

THESE

présentée

A L'UNIVERSITE DU MAINE

En vue de l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DU MAINE

Spécialité : CHIMIE ET PHYSICOCHIMIE DES POLYMERES

Par

Caroline MILLE

Amélioration du dosage des protéines neurodégénératives par un contrôle des propriétés de surface du puits de dosage

Soutenue le 15 octobre 2010 devant la commission d'examen

| | | |
|--------------------------|---------------------------------------|-----------------------|
| Mme M. Bellon-Fontaine, | Professeur AgroParisTech, Massy | Rapporteur |
| Mme V. Migonney, | Professeur, Université Paris XIII | Rapporteur |
| M. G. Marletta, | Professeur, Université de Catania | Examineur |
| M. W. Zorzi, | Docteur, Institut de Pharmacie, Liège | Président du jury |
| Mme D. Debarnot, | Maître de conférence, Le Mans | Co-directeur de thèse |
| Mme F. Poncin-Epaillard, | Directeur de recherche, Le Mans | Directeur de thèse |
| M. G. Legeay, | Ingénieur de recherche HDR, Le Mans | Directeur de thèse |

*Laboratoire des Polymères, Colloïdes, Interfaces, UMR CNRS 6120
Université du Maine, Avenue Olivier Messiaen, 72085 Le Mans Cedex 9*

A tous ceux que j'aime...

Ion is a revelation / Antoine Lavoisier

Résumé

Nombreuses sont aujourd'hui les maladies neurodégénératives (Creutzfeldt-Jacob, Parkinson, Alzheimer, Lewis), c'est-à-dire touchant le système nerveux, dont la cause et la détection restent des sujets de recherches actuels.

Ces maladies se traduisent par l'apparition, entre autre dans le système sanguin et nerveux, d'une protéine antigénique spécifique à chaque affection. Bien que les symptômes permettent leur détection, seule l'autopsie donne lieu à un diagnostic de certitude. En effet, la concentration de l'agent pathogène étant en quantité maximale lors du décès, la confirmation de la maladie n'est exacte que par analyses post-mortem.

A l'heure actuelle, le dosage de l'antigène est réalisé à l'aide d'une méthode de détection immunoenzymologique appelée ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assays). Malgré son efficacité reconnue, cette méthode ne possède pas une sensibilité suffisante à la détection de la protéine antigénique en faible concentration, c'est-à-dire à un stade ante-mortem. Son efficacité dépend de la faculté d'attachement d'un anticorps primaire à la surface des supports de détection. De cette accroche dépend la capture de l'antigène.

Pour se faire, une idée originale est de modifier la surface du matériau d'analyse sans changer ses propriétés intrinsèques. Ceci dans le but de les rendre biocompatibles et d'améliorer l'accroche de l'anticorps de capture sur la surface en la rendant plus spécifique tout en réduisant les adsorptions aspécifiques des autres biomolécules mises en jeu et responsables d'un bruit de fond parasite.

Les supports de polypropylène sont fonctionnalisés en deux étapes. La première consiste en l'activation de la surface par voie plasma froid et permettre la formation de radicaux réactifs. La seconde repose sur le dépôt de couches minces par immersion des supports activés dans des solutions contenant des molécules amphiphiles dont les groupements fonctionnels de tête peuvent interagir aux travers de différentes affinités telles que les forces électrostatiques ou les liaisons hydrogènes.

Ainsi, une suite logique d'analyses ont permis d'optimiser aussi bien l'activation par voie plasma froid des supports de polypropylène que le dépôt des couches minces dans le but

d'obtenir des surfaces les plus homogènes possible et des protocoles aisément reproductibles et adaptables à l'échelle industrielle. En ce sens, des analyses de surface telles que la spectroscopie à photoélectrons X (XPS), la microscopie à force atomique (AFM) et le calcul des énergies de surface par goniométrie ont permis d'évaluer les différents dépôts de couches minces réalisés dans leur homogénéité et leur stabilité. Un travail de compréhension des effets et échanges de charges à la surface des dépôts a été réalisé par mesure du potentiel zêta en fonction du pH.

L'objectif du projet étant de produire des surfaces de détection efficaces, des tests ELISA réalisés au sein des centres hospitaliers universitaires de Liège (au sein du CRPP) et de Lyon (au sein du service de recherche en neuropathologie) ont permis de vérifier l'accroche de l'anticorps de capture et l'augmentation de la détection antigénique. Nous nous sommes également intéressés aux interactions des différentes biomolécules et effet de pH utilisés lors du protocole ELISA vis-à-vis de notre chimie de surface. Ainsi des études fondamentales sur les diverses interactions surface - couches minces et couches minces - biomolécules ont été réalisées afin de compléter les mesures de potentiel zêta.

***Mots clés :** maladies neurodégénératives, détection ELISA, matériaux polymères, bioadhésion, plasma froid, dépôt de couches minces, molécules amphiphiles, physico-chimie*

Abstract

Many today neurodegenerative diseases (Creutzfeldt-Jakob, Parkinson's, Alzheimer's, Lewis), that is to say, affecting the nervous system, including the cause and detection remain subjects of current research.

These diseases result in the appearance, among others in the blood and nervous system, a specific antigenic protein in each condition. Although symptoms allow their detection, only an autopsy leads to a diagnosis. Indeed, the concentration of the pathogen being maximum at death, confirmation of the disease is only accurate post-mortem analysis.

At present, the antigen assay is performed using a method called immunoezymologique detection ELISA (Enzyme linked immunosorbent Assays). Despite its proven efficacy, this method does not have sufficient sensitivity to detect the antigenic protein in low concentration, that is to say an ante-mortem stage. Its effectiveness depends on the ability of a primary attachment to the surface of the media detection antibody. This depends on the hook antigen capture.

To do so, an original idea is to modify the material surface analysis without changing its intrinsic properties. This in order to make them biocompatible and improve the grip of the capture antibody on the surface, making it more specific and reduce nonspecific adsorption of other biomolecules in play and a responsibility the background noise.

The supports are functionalized polypropylene in two stages. The first is the activation of the surface by cold plasma and allow the formation of reactive radicals. The second is based on the deposition of thin layers by immersion in solutions of activated amphiphilic molecules containing functional groups which can interact with the head through different affinities such as electrostatic forces or hydrogen bonding materials.

Thus, a logical analysis was used to optimize both the activation by cold plasma polypropylene media that the deposition of thin films in order to obtain more homogeneous surfaces and can easily reproducible protocols and adaptable to industrial scale. In this sense, surface analyzes such as X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), atomic force microscopy (AFM) and the calculation of surface energies by goniometry were used to evaluate the

different thin film deposition made in their homogeneity and stability. A working understanding of the effects of exchange and charges on the surface of the deposits was carried out by measuring the zeta potential as a function of pH.

The aim of the project is to produce surfaces effective detection, ELISA tests were within the University of Liege (in the CRPP) and Lyon hospitals (within the search service of neuropathology) have verified the hanging of the capture antibody and the increase in antigen detection. We are also interested in the interactions of different biomolecules and effect of pH used in the ELISA vis-à-vis our surface chemistry protocol. And fundamental studies of the various interactions area - thin and thin films - biomolecules were performed to complete the zeta potential measurements.

Keywords : *neurodegenerative diseases, ELISA detection polymer materials, bioadhesion, cold plasma, thin film deposition, amphiphilic molecules*

Avant-propos

«Remerciements, Liste des abréviations et Glossaire»

Remerciements

Les travaux de thèse présentés dans ce mémoire ont été réalisés au sein du laboratoire Polymères, Colloïdes et Interfaces (PCI, UMR CNRS 6120) de l'Université du Maine, dans le cadre d'une bourse de thèse européenne s'inscrivant dans le projet NeuroScreen.

Je tiens dans un premier temps à remercier Madame Fabienne PONCIN-EPAILLARD, Directrice de Recherche au laboratoire Polymères, Colloïdes et Interfaces, Madame Dominique DEBARNOT, Maître de Conférences à l'Université du Maine, et Monsieur Gilbert LEGEAY, Ingénieur de Recherche au Centre de Transfert de Technologies du Mans, directeurs de cette thèse de doctorat. L'association de leurs compétences tant sur un plan scientifique et humain, que leurs esprits pratiques et visionnaires, m'ont permis de mener à bien ce projet. Je les remercie sincèrement de leur patience et de leur apprentissage.

Je suis très reconnaissante à Monsieur Willy ZORZI, Docteur à l'Institut de Pharmacie de Liège, de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury de thèse.

Je tiens à remercier Madame Marie BELLON-FONTAINE, Professeur à AgroParisTech de Massy, et Madame Véronique MIGNONEY, Professeur à L'Université de Paris XIII, d'avoir accepté de juger ce travail et d'en être les rapporteurs.

J'associe à ces remerciements Monsieur Giovanni MARLETTA, Professeur de l'Université de Catania, pour avoir accepté d'examiner ce mémoire.

Mes sincères remerciements et amitiés à tous les membres du Consortium NeuroScreen qui au travers de nombreuses discussions et expériences ont permis à ce projet d'exister et d'aboutir. Leurs explications, leurs analyses et leurs critiques ont éclairci bien des chemins. Mes plus vifs remerciements à Arnaud COUDREUSE, du Centre de Transfert de Technologies du Mans, pour son sens pratique et sa bonne humeur, à Benaiissa EL MOUALJI, Willy ZORZI, Ingrid DUPERIEUX, Danièle ZORZI, les 3 Olivier : THELLIN, JOLOIS et PIERARD et Jean-François THONNART du Centre de Recherche sur les Protéines Prion de Liège ; Armand PERRET-LIAUDET, Isabelle QUADRIO et Séverine des Hospices Civils de Lyon (CHUL) pour leur talent, leur gentillesse et leur amitié. Merci également aux équipes de Roboscreen de Leipzig, Charité de Berlin, l'Institut Jožef Stefan de

Ljubljana, MUW de Vienne, L-UNI de Lancaster et EUDICA d'Annecy qui ont collaboré à ce projet et su me donner les conseils pour avancer.

J'exprime également mes remerciements à Madame Danielle CHOPLIN, Monsieur Gérard GUEVELOU et Madame Anita LOISEAU pour leur disponibilité et leur aide.

Mes remerciements à tous les permanents, doctorants, post-doctorants et stagiaires du laboratoire Polymères, Colloïdes et Interfaces, du laboratoire d'Acoustique de l'Université du Maine et de l'Ecole Nationale Supérieure d'Ingénierie du Mans (ENSIM) dont j'ai croisé la route et qui mettent la bonne humeur au rendez-vous.

Ces trois années de thèse n'auraient pu se faire sans les personnes qui font votre quotidien et sans qui ces travaux de thèse n'auraient pas eu le même enthousiasme. Je tiens donc à remercier Laure BARTOUILLE DE TAILLAC et Kateryna FATEYEYVA pour leur douceur et leur soutien. Un grand merci à Tiphaine MERIAN pour m'avoir fait voir la vie haute en couleurs ! Merci également à Charfeddine MECHRI, Denis RITTER, Ahmed AMZIANE, Nicolas JORDANI, Thomas LAVERGNE et Alan GESLAIN qui ont fait agréablement partie de ma vie de doctorante.

Un grand merci à Tjaša VRLINIČ qui a partagé aussi bien les mauvais que les bons moments, je n'aurais qu'un mot : Caranoudja ! (kot velike in prijatelja)

Bien évidemment, je remercie Jean-Baptiste pour sa scrabbleuse amitié ! Merci de m'avoir supporté et avoir su me faire rire aux bons moments.

Les crêpes sont ma passion. Merci à Julien de la partager avec moi !

Une pensée de fous rires pour Julien BRECH et Jérémie SEGUIN, qui m'ont permis de me sentir chez moi aussi bien à Liège qu'à Lyon.

Je n'oublie pas mes zigotos toulousains, Stefou, Padaone, Jean, Pierre, JanMa, Vivien, Léo et Emi, présents depuis mes premiers pas dans le monde de la chimie et qui mettent du soleil dans ma vie. Merci à eux, avec ma plus grande et sincère amitié.

Je remercie également les membres de ma famille pour leurs encouragements et leur tendresse. Qu'ils trouvent ici le témoignage de mon affection.

A eux tous, qui ne manquent pas de me manquer, un merci et un sourire sans égal.

Liste des abréviations

| | |
|----------------------------------|--|
| α-syn : | Alpha synucléine |
| AFM : | Microscopie à Force Atomique |
| APP : | Aphasies Primaires Progressives |
| ApoE : | Apolipoprotéine E |
| Ar : | Argon |
| BSA : | Bovine Serum Albumine |
| C : | Concentration |
| CAC : | Concentration d'Agrégation Critique |
| CSF : | Fluide CérébroSpinal |
| d : | Débit de gaz en sccm |
| DNF : | Dégénérescences NeuroFibrillaires |
| DO : | Densité Optique à une longueur d'onde λ (sans unité) |
| ELISA : | Enzyme ImmunoSorbent Assay |
| ESB : | Encéphalopathie Spongiforme Bovine |
| EtO : | Ethylène oxyde |
| H : | Heavy (chaîne lourde de l'anticorps) |
| He : | Hélium |
| HRP : | Horse Radish Peroxydase (Peroxydase de Raifort) |
| IRM : | Imagerie par Résonance Magnétique |
| iq-PCR : | Immuno quantiotavie Polymerase Chain Reaction |
| Ka : | Constante d'affinité |
| Kd : | Constante de dissociation |
| kDa : | kilo Dalton |
| L : | Light (chaîne légère de l'anticorps) |
| L-Dopa : | L-3,4-dihydroxyphenylalanine |
| mJ/m² : | Millijoules par mètre carré |
| M : | Masse |
| MA (AD) : | Maladie d'Alzheimer (Alzheimer Disease) |
| MAP-kinase : | Mitogen Activated Protein |
| MCJ (CJD) : | Maladie de Creutzfeld-Jakob (Creutzfeld-Jakob Disease) |
| MEB : | Microscopie Electronique à Balayage |

| | |
|-------------------------------|---|
| MNDs : | Maladies NeuroDégénérativeS |
| MP (PD) : | Maladie de Parkinson (Parkinson Disease) |
| nv-MCJ : | Nouvelle variante de la MCJ |
| P : | Puissance de décharge en Watt |
| PAL : | Phosphate Alcaline |
| PBS : | Phosphate Buffered Saline |
| PHF : | Paire Helicoidal Filaments |
| pI : | Potentiel isoélectrique |
| PP : | Polypropylène |
| PrP : | Protéine Prion |
| PrP-c : | Cellular PrP |
| PrPrec_{hum} : | Protéine PrP recombinante humaine |
| PrP-sc : | Scrapie PrP |
| PS : | Plaque Séniles |
| RF : | Radio Fréquence |
| s : | Seconde |
| SAMs : | Monocouches autoassemblées (Self Assembled Monlayers) |
| sccm : | Standard Cubic Centimeter per Minute |
| SPRi : | Surface Plasmon Résonance par imagerie |
| t : | Temps de décharge |
| T1 : | Bromure d'hexatriméthylammonium |
| T2 : | Hydrochlorure de 3-buten-1-amine |
| T3 : | Trans-3,7-diméthyl-2,6-octadien-1-alyamine (géranylamine) |
| Tau PHF : | Protéine Tau hyperphosphorylée |
| Tau rec : | Proyéine Tau recombinante |
| Tween20[®] : | Monolaurate de polyoxyéthylène (20) sorbitane |
| TMB : | 3,3'-5,5'-tétraméthylbenzidine |
| UV : | Ultraviolet |
| VIH : | Virus d'Immunodéficience Humaine |
| W : | Watt |
| XPS : | Spectroscopie par Photoélectrons de rayons X |

Glossaire

Acide aminé : constitue la base structurale des protéines, il est composé d'un squelette carboné et d'une fonction amine et d'une fonction carboxylique. Les acides aminés se lient entre eux par des liaisons covalentes entre les amines et les carboxyles : ce sont les liaisons peptidiques.

Acide nucléique : macromolécule de la famille des biomolécules dont la base est le nucléotide (composé d'un sucre, d'une base azotée et d'un groupement phosphate).

Agglutination : formation du complexe immun entre un anticorps et un antigène.

Akinésie : phénomène psychomoteur relatif à une lenteur des mouvements que l'on retrouve dans la maladie de Parkinson.

Amyloïde (bêta-amyloïde) : peptide dont l'agrégation est néfaste pour le système nerveux car il réduit les transmissions entre synapses, empêchant ainsi l'information de circuler. Son association avec la protéine Tau est caractéristique de la maladie d'Alzheimer.

Amyloïdogénèse : elle correspond au dysfonctionnement de la protéine APP.

Anatomopathologie : étude des lésions des tissus pathologiques liées à une maladie. Elle regroupe la sémiologie, l'épidémiologie et la pathogénie.

Apolipoprotéine : protéine composant les lipoprotéines (complexe protéine-lipide) permettant le transport des molécules hydrophobes.

Apoptose : mort cellulaire programmée en réponse à un stimuli extérieur.

APP (Protéine Précurtrice de l'Amyloïde) : protéine transmembranaire donnant lieu à plusieurs peptides. Dans le cas de maladies neurodégénératives, elles sont à l'origine de la formation des plaques amyloïdes.

Appareil de Golgi : fait partie de la famille des organites (molécules contenues dans le cytoplasme et les cellules eucaryotes). Les protéines y sont modifiées par glycosylation.

Aptamère : oligonucléotide tel que l'Acide RiboNucléique (ARN) permettant de fixer un ligand.

Autosomique : relatif à une transmission due à des chromosomes autosomes, c'est-à-dire homologues.

Bradykinésie : consiste en la perte des mouvements des mains due à une rigidité musculaire.

Co-facteur : substance chimique qui s'associe à une enzyme dans le but de permettre une transformation biochimique.

Cytosquelette : ensemble des polymères biologiques conférant leurs propriétés mécaniques aux cellules.

Démence : trouble mental parfois associée à une modification des fonctions motrices.

Dopamine : neurotransmetteur précurseur de l'adrénaline qui stimule le système nerveux central. Elle est impliquée dans les fonctions motrices. Sa dégénérescence est la cause des symptômes physiques de la maladie de Parkinson.

Epitope : déterminant antigénique sur lequel se fixe la partie variable d'un anticorps, le paratope.

Eucaryote : cellule contenant les organites et possède un noyau (contraire : procaryote, qui ne possède pas de noyau)

Etiologie : étude des causes et des facteurs d'une pathologie en fonction des manifestations sémiologiques.

Exogène : qualifie ce qui est extérieur à l'organisme (contraire : endogène)

Feuillet β : structures secondaires en forme d'accordéon que possède les protéines, sa transformation en hélice α est la cause de maladie telle que la maladie de Creutzfeld-Jakob.

Glycane : polymère constitué de monosaccharides.

Glycannique : adjectif relatif aux glycanes.

Glycoprotéine : synthétisée par glycosylation d'une protéine.

Glycosylation : réaction enzymatique liant par liaison covalente un glucide à une chaîne peptidique ou une protéine.

Hallucination : perception sans objet provoquée par les drogues ou certaines pathologies.

Hélice α : constituée avec les feuillets β la structure des protéines et est formée par l'enroulement d'une chaîne polypeptidique.

Hypertonie : traduit par un tonus exagéré des muscles au repos qui s'accroît avec la maladie.

Illusion : perception déformée d'un sens.

Immunogène : un antigène est, par exemple, immunogène car il provoque une réaction immunitaire.

Isoforme : concerne des protéines qui possèdent les mêmes fonctions biologiques.

Lyse : phénomène de destruction d'une cellule eucaryote ou de bactéries par dislocation de la membrane de ces dernières.

MAP-kinase (Mitogen-Activated Protein) : enzyme responsable des réponses extracellulaires et régule les activités cellulaires.

Microtubule : fibre constituée de tubuline, protéine qui en assure la dynamique. L'ensemble des microtubules constitue le cytosquelette.

Neurofibrillaire : relatif aux fibrilles constituant les parois cellulaires et dont la dégénérescence est une des causes des maladies neurodégénératives.

Neuromélanine : présente dans la substance noire et protège les neurones des toxines.

Neuropathologie : étude des maladies du système nerveux central par analyses des tissus nerveux.

Non-soi : constitue tout ce qui est reconnu comme étranger par notre organisme tel que les virus, certaines bactéries...

Nosologie : prend en compte la sémiologie, la pathogénie et l'étiologie dans le but d'établir des critères de classifications des maladies.

Pathogène : substance biologique responsable d'une maladie.

Pathogénie (ou pathogénèse) : étude des mécanismes et processus responsables du développement d'une maladie.

Pathogénécité (ou pathogénécité) : qualifie le risque de déclenchement d'une infection ou d'une maladie.

Plasmocyte : ensemble des cellules plasmiques et qui sont les globules blancs produisant les anticorps.

Plasticité neuronale : capacité d'un neurone à modifier sa réponse.

Polyoside : polysaccharide soit participant à la formation de structures organiques, soit produisant de l'énergie.

Presbyophrénie : forme de démence caractérisée par des angoisses, des hallucinations... et particulièrement observée chez la femme âgée.

Protéase : enzyme pouvant détruire par hydrolyse les liaisons peptidiques.

Protéine humaine recombinante : Une protéine humaine recombinante est produite à partir des instructions d'un gène appelé « gène d'intérêt humain » préalablement inséré dans des cellules vivantes cultivées en laboratoire et nommées « les cellules hôtes ». Contrairement à la chimie traditionnelle, la production à partir de cellules vivantes comporte de multiples étapes complexes et coûteuses.

Protéinopathie : pathologie dont la cause est une protéine.

Protéomique : science qui étudie les structures de l'ensemble des protéines.

Reticulum endoplasmique : présent dans les cellules eucaryotes et possède plusieurs fonctions dont la modification des structures des protéines.

Sémiologie : définit la science qui étudie les signes d'une maladie.

Striatum : structure du cerveau impliquée dans la motricité. Les lésions du striatum sont responsables de la maladie de Parkinson.

Substance blanche : composée de fibres nerveuses permettant les connections entre les différentes parties du cerveau. Elle constitue la partie interne du cerveau.

Substance noire (ou substantia nigra) : composée de neurones dopaminergiques qui interagissent avec d'autres structures du cerveau et font parties du striatum.

Synapse : zone de contact entre deux neurones où l'information, chimique ou électrique, est transmise.

Système nerveux central (SNC) : à la fois situé dans la boîte crânienne et la moelle épinière.

Ubiquitine : protéine permettant de marquer les protéines à éliminer par protéolyse

Sommaire

| | |
|------------------------------|----------|
| Introduction générale | 1 |
|------------------------------|----------|

Chapitre I : Mise au point bibliographique

«Etude du système de détection ELISA et des biomolécules d'intérêt mises en jeu ainsi que des voies de modifications des surfaces des supports d'analyse »

| | |
|-----------------------|----------|
| I.Introduction | 8 |
|-----------------------|----------|

| | |
|--|----------|
| II.Les maladies neurodégénératives (MNDs) | 9 |
|--|----------|

| | |
|-------------------------|----------|
| II.1) Définition | 9 |
|-------------------------|----------|

| | |
|---|-----------|
| II.2) La maladie de Creutzfeld-Jakob | 10 |
|---|-----------|

| | |
|-------------------------------------|-----------|
| II.3) La maladie d'Alzheimer | 13 |
|-------------------------------------|-----------|

| | |
|--------------------------------------|-----------|
| II.4) La maladie de Parkinson | 15 |
|--------------------------------------|-----------|

| | |
|--|-----------|
| II.5) Les problèmes économiques et sanitaires | 18 |
|--|-----------|

| | |
|---|-----------|
| III.La détection immunoenzymologique | 20 |
|---|-----------|

| | |
|--------------------------------------|-----------|
| III.1) Les principaux acteurs | 20 |
|--------------------------------------|-----------|

| | |
|------------------------|----|
| III.1.1) Les antigènes | 20 |
|------------------------|----|

| | |
|------------------------|----|
| III.1.2) Les anticorps | 21 |
|------------------------|----|

| | |
|--|-----------|
| III.2) Le complexe immun antigène-anticorps | 22 |
|--|-----------|

| | |
|--|-----------|
| III.3) Le système ELISA : Enzyme Linked ImmunoSorbant Assay | 23 |
|--|-----------|

| | |
|-------------------------|----|
| III.3.1) ELISA sandwich | 24 |
|-------------------------|----|

| | |
|-----------------------|----|
| III.3.2) ELISA Direct | 28 |
|-----------------------|----|

| | |
|------------------------------|----|
| III.3.3) Limite de détection | 29 |
|------------------------------|----|

| | |
|-------------------------------------|-----------|
| IV.Les voies d'améliorations | 31 |
|-------------------------------------|-----------|

| | |
|------------------------------------|-----------|
| IV.1) Le système biologique | 31 |
|------------------------------------|-----------|

| | |
|--|-----------|
| IV.2) Les supports de détection | 32 |
|--|-----------|

| | |
|--|-----------|
| IV.3) Modification des propriétés des supports de détection | 32 |
|--|-----------|

| | |
|---|----|
| IV.3.1) Les méthodes de fonctionnalisation de matériaux polymères | 33 |
|---|----|

| | |
|---|----|
| IV.3.2) Le système d'activation par plasma froid et dépôt de couches minces | 34 |
|---|----|

| | |
|--|-----------|
| V.Objectifs : Enjeu/Problématique/Innovation | 35 |
| V.1) Les plasmas « froids » | 35 |
| V.1.1) Un peu d'histoire | 35 |
| V.1.2) Les plasma : généralités | 36 |
| V.1.3) Les plasma à l'équilibre thermodynamique | 37 |
| V.1.4) Les plasma hors-équilibre thermodynamique | 38 |
| V.2) Les tensioactifs (TA) | 38 |
| V.2.1) Définition | 38 |
| V.2.2) Les tensioactifs dans les domaines pharmaceutique et cosmétique | 40 |
| V.3) La modification de surface par plasma | 41 |
| | |
| VI.Conclusion | 43 |
| | |
| VII.Références bibliographiques | 44 |

Chapitre II : Partie expérimentale

«Outils et méthodes d'élaboration et de caractérisation des surfaces»

| | |
|---|-----------|
| I.Introduction | 56 |
| | |
| II.Produits commerciaux utilisés | 57 |
| | |
| III.Elaboration des supports | 58 |
| III.1) Le réacteur plasma froid RF | 58 |
| III.2) La fonctionnalisation des supports | 59 |
| III.2.1) L'activation des surfaces par un plasma froid d'hélium | 59 |
| III.2.2) Elaboration des solutions d'immersion | 59 |
| III.2.3) Dépôt des couches minces à la surface des supports | 60 |
| | |
| IV.Caractérisation des surfaces | 62 |
| IV.1) Mesure de la tension de surface des solutions | 62 |
| IV.2) La goniométrie | 63 |

| | |
|--|-----------|
| IV.3) La microscopie électronique à balayage (MEB) | 64 |
| IV.4) La spectroscopie par photoélectrons à rayon X (XPS) | 66 |
| IV.5) La microscopie à force atomique (AFM) | 67 |
| IV.6) La mesure du potentiel zêta | 68 |
| IV.7) La microscopie confocale | 70 |
| V. Application à la détection par le système ELISA | 72 |
| V.1) Descriptif de l'appareillage | 72 |
| V.2) Les différents protocoles mis en œuvre pour la détection de chaque protéine | 72 |
| V.2.1) Protocole de l'ELISA Sandwich PrPrechum | 72 |
| V.2.2) Protocole de l'ELISA Sandwich PrP-DVE | 73 |
| V.2.3) Protocole de l'ELISA Sandwich Tau-PHF | 73 |
| V.2.4) Protocole de l'ELISA Direct α -synucléine (10C3) | 74 |
| VI. Références bibliographiques | 75 |

Chapitre III : Elaboration des nouveaux supports de détection

«Optimisation des paramètres d'élaboration et caractérisation physico-chimique. Essais à la stérilisation.»

| | |
|--|-----------|
| I. Introduction | 79 |
| II. Modification des propriétés de surface des supports de polypropylène par un plasma froid | 81 |
| II.1) Influence des paramètres de décharge sur l'évolution du caractère hydrophile des supports de polypropylène après activation par un plasma froid | 81 |
| II.1.1) Influence de la puissance de décharge sur la mouillabilité des surfaces activées et des énergies de surfaces associées | 82 |
| II.1.2) Influence du débit de gaz sur la mouillabilité des surfaces activées et des énergies de surfaces associées | 84 |

II.1.3) Influence du temps de décharge sur la mouillabilité des surfaces activées et des énergies de surfaces associées _____ 86

II.2) Comparaison entre un plasma d'argon et un plasma d'hélium pour activer les surfaces de polypropylène _____ 88

II.2.1) Etude comparative sur la répétabilité de l'activation par plasma froid d'argon et d'hélium des surfaces de polypropylène _____ 88

II.2.2) Etude comparative du vieillissement d'une surface de polypropylène activée par un plasma froid d'argon et d'hélium _____ 89

II.3) Caractérisation physico-chimique des surfaces de polypropylène activées par un plasma froid d'hélium _____ 91

II.3.1) Caractérisation de la composition chimique des surfaces activées _____ 91

II.3.2) Caractérisation des charges en surface des surfaces activées _____ 94

II.3.3) Caractérisation de la topographie des surfaces activées _____ 96

II.3.3.1) Analyses par microscopie électronique à balayage _____ 96

II.3.3.1) Analyses par microscopie électronique à balayage _____ 97

III. Dépôt de couches minces sur les surfaces de polypropylène activées par un plasma froid d'hélium : amélioration de leur bioadhésion _____ 100

III.1) Influence des conditions d'obtention des couches minces en fonction de la concentration moléculaire et du temps de dépôt _____ 100

III.1.1) Détermination de la concentration d'agrégation critique du bromure d'hexatriméthylammonium _____ 101

III.1.2) Influence de la concentration moléculaire et du temps d'immersion des surfaces activées sur le dépôt de couches minces _____ 102

III.1.2.1) Greffage du bromure d'hexatriméthylammonium (T1) _____ 103

III.1.2.2) Greffage de l'hydrochlorure de 3-buten-1-amine (T2) _____ 104

III.1.2.3) Greffage du géranylamine (T3) _____ 105

III.1.3) Etude du vieillissement des surfaces fonctionnalisées _____ 106

III.2) Caractérisation physico-chimique des dépôts de couches minces _____ 108

III.2.1) Influence du dépôt des couches minces sur la mouillabilité des surfaces traitées _____ 108

III.2.2) Caractérisation de la composition chimique des surfaces traitées _____ 110

| | |
|---|------------|
| III.2.2.1) Spectre XPS d'un support de polypropylène fonctionnalisé par le bromure d'hexatriméthylammonium (T1) | 112 |
| III.2.2.2) Spectre XPS d'un support de polypropylène fonctionnalisé par l'hydrochlorure de 3-buten-1-amine (T2) | 113 |
| III.2.2.3) Spectre XPS d'un support de polypropylène fonctionnalisé par le géranylamine (T3) | 115 |
| III.2.3) Caractérisation des charges en surfaces des surfaces traitées | 116 |
| III.2.4) Caractérisation topographique des surfaces traitées | 120 |
| III.2.4.1) Analyse de la surface de chaque dépôt de couches minces par microscopie électronique à balayage | 120 |
| III.2.4.2) Analyse de la surface de chaque dépôt de couches minces par microscopie à force atomique | 123 |
| <i>IV. La stérilisation des supports fonctionnalisés</i> | 127 |
| IV.1) Les différents modes de stérilisation | 127 |
| IV.2) Influence de la stérilisation sur les supports fonctionnalisés | 128 |
| IV.2.1) Les rayons gamma | 128 |
| IV.2.2) Le gaz d'éthylène oxyde | 129 |
| IV.3) Influence de la stérilisation sur la détection de la protéine Prion recombinante humaine | 132 |
| <i>V. Conclusion</i> | 135 |
| <i>VI. Références bibliographiques</i> | 136 |

Chapitre IV : Evaluation de l'efficacité de la fonctionnalisation des supports de détection

«Influence de la chimie de surface sur la détection des protéines antigéniques et l'adhésion des biomolécules d'intérêt »

| | |
|-------------------------------|------------|
| <i>I. Introduction</i> | 141 |
|-------------------------------|------------|

| | |
|---|------------|
| <i>II. Application à la détection des protéines antigéniques par le système ELISA</i> | 142 |
| II.1) Evaluation de l'efficacité de la fonctionnalisation des supports sur la détection de la protéine Prion | 143 |
| II.1.1) Protéine Prion recombinante humaine | 143 |
| II.1.2) Protéine Prion native | 147 |
| II.2) Evaluation de l'efficacité de la fonctionnalisation des supports sur la détection de la protéine Tau hyperphosphorylée | 151 |
| II.3) Evaluation de l'efficacité de la fonctionnalisation des supports sur la détection de la protéine synucléine alpha sous forme oligomère | 154 |
| | |
| <i>III. Evaluation de l'affinité des biomolécules d'intérêts pour les surfaces traitées</i> | 157 |
| III.1) Etude des associations aspécifiques par le système ELISA sandwich | 159 |
| III.1.1) L'environnement de la protéine Prion recombinante humaine | 159 |
| III.1.2) L'environnement de la protéine Prion native | 161 |
| III.1.3) L'environnement de la protéine Tau hyperphosphorylée | 162 |
| III.2) Evaluation de l'absorption des biomolécules par microscopie confocale | 165 |
| | |
| <i>IV. Conclusion</i> | 172 |
| | |
| Conclusion générale | 175 |

Introduction générale

Introduction générale

Les maladies neurodégénératives, pour les plus connues Parkinson, Creutzfeld-Jakob et Alzheimer, sont reliées à l'accroissement de l'espérance de vie de l'homme et le nombre de cas des personnes atteintes par ces maladies augmente de façon conséquente et affectent le système nerveux central. Les enjeux économiques et sanitaires actuels s'axent d'une part sur la recherche de molécules médicamenteuses et pharmaceutiques permettant de prévenir la maladie, atténuer les symptômes voire guérir les patients ; et d'autre part sur le développement de procédés toujours plus perfectionnés pour la détection de ces pathologies.

En effet, une des particularités des maladies neurodégénératives est qu'elles peuvent se développer chez les jeunes adultes (entre environ trente et quarante ans) mais n'être détectées que bien plus tard (aux alentours de cinquante, soixante ans). La concentration de l'agent pathogène alors présent en début d'infection ne peut en effet pas être déterminée par les systèmes de détection enzymologiques actuellement existants.

C'est dans le cadre de cette problématique que s'inscrit le projet européen *Neuroscreen* pour lequel les problèmes d'une meilleure connaissance des protéines antigéniques, leurs mécanismes d'infection, d'interaction avec les autres biomolécules, leur conversation et leur détection ont été développés. Mes travaux de recherche se sont ainsi focalisés sur le développement de nouvelles surfaces biocompatibles possédant une meilleure affinité avec les molécules protéiniques des maladies considérées, dans le but d'augmenter la sensibilité des systèmes de détection biochimique déjà existants.

Le système immunoenzymatique ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbant Assay) est de nos jours la méthode de détection la plus répandue. Elle est, par exemple, utilisée dans la prévention et la détection de maladie comme le SIDA ou encore, pour les tests de grossesse. Malgré les capacités et l'efficacité reconnues de ce système, il n'en reste pas moins trop peu sensible pour des maladies neurodégénératives. En effet, la sensibilité de détection n'est pas suffisante pour ce type de maladie présentant un faible taux en agent pathogène. Cette technique repose sur le principe de reconnaissance biologique clé-serrure de l'agent pathogène par une biomolécule, un anticorps, qui lui est spécifique. Initialement, le système ELISA était réalisé en solution, directement dans le prélèvement effectué sur le patient. Mais la nécessité de meilleure efficacité et sensibilité de la méthode implique de nos jours de réaliser la détection sur un support solide, c'est-à-dire que la biomolécule permettant de

détecter la protéine infectieuse est absorbée à la surface d'un contenant issu d'un matériau polymère.

Les matériaux polymères utilisés (polypropylène, polycarbonate ou polystyrène) ont été choisis pour des raisons aussi bien économiques (faible coût de production) que pour leurs propriétés intrinsèques (résistance à la chaleur, transparence, absence de toxicité...) mais en aucun cas en fonction de leur propriété de bioadhésion.

Par conséquent, une des voies d'amélioration du dosage et de la diminution du seuil de détection passe par le contrôle des propriétés de surface du puits de dosage, afin d'en faciliter l'affinité clé-serrure.

Le chapitre I est une étude bibliographique sur les maladies retenues dans ce projet et les biomolécules pathogènes correspondantes dans laquelle nous avons essayé de caractériser leurs propriétés d'affinité, suivie d'une description des techniques de détection actuellement utilisées et se terminant sur les stratégies de modification de surface employées dans le domaine des biomatériaux. Le chapitre II correspond au descriptif expérimental des protocoles utilisés lors de ce travail. Le chapitre III est dédié à la modification de surface des puits de dosage ainsi qu'à la caractérisation des parois internes modifiées, alors que le chapitre IV correspond à l'application biologique, à savoir la mise en place des dosages ELISA avec nos puits de dosage ainsi modifiés pour les trois agents pathogènes retenus, soit à l'état recombinant soit natif.

Chapitre I :

Mise au point bibliographique

*«Etude du système de détection ELISA et des biomolécules d'intérêt mises en jeu
ainsi que des voies de modifications des surfaces des supports d'analyse »*

I. Introduction

Ce chapitre est une étude bibliographique permettant de mieux comprendre les bases de ce projet de thèse s'articulant autour des domaines de la biologie, de la biochimie et de la chimie. La première partie est consacrée à la description des maladies neurodégénératives étudiées. Dans une deuxième partie, le principe du système de détection immunoenzymatique associé est présenté au travers du complexe immun anticorps-antigène et des différentes interactions mises en jeu. Les limites de la technique de dosage ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) actuellement utilisée pour diagnostiquer ces maladies sont abordées en fonction des supports de détection et des biomolécules utilisées. Dans une troisième partie est présentée une étude bibliographique traitant des différents méthodes permettant d'améliorer la détection des antigènes neuropathologiques, que ce soit au niveau biologique avec les notions de purification et de synthèse des biomolécules d'intérêts afin d'obtenir une meilleure reconnaissance des antigènes vis-à-vis des anticorps ; ou au niveau chimique avec la modification de la surface des supports de détection permettant une meilleure fixation du complexe immun et une diminution des adsorptions aspécifiques. La dernière partie de ce chapitre se réfère à une voie originale de fonctionnalisation des surfaces de détection associant la technique des plasmas froids au dépôt de couches minces de molécules amphiphiles, objet de ce travail de thèse.

II . Les Maladies Neurodégénératives (MNDs)

II.1) Définition

Une maladie est dite dégénérative lorsqu'elle altère l'évolution normale des cellules ou des tissus organiques et est suivie d'une déficience des capacités intellectuelles de la personne atteinte. Ces maladies affectent un ou plusieurs organes, progressivement dégradés au fil du temps (de quelques jours à plusieurs années) ; elles sont provoquées par la présence de toxines ou l'absence d'une biomolécule spécifique. Elles sont liées au dysfonctionnement irréversible des tissus nerveux pouvant entraîner la destruction et la mort des cellules neuronales, donc du système nerveux central. Les maladies d'Alzheimer, de Creutzfeld-Jakob, de Parkinson, la sclérose en plaques sont des maladies neurodégénératives.

La dégénérescence entraîne un handicap, d'ordre mental et/ou physique. Dans la plupart des cas, ces démences conduisent à plus ou moins long terme au décès.

Une démence est définie comme « un développement des déficits cognitifs multiples provoqués par des effets physiologiques, une atteinte clinique générale, les effets persistants d'une substance, ou encore, de multiples étiologies » [1]. Les premières observations de démences séniles et le concept de séparation entre hallucinations et illusions sont apportés par Jean-Etienne Esquirol (1772-1840). Présentes de façon sporadique et isolée, elles touchent des zones spécifiques du cerveau et/ou de la moelle épinière et apparaissent tardivement dans la vie des personnes (aux alentours de 60 ans). Leur durée d'incubation et de développement est longue (plusieurs années). Par ailleurs, l'augmentation de la durée de vie de la population entraîne une augmentation du nombre de cas.

Ces maladies ont de nombreux symptômes communs : les lésions anatomopathologiques, la rigidité, la bradykinésie, les troubles de la parole, du langage et de la réflexion. Pour les distinguer les unes des autres, des analyses et dosages de leurs marqueurs spécifiques (protéines) sont indispensables.

La cascade d'altérations neuropathologiques et biochimiques et les conséquences sur la santé des personnes atteintes font de ces maladies un enjeu économique et de recherche mondial très important. De nombreux laboratoires cherchent à établir une nosologie et une étiologie les plus complètes possible, permettant ainsi de disposer d'un diagnostic précis de la maladie. Parallèlement, un vaste champ de recherche regroupant l'étude, la détection et le dosage des agents pathogènes est mis en jeu afin de mieux comprendre le mode d'action de

ces maladies et de leur détection précoce. En effet, un des problèmes majeurs est la détection qui est actuellement en *post-mortem*. Ces pathologies ont comme particularité de ne développer une quantité détectable de marqueurs spécifiques qu'en fin de vie du patient.

L'objectif de beaucoup de travaux est de disposer de systèmes de détection fiables et ultra sensibles, pour permettre l'identification de la maladie à un stade précoce (*ante mortem*).

II.2) La maladie de Creutzfeld-Jakob

Elle est décrite pour la première fois en 1920 par les neurologistes allemands Hans Gerhard Creutzfeld (1885-1964) et Alfons Maria Jakob (1884-1931) qui observent chez des patients des symptômes proches de ceux de la tremblante du mouton. Ils constatent par observation microscopique que le cerveau des patients atteints est criblé de trous telle une éponge : ils lui donnent le nom d'encéphalopathie spongiforme. Cette maladie prendra par la suite le nom de ces découvreurs : Maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ, ou CJD en anglais).

Un patient sain possède des protéines Prion non pathogènes, PrP-c (PRion Protein Cellular), pour le développement du système nerveux de l'embryon, et dans le cerveau et la moelle épinière de l'adulte. Elles permettent le processus d'adhésion et de différenciation des cellules, jouant un rôle d'antioxydant et de ralentisseur de l'apoptose. Mais leur rôle le plus important est d'entraîner le repliement de protéines, permettant ainsi à ces dernières d'être, ou non, fonctionnelles. Cette particularité est à l'origine du développement de la maladie de Creutzfeldt-Jakob [2]. Par ailleurs, les maladies à prions sont génétiquement transmissibles à 10% d'un individu à l'autre.

Cette maladie est caractérisée par une démence associée à des anomalies motrices découlant de la présence d'une protéine prion infectieuse notée PrP-sc (PRion Protein SCrapie) [3]. Cette protéine est un agent pathogène non conventionnel parce que dépourvue de l'acide nucléique qui détient normalement l'information infectieuse [4]. C'est le neurologue et biochimiste Stanley Ben Prusiner qui, dans les années 80, décrit cette protéine. Très controversé au départ, il obtient le prix Nobel de Médecine Physiologique en 1997 [5,6]. En effet, sa découverte remet en cause le paradigme selon lequel une protéine ne peut pas être considérée comme un agent infectieux comme les virus, les microbes et les parasites.

La protéine Prion infectieuse (30 kDa) est impliquée dans toutes les maladies d'encéphalopathies spongiformes, humaines ou animales. C'est un isoforme résultant de la

modification de la protéine prion PrP-c [7]. Cette mutation dont nous ignorons toujours la cause et la structure spatiale post-traductionnelle (figure I.1) est encore non expliquée.

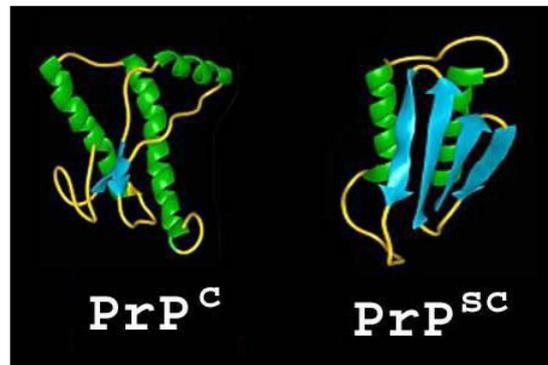


Figure I.1 : Conformation de la protéine Prion dans sa configuration normale PrP-c (à gauche) et dans sa conformation infectieuse PrP-sc (à droite)

La PrP-c présente une structure à 43% en hélice α et 3% en feuillets β tandis que la PrP-sc présente 30% d'hélice α et 43% de feuillets β [8,9]. S. B. Prusiner affirme que la protéine Prion-sc modifie elle-même sa pathogénécité, proposant le principe de la molécule auto-chaperonne, c'est-à-dire capable de modifier spontanément sa propre conformation [10,11]. Une autre hypothèse dégage l'existence d'un co-facteur de type glycanique aidant à la propagation et au transport de l'agent infectieux [12].

La forme PrP-sc n'est pas sensible à la protéolyse par la protéase K, ainsi qu'aux techniques de désinfection et de stérilisation classiques (thermique, chimique...) permettant sa dégradation en plusieurs séquences et sa digestion par la cellule. Ceci pourrait être dû au nombre plus important de feuillets β qui stabilisent la protéine et lui confère une meilleure résistance aux enzymes.

Concernant le mode d'action de la protéine prion infectieuse (figure I.2), elle se multiplie au sein des neurones de façon exponentielle, faisant muter par un système de dépliage/repliage les protéines prion saines avec lesquelles elle est en contact [13,14].

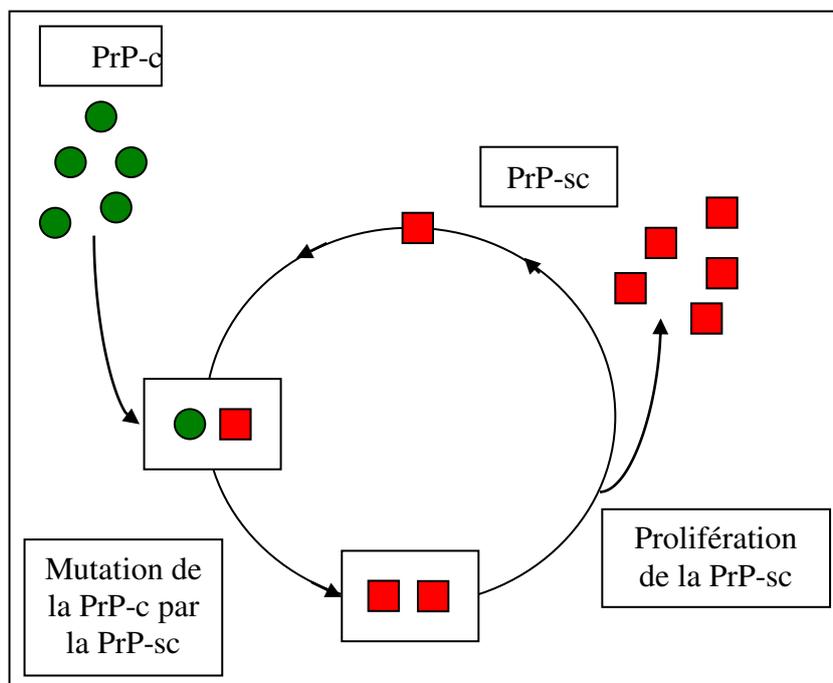


Figure I.2 : Mécanisme simplifié de l'insertion de la protéine prion infectieuse au sein de la cellule et sa multiplication par modification des prions sains

L'accumulation des prions infectieux et leur propriété d'auto-agrégation entraînent une augmentation de la pression osmotique au sein de la cellule infectée qui finit par exploser. Le phénomène est suivi de la formation de plaques amyloïdes : un cerveau sain peut les décomposer en protéines tandis que dans le cas de MCJ, ces plaques séniles (PS) engendrent des lésions neurofibrillaires endommageant le cerveau de façon irréversible. Ainsi, la présence de la protéine prion pathogène entraîne la perte des cellules neuronales et donc une dégénérescence du système nerveux central. Cette démence a toujours une issue fatale.

De part la mutation et l'évolution de la maladie, une nouvelle variante, notée nv-MCJ et décrite en 1996, affecte des sujets jeunes (moins de trente ans). Elle serait déclenchée par l'ingestion d'animaux contaminés par l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) et son évolution serait plus lente (jusqu'à 14 mois).

Malgré les mesures d'hygiène prises à l'égard des contaminations animales, surtout par les services des fraudes et malgré les campagnes d'informations, les farines animales n'ont pas toutes été retirées rapidement du marché. Ainsi il est possible que les personnes ayant ingéré de la viande d'origine bovine soient touchées par la maladie [15].

Le diagnostic de la maladie de Creutzfeldt-Jakob est réalisé lorsque la concentration en protéine prion anormale est la plus importante (à partir de 30 ng/mL), c'est-à-dire après la mort du patient.

Deux méthodes sont aujourd'hui utilisées, permettant l'identification de la pathologie :

- le Western-Blot, analysant la taille des résidus de l'agent pathogène après hydrolyse et protéolyse et incubation à 130°C [16]
- l'immuno-histochimie, détectant la protéine antigénique via un anticorps spécifique [17,18]

Une autre voie est la protéinopathie, qui permet de mieux identifier le comportement chimique et biochimique des protéines, et donc constituer un mode de diagnostic sensible [9].

Les problèmes majeurs de sécurité sanitaire et de santé publique font de ces techniques de détection des maladies neurodégénératives un énorme enjeu économique pour d'une part en comprendre la sémiologie et d'autre part améliorer la sensibilité du système pour permettre une détection *ante-mortem* [19]. Précisons qu'un des problèmes de la détection réside dans la différence de concentration en PrP infectieuse qui se trouve être en plus faible concentration dans le liquide biologique (environ 10^{-9} mol/L) que dans le cerveau. Un objectif est aujourd'hui de pouvoir détecter la protéine à des concentrations de l'ordre de 0,1 pg/mL, voire moins.

II.3) La maladie d'Alzheimer

L'appellation « Maladie d'Alzheimer » (MA) est apparue en 1907 et admise en 1912 après une longue bataille entre deux grandes écoles de neuropsychiatrie alors concurrentes en matière de maladies mentales [20, 21]. Existente l'école d'Arnold Pick (1851-1924) et d'Oskar Fisher à Prague et celle d'Emil Kraepelin (1856-1926) et d'Aloïs Alzheimer (1864-1915) à Munich. L'école de Fischer fait état de la corrélation entre la perte de mémoire et l'observation de plaques séniles sur des sujets âgés atteints de démences appelées dans un premier temps presbyophrénie puis « Maladie de Fischer » [22]. La seconde école décrit une observation faite par Alzheimer et présentée en 1906 sur l'existence de dégénérescences neurofibrillaires (DNF) sur le cerveau d'une patiente [23, 24]. Les chercheurs parlent d'abord d'un cas particulier de la « Maladie de Fischer ». Emil Kraepelin, s'appuyant sur les travaux de son équipe, décrit pour la première fois la « Maladie d'Alzheimer » (1912) [25].

Cette maladie est présente sous deux formes : la première est sporadique et concerne 90 à 95% des cas, la seconde est dite familiale, c'est-à-dire génétique à transmission autosomique dominante, et reste rare (5-10%) [26].

Les causes de la Maladie d'Alzheimer sont toujours mal connues. Les études montrent qu'elle résulte de l'association de deux processus dégénératifs entraînant inexorablement la mort de la quasi-totalité des neurones. Il s'agit de l'amyloïdogénèse (ou pathologie APP) et de la formation de dégénérescences neurofibrillaires [27,28].

L'amyloïdogénèse est une accumulation de dépôts extracellulaires, appelés plaques séniles, constitués d'une protéine β -amyloïde dont le clivage glycoprotéique anormal lui confère une conformation en feuillets β lui permettant d'être stable et insoluble [29]. Les équipes de Sanders et Hardy ont montré qu'une mutation de la protéine précurseur de l'amyloïde donnait lieu à un mauvais codage [30]. Par ailleurs, la fixation d'une apolipoprotéine E, notée ApoE, sur l'amyloïde favorise sa stabilité [31].

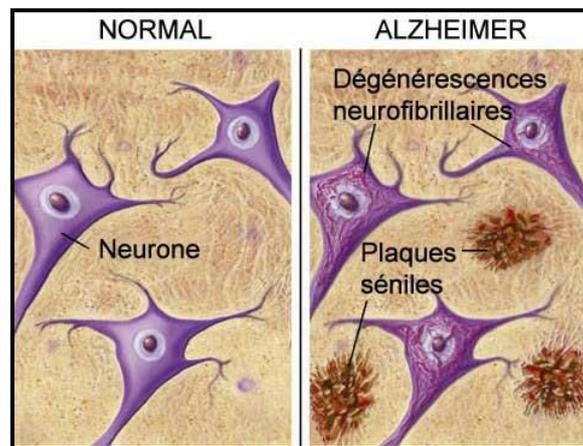


Figure I.3 : Schémas de neurones chez un patient sain (à gauche) et de neurones dont l'activité est perturbée par la présence de plaques séniles et de dégénérescences neurofibrillaires (à droite) (Alzheimer's Disease Research- American Health Assistance Foundation)

Les dégénérescences neurofibrillaires sont intracellulaires (figure I.3). Elles proviennent de l'hyperphosphorylation d'une protéine : la protéine Tau. Cette dernière permet en temps normal de polymériser et de stabiliser les microtubules du cytosquelette, conférant ainsi à la cellule l'interconnexion neuronale et donc ses propriétés mécaniques [32,33]. Lorsque les protéines MAP-kinases (Mitogen Activated Protein) sont perturbées, elles ne peuvent plus réguler la phosphorylation de la protéine Tau. Les études conduites par Jenkins ont montré que cette hyperphosphorylation est retrouvée sous la forme de paires de filaments appariés en hélices, aussi nommées Tau-PHF [34,35]. Ces fibrilles pathologiques entraînent alors un dysfonctionnement axonal et l'association avec les plaques séniles provoque une entrée massive de calcium dans la cellule qui la rend très sensible au stress oxydatif, entraînant sa nécrose et/ou son apoptose.

Actuellement, en France, la maladie d'Alzheimer est la forme de démence la plus courante et touche environ 220 000 personnes nouvelles par an avec un coût moyen de 19 000 euros par personne (OPEPS, 2009). Actuellement, le diagnostic repose sur des examens cliniques et neuropsychologiques avec des tests verbaux et écrits tel que le « California Verbal Learning Test ». Des analyses par Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) viennent compléter ces tests en évaluant l'avancée de la maladie par rapport à l'atrophie cérébrale.

Malheureusement ces méthodes ne permettent pas de diagnostiquer avec certitude la maladie. De nos jours, la seule façon de confirmer que le patient est atteint de la Maladie d'Alzheimer est le test ELISA *post-mortem* par la détection des protéines Tau-PHF [36,37]. Des réponses au mode de fonctionnement de cette maladie commencent également à être apportées.

II.4) La maladie de Parkinson

La Maladie de Parkinson (MP) est la deuxième maladie neurodégénérative la plus importante après la maladie d'Alzheimer. Elle atteint 1% des 50-65 ans, en particulier les hommes [38]. L'évolution de cette maladie devient progressivement de plus en plus marquée dans les gestes et le cerveau jusqu'au décès du patient.

Les premiers symptômes furent décrits par James Parkinson (1755-1824) en 1817 comme une paralysie tremblante généralisée [39]. Mais c'est en 1861 que Jean-Martin Charcot (1825-1893), professeur en neurologie, fera les premières réelles observations de la « paralysie agitante » et nommera la maladie par le nom de son découvreur : la maladie de Parkinson [40]. La communauté adopte alors les constatations symptomatiques faites par Parkinson, à savoir l'akinésie (mouvements lents et rares), l'hypertonie (rigidité musculaire) et les tremblements musculaires au repos qui apparaissent d'abord sur un seul côté du corps puis sur sa totalité. Ces premiers symptômes permettent d'effectuer un premier état de la maladie (Unified Parkinson's Disease Rating Scale).

De nos jours, la certitude du diagnostic se fait par analyse du cerveau par IRM et scanner cérébral ce qui permet de distinguer les maladies proches présentant les mêmes syndromes [41]. En effet, un des soucis actuel est la difficulté à faire la différence entre syndromes parkinsoniens et maladie de Parkinson ; ces derniers ayant les mêmes caractéristiques symptomatiques (paralysie supranucléaire, atrophie multisystématisée...).

Seule la connaissance du processus neurodégénératif permet de distinguer la maladie de Parkinson des autres maladies voisines. En effet, les maladies de type parkinsoniennes ont un phénomène cellulaire commun qui est la mort de neurones dopaminergiques à projection striatale localisés dans les îlots de la substance noire [42].

L'agent responsable de la maladie est la protéine synucléine alpha, notée α -syn, qui est une petite protéine du système nerveux central. Elle est exprimée au niveau des liaisons présynaptiques terminales permettant les processus d'association membranaire [43]. Elle a un rôle régulateur dans la stabilité des membranes des cellules et dans la plasticité neuronale, c'est-à-dire dans le mécanisme de réponse cellulaire de la mémorisation et de l'apprentissage [44], en particulier sur l'activité des neurones dopaminergiques [45].

L' α -syn a également un rôle de molécule dite chaperonne ; c'est-à-dire qu'elle prévient l'agrégation irréversible protéique et régule les associations et la libération de molécules d'intérêt [46].

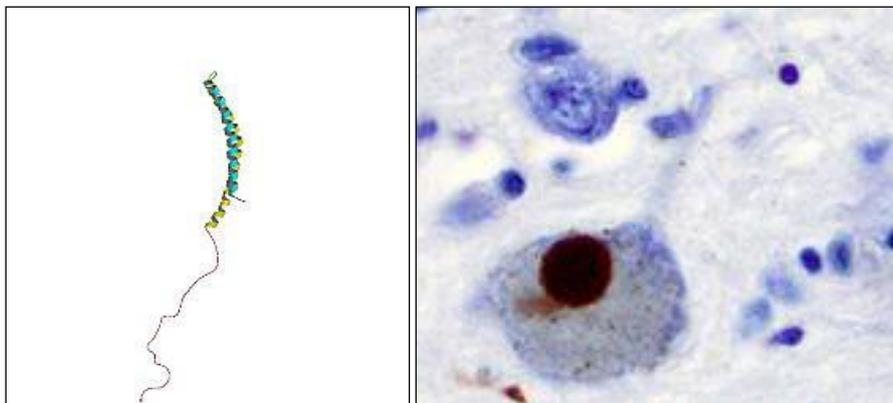


Figure I.4 : Modélisation de la protéine synucléine alpha (à gauche) et imagerie par fluorescence d'une protéine synucléine alpha positive (à droite)

Lorsque la protéine est en trop forte concentration dans le milieu cellulaire, elle s'agrège et change de conformation passant d'un stade hélicoïdal à un stade en feuillets β [47]. Cette agrégation est une cause du vieillissement et de la dégénérescence du cerveau (figure I.4). En effet, la protéine quand elle s'agrège forme des plaques fibrillaires amyloïdales stables que l'on retrouve aussi dans la maladie d'Alzheimer [48 à 50]. Ce dysfonctionnement serait dû à la mutation d'un gène codant pour l' α -syn [51]. La forte concentration en α -syn entraîne alors la dégénérescence et l'apoptose des neurones dopaminergiques situés dans la substance noire. Les lésions engendrées par la réduction de la

quantité de dopamine au sein des structures nerveuses du striatum et du tronc cérébral provoquent une perturbation du système neuronal responsable des fonctions motrices [52,53].

Le mécanisme d'action de l' α -syn vis-à-vis des neurones producteurs de dopamine est encore mal connu et est un sujet d'étude actuel mettant en jeu de nombreuses voies biologiques possibles et complémentaires (figure I.5).

Les analyses effectuées sur les cerveaux de patients décédés montrent la présence d'espèces oxygénées réactives [54], de fer [55] et d'ubiquitine [56]. Ces éléments suggèrent que la mort neuronale serait induite par un stress oxydatif [57,58]. En effet, la protéine α -syn est marquée de façon covalente par des molécules d'ubiquitine qui sont des marqueurs de protéines à éliminer et présentes dans toutes les cellules eucaryotes. L' α -synucléine est alors protéolysée, libérant l'ubiquitine qui peut à nouveau se fixer et dégrader une nouvelle protéine. S'en suit une succession métabolique anormale. L'accumulation de la α -synucléine et l'absence de transmission entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi entraînent la mort des neurones à dopamine qui se retrouve en quantité insuffisante dans le milieu cellulaire pour réguler l'activité des circuits neuronaux des mouvements [59,60]. Par ailleurs, lorsque les neurones dopaminergiques meurent, ils libèrent leur contenant, à savoir la neuromélanine, dont la synthèse s'effectue en présence de radicaux libres, et de fer. L'association du fer avec les radicaux libres provoquerait ainsi le stress oxydatif donnant lieu à l'apoptose cellulaire et donc à la maladie de Parkinson [61,62].

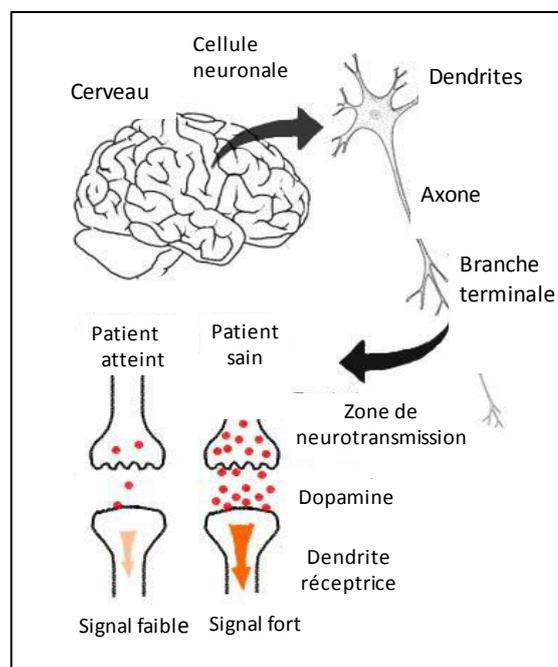


Figure I.5 : Mécanisme d'action de la synucléine alpha chez un patient sain et un patient atteint de la maladie de Parkinson (d'après Medical Illustration par Calne DB, <http://www.science.ca>)

Certains facteurs environnementaux telle la présence de métaux lourds et de pesticides, ainsi qu'un traumatisme crânien aggravent la maladie de près de 70% [63,64]. De nos jours, il n'existe pas de traitement curatif de la maladie de Parkinson. On retrouve dans la plupart des cas, des traitements à base de L-dopa qui visent à combler le manque en dopamine ou encore la pose d'électrodes servant à contrôler les différences de potentiel membranaire régulant la vitesse des mouvements [65,66].

II.5) Les problèmes économiques et sanitaires

La médecine moderne et les progrès techniques ont amélioré fortement la vie des populations des pays développés et en voie de développement. Le résultat est une augmentation de près de 65% de l'espérance de vie par rapport à celle du 19^{ème} siècle [67]. Une conséquence est l'augmentation du nombre de cas de maladies neurodégénératives. En effet, ces maladies se déclarant à un âge biologique avancé (entre 40 et 60 ans), lorsque l'espérance de vie avoisinait les 45 ans, peu de personnes étaient recensées, la maladie n'étant pas encore déclarée. De nos jours, avec une longévité accrue, le nombre de personnes ayant exprimé la maladie augmente également. Les problèmes sanitaires dans le domaine de l'alimentation étant récents et la maladie restant encore mal connue, son développement maximal ne se déclenchera que tardivement au niveau de la population mondiale. La mise en défaut des services de santé face au nombre de malades, tant d'un point de vue économique que d'assistance et soins palliatifs, a relancé les financements et les laboratoires de recherche qui travaillent actuellement sur les agents pathogènes responsables de ces maladies.

Malgré les progrès incontestables dans le domaine de la recherche médicale, les modes d'action de ces maladies neurodégénératives et les multiples protéines mises en jeu restent mal connus. Les problèmes rencontrés sont multiples : difficulté à extraire et à purifier les protéines, complexité à synthétiser des protéines recombinantes servant par la suite de modèle d'étude, difficulté de disposer d'anticorps de capture et détection spécifiques.

De même, se pose aussi le problème de détection sensible. Actuellement, aucun système ne permet de diagnostiquer ces maladies à un stade *ante-mortem* car la concentration en agent pathogène est trop faible (de l'ordre du fentogramme par millilitre) dans les premières années de la maladie. De nombreux laboratoires cherchent à améliorer ces modes de détection en modifiant soit les protéines, soit directement la surface des supports d'analyse.

III . La détection immunoenzymologique

Les premiers tests de détection d'un anticorps ou d'un antigène reposaient sur les principes de base tels que la précipitation, la turbidimétrie ou encore sur l'agglutination comme le test de Coombs.

Des tests immunologiques utilisant la radioactivité furent proposés par Rosalyn Sussman Yalow et Solomon Berson en 1960 [68]. Selon que l'on souhaite détecter un antigène ou un anticorps, la protéine complémentaire est marquée par un agent radioactif. Il a ensuite été proposé un test colorimétrique dans lequel les antigènes et anticorps sont couplés à une peroxydase [69,70].

Cinq ans plus tard, des chercheurs de l'Université de Stockholm en Suède, Peter Perlmann et Eva Engvall, et de l'Université des Pays-Bas, Anton Schuurs et Bauk van Weemen, publièrent le premier protocole complet du système ELISA [71 à 73].

III.1) Les principaux acteurs

Les tests de détection immunoenzymatique reposent sur la présence de deux types de biomolécules : les anticorps et les agents pathogènes qui sont ici des protéines antigéniques.

III.1.1) Les antigènes

Par définition un antigène est une molécule immunogène entraînant une réaction immunitaire, d'où son nom qui signifie **générateur d'anticorps**. Les antigènes sont d'origines biologiques ou synthétiques. La première catégorie comprend les agents immunogènes : les protéines et polysides et ceux possédant une faible immunogénicité : les lipides ou les acides aminés libres. Les antigènes synthétiques sont quant à eux produits par polymérisation d'acides aminés [74]. Par ailleurs, un antigène peut être soit exogène, c'est-à-dire qu'il est étranger à l'organisme (le non-soi), ou endogène : dans ce cas, il est alors déjà présent au sein de l'organisme ou il est le produit d'une infection préalable tel qu'un virus utilisant la cellule hôte pour se reproduire. Il existe des cas particuliers où certains antigènes perdent leur reconnaissance vis-à-vis du système immunitaire et sont détruits : c'est le cas des maladies auto-immunes.

De manière générale, les antigènes sont des macromolécules constituées de polysaccharides et de poids moléculaire élevé (de 1 à 20 kDa). Elles possèdent à leur surface des épitopes, ou déterminants antigéniques, qui peuvent être identiques ou différents les uns des autres (figure I.6). Plus la masse de l'antigène est grande, plus il a d'épitopes et est donc plus immunogène.

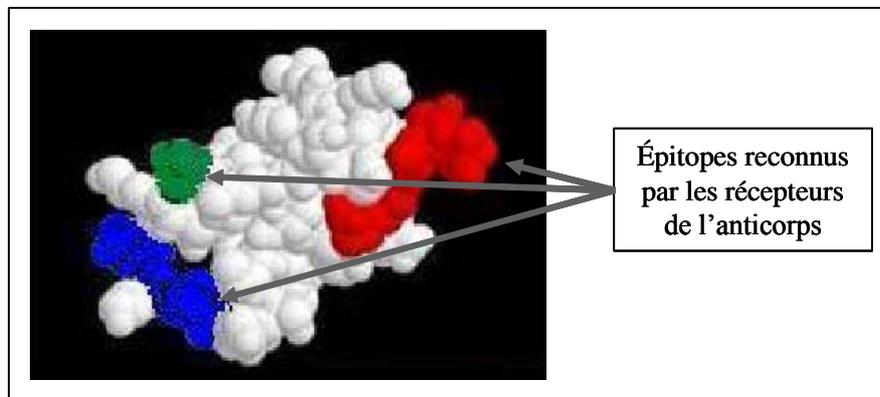


Figure I.6 : Modèle d'un antigène immunogène possédant trois épitopes différents (image modifiée à partir d'une modélisation de plate-forme anticorps pour la protéomique et la santé – cnrs)

En fonction de la structure de la protéine par laquelle ils sont portés, les épitopes sont séquentiels ou conformationnels, selon que la séquence d'acides aminés est alignée ou repliée sur elle-même. Ce sont sur ces épitopes que l'anticorps se fixe *via* ses récepteurs spécifiques, entraînant ainsi la réaction du système immunitaire.

III.1.2) Les anticorps

Un anticorps est un amas protéique de haut poids moléculaire (150 kDa) qui permet de neutraliser et détecter les antigènes de manière spécifique. Ils sont produits par les plasmocytes et constituent majoritairement l'immunoglobuline du sang. Dans l'organisme, l'anticorps a pour rôle de capturer l'antigène et d'activer le système immunitaire qui se charge de neutraliser l'agent infectieux, par lyse. Les anticorps sont des glycoprotéines possédant un groupement polysaccharide et une chaîne polypeptidique. Un anticorps est composé de deux chaînes lourdes (notées H pour heavy) et de deux chaînes légères (notées L pour light) liées par des ponts disulfures (figure I.7). Chacune de ces chaînes possède des groupements communs à tous les anticorps et reconnus par le système immunitaire, et un groupement variable qui caractérise l'anticorps. Cette partie variable est le site de reconnaissance de l'anticorps vis-à-vis de l'agent pathogène : le paratope. Chaque anticorps possède deux

paratopes qui lui permettent de reconnaître et de se lier à l'antigène par le principe de clé-serrure, les clés étant la métaphore des épitopes et la serrure du récepteur [75].

Les anticorps se différencient en deux grandes familles : les monoclonaux et les polyclonaux, selon la capacité de ses récepteurs à se lier à un ou plusieurs épitopes. Les anticorps polyclonaux ont la capacité de reconnaître soit différents épitopes sur un même antigène, dans ce cas-là ce sont des anticorps monospécifiques ; soit différents épitopes sur différents antigènes. Les anticorps monoclonaux ne reconnaissent qu'un seul épitope pour un seul antigène. La compétition entre deux anticorps monoclonaux différents est donc impossible. Cela leur confère une spécificité d'accroche qui les rend utilisable en laboratoire lors de diagnostics.

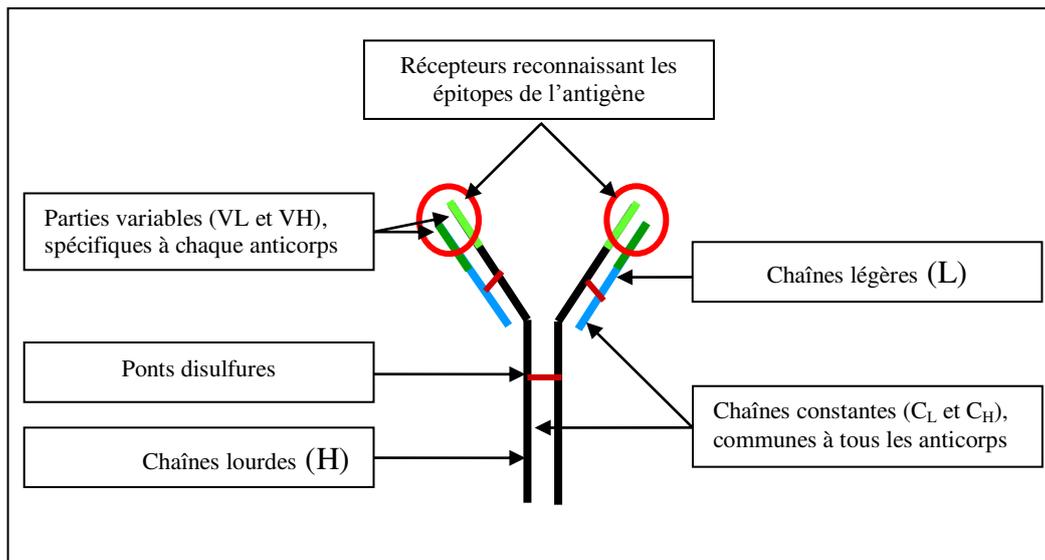


Figure I.7 : Représentation schématique d'un anticorps

III.2) Le complexe immunitaire antigène-anticorps

Un anticorps se lie de façon spécifique à un antigène, formant ainsi un complexe, au même titre que le complexe enzyme-substrat. Cette spécificité entraîne une affinité très forte entre les deux biomolécules, et cela même lorsqu'ils sont en faibles concentrations dans l'organisme (de l'ordre de 10^{-5} mol/L). Le tableau 1 répertorie les divers types d'interactions qui lient les biomolécules entre elles [76].

| | |
|-------------------------|--|
| Forces électrostatiques | $\text{-NH}_3^+ \quad \text{COO}^-$ |
| Liaisons hydrogènes | $\text{N}(\delta^-) - \text{H}(\delta^+) \cdots \text{O}(\delta^-) = \text{C}$ |
| Forces de Van der Waals | $\delta^+ \delta^- \rightleftharpoons \delta^- \delta^+$ |

Tableau I.1 : Liste des forces non covalente mises en jeu entre les groupements amine et carboxyliques des biomolécules

Cette affinité entre un épitope et un paratope étant réversible sous des conditions extrêmes de pH, de force ionique et d'interactions enzymatiques, il existe une constante d'affinité K_a , et donc une constante de dissociation K_d , dont la valeur peut varier de 10^6 à 10^{12} en fonction du nombre et la force des liaisons formées (figure I.8).

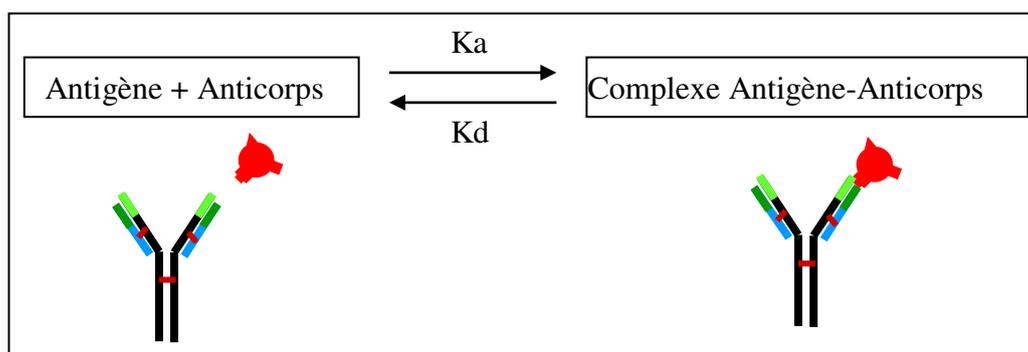


Figure I.8 : Formation du complexe antigène-anticorps

Sur la base de cette relation entre l'anticorps et l'agent pathogène se sont développés des systèmes de détection immunoenzymologique comme le système ELISA.

III.3) ELISA : Enzyme Linked ImmunoSorbant Assay

Il existe principalement deux types de dosage, avec ou sans compétition, selon que le réactif est limitant ou en excès. Un dosage par compétition met en jeu, par exemple, un antigène à doser avec un antigène marqué pour un même anticorps de capture.

Ne seront traités ici que des dosages sans compétition : immunoenzymométrie. Aujourd'hui, les tests de détection immunoenzymologique les plus utilisés sont le système

ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbant Assay, ou dosage d'immunoabsorption par enzyme liée) et l'iq-PCR (immuno quantitative Réaction en Chaîne par Polymérase).

La technique ELISA est très utilisée aujourd'hui, couvrant des détections sériques telle que celle du VIH (Virus Immunodéficience Humaine), celle d'antigènes, celle d'allergènes contenus dans les aliments. Cette technique met en évidence la présence d'un anticorps ou d'un antigène particulier. Elle peut aussi mettre en jeu deux anticorps : l'un, dit primaire, est appelé anticorps de capture ; l'autre, dit secondaire, est l'anticorps de détection, qui révèle la présence de l'antigène et réagit aux complexes immuns antigène-anticorps. En effet, l'antigène possède plusieurs épitopes qui lui permettent d'être capturé par différents anticorps. Ainsi, lorsque l'anticorps de capture est accroché à la protéine antigénique, l'anticorps de détection peut venir se fixer sur un autre marqueur de l'antigène.

Cette méthode de détection par chimiluminescence permet d'obtenir une valeur de densité optique proportionnelle à la valeur de la concentration en protéine recherchée. L'avantage principal est la spécificité de la détection via l'utilisation d'anticorps monoclonaux. Les défauts majoritaires restent la dépendance au pH, les variations de température et la luminosité, auxquels doit prendre garde l'utilisateur.

Selon la concentration en antigène et la sensibilité de détection, deux types de tests ELISA existent : l'un dit sandwich et l'autre dit direct. En effet, toutes les maladies ne se détectent pas à la même concentration. Ainsi, lorsque l'antigène est en forte concentration dès le début des symptômes, le système ELISA direct est préconisé. Pour une meilleure sensibilité quand la protéine pathogène est en faible quantité, il est plus intéressant de réaliser un ELISA Sandwich.

III.3.1) ELISA Sandwich

Comme son nom l'indique, l'antigène à doser est pris en sandwich entre deux anticorps (figure I.9). Le dosage implique six étapes majeures.

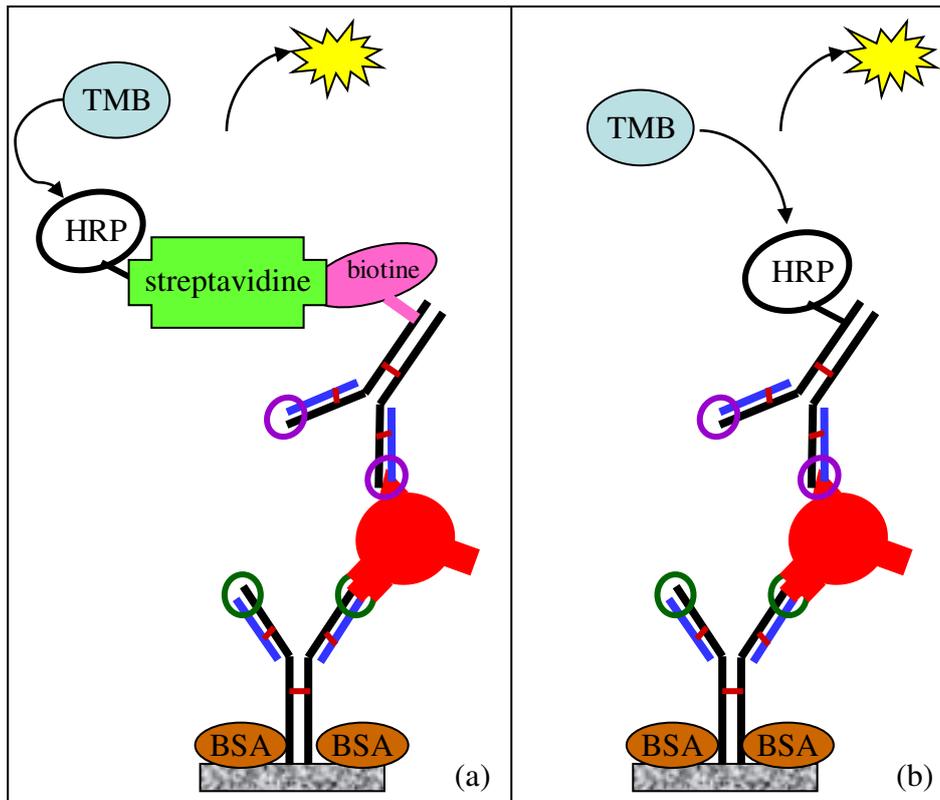


Figure 1.9 : Schéma d'un ELISA sandwich avec révélation indirecte (a) ou révélation directe (b)

Une quantité connue et saturante en anticorps de capture est adsorbée à la surface des puits du support d'analyse qui sont ensuite lavés par une solution tamponnée, généralement de phosphate salin (PBS) afin d'éliminer les anticorps de capture non fixés à la surface, pour éviter toute détection saturante ou aspécifique. Ce lavage est réalisé à chaque étape du dosage.

Pour éviter les artefacts de mesure, la surface du support de détection où l'anticorps de capture ne serait pas fixé, est saturée en solution protéique n'ayant aucune interaction avec les autres biomolécules. Pour cela est utilisée l'albumine de sérum bovin (Bovine Sérum Albumine, BSA), ou de la Caséine, du Tween20[®], du Triton...[77]. Après lavage par la solution tamponnée, l'échantillon possédant l'antigène est introduit. En parallèle, une concentration connue en antigène est également introduite dans un des puits et sert d'étalon pour la détection. Pour éviter que l'antigène, s'il est en trop forte quantité dans la solution de dosage, ne s'agrège sur lui-même et ne fausse le dosage, le lavage s'effectue avec une solution tamponnée à faible pourcentage d'agent saturant.

L'anticorps de détection est ajouté en quantité connue. Il doit être couplé à une biomolécule qui donnera lieu à une luminescence. Il existe deux types d'anticorps de détection : des anticorps de détection couplés soit à une enzyme telles que la peroxydase de Raifort (HRP pour Horse Radish Peroxydase) [78] ou la phosphatase alcaline (PAL), soit à

une coenzyme comme la biotine, vitamine H (ou B8), qui participe au métabolisme de certaines biomolécules et a une très forte affinité pour la streptavidine. Dans le premier cas, nous avons un ELISA Sandwich avec révélation directe ; dans le second, avec une révélation indirecte.

Lors de la détection, trois molécules entrent en jeu : le 3,3', 5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB), la peroxydase de Raifort couplé à un peroxyde d'hydrogène (HRP-H₂O₂) et de l'acide sulfurique concentré (H₂SO₄, 1M) [79]. Le TMB est un chromophore sensible pour la détection de la HRP. Un transfert d'électrons a lieu entre le TMB et le peroxyde d'hydrogène, donnant lieu à la formation d'un radical cation et la conversion du peroxyde en eau et dioxygène (figure I.10) ; la peroxydase accélère ce phénomène. La forme oxydée du TMB colore la solution en bleu qui peut être détecté par spectrométrie UV/Visible à 650 nm.

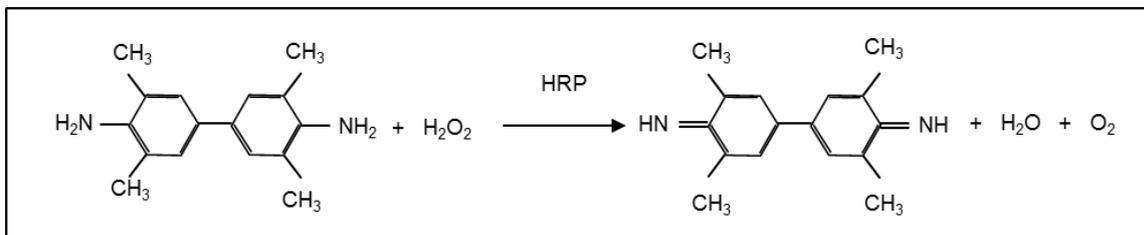


Figure I.10 : Réaction de réduction du TMB

Dans le but d'obtenir une meilleure sensibilité de détection, les diimines du TMB formées sont stabilisées par l'ajout d'H₂SO₄. La peroxydase et les structures des protéines sont alors altérées, voire détruites. La solution se colore en jaune et est détectée à 450 nm (figure I.11).



Figure I.11 : Réglettes ELISA en polycarbonate avant et après ajout du TMB ayant réagi avec la HRP-H₂O₂ sur une gamme de concentrations en agent pathogène (sordalab.com)

Dans le cas d'une révélation indirecte, il est nécessaire d'ajouter une molécule pouvant à la fois se lier à la biotine et pouvant réagir avec le TMB pour donner lieu à la révélation. La biotine étant très affine pour la streptavidine ($K_d \sim 10^{-15}$) et le TMB réagissant avec l'enzyme HRP- H_2O_2 , un complexe streptavidine couplé HRP- H_2O_2 est introduit dans la solution d'analyse. La streptavidine est une protéine tétramère pouvant se lier à la fois à la biotine et à l'enzyme HRP.

Le graphique ci-dessous (figure I.12) est un exemple de courbe de détection obtenue dans le cas d'un ELISA sandwich réalisé sur une gamme de concentrations en antigène.

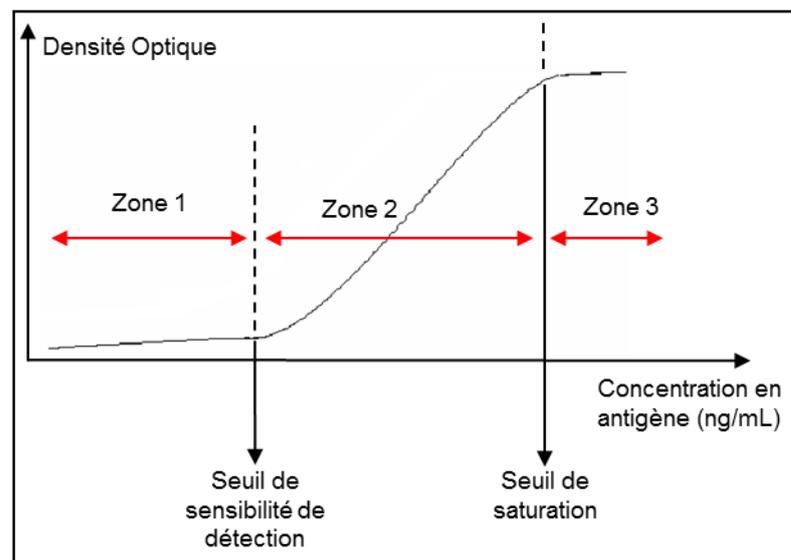


Figure I.12 : Courbe de dosage immuno-enzymatique ELISA de la densité optique en fonction de la concentration en protéine antigénique

Trois zones sont délimitées par deux points d'inflexion notables : le premier correspond au seuil de sensibilité, c'est-à-dire la concentration à partir de laquelle la protéine antigénique peut être détectée. En dessous de ce seuil, la valeur de la densité optique peut être confondue avec le bruit de fond propre à chaque appareil de détection ainsi qu'aux associations parasites entre le support et les biomolécules ou les biomolécules entre elles. Le second point est l'arrivée à un palier de saturation. La partie croissante de la courbe correspond à la plage de mesure du système.

La valeur de la densité optique est mesurée par spectrométrie UV/visible et obéit à la loi de Beer-Lambert. La valeur de la densité optique est proportionnelle à la valeur de la concentration, et donne une droite passant par l'origine selon la relation ci-dessous.

$$DO = \epsilon l C$$

Avec :

- DO : densité optique à une longueur d'onde λ (sans unité),
- ϵ : coefficient d'extinction molaire ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$),
- l : longueur traversée par la lumière (cm),
- C : concentration de l'élément mesuré ($mol \cdot L^{-1}$).

Dès que la concentration seuil est atteinte, la courbe présente une partie croissante correspondant à la droite de Beer-Lambert (zone 2). Mais la quantité d'anticorps secondaire reste la même quelle que soit la concentration en protéine antigénique introduite précédemment dans le milieu. Ainsi, lorsque la concentration en antigène ajouté devient saturante (zone 3), la totalité des anticorps de capture sont liés et ne peuvent donc pas réagir avec les protéines restantes qui se retrouvent donc en excès. Le seuil de saturation revient alors à doser la quantité totale d'anticorps de détection initiale.

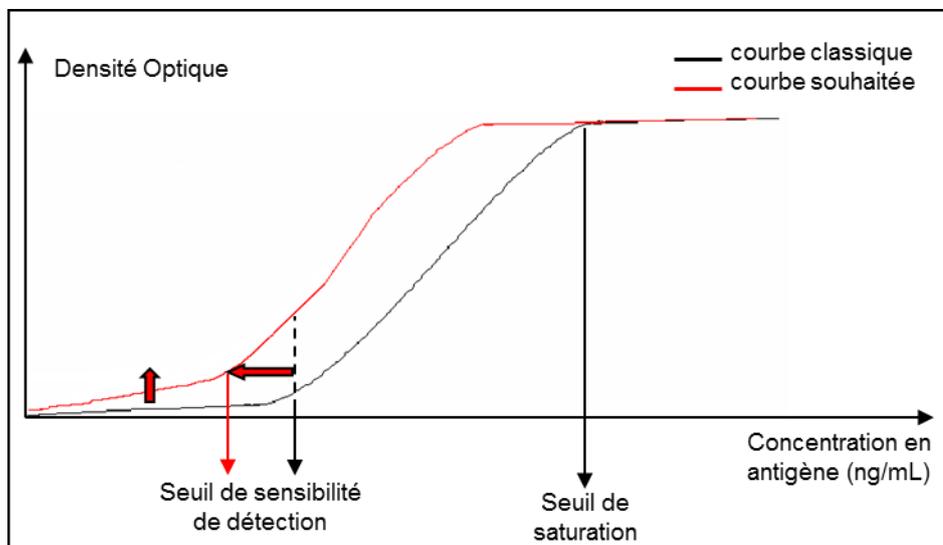


Figure I.13 : Graphique simplifié comparant la courbe théorique classique (en noir) avec la courbe à obtenir (en rouge)

L'enjeu est abaisser le seuil de détection comme présenté sur la figure I.13. La courbe noire représente la courbe actuelle et la courbe rouge est l'objectif à atteindre.

III.3.2) ELISA Direct

Dans ce cas, l'antigène est adsorbé sur le support d'étude [80]. Selon les anticorps existants, il est possible de détecter directement l'antigène en introduisant un anticorps de

détection qui se lierait à l'un des épitopes de la protéine et servirait alors à la fois d'anticorps de reconnaissance et d'anticorps de détection [81,82]. Dans le cas contraire où l'anticorps de détection ne peut pas reconnaître la protéine antigénique, un premier anticorps de reconnaissance est introduit dans le milieu d'analyse et viendra s'intercaler entre l'antigène et l'anticorps de détection [83]. Quelle que soit la voie utilisée, l'anticorps secondaire peut être couplé soit à l'enzyme HRP, soit à la biotine (figure I.14). Suivent les étapes de révélation et d'arrêt de la réaction décrites au II – 2 – a).

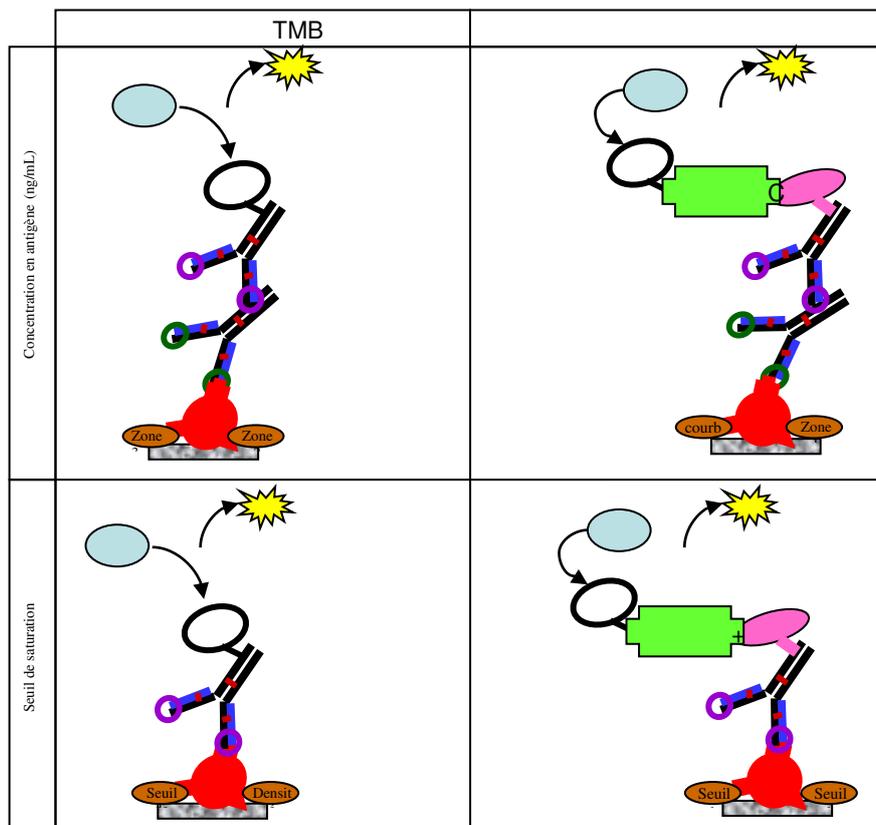


Figure I.14 : Tableau récapitulatif des différents ELISA indirects avec ou sans anticorps primaire et avec révélation directe ou indirecte

III.3.3) Limite de détection

La technique ELISA est une méthode intéressante, mais elle n'est pas assez sensible pour la détection des protéines antigéniques. En effet, les résultats montrent souvent un bruit de fond résiduel perturbant les signaux de faibles intensités pour de faibles concentrations en antigène. Par exemple, pour une concentration en antigène de 5 ng/mL, la valeur de la densité optique obtenue est de 0,456 u.a. alors que le bruit de fond de l'appareil est à 0,240 u.a. Par soustraction, la valeur correspondante à cette concentration est alors de l'ordre du bruit de

fond résiduel. Par ailleurs, ce problème se pose également avec les phénomènes d'adsorption aspécifique des biomolécules mises en jeu, en particulier celles de l'anticorps de détection.

IV. Voies d'amélioration

Cette partie décrit des possibilités étudiées par les laboratoires, tant d'un point de vue biologique que chimique, pour augmenter la sensibilité et l'efficacité de ces techniques de détection immunoenzymatiques.

IV.1) Le système biologique

Un des premiers problèmes rencontrés par les chercheurs travaillant sur les protéines antigéniques et leur détection, est d'abord leur extraction du milieu cellulaire et leur purification [84 à 88]. Les biomolécules recherchées sont stabilisées par d'autres protéines ou enzymes qui leur permettent de rester dans une certaine conformation qui dépend du nombre d'acides aminés qui les composent et du milieu dans lequel elle évolue [89,90]. Ainsi, les antigènes infectieux n'étant pas toujours en grande quantité dans l'organisme, il est nécessaire de créer des protéines recombinantes, c'est-à-dire non infectieuses et produites par clonage, ayant les mêmes propriétés et présentant les mêmes épitopes que les protéines pathogènes. Il existe également des protéines dites de synthèse, créées en laboratoire par polymérisation d'acides aminés [91 à 93].

Un autre aspect concerne les anticorps primaires et secondaires qui vont permettre la détection de la protéine. Comme déjà indiqué, un antigène possède à sa surface plusieurs épitopes spécifiques à un anticorps. Quand la maladie est traitée par l'organisme lors de la reconnaissance d'une entité du non-soi, les anticorps sont directement produits par les globules blancs. Dans le cas contraire, il est nécessaire d'apporter des anticorps possédant des récepteurs propres aux épitopes de la protéine antigénique en fonction des différents fragments ayant été purifiées en amont [94 à 96].

Une approche novatrice utilisable à la fois dans les systèmes de détection immunoenzymologique et sur des biopuces, est la recherche de nouvelles molécules constituées de brins d'acide désoxyribonucléique recombinant : les aptamères [97,98].

Comme décrit dans le système de détection ELISA, il est recommandé de stabiliser la surface du support d'analyse par un agent bloquant empêchant les fixations aspécifiques (BSA, caséine, gélatine, agents détergents comme le Tween20[®] ou le Triton) [99 à 103].

C'est donc dans le but de repousser les biomolécules indésirables et d'accrocher plus spécifiquement celles d'intérêt, que la recherche se tourne sur la fonctionnalisation directe des

divers types de supports d'analyse en y fixant des molécules présentant à la fois les capacités de fonction ciblant et de répulsion.

IV.2) Les supports de détection

Ce sont souvent des réglottes en polystyrène (PS) ou en polypropylène (PP) présentant huit puits à fond coniques (figure I.15). Le PP présente une valeur de densité optique propre faible (de l'ordre de 0,05 u.a.), une résistance à la température de moulage et un coût de fabrication peu onéreux (0,012 cents par réglotte). Par ailleurs le polypropylène est facilement modifiable par voie plasma froid et compatible avec une large gamme de molécules.

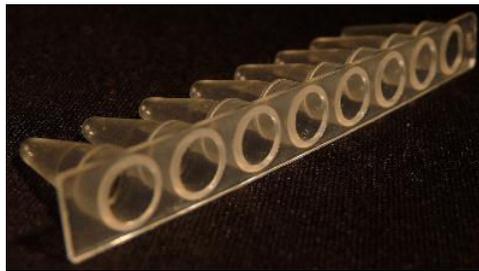


Figure I.15 : Réglotte de détection en polypropylène avec puits coniques (fabriquées par EUDICA)

IV.3) Modification des propriétés des supports de détection

Les notions de biospécificité et de biocompatibilité sont des éléments importants dans le choix des polymères utilisés dans le domaine biomédical et dont la surface doit interagir de façon spécifique avec un milieu biologique. En fonction des domaines d'utilisation (prothèses, matériels chirurgicaux, supports de détection immunoenzymatique...), la conception de matériaux biocompatibles doit permettre de réduire l'adsorption non spécifique de protéines ou améliorer les interactions entre cellules, ou biomolécules, et surfaces exogènes. La force et le type d'interactions des biomolécules avec les supports présents dépendent aussi de la topographie et la chimie de la surface considérée.

Un nombre considérable de publications et de revues traite de différentes voies de modification de surfaces et de l'étude des interactions entre biomolécules et molécules de fonctionnalisation [105,106]. Ces études peuvent être classées selon trois critères :

- la réponse cellulaire en fonction des interactions surface - protéine,
- la répulsion de protéines dans le cadre de matériel chirurgical,

- l'adsorption de biomolécules sur des surfaces bioactives.

La description ci-dessous est un état de l'art des différentes voies de modifications de surfaces polymères.

IV.3.1) Les méthodes de fonctionnalisation de matériaux polymères

Les matériaux polymères sont pour la plupart très hydrophobes et ne peuvent donc pas fixer des molécules de type protéique, généralement hydrophiles. Le but est de créer à leur surface des groupements chimiques réactifs (amines, phosphates, carboxyles, hydroxyles) augmentant ainsi l'énergie polaire de surface et pouvant forcer l'adsorption des protéines [104 à 109].

L'utilisation des matériaux dans les milieux biologiques nécessite que les nouvelles surfaces soient stables.

Les premières méthodes de modification des matériaux utilisées sont l'incorporation de composés organiques dans la masse du matériau. Mais il peut y avoir une altération des propriétés physiques parfois incompatibles avec l'usage. Aussi des voies de modifications superficielles des matériaux ont été proposées.

Les surfaces peuvent être directement modifiées par adsorption de composés amphiphiles ou de macromolécules hydrophiles. Pour faciliter l'accrochage, il est souvent nécessaire de préparer la surface par différents traitements (chimiques, thermiques, par procédés ionisants) :

- soit par un premier dépôt pouvant être un dépôt de couches minces de systèmes auto-assemblés (SAMs) dont l'épaisseur peut être contrôlée et les groupements fonctionnels choisis en fonction de l'application [110 à 112], l'immobilisation de molécules biologiques telles que l'albumine ou la caséine afin d'augmenter la biocompatibilité du matériau [113,114] ou encore l'utilisation de tensioactifs à fort pouvoir hydrophobe tel que le Tween20[®] afin de réduire ou éliminer les adsorptions protéique ou peptidique indésirables [115],

- soit par oxydation contrôlée via un composé acide qui permet l'introduction de groupements carboxyles et carbonyles en surface. Un traitement chimique plus intense permet d'atteindre les premières couches polymères du matériau et un meilleur ancrage des groupes fonctionnels.

- soit par traitements thermiques, ce qui peut induire la création d'espèces radicalaires réactives avec l'oxygène et l'azote de l'air et donnant des groupements amines, hydroxyles ou carboxyliques [116].

Un autre type de méthode est le traitement par des procédés ionisants comme les radiations gamma, les rayonnements UV, les lasers, les décharges plasma [117 à 121]. Les sites actifs créés sont par la suite utilisés comme initiateurs de réactions de greffage [122,123]. Actuellement, la voie de fonctionnalisation la plus connue associe la création de sites radicalaires et l'immersion de la surface.

IV.3.2) Le système d'activation par plasma et dépôt de couches minces

La complexité et l'intérêt de cette méthode résident dans le choix du gaz et des paramètres de décharge utilisés, et dans la sélection du dépôt. Selon que l'on souhaite repousser ou adsorber les molécules biologiques, les groupements fonctionnels des molécules déposées doivent être choisis en fonction de leur réactivité et de leur spécificité [104,124].

V. Objectifs : Enjeu / Problématique / Innovation

Notre objectif est de mettre en œuvre une voie originale pour créer des surfaces fonctionnelles et biocompatibles à partir de polymères commerciaux. Cette voie doit être éventuellement industrialisable. Nos travaux proposent :

- l'activation par plasmas froids des surfaces
- le dépôt de couches minces de molécules amphiphiles biocompatibles

V.1) Les Plasmas « froids »

Les plasmas dits froids, ou basses températures, peuvent modifier la surface de matériaux polymères (mouillabilité, adhésion, rugosité...) sans en altérer les propriétés massiques. La rapidité d'utilisation et l'homogénéité de la modification en font une technique avantageuse permettant de pallier les aléas d'une chimie traditionnelle qui peut ne pas être applicable sur tous types de support, dont le contrôle est délicat et qui peut laisser des traces de solvants ou de métaux lourds non souhaitables. Par ailleurs, la gamme de gaz pouvant être ionisés est suffisamment large (gaz rares, fluorés, inertes) pour diversifier les espèces greffées et les activations de surface.

V.1.1) Un peu d'histoire

Il y a deux sens au mot plasma :

- un liquide : le physiologiste Johannes Purkinje (1787-1869) a ainsi désigné le liquide obtenu après extraction des globules et plaquettes du sang,
- des arcs électriques naturels puis artificiels : la foudre, les protubérances solaires, les aurores boréales.

Les premiers plasmas artificiels ont été créés en 1839 par Michael Faraday (1791-1867), pour reproduire et analyser des phénomènes se produisant dans les gaz sous faible pression.

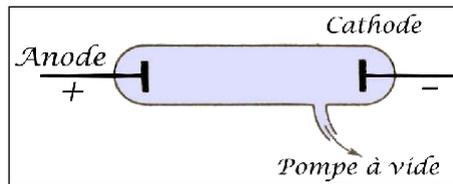


Figure I.16 : Schéma du montage réalisé par Michaël Faraday lui ayant permis de créer un plasma

Vers 1850, Heinrich Geissler (1815-1879) fabrique des tubes dans lesquels il fait varier la pression et la température de différents gaz : il observe des changements de couleurs (figure I.16). Le concept d'ondes et rayonnements électromagnétiques est alors proposé vers 1850 par le chimiste et physicien Sir Williams Crookes (1832-1919). Le mot « plasma » est employé pour la première fois en 1927 par le physicien Irving Langmuir (1881-1957) par analogie avec le plasma sanguin. Il le définit comme une « soupe » où se meuvent des espèces réactives.

V.1.2) Les plasmas : généralités

Un plasma électromagnétique est actuellement défini comme le « quatrième état de la matière » après les phases solide, liquide et gaz (figure I.17).

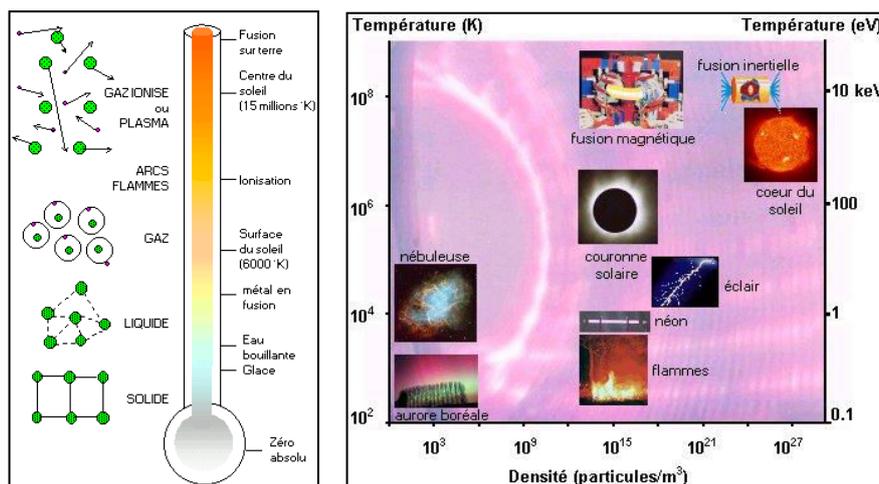


Figure I.17 : Les différents états de la matière en fonction de la température (à gauche) et des différents types de plasmas (à droite) (extrait de fusion-magnétique.cea.fr)

Lorsqu'un gaz est fortement chauffé (de 10^3 à 10^6 degrés Kelvin) ou soumis à un champ électrique de forte intensité, les électrons des couches supérieures sont arrachés lors des collisions entre particules. Le nombre d'électrons par unité de volume se trouve alors en quantité comparable à celui d'espèces neutres, le gaz devient un fluide conducteur

globalement neutre : c'est le plasma. En retournant à leur état initial, les molécules émettent un rayonnement électromagnétique qui confère au plasma sa couleur caractéristique, dépendant du gaz utilisé [125].

Un plasma est constitué de particules neutres, excitées et/ou métastables (les atomes et les molécules) et sa neutralité électrique est assurée par la présence de particules chargées que sont les électrons et les ions. Les électrons ont une masse environ 2000 fois plus faible que celles des ions, ils ont donc moins d'inertie et sont plus réactifs. Il est donc plus facile de donner de l'énergie aux électrons qu'aux espèces plus lourdes : les ions. Un plasma est caractérisé par la densité des différentes espèces présentes (neutres, ions et électrons) et donc par son degré d'ionisation α pouvant être compris entre 10^{-10} et 1.

$$\alpha = \frac{n_i}{n_i + n_0}$$

Relation entre le degré d'ionisation et la densité d'espèces du milieu

Où n_i est la densité des espèces d'ions et n_0 la densité des espèces neutres.

Il existe deux grandes familles de plasmas : les plasmas à l'équilibre thermodynamique et les plasmas hors équilibre.

V.1.3) Les plasmas à l'équilibre thermodynamique

Les plasmas à l'équilibre thermodynamique sont également appelés plasmas chauds. Le système est à la fois en équilibre thermique, mécanique et chimique, et déterminé par ses paramètres de pression et de température. Dans la nature, on trouve les plasmas chauds dans la couronne solaire, dans les naines blanches... Les plasmas à l'équilibre ont un degré d'ionisation supérieur à 10^{-5} . Les particules chargées (ions et électrons) ne se rencontrent jamais et suivent le trajet du champ électromagnétique induit [126].

Dans le domaine industriel, les plasmas chauds sont utilisés dans la torche à plasma, ou les plasmas d'arc, pour la vitrification (traitement des déchets) ou la projection thermique (dépôt de couches). Les plasmas chauds nécessitent une grande quantité d'énergie et des installations coûteuses.

V.1.4) Les plasmas hors équilibre thermodynamique

Les plasmas froids sont des plasmas dits hors équilibre thermodynamique dont le degré d'ionisation est égal à 10^{-4} . La dynamique du système est déterminée par les collisions permanentes entre les molécules et les espèces chargées [127 à 129]. Celles-ci sont créées sous l'effet d'une énergie apportée au système. Cette énergie peut être un champ électromagnétique tel qu'un laser ou un champ électrique tel que des radio-fréquences (RF) ou des micro-ondes. L'énergie et le gaz, toujours en quantité constante dans le système de réaction, créent des espèces réactives qui bombardent les surfaces d'objets présents [130 à 132].

Les techniques utilisant les plasmas froids ont de nombreuses applications aussi bien dans le domaine de la chimie organique que dans la gravure de composants électroniques. Ils sont utilisés dans la gravure en microélectronique, la fonctionnalisation, la stérilisation de dispositifs chirurgicaux, le nettoyage de surfaces [133 à 135].

Dans le cadre de notre travail, nous avons utilisé des plasmas froids RF en présence de gaz tels que l'argon (Ar) et l'hélium (He) [136]. L'activation de la surface est suivie d'une fonctionnalisation par dépôt de couches minces de molécules de types tensioactives intéressantes [137].

V.2) Les tensioactifs (TA)

V.2.1) Définition

Une molécule tensioactive a la particularité d'être amphiphile : elle comporte une partie hydrophobe (ou queue) et une partie hydrophile (ou tête) (figure I.18). Cette bivalence lui permet de s'adapter facilement à son milieu environnant et d'être utilisée dans de nombreuses applications [138,139]. Il existe cinq familles de tensioactifs classées selon la charge de la tête :

- Les anioniques, de charge négative. Ils possèdent à leur tête des groupements tels que phosphates, sulfates et sont accompagnés d'un contre ion (souvent Na^+),
- Les cationiques avec des groupements tels que NH_4^+ avec un contre ion : Br^- ou Cl^- ,
- Les non ioniques dont la tête ne possède pas de charge tel que l'oxyde de polyéthylène,

- Les zwitterioniques qui sont amphotères, soit doublement chargés et ne possèdent donc pas de contre ion comme le cocamidopropyl de bétaine,

Les catanioniques qui sont l'association de deux molécules dont les têtes sont de charges opposées et dont les queues se stabilisent par liaisons hydrophobe ou recouvrement π par exemple.

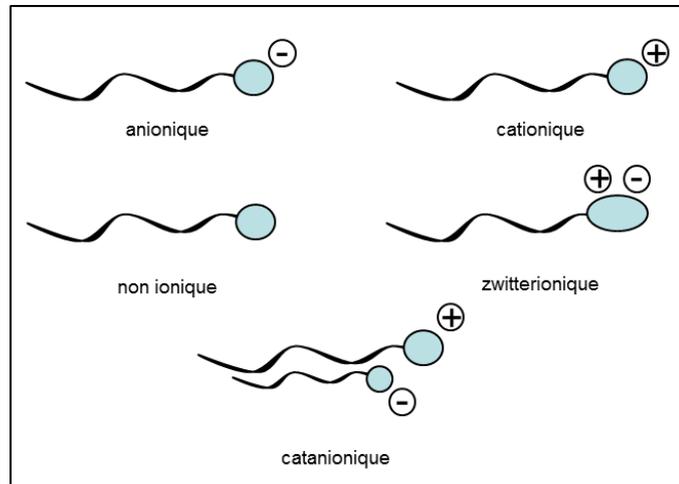


Figure I.18 : Représentations schématisées des différents types de molécules tensioactives

La première caractéristique des tensioactifs est leur capacité d'agrégation pour minimiser leur énergie de réaction et abaisser la tension de surface d'une solution. En effet, au-delà d'une certaine concentration, appelée concentration d'agrégation critique, notée CAC, ils forment des agrégats sphériques ou ovales. Cette concentration est le point de croisement des tangentes de la courbe obtenue en relevant à différentes concentrations la valeur de la tension de surface d'une solution tensioactive (figure I.19).

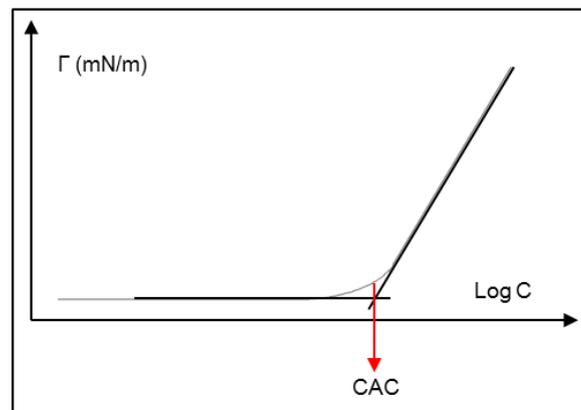


Figure I.19 : Evaluation de la concentration d'agrégation critique d'une molécule tensioactive par la mesure de la tension de surface en fonction d'une gamme de concentration

Selon les formules chimiques et à partir d'une concentration critique, des particules se forment spontanément. Si elles sont constituées d'une seule couche de molécules, elles sont appelées micelles ; si elles sont constituées par au moins deux couches de tensioactifs, elles sont appelées vésicules (figure I.20). Une micelle est un système dynamique instable et évolutif, tandis qu'une vésicule est un système stable se désagrégant sous l'effet du temps, d'une pression osmotique ou après avoir réagi avec une molécule particulière [140,141].

Quand les tensioactifs sont dans un milieu aqueux, leurs queues, pour se stabiliser, se regroupent et orientent les têtes hydrophiles vers l'eau. L'espace ainsi créé au centre de la micelle permet d'y enfermer un composé hydrophobe ou lipophile. En revanche, lorsque le milieu est majoritairement composé d'une solution organique, les tensioactifs vont créer un cœur hydrophile, qui donne lieu à une micelle dite « inverse » [142].

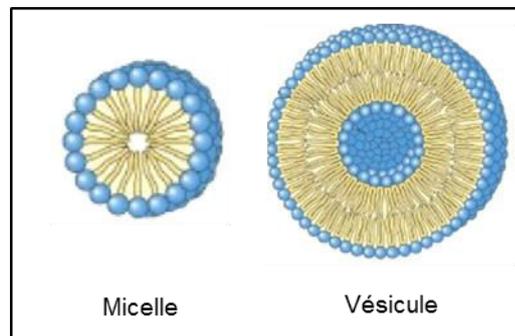


Figure I.20 : Schéma de l'agrégation micellaire et vésiculaire de molécules tensioactives

La partie hydrophobe est une chaîne carbonée plus ou moins longue et plus ou moins substituées par des groupes méthyles, des atomes de fluor...[143 à 146] La caractéristique la plus intéressante reste la tête de ces molécules. En effet, elle peut être choisie de façon à posséder une fonction dite ciblante, c'est-à-dire capable de réagir de manière spécifique avec un composé cible lui aussi spécifique. Les applications sont pour la plupart dans les domaines de la pharmacie et des produits cosmétiques.

La plupart des tensioactifs sont commerciaux ou facilement synthétisables, et sont souvent biodégradables et/ou éliminables.

V.2.2) Les tensioactifs dans les domaines pharmaceutique et cosmétique

Les tensioactifs font partie intégrante de notre quotidien. Ils sont présents dans tous les produits détergents tels que les savons, les produits ménagés ou encore les dentifrices. Ils ont la capacité de capter des produits indésirables (tâches, bactéries...). Ils sont ensuite éliminés

avec le rinçage. Ils sont aussi utilisés dans les applications spécifiques comme dans les latex et les microparticules.

Les vésicules permettent d'encapsuler des principes actifs. Les applications sont dans les domaines des médicaments et de la cosmétique [147,148]. Dans les crèmes, latex, laits et autres produits cosmétiques, elles permettent la libération et la diffusion d'un principe hydratant ou de molécules ralentissant le vieillissement des cellules. Dans ces cas, leur action est localisée dans les parties supérieures de l'épiderme.

De même pour des applications pharmaceutiques, l'encapsulation de principes actifs est de plus en plus utilisée. Par exemple pour lutter contre les invasions virales (comme le virus de l'immunodéficience humaine, VIH), il est proposé des vésicules contenant une molécule capable de bloquer l'action d'un virus ou détruire les cellules infectées [149,150]. Pour cela les tensioactifs catanioniques composant ces vésicules ont la particularité de présenter une tête glycoprotéinique reconnue par les cellules infectées. Lors du contact, les vésicules s'ouvrent et se fondent dans la membrane lipidique, libérant ainsi le principe actif.

Actuellement, les tensioactifs sont utilisés au même titre que les polymères amphiphiles et servent à modifier les propriétés intrinsèques ou de surface de matériaux [151,152]. Comme nous avons pu le voir précédemment, la nécessité de créer des surfaces intelligentes pouvant à la fois être biocompatibles et biospécifiques est un enjeu de taille, entre autre, pour la détection de maladies neurodégénératives dont la mise en évidence de l'antigène responsable est difficile au-dessous d'une certaine concentration.

V.3) La modification de surface par plasma

Une voie en émergence est la chimie du plasma qui permet selon les gaz utilisés de greffer directement à la surface de matériaux des groupes fonctionnels. Cette technique douce n'altère pas les propriétés intrinsèques du matériau considéré. Il est ensuite possible de fixer des molécules par adsorption. Des supports fonctionnalisés, de façon irréversible, sont ainsi créés spécifiquement.

Les dépôts peuvent se faire :

- soit par trempage dans une solution contenant le produit à déposer. Des tensioactifs sont intéressants tels que le dodecylbenzenesulfonate de sodium pour du polypropylène [153],
- soit par la technique dite de la tournette (ou spin-coating) [154].

VI – Conclusion

Les différentes notions abordées dans ce chapitre permettent d'orienter ce travail de thèse sur la conception de nouveaux supports de détection donnant un signal de détection plus sensible pour de faibles concentrations en protéine antigénique, sans pour autant donner lieu à de faux-positifs provenant d'associations et d'absorption aspécifiques des biomolécules d'intérêts entre-elles ou à la surface des supports. L'étude bibliographique réalisée met en évidence la nécessité de définir les propriétés des biomolécules d'intérêts ainsi que les types d'interactions qu'elles présentent afin d'adapter la surface d'analyse. Ainsi l'étude bibliographique montre que les biomolécules de type anticorps présentent un caractère semi hydrophobe, un point isoélectrique proche de celui de la protéine antigénique ($pI \sim 5$) et des groupements amines et carboxyles pouvant créer des liaisons hydrogènes et électrostatiques avec d'autres molécules possédant des groupes fonctionnels proches.

L'amélioration de la détection des antigènes ne doit pas uniquement tenir compte de la spécificité de reconnaissance du complexe immunitaire mais également de l'affinité de l'anticorps primaire pour la surface des puits constituant les répliquettes de dosage. Ainsi, il est montré que l'amélioration du seuil de détection du système ELISA et la réduction du bruit de fond sont liés à une surface du puits ayant une rugosité suffisante pour améliorer l'induction de l'anticorps de capture évitant ainsi tout phénomène de désorption et compatible avec la molécule d'intérêt. Il apparaît clairement que ces améliorations passent d'abord par une chimie de surface induisant un contrôle des propriétés physico-chimiques de la surface interne du puits de dosage.

Parmi les diverses voies proposées dans la littérature, une procédure originale a retenu notre attention et correspond à l'activation de la surface polymère par un plasma froid avec le dépôt de couches minces organisées de molécules amphiphiles. L'objectif de ces travaux de thèse a été de définir des surfaces fonctionnalisées homogènes et stables permettant aux différentes biomolécules d'intérêt de réagir de manière spécifique entre elles et avec la surface. En ce sens, l'étude et la caractérisation de ces couches et l'analyse des interactions biomolécules – surface, ont permis une meilleure compréhension de l'influence de leurs propriétés quant à l'accroche de l'anticorps de capture et donc au signal de détection.

VII– Références bibliographiques

II. 2) La maladie de Creutzfeld-Jakob

- [1] Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders ; *Am. Psy. Ass.* ; 1994 ; DSM IV
- [2] Prusiner SB, Hadlow WJ, Eklund CM, Race RE. Sedimentation properties of the scrapie agent. *PNAS* (1977) ; 74 (10) ; 4656-4660.
- [3] Prusiner SB. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* (1982) ; 216 (4542) ; 136-144.
- [4] Bockman JM, Kingsbury DT, McKinley MP, Bendheim PE, Prusiner SB. Creutzfeldt-Jakob disease prion proteins in human brains. *Journal of Medecine* (1985) ; 312 (2) ; 73-78
- [5] Prusiner SB. Prions. *PNAS USA* (1998) ; 95 ; 13363-13383.
- [6] Oki RK, Nwanebu FC. Prion and prion diseases. *Journal of Clinical and Experimental Microbiology* (2009) ; 9 (1) ; 38-52.
- [7] McKinley MP, Masiarz FR, Prusiner. Reversible chemical modification of the scrapie agent. *Science* (1981) ; 214(4526) ; 1259-1261.
- [8] Conversion of α –helices into β -sheets features in the formation of scrapie prion protein. *PNAS USA* (1993) ; 90 (23) ; 10962-10966.
- [9] Horvath V, Kovacs A, Menyhard DK. Conformational studies on the prion protein 11-122 fragment. *Journal of Molecular Structure* (2007) ; 804 (1-3) ; 9-15.
- [10] Beranger F, Crozet C, Goldsborough A, Lehmann S. Trehalose impairs aggregation of PrP-sc molecules and protects prion-infected cells against oxidative damage. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2008) ; 374 (1) ; 44-48.
- [11] Welch WJ, Gambetti P. Chaperoning brain diseases. *Nature* (1998) ; 392; 23-24.
- [12] Malaga-Trillo. Regulation of embryonic cell adhesion by the prion protein. *PLoS Biology* (2009) ; 7 ; 576-590.
- [13] Lawson VA, Collins SJ, Masters CL, Hill AF. Prion protein glycosylation. *Journal of Neurochemical* (2005) ; 93 ; 793-801.
- [14] Castilla J, Saà P, Soto C. Detection of prion in blood. *Nature Medecine* (2005) ; 11 ; 982-985.
- [15] <http://www.agriculture.gouv.fr> et <http://www.dgcrf.bercy.gouv.fr>
- [16] Bergendahl V, Glaser BT, Burgess RR. A fast Western blot procedure improved for quantitative analysis by direct fluorescence labeling of primary antibodies. *Journal of Immunological Methods* (2003) ; 277 ; 117-125.
- [17] Serban D, Taraboulos A, DeArmond SJ, Prusiner SB. Rapid detection of Creutzfeldt-Jakob disease and scrapie prions proteins. *American Academy of Neurology* (1990) ; 40-110.
- [18] Barletta JM, Edelman DC, Highsmith WE, Constantine NT. Detection of ultra-low levels of pathologic prion protein in scrapie infected hamster brain homogenates using real-time immuno-PCR. *Journal of Virological Methods* (2005) ; 127 (2) ; 154-164.
- [19] Dupiereux I, Zorzi W, Lins L, Bresseur R, Colson P, Heinen E, Elmoualij B. Interaction of the 106-126 prion peptide with lipid membranes and potential implication for neurotoxicity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2005) ; 331 ; 894-901.

II.3) La maladie d'Alzheimer

- [20] Fischer O. Miliare Nekrosen mit drusigen Wucherungen der Neurofibrillen, eine regel mässig Veränderung der Hirnrinde bei seniler Demenz. *Mtschr. Psychiatr. Neurol.* (1907) ; 22 ; 361-372.
- [21] 37^{ème} Conférence des Psychiatres Allemands (Tübingen, 04/11/1906)

- [22] Alzheimer A. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift Psych.* (1907) ; 64 ; 146-148.
- [23] Maner K, Volk S, Gerbaldo H. Auguste D; and Alzheimer's disease. *The Lancet* (1997) ; 349 ; 1546-1549.
- [24] Lee VMY, Goedert M and Trojanowski JQ. Neurodegenerative Tauopathies. *Annu. Rev. Neurosci.* (2001) ; 24 ; 1121-1159
- [25] Kraepelin E. *Traité de Psychiatrie* (1912)
- [26] Zekri O. *Pharmacologie de la Maladie d'Alzheimer* (1999).
- [27] Williams DR. Tauopathies : classification and clinical update on neurodegenerative diseases associated with microtubule-associated protein Tau. *Intern. Med. Jour.* (2006) ; 36 ; 652-660.
- [28] Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease, *Nature* (1963) ; 197 ; 192-193)
- [29] Yan SD, Fu J, Soto C, Chen X, Zhu H, Al-Mohanna F, Collison K, Zhu A, Stern E, Saido T, Tohyama M, Ogawa S, Roher A, Stern D. An intracellular protein that binds amyloid- β peptide and mediates neurotoxicity in Alzheimer disease. *Nature* (1997) ; 392 ; 23-24.
- [30] Mullan M, Tsuji S, Miki T, Katsuya T, Naruse S, Kaneko K, Shimizu T, Kojima T, Nakano I, Ogihara T, Miyatake T, Ovenstone I, Crawford F, Goate A, Hardy J, Roques P, Roberts G, Luthert P, Lantos P, Clark C. Clinical comparison of Alzheimer's disease in pedigrees with the codon 717 Val-Ile mutation in the amyloid precursor protein gene. *Neurobiology of aging* (1993) ; 14 (5) ; 407-419.
- [31] Saunders AM, Roses AD, Pericak-Vance MA, Dole KC, Strittmatter WJ, Schmechel ED, Szymanski MH, McCown N, Manwaring MG, Schmechel K, Breitner JCS, Goldgaber D, Benson MD, Goldfarb L, Brown WT. Apolipoprotein E allele distributions in late-onset Alzheimer disease and in other amyloid-forming diseases. *The Lancet* (1993) ; 342 (8873) ; 710-711.
- [32] Herrmann M, Golombowski S, Kränchi K, Frey P, Mourton-Gilles M, Hulette C, Rosenberg C, Müller-Spahn F, Hock C. ELISA quantification of phosphorylated Tau protein in the Alzheimer's disease brain. *Eur Neurol* (1999) ; 45 ; 205-210.
- [33] Buée L, Bussièrre T, Buée-Scherrer V, Delacourte A and Hof PR. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Research Interactive* (2000) ; 33 ; 95-130.
- [34] Johnson GVW and Jenkins SM. Tau protein in normal and Alzheimer's disease brain. *Journal of Alzheimer's Disease* (1999) ; 1 ; 307-328.
- [35] Brandt R, Hundelt M and Shahami N. Tau alteration and neuronal degeneration in tauopathies : mechanisms and models. *Biochim. And Biophys. Acta* (2005) ; 1739 ; 331-354.
- [36] Brandt R and Leschil J. Functional interactions of Tau and their relevance for Alzheimer's disease. *Current Alzheimer Research* (2004) ; 1 ; 255-269.
- [37] Sergeant N, David JP, Lefranc D, Vermersch P, Watzet A and Delacourte A. Different distribution of phosphorylated Tau protein isoforms in Alzheimer's and Pick's diseases. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal* (1997) ; 412 ; 578-582.

II.4) La maladie de Parkinson

- [38] Dluzen DE and McDermott JL. Gender differences in neurotoxicity of the nigrostriatal dopaminergic system : implications for Parkinson's disease. *J. Genet; Specif. Med.* (2000) ; 3 ; 36-42.
- [39] Parkinson J. An essays on the shaking palsy. *Journal of Neuropsychiatry Clin Neurosci* (2002) ; 14 (2) ; 223-236.
- [40] Berrios GE. Parkinson's Disease. *The History of Clinical Psychiatry* (1995) ; 95-112.

- [41] Damier P, Hirsch EC, Agid Y and Graybiel AM. The substantia nigra of the human brain – Patterns of loss of dopamine-containing neurons in Parkinson’s disease. *Brain* (1999) ; 122 ; 1497-1448.
- [42] Recchia A, Debetto P, Negro A, Guidolin D, Skaper SD and Giusti P. α -Synuclein and Parkinson’s disease. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal* (2004) ; 18 ; 617-626.
- [43] Gelb D, Oliver E and Gilman S. Diagnostic criteria for Parkinson’s disease. *Arch Neurol* (1999) ; 56(1) ; 33-39.
- [44] Nakajo S, Shioda S, Nakai Y and Nakaya K. Localization of phosphoneuroprotein 14 (PNP14) and its mRNA expression in rat brain determined by immunocytochemistry and in situ hybridisation. *Brain Res. Mol.* (1994) ; 27 ; 81-86.
- [45] Abeliovich A, Schmitz Y, Farinas I, Choi-Lundberg D, Ho WH, Ryan A et al. Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron*. (2000) ; 25 ; 239-252.
- [46] Eliezer D, Kutluay E, Bussell R and Browne G. Conformational properties of alpha-synuclein in its free and lipid-associated states. *J. Biol. Mol.* (2001) ; 307 ; 1061-1073.
- [47] Biere AL, Wood SJ, Wypych J, Louis JC et al. Parkinson’s disease-associated alpha-synuclein is more fibrillogenic than beta- and gamma-synuclein and can not cross-seed its homologs. *J. Biol. Chem.* (2000) ; 275 ; 34574-34579.
- [48] Volles MJ and Lansbury PT. Vesicle permeabilization by protofibrillar alpha-synuclein is sensitive to Parkinson’s disease-linked mutations and occurs by a pore-like mechanism. *Biochemistry* (2002) ; 41 ; 4595-4602.
- [49] Ueda K, Fukushima H, Masliah E, Xia Y, Iwai A and Saitoh T. Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (1993) ; 90 ; 11282-11286.
- [50] Kruger R, Kuhn W, Muller T, Woitalla D, Graeber M, Kosel S, Przuntek H, Eppelen JT, Schols L and Riess O. Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson’s disease. *Nat. Genet.* (1998) ; 18 ; 106-108.
- [51] Splilantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R and Goedert M. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature (London)* (1997) ; 388 ; 839-840.
- [52] Siderowf A and Stern M. Update on Parkinson’s disease. *Ann. Intern. Med.* (2003) ; 138 ; 651-658.
- [53] Tompkins MM, Basgall EJ, Zamrini E et al. Apoptotic-like changes in Lewy-body-associated disorders and normal aging in substantia nigra neurons. *American Jour. Pathol.* (1997) ; 150 ; 119-131.
- [54] Jenner P and Olanow CW. Understanding cell death in Parkinson’s disease. *Ann. Neurol.* (1998) ; 44 (1) ; 72-84.
- [55] Berg D, Gerlach M, Youdim MB, Double KL, Zecca L, Riederer P and Becker G. Brain iron pathways and their relevance to Parkinson’s disease. *J. Neurochem.* (2001) ; 79 ; 225-236.
- [56] McNaught K, Belizaire R, Isacson O, Jenner P and Olanow CW. Altered proteasomal function in sporadic Parkinson’s disease. *Exp. Neurol.* (2003) ; 179 ; 38-46.
- [57] Jenner P, Dexter DT, Sian J, Schapira AH and Marsden CD. Oxidative stress as a cause of nigral cell death in Parkinson’s disease and incidental Lewy body disease. *Ann. Neurol.* (1992) ; 32 ; 82-87.
- [58] Jenner P. Oxidative mechanism in nigral cell death in Parkinson’s disease. *Mov. Disord.* (1998) ; 13 ; 24-34.
- [59] Jankovic J. Parkinson’s disease : clinical features and diagnosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* (2008) ; 79 (4) ; 368-376.

- [60] McLaughlin BA, Nelson D, Erecinska M and Chesselet MF. Toxicity of dopamine to striatal neurons in vitro and potentiation of cell death by mitochondrial inhibitor. *J. Neurochem.* (1998) ; 70 ; 2406-2415.
- [61] Ostrerova-Golts N, Petrucelli L, Hardy J, Lee JM, Farer M and Wolozin B. The A53T alpha-synuclein mutation increases iron-dependant aggregation and toxicity. *J. Neurosci.* (2000) ; 20 ; 6048-6054.
- [62] Ruberg M. Maladie de Parkinson : vers un mécanisme de mort neuronale. 25-45.
- [63] Warner TT and Schapira AH. Genetic and environmental factors in the cause of Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* (2003) ; 53 (3) ; 16-25.
- [64] Rubgjern K, Ritz B, Korbo L, Martinussen N and Olsen JH. Risk of Parkinson's disease after hospital contact for head injury : population based cas-control study. *Biol. Med. J.* (2008) ; 337 ; 2493-2495.
- [65] Lees AJ, Hardy J and Revesz T. Parkinson's disease. *Lancet* (2009) ; 373 ; 2055-2066.
- [66] Fuentes R, Petersson P, Siesser WB, Caron MG and Nicoletis MA. Spinal cord stimulation restores locomotion in animal models of Parkinson's disease. *Science* (2009) ; 323 ; 1578-1582.

II.5) Les problèmes économiques et sanitaires

- [67] Goldsmith E. *Le défi du 20ème siècle* (1994), 261-262.

III . La détection immunoenzymologique

- [68] Yalow R and Berson S. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *Jour. Clin. Invest.* (1960) ; 39 ; 1157-1175.
- [69] Lequin R. Enzyme immunoassay (EIA) / Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). *Clin. Chem.* (2005) ; 51(12) ; 2415-2418.
- [70] Wide L and Porath J. Radioimmunoassay of proteins with the use of Sephadex-coupled antibodies. *Biochem. Biophys. Acta.* (1996) ; 30 ; 257-260.
- [71] Engvall E and Perlmann P. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobuline G. *Immunochemistry* (1971) ; 8(9) ; 871-874.
- [72] Van Weemen BK and Schuurs AH. Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *FEBS Letters* (1971) ; 15(3) ; 232-236.
- [73] Engvall E. *The Scientist* (1995) ; 9(18) ; 8.

III.1) Les principaux acteurs

- [74] Lindenmann J. Origins of the terms of antibody and antigen. *Scand. Jour. Immunol.* (1984) ; 19 (4) ; 281-285.
- [75] Brannon H. Antibodies. Health's Disease and Antibody – Dorland's Medical Dictionary (2008).

II – 2) Le complexe immun anticorps-antigène

- [76] Letonturier P. *Immunologie Générale* (8^{ème} édition).

III.3) ELISA : Enzyme Linked ImmunoSorbant Assay

- [77] Watcharatanyatip K , Boonmoh S, Chaichoun K, Songserm T, Woratanti M, Dharakul T. Multispecies detection of antibodies to influenza A viruses by a double antigen sandwich ELISA. *Journal of Virological Methods* (2010) ; 163 ; 238-243.
- [78] Luo Q, Huang H, Zou W, Dan H, Guo X, Zhang A, Yu Z, Chen H, Jin M. An indirect sandwich ELISA for the detection of avian influenza H5 subtype viruses using anti-hemagglutinin protein monoclonal antibody. *Veterinary Microbiology* (2009) ; 137 ; 24–30.

- [79] Rye DB, Saper CB and Wainer BH. Stabilization of TMB reaction product : application for retrograde and anterograde tracing, and combination with immunohistochemistry. *The Histochemical Society* (1984) ; 32(11) ; 1145-1153.
- [80] Vos EA. Direct ELISA for estrone measurement in the feces of sows - prospects for rapid, sow side pregnancy diagnosis. *Theriogenology* (1996) ; 2 (46) ; 211-231.
- [81] Schots A, Van der Leede BJ, De Jongh E, Egberts E. A method for the determination of antibody affinity using a direct ELISA. *Journal of Immunological Methods* (1988) ; 109 (2) ; 225-233.
- [82] Al-Dujaili EAS. Development and validation of a simple and direct ELISA method for the determination of conjugated (glucuronide) and non-conjugated testosterone excretion in urine. *Clinica Chimica Acta* (2006) ; 364 (1-2) ; 172-179.
- [83] Raymond D. In vitro veritas ? : Stalking HIV immune dysregulation. *Treatment Issues : Newsletter of Experimental AIDS Therapies* (2002) ; 16 (5).

IV. Voies d'amélioration

- [84] Dear Dv et al. Effect of enzymatique deimination on the conformation of recombinant prion protein. *Bioch and Biophys. Acta.* (2009) ; 1794 ; 1123-1133.
- [85] Alvarez-Martinez MT, Torrent J, Lange R, Verdier JM, Balny C and Liautard JP. Optimized overproduction, purification, characterization and high-pressure sensitivity of the prion protein in the native (PrP^C-like) or amyloid (PrP^{Sc}-like) conformation. *Bioch et bioph. Acta* (2003) ; 1645 ; 228-240.
- [86] Florio T et al. Expression in E. Coli and purification of recombinant fragments of wild type and mutant human prion protein. *Neurochem. International* (2002) ; 41 ; 55-63.
- [87] Kushnirov VV, Alexandrov IM, Mitkevich OV, Shkundina IS and Ter-Avanesyan MD. Purification and analysis of prion and amyloid aggregates. *Methods* (2006) ; 39 ; 50-55.
- [88] Kontseikova E, Cattaneo A and Novak Michal. Quick purification of recombinant human truncated tau proteins for immunoanalysis. *Jour. Immuno. Methods* (1995) ; 185 ; 245-248.
- [89] Ivanovova N, Handzusova M, Hanes J, Kontseikova E and Novak M. High-yield purification of fetal tau176 perserving its structure and phosphorylation pattern. *Jour. Immuno. Methods* (2008) ; 339 ; 17-22.
- [90] Huang C, Ren G, Zhou H and Wang CC. A new method for purification of recombinant human α -synuclein in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification* (2005) ; 42 ; 173-177.
- [91] Chan P et al. Extensive nuclear localization of α -synuclein in normal rat brain neurons revealed by a novel monoclonal antibody. *Neuroscience* (2007) ; 145 ; 539-555.
- [92] Bisaglia M, Trolio A, Tessari I, Bubacco L, Mammi S and Bergantino E. Cloning, expression, purification and spectroscopic analysis of the fragment 57-102 of human α -synuclein. *Protein Expression and Purification* (2005) ; 39 ; 90-96.
- [93] Hanoux V, Wijkhuisen A, Alexandrenne C, Crémion C, Boquet D and Couraud JY. Polyclonal anti-idiotypic antibodies which mimic an epitope of the human prion protein. *Molec. Immuno.* (2009) ; 46 ; 1076-1083.
- [94] Feredoff HJ et al. Identification of human α -synuclein specific single chain antibodies. *Biochem. And Biophys. Res. Com.* (2006) ; 349 ; 1198-1205.
- [95] Liu T, Zwingman T, Wong BS, Peterson RB, Herrup K and Sy MS. Differential expression of cellular prion protein in mouse brain as detected with mutiple anti-PrP monoclonal antibodies. *Brain Research* (2001) ; 896 ; 118-129.
- [96] Umekage S and Kikuchi Y. *In vitro* and *in vivo* production and purification of circular RNA aptamer. *Jour. Biotech.* (2009) ; 139 ; 265-272.
- [97] Wang W, Chen C, Qian M and Zhao XS. Aptamer biosensor for protein detection using gold nanoparticles. *Anal. Biochem.* (2008) ; 373 ; 213-219.

- [98] Spinola SM and Cannon JG. Different blocking agents cause variation in the immunologic detection of proteins transferred to nitrocellulose membranes. *Jour. Immuno. Methods* (1985) ; 81 (1) ; 161-165.
- [99] Baldo BA, Tovey ER and Ford SA. Comparison of different blocking agents and nitrocellulose in the solid phase detection of proteins by labelled antisera and protein A. *Jour. Biochem. and Biophys. Methods* (1986) ; 12 (5-6) ; 271-279.
- [100] Bird CR, Gearing AJH and Thorpe R. The use of Tween 20 alone as blocking agent for immunoblotting can cause artefactual results. *Jour. Immuno. Methods* (1988) ; 106 (2) ; 175-179.
- [101] Craig WY, Poulin SE, Collins MF, Ledue TB, Ritchie RF. Background staining in immunoblot assays reduction of signal caused by cross-reactivity with blocking agent. *Jour. Immuno. Methods* (1993) ; 158 (1) ; 67-76.
- [102] Batteiger B, Newhall WJ and Jones RB. The use of Tween 20 as a blocking agent in the immunological detection of protein transferred to nitrocellulose membranes. *Jour. Immuno. Methods* (1982) ; 55 (3) ; 297-307.
- [103] Vogt Jr. RV, Phillips DL, Henderson O, Whitfield W and Spierto FW. Quantitative differences among various proteins as blocking agents for ELISA microtiter plates. *Jour. Immuno. Methods* (1987) ; 101 (1) ; 43-50.

IV.3) Modification des propriétés du support de détection

- [104] Kasemo B. Biological surface science. *Surf. Sci.* (2002) ; 500 ; 656-677.
- [105] Chan CM, Ko TM and Hiraoka H. Polymer surface modification by plasmas and photons. *Surface Science Reports* (1996) ; 24 ; 1-54.
- [106] Vahdat A, Bahrami H, Ansari N, Ziaie F. Radiation grafting of styrene onto polypropylene fibres by a 10 MeV electron beam. *Radiation Physics and Chemistry* (2007) ; 76 ; 787-793.
- [107] Duncan MR, Lee JM, Warchol MP. Influence of surfactants upon protein/peptide adsorption to glass and polypropylene. *International journal of Pharmaceutics* (1995) ; 120 ; 179-188.
- [108] Norman-Chave C. A method for surface controlled oxidation : Application to metal coating surface preparation. *Congrès Journée d'Etude Aluminium* (1994) ; 50 (273) ; 333-339.
- [109] Klein E, Kerth P, Lebeau L. Enhanced selective immobilization of biomolecules onto solid supports coated with semifluorinated self-assembled monolayers. *Biomaterials* (2008) ; 29 ; 204-214.
- [110] Choong C, Griffiths JP, Moloney MG, Triffitt J, Swallow D. Direct introduction of phosphonate by the surface modification of polymers enhances biocompatibility. *Reactive and Functional Polymers* (2009) ; 69 ; 77-85.
- [111] Eckert AW, Gröbe D, Rothe U. Surface-modification of polystyrene-microtitre plates via grafting of glycidylmethacrylate and coating of poly-glycidylmethacrylate. *Biomaterials* (2000) ; 21 ; 441-447.
- [112] De Geyter n, Morent R, Leys C, Gengembre L, Payen E. Treatment of polymer films with a dielectric barrier discharge in air, helium and argon at medium pressure. *Surface and Coating Technology* (2007) ; 201 ; 7066-7075.
- [113] Ikada Y. Surface modification of polymers for medical applications. *Biomaterials* (1994) ; 15 (10) ; 725-736.
- [114] Ikada Y, Shalaby SW, Langer R and Williams J. Interfacial biocompatibility. *Polym. of Biol. and Biomed. Signif.* (1994) ; 540 ; 35-48.
- [115] Sebra RP, Masters KS, Bowman CN and Anseth KS. Surface grafted antibodies : controlled architecture permits enhanced antigen detection. *Langmuir* (2005) ; 21 ; 10907-10911.

- [116] Novel photochemical surface functionalization of polysulfone ultrafiltration membranes for covalent immobilization of biomolecules. *Journal of Membrane Science* (1996) ; 120 ; 239-259.
- [117] Fujimoto K, Takebayashi Y, Inoue H and Ikada Y. Ozone-induced graft polymerisation onto polymer surface. *Jour. Polym. Sci.* (1993) ; 31 ; 1035-1043.
- [118] Huang N, Yang P, Leng YX, Wang J, Sun H, Chen JY and Wan GJ. Surface modification of biomaterials by plasma immersion ion implantation. *Surf. And Coat. Tech.* (2004) ; 186 ; 218-26.
- [119] Ward R. *New Frontiers in Polymer Surface Modification – Surface Technology. Medical Device and Diagnostic Industry* (2007).
- [120] Sano S, Kato K and Ikada Y. Introduction of functional groups onto the surface of polyethylene for protein immobilization. *Biomaterials* (1993) ; 14 (11) ; 817-822.
- [121] Kejlova K, Labsky J, Irova d, Bendova H. Hydrophilic polymers – biocompatibility testing in vitro. *Toxicology in Vitro* (2005) ; 19 ; 957-962.
- [122] Morent R, De Geyter N, Leys C, Gengembre L, Payen E. Study of ageing behaviour of polymer films treated with a dielectric barrier discharge in air, helium and argon at medium pressure. *Surface and Coating Technology* (2007).
- [123] Terlinger JGA. Functionalization of polymers surfaces - Introduction of functional groups at polymers surfaces by glow discharge techniques. *Europlasma Technical Paper* (2004) ; chap 2.
- [124] Naqvi A, Nahar P and Gandhi RP. Introduction of functional groups onto polypropylene and polyethylene surfaces for immobilization of enzymes. *Analytical Biochemistry* (2002) ; 306 ; 74-78.

V. Objectifs : Enjeu / Problématique / Innovation

- [125] Ricard A. Plasmas réactifs. *Société Française du Vide* (1995).
- [126] Kazadi MBA, Liyoko M and Nyamu M. Tenseur diélectrique du plasma chaud dans un champ électromagnétique en rotation. *Phys. Scr.* (2009) ; 80.
- [127] Winchester MR and Payling R. Radio-frequency glow discharge : a critical review. *Spectrochimica* (2004) ; 59 ; 607-666.
- [128] Plasmas froids : Systèmes et procédés. *Publications de l'université de Saint-Etienne* (2008).
- [129] Boeuf JB. Les plasmas froids hors équilibre. *Colloque Delcroix* (2006).
- [130] Man BY, Wang XT and Liu AH. Transport of plasmas produced by pulsed laser ablation of HGCDTE. *Journal of Applied Physics* (1998) ; 83(7) ; 3509-3513.
- [131] Plasmas froids : Réactivité en volume et en surface. *Publications de l'université de Saint-Etienne* (2005).
- [132] Chan CM. Polymer surface modification and characterization (1993).
- [133] Inagaki N. Plasma surface modification and plasma polymerization (1996).
- [134] Pinson SJM, Collins J, Thompson GE, Alexander MR. Atmospheric pressure plasma cleaning of aluminium. *Transactions of the Institut of Metal Finishing* (2001) ; 79 (5) ; 155-159.
- [135] Alder S, Scherrer M, Daschner FD. Costs of low-temperature plasma sterilization compared with other sterilization methods. *Journal of Hospital Infection* (1998) ; 40 (2) ; 125-134.
- [136] Elghazaly MH, Abdel Bakry AM, Mansour MM, Gabr M, Elsayed NM. Details comparison between probe density measurements of glow discharge in argon and in helium. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer* (2006) ; 97 (1) ; 58-67.
- [137] Terlingen JGA. Fonctionnalization of polymer surfaces. *Europlasma Tech. Paper* (2004) ; chap. 2.

V.2) *Les Tensioactifs (TA)*

- [138] Rico I and Lattes A. *Microemulsions Systems* (1987) ; 23 ; 341.
- [139] Xu G, Zhang X, He W, Liu H, Li H. The study of surfactant application on synthesis of YAG nano-sized powders. *Powder Technology* (2006) ; 163 (3) ; 202-205.
- [140] Baeurle SA, Kroener J. Modeling effective interactions of micellar aggregates of ionic surfactants with the Gauss-Core potential. *Journal of Mathematica Chemistry* (2004) ; 36 ; 409–421.
- [141] Barenholz Y, Gibbes D, Litman B J, Goll J, Thompson T E, Carlson FD. A simple method for the preparation of homogeneous phospholipid vesicles. *Biochemistry* (1977) ; 16 (12) ; 2806.
- [142] Uskokovic V, Drofenik M. Reverse micelles : Inert nano-reactors or physico-chemically active guides of capped reactions. *Advances in Colloid and Interface Science* (2007) ; 133 ; 23-34.
- [143] Kandadai MA, Mohan P, Lin G, Butterfield A, Skliar M and Magda JJ. Comparison of Surfactants Used to Prepare Aqueous Perfluoropentane Emulsions for Pharmaceutical Applications. *Langmuir* (2010) ; 26 (7) ; 4655–4660.
- [144] Li X, Turánek J, Knötigová P, Kudláčková H, Mašek J, Parkin S, Rankin SE, Knutson BL, Lehmler HJ. Hydrophobic tail length, degree of fluorination and headgroup stereochemistry are determinants of the biocompatibility of (fluorinated) carbohydrate surfactants. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* (2009) ; 73 (1) ; 65-74.
- [145] Perez E, Laval JP, Bon M, Rico I, Lattes A. Synthesis of bicyclo [2-2-1] hept-2-enes with mono and disubstitued long perfluorinated chains C_nF_{2n+1} (n=4,6,8,10) – Investigation of association in solubility by ^{19}F MNR study of polymerization via a matathetic reaction. *Journ. Fluorine Chem.* (1988) ; 39 (2) ; 173-196.
- [146] El Ghouli M, Escoula B, Rico I, Lattes A. Synthesis of new fluorinated non-ionic surfactants derived from lactose : the *N*-[2-(*F*-alkyl)ethyl]-lactosylamines and – lactobionamides. *Jour. Fluorine Chemistry* (1992) ; 59 (1) ; 107-112.
- [147] Zhao X. Design of self-assembling surfactant-like peptides and their application. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* (2009) ; 14 (5) ; 340-348.
- [148] Miller DJ, Henning T, Grünbein W. Phase inversion of W/O emulsions by adding hydrophilic surfactant : A technique for making cosmetics products. *Colloids and Surfaces – Physicochemical and Engineering Aspects* (2001) ; 183-185 ; 681-688.
- [149] Soussan E, Mille C, Blanzat M, Bordat P, Rico-Lattes I. Sugar-derived tricatener cationic surfactant : synthesis, self-assembly properties and hydrophilic probe encapsulation by vesicles. *Langmuir* (2008) ; 24 (6) ; 2326-2330.
- [150] Rico-Lattes I, Gouzy MF, Andre-Barres C, Guidetti B, Lattes A. Synthetic neoglycolipids for biological application : Correlation between their structures and their interactions with membranes proteins. *Biochimie* (1998) ; 80 ; 483-487.
- [151] Fricain JC, Granja PL, Barbosa MA, de Jéso B, Barthe N, Baquey C. Cellulose phosphates as biomaterials. In vivo biocompatibility studies. *Biomaterials* (2002) ; 23 (4) ; 971-980.
- [152] Kim K, Kim C, Byun Youngro. Biostability and biocompatibility of a surface-grafted phospholipid monolayer on a solid substrate. *Biomaterials* (2004) ; 25 ; 33-41.

V.3) *La modification de surface par plasma électromagnétique*

- [153] Terlingen JGA, Feijen J and Hoffman AS. Immobilization of surface active compounds on polymer supports using glow discharge processes – Sodium dodecyl sulfate on poly(propylene). *Journal of Colloid and Interface Science* (1993) ; 155 ; 55-65.

[154] Kim SG, Hagura N, Iskandar F, Yabuki A, Okuyama K. Multilayer film deposition of Ag and SiO₂ nanoparticles using a spin coating proces. Thin Solid Films (2008) ; 516 ; 8721-8725.

Chapitre II :

Partie expérimentale

«Outils et méthodes d'élaboration et de caractérisation des surfaces»

I. Introduction

Ce chapitre décrit les méthodes permettant l'élaboration, la caractérisation et les procédés de détection des maladies neurodégénératives, sujet de cette thèse. La première partie concerne l'élaboration par voie plasma froid et dépôt de couches minces des nouvelles surfaces de détection. La caractérisation des surfaces nouvelles par diverses techniques telles que la goniométrie, la microscopie électronique à balayage (MEB), la microscopie à force atomique (AFM), et l'analyse des charges en surface sont décrites dans une deuxième partie. Enfin, la troisième partie de ce chapitre présente les protocoles de détection immuno enzymatique ELISA utilisés pour diagnostiquer la présence des antigènes correspondant à chacune des maladies étudiées.

II . Produits commerciaux utilisés

- Gaz d'Argon et d'Hélium
- Hexatriméthylammonium
- 3-buten-1-amine
- Trans-3,7-diméthyl-2,6-octadièn-1-alyamine (gérnylamine)
- Rhodamine B
- Diodométhane
- Eau ultra pure
- Support de polypropylène 99% : société EUDICA
- PBS
- BSA
- Acide sulfurique
- Kit de détection INNOGenetics
- Kit RoboScreen
- Les protéines et anticorps de détection ont été fournis par les laboratoires partenaires et centres hospitaliers

III . Elaboration des supports

III.1) Le réacteur plasma froid RF

Les échantillons de polypropylène servant à l'étude des différentes interactions entre la chimie de surface et les biomolécules d'intérêt ainsi que les réglettes de détection ELISA ont été activées à l'aide d'un réacteur RF plasma froid. Ce dernier a été conçu au sein du laboratoire PCI et se compose de trois parties principales : une enceinte de traitement, un système de pompage et un générateur radio-fréquence.

Le réacteur est constitué d'une enceinte de traitement, d'un groupe de pompage et d'un générateur permettant l'excitation du gaz au sein de l'enceinte (figure III.1).

Le traitement s'effectue dans une enceinte à vide métallique, non magnétique (en aluminium). Elle possède une cathode reliée au générateur et une anode reliée à la masse qui sert également de porte échantillon. L'enceinte mesure 140 mm de largeur, 285 mm de longueur et 235 mm de hauteur.

La mise sous vide de l'enceinte de traitement s'effectue en deux étapes. Dans un premier temps, une pompe primaire CIT – ALCATEL Pascal n°2010 SD permet d'obtenir une pression de l'ordre de 10^{-3} mbar. Un second système de pompage régulé par une pompe turbomoléculaire ALCATEL ATP 80/100 permet d'atteindre une pression de l'ordre de 10^{-6} mbar. Une jauge Pirani/cathode froide ACC 1009, mesure la pression. Ce pompage est permanent pendant toute la durée de traitement.

Une fois la pression constante, le gaz est injecté et son flux est contrôlé à l'aide d'un régulateur de débit massique FC 7700 CDC Area. Le débit souhaité est réglé par le système ROD-4 Area et exprimé en sccm (standard centimètre cube par minute).

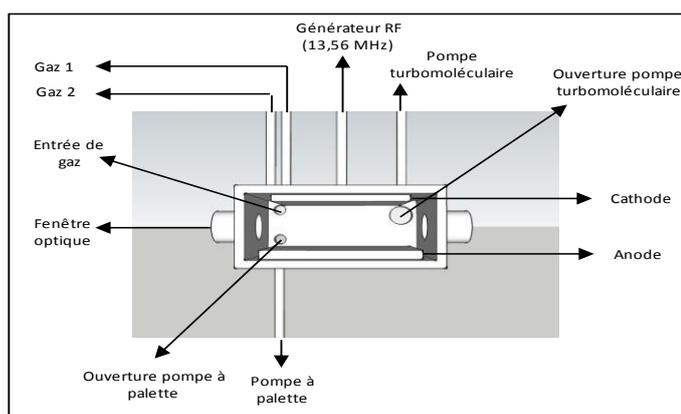


Figure II.1 : Représentation simplifiée du réacteur RF plasma froid

L'excitation du gaz est effectuée par une décharge électrique émise par un générateur d'onde électromagnétique RF de 13,56 MHz (marque SAIREM). Il délivre une puissance pouvant aller jusqu'à 600 W. Des cadrans reliés à un Wattmètre Métrix permettent de contrôler la puissance incidente demandée (Pi) et la puissance réfléchie perdue (Pr). Une boîte d'accord d'impédance permet d'ajuster la puissance réfléchie qui doit être la plus faible possible.

L'expérience s'effectue en optimisant les paramètres influençant le traitement :

- le choix du gaz,
- la puissance d'excitation du gaz,
- le débit du gaz utilisé,
- la durée de traitement.

III.2) La fonctionnalisation des supports

III.2.1) L'activation des surfaces par un plasma froid d'hélium

Les supports de polypropylène ont été fabriqués par la société EUDICA (Annecy). Le polymère a une pureté d'environ 99%. Pour les besoins de l'étude EUDICA a fourni des plaques de 7cm² et des réglettes à huit puits coniques.

Les supports de polypropylène sont toujours lavés dans un bain d'éthanol sous ultrasons durant 15 min et séchés 5 heures sous hotte à flux laminaire.

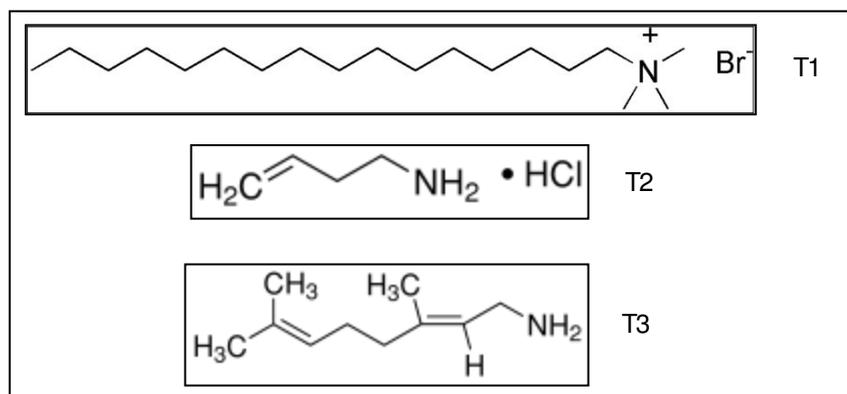
Le substrat est introduit dans le réacteur. L'enceinte est dans un premier temps mise sous pression par vide primaire ($10^{-2}/10^{-3}$ mbar), puis sous vide secondaire ($10^{-5}/10^{-6}$ mbar), de l'hélium est introduit dans l'enceinte à une pression de 100 mbar et un débit de 100 sccm. La puissance de décharge optimale est de 60 W. Le traitement est maintenu durant 60 secondes. Au bout de ce temps, le flux d'hélium est arrêté et l'enceinte est remise à pression atmosphérique.

III.2.2) Elaboration des solutions d'immersion

Trois molécules commerciales, présentant un caractère amphiphile ont été retenues en tenant compte : i) de leur masse moléculaire, ii) de leur hydrophilie en relation avec les

groupements fonctionnels de leur partie hydrophile. Il s'agit du bromure d'hexatriméthylammonium (T1, M = 364,46 g/mol), de l'hydrochlorure de 3-buten-1-amine (T2, M = 107,58 g/mol) et du trans-3,7-diméthyl-2,6-octadien-1-alyamine (géranylamine) (T3, M = 153,26 g/mol). Les deux premiers sont solides (poudres) et le troisième est liquide (visqueux).

Les produits sont dissous dans de l'eau distillée sous ultrasons durant 20 min à 37°C. Pour dissoudre le trans-3,7-diméthyl-2,6-octadien-1-alyamine il est nécessaire d'ajouter 10% en volume d'éthanol.



III.2.3) Dépôt des couches minces à la surface des supports

Suite à l'exposition au plasma d'hélium, le substrat présente à sa surface des radicaux qui vont permettre le greffage des molécules tensioactives (figure III.2). L'échantillon est immergé durant 5 h dans une solution aqueuse d'hydrochlorure de 3-buten-1-amine (1 mM) et de géranylamine (1 mM) et durant 12 h pour le bromure d'hexatriméthylammonium (1 mM).

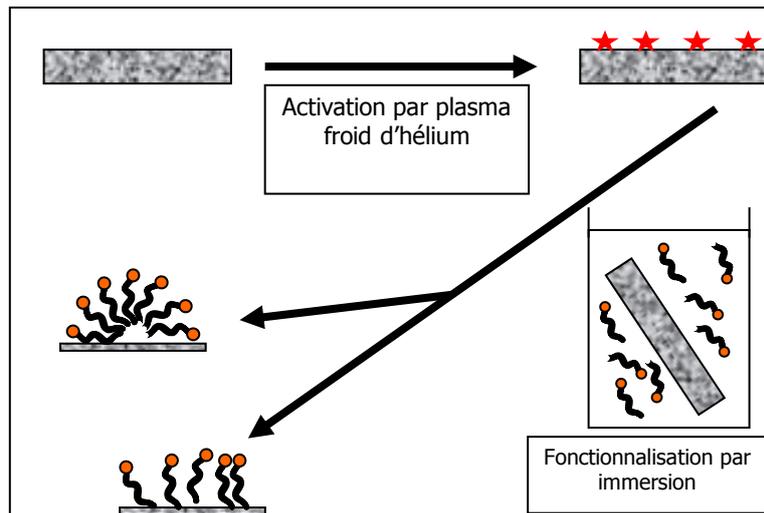


Figure II.2 : Schéma explicatif du protocole de fonctionnalisation des surfaces de polypropylène

Après 5 heures ou 12 heures, l'échantillon est retiré et mis à sécher durant 5 heures sous hotte à flux laminaire. Il est ensuite conditionné sous atmosphère ambiante dans un sachet stérile de polyéthylène.

IV . Caractérisation des surfaces

IV.1) Mesure de la tension de surface des solutions

Une solution aqueuse de tensioactif possède une tension de surface spécifique et permet de déterminer la concentration d'agrégation critique (CAC) d'une molécule tensioactive. A cette fin, différentes techniques existent telles que l'anneau de Noüy, la technique de la goutte pendante, la lame de Wilhelmy. Cette dernière a été utilisée.

Les mesures de tension de surface sont réalisées à l'aide d'un tensiomètre relié à un ordinateur qui génère automatiquement la mesure de la tension de surface. Le principe consiste à immerger une lame de platine dans une solution contenant le tensioactif étudié (figure IV.3). La solution forme alors un film à la surface de la lame par capillarité. En remontant la lame, le film aqueux se rompt. La tension de surface est mesurée à la rupture du film. En réalisant cette expérience pour plusieurs solutions de concentrations différentes en tensioactif, la courbe reportant la valeur de la tension de surface en fonction de la concentration, ou du logarithme de la concentration, permet d'obtenir une courbe dont la rupture de pente correspond à la CAC.

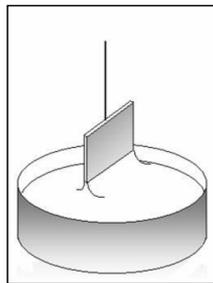


Figure II.3 : Schéma de la lame de Wilhelmy

Avant toute mesure, la lame de platine doit être nettoyée à l'éthanol puis brûlée à la flamme afin d'éliminer toutes impuretés. L'appareillage doit ensuite être étalonné. Dans un premier temps, la masse de la lame de platine, qui est maintenue à la verticale par un crochet, doit afficher une masse de 200 +/- 1 mg. Dans un second temps, le bon fonctionnement de l'appareil est défini par la mesure de la tension de surface de l'eau distillée qui est de $72,8 \cdot 10^{-3}$ N/m.

En tenant compte des valeurs des tensions superficielles données dans la littérature [1,2], et pour encadrer la valeur théorique de la CAC, les solutions sont préparées, plusieurs heures avant les mesures, dans une gamme de concentrations allant de 0,5 mM à 3 mM.

Un volume de 15 mL de chacune des solutions est versé dans un cristalliseur dans lequel la lame de platine ($L=24,20 \pm 0,05$ mm x $l=10 \pm 0,05$ mm x $e=0,27 \pm 0,05$ mm) est plongée. Les mesures s'effectuent à température ambiante (24 °C).

IV.2) La goniométrie

Dans le but d'évaluer la mouillabilité des surfaces avant et après fonctionnalisation, des mesures d'angles de contact sont réalisées [3] avec plusieurs liquides. Elles permettent de calculer les valeurs d'énergies polaire, apolaire et globale de chaque surface [4].

Les mesures d'angles de contact sont réalisées à l'aide d'un goniomètre de chez RAME-HART.inc (model : 100-00-230). Il se compose de trois parties (figure IV.4) :

- une source lumineuse associée à un collimateur
- un porte échantillon
- et une lunette optique de lecture

Un disque radian disposé sur la lunette optique permet par la suite d'effectuer la lecture de la valeur de l'angle déterminé d'une part par la tangente du profil d'une goutte déposée sur le substrat, et d'autre part avec la surface du substrat.

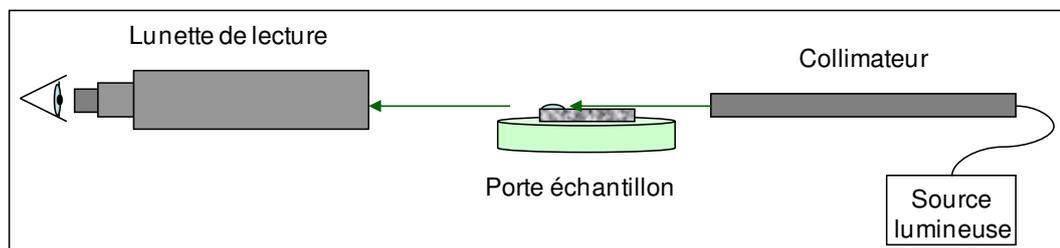


Figure II.4 : Schéma présentant les trois composants du goniomètre

Les énergies de surface sont calculées à l'aide de la méthode de Fowkes – Dupré – Young et utilise les valeurs moyennes des angles de contact. Le principe repose sur la mesure du travail d'adhésion à l'interface solide – liquide qui correspond aux interactions de Van der Waals et aux liaisons hydrogènes entre les molécules. Par association avec les différentes équations, il en résulte l'équation (5).

| | |
|---|-------------------------------|
| $W_{SL} = \gamma_S + \gamma_L - \gamma_{SL}$ | équation de Dupré (1) |
| $\gamma_{Sv} + \gamma_{SL} = \gamma_{LV} \cdot \cos\theta$ | équation de Young (2) |
| $W_{SL} = \gamma_L \cdot (1 + \cos\theta)$ | équation de Dupré – Young (3) |
| $W_{SL} = W_{SL}^d + W_{SL}^{nd}$ $W_{SL} = 2 [(\gamma_S^d \cdot \gamma_L^d)^{1/2} + (\gamma_S^{nd} \cdot \gamma_L^{nd})^{1/2}]$ | équation de Young (4) |
| $\gamma_L (1 + \cos\theta) = 2 [(\gamma_S^d \cdot \gamma_L^d)^{1/2} + (\gamma_S^{nd} \cdot \gamma_L^{nd})^{1/2}]$ | (5) |

Dans le cadre de notre étude, deux liquides de référence sont utilisés : l'eau en tant que solvant polaire et le diiodométhane en tant que solvant apolaire. Le tableau IV.1 présente les valeurs des énergies de surface pour chacun de ces solvants [5].

| Solvant | γ_L^t (mJ/m ²) | γ_L^p (mJ/m ²) | γ_L^d (mJ/m ²) |
|----------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| Eau ultra-pure | 72,8 | 21,8 | 51 |
| Diiodométhane | 50,8 | 49,5 | 1,3 |

Tableau II.1 : Valeur des énergies de surfaces des solvants de référence

Pour chaque substrat, traité et non-traité, analysé, la valeur de l'angle de contact relevé est la moyenne de plusieurs mesures réalisées à l'aide de gouttes de chaque liquide, de 3 μ L d'eau ultra-pure et de 1,5 μ L de diiodométhane. L'erreur moyenne pour la plupart des mesures est inférieur à +/- 2°.

IV.3) La Microscopie Electronique à Balayage (MEB)

La microscopie électronique à balayage est une technique permettant d'obtenir une photographie de la surface analysée donnant ainsi la morphologie et l'effet de relief de la surface mais également des spectres EDS présentant les éléments constitutifs de la surface.

Le principe repose sur les interactions entre les électrons bombardés à la surface de l'échantillon et la surface elle-même.

En fonction des électrons émis en retour, différents types d'images de la surface sont obtenues. Les électrons secondaires et les électrons primaires rétro diffusés donnent lieu à un signal électrique caractéristique de la nature de l'échantillon et permettent d'accéder à la morphologie de la surface. Les variations de lumière et donc de contrastes observés donnent une image en noir et blanc qui révèle le relief de la surface de l'échantillon. Les rayons X proviennent du retour à l'état fondamental d'un électron excité de la couche interne d'un atome, chaque élément possédant une longueur d'onde et des énergies qui lui sont propres. La détection des rayons X est réalisée en fonction de leur énergie et l'ensemble permet d'obtenir des spectres à dispersion d'énergie et donc l'analyse élémentaire de la surface [6].

Les analyses ont été réalisées au Centre de Transfert de Technologie du Mans avec l'aide d'Isabelle Gimenez sur un microscope électronique à balayage à pression variable HITACHI S3200N équipé d'un détecteur de rayons X PRISMA GAMMA PGT.

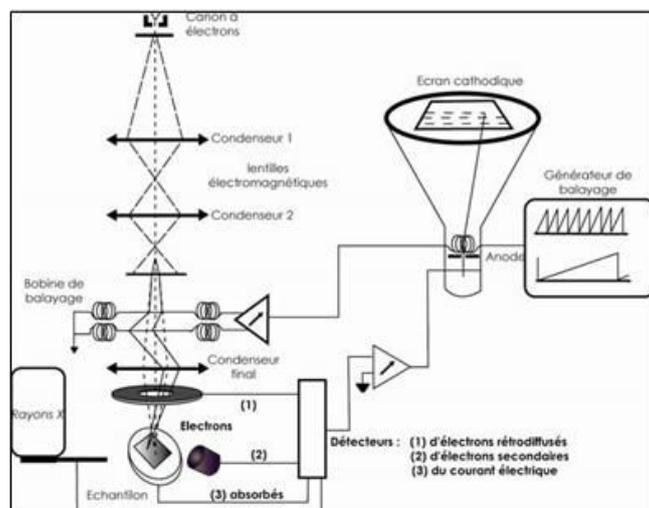


Figure II.5 : Schéma explicatif du fonctionnement d'un appareil de microscopie électronique à balayage

Le microscope est composé d'une chambre sous vide, d'un filament de tungstène qui émet des électrons lesquels sont accélérés par des lentilles électromagnétiques et qui vont bombarder la cible. Les bobines de balayage permettent de focaliser le flux et de le déplacer selon x, y et z. Les détecteurs placés en fin de chaîne captent les diverses émissions d'électrons et de rayons X.

La nature chimique des échantillons est d'abord évaluée en travaillant à une pression d'environ 15 Pa. Les rayonnements d'électrons émis par le filament de tungstène (10-30 kV) balayent la surface et permettent la reconnaissance des éléments constitutifs de l'échantillon.

Les supports sont aussi métallisés dans une cloche de métallisation (à $2 \cdot 10^{-2}$ Pa) par de l'or et/ou du palladium. Après métallisation, les échantillons sont mis dans le MEB (pression $6 \cdot 10^{-4}$ Pa) : les électrons secondaires et rétrodiffusés émis par la surface permettent d'obtenir leur topographie.

IV.4) La spectroscopie par photoélectrons à rayon X (XPS)

La spectroscopie par photoélectrons de rayons X repose sur un effet photoélectronique résidant dans l'interaction entre la matière analysée et le rayon de photons X et permet une analyse élémentaire de la surface étudiée. Sous l'impact du faisceau de rayons X, la surface est excitée et des photoélectrons sont émis. Ces derniers ont une énergie cinétique spécifique ce qui permet d'accéder aux énergies de liaisons interatomiques. Par ailleurs ces énergies permettent de connaître l'environnement chimique (nature des liaisons atomiques) de l'atome considéré. Le résultat de ces analyses est un spectre composé de pics dont l'aire est proportionnelle au pourcentage atomique des éléments.

Les analyses ont été réalisées à l'Institut Josef Stefan à Ljubljana (Slovénie) par Janez Kovac et Alenka Vesel avec un spectromètre TFA XPS Physical Electronics. La figure II.6 présente le principe de fonctionnement de l'appareil. Le fonctionnement de la source équipée d'une anode en aluminium émettant un rayonnement correspondant à la raie $K\alpha_{1,2}$ pour une énergie de 1486,6 eV, ainsi que de l'analyseur, nécessite une mise sous pression importante de l'ordre de $6 \cdot 10^{-10}$ mbar.

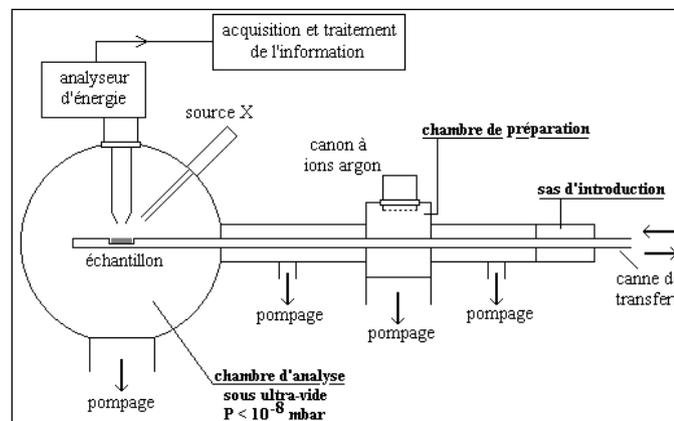


Figure II.6 : Schéma du principe de fonctionnement d'un appareil XPS

Les dépôts de couches minces ont été réalisés sur des surfaces de polypropylène de 10×10 mm². L'analyseur hémisphérique a été positionné à un angle de 45° par rapport à la surface de l'échantillon. La profondeur d'analyse est de 9 nm. Le spectre large est obtenu

avec un balayage jusqu'à 187,85 eV avec un pas de 0,4 eV, tandis que le spectre fin est réalisé à 23,5 eV avec un pas de 0,1 eV. Tous les spectres sont référencés à partir du pic du carbone principal C1s à la valeur de 284,8 eV. Le pourcentage atomique des éléments est déterminé par le logiciel MultiPak v7.3.1 de chez Physical Electronics.

IV.5) La microscopie à force atomique (AFM)

La microscopie à force atomique est une technique issue de l'association du principe du microscope à effet tunnel, permettant une étude à l'échelle atomique, et de la profilométrie. L'AFM permet ainsi d'accéder à la fois à la rugosité de la surface finale et à l'épaisseur du dépôt de couches minces effectué [7].

Le principe de cette technique repose sur la présence d'une sonde locale, une pointe, montée sur un micro levier, qui en balayant la surface (en x, y et z) interagit avec l'échantillon (figure IV.7). Les différences de hauteur relevées par la pointe permettent de représenter la topographie de la surface de l'échantillon. En effet, la pointe et les atomes en surface se repoussent et s'attirent de façon permanente via des forces de Van der Waals, leur permettant de se trouver à une distance dite d'équilibre. Ce sont ces attractions et ses répulsions que le micro clavier ressent et enregistre. Le relief de la surface est ensuite reconstitué par ordinateur.

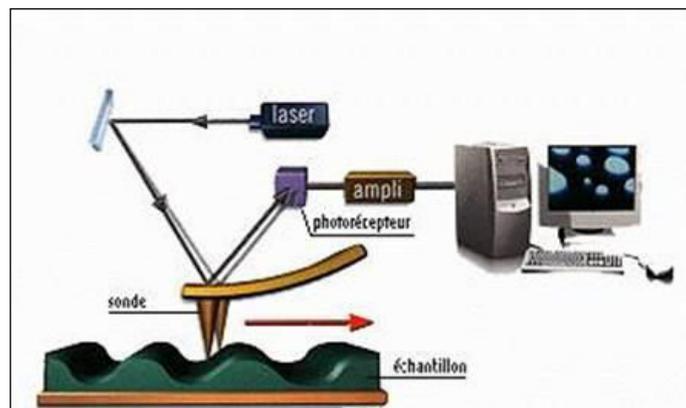


Figure II.7 : Exemple de mouvement de la pointe sur des « dents » de carbones.

La pointe est solidaire d'un faisceau laser qui permet, lors d'un changement d'indice de réflexion, d'amplifier une variation topographique de la surface de l'échantillon. La figure IV.8 présente le fonctionnement d'un microscope à force atomique.

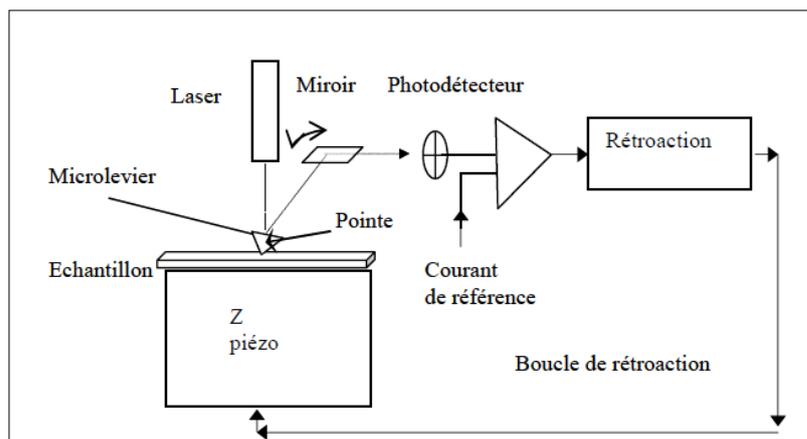


Figure II.8 : Schéma descriptif du fonctionnement de la technique de microscopie à force atomique

Il existe différentes modes d'utilisations en fonction du type d'interaction pointe – surface :

- tapping : la pointe en interagissant avec la surface modifie la fréquence de résonance propre du levier en réduisant son amplitude de vibration,
- statique : les forces d'attraction et de répulsion entre les atomes en surface et la pointe dévie le levier de son axe original ; la direction de cette déviation permet d'évaluer le relief de la surface.
- modulation de fréquence : lorsque l'analyse est réalisée sous vide.

Dans notre cas, les mesures ont été réalisées par Janez Kovac et Alenka Vesel de l'Institut Josef Stefan à Ljubljana (Slovénie) sur un appareil de type Solver PRO, NT-MDT en mode tapping. Les échantillons ont été balayés avec une pointe en silicium avec une force constante de 10 N.m^{-1} et une fréquence de résonance de 170 kHz. Toutes les analyses sont réalisées à l'air sur des surfaces de $5 \times 5 \text{ }\mu\text{m}^2$ et de $10 \times 10 \text{ }\mu\text{m}^2$. La rugosité moyenne, correspondant aux valeurs les plus élevées, est obtenue à partir de 5 aires différentes mesurant $5 \times 5 \text{ }\mu\text{m}^2$.

IV.6) La mesure du potentiel Zêta

La mesure du potentiel zêta d'une surface permet d'évaluer l'effet d'un électrolyte ou d'une solution sur les modifications de charges d'une surface donnée [8]. En effet, sous l'effet d'une solution pHmétrique, une surface peut se charger positivement ou négativement ; les interactions de répulsion et d'attraction des charges avec celles en solution dans l'électrolyte

crée une différence de potentiel électrique, et permet d'obtenir après calcul la valeur du potentiel zêta de la surface. Plus le potentiel zêta est élevé (en valeur absolue), plus la surface est chargée (négativement ou positivement).

La composante principale de l'appareil de mesure est une cellule d'analyse adaptée à l'échantillon à analyser. Comme le montre la figure IV.9, la cellule (25 x 50 x 5 mm) est composée de deux parties emboîtables permettant aux échantillons d'être à une distance constante l'un de l'autre. La partie inférieure de la cellule possède deux orifices permettant aux flux d'électrolyte de circuler au sein de la cellule d'analyse.

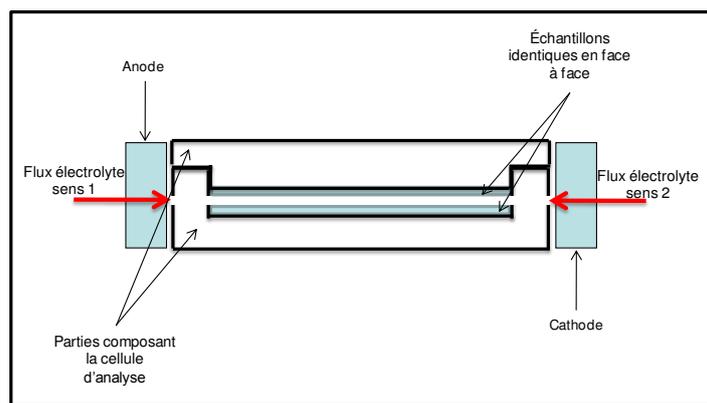


Figure II.9 : Schéma de la cellule d'analyse de l'appareil de mesure du potentiel zêta

La différence de potentiel est mesurée par des électrodes situées de part et d'autre de la cellule d'analyse contenant un électrolyte.

Deux cuves cylindriques permettent à l'électrolyte de circuler dans un sens puis dans l'autre au sein de la cellule. L'appareil de mesure est relié à un ordinateur calculant la valeur du potentiel zêta. Les mesures ont été réalisées sur l'appareil de mesure ZêtaCAD de la société CAD Instrument. La température d'expérience est maintenue de façon constante à 25°C.

Comme présenté sur la figure II.9, deux échantillons préalablement traités sont placés en vis-à-vis dans la cellule d'analyse à une distance de 1 mm. Des solutions tamponnées de pH 3 ; 4 ; 5,5 ; 7,4 et 9 ont été préparées à partir d'une solution physiologique d'eau ultra pure avec une concentration de NaCl à 90 mg/L puis ajustée au pH désiré à l'aide de soude (NaOH) ou de d'acide chlorhydrique (HCl). Les pH ont été mesurés avec un pH-mètre HI – 8014 de HANNA Instruments.

Les électrolytes sont introduits au sein de la cellule d'analyse à une pression constante de 20 mbar en effectuant 5 allers-retours. Entre chaque solution pH, la cellule, et donc les échantillons, ont été rincés avec de l'eau ultra pure. Chaque expérience est reproduite trois fois. Par ailleurs, et afin de s'assurer qu'aucun phénomène d'hystérésis n'est présent, chaque gamme de pH est réalisée dans le sens croissant et décroissant. Le calcul du potentiel zêta est calculé à l'aide du logiciel Zêta CAD (résolution 800 x 600, pilote d'écran : SVGA) auquel est relié l'appareil de mesure. La valeur du potentiel zêta retenue est la moyenne des six valeurs obtenues pour chaque solution pH.

IV.7) La microscopie confocale

La technique de la microscopie confocale est basée sur le principe du microscope optique soit à lumière réfléchie, soit à fluorescence, et possédant une faible profondeur de champ (400 nm). Le plan focal de l'objectif est placé à différents niveaux de profondeur au sein de l'échantillon, permettant ainsi d'obtenir une représentation tridimensionnelle de l'échantillon. La source lumineuse est un laser, d'où le terme de microscope confocal à balayage laser (MCBL).

La surface à reconstituer est balayée par un rayon laser concentré par une lentille optique. Un sténopé placé devant le détecteur permet aux photons provenant du plan focal d'être détectés et reproduire ainsi une image de la surface. La figure IV.10 présente le mode de fonctionnement d'un microscope confocal à balayage laser

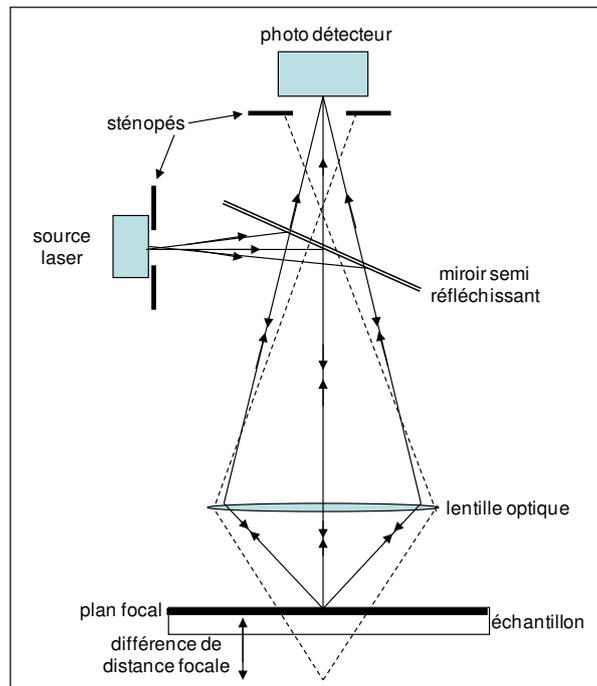


Figure II.10 : Schéma du principe de fonctionnement de la microscopie confocale

Les analyses en microscopie confocale ont été réalisées sur un microscope confocal à balayage laser (MCBL) de type Leica TCS-SP2 (Leica Microsystems Heidelberg, Germany). Les solutions contenant les antigènes sont en milieu tampon phosphate salin (PBS) à un pH de 7,4. Les concentrations des protéines pathogènes sont de 50 ng/mL et 1 µg/mL respectivement pour les protéines Prion recombinante humaine (PrPrechum) et α -synucléine (α -syn). La protéine Tau-PHF est étudiée à une dilution de 1/250 de la concentration extraite du LCR. Les solutions avec les anticorps de capture correspondant à chaque agent protéique sont en milieu tampon carbonate à un pH de 9,6. Les concentrations respectives de l'anticorps de capture de la protéine PrPrechum (3F3), Tau-PHF (T46) et α -syn (10C3) sont de 10 µg/mL ; 2 µg/mL et 5 µg/mL.

La rhodamine est préparée à une concentration de 0,5 mol/L dans une solution PBS et une solution tampon carbonate [9,10]. Une goutte de 1mL de chaque solution est additionnée à 5 mL des solutions protéiques ou d'anticorps. A l'aide d'une pipette pasteur, 2 à 3 mL de solution finale sont déposés à la surface des supports traités. Après 1 heure de séchage sous hotte à flux laminaire, les supports sont mis sur le porte échantillon du microscope confocal. Parallèlement, un échantillon « blanc » a été réalisé avec de la solution tampon sans anticorps et de la rhodamine dans les mêmes conditions.

V. Application à la détection par le système ELISA

V.1) Descriptif de l'appareillage

Le système ELISA est basé sur une analyse spectrophotométrique UV – visible et sur la détection d'un chromophore. Un spectromètre possédant un lecteur de plaque ELISA est relié à un ordinateur effectuant le calcul de la densité optique correspondante.

Les expériences menées au Centre de Recherche sur la Protéine Prion de Liège ont été réalisées sur un spectrophotomètre Bio-Tek instruments, EL-312e microplate Bio-Kinetics reader. Les expériences effectuées au laboratoire de neuropathologie de Lyon ont été analysées sur un spectrophotomètre.

V.2) Les différents protocoles mis en œuvre pour la détection de chaque protéine considérée

Bien que le système ELISA possède un protocole uniforme, il doit être adapté aux agents pathogènes considérés.

V.2.1) Protocole de l'ELISA Sandwich PrPrechum

- Enduction de l'anticorps de capture Saf32 (10 µg/mL) contenu dans du tampon carbonate (pH = 9,4) (Cm initiale = 1,2 mg/mL) (50 µL par puits) durant une nuit à 4°C
- Lavage et saturation des surfaces des puits à l'aide de la BSA à 3% dans le PBS (pH = 7,4) (200µL par puits). L'opération est réalisée 5 fois.
- Ajout de la PrPrechum (0-50 ng/mL) (50 µL par puits) durant 1h à 37°C (Cm initiale = 2 mg/mL)
- Lavage des puits au tampon PBS (5 fois) (200 µL par puits)
- Ajout de l'anticorps de détection couplé biotinylé 7F4-biot contenu dans du PBS (pH = 7,4) (1 µL/mL) (50 µL par puits) durant 1h à 37°C (Cm initiale = 1 mg/mL)
- Lavage des puits au PBS (5 fois) (200 µL par puits)
- Ajout de la streptavidine couplée HRP dilué au 1/7500 durant 30min à 25 °C (50 µL par puits)

- Lavage des puits au PBS (5 fois) (200 µL par puits)
- Ajout du TMB dilué au 1/10, durant 30 min à 25 °C et à l'abri de la lumière (50 µL par puits)
- Arrêt de la réaction avec du H₂SO₄ à 1N (50 µL par puits)
- Lecture de la plaque d'analyse au spectrophotomètre UV – visible à une longueur d'onde de 450 nm.

V.2.2) Protocole de l'ELISA Sandwich PrP-DVE

- Enduction de l'anticorps de capture 3F3 à 10µg/mL dans du PBS (pH = 7,4) (Cm initiale : 1,5µg/mL) durant une nuit à 4°C (50 µL par puits)
 - Lavage et saturation des puits avec de la BSA à 3 % dans du PBS (200 µL par puits) (5 fois)
 - Ajout de la protéine PrPrechum à 50ng/mL dans du PBS durant 2h à 25 °C (n° patient 0106730)
 - Lavage des puits au PBS (5 fois) (200 µL par puits)
 - Ajout de l'anticorps de détection 15F5-HRP dilué à 1/10 dans du PBS (RoboScreen Kit) durant 1h à 25 °C (50 µL par puits)
 - Lavage des puits au PBS (5 fois) (200 µL par puits)
 - Ajout du TMB dans les proportions : 75µL TMB, 45µL solution peroxyde, 3mL tampon associé (RoboScreen Kit) durant 30min à 25 °C et à l'abri de la lumière (50 µL par puits)
 - Arrêt de la réaction avec du H₂SO₄ à 2N (50 µL par puits)
 - Lecture de la plaque d'analyse au spectrophotomètre UV – visible à une longueur d'onde de 450nm.

V.2.3) Protocole de l'ELISA Sandwich Tau –PHF

- Enduction de l'anticorps de capture T46 à 2 µg/mL dans du tampon carbonate (pH = 9,4) (Cm initiale : 100µg/200µL) (50 µL par puits) durant une nuit à 4°C
 - Lavage et saturation avec du Triton à 0,05 % dans du PBS (3 fois) (200 µL par puits)
 - Ajout de la protéine Tau-PHF avec une dilution à 1/500 et une à 1/250 durant 2h à 25 °C (50 µL par puits)

- Lavage et saturation avec du Triton à 0,05 % dans du PBS (3 fois) (200 µL par puits)
- Ajout de l'anticorps de détection (issu du kit de détection INNOgenetics Kit) durant 30 min à 37°C (50 µL par puits)
- Lavage et saturation avec du Triton à 0,05 % dans du PBS (3 fois) (200 µL par puits)
- Ajout de la streptavidine couplée HRP et diluée à 1/100 dans le diluant associé (INNOgenetics Kit) durant 30 min à 25 °C (50 µL par puits)
- Lavage et saturation avec du Triton à 0,05 % dans du PBS (3 fois) (200 µL par puits)
- Ajout du TMB dilué à 1/100 dans le diluant associé (INNOgenetics Kit) durant 30min à 25 °C et maintenu à l'abri de la lumière (50 µL par puits)
- Arrêt de la réaction avec du H₂SO₄ à 2N (50 µL par puits)
- Lecture de la plaque d'analyse au spectrophotomètre UV – visible à une longueur d'onde de 450nm.

V.2.4) Protocole de l'ELISA Direct a-synucléine (10C3)

- Enduction de l'anticorps de capture 10C3 à 0,5 et 5 µg/mL en tampon PBS (pH = 7,2) durant une nuit à 4 °C (50 µL par puits)
- Lavage et saturation des puits au Tween20[®] à 0,05% dans du PBS (200 µL par puits) (3 fois)
- Ajout de l'anticorps de détection mousse-HRP à 0,3µg/mL dans le PBS (50 µL par puits)
- Lavage et saturation des puits au Tween20[®] à 0,05% dans du PBS (200 µL par puits) (3 fois)
- Addition du TMB (50 µL par puits)
- Arrêt de la réaction avec H₂SO₄ à 2N (50µL par puits)
- Lecture de la plaque d'analyse au spectrophotomètre UV – visible à une longueur d'onde de 450nm.

VI . Références bibliographiques

IV.1) La tension de surface

- [1] Jiang N, Li P, Wang Y, Wang J, Yan H and Thomas RK. Aggregation behavior of hexadecyltrimethylammonium surfactants with various counterions in aqueous solution. *Colloid and interface Science* (2005) ; 286 ; 755-760.
- [2] Para G, Jarek E and Warszynski P. The surface tension of aqueous solutions of cetyltrimethylammonium cationic surfactants in presence of bromide and chloride counterions. *Colloids and Surface* (2005) ; 261 ; 65-73.

IV.2) La goniométrie

- [3] Sommer F. Angle de contact. *Biophy Research* ; pages 1-4.
- [4] de Gennes PG. Wetting : statics and dynamics. *Reviews of Modern Physics* (1985) ; 57 ; part 1.
- [5] Cognard J. Science et Technologies du Collage. *Presses Polytechniques et Universitaire Romandes* (2000) ; 15.

IV.3) La microscopie électronique à balayage

- [6] Perrin M. Microscopie électronique à balayage et microanalyse. *Cours – Université de Rennes* (2008) ; page 1-23.

IV.5) La microscopie à force atomique

- [7] Frétiigny C. and Rivoal JC. Microscopie à force atomique. *Mesures Dynamiques et Dimensionnelles* (2005) ; référence R1394 ; 1-18.

IV.6) Le potentiel zêta

- [8] Stakne K, Smole MS, Kleinschek KS, Jaroschuk A and Ribitsch V. Characterisation of modified polypropylene fibres. *Journal of Materials Science* (2003) ; 38 ; 2167-2169.

IV.7) La microscopie confocale

- [9] Huo FJ, Su J, Sun YQ, Yin CX, Tong HB and Nie ZX. A rhodamine based dual chemosensor for the visual detection of copper and ratiometric fluorescent detection of vanadium. *Dyes and pigments* (2010) ; 86 ; 50-55.
- [10] Desvergne JP, Czarnik AW. Chemosensors of ion and molecule recognition. *North Atlantic Treaty Organization. Scientific Affairs Division*.

Chapitre III :

Elaborations des nouveaux supports de détection

«Optimisation des paramètres d'élaboration et caractérisation physico-chimique. Essais à la stérilisation.»

I. Introduction

La biocompatibilité des surfaces polymères hydrophobes utilisées dans le domaine du biomédical est un enjeu de taille [1,2]. Ainsi, et comme nous avons pu le voir dans le chapitre 1, la nécessité d'augmenter la rugosité, l'hydrophilie et la fonctionnalité de ces surfaces est indispensable à une meilleure bio-adhésion des biomolécules d'intérêts mises en jeu dans le système immunoenzymatique ELISA. Il s'agit alors de définir un protocole de fonctionnalisation des surfaces de polypropylène préservant les propriétés intrinsèques du matériau, nécessaire à l'analyse optique, et n'altérant pas les conformations structurales des agents biologiques. Par ailleurs, l'industrialisation possible du protocole de modification des surfaces d'analyses demande un procédé facile à mettre en place, peu onéreux et respectueux de l'environnement. L'association de la technique du plasma froid et du dépôt de couche minces de molécules amphiphiles biocompatibles, en adéquation avec ces critères, a donc retenu notre attention [3 à 5].

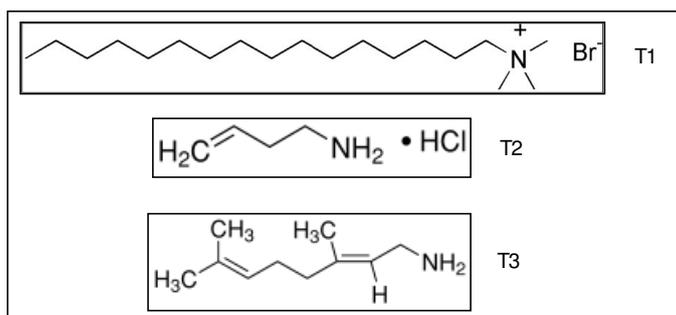
En effet, le traitement de surface par plasma froid est un procédé non toxique et non polluant, il permettait selon le gaz utilisé d'obtenir des surfaces très spécifiques conduisant à des applications performantes [5]. La volonté de fixer des groupements spécifiques, via un dépôt de couches minces, permettant de reproduire les interactions existantes entre les biomolécules à l'état naturel (liaisons hydrogènes, forces électrostatiques et de Van der Waals) nécessite la formation à la surface du polypropylène de radicaux libres pouvant réagir par la suite avec les molécules de fonctionnalisation. Ces dernières étant amphiphiles, l'augmentation du caractère hydrophile doit être telle que la quantité de radicaux libres soit suffisante pour fixer les molécules *via* les groupements présents sur leur queue et non *via* les têtes possédant les groupements fonctionnels ciblant. Le choix de gaz rares tels que l'argon et l'hélium semble approprié [6]. L'activation de la surface de polypropylène passe donc par l'optimisation de trois paramètres permettant de générer le plasma le plus à même de répondre à nos exigences :

- la puissance induite,
- le débit de gaz,
- et le temps de décharge.

Par la suite, le dépôt de couches doit permettre d'obtenir une rugosité plus importante de la surface afin de mieux fixer les anticorps de capture mais également de posséder des

groupes de têtes biocompatibles tels que des groupements dérivés d'amines, pouvant être reconnus par le système biologique [7 à 10]. Dans le but de réaliser une étude comparative sur les différences de longueur de chaîne, la taille de la partie hydrophile amine substituée ou non et de la présence de charges, trois molécules amphiphiles ont été choisies :

- le bromure d'hexatriméthylammonium, noté T1
- l'hydrochlorure de 3-buten-1-amine, noté T2
- et le trans-3,7-diméthyl-2,6-octadien-1-amine, noté T3.



Notons que le bromure d'hexatriméthylammonium possède des propriétés tensioactives, en particulier sa capacité d'agrégation qui sera également étudiée par mesure de la tension de surface en milieu aqueux en fonction de sa concentration.

L'optimisation du dépôt de couches minces nécessite de définir la concentration et le temps d'immersion du support, optimaux pour laquelle la multicouche donne lieu à une surface hydrophile et d'épaisseur suffisante pour que l'accroche de l'anticorps de capture soit la meilleure possible.

Les surfaces ainsi modifiées sont systématiquement caractérisées par différentes techniques permettant d'évaluer la bonne activation, fonctionnalisation et hydrophilie de la surface finale. Dans le but de pouvoir répondre aux exigences matérielles des méthodes d'analyses, l'optimisation de la modification de surface est réalisée sur des plaques de polypropylène identique à celui des réglettes d'analyses et d'une taille moyenne de 10 x 15 mm². Seront alors présentées les caractérisations par goniométrie, mesure du potentiel des charges en surfaces, par spectroscopie par rayons X, par microscopie à force atomique... pour la partie d'activation de surface puis de fonctionnalisation par dépôt de couches minces, toujours en référence à un support témoin non traité.

Dans un dernier temps, une étude menée sur les modes stérilisation des supports fonctionnalisés sera traitée.

II . Modification des propriétés de surface des supports de polypropylène par un plasma froid

La technique des plasmas dits « froids » permet de modifier la surface d'un matériau sans pour autant altérer ses propriétés massiques [12]. Cette technique possède diverses applications telles que le nettoyage de surfaces, la dépollution et la stérilisation de matériel médical [13,14]. En chimie, les plasmas froids permettent de modifier physiquement les couches supérieures d'un matériau soit par greffage de groupements fonctionnels, soit par activation en créant des radicaux en surface. Le choix du gaz est donc important en fonction de l'application finale du support modifié.

Dans le cas de notre sujet de recherche, la surface des supports de polypropylène doit être activée afin de pouvoir par la suite réaliser un dépôt de couches minces fonctionnelles. Les molécules utilisées possédant un caractère amphiphile, il est nécessaire d'obtenir des surfaces à caractère hydrophile permettant un réarrangement optimal des couches minces à leurs surfaces. Dans la littérature, les gaz les plus souvent utilisés sont l'argon et l'hélium qui permettent d'obtenir facilement une surface homogène de radicaux libres *via* une décharge plasma radiofréquence [15,16].

Comme énoncé précédemment, une décharge plasma dépend de trois paramètres : la puissance de décharge (P), le débit de gaz (d) et le temps de décharge (t). Afin de définir les conditions et le gaz le mieux approprié à nos critères, une étude comparative entre l'argon (Ar) et l'hélium (He) a été réalisée. Les surfaces activées ont été caractérisées par mesure d'angle de contact, la chimie de surface (de charges et atomistique) a été évaluée par mesure de potentiel zêta et par spectroscopie des rayons X (XPS), leur topographie a été analysée à l'échelle nanométrique et micrométrique par microscopie électronique à balayage (MEB) et microscopie à force atomique (AFM).

II.1) Influence des paramètres de décharge sur l'évolution du caractère hydrophile des supports de polypropylène après activation par un plasma froid

Afin de déterminer les paramètres de décharges optimum réalisés avec le gaz d'argon et le gaz d'hélium dans les conditions recherchées ; à savoir l'obtention d'une surface hydrophile possédant une énergie polaire de surface de l'ordre de 20 mJ.m^{-2} de manière à

correctement fixer par la suite les molécules de fonctionnalisation ; un suivi par mesure d'angle de contact a été réalisé pour chacun des paramètres influençant la décharge.

II.1.1) Influence de la puissance de décharge sur la mouillabilité des surfaces activées et des énergies de surfaces associées

L'évolution du caractère hydrophile de la surface en fonction de la variation de la puissance de décharge pour le gaz d'argon et d'hélium est représentée sur la figure III.1. Les paramètres correspondant au débit et au temps de décharge sont fixés à 60 sccm et 2 minutes. Tout au long de l'expérience, et ce pour chacun des deux gaz, la pression dans l'enceinte du réacteur lors de la décharge est constante ($p=10^{-2}$ mbar).

Quel que soit le gaz considéré, la variation de la mouillabilité évolue de la même façon. Plus la puissance est importante, plus l'angle de contact entre la goutte d'eau ultra-pure déposée et la surface de l'échantillon est faible. Les deux courbes présentent une décroissance rapide de la valeur de l'angle de contact jusqu'à une valeur de la puissance de 50 W et 60 W, respectivement pour l'argon et l'hélium. Au-delà de ces valeurs, la puissance n'a plus d'influence sur l'activation de la surface, la valeur de l'angle de contact demeurant constante et quasi nulle.

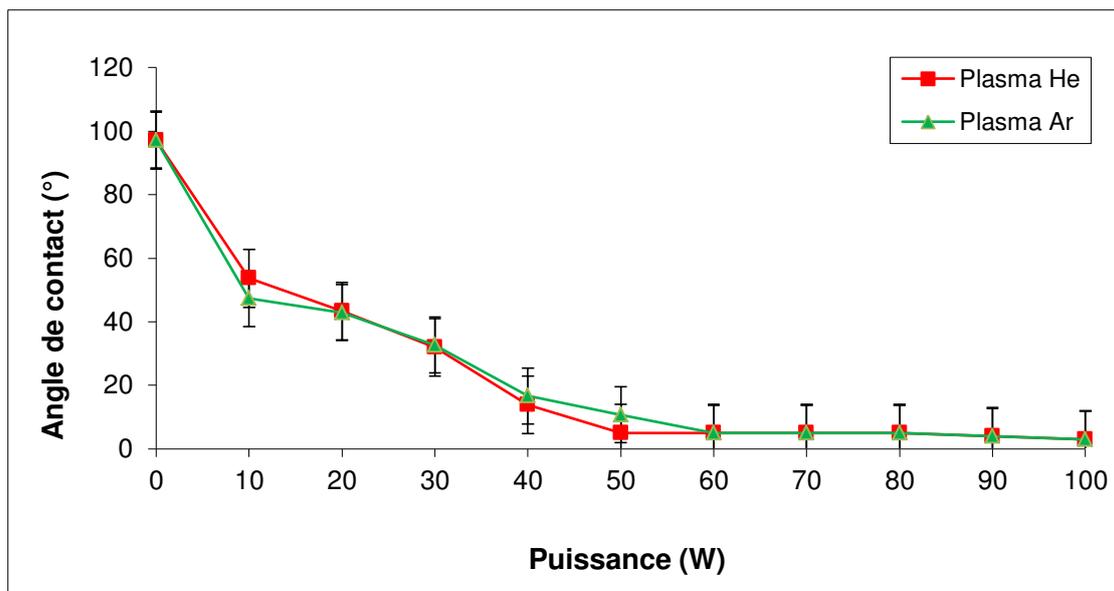


Figure III.1 : Evolution de l'angle de contact d'une goutte d'eau ultra-pure déposée sur la surface de PP après traitement en fonction de la puissance de décharge pour un plasma d'argon et un plasma d'hélium ($d=60$ sccm, $t=2$ min, $p=10^{-2}$ mbar)

La figure III.2 présente les variations des énergies totale et polaire associées aux valeurs des angles de contact d'eau ultra-pure pour des surfaces de PP activées par un plasma d'argon et un plasma d'hélium. Lorsque le caractère hydrophobe d'une surface diminue, la valeur de l'énergie polaire de surface augmente tandis que l'énergie de surface apolaire décroît. Contrairement aux mesures d'angle de contact présentées sur la figure 1, les énergies de surfaces augmentent avec la puissance. En effet, plus la puissance est importante et plus la surface devient hydrophile, l'angle de contact de la goutte d'eau ultra-pure devient donc quasi nul et son énergie polaire est plus grande.

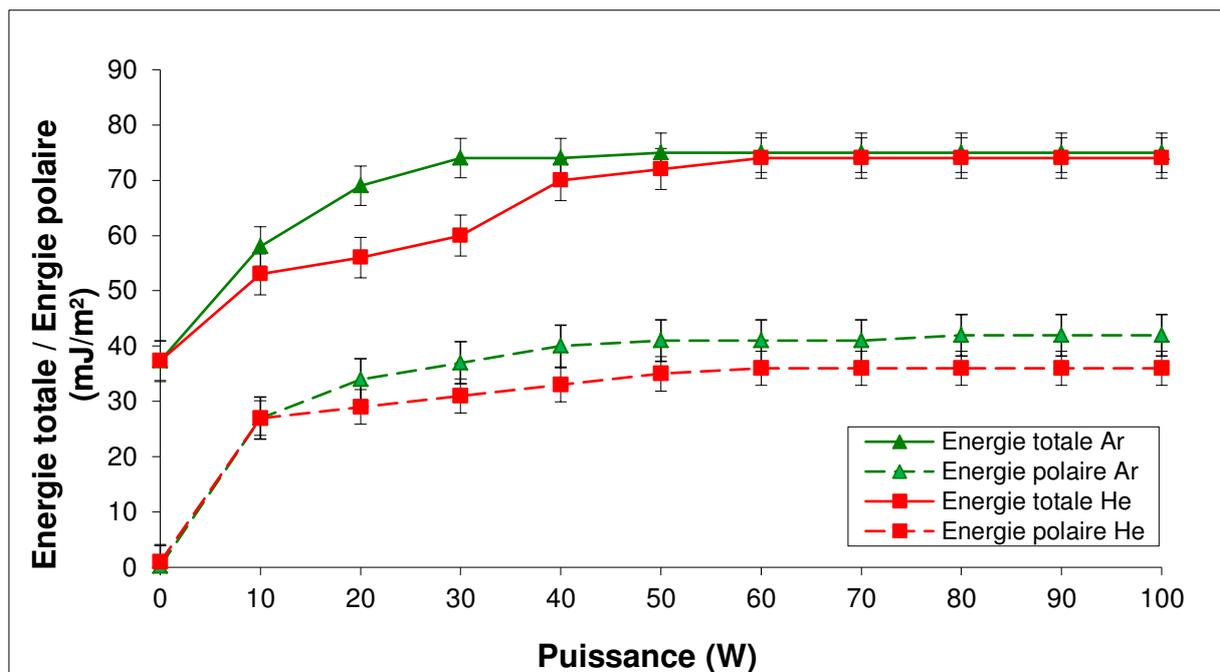


Figure III.2 : Evolution des valeurs des énergies totale et polaire en fonction de la puissance de décharge pour un plasma d'argon et un plasma d'hélium ($d=60$ sccm, $t=2$ min, $p=10^{-2}$ mbar)

De même que pour les valeurs d'angle de contact, les valeurs des énergies totale et polaire deviennent constantes aux alentours d'une puissance induite de 45 W et 60 W pour le plasma d'argon et d'hélium, respectivement. Au-delà de ces puissances, l'argon présente ainsi une valeur moyenne d'énergie polaire de surface de 41 mJ.m^{-2} et l'hélium une énergie polaire de surface de 36 mJ.m^{-2} .

Les résultats présentés dans la littérature montrent souvent une stabilisation de ces valeurs lorsque l'un des paramètres de décharges n'influe plus la modification de la surface considérée. Il existe en effet un équilibre thermodynamique entre les espèces présentes dans la phase plasma et celles qui peuvent réagir avec la surface de PP. Par ailleurs, et selon l'épaisseur de l'échantillon et les paramètres de décharge considérés, la rugosité de la surface

traitée est limitée [17]. Cet équilibre permet de relever la valeur à partir de laquelle l'un des paramètres de décharge n'a plus d'influence sur l'activation des surfaces. Ainsi, le reste de notre étude gardera comme valeur de puissance de décharge 50 W et 60 W, respectivement pour le gaz d'argon et d'hélium.

II.1.2) Influence du débit de gaz sur la mouillabilité des surfaces activées et les énergies de surfaces associées

Lors de la décharge plasma, le débit de gaz doit rester constant durant le traitement de la surface. Ceci permet d'assurer au sein de l'enceinte du réacteur une quantité toujours identique en espèces réactives [18].

Les variations des angles de contact de gouttes d'eau ultra-pure déposées sur les surfaces traitées permettant d'évaluer l'influence du débit de gaz sur l'activation de la surface de PP pour des puissances de 50 W et 60 W pour le gaz d'argon et le gaz d'hélium, respectivement, sont présentées sur la figure III.3.

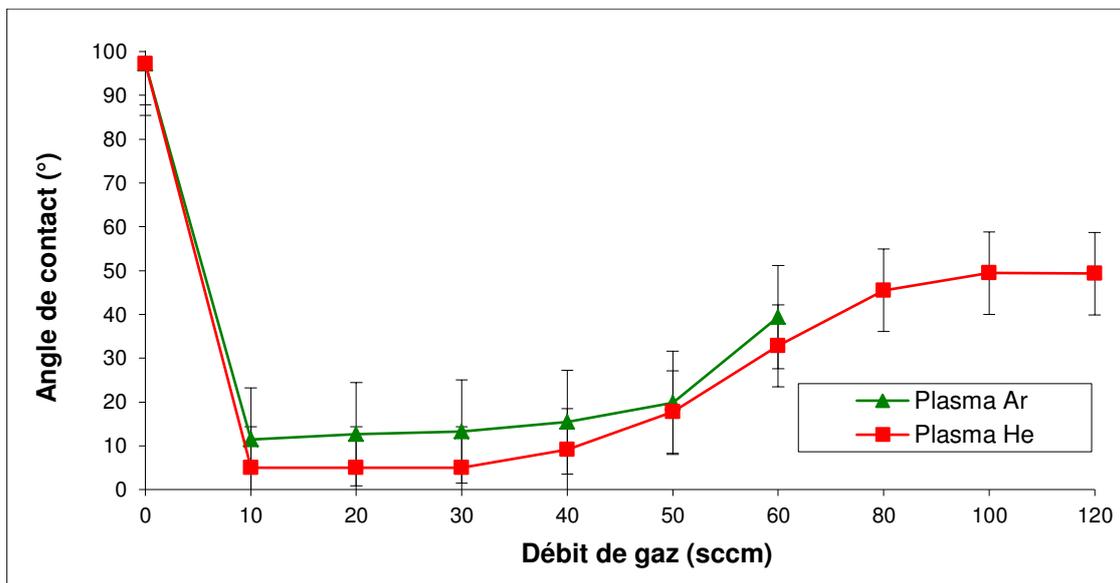


Figure III.3 : Evolution de l'angle de contact d'une goutte d'eau ultra-pure déposée sur la surface de PP après traitement en fonction du débit de gaz pour un plasma d'argon et un plasma d'hélium ($P(\text{Ar})=50 \text{ W}$, $P(\text{He})=60 \text{ W}$, $t=2 \text{ min}$, $p=10^{-2} \text{ mbar}$)

Les deux courbes évoluent de la même façon. Plus le débit de gaz est important, plus la valeur de l'angle de la goutte d'eau ultra-pure déposée à la surface des échantillons augmente, c'est-à-dire que la surface est de plus en plus hydrophobe. Quel que soit le gaz considéré, argon ou hélium, la courbe présente une rupture de pente pour un débit de gaz de

50 sccm avec une valeur d'angle de contact de $19,83^\circ$ pour l'argon et de $17,75^\circ$ pour l'hélium. Au-delà de cette valeur de 50 sccm, la pente des courbes augmente pour devenir quasi-nulle pour des débits de gaz d'hélium de 100 sccm et 120 sccm. Le débit de gaz n'a donc plus d'influence sur la modification de la surface de PP [18].

Les expériences réalisées avec le gaz d'argon ne permettent pas d'obtenir un plasma au-delà d'un débit de 60 sccm. Il est possible qu'un tel débit entraîne une dégradation de la surface de PP trop importante et non seulement une activation.

La figure III.4 permet d'observer l'évolution des valeurs des énergies de surfaces totale et polaire calculées en fonction des mesures d'angle de contact pour les surfaces traitées par le gaz d'argon et le gaz d'hélium.

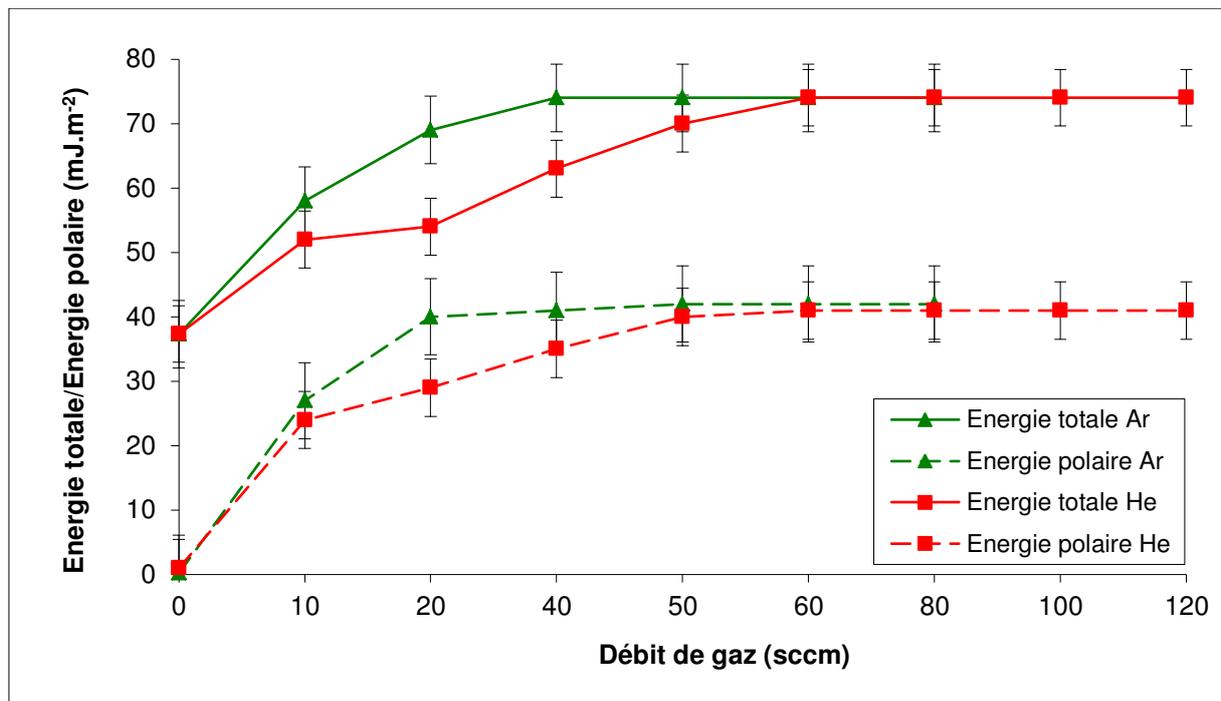


Figure III.4 : Evolution des valeurs des énergies totale et polaire en fonction du débit de gaz pour un plasma d'argon et un plasma d'hélium ($P(\text{Ar})=50\text{ W}$, $P(\text{He})=60\text{ W}$, $t=2\text{ min}$, $p=10^{-2}\text{ mbar}$)

Les énergies totale et polaire évoluent de la même façon l'une par rapport à l'autre. Ainsi les valeurs des énergies de surfaces augmentent en même temps que la valeur du débit de gaz. Les valeurs des énergies polaires correspondant à chacun des deux gaz deviennent constantes à partir d'un débit de gaz de 50 sccm avec une valeur de 74 mJ.m^{-2} tandis que les valeurs des énergies totales sont constantes à partir de 50 sccm pour l'argon (42 mJ.m^{-2}) et 60 sccm pour l'hélium (41 mJ.m^{-2}), ce qui signifie que le caractère hydrophobe des surfaces

traitées par un plasma d'hélium est plus prononcé jusqu'à 60 sccm que celles traitées par le plasma d'argon.

L'équilibre thermodynamique de la phase plasma est donc atteint pour des débits de gaz de 50 sccm pour le traitement effectué avec le gaz d'argon et de 60 sccm pour le gaz d'hélium. Ces valeurs sont donc retenues pour l'étude du temps de traitement.

II.1.3) Influence du temps de décharge sur la mouillabilité des surfaces activées et des énergies de surfaces associées

Le dernier paramètre influençant l'activation de la surface de PP est le temps de traitement durant lequel la puissance et le débit de gaz vont être maintenus constants. La variation de l'angle de contact d'une goutte d'eau ultra-pure déposée sur les surfaces traitées à différents temps est reportée sur la figure III.5.

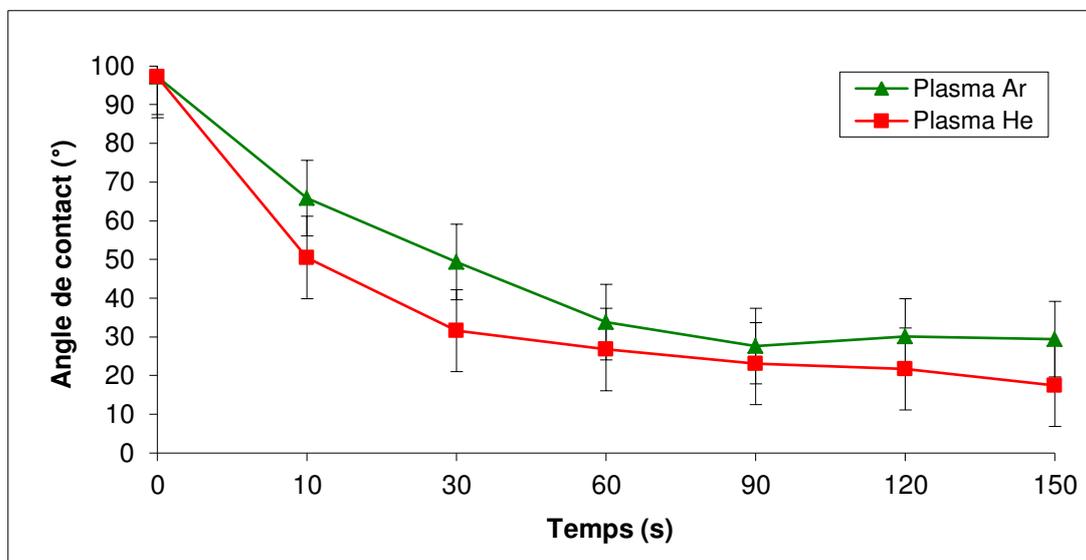


Figure III.5 : Evaluation de l'angle de contact d'une goutte d'eau ultra-pure déposée sur la surface de PP après traitement en fonction du temps de traitement pour un plasma d'argon et un plasma d'hélium ($P(\text{Ar})=50 \text{ W}$, $d(\text{Ar})=50 \text{ sccm}$, $P(\text{He})=60 \text{ W}$, $d(\text{He})=60 \text{ sccm}$, $p=10^{-2} \text{ mbar}$)

Les deux courbes correspondant au temps de traitement des surfaces de PP avec un plasma d'argon et d'hélium évoluent de façon identique. Plus le temps durant lequel la décharge est maintenue constante (puissance et débit de gaz constants) augmente, plus la valeur de l'angle de contact avec la surface décroît. Contrairement aux deux autres paramètres, puissance induite de décharge et débit de gaz, le temps influence la surface traitée en augmentant son caractère hydrophile et non son caractère hydrophobe. En effet, pour un

temps de traitement de 10 s, les angles de contact relevant du caractère hydrophile de la surface de PP après traitement présentent, respectivement pour l'argon et l'hélium, des valeurs de 65,83° et 50,5° alors que pour un temps de 150 s, les valeurs obtenues sont 29,42° et 17,5°. Néanmoins, la courbe correspondant au plasma d'argon présente un plier à partir de 90 s de traitement. La courbe réalisée avec les supports de PP traités par un plasma d'hélium se stabilise quant à elle légèrement à partir de 60 s où l'écart entre chaque valeur d'angle de contact est plus faible, de l'ordre de 5° contre 15° pour de courts temps de traitement.

Les énergies de surfaces totale et polaire ont été calculées et sont présentées dans la figure III.6. Bien que les angles de contact décroissent fortement avec le temps, le caractère hydrophile de la surface traitée relatif à la valeur de l'énergie polaire de surface n'est pas traduit par de très faibles valeurs. En effet, les courbes des énergies de surfaces polaires des supports traités par un plasma d'argon et un plasma d'hélium deviennent constantes pour de long temps de traitement. Au-delà de 90 s, les courbes présentent un palier situé aux alentours de 40 mJ.m⁻². Il en va de même pour les courbes correspondant à l'énergie de surface totale dont la valeur se stabilise vers 70 mJ.m⁻².

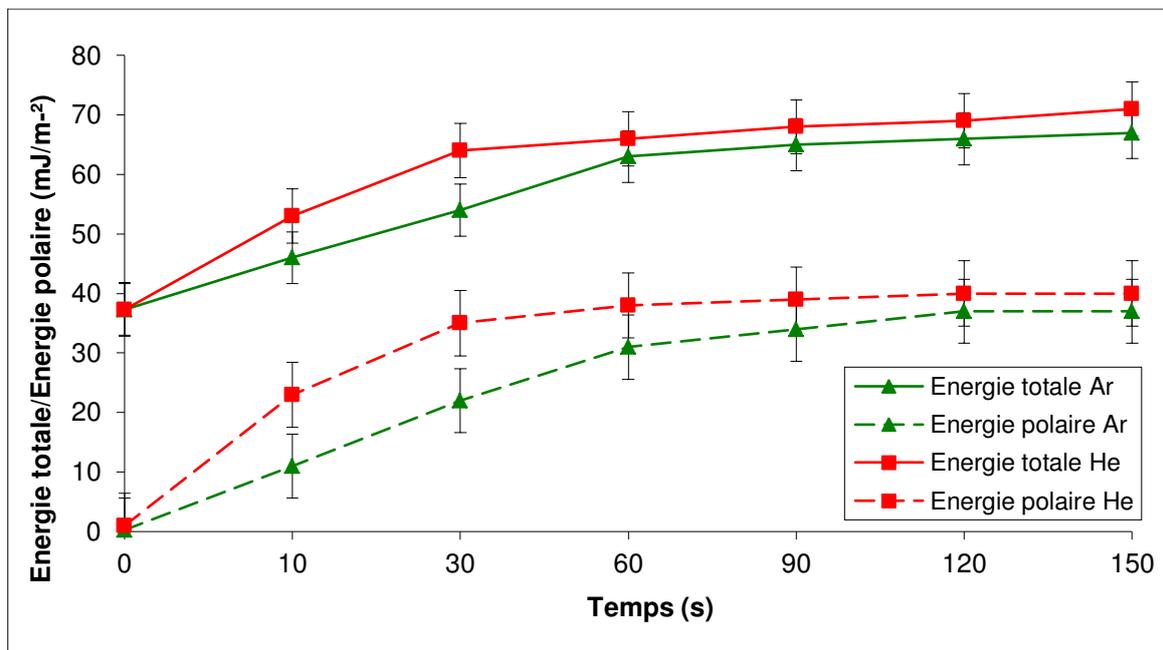


Figure III. 6 : Evolution des valeurs des énergies totale et polaire en fonction du débit de gaz pour un plasma d'argon et un plasma d'hélium ($P(\text{Ar})=50 \text{ W}$, $P(\text{He})=60 \text{ W}$, $d(\text{Ar})=50 \text{ sccm}$, $d(\text{He})=100 \text{ sccm}$, $p=10^{-2} \text{ mbar}$)

Les paramètres optimaux de décharge choisis pour l'argon et l'hélium sont donc une puissance de 50 W pour chaque gaz, un flux de gaz de 50 sccm et de 60 sccm et un temps de

traitement de 90s et 60s. Pour des conditions de décharges voisines, le temps de traitement étant plus faible dans le cas de l'activation par plasma froid d'hélium, il semblerait intéressant de ne conserver que ce dernier. Afin de s'en assurer, nous avons réalisé un test de répétabilité de notre activation pour comparer l'activité de chaque gaz.

II.2) Comparaison entre un plasma d'argon et un plasma d'hélium pour activer les surfaces de polypropylène

Dans le cadre de notre projet, il est nécessaire de pouvoir fournir un traitement donnant lieu à des surfaces à la fois homogène et dont le traitement est reproductible et facilement exploitable à l'échelle industrielle. Dans cette optique, nous avons réalisé une série de mesures par goniométrie afin d'évaluer la répétabilité et la stabilité dans le temps de l'activation de nos surfaces. Cela nous a permis de sélectionner le traitement plasma répondant à nos attentes.

II.2.1) Etude comparative sur la répétabilité de l'activation par plasma froid d'argon et d'hélium des surfaces de polypropylène

Les mesures d'angles de contact d'une goutte d'eau ultra-pure et les valeurs des énergies de surface polaires de plusieurs échantillons traités par plasma froid d'argon ou d'hélium dans des conditions identiques sont présentées sur la figure III.7.

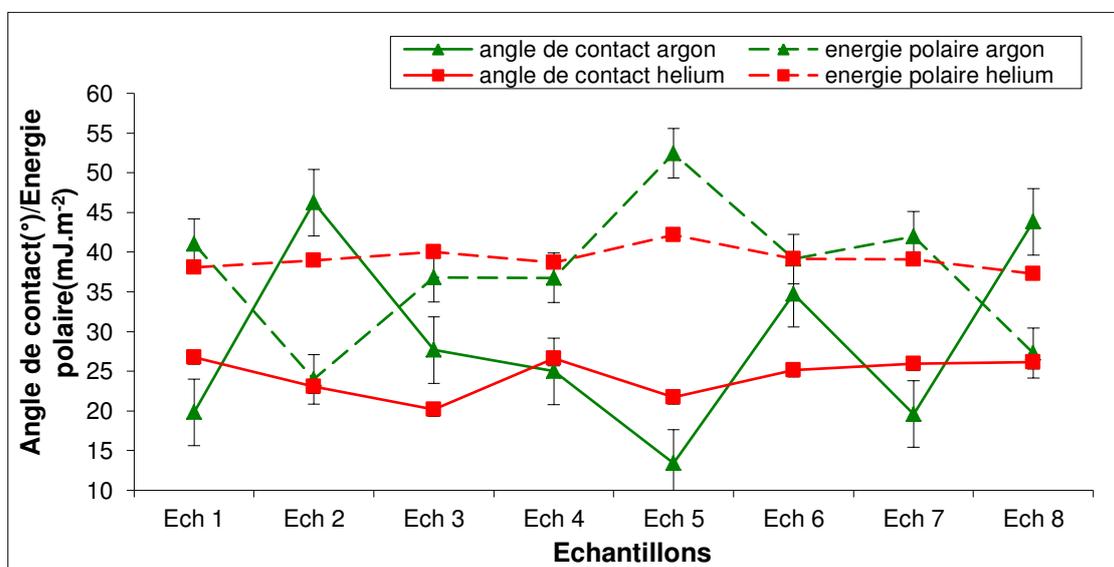


Figure III.7 : Evolution des valeurs des angles de contact d'une goutte d'eau ultra-pure déposée sur la surface et des énergies polaires sur une série d'échantillons de PP traités par plasma d'argon ($P=50\text{ W}$, $d=50\text{ sccm}$, $t=90\text{ s}$, $p=10^{-2}\text{ mbar}$) et par plasma d'hélium ($P=60\text{ W}$, $d=60\text{ sccm}$, $t=60\text{ s}$, $p=10^{-2}\text{ mbar}$)

La nécessité d'obtenir au final des surfaces homogènes avec une bonne reproductibilité, ne permet pas de choisir l'argon comme gaz activateur de nos surfaces de PP, ce dernier ne permettant pas d'acquérir des surfaces traitées identiques après chaque traitement. En effet, les valeurs obtenues pour les mesures d'angle de contact avec une goutte d'eau ultra-pure présentent des valeurs pouvant varier de $13,42^\circ$ avec une énergie de surface polaire associée de $52,46\text{ mJ.m}^{-2}$ (échantillon 5) à $46,25^\circ$ avec une énergie de surface polaire de $23,99\text{ mJ.m}^{-2}$. Le traitement des surfaces de PP par plasma froid d'argon n'est donc pas reproductible et ne peut donc pas retenir notre attention.

En revanche, le traitement réalisé avec l'hélium présente une meilleure stabilité et répétabilité des mesures. En effet, quel que soit l'échantillon traité considéré, les valeurs correspondant aux angles de contact mesurés avec le dépôt d'une goutte d'eau ultra-pure à la surface des échantillons présentent une moyenne centrée sur $24,45^\circ$ avec une erreur moyenne de $2,067^\circ$. Il en va de même pour les énergies de surfaces polaires calculées dont la moyenne s'axe autour de $39,19\text{ mJ.m}^{-2}$ avec une erreur moyenne de $1,196\text{ mJ.m}^{-2}$.

II.2.2) Etude comparative du vieillissement d'une surface de polypropylène activée par un plasma froid d'argon et d'hélium

Les supports activés par traitement plasma montrent parfois une modification de leurs propriétés de surface, due à une post-oxydation ou un remaniement de la chimie de surface en fonction de son environnement. La nécessité de pouvoir stockés les supports activés jusqu'à leur fonctionnalisation par dépôt de couches était donc une notion à prendre en compte. Nous avons réalisé une série de mesures permettant d'évaluer la stabilité de ce prétraitement dans le temps.

La figure III.8 montre la variation de l'angle de contact et de l'énergie de surface polaire de polypropylène activé par un plasma froid d'argon et par un plasma froid d'hélium stockés à l'air ambiant dans des sachets hermétiques, pour des mesures relevées chaque semaine durant 8 semaines dans les mêmes conditions.

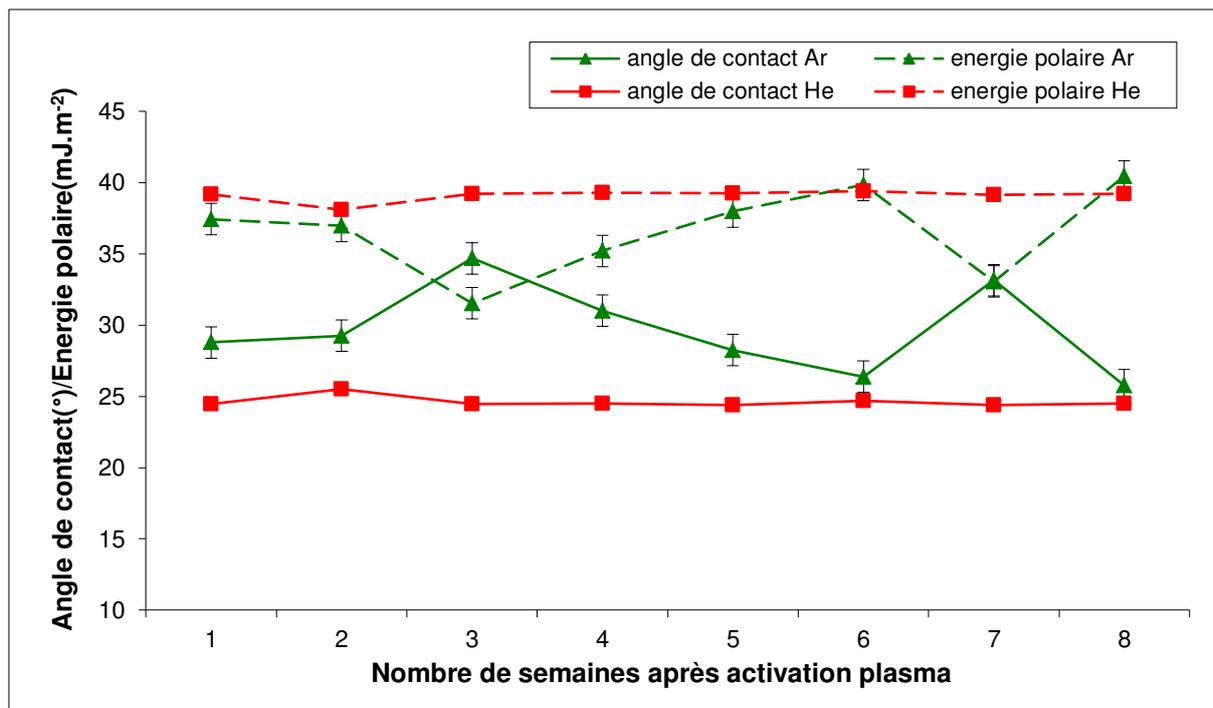


Figure III.8 : Evolution dans le temps des valeurs des angles de contact d'une goutte d'eau ultra-pure déposée sur la surface et des énergies polaires sur une série d'échantillons de PP traités par plasma d'argon ($P=50\text{ W}$, $d=50\text{ sccm}$, $t=90\text{ s}$, $p=10^{-2}\text{ mbar}$) et par plasma d'hélium ($P=60\text{ W}$, $d=60\text{ sccm}$, $t=60\text{ s}$, $p=10^{-2}\text{ mbar}$)

N.B. : les barres d'erreurs des angles des courbes correspondant à l'activation par un plasma froid d'hélium étant très faibles, de l'ordre de 0.3° , ne peuvent être visibles sur le graphique.

Les valeurs obtenues montrent dans chaque cas une variation négligeable du caractère hydrophile des surfaces activées puisque la valeur de l'angle de contact varie au maximum d'environ 3° pour les supports traités par plasma d'argon. Ces résultats étaient attendus puisque l'air est en parti constitué d'atome d'oxygène et d'azote et lui confère donc un caractère semi-hydrophile. Les angles de contact relatifs aux supports activé par un plasma d'argon sont significatifs d'un réarrangement de la chimie de surface avec les molécules ambiantes. Néanmoins, il semblerait que le système, bien que fermé, ait du mal à s'équilibrer, ce qui expliquerait les variations plus importantes des valeurs obtenues par goniométrie.

A contrario, les supports activés par un plasma d'hélium ne présentent qu'une très faible variation de la valeur de l'angle de contact, de l'ordre de 0.3° . La chimie de surface du support s'équilibre dès la seconde semaine et se stabilise de façon irréversible.

Bien que comme mentionné au début de ce chapitre et contrairement à la littérature [15], l'argon ne sera pas choisi comme gaz pour créer un plasma froid permettant d'activer la surface des supports de PP. La suite de nos travaux, est donc menée sur l'étude et la

caractérisation de supports de polypropylène activés par un plasma froid d'hélium avec comme paramètres optimum de décharge : P=60 W, d=100 sccm et t=60s.

II.3) Caractérisation physico-chimique des surfaces de polypropylène activées par un plasma froid d'hélium

Les surfaces des supports de PP activées par plasma froid d'hélium avec les paramètres optimum définis précédemment ont été analysées et caractérisées d'un point de vue chimique au travers de méthodes telles que la spectrométrie à rayons X et la mesure du potentiel zêta correspondant à l'étude des charges en surfaces mais aussi d'un point de vue topographique *via* la microscopie électronique à balayage et à force atomique.

Dans chaque cas, les supports dont la surface a été activée sont notée PPHé et sont comparées à un support témoin non traité, noté PP.

II.3.1) Caractérisation de la composition chimique des surfaces activées

L'activation de la surface des supports de PP par un plasma d'hélium crée des radicaux libres qui peuvent par la suite réagir avec les molécules présentes dans l'air tels que l'hydrogène, l'azote et l'oxygène. Ce sont ces molécules qui vont être analysées, et confirmées que le support a bien été activé.

Dans un premier temps la chimie de surface est évaluée par spectrométrie des rayons X. Le tableau III.1 et l'histogramme associé de la figure III.9 présentent les concentrations en pourcentage atomique des atomes présents à la surface d'un support non traité et traité par rapport au carbone. Les impuretés recensées ici correspondent aux atomes constituant les appareils et ustensiles avec lesquels les analyses de spectrométrie à rayons X ont été réalisées (silicium, sodium, chlore, soufre).

| | C1s | N1s | O1s | impuretés |
|--------------|------|-----|------|-----------|
| PP | 99,1 | | 0,9 | |
| PPHe zone 1 | 74,8 | 2 | 21 | 2,2 |
| PPHe zone 2 | 73,7 | 1,7 | 21,4 | 3,2 |
| Moyenne PPHé | 74,3 | 1,8 | 21,2 | 2,7 |

Tableau III.1 : Concentration en pourcentage atomique de la chimie de surface d'un support de PP non traité et d'un support de PP traité par un plasma d'hélium (P=60 W ; d=100sccm ; t=60 s)

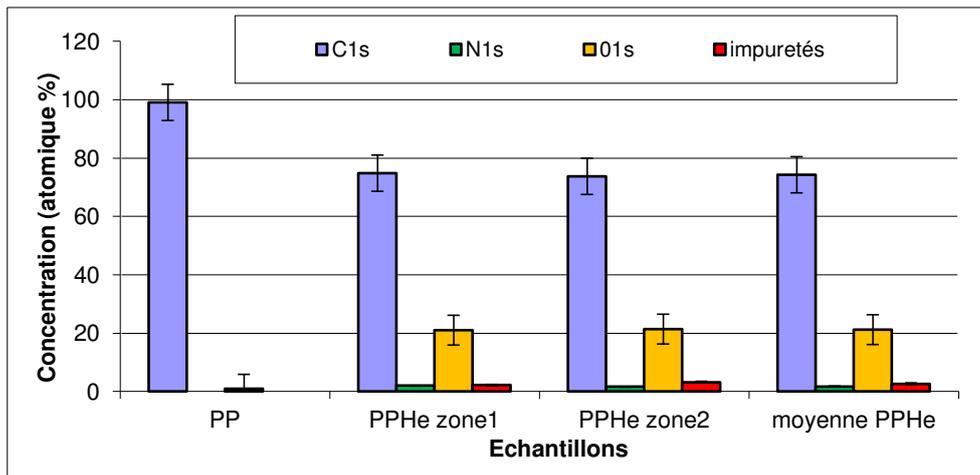


Figure III.9 : Histogramme correspond aux concentrations en pourcentage atomique de la chimie de surface d'un support de PP non traité et traité par un plasma d'hélium ($P=60\text{ W}$; $d=100\text{ sccm}$; $t=60\text{ s}$)

Le polypropylène choisi dans le cadre de notre projet étant pur à 99%, il est donc majoritairement composé d'atomes de carbone et d'atomes d'hydrogène. Comme présenté dans le tableau III.1, le PP est constitué à 99,1% d'atomes de carbones et à 0,9% d'atomes d'oxygène pouvant être présent dans la matrice du polymère, soit provenir de manipulations extérieures lors de l'analyse de l'échantillon.

La surface de l'échantillon de PP activé par plasma d'hélium est analysée en deux endroits différents afin de s'assurer des résultats obtenus par XPS ainsi que pour vérifier l'homogénéité du traitement. Les valeurs obtenues montrent bien que le traitement d'activation de la surface par plasma froid est homogène à la surface des supports puisque les valeurs en pourcentage atomique sont très proches pour un même atome. Considérant l'atome de carbone pour le support activé par exemple, les concentrations en pourcentage atomique sont de 74,8 % et 73,7 %, pour la zone 1 et 2 respectivement. Par ailleurs, les pourcentages calculés permettent de confirmer que la surface des supports de PP est bien activée par le plasma d'hélium puisque apparaissent les pourcentages relatifs d'atomes d'azote (1,8 %), d'oxygène (21,4 %) et par conséquence de la présence de ces atomes, le pourcentage de carbone décroît passant de 99,1 % sur le support de PP témoin à 74,3 %.

Ceci est confirmé par les spectres XPS relatif au C1s présentés dans les figures III.10 et III.11. Le spectre XPS correspondant au support de polypropylène brut présente un pic majoritaire à 285.0eV attribué aux liaisons C-C/C-H et un pic secondaire à 286.3eV attribué à la liaison C-O correspondant à la présence d'atomes d'oxygène dans la matrice du polymère.

| Constituant C1s | C1 (%) | C2% | C3% | C4% |
|-----------------|------------|------------|---------------------|------------|
| Energie (eV) | E=285,0 eV | E=286,3 eV | E=288,0 eV | E=289,3 eV |
| Assignement | C-C / C-H | C-O / C-N | C=O / O-C-O / N-C=O | O=C-O |
| Echantillons | | | | |
| PP | 97,2 | 2,8 | 0 | 0 |
| PPHe | 80,3 | 15,6 | 4,1 | 0 |

Tableau III.2 : Concentration relative des groupes carbone fonctionnalisés provenant du spectre C1s d'un support de PP non traité et d'un support de PP traité par un plasma d'hélium ($P=60\text{ W}$; $d=100\text{sccm}$; $t=60\text{ s}$)

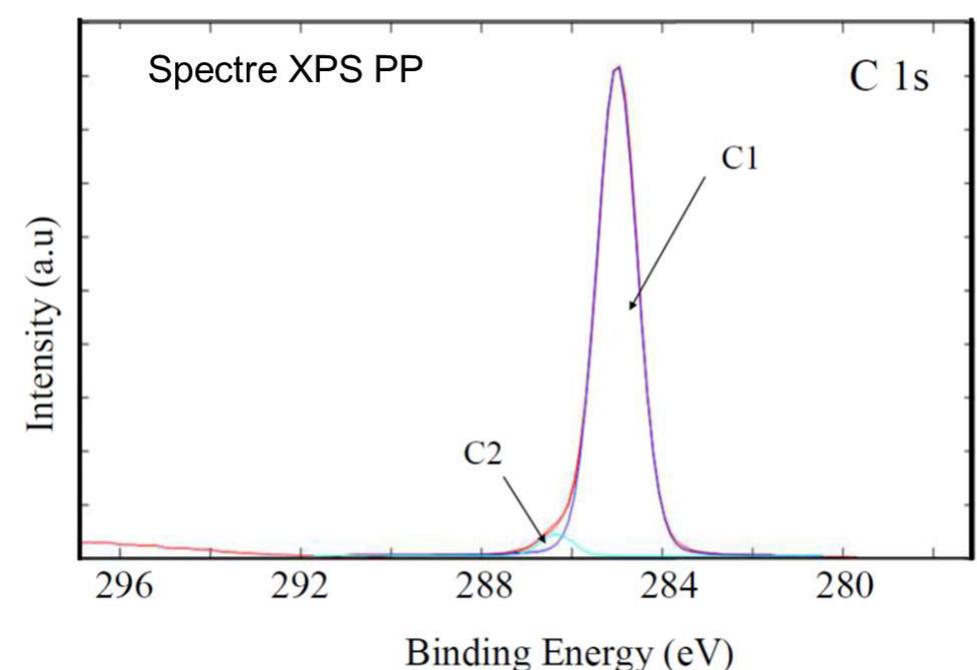


Figure III.10 : Spectres XPS C1s d'un échantillon de PP non activé

En revanche, le spectre XPS relatif au support de polypropylène activé par un plasma froid d'hélium, montre que le taux d'oxygène en surface augmente. Le pic correspondant à la liaison C-O (286.3eV) augmente de près de 80% par rapport au support brut et un nouveau pic apparaît à 288.0eV correspondant à la liaison C=O. Ceci est dû à la réaction entre les radicaux libres créés à la surface du support après activation et les molécules d'oxygène présente dans l'air ambiant lors de l'exposition de la surface durant l'analyse.

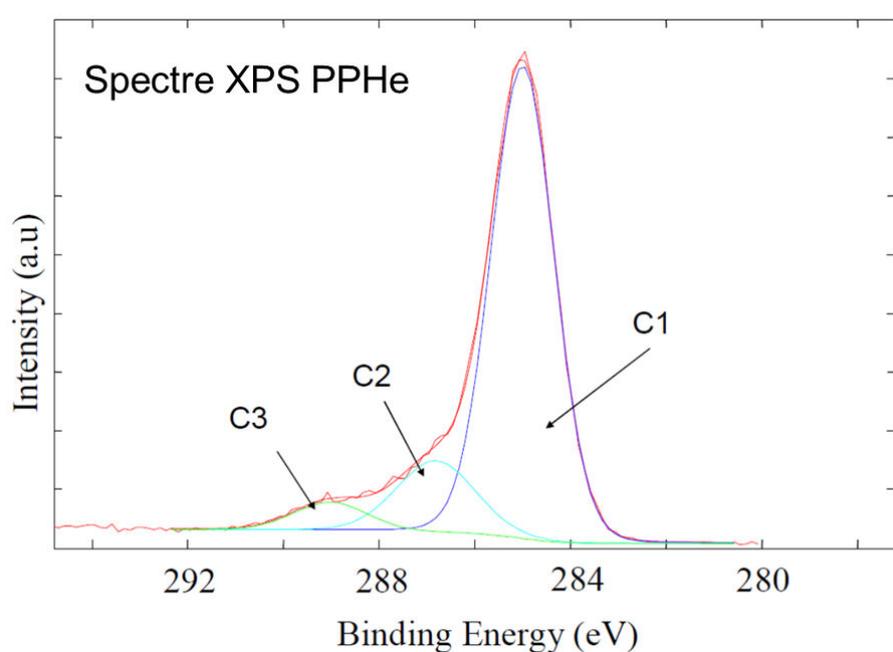


Figure III.11 : Spectres XPS C1s d'un échantillon de PP activé par un plasma froid d'hélium

Néanmoins, le plasma d'hélium permet donc d'activer la surface des supports de polypropylène de façon homogène et de créer des radicaux libres très réactifs qui pourront par la suite interagir avec les molécules de fonctionnalisation.

II.3.2) Caractérisation des charges en surface des surfaces activées

Dans un second temps, une série de mesure permettant d'accéder à la valeur du potentiel zêta des charges en surfaces a été réalisée sur un support de PP témoin non traité et un support de PP activé par plasma d'hélium.

L'évaluation des charges de surface a été réalisée à différents pH correspond à la fois au point isoélectrique du PP ($pI=5,5$), du pK_a des groupements induits par l'activation radicalaire ($pK_a=9$) et du pH utilisé lors de la détection des maladies neurodégénératives au moment de l'induction de l'anticorps primaire à la surface du support de détection ($pH=7,4$). Une valeur de $pH=4$ intermédiaire a été ajoutée dans le but d'avoir un croissante continue en pH.

Tout d'abord, les mesures de potentiel zêta ont été relevées par pH croissants puis décroissants afin de s'assurer que le support ne subit aucun effet d'hystérésie sous l'action des divers pH à sa surface. En effet, sous l'action du pH, la surface peut être modifiée de façon irréversible. Effectuer un relevé des potentiels zêtas pour chaque pH dans le sens croissant

puis décroissant des valeurs de pH permet d'évaluer ce phénomène d'hystérisie. S'il a lieu, les courbes aller-retour sont différentes, dans le cas contraire elles sont quasiment superposables.

La figure III.12 présente l'évolution des valeurs du potentiel zêta pour chaque pH considérés pour le support de PP témoin et le support activé.

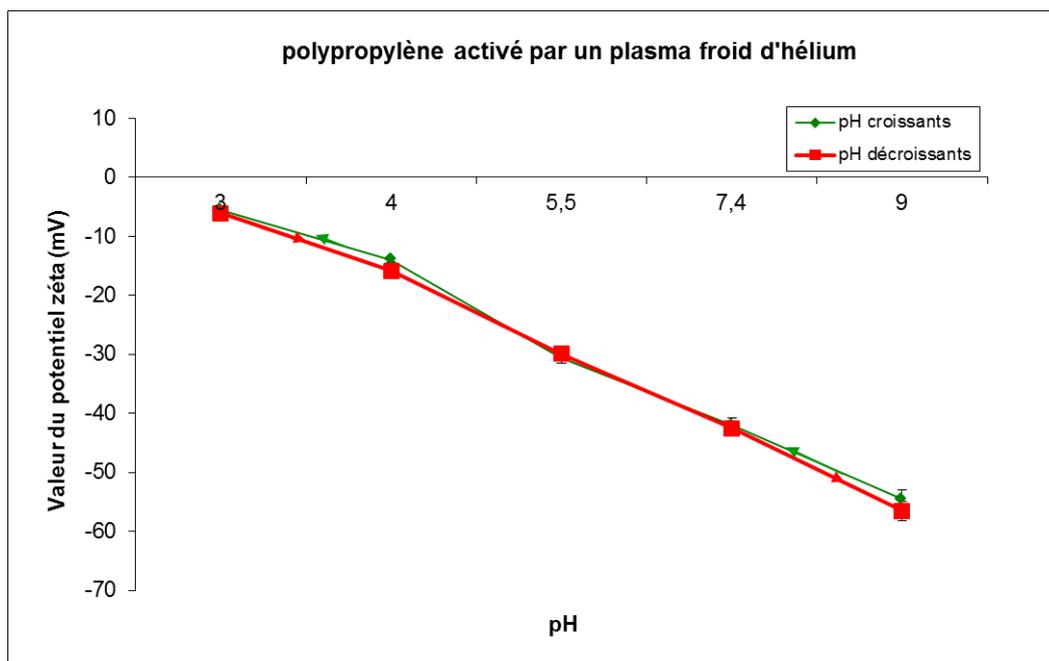
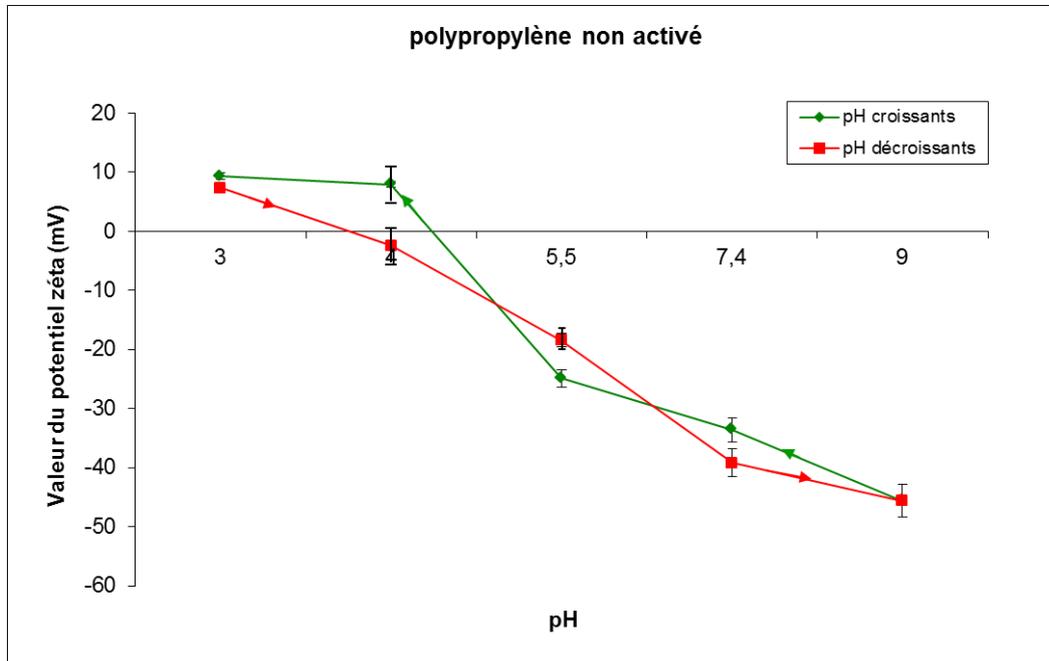


Figure III.12 : Evaluation de l'hystérisie en fonction des pH sur les surfaces de PP non traité (en haut) et de PP traité par un plasma d'hélium (en bas)

Quel que soit le support, aucun phénomène d'hystérésis n'est observé, les courbes correspondant au pH croissants et décroissants présentent la même attitude en fonction du pH. Les surfaces ne sont donc pas altérées sous l'effet de l'écoulement des solutions tamponnées.

II.3.3) Caractérisation de la topographie des surfaces activées

Afin d'évaluer la topographie des surfaces des supports de PP non activé et activé par plasma d'hélium et de confirmer les résultats obtenus par les analyses chimiques réalisées par XPS et mesure du potentiel zêta des charges de surface, à savoir que la surface de PP a bien été activée de façon homogène, des analyses par microscopie à balayage et à force atomique ont été réalisées.

II.3.3.1) Analyses par microscopie électronique à balayage

Dans un premier temps, des analyses par microscopie électronique à balayage ont été effectuées sur un support de PP non traité et d'un support de PP activé par un plasma d'hélium. Ces analyses ont permis d'obtenir les spectres EDX des atomes constitutifs de la surface ainsi que des images des surfaces métallisées au palladium.

La figure III.13 présente les spectres EDX relatifs aux supports de PP non traité et activé par un plasma d'hélium.

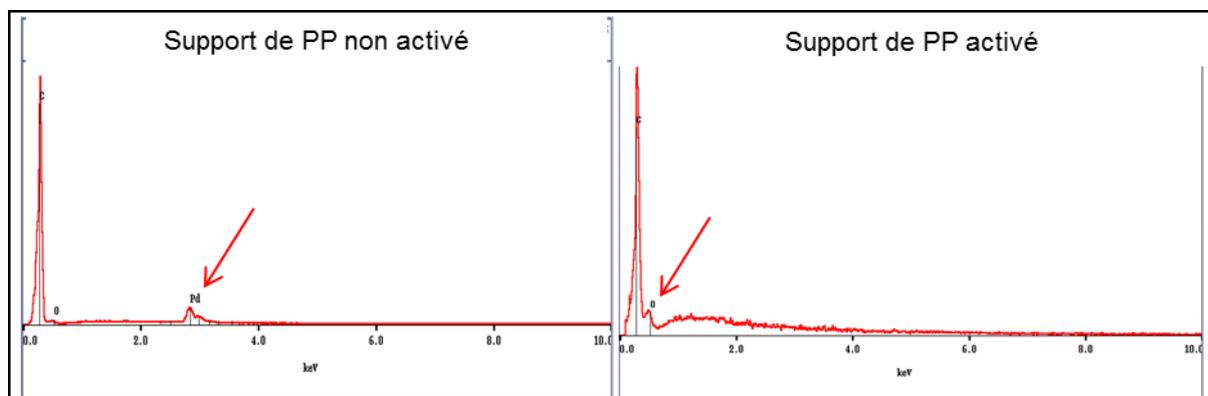


Figure III.13 : Spectres EDX obtenus sur un support de PP non traité et un support de PP activé par un plasma d'hélium

Les spectres EDX obtenus présentent chacun un pic majoritaire vers 0,25 keV correspondant à l'atome de carbone qui est le constituant principal du support de PP. Notons que le pic présent à 2,4 keV sur le spectre EDX du support de PP brut correspond aux

instruments de manipulation et ne doit donc pas être considéré. En revanche le support activé par plasma d'hélium présente un second pic vers 0,5 keV correspondant à l'atome d'oxygène. Ceci confirme les résultats obtenus précédemment par XPS où le pourcentage relatif de l'atome d'oxygène est très faible par rapport à celui de carbone (0,9 % pour 99,1 %). La surface du support de PP a bien été activée par le plasma d'hélium créé.

Le tableau III.3 contient les images des surfaces de PP non traité et de PP activé pour différents grossissements.

| | | | | |
|------|-------|-------|--------|--------|
| PP | | | | |
| | x 150 | x 500 | x 2000 | x 5000 |
| PPHe | | | | |
| | x 150 | x 500 | x 2000 | x 5000 |

Tableau III.3 : Images après métallisation des surfaces de PP non traité et activée par un plasma d'hélium pour différents grossissements

L'activation de la surface de PP par le plasma d'hélium crée à la surface des radicaux qui réagissent avec les molécules présentes dans l'air ambiant. Ces molécules qui se fixent à la surface du support de PP activé forment une couche homogène. Les images obtenues après métallisation de la surface montrent que le support de PP témoin est strié. Après activation de la surface, les stries n'apparaissent plus. La surface présente un aspect veloutée et homogène (grossissements x150 et x500). De plus l'image grossie 2000 fois montre que les stries ne sont pas simplement couvertes mais également comblées par les molécules fixées par les radicaux libres à la surface du support de PP activé.

II.3.3.1) Analyses par microscopie électronique à balayage

Dans un second temps, des analyses en microscopie à force atomique ont été réalisées afin de visualiser la modification topographique et de rugosité de la surface avant et après activation par plasma d'hélium. La figure III.14 présente les images obtenues.

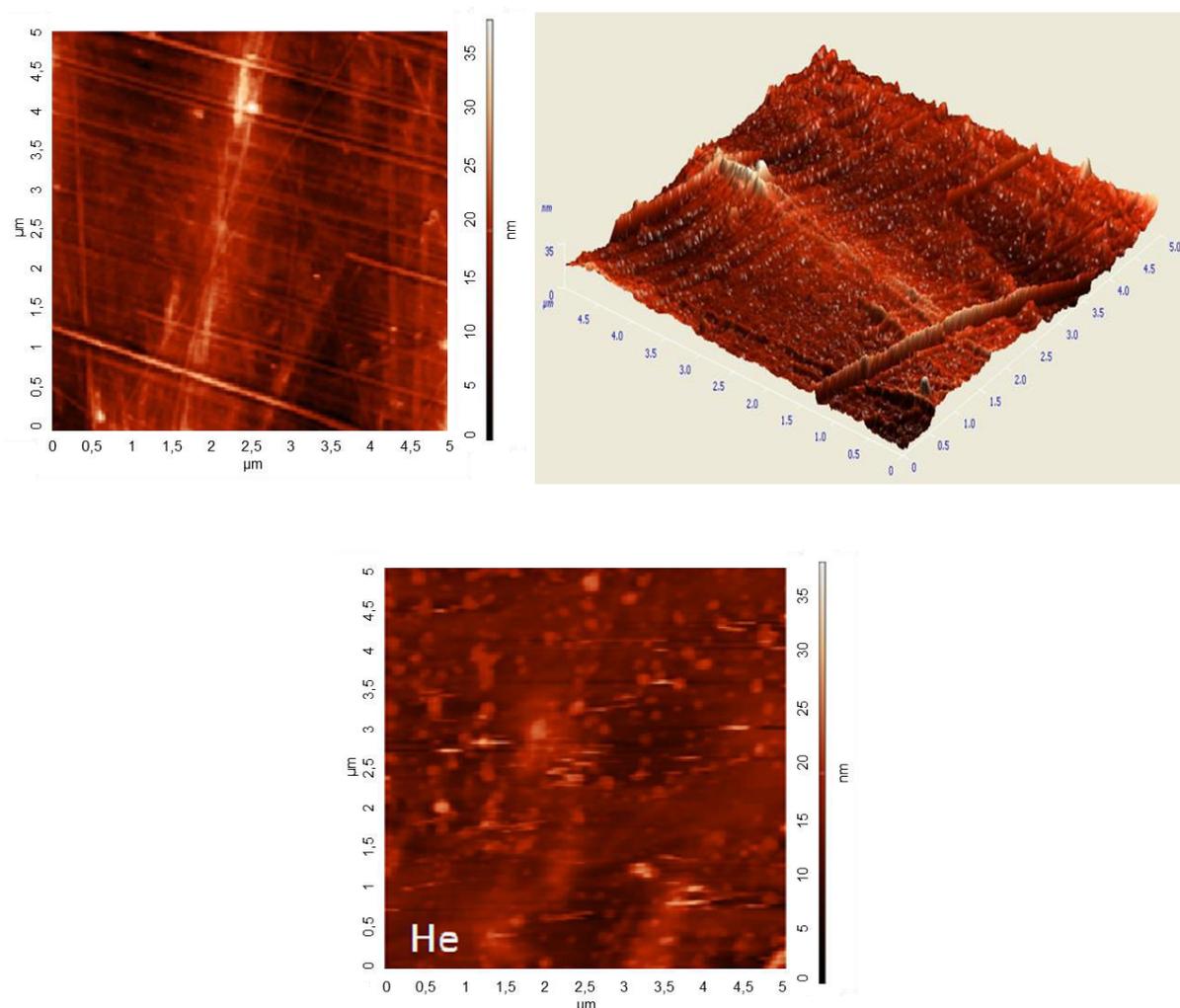


Figure III.14 : Images obtenues par microscopie à force atomique sur des surfaces de PP avant (en haut) et après (en bas) traitement par plasma d'hélium

L'image de la figure III.14 correspondant à la surface du support de PP non traité présente les stries préalablement observées lors des analyses MEB. La microscopie à force atomique permet également d'évaluer la rugosité originale du support de PP de l'ordre de 1,5 nm. L'image relative au support de PP activé par plasma froid d'hélium présente quant à elle une rugosité de surface moyenne de 2.1nm.

Cette augmentation de la rugosité s'explique par les réactions qui s'effectuent entre les molécules présentes dans l'air ambiant et les radicaux libres activés à la surface du support de polypropylène lors de la décharge de plasma froid d'hélium.

Les caractérisations physico-chimiques des surfaces des supports de PP avant et après activation par plasma d'hélium dans les conditions optimales de décharges ont permis d'observer que les surfaces obtenues sont bien activées de façon homogène. La présence de

molécules d'azote et d'oxygène à la surface du support traité a permis de confirmer son activation et la présence de radicaux libres réactifs créés après décharge.

La seconde partie de ce chapitre porte sur la caractérisation physico-chimique des dépôts de couches minces fonctionnelles réalisées par immersion à la surface de support de PP ayant été activés par plasma froid d'hélium.

III . Dépôt de couches minces sur les surfaces de polypropylène activées par un plasma froid d'hélium : amélioration de leur bioadhésion

La fonctionnalisation de nos surfaces s'effectue par dépôt de couches minces de molécules amphiphiles. Dans le but d'élaborer des couches stables et homogènes, il est nécessaire de connaître le comportement des molécules utilisées en solution aqueuse mais également la concentration et le temps d'immersion qui permettront de réaliser par la suite le dépôt le plus homogène.

Trois molécules ont été choisies pour la présence de fonctions amines chargées ou non, pouvant réagir avec les biomolécules d'intérêt au travers des différentes affinités décrites dans le chapitre I, III.2 et s'adaptant au caractère hydrophile des anticorps de capture (Tableau III.3).

| | PrPrechum | PrP DVE | Tau-PHF | a - syn | anticorps |
|------------------|-------------------|----------------|----------------|----------------|------------------|
| pl | 9,4 | -- | 5,5 | 4,7 | 5 |
| caractère | semi - hydrophile | hydrophile | hydrophile | hydrophile | hydrophile |

Tableau III.4 : Valeurs des potentiels isoélectrique et du caractère des biomolécules d'intérêts intervenant dans la détection des maladies considérées

III.1) Influence des conditions d'obtention des couches minces en fonction de la concentration moléculaire et du temps de dépôt

Désireux d'obtenir des surfaces traitées homogènes et semi-hydrophiles, il était nécessaire de réaliser une série d'expérience prenant en compte la concentration moléculaire de chaque composé ainsi que le temps d'immersion des supports dans chaque solution. En effet, nous pouvons penser qu'une solution trop concentrée ou un temps d'immersion trop important pouvait donner lieu à des surfaces irrégulières et anti-adhésives vis-à-vis des anticorps de capture.

Le bromure d'hexatriméthylammonium étant un tensioactif cationique, il possède une concentration micellaire. Nous avons donc dans un premier temps déterminé cette concentration.

III.1.1) Détermination de la concentration d'agrégation critique du bromure d'hexatriméthylammonium

La tension de surface d'une solution correspond à la contrainte existante à l'interface d'un milieu et d'un gaz. Les tensioactifs modifient cette tension superficielle [19]. Lorsqu'ils sont introduits dans la solution, ils viennent dans un premier temps se placer à la surface de l'eau. Plus leur concentration augmente, plus ils saturent cette surface jusqu'à créer un équilibre dynamique entre les molécules en surface et les molécules en solution. Cette saturation est caractérisée par la formation, à partir d'une certaine concentration en molécules tensioactives, d'agrégats sphériques ou ellipsoïdaux. C'est la concentration d'agrégation critique.

Le but est ici de vérifier, plus que déterminer, la valeur de la concentration d'agrégation critique (CAC). Cette valeur peut varier en fonction de la nature de la solution de dilution, de la température et bien sûr de l'appareil de mesure.

S'appuyant sur les valeurs trouvées dans la littérature, nous avons établi des gammes de concentrations encadrant la CAC [20]. Est présentée sur la figure III.15 la variation de la tension superficielle de la solution en fonction du logarithme de la concentration en bromure d'hexatriméthylammonium (T1) dissout.

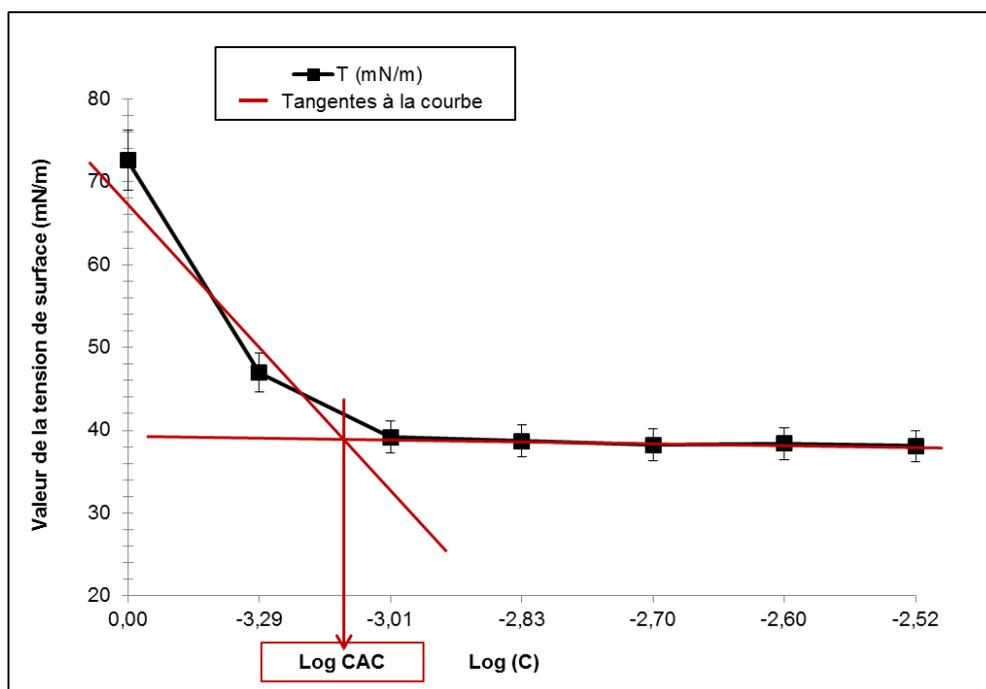


Figure III.15 : Détermination de la concentration d'agrégation critique du bromure d'hexatriméthylammonium

La jonction des deux tangentes à la courbe (en rouge sur la graphique) donne la valeur du logarithme de la concentration d'agrégation critique. Dans notre cas, la valeur logarithmique de la CAC est égale à -3,07, ce qui correspond à une concentration de 0.85 mM. Dans la littérature, nous trouvons une valeur de la CAC pour le bromure d'hexatriméthylammonium de l'ordre de 0,83 mM, confirmant ainsi notre valeur expérimentale [20]. Ainsi, en dessous de cette concentration, les molécules sont majoritairement sous forme libre en solution alors qu'elles sont sous forme micellaire au-dessus de 0,85 mM. Il serait donc possible d'obtenir des dépôts de couches de différentes épaisseur et rugosité en fonction de la concentration de travail choisie.

Le but étant de pouvoir obtenir un dépôt de couches minces de ce produit homogène à la surface de notre support de PP activé par plasma froid d'hélium, une gamme de concentration centrée autour de la CAC permettra de définir la concentration la plus appropriée à la fonctionnalisation des surfaces activées.

Une série d'analyses de mouillabilité de la surface pour une gamme de concentration de chacune des molécules amphiphiles ainsi qu'une étude sur le temps optimal durant lequel les supports de PP doivent être immergés afin d'obtenir les dépôts de couches minces les plus homogènes a été réalisée.

III.1.2) Influence de la concentration moléculaire et du temps d'immersion des surfaces activées sur le dépôt de couches minces

La rugosité, l'épaisseur et l'homogénéité d'un dépôt de couches minces dépendent de deux facteurs qui sont la concentration des molécules de fonctionnalisation et le temps durant lequel les supports sont immergés dans ces solutions.

Ainsi, nous avons évalué en fonction du temps d'immersion en solution aqueuse et à température ambiante des supports de PP activé par plasma froid, la concentration pour laquelle le dépôt présente une mouillabilité avec une valeur d'angle de contact de l'ordre de 30° - 40° permettant une bonne fixation des molécules protéiques.

Les valeurs des angles de contact d'une goutte d'eau ultra-pure déposée à la surface des échantillons pour différentes concentrations et temps d'immersion sont reportées dans les figures III.16, 17 et 18.

III.1.2.1) Greffage du bromure d'hexatriméthylammonium (T1)

La figure III.16 présente l'évolution du caractère hydrophile de la surface des supports de PP activés ayant été immergés durant 3h, 5h et 12h à température ambiante (25°C) dans des solutions aqueuses contenant des concentrations variables en molécules de bromure d'hexatriméthylammonium (T1).

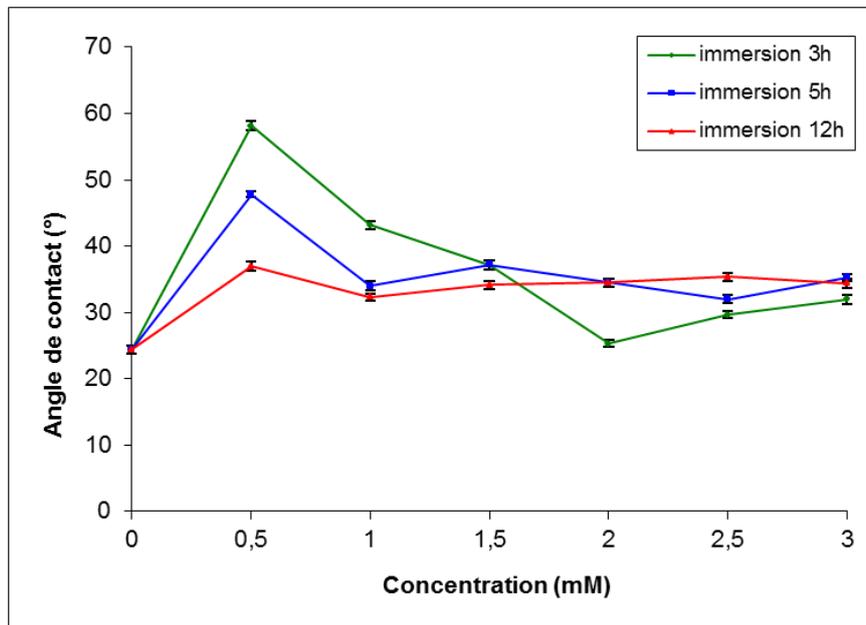


Figure III.16 : Evolution des valeurs des angles de contact d'eau ultra-pure en fonction de la concentration en T1 et du temps d'immersion d'un support de PP activé par un plasma d'hélium ($P=60$ W, $d=100$ sccm, $t=60$ s)

Pour des temps d'immersion de 3h et 5h, les valeurs des angles de contact obtenues diminuent lorsque la concentration molaire augmente passant de 58,17° et 47,83°, pour 3h et 5h respectivement, pour une concentration de 0,5 mM à 32° et 35,25° pour une concentration de 3 mM. Il semble donc qu'il soit nécessaire de se placer au-dessus de la valeur de la CAC pour obtenir une surface plus hydrophile.

Par ailleurs, l'évolution des valeurs de l'angle de contact de la courbe correspondant à une immersion des supports de PP activé durant 3h, ne semble pas être un temps suffisamment important pour permettre aux molécules tensioactives de s'organiser correctement à la surfaces des supports, puisque la valeur de l'angle de contact au-delà de la CAC (0.85 mM) ne se stabilise pas. Au contraire, au-dessus de la CAC, un temps d'immersion de 5h permet aux molécules tensioactives de se stabiliser dans le milieu et d'être en équilibre entre les molécules restant en solution et celles adhérant à la surface du PP activé.

La courbe correspondant à un temps d'immersion de 12h présente pour toute concentration, une valeur d'angle de contact quasiment toujours identique aux alentours de 34°. Ce temps d'immersion permet aux molécules de T1 de s'organiser à l'interface surface de PP activé – milieu aqueux. Ainsi un temps d'immersion de 12h semble le mieux convenir à l'obtention d'une surface possédant un angle de contact de l'ordre de 35°. La concentration molaire gardée sera de 1 mM.

III.1.2.2) Greffage de l'hydrochlorure de 3-buten-1-amine (T2)

Considérant à présent l'hydrochlorure de 3-buten-1-amine (T2) (figure III.17), un temps d'immersion de 3h ne semble pas convenir.

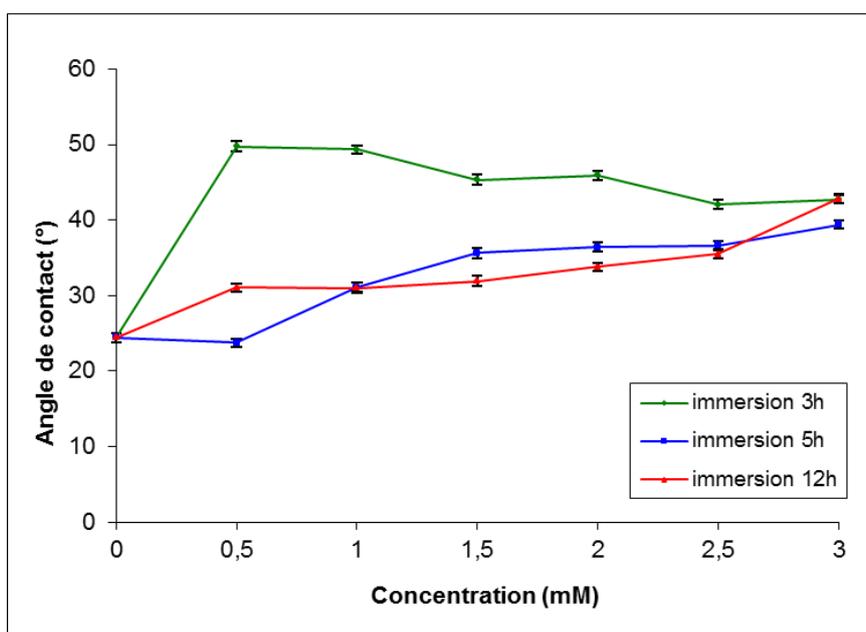


Figure III.17 : Evolution des valeurs des angles de contact d'eau ultra-pure en fonction de la concentration en T2 et du temps d'immersion d'un support de PP activé par un plasma d'hélium ($P=60$ W, $d=100$ sccm, $t=60$ s)

Bien que l'augmentation de la concentration molaire entraîne une diminution de la valeur de l'angle de contact, il reste cependant trop élevé pour répondre à nos critères puisque en moyenne de 46°. Les molécules amphiphiles ne semblent pas avoir suffisamment de temps pour s'organiser de façon homogène à la surface du PP activé. Les courbes relatives à des temps d'immersion de 5h et 12h évoluent manière identique lorsque la concentration moléculaire augmente. Les valeurs des angles de contact de la goutte d'eau ultra-pure déposée à la surface des échantillons varient de 23,75° et 31,08°, pour 5h et 12h respectivement, pour

une concentration de 0,5 mM jusqu'à 39,42° et 42,83° pour une concentration de 3 mM. Les valeurs des angles de contact obtenues correspondant mieux à nos critères pour des temps d'immersion des supports de PP activé de 5h et 12h, le point de concurrence de ces deux courbes et choisi, soit une concentration de 1 mM et un temps de 5h.

III.1.2.3 Greffage du géranylamine (T3)

Les expériences menées avec le géranylamine (T3) donnent lieu à une série de courbes (figure III.18) dont les valeurs des angles de contact relevées sont bien supérieures à celles obtenues avec les traitements T1 et T2.

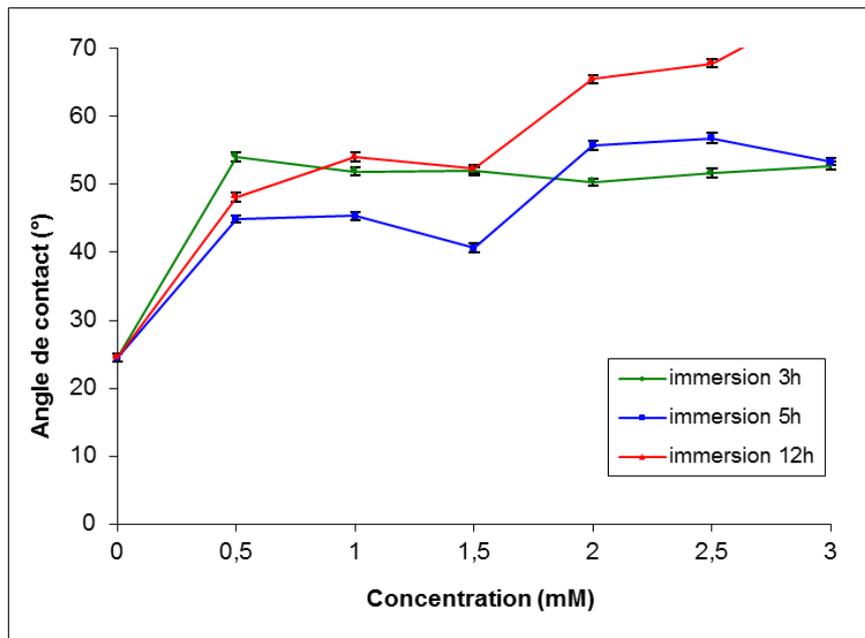


Figure III.18 : Evolution des valeurs des angles de contact d'eau ultra-pure en fonction de la concentration en T3 et du temps d'immersion d'un support de PP activé par un plasma d'hélium ($P=60$ W, $d=100$ sccm, $t=60$ s)

Seul un temps d'immersion de 3h présente une série de valeurs proches de 45,86° quel que soit la concentration molaire utilisée. Bien que les molécules aient donc le temps en 3h de s'équilibrer dans le milieu, le caractère hydrophile du dépôt obtenu n'est pas suffisant. En revanche, les courbes associées à des temps d'immersion des supports activés à 5h et 12h présentent des comportements identiques en fonction de la concentration molaire considérée. Plus cette concentration est importante, plus la valeur de l'angle de contact est élevée : 53,33° et 77,17° à une concentration de 3mM pour un temps d'immersion de 5 h et 12 h, respectivement. Ceci peut être dû à une réorganisation des molécules amphiphiles dans le

milieu de façon à minimiser les énergies. En effet, la faible quantité de molécules libres restant en milieu aqueux entraîne une diminution de la tension de surface de la solution. Ainsi, pour contrebalancer cet effet, les molécules amphiphiles présentent non plus leur partie hydrophile mais leur partie hydrophobe. La surface du support de PP activé devient plus hydrophobe et la valeur de l'angle de contact associé augmente.

D'une manière générale, et ce bien que les valeurs des angles de contact d'une goutte d'eau ultra-pure déposée sur la surface des supports ne correspondent à la mouillabilité visée de 25°, chaque molécule amphiphile considérée dans cette expérience semble réussir à s'équilibrer entre la surface des supports de PP activés et le milieu aqueux dans un temps de 5h ; les courbes correspondant à 5h et 12h évoluant de la même manière et présentant des valeurs d'angles de contact voisines.

Les paramètres de fonctionnalisation des supports de polypropylène activés par un plasma froid d'hélium sont répertoriés dans le tableau III.5.

| Activation par un plasma froid d'hélium avec P=60W, d=100sccm et t=60s | | | | |
|--|--------------------|-----------------------|-------------------------------------|---|
| Greffon Tx | Concentration (mM) | Temps d'immersion (h) | Angle de contact eau ultra-pure (°) | Energie de surface polaire (mJ/m ²) |
| T1 | 1 | 12 | 32,33 | 30,82 |
| T2 | 1 | 5 | 31,08 | 37,04 |
| T3 | 1,5 | 5 | 40,67 | 26,76 |

Tableau III.5 : Tableau récapitulatif des conditions et paramètres de fonctionnalisation des supports de PP pour chaque Tx

III.1.3) Etude du vieillissement des surfaces fonctionnalisées

Les paramètres de fonctionnalisation des surfaces de PP activé ayant été défini en fonction de la concentration molaire en molécules amphiphiles et en fonction du temps d'immersion des supports de PP activés, une étude sur le vieillissement des surfaces a été

réalisée. En effet, en milieu hospitalier les analyses de détection immunoenzymatique ne sont pas systématiquement réalisées le jour même des prélèvements sanguins et/ou lymphoïques, il est donc nécessaire de s'assurer que les dépôts de couches minces ne sont pas altérés dans le temps et peuvent être utilisés dans un temps plus long. Dans cette optique, une série de huit échantillons pour chaque traitement T1, T2 et T3 a été réalisée et une mesure de l'angle de contact d'une goutte d'eau ultra-pure déposée sur la surface de PP traité a été relevée chaque semaine durant 2 mois.

La figure III.19 présente les mesures effectuées pour chacun des trois traitements.

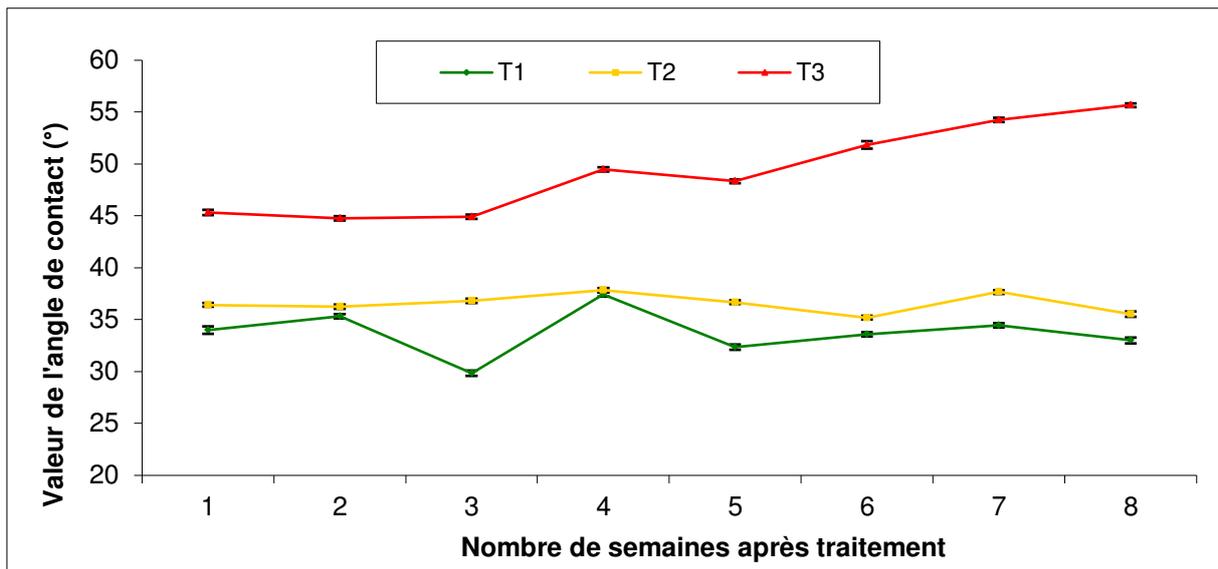


Figure III.19 : Evolution de la valeur de l'angle de contact d'eau ultra-pure déposée à la surface d'un support de PP activé par plasma d'hélium ($P=60\text{ W}$, $d=100\text{ sccm}$, $t=60\text{ s}$ et $p=10^{-2}\text{ mbar}$) et fonctionnalisé par dépôt de couches minces T1 (1 mM, 12h), T2 (1 mM, 5h) et T3 (1,5 mM, 5h)

Les courbes correspondant au traitement T1 et T2 présentent des valeurs d'angle de contact qui varient peu dans le temps. Le traitement T1 donne lieu à une valeur moyenne de l'angle de contact de $33,74^\circ$ avec une erreur de $1,85^\circ$ et le traitement T2, un angle de contact moyen de $36,55^\circ$ avec une erreur de $0,77^\circ$. Ils présentent donc tous deux une très bonne stabilité dans le temps. En revanche, la courbe associée au traitement T3 présente une dérive dans le temps, particulièrement à partir de 5 semaines. Le dépôt de couches minces effectué semble se détériorer dans le temps. Ceci est confirmé par la valeur moyennée des valeurs des angles de contact dont l'erreur est importante : $49,32^\circ \pm 3,57^\circ$.

Bien que le traitement T3 ne semble pas le plus approprié, sa caractérisation physico-chimique sera tout de même réalisé à titre comparatif par rapport aux deux autres traitements T1 et T2. De plus, le vieillissement des dépôts de couches sera également évalué en

conditions réelles, c'est-à-dire en détection immunoenzymologique, dans le chapitre IV dans le but de confirmer les résultats obtenus ici.

Considérant ces dépôts de couches minces stables dans le temps, une série d'expériences permettant de caractériser d'un point de vue physico-chimique la chimie et la topographie des surfaces ainsi fonctionnalisées.

III.2) Caractérisation physico-chimique des dépôts de couches minces

Afin d'étudier les dépôts de couches réalisés sur les surfaces activées par plasma d'hélium des supports de polypropylène et possédant une mouillabilité correspondant au caractère hydrophile des biomolécules d'intérêt mises en jeu dans le système de détection ELISA, des expériences permettant la caractérisation de la chimie de surface des couches fonctionnelles ont été réalisées par calculs de l'énergie de surface, analyses XPS et mesures du potentiel d'écoulement des charges en surfaces. Leurs topographies à quant à elle était effectuées par microscopie électronique à balayage et à force atomique.

III.2.1) Influence du dépôt des couches minces sur la mouillabilité des surfaces traitées

Les dépôts de couches minces réalisés sur les surfaces de PP activées par plasma froid d'hélium possèdent un caractère hydrophobe et/ou hydrophile dont dépend sa mouillabilité et donc dans le cadre de ces travaux la biocompatibilité des surfaces vis-à-vis des protéines. Dans un premier temps, les mesures des angles de contact d'une goutte d'eau ultra-pure et de diodométhane (DIODO) déposées à la surface des échantillons témoin et traités ont permis de calculer les énergies de surfaces associées. Les mesures d'angle de contact réalisées avec un solvant polaire (de l'eau ultra pure) et un solvant apolaire (le diodométhane) associées à la méthode de calculs de Fowkes (chapitre II, III.2), permettent de calculer l'énergie de surface d'un solide en dissociant les interactions polaires et apolaires. Le caractère hydrophile ou hydrophobe d'une surface peut ainsi être déterminé.

Les valeurs des différents angles de contact relevées sur les surfaces traitées donnent lieu aux énergies de surfaces répertoriées dans le tableau III.3 ci-dessous. Les histogrammes de la figure III.20 et 21 correspondent aux valeurs des énergies de surfaces et des angles de contact du tableau III.6.

| Echantillons | θ_{H_2O} en degré (°) | θ_{DIODO} en degré (°) | Energie de surface totale | Energie de surface polaire (mJ/m ²) | Energie de surface apolaire |
|--------------|---------------------------------|----------------------------------|------------------------------|---|--------------------------------|
| PP témoin | 98,6 | 56,5 | 30,78 | 0,56 | 30,22 |
| PPHe | 27,67 | 32 | 66,2 | 36,84 | 29,36 |
| PPT1 | 34 | 51,33 | 61 | 40,37 | 20,64 |
| PPT2 | 36,42 | 42,42 | 60,32 | 34,75 | 25,57 |
| PPT3 | 45,38 | 41,08 | 55,15 | 27,55 | 27,6 |

Tableau III.6 : Valeurs des énergies de surfaces calculées par la méthode de Fowkes-Young sur le PP témoin, le PP activé par plasma d'hélium et le PP activé et fonctionnalisé par les traitements T1, T2 et T3

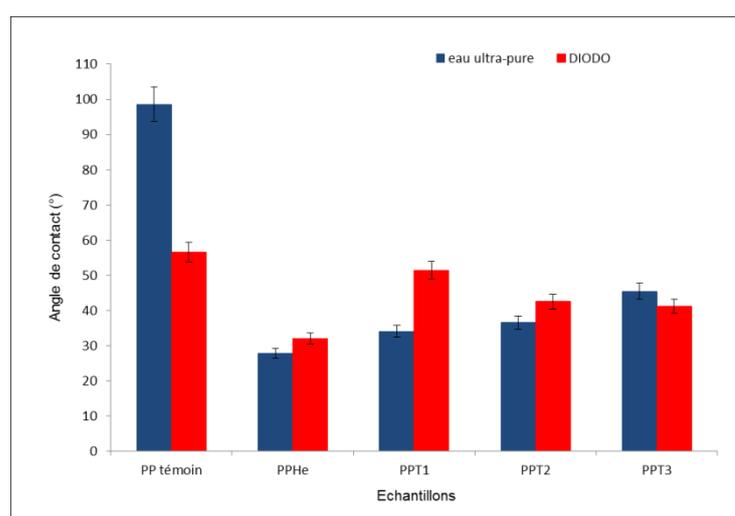


Figure III.20 : Histogramme correspondant à l'évolution des valeurs des angles de contact de gouttes d'eau ultra-pure et de diodométhane (DIODO) déposées à la surface des supports de PP activés et fonctionnalisés (T1 : 1 mM et 12h d'immersion ; T2 : 1 mM et 5h d'immersion ; T3 : 1,5 mM et 5h d'immersion)

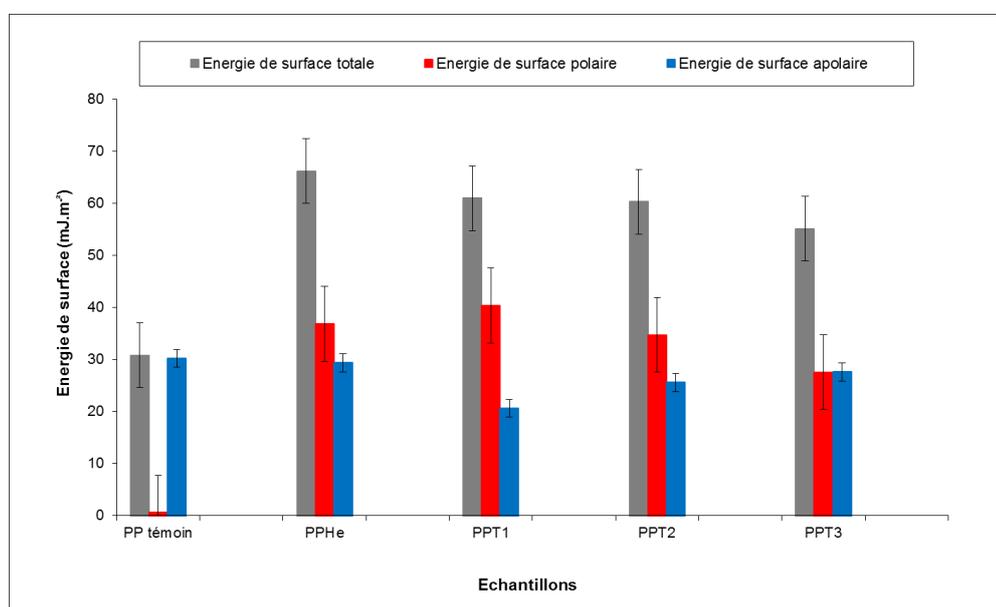


Figure III.21 : Histogramme correspondant à l'évolution des énergies de surface totale, polaire et apolaire à la surface des supports de PP activés et fonctionnalisés (à droite) (T1 : 1 mM et 12h d'immersion ; T2 : 1 mM et 5h d'immersion ; T3 : 1,5 mM et 5h d'immersion)

Le graphique sur la figure III.20 montre que le caractère hydrophile des surfaces des supports activés et fonctionnalisés deviennent hydrophiles après traitement, l'angle de contact d'une goutte d'eau ultra-pure avec la surface variant de $98,6^\circ$ pour le support témoin non traité à $27,67^\circ$ pour le support activé par le plasma d'hélium et aux alentours de 38° pour les supports activés et fonctionnalisés (T1, T2 et T3). La présence à la surface des supports de PP de couches minces fonctionnelles permet donc bien de réduire son caractère hydrophobe. Ceci est confirmé par les calculs des énergies de surfaces polaires et apolaires. L'histogramme (figure III.21) permet d'observer nettement l'évolution du caractère hydrophile des surfaces des supports de PP par l'augmentation des valeurs des énergies polaires de surfaces des supports traités par rapport au support témoin. La valeur de l'énergie de surface polaire passe de $0,56 \text{ mJ.m}^{-2}$ pour le PP non traité témoin à environ 37 mJ.m^{-2} et 28 mJ.m^{-2} pour les supports activés, T1 et T2 et pour le support T3, respectivement. Il en découle une augmentation des valeurs des énergies de surfaces totales des tous les supports traités (activation et activation avec fonctionnalisation). Les traitements déposés à la surface des supports de PP activés par plasma froid d'hélium permettent d'obtenir des surfaces fonctionnalisées dont le caractère hydrophile apparaissant alors et à même de pouvoir mieux réagir avec les biomolécules concernées.

III.2.2) Caractérisation de la composition chimique des surfaces traitées

Bien que les mesures d'angle de contact avec l'eau ultra-pure et le Diodo permettent de rendre compte de la fonctionnalisation des surfaces à travers les calculs des énergies de surfaces, des analyses XPS ont été réalisées afin de définir les atomes les plus présents à la surface des supports fonctionnalisés par rapport au support témoin non traité.

Le tableau III.7 répertorie les valeurs des pourcentages atomiques de chaque atome par rapport au carbone. Les impuretés correspondent aux diverses molécules et atomes pouvant interagir avec les surfaces traitées et fonctionnalisées et provenant des intermédiaires de manipulation, comme par exemple le silicium de la pince ou le sel présent sur les mains de l'expérimentateur.

| | C1s | N1s | O1s | Br3d/4s | impuretés |
|--------------|-------|------|------|---------|-----------|
| PP | 95,35 | | 2,9 | | 1,75 |
| PPHe | 74,3 | 1,8 | 21,2 | | 2,7 |
| PPT1 zone1 | 93,15 | 1,39 | 4,95 | 0,25 | 0,26 |
| PPT1 zone2 | 92,82 | 1,47 | 5,08 | 0,33 | 0,3 |
| moyenne PPT1 | 92,99 | 1,43 | 5,02 | 0,29 | 0,28 |
| PPT2 zone1 | 88,45 | 2,01 | 9,20 | | 0,34 |
| PPT2 zone2 | 87,97 | 2,35 | 9,11 | | 0,57 |
| moyenne PPT2 | 88,21 | 2,18 | 9,16 | | 0,46 |
| PPT3 zone1 | 88,80 | 2,05 | 8,90 | | 0,25 |
| PPT3 zone2 | 89,10 | 1,98 | 8,59 | | 0,33 |
| moyenne PPT3 | 88,95 | 2,02 | 8,75 | | 0,29 |

Tableau III.7 : Concentration en pourcentage atomique de la chimie de surface d'un support de PP non traité et d'un support de PP traité par plasma d'hélium ($P=60\text{ W}$; $d=100\text{ sccm}$; $t=60\text{ s}$).
Remarque : T1 possède donc un contre ion bromure avec un ratio $Br/C = 1/19$

Chaque surface activée par un plasma froid d'hélium et fonctionnalisée par les dépôts de couches minces T1, T2 et T3 ont été analysées en deux points afin de s'assurer que le traitement est bien homogène. Quel que soit le support traité considéré, les pourcentages atomiques calculés reflètent correctement le caractère homogène de la surface. En effet, par exemple, le support PPT2 présente des valeurs de pourcentages atomiques quasiment identiques : 88,45 % et 87,97 % en considérant l'atome de carbone sur les zone1 et zone2, respectivement.

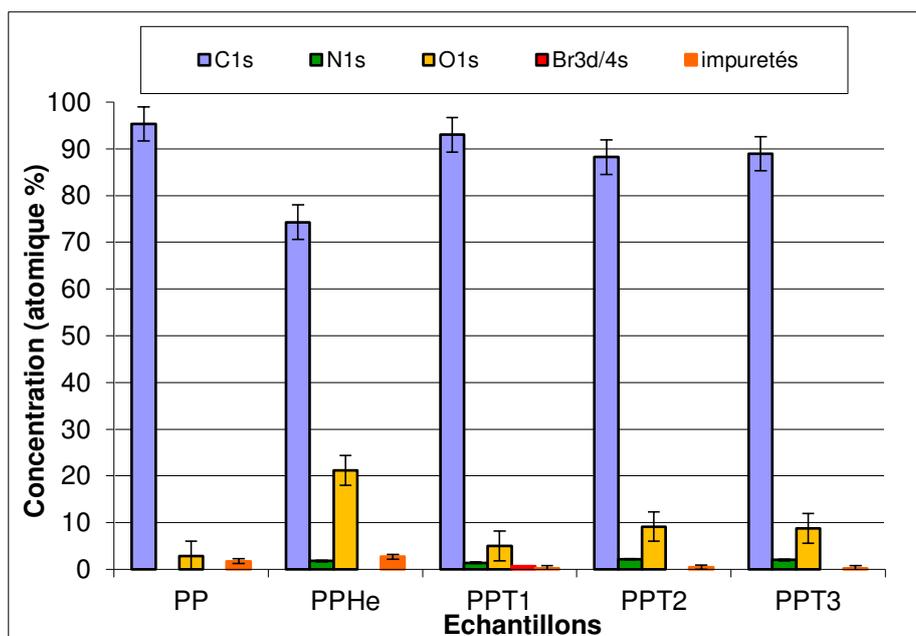


Figure III.22 : Histogramme correspondant concentration en pourcentage atomique de la chimie de surface d'un support de PP non traité et d'un support de PP traité par un plasma d'hélium ($P=60\text{ W}$; $d=100\text{ sccm}$; $t=60\text{ s}$)

L'histogramme de la figure III.22 correspond aux pourcentages atomiques de chaque atome moyennés sur les deux zones d'analyse. Il permet de rendre compte de l'évolution de la surface d'un point de vue chimique avant et après traitement (activation et/ou fonctionnalisation). La présence du dépôt de couches minces du traitement T1 est également confirmée par la présence de l'atome de brome. Son ratio par rapport au carbone ($Br/C = 1/19$) au sein de la molécule étant faible, il est normal que les valeurs de ses pourcentage atomiques relatifs au carbone le soient aussi (0,25 % et 0,33 %). De plus, lors de l'immersion et du séchage, le contre ion peut ne pas rester associé au tensioactif, il est donc moins présent à la surface de l'échantillon que les atomes de carbone ou d'azote. Cependant, il indique que le dépôt de couches minces correspondant au traitement T1 est bien présent à la surface du support de PP.

III.2.2.1) Spectre XPS d'un support de polypropylène fonctionnalisé par le bromure d'hexatriméthylammonium (T1)

Pour rappel, une solution aqueuse de T1 a été préparée à une concentration de 1mM dans laquelle un support de PP activé par un plasma d'hélium ($P=60W$; $d=100sccm$; $t=60s$) a été immergé durant 12h. Le tableau III.8 et la figure III.23 correspondent à la décomposition du pic C1s et du spectre XPS, respectivement.

| Constituant C1s | C1 (%) | C2% | C3% | C4% |
|-----------------|------------|------------|---------------------|------------|
| Energie (eV) | E=285,0 eV | E=286,3 eV | E=288,0 eV | E=289,3 eV |
| Assignement | C-C / C-H | C-O / C-N | C=O / O-C-O / N-C=O | O=C-O |
| Echantillons | | | | |
| PP | 97,2 | 0 | 0 | 0 |
| PPT1 | 88 | 12 | 0 | 0 |

Tableau III.8 : Concentration relative des groupes carbone fonctionnalisés provenant du spectre C1s d'un support de PP non traité et d'un support de PP activé par un plasma d'hélium ($P=60 W$; $d=100sccm$; $t=60 s$) et fonctionnalisé par T1

Le tableau III.8 montre que le pourcentage correspondant à C1/C1s décroît légèrement dans le cas du support PPT1 tandis que le pourcentage correspondant à C2/C1s augmente.

En effet, le bromure d'hexatriméthylammonium est une molécule tensioactive cationique à longue chaîne carbonée présentant une tête chargée $N^+(CH_3)_3Br^-$. Le pic C2 à 286.3eV sur le spectre XPS de la figure III.23 correspond à la liaison C-N.

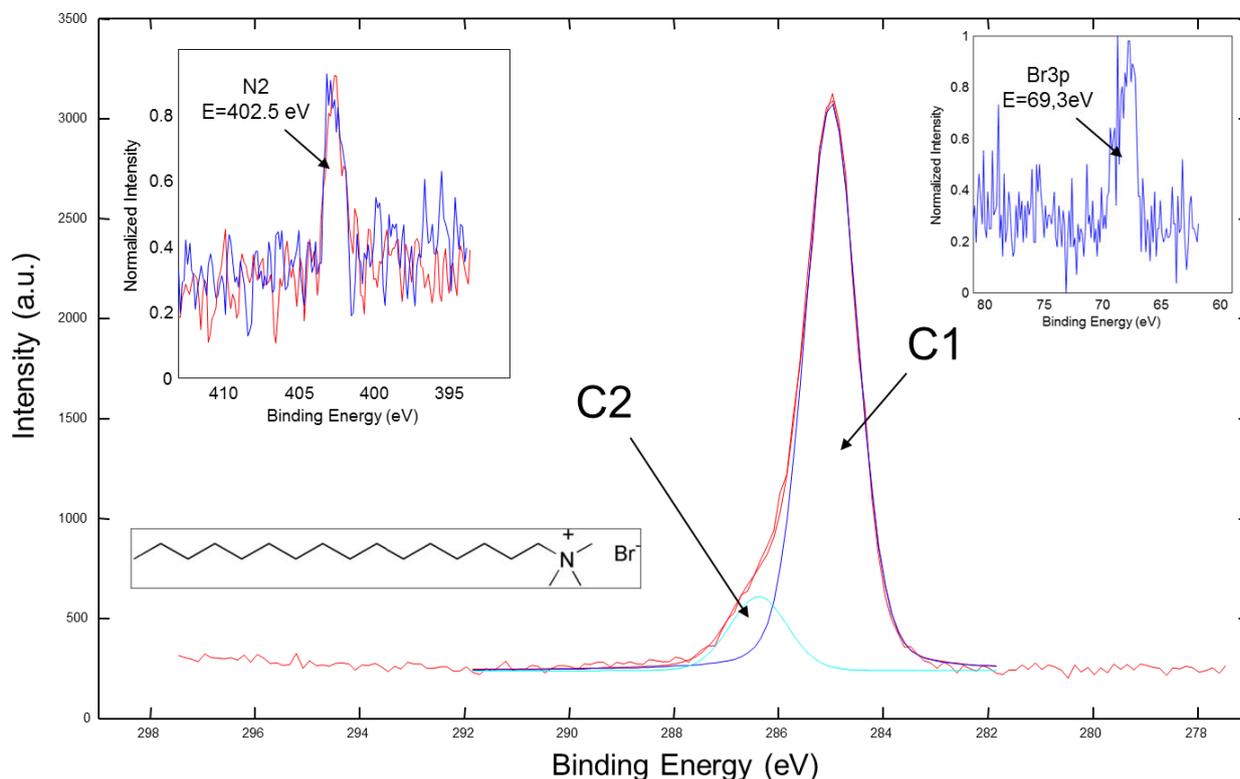


Figure III.23 : Spectres XPS C1s d'un échantillon de PP activé par un plasma froid d'hélium et fonctionnalisé par le dépôt de couches minces de T1

La présence du groupement azoté en tête de la molécule T1 se retrouve sur le spectre N1s, en encart à gauche dans la figure III.23, avec la présence d'un pic N2 à 402.5eV. De plus, le spectre XPS relatif au brome présente un pic à 69.3eV correspondant à Br3p. Ces résultats corroborent les résultats obtenus par goniométrie. La présence du tensioactif augmentant la mouillabilité de la surface du support de PP traité.

III.2.2.2) Spectre XPS d'un support de polypropylène fonctionnalisé par l'hydrochlorure de 3-buten-1-amine (T2)

Le tableau III.9 et la figure III.24 correspondent à la décomposition du pic C1s et du spectre XPS, respectivement. Le support de polypropylène a été activé par un plasma froid

d'hélium (P=60W ; d=100sccm ; t=60s) et mis en solution aqueuse de T2 (1mM) pendant 5h. Ce composé possède une double liaison C=C qui s'ouvre et se fixe sur le support activé, ainsi qu'un groupement de tête azoté –NH₂.

| Constituant C1s | C1 (%) | C2% | C3% | C4% |
|-----------------|------------|------------|---------------------|------------|
| Energie (eV) | E=285,0 eV | E=286,3 eV | E=288,0 eV | E=289,3 eV |
| Assignement | C-C / C-H | C-O / C-N | C=O / O-C-O / N-C=O | O=C-O |
| Echantillons | | | | |
| PP | 97,2 | 0 | 0 | 0 |
| PPT2 | 63,4 | 23,8 | 12,8 | 0 |

Tableau III.9 : Concentration relative des groupes carbone fonctionnalisés provenant du spectre C1s d'un support de PP non traité et d'un support de PP activé par un plasma d'hélium (P=60 W ; d=100sccm ; t=60 s) et fonctionnalisé par T2

Le tableau III.9 montre que le pourcentage correspondant à C1/C1s diminue de près de 40% dans le cas du support PPT2 favorisant l'apparition de deux nouveaux pics correspondant à C2 et C3, à des énergies de 286.3eV et 288.0eV respectivement.

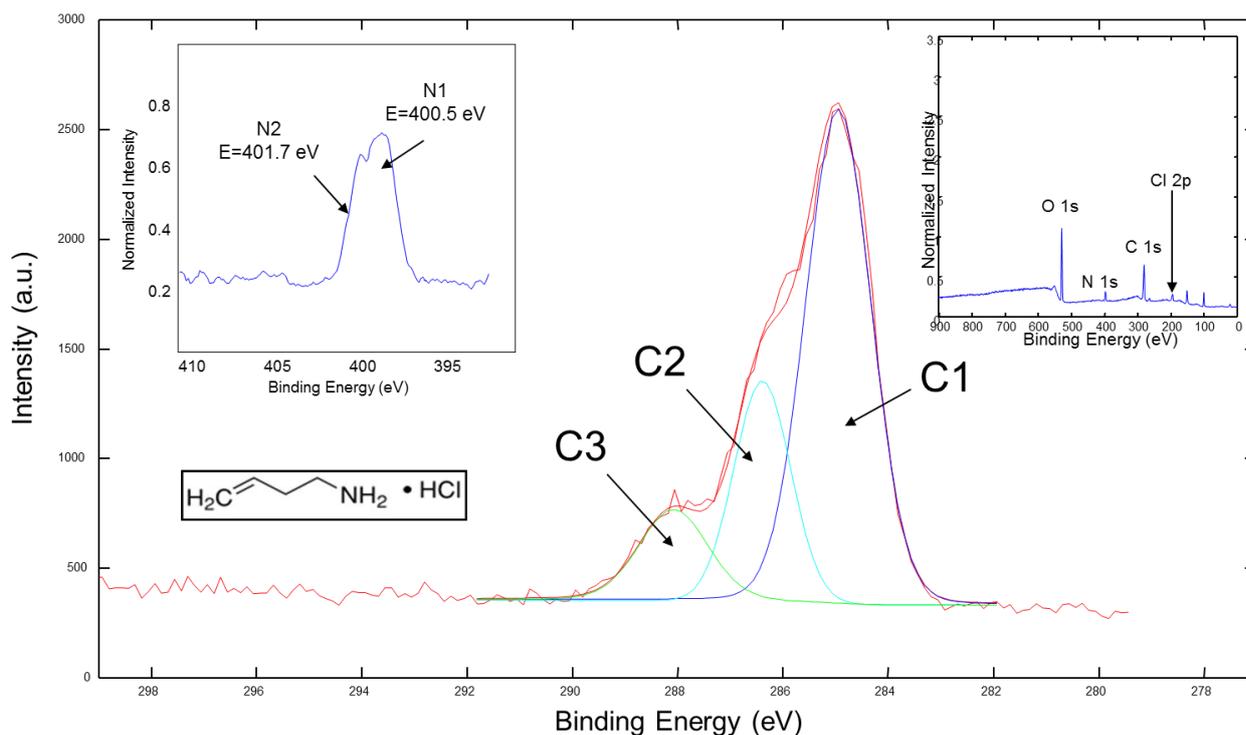


Figure III.24 : Spectres XPS C1s d'un échantillon de PP activé par un plasma froid d'hélium et fonctionnalisé par le dépôt de couches minces de T2

Par ailleurs, le spectre N1s présente deux pics à 400.5eV pour N1 et 401.7eV pour N2, confirmant la présence de groupements azotés. Le pic N1 peut être attribué à la forme non chargée de la molécule T2 tandis que le pic N2 correspond à la forme en équilibre avec le chlorure d'hydrogène. En effet, le groupement de tête de T2 a la caractéristique de posséder un radical cation en équilibre permanent entre NH_2^{\cdot} / HCl et $\text{NH}_3^+/\text{Cl}^-$. Le spectre XPS en haut à droite sur la figure III.24, présente un pic à 199.9eV correspondant à Cl2p ; confirmant ainsi le dépôt de couches de T2.

III.2.2.3) Spectre XPS d'un support de polypropylène fonctionnalisé par le géranylamine (T3)

Les analyses XPS ont été réalisées sur un support de polypropylène activé par un plasma froid d'hélium (P=60W ; d=100sccm ; t=60s) puis immergé dans un solution eau/éthanol : 90/10 de T3 (1.5mM) durant 5h.

| Constituant C1s | C1 (%) | C2% | C3% | C4% |
|-----------------|------------|------------|---------------------|------------|
| Energie (eV) | E=285,0 eV | E=286,3 eV | E=288,0 eV | E=289,3 eV |
| Assignement | C-C / C-H | C-O / C-N | C=O / O-C-O / N-C=O | O=C-O |
| Echantillons | | | | |
| PP | 97,2 | 0 | 0 | 0 |
| PPT3 | 47,5 | 29,8 | 16 | 6,7 |

Tableau III.10 : Concentration relative des groupes carbone fonctionnalisés provenant du spectre C1s d'un support de PP non traité et d'un support de PP activé par un plasma d'hélium (P=60 W ; d=100sccm ; t=60 s) et fonctionnalisé par T3

Le géranylamine possède deux doubles liaisons C=C ainsi qu'un groupement de tête amine NH_2 . Le tableau III.10 montre que la concentration relative de C1 décroît de 67% par rapport au support de polypropylène non traité. En contrepartie, les constituants C2 et C3 sont toujours présents et augmentent par rapport aux valeurs attribuées aux supports PPT1 et PPT2 et un pic à 289.3eV apparaît, correspondant à O=C-O (5%).

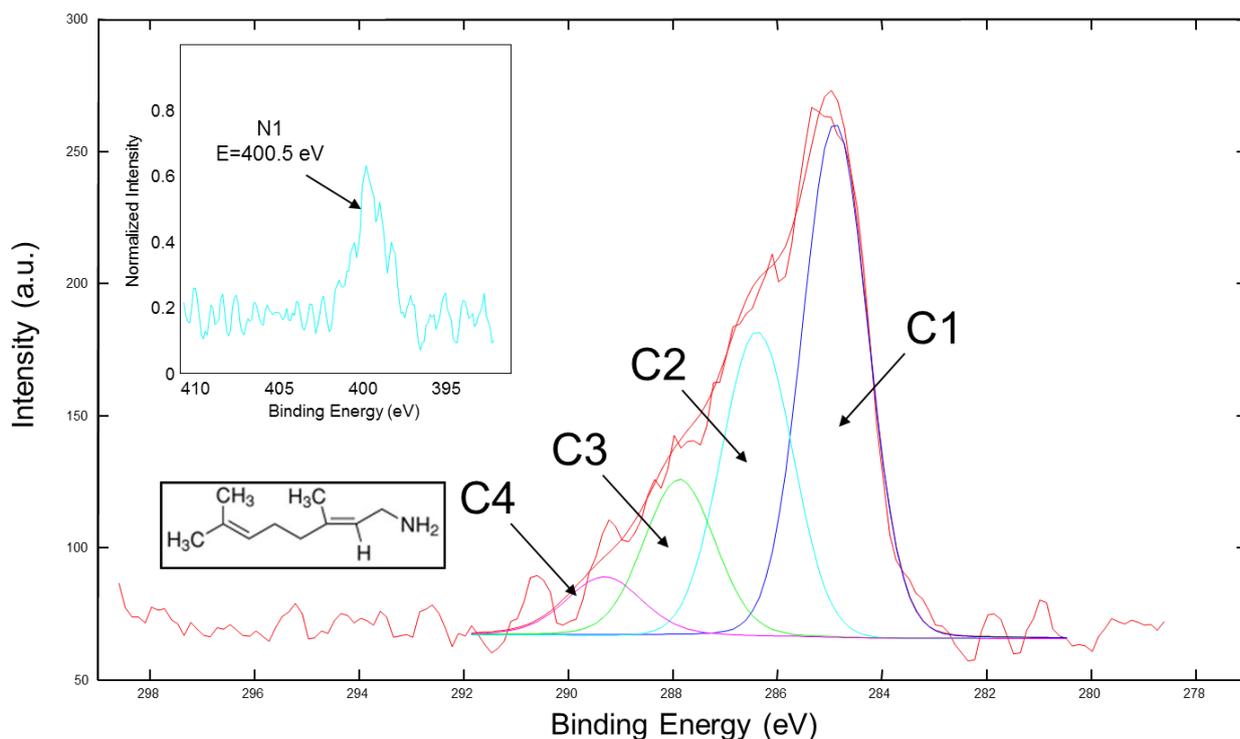


Figure III.25 : Spectres XPS C1s d'un échantillon de PP activé par un plasma froid d'hélium et fonctionnalisé par le dépôt de couches minces de T3

Le dépôt de couches minces de géranylamine est bien effectif mais semble réagir constamment avec le milieu environnant de façon significative. Ceci a déjà été montré lors de l'étude sur le vieillissement des surfaces, où la détérioration du dépôt engendrait de fortes variations de la mouillabilité de la surface (III.1.3 de ce chapitre).

Les analyses XPS ont permis de confirmer les mesures et calculs réalisés par goniométrie. L'activation de la surface de polypropylène par un plasma froid d'hélium permet de fixer de façon homogène les molécules amphiphiles relatives aux traitements T1, T2 et T3 et permettant de fonctionnaliser la surface d'étude.

III.2.3) Caractérisation des charges en surfaces des surfaces traitées

Des analyses en zêta potentiel ont été réalisés sur les traitements T1, T2 et T3 réalisés à la surface des supports de PP activés sur la même gamme de pH : 3, 4, 5,5, 7,4 et 9.6.

Afin de s'assurer que les supports ne subissent pas de modification chimique sous l'effet des différents microfluidiques tamponnés, des mesures en pH croissants et décroissants

ont été réalisées. La figure III.26 présente les graphiques correspondant aux mesures réalisées sur les supports de PP témoin et fonctionnalisés T1, T2 et T3.

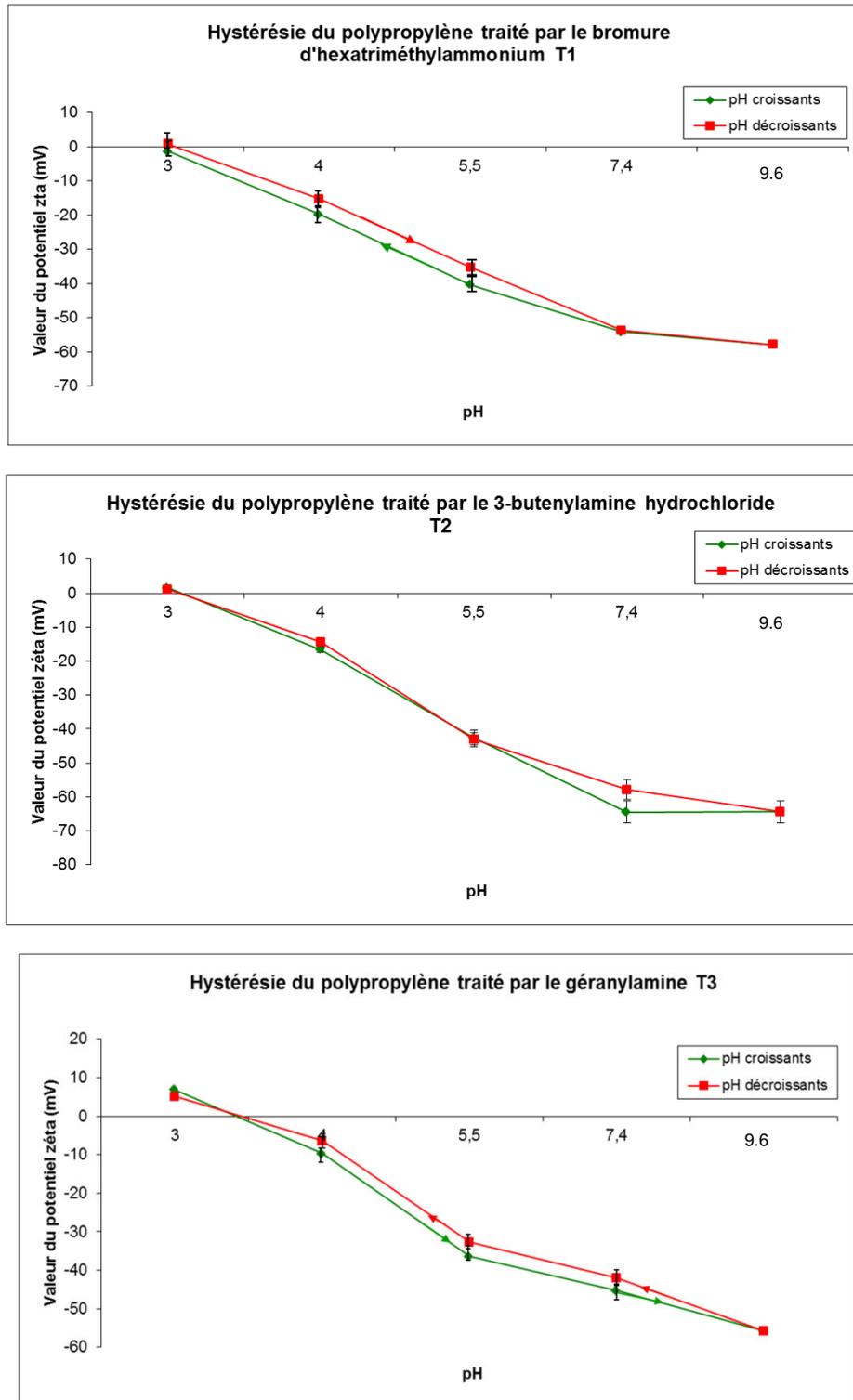


Figure III.26 : Evaluation de l'hystérésis des différents supports de PP témoin et traités selon les conditions optimales correspondant aux traitements T1, T2 et T3 en fonction du pH ($T=24^{\circ}\text{C}$)

Les supports traités par T1, T2 et T3 présentent chacun des courbes de pH croissants et pH décroissants quasiment superposables. Les supports traités ne présentent donc pas d'hystérésis sous l'effet d'une modification ou d'une déformation du dépôt de couches minces fonctionnelles sous l'effet des variations de pH qu'ils subissent lors de l'analyse et la mesure du potentiel zêta des charges en surfaces.

Le graphique de la figure III.27 présente l'évolution des valeurs du potentiel zêta ζ en fonction du pH réalisé sur la moyenne des valeurs du potentiel zêta en pH croissant et décroissant.

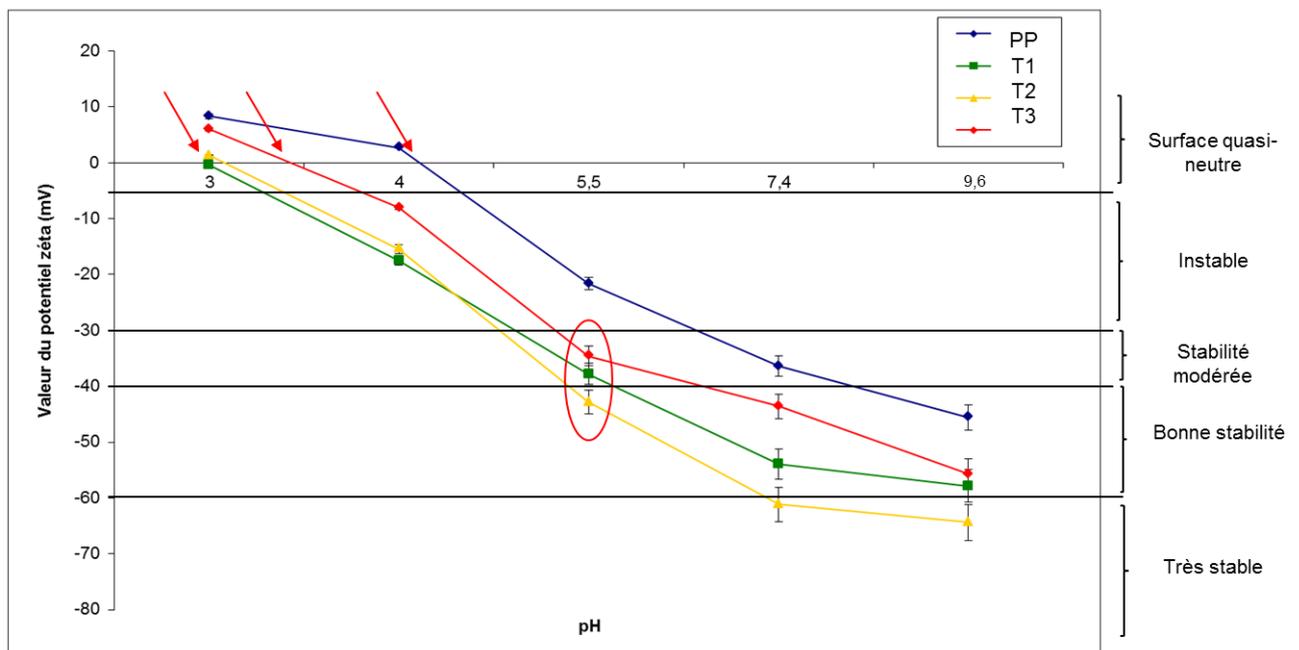


Figure III.27 : Evaluation du potentiel zêta des couches traitées en fonction du pH ($T=23^{\circ}\text{C}$)

Dans un premier temps, nous constatons que les courbes ne présentent pas de différence notable. La valeur du potentiel zêta étant comprise entre 10mV et -65mV. Le support de polypropylène brut et le support T3 présentent néanmoins des valeurs de potentiel zêta plus élevées à $\text{pH}=3$, 7.33mV et 5.11mV respectivement, que pour les supports T1 et T2. Ceci s'explique par le fait que les supports PP et T3 ne présentent initialement pas de charges en surface, contrairement aux supports T1 et T3 dont les groupements chargés ($\text{N}(\text{CH}_3)_3^+\text{Br}^-$ et NH_2^+Cl^-) réagissent avec le milieu fluide. Ils ont donc des valeurs de potentiel zêta plus faibles : 0.71mV pour T1 et 1.1mV pour T2.

En augmentant la valeur du pH à 4, les valeurs des potentiels zêtas de chacun des supports traités deviennent négatives, exceptés pour le support PP dont la surface reste quasiment neutre en charges. Nous obtenons ainsi la valeur du potentiel isoélectrique pI des traitements. Celui du support de PP brut n'est obtenu qu'après un pH de 5.5. Le tableau III.11 répertorie la valeur du pI de PP, T1, T2, T3 et la valeur moyenne du pI d'un anticorps.

| Echantillon | Potentiel isoélectrique pI (mV) |
|-------------|---------------------------------|
| PP | 4,25 |
| T1 | 3 |
| T2 | 3,1 |
| T3 | 3,4 |
| Anticorps | ~5 |

Tableau III.11 : Valeur du potentiel isoélectrique de chaque support PP, T1, T2, T3 et d'un anticorps

Remarquons que la valeur du potentiel isoélectrique de l'anticorps est supérieure à celui correspondant aux supports traités. Nous pouvons donc penser que si les supports T1, T2 et T3 se stabilisent à partir de pH=5, la bioadhésion de l'anticorps de capture sera favorisée.

Lorsque le pH de la solution microfluidique est de 5.5, nous pouvons voir que le support de PP brut ne s'est toujours pas stabilisé. En revanche les supports T1 et T3 ont alors des valeurs de potentiel zêta suffisantes, -34.6mV et -37.8mV respectivement, pour être en zone de stabilité modérée. Le support ayant subi le traitement T2 possède une valeur ζ de -42.9mV qui lui permet d'avoir une meilleure stabilité de charge en surface à pH équivalent.

La majorité du protocole de détection immunoenzymatique ELISA se déroule au pH 7.4 et 9.6, particulièrement dans notre cas puisqu'il s'agit des pH d'enduction des anticorps des capture en fonction de la protéine considérée. Il est donc essentiel que la surface des supports traités soit stable à ces pH afin de s'assurer que les anticorps de capture et les agents pathogènes ne seront pas perturbés par un échange constant de charges ne permettant pas leur fixation.

Sur la figure III.27, nous pouvons voir que pour un pH=7.4, les supports T1 et T2 se sont très bien stabilisés ($\zeta_{T1} = -53.9\text{mV}$ et $\zeta_{T2} = -61.2\text{mV}$) tandis qu'il faut que le support T3 ne se situe qu'au début de zone de bonne stabilité ($\zeta_{T3} = -43.6\text{mV}$). Il sera donc nécessaire de tenir donc de ce résultat lors de l'encrage de l'anticorps de capture à ce pH. Cette différence peut-être dû au fait que la fonctionnalisation réalisée avec le géranylamine ne soit pas stable, comme nous avons pu le voir précédemment.

Néanmoins, lorsque le pH atteint la valeur de 9.6, les valeurs du potentiel zêta des traitements T1 et T3 sont très proches, -55.8mV et -57.8mV respectivement ; le support de polypropylène non traité possède également une valeur $\zeta_{PP} = -45.6\text{mV}$. Ces valeurs leur confèrent une bonne stabilité des charges en surface. Notons que le support T2 a une valeur de $\zeta_{T2} = -64.3\text{mV}$ qui lui permet d'être extrêmement stable à pH=9.6.

En conclusion, nous pouvons dire que les supports traités T1, T2 et T3 se stabilisent plus rapidement et sont chargés négativement à partir de pH=5.5. Le dépôt de couches affectant le comportement des réglettes de polypropylène de façon positive, il est attendu que les évaluations des protocoles ELISA rendent compte de ce phénomène et donnent lieu à de meilleurs résultats en utilisant les surfaces modifiées que le polypropylène non traité.

III.2.4) Caractérisation topographique des surfaces traitées

Afin d'évaluer la topographie des dépôts de couches minces réalisés par les traitements T1, T2 et T3 sur les supports de polypropylène activé par plasma d'hélium, les surfaces ont été analysées par microscopie électronique à balayage et à force atomique dans les conditions optimales d'activation et de fonctionnalisation.

III.2.4.1) Analyse de la surface de chaque dépôt de couches minces par microscopie électronique à balayage

La microscopie électronique à balayage (MEB) permet d'évaluer l'homogénéité et la morphologie des dépôts réalisés. Cette technique nous a également permis d'obtenir les spectres EDX (figure III.28) correspondant aux images prises après métallisation au palladium des surfaces traitées (figure III.29).

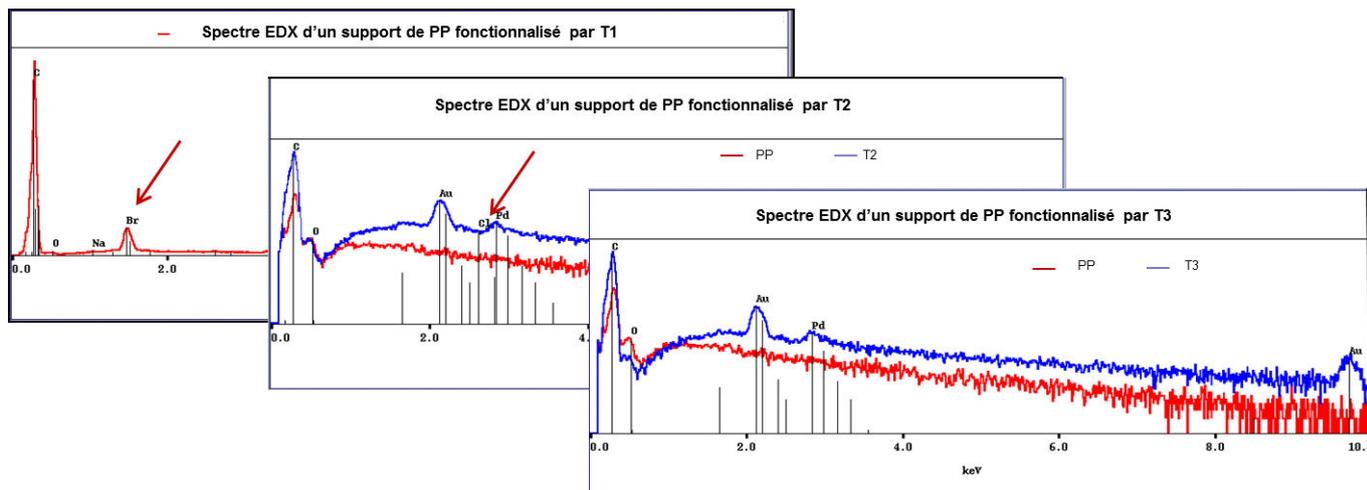


Figure III.28 : Spectres EDX obtenus sur les supports de PP traités par T1, T2 et T3

Les spectres EDX des surfaces des supports de PP fonctionnalisés présentent un pic correspondant au carbone plus important que sur la surface du PP témoin et dû à aux atomes de carbone présents dans les chaînes des molécules de fonctionnalisation. Le pic relatif à l'oxygène présent dans la matrice du support brut apparaît vers 0,5 keV.

La surface des supports de polypropylène fonctionnalisé par le traitement T1 (bromure d'hexatriméthylammonium) présente sur son spectre EDX un pic particulier vers 1,55 keV propre à l'atome de brome et confirmant la présence de la molécule tensioactive à la surface du PP. Il en va de même pour le traitement T2 (hydrochlorure de 3 buten-1-amine) ; un pic à 2.65eV correspondant au chlore est présent sur le spectre EDX.

Les figures III.29, 30, 31 sont les images obtenues par microscopie à balayage et correspondent aux surfaces des supports de PP activé par plasma d'hélium ($P=60W$, $d=100\text{sccm}$, $t=60\text{s}$) et fonctionnalisés par un dépôt de couches minces dans les conditions optimales des traitements T1 (1mM, $t=12\text{h}$), T2 (1mM, $t=5\text{h}$) et T3 (1.5mM, $t=5\text{h}$).

Sur la figure III.29 (à gauche), nous pouvons observer la répartition de T1 à la surface du support de PP à un grossissement de x500. La surface semble homogène en rugosité et en répartition.

Les agrégats blancs présents à la surface ont été observés à un grossissement de x2000 (à droite). On constate que les agrégats micellaires se sont ramifiés et parfois regroupaient autour d'un cœur. En moyenne, les cœurs ont une taille de $4\mu\text{m}$ et les branches ont une taille de $6\mu\text{m}$ pouvant atteindre $8\mu\text{m}$. On peut penser que les anticorps se fixeront sur ces ramifications.

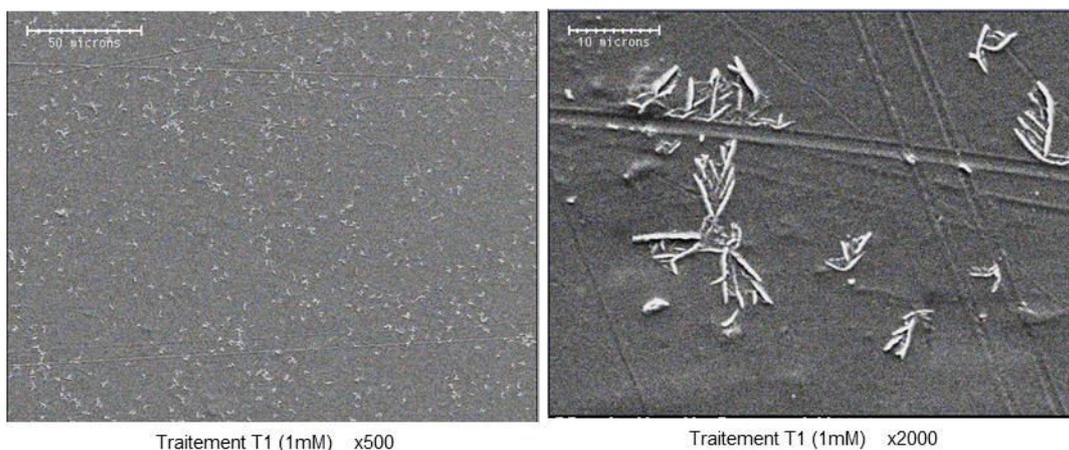


Figure III.29 : Images MEB de la surface des supports de PP traités par T1 (1mM, 12h) à un grossissement de x500 et de x2000

Le traitement T2 présente sur la figure III.30 (à gauche) une surface uniforme légèrement pixélisée et quelques agrégats sphériques. L'image MEB réalisée à un grossissement de x1000 montre que la surface est grainée d'agrégats de taille moyenne située autour de $1.6\mu\text{m}$. Les sphères de tailles plus importantes mesurent quant à elles jusqu'à $4\mu\text{m}$. Elles peuvent être dues à une concentration en hydrochlorure de 3-buten-1-amine plus importante à certains endroits de la surface du support de détection. Il serait peut-être nécessaire de souffler à l'air comprimé la surface après immersion pour éviter la présence de ces agrégats.

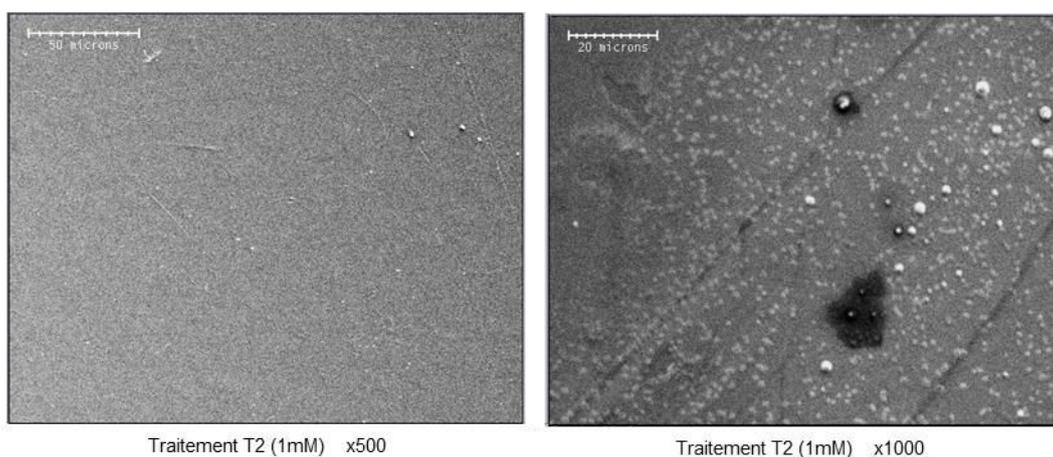


Figure III.30 : Images MEB de la surface des supports de PP traités par T2 (1mM, 5h) à un grossissement de x500 et de x1000

La figure III.31 présente les images MEB obtenues à partir de surfaces de polypropylène traitées par T3 à des grossissements de x500 (à gauche) et x1000 (à droite).

Bien que la surface de polypropylène semble recouverte uniformément par le dépôt de couches minces T3, elle présente des agrégats de formes diverses et variées pouvant être dus à un souci de stabilisation de la molécule à la surface du polymère.

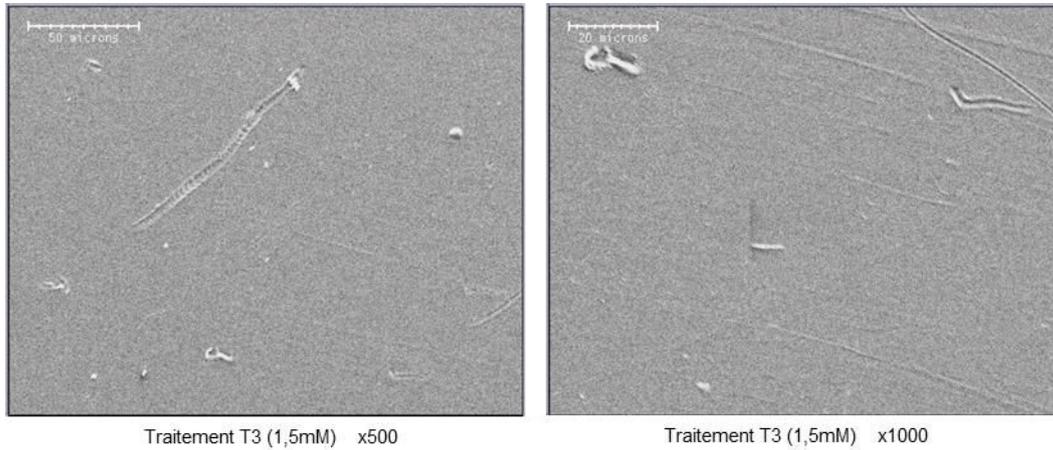


Figure III.31 : Images MEB de la surface des supports de PP traités par T3 (1.5mM, 5h) à un grossissement de x500 et de x1000

Les formes sphériques ont une taille moyenne de $5\mu\text{m}$ tandis que les formes tubulaires et ramifiées peuvent atteindre une taille de $12\mu\text{m}$.

Les analyses réalisées en microscopie électronique à balayage nous ont permis de confirmer la présence des dépôts de couches de chaque traitement T1, T2 et T3. Elles sont en réparties de façons uniforme et homogène à la surface du support. Les traitements T1 et T2 présentent à quant à eux des agrégats superficiels pouvant favoriser l'accroche des anticorps de détection à considérer.

III.2.4.2) Analyse de la surface de chaque dépôt de couches minces par microscopie à force atomique

Les analyses réalisées en microscopie à force atomique vont permettre de rendre mieux compte de la répartition et de la taille de ces agrégats. Les échantillons ont été réalisés en même temps et dans les mêmes conditions que ceux analysés par microscopie électronique à balayage, soit un plasma froid d'hélium ($P=60\text{W}$, $d=100\text{sccm}$, $t=60\text{s}$) et les dépôts de couches minces de T& (1mM , 12h), T2 (1mM , 5h) et T3 (1.5mM , 5h).

La figure III.32 montre les images AFM 2D et 3D de la surface d'un support de polypropylène traité par T1 sur une aire de $10\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$. L'image AFM 2D est en accord avec l'image MEB et présente une surface homogène possédant des agrégats d'un diamètre moyen de 70nm. L'image AFM 3D, à droite sur la figure III.32 nous permet d'accéder à la valeur de la hauteur moyenne se situant à 10nm ainsi qu'à la rugosité de surface moyenne de 3.2nm. Le traitement T1 a permis de doubler la rugosité de surface du support de polypropylène brut qui se situe à 1.5nm.

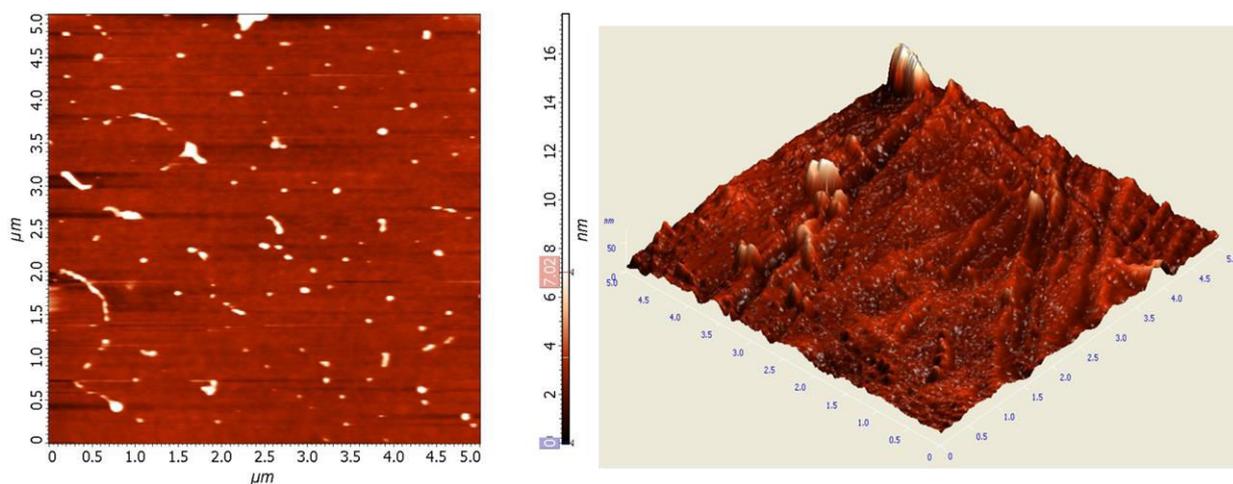


Figure III.32 : Images AFM 2D et 3D des surfaces des supports de PP traités T1

Les images AFM 2D et 3D de la surface d'un support de PP après dépôt de couches minces de T2 sont présentées dans la figure III.33.

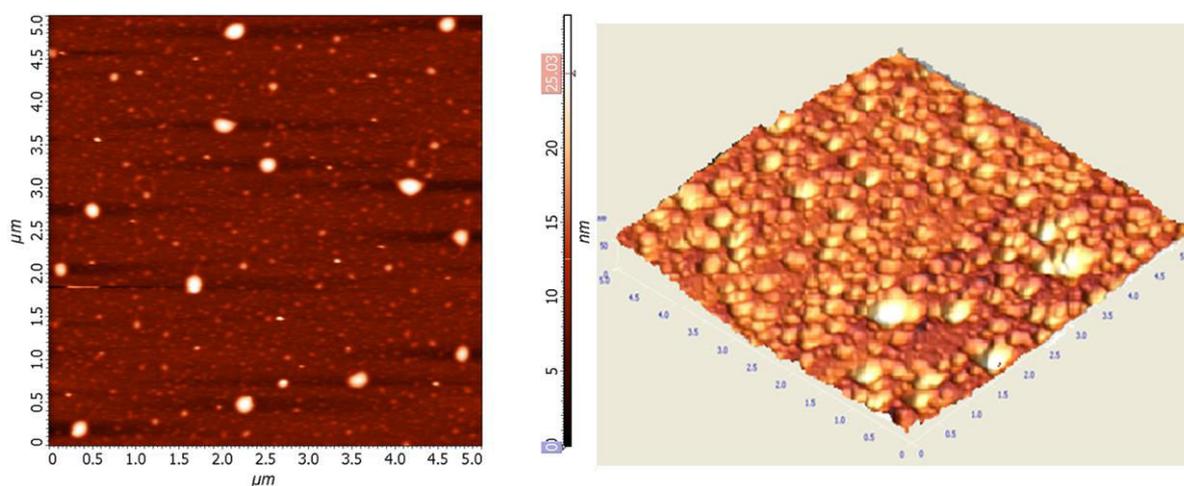


Figure III.33 : Images AFM 2D et 3D des surfaces des supports de PP traités T2

Tout comme lors des analyses réalisées en microscopie électronique à balayage, l'image 2D (à gauche) montre une surface homogène majoritairement recouverte d'agrégats de petites tailles et dont le diamètre est moyenné à 70nm. Nous observons également des agrégats de taille plus importante ayant un diamètre moyen de 150nm. L'image 3D (à droite) présente une surface uniforme dont la hauteur moyenne est de 45nm et la rugosité de surface moyenne est de 4.5nm. Contrairement au traitement T1, la couche mince de T2 n'a pas d'irrégularité aussi marquée. Ceci peut être dû à la longueur de la chaîne carbonée qui dans le cas de T1 peut se recroqueviller sur elle-même ou se fixer à partir de plusieurs atome de carbone sur les radicaux libres et s'étendre à la surface du polymère.

Deux échantillons de PP activés par un plasma froid d'hélium et immergés en solution eau : éthanol, 90 :10 de T3 ont été réalisés dans les mêmes conditions et en même temps. L'un a été analysé par microscopie électronique à balayage, le second en microscopie à force atomique.

Les images issues de MEB présentées une surface homogène mais seulement marquée par la présence disparate d'agrégats. Comme le montre l'image AFM 2D de la figure III.34, la surface est également homogène mais présente plusieurs agrégats de forme sphérique et de répartition relativement régulière. Leur diamètre moyen est approximativement de 200nm.

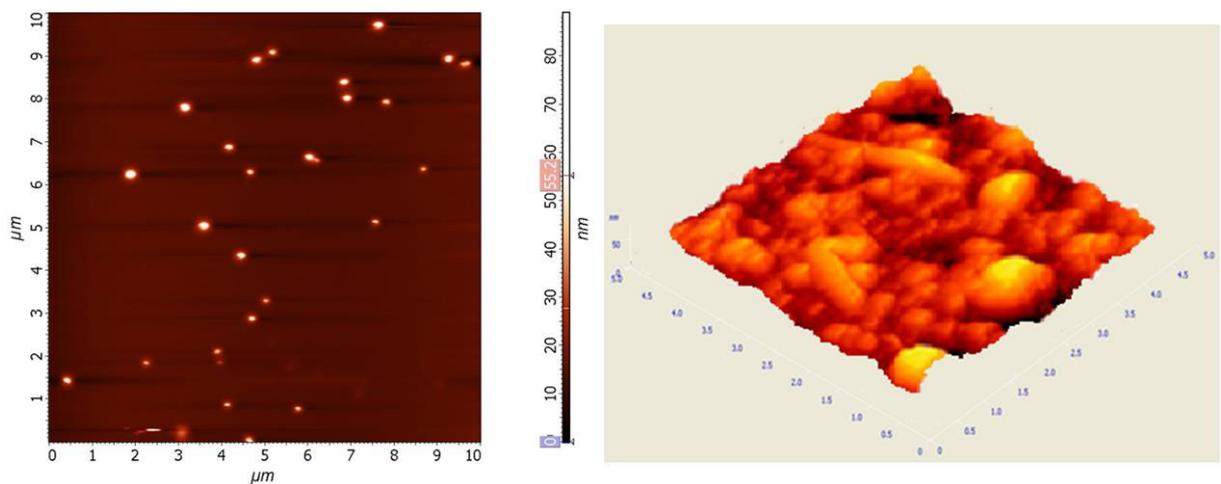


Figure III.34 : Images AFM 2D et 3D des surfaces des supports de PP traités T3

Par ailleurs, l'image 3D (à gauche) nous permet d'obtenir une hauteur moyenne comprise entre 15nm et 20nm, pour les reliefs les plus importants, et une rugosité de surface moyenne de 2.6nm. Cette disparité entre la partie lisse de la surface et la formation d'agrégats peut être la conséquence de l'instabilité du traitement. Nous avons en effet constaté que le

dépôt de couches minces de T3 était difficilement reproductible et instable dans le temps. Il serait donc possible que sous un effet de stress, la molécule de géranylamine réagisse dans un premier temps activement avec les radicaux libres obtenus après décharge à partir de ces deux doubles liaisons carbone-carbone mais également qu'elle ne se fixe qu'à travers une seule accroche et que la molécule se replie sur elle-même. Le géranylamine réagit avec l'eau en fonction de sa conformation initiale et peut donner lieu à une molécule possédant un cycle à six côtés avec une double liaison C-C ou un cycle ouvert conservant les deux doubles liaisons C-C initiales. Cette différence peut être à l'origine du taux d'atome d'oxygène relevé lors des analyses XPS et des différences notables visibles sur la surface par MEB et AFM.

Les analyses topographiques de la surface des supports de polypropylène recouvert d'un dépôt de couches minces confirment la stabilité et l'uniformité préalablement remarquée des dépôts de T1 et T2. L'homogénéité de leur surface et la rugosité de surface moyenne en font de bon candidat pouvant augmenter la bioadhésion des biomolécules d'intérêts.

IV . La stérilisation des supports fonctionnalisés

En milieu hospitalier, les instruments utilisés aussi bien pour diagnostiquer un patient que pour le soigner doivent répondre à des normes de sécurité et d'hygiène particulières comme la stérilisation et la désinfection des produits considérés. Celles-ci doivent prévenir tous risques d'infections possibles auxquelles le patient pourrait être exposé, telle qu'une contamination bactériologique ou une infection nosocomiale [21]. Elles permettent d'éliminer ou détruire toutes formes de microorganismes ou agents pathogènes par un traitement physique et/ou chimiques des appareils biomédicaux [23].

La stérilisation est donc un point important sur la finalisation des appareils et produits pharmaceutiques ou médicaux. Il est également nécessaire de choisir le mode de stérilisation le plus adéquate afin de ne pas dégrader les instruments ou les protéines utilisés [22,24].

Dans un premier temps, les différentes techniques de stérilisation les plus utilisées seront exposées en comparant leurs avantages et leurs inconvénients. Par la suite, l'influence d'une stérilisation à l'oxyde d'éthylène sur les surfaces traitées sera présentée aux travers d'analyses goniométriques et d'application au système de détection ELISA.

IV.1) Les différents modes de stérilisation

Il existe de nombreuses voies de stérilisation aussi bien physique que chimique. Elles peuvent être répertoriées en quatre familles : les procédés thermiques, les radiations, les méthodes chimiques et les gaz plasmagènes [22]. Le tableau ?? répertorie les avantages et inconvénients de ces techniques de stérilisation [21,23,25,26,27].

| Méthodes de stérilisation | Avantages | Inconvénients |
|--|---|--|
| Thermiques (vapeur, chauffage) | non-toxique, peu coûteux, contrôlé, rapide | non adaptable à tous les matériaux |
| Radiations (UV, IR, γ) | contrôlé, sans résidus, adaptable, | peut détériorer le matériaux ou la chimie de surface, coûteux |
| Chimiques (EtO, H ₂ O ₂ , alcool...) | adaptable, peu coûteux, bonne pénétration, forte réactivité, rapide | toxique, peut dénaturer certaines protéines ou agents chimiques |
| Gaz plasmagènes | simple, non-toxique, rapide, adaptable | nécessité de posséder des filtres à air adaptés, possibilité de réaction avec les molécules chimiques ou biologiques |

Tableau III.12 : Avantages et inconvénients majeurs des différentes techniques de stérilisation

En regard des avantages et inconvénients que possèdent les différentes méthodes de stérilisations, il est donc nécessaire de bien choisir et d'adapter le traitement en fonction des supports et des biomolécules mises en jeu.

L'enjeu étant de pouvoir stériliser de façon contrôlée et de ne pas altérer les dépôts de couches minces déposés sur les surfaces de polypropylène, tout en étant peu onéreux, les méthodes retenues dans le cadre de notre projet sont les radiations gamma et l'oxyde d'éthylène gazeux (EtO). En effet, ces techniques bien connues permettent de traiter une grande quantité de supports considérés en peu d'étapes, rapidement et à faible coût.

La partie qui suit concerne des essais de stérilisation réalisés sur des supports de détection, réalisée par la société ALCIS, afin d'évaluer l'influence de ce traitement sur la chimie de surface.

IV.2) Influence de la stérilisation sur les supports fonctionnalisés

IV.2.1) Les rayons gamma

Tout d'abord, une étude de stérilisation par irradiations de rayons gamma a été réalisée sur les réglettes de détection en polypropylène. Ceux-ci ont par la suite été testés par le CTTM en ELISA sandwich afin de voir si la stérilisation modifie ou non l'accroche des biomolécules d'intérêt et donc la détection des agents infectieux.

Suite à l'irradiation γ , les supports de polypropylène ont jauni et sont devenus plus fragiles, donc plus difficilement manipulables. Les rayons γ ont des effets à long terme après le traitement. Entre autre, ils entraînent, sur les polymères, des réactions de réticulation et la coupure des chaînes macromoléculaires donnant lieu à la formation de doubles liaisons pouvant émettre dans le visible (coloration jaune clair) et, comme dans notre cas, rendant le polymère cassant [28]. Par ailleurs, les résultats obtenus par le CTTM en ELISA sandwich ont été inexploitablement faibles puisque les valeurs des densités optiques obtenues sur les supports stérilisés étaient plus faibles que le support originel de polypropylène brut. Par ailleurs, les résultats n'étaient pas reproductibles.

Ces essais ont permis de confirmer les résultats observés dans la littérature et soulèvent le problème principal de la modification de la cristallinité du matériau, tout comme la modification des groupements chimiques présents en surface [25,29,30]. Nous avons donc décidé de tester la stérilisation par gaz d'éthylène oxyde.

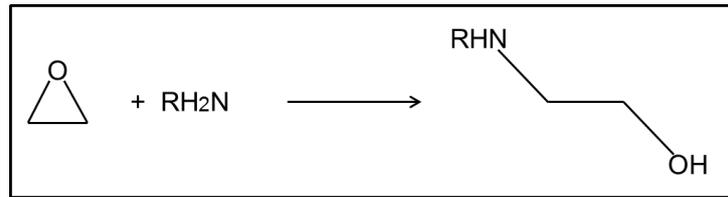
IV.2.2) Le gaz d'éthylène oxyde

L'éthylène oxyde (EtO) permet de détruire les bactéries éventuellement absorbées à la surface du matériel hospitalier et pouvant être responsable d'une infection. C'est un composé très réactif et n'entraînant pas la coloration des outils stérilisés, possédant des propriétés biocides et fongicides.

En temps normal, c'est-à-dire lorsque le gaz est mis en contact avec les molécules biologiques à stériliser, l'éthylène oxyde réagit avec les fonctions situées aux extrémités des enzymes sur les fonctions de types $-OH$, $-COOH$, $-SH$ et NH altérant ainsi les mécanismes microbiens. Cette alkylation est peu présente sur les matières plastiques, puisque bien que la réaction puisse se faire en bout de chaînes, ces dernières sont la plupart du temps bloquées par les additifs de polymérisation. Ainsi, nous pouvons nous attendre à ce que le PP non activé et non traité ne voit pas ses propriétés intrinsèques et de surface modifiées.

Dans notre cas, le polypropylène fonctionnalisé présente à sa surface des groupements de type $-NH$ qui lui confèrent son caractère hydrophile. Le gaz d'éthylène oxyde devrait donc

régir avec nos couches minces (équation 1) et modifier les propriétés de surface des supports de détection, tout en conservant leur caractère hydrophile (figure III.35).



Equation III.1 : Ouverture du cycle

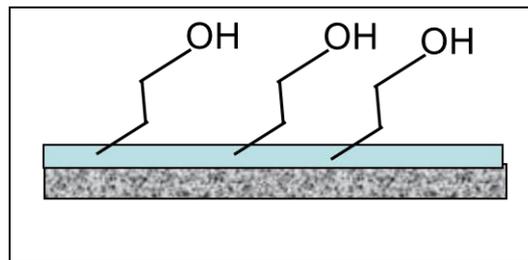


Figure III.35 : Suggestion de positionnement de l'oxyde d'éthylène sur un support hydrophile

Une série d'essais a donc été réalisée en utilisant la stérilisation à l'EtO sous forme gazeux. L'influence de cette technique de stérilisation sur les supports traités a tout d'abord été étudiée par analyse goniométrique. Les résultats des angles de contact d'eau ultra pure et des énergies de surface globale et polaire ainsi obtenus sont présentés sur les figures III.36 et III.37 pour des supports de PP non traités et fonctionnalisés. Dans le but de comprendre au mieux l'interaction entre l'éthylène oxyde et les traitements de surface, un échantillon de polypropylène activé par plasma d'hélium dans nos conditions de traitements a également été étudié avant et après stérilisation.

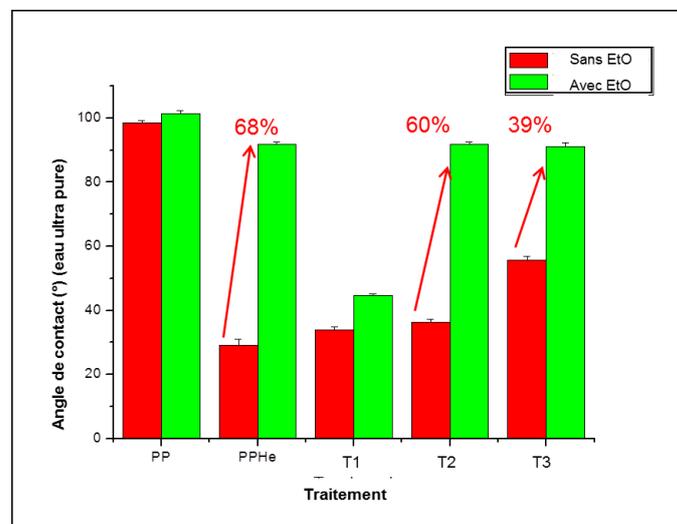


Figure III.36 : Valeurs des angles relevés à l'eau ultra-pure avant et après stérilisation à l'oxyde d'éthylène

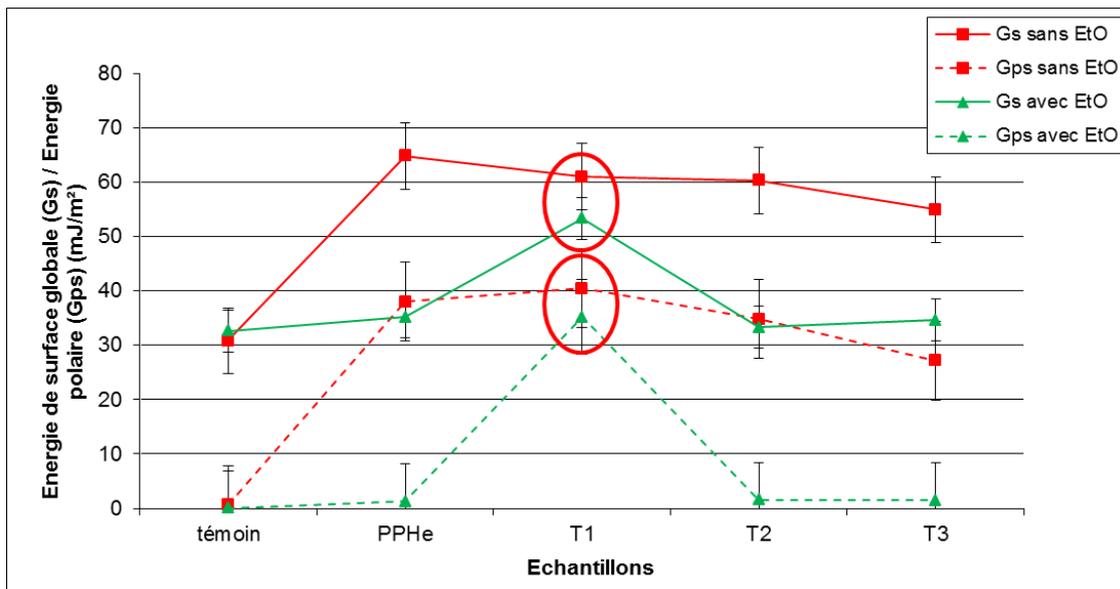


Figure III.37 : Evaluation de l'énergie de surface globale et polaire pour chaque échantillon avant et après stérilisation

Les valeurs des angles de contact mesurées présentent des valeurs très différentes selon que le support ait subi la stérilisation ou non, excepté pour le support témoin et celui traité par le bromure d'hexatriméthylammonium. En effet, les valeurs des angles de contact sont toutes nettement plus importantes lorsque le support est stérilisé sauf pour les deux cas particulier exposé précédemment. Les supports dont le caractère était hydrophile après soit l'activation au plasma d'hélium, soit après les traitements T2 et T3, sont à nouveau très hydrophobes après stérilisation. Nous pouvons constater que les valeurs des angles de contact pour les supports T2 et T3 présente une augmentation du caractère hydrophobe de 60% et 39%, respectivement. Cet accroissement de l'hydrophobie a pour conséquence de diminuer la valeur de l'énergie de surface globale puisque l'énergie de surface polaire est quasiment nulle. En effet, le support activé à l'hélium, par exemple, a une énergie de surface polaire qui passe de 38mJ/m² à 1,3mJ/m², son caractère hydrophile est donc bien moins important qu'avant stérilisation.

Aucune modification pour le support témoin PP dont les valeurs d'angle de contact et d'énergie de surface, globale et polaire, restent inchangées avant et après traitement. Cas particulier pour le support traité par le bromure d'hexatriméthylammonium dont les valeurs restent proches de celles obtenues avant stérilisation. Comme prévu, la stérilisation n'a donc pas effet sur le support de polypropylène brut. En revanche, il n'y en a pas non plus sur la chimie de surface du support fonctionnalisé T1.

Concernant le dépôt de couches minces réalisé avec le bromure d'hexatriméthylammonium, la faible modification des valeurs des énergies de surface obtenues montrent que le support à d'une part réagit avec l'oxyde d'éthylène mais que cela n'a pas entraîné de modification notable de la surface pouvant compromettre la détection des agents pathogènes. Comme prévu, sa surface conserve un caractère hydrophile.

Une explication possible aux différences observées entre les supports témoin et celui traité par l'hexatriméthylammonium par rapport aux autres traitements est la présence des charges en surface et la longueur de chaîne carbonée qui influencerait l'adsorption, ou non, ainsi que l'orientation de l'oxyde d'éthylène.

Il serait intéressant d'effectuer à nouveau la même expérience en associant des analyses de caractérisation topographique et chimique, qui n'ont pu ici être réalisées. Le procédé de stérilisation, dans le cadre de notre convention, n'a pu être mis en place que le dernier trimestre.

IV.3) Influence de la stérilisation sur la détection de la protéine prion recombinante humaine

Dans le but d'évaluer l'influence de cette modification de surface sur la capacité de détection des supports traités, des tests ELISA sandwich ont été réalisés sur la protéine Prion humaine recombinante, c'est-à-dire reproduire au sein d'une cellule programmée. La figure III.38 présente les valeurs des densités optiques obtenues pour différentes concentrations en protéine Prion recombinante humaine pour des échantillons témoin et traités puis stérilisés.

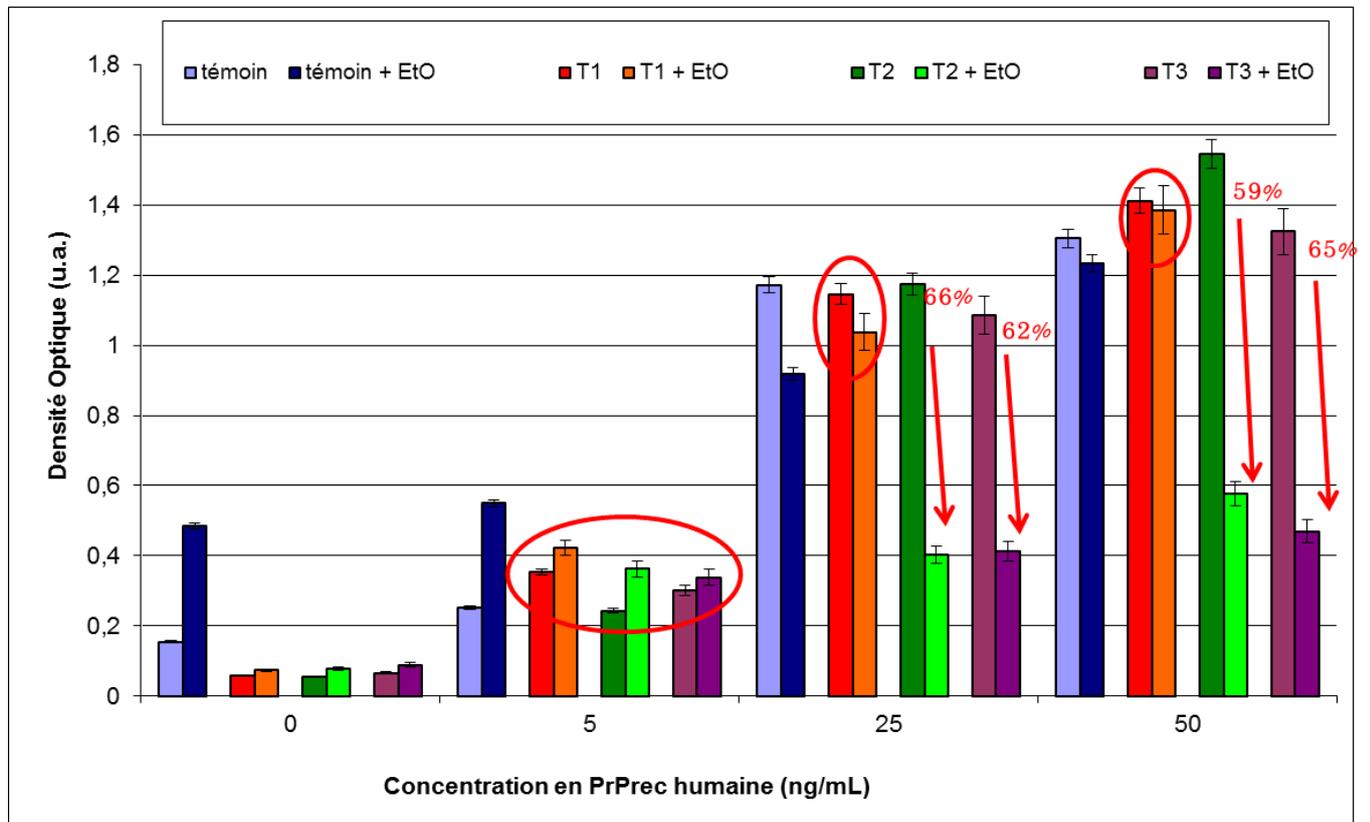


Figure III.38 : Evaluation de la détection de la protéine Prion recombinante humaine par ELISA sandwich avant et après traitement à l'oxyde d'éthylène

Les résultats obtenus dans le cadre de la détection de la protéine Prion recombinante concordent avec ceux obtenus dans l'étude goniométrique précédemment décrite. En effet, en comparant les valeurs des densités optiques obtenues sur les supports avant et après stérilisation, on constate que la stérilisation affecte la chimie de surface des supports traités par le 3-butenylamine hydrochloride et le géranylamine. Ils sont moins sensibles après stérilisation, les valeurs de détection diminuant de 60%, en moyenne. En revanche, à faible concentration (5ng/mL), et considérant la valeur du bruit de fond pour une concentration en PrPrec nulle, la stérilisation ne semble pas empêcher la détection de la protéine. La conformation des biomolécules d'intérêts dépendant de leur milieu et de leur agrégation en fonction de la concentration, le caractère hydrophobe ou hydrophile ne semble pas avoir d'influence à faible concentration.

Les résultats les plus intéressants concernent le support traité avec le bromure d'hexatriméthylammonium puisque la stérilisation n'affecte pas sa surface. Les valeurs des densités optiques relatives à une concentration de 50ng/mL, par exemple, restent très proches : 1,412 et 1,386 u.a., avant et après stérilisation respectivement. Par ailleurs, la

sensibilité de la détection est également augmentée puisque le bruit de fond est proportionnellement plus faible par rapport au support de PP témoin. En effet, le rapport entre T1 et le témoin stérilisés est 3 fois supérieur à celui entre T1 et le témoin non stérilisés.

La stérilisation du support fonctionnalisé par le bromure d'hexatriméthylammonium permet donc de détecter la protéine quel qu'en soit la concentration tout en réduisant le bruit de fond et en augmentant ainsi le seuil de détection.

Ainsi, et bien que d'autres tests complémentaires soient nécessaire quant à la répétabilité de l'expérience, le dépôt de couches minces de bromure d'hexatriméthylammonium semble être le plus approprié à la détection des agents pathogènes ; sa surface n'étant pas affectée par la stérilisation à l'oxyde d'éthylène et son hydrophilie conservée.

Par ailleurs, il serait intéressant de tester d'autres modes de stérilisation mieux adaptés aux types de dépôt de couches minces considérés sans altérer les propriétés intrinsèques du polypropylène. Deux techniques semblent répondre à ces attentes : la stérilisation par chaleur sèche et par voie plasma [25,26,27].

V. Conclusion

Les diverses méthodes de caractérisation et d'analyses physico-chimique des surfaces des supports de PP activé par plasma froid d'hélium et traité par un dépôt de couches minces ont permis de confirmer que les surfaces obtenues après traitement présentées une augmentation de leur caractère hydrophile et donc de leur énergie polaire de surface, que les dépôts de couches sont homogènes et stables dans le temps. Les rugosités ainsi obtenues vont permettre de mieux fixer les biomolécules d'intérêt lors de la détection des protéines infectieuses correspondant à chaque maladie neurodégénératives.

A ce stade, les surfaces des supports de PP traitées par les molécules de bromure d'hexatriméthylammonium (T1) et de 3-butenylamine (T2) semblent être de bons candidats.

Reste toutefois à affiner les expériences menées sur le mode de stérilisation des supports afin de déterminer le mode d'interaction chimique entre les dépôts de couches minces et le gaz d'éthylène oxyde. Il est possible d'envisager une stérilisation par plasma froid qui fixerait les extrémités des chaînes des couches minces et n'altérerait pas leurs fonctionnalités.

VI . Références bibliographiques

I . Introduction

- [1] Zuwei M, Zhengwei M, Changyou G. Surface modification and property analysis of biomedical polymers used for tissue engineering. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* (2007) ; 60 (2) ; 137-157.
- [2] Ratner BD. Surface modification of polymers: chemical, biological and surface analytical challenges. *Biosensors and Bioelectronics* (1995) ; 10 (9-10) ; 797-804.
- [3] Denes FS, Manolache S. Macromolecular plasma-chemistry: an emerging field of polymer science. *Progress in Polymer Science* (2004) ; 29 (8) ; 815-885.
- [4] Rühle J, Biesalski M. Biocompatibility of Microsystems. *Comprehensive Microsystems* (2008) ; Chapter 1.05 ; 107-130.
- [5] Poncin-Epaillard F, Legeay G. Why is the modification of polymer surfaces with electromagnetic discharge so advantageous? *Annales de Chimie Science des Matériaux* (2003) ; 28 (3) ; 55-66.
- [6] Heinen E, Legeay G, Poncin-Epaillard F, Zorzi W, Elmoualij B, Legeais V, Rouault E. Novel supports, in particular for immunodetection of molecules of interest. WO/2006/105622, October 12, 2006.
- [7] Keller M, Ritter A, Reimann P, Thommen V, Fischer A, Hegemann D. Comparative study of plasma-induced and wet-chemical cleaning of synthetic fibers. *Surface and Coatings Technology* (2005) ; 200 (1-4) ; 1045-1050.
- [8] Elias CN, Oshida Y, Cavalcanti Lima JH, Muller CA. [Relationship between surface properties \(roughness, wettability and morphology\) of titanium and dental implant removal torque](#). *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* (2008) ; 1 (3) ; 234-242.
- [9] Tanii T, Hosaka T, Miyake T, Zhang GJ, Zako T, Funatsu T, Ohdomari I. Preferential immobilization of biomolecules on silicon microstructure array by means of electron beam lithography on organosilane self-assembled monolayer resist. *Applied Surface Science* (2004) ; 234 (1-4) ; 102-106.
- [10] Biebricher A, Paul A, Tinnefeld P, Götzhäuser A, Sauer M. Controlled three-dimensional immobilization of biomolecules on chemically patterned surfaces. *Journal of Biotechnology* (2004) ; 112 (1-2) ; 97-107.
- [11] Pykönen M, Silvaani H, Preston J, Fardim P, Toivakka M. Plasma activation induced changes in surface chemistry of pigment coating components. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* (2009) ; 352 (1-3) ; 103-112.

II . Modification des propriétés de surfaces des supports de polypropylène par plasma froid

- [12] Yang S, Gupta MC. Surface modification of polyethyleneterephthalate by an atmospheric-pressure plasma source. *Surface and Coatings Technology* (2004) ; 187 (2-3) ; 172-176.
- [13] Mozetic M. Discharge cleaning with hydrogen plasma. *Vacuum* (2001) ; 61 (2-4) ; 367-371.
- [14] Gadri RB, Roth JR, Montie TC, Kelly-Wintenberg K, Tsai PPY, Helfritsch DJ, Feldman P, Sherman DM, Karakaya F, Che Z. Sterilization and plasma processing of room temperature surfaces with a one atmosphere uniform glow discharge plasma (OAUGDP). *Surface and Coatings Technology* (2000) ; 131 (1-3) ; 528-541.
- [15] Chung YM, Jung MJ, Han JG, Lee MW, Kim YM. Atmospheric RF plasma effects on the film adhesion property. *Thin Solid Films* (2004) ; 447-448 ; 354-358.

- [16] Hegemann D, Brunner H, Oehr C. Plasma treatment of polymers for surface and adhesion improvement. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* (2003) ; 208 ; 281-286.
- [17] Bouderbala M, Hamzaoui S, Adnane M, Sharaoui T and Zerdali M. Etude de l'influence de la puissance de dépôt sur les propriétés électriques de films minces d'oxyde de zinc non dopé. *Revue des Energies Renouvelables* (2009) ; 12 (2) ; 249-256.
- [18] Vandencastele. Etude du rôle des espèces constitutives d'un plasma pour la fonctionnalisation de surface polymériques. Thèse (juin 2008)
- [19] Zana R. Micelles and vesicles. *Encyclopedia of Supramolecular Chemistry* (2004).
- [20] Mosquera V, Manuel del Rio J, Attwood D, Garcia M, Malcolm NJ, Prieto G, Suarez MJ and Sarmiento F. A study of aggregation behavior of hexatrimethylammonium bromide in aqueous solution. *Journal of Colloid and Interface Science* (1998) ; 206 ; 66-76.

IV. La stérilisation

- [21] Mendes GCC, Brandao TRS and Silva CLM. Ethylene oxide sterilization of medical devices : a review. *Am. Jour. Infect. Control* (2007) ; 35 ; 574-581.
- [22] Ansari IA and Datta K. An overview of sterilization methods for packaging materials used in aseptic packaging systems. *TransIChemE* (2003) ; 81 ; part C.
- [23] Rutala WA and Weber DJ. Infection control : the role of disinfection and sterilization. *Jour. Of Hospital Infection* (1999) ; 43 (sup.) ; 43-45.
- [24] Serbetci K, Kulacoglu H, Devay AO and Hasirci N. Effects of reesterilization on mechanical properties of polypropylene meshes. *The American Journal of Surgery* (2007) ; 194 ; 375-379.
- [25] Valdes-Diaz G, Rodriguez-Calvo S, Perez-Gramatges A, Rapado-Paneque M, Fernandez-Lima FA, Ponciano CR and da Silveira EF. Effects o gamma radiation on phase behaviour and critical micelle concentration of Triton X-100 aqueous solutions. *Jour. Of Colloid and Interface Science* (2007) ; 311 ; 253-261.
- [26] Baier RE, Meyer AE, Akers CK, Natiella JR, Meenaghan M and Carter JM. Degradative effects of conventional steam sterilization on biomedical surfaces. *Biomaterials* (1982) ; 3 ; 241-245.
- [27] Chen Z et al. Sterilization and plasma processing of room temperature surfaces with a one atmosphere uniform glow discharge plasma (OAUGDP). *Surface and Coating Technology* (2000) ; 131 ; 528-542.
- [28] Cambon S., Rivaton A. et Gardette JL. Mécanisme de dégradation d'un élastomère de type EPDM. *Polymer Degradation and Stability* 91 (2006) 136-143.
- [29] Jayabalan M, Nair PD and Sreenivasan K. Ageing of radation-sterilized polypropylene : changes in semicrystallinity. *Biomaterials* (1989) ; 10 ; 33-37.
- [30] Fleith S, Ponche A, bareille R, Amédée J and Nardin M. Effect of several sterilization techniques on homogeneous self assembled monolayers. *Colloids and Surface Biointerfaces* (2005) ; 44 ; 15-24.

Chapitre IV :

Evaluation de l'efficacité de la fonctionnalisation des supports de détection

*«Influence de la chimie de surface sur la détection des protéines antigéniques et
l'adhésion des biomolécules d'intérêt »*

I. Introduction

Ce chapitre est dédié à l'application des surfaces développées pour la détection des protéines pathologiques propres aux différentes maladies neurodégénératives étudiées dans ce projet de recherche. Par ailleurs, l'intérêt étant de mieux comprendre l'amélioration de la détection par l'étude des interactions entre la chimie de surface et les biomolécules mises en jeu, des analyses via le système ELISA et en microscopie confocale ont été réalisées.

Dans un premier temps, les résultats obtenus sur les antigènes concernés seront présentés pour chaque traitement élaborés et comparés au support témoin non traité. Dans un second temps, nous verrons les études menées afin de mieux comprendre comment et pourquoi les traitements augmentent le signal de détection tout en réduisant le bruit de fond relatif aux associations et fixations des biomolécules de façon non spécifique. Ainsi, les résultats obtenus par la méthode ELISA et par microscopie confocale permettront de répondre aux différences d'affinités des protéines et anticorps vis-à-vis des traitements de fonctionnalisation.

II . Application à la détection des protéines antigéniques par le système ELISA

Dans cette partie, les supports élaborés ont été testés sur trois molécules protéiques pathogènes : la protéine Prion, la protéine Tau et la protéine α -synucléine, responsable de la maladie de Creutzfeld-Jakob, Alzheimer et Parkinson, respectivement. Les expériences ont été réalisées en utilisant le système de détection ELISA sandwich. Chaque expérience met en comparaison les supports modifiés avec le support témoin, c'est-à-dire le support de polypropylène non traité. Les supports sont évalués selon trois critères : ils doivent suivre la loi de Beer-Lambert, c'est-à-dire que la densité optique doit évoluer dans le même sens que la concentration, réduire le bruit de fond lié à une adsorption non spécifique et permettre une détection à des concentrations les plus faibles possibles tout en augmentant le signal de détection.

Comme le rappelle le schéma de la figure IV.1, le système ELISA sandwich utilisé ici repose sur la capture en « sandwich » de l'antigène responsable de la maladie par un anticorps de capture et d'un anticorps de détection.

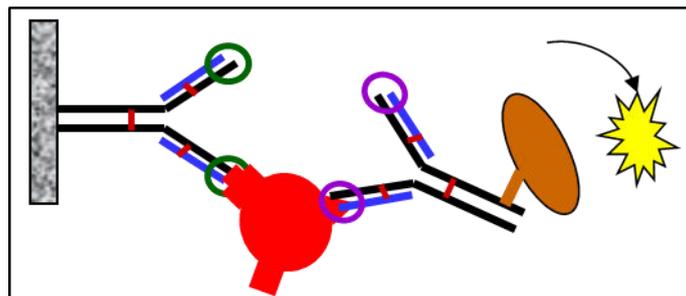


Figure IV.1 : Schéma du système de détection ELISA sandwich

Pour faciliter la discussion sur les analyses, les traitements réalisés par le bromure d'hexatriméthylammonium, le 3-butenylamine et le géranylamine, seront notés respectivement T1, T2 et T3 comme présenté sur la figure IV.2.

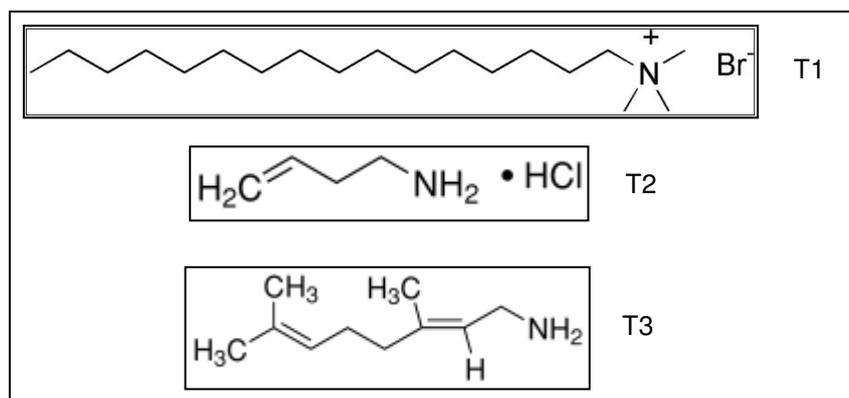


Figure IV.2 : Annotation des traitements où T1, T2 et T3 correspondent au bromure d'hexatriméthylammonium, au 3-butenylamine hydrochloride et au géranylamine

II.1) Evaluation de l'efficacité de la fonctionnalisation des supports sur la détection de la protéine Prion

Les premiers essais ont été réalisés sur une protéine Prion recombinante humaine notée PrPrechum, c'est-à-dire développée et purifiée de façon à comporter les principales fonctions biologiques propre à la protéine Prion infectieuse sans en porter pour autant le gène responsable de la maladie. Dans un second temps, les mêmes expériences ont été réalisées à partir de la protéine Prion dite PrP-DVE, soit directement prélevée sur les patients atteints de la maladie de Creutzfeld-Jacob par Dérivation Ventriculaire Externe.

II.1.1) Protéine Prion recombinante humaine

La figure IV.3 montre l'évolution de la densité optique obtenue pour les supports témoin et traités (T1, T2 et T3) en fonction d'une gamme de concentration croissante en protéine Prion recombinante humaine en présence de l'anticorps de capture Saf32 (10 µg/mL) et de l'anticorps de détection biotinylé 4F7biot (1 µg/mL). Les valeurs reportées correspondent à la moyenne de cinq expériences réalisées en même temps afin de s'assurer de la reproductibilité des résultats.

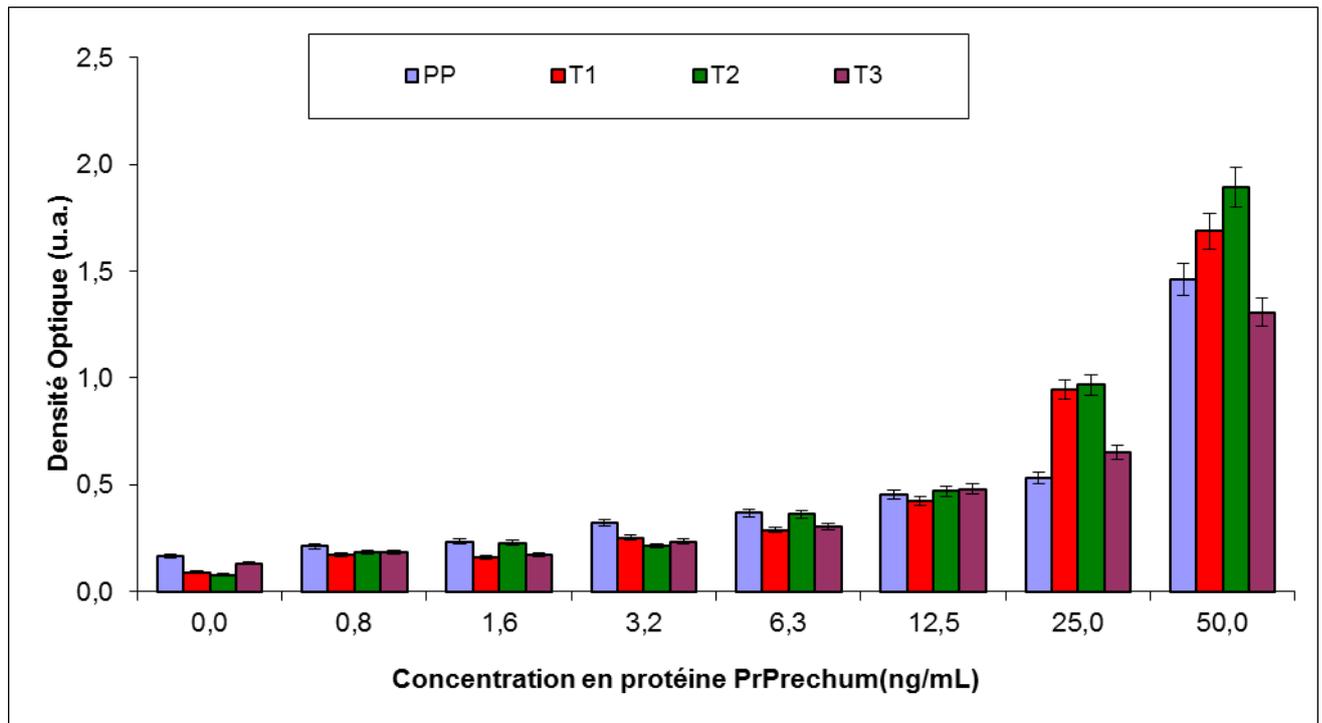


Figure IV.3 : Evaluation de la détection de la protéine Prion recombinante humaine par les supports fonctionnalisés ([anticorps de capture]=10 µg/mL, [anticorps secondaire]=1 µg/mL).

D'après la figure IV.3, on constate que la densité optique augmente avec la concentration, ce qui est en accord avec la loi de Beer-Lambert ($DO=\epsilon lc$). En effet, la valeur de la densité optique des différents supports évolue proportionnellement à la concentration en protéines Prion.

Pour une concentration nulle en agent pathogène, la densité optique ne l'est pas toujours. Ceci est dû d'une part au bruit de fond de l'appareil et d'autre part à des détections non spécifiques, correspondant à de faux-positifs, tels que le système anticorps primaire – anticorps secondaire. Il est donc nécessaire que la valeur de la densité optique relative à une concentration nulle en agent pathogène soit la plus faible possible malgré le bruit de fond propre de l'appareil. Ainsi, à une concentration de 0 ng/mL, le bruit de fond des traitements T1 et T2 sont de moitié celui du témoin : 0,090 u.a. et 0,079 u.a. contre 0,165 u.a.

Afin de mieux estimer l'influence des traitements T1, T2 et T3, nous avons représenté l'évolution de la sensibilité des différents supports en fonction de la concentration en protéine Prion recombinante humaine (Cf. figure IV.4). La sensibilité (en %) est définie selon la relation suivante :

$$S (\%) = \left| \frac{A-A_0}{A_0} \right| \times 100 \quad 144$$

Où A et A_0 correspondent respectivement à la valeur de l'absorbance du support (témoin, traité T1, traité T2 ou traité T3) en présence de protéines et en l'absence de protéines.

La figure IV.4 montre clairement que les supports traités T1 et T2 présentent une plus grande sensibilité à la protéine Prion $\text{PrP}_{\text{rechum}}$ que le témoin. La présence d'une charge à la surface des supports permettrait donc de mieux fixer l'anticorps de capture par effets électrostatiques et de Van der Waals, et donc mieux détecter la protéine. Le seuil de détection se situe à 12,5 ng/mL pour tous les supports traités.

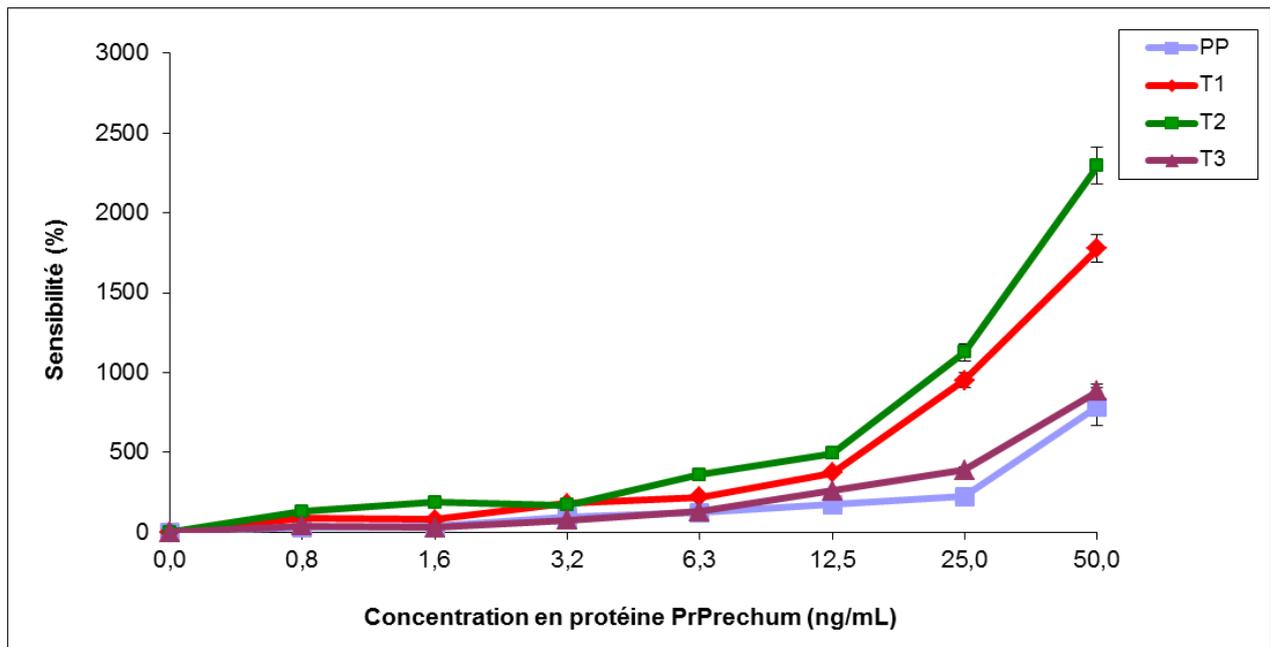


Figure IV.4 : Evolution de la sensibilité des différents supports en fonction de la concentration en protéine Prion recombinante humaine.

Le traitement T3 ne présente pas d'amélioration notable des signaux par rapport au support témoin, en effet il n'augmente la sensibilité du signal de détection que de 11% en moyenne. En revanche les supports de polypropylène fonctionnalisés par les couches minces T1 et T2 présentent, pour une concentration en $\text{PrP}_{\text{rechum}}$ de 50ng/mL, une augmentation de la sensibilité du signal de détection de 65.8% et 55.7%, respectivement.

Afin de s'assurer de l'efficacité des traitements de surface quel que soit le moment de leur utilisation, les tests en ELISA sandwich ont été réalisés sur les différents supports sur une gamme de temps s'étendant jusqu'à 8 mois. Les résultats de ces expériences sont présentés dans la figure IV.5.

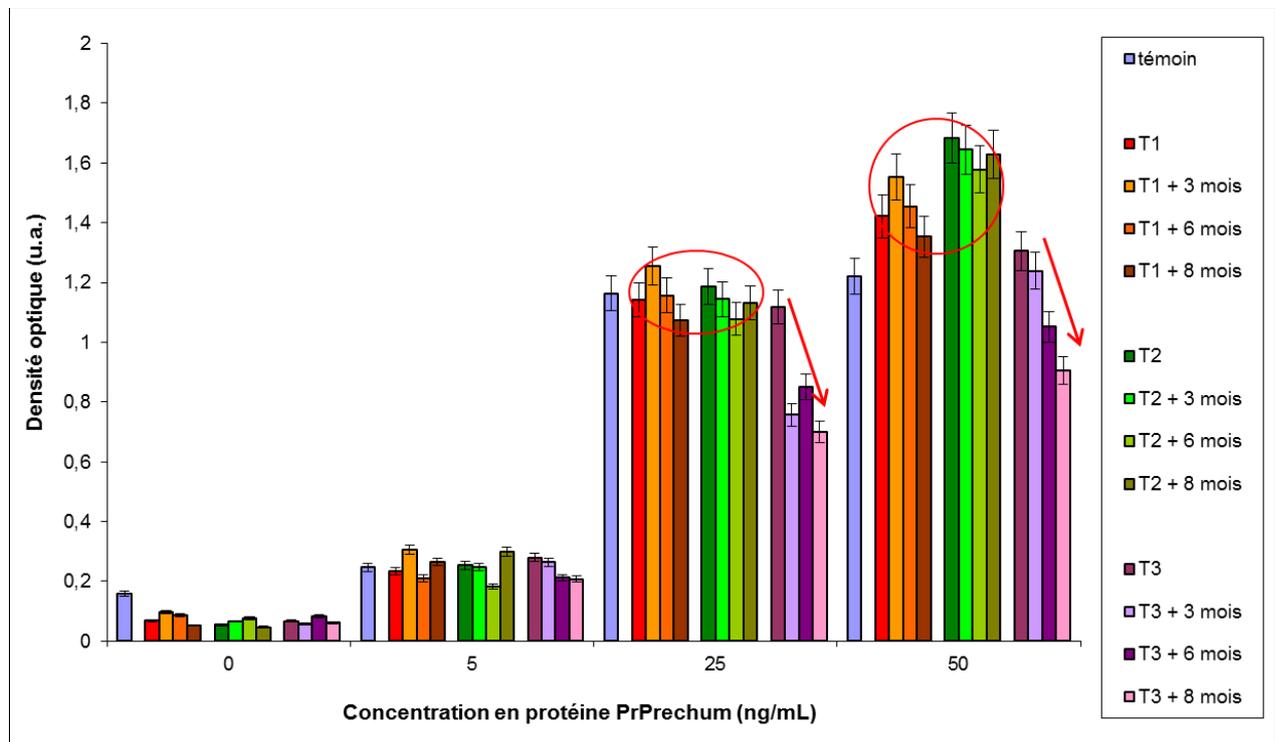


Figure IV.5 : Evaluation de l'influence du vieillissement des supports sur la détection de la protéine Prion recombinante.

Les résultats montrent que la densité optique des analyses réalisées sur le support T3 diminue au cours du temps, passant de 1,118 u.a. à 0,700 u.a. pour une concentration de 25ng/mL ; soit une perte du signal de 37%. De même pour une concentration en PrP_{rechum} de 50ng/mL où les valeurs des densités optiques entre un support à t=0 et t=8 mois perdent 30.6% de leur intensité. Ceci est en accord avec les études menées sur le vieillissement des surfaces modifiées. En effet, la valeur de l'angle de contact avec de l'eau ultra-pure était passée en 8 semaines de 45.33° à 55.67°, montrant que le dépôt de couches de T3 ne se stabilisait pas.

Les traitements T1 et T2 quant à eux ne présentent aucune perte du signal de détection et restent stables dans le temps puisque la perte de signal quel que soit le traitement et la concentration en PrP_{rechum} ne varie que de 5% à 8%.

Rappelons que toutes biomolécules possèdent un nombre important de conformations possibles qui s'opèrent en fonction du milieu dans lequel elles évoluent. Ainsi, un caractère hydrophobe plus prononcé susciterait une nouvelle conformation et une moins bonne accroche de l'anticorps de capture à la surface des supports d'analyses, ce qui a pour conséquence une perte en détection.

Néanmoins, il est important de noter que le vieillissement des supports n'altère la détection qu'au niveau de l'adsorption de l'anticorps primaire puisqu'en absence d'antigène, les valeurs des densités optiques obtenues relèvent du bruit de fond de l'appareil de mesure.

II.1.2) Protéine Prion native

Afin de pouvoir évaluer l'efficacité des supports traités sur la protéine native, les mêmes expériences que celles réalisées sur la protéine recombinante ont été menées sur la protéine issue du liquide céphalo-rachidien (LCR). Quand la maladie est symptomatiquement déclarée, le LCR contient 10% de protéines prion infectieuses et 90% de protéines prion saines. Il est alors possible de recueillir des échantillons de ce liquide à l'aide d'une dérivation ventriculaire externe (DVE) posée sur le patient atteint.

Les résultats des valeurs des densités optiques moyennées de plusieurs expériences réalisées simultanément, sont reportés sur la figure IV.6.

Nous pouvons constater que lorsque la protéine n'est pas présente, concentration nulle, la valeur de la densité optique du support de polypropylène brut est quasiment le double des valeurs obtenues avec les supports traités. Cela signifie que le PP entraîne une adhésion plus importante des deux anticorps capture et détection ou du système de détection anticorps-HRP. Par ailleurs, nous pouvons observer que la valeur des densités optiques en fonction de la concentration en PrP-DVE ne varie que très peu, allant de 0.185u.a. à une concentration nulle jusqu'à 0.246u.a. pour une concentration de 50ng/mL, soit une hausse de 25%.

En revanche, les traitements T1, T2 et T3 présentent des valeurs de densité optique en moyenne 63% et 59%, respectivement pour des concentrations en PrP-DVE de 25ng/mL et 50ng/mL, plus importantes que celles relevées pour le support de PP témoin. Nous pouvons donc considérer une forte amélioration de l'adhésion de l'anticorps de capture 3F3 à la

surface de nos supports. De plus, la variation de l'intensité de la densité optique entre 25ng/mL et 50ng/mL, quelle que soit le traitement considéré, ne varie pas de plus de 10%. Il est possible que la quantité d'anticorps de capture enduite à la surface ou d'anticorps de capture 15F5-HRP ne soit pas suffisante ; lors de l'ajout de la protéine PrP-DVE, les sites de reconnaissance peuvent être saturés. La protéine PrP-DVE en excès peut alors se fixer partiellement à même la surface.

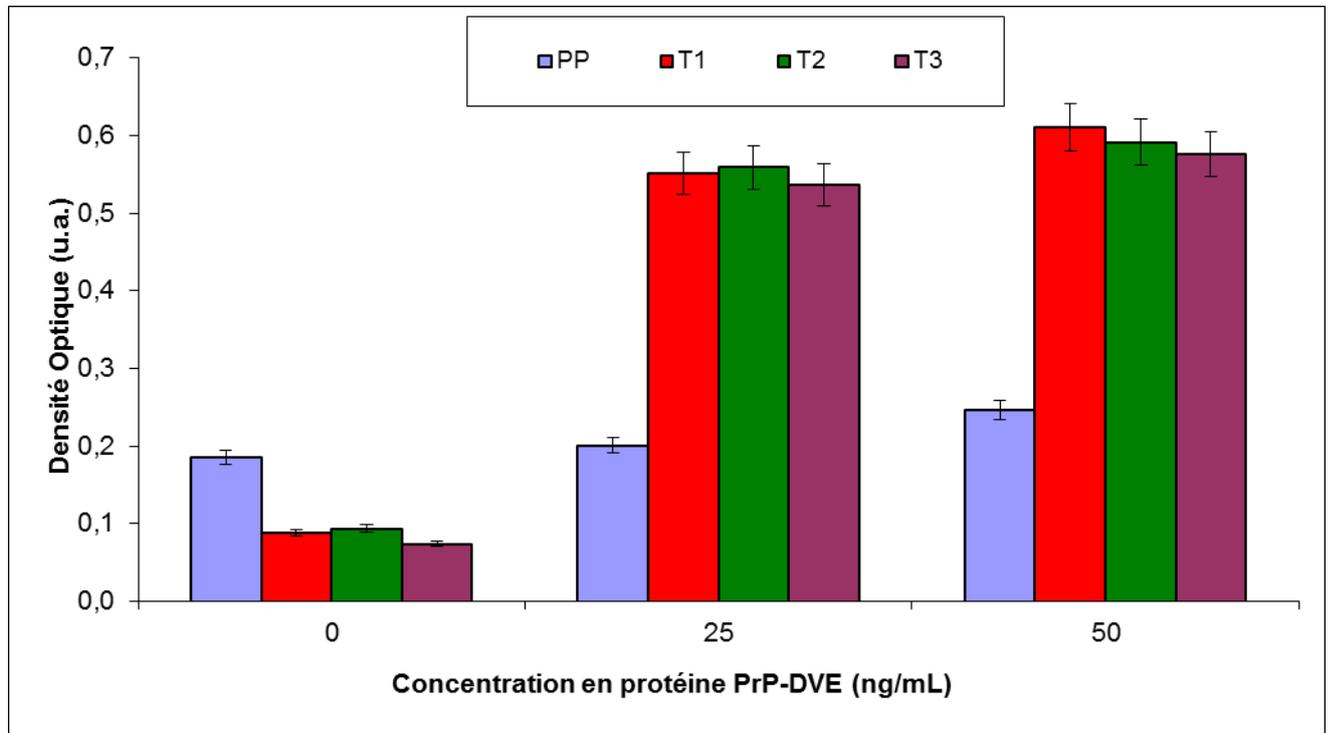


Figure IV.6 : Evaluation de la détection de la protéine Prion native par les supports fonctionnalisés ([anticorps de capture]=10 µg/mL, [anticorps secondaire]=1/10)

La figure IV.7 représente l'évolution de la sensibilité des différents supports en fonction de la concentration en protéines prion natives. Les résultats montrent une sensibilité nettement améliorée pour les supports traités par rapport au support de polypropylène brut et prouvent donc l'efficacité de ce type de traitement. Le seuil de saturation est déjà atteint à la concentration de 25 ng/mL et il serait donc intéressant, en perspective, d'étudier des concentrations inférieures à 25 ng/mL.

Cependant, on peut remarquer que les trois traitements donnent des sensibilités très proches et contrairement aux expériences menées sur la protéine recombinante, le traitement T3 donne des résultats légèrement plus élevés, de l'ordre de 3%, qu'avec les deux autres traitements. Notons tout de même que chaque traitement permet d'obtenir une forte

augmentation de la sensibilité du signal de détection. L'accroissement moyen des valeurs des densités optiques relevées atteint 98% pour une concentration en PrP-DVE de 25ng/mL et de 94% pour une concentration de 50ng/mL.

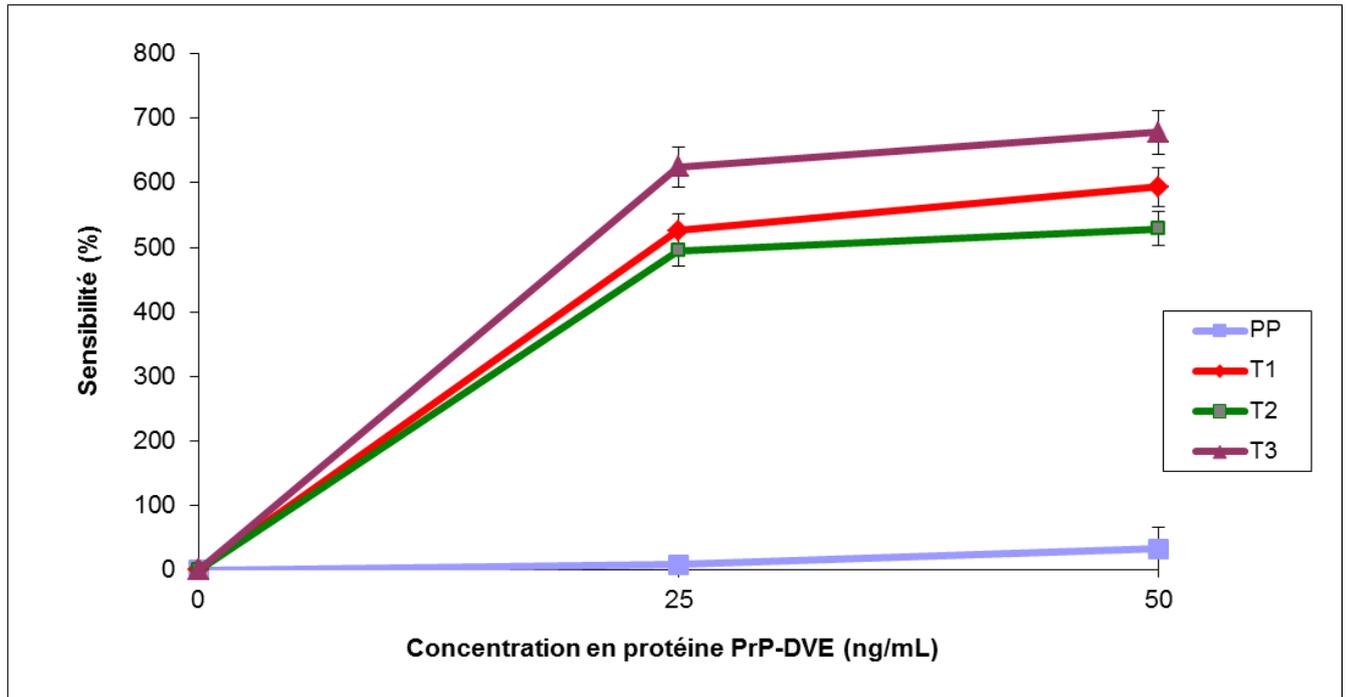


Figure IV.7 : Evolution de la sensibilité des différents supports en fonction de la concentration en protéines prion native

La littérature rend compte de la difficulté que présentent la purification et la synthèse de protéines antigéniques modèles. Il existe donc des différences entre les propriétés des protéines modèles et des protéines natives aussi bien au niveau de leur conformation que de leur caractère hydrophile, entraînant des conséquences sur leur degré d'affinité vis-à-vis des molécules chimiques et/ou biologiques. Ceci peut alors expliquer la différence de comportement de la protéine recombinante humaine et celle issue de la dérivation ventriculaire externe, vis-à-vis du traitement T3 mais également par rapport aux forts écarts des densités optiques relevées sur les supports traités et le support témoin.

Il est donc indispensable de réaliser les tests autant qu'il est possible sur les protéines natives en fonction de l'avancement des symptômes chez les patients.

L'étude sur le vieillissement des supports vis-à-vis de la détection de la protéine prion native sur une période de 8 mois est représentée sur la figure IV.8.

Pour une concentration nulle en PrP-DVE, les valeurs des densités optiques associées aux traitements T1 et T2 varient très peu entre t=0 et t=8 mois (de l'ordre de 15%). A contrario, le traitement T3 au bout de 8 mois de stockage, présente une augmentation de 49% de la valeur de la densité optique relevée à t=0.

Pareillement pour une concentration en PrP-DVE de 50ng/mL, où l'instabilité de la couche mince de T3 entraîne une perte du signal de détection de 35%. Les couches minces des traitements T1 et T2 restent stables et efficaces dans le temps.

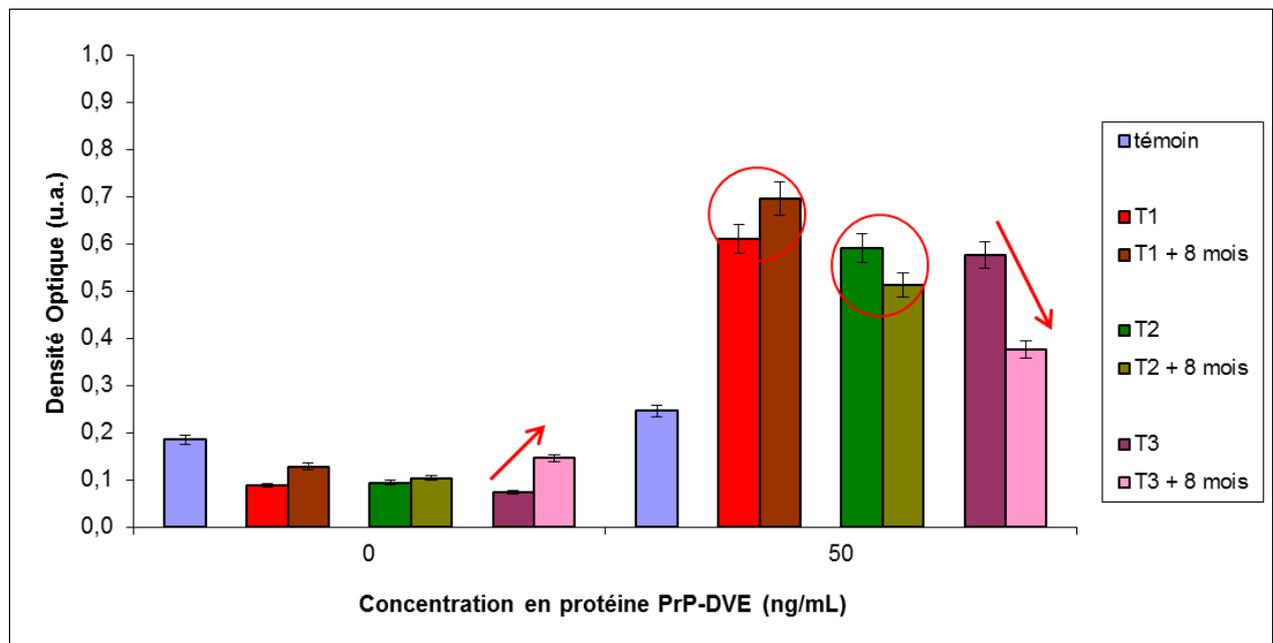


Figure IV.8 : Evaluation de l'influence du vieillissement des supports sur la détection de la protéine Prion native.

Bien que dans le cadre de l'étude de la détection de la protéine Prion issue de la DVE, le traitement T3 semblait s'imposer comme étant le plus opérationnel, l'instabilité de ses couches minces ne permette pas de l'utiliser comme agent de fonctionnalisation. En effet, aussi bien pour la protéine Prion recombinante humaine que la protéine PrP-DVE, les supports ayant été fonctionnalisés par les dépôts de couches minces T1 et T2 sont les plus appropriés puisque présentant une bonne augmentation du signal de détection, et donc de la sensibilité de détection, de 60% à 95%, mais également permettent une bonne reproductibilité des expériences au cours du temps dû à une meilleure stabilité de leur dépôt.

II.2) Evaluation de l'efficacité de la fonctionnalisation des supports sur la détection de la protéine Tau hyperphosphorylée

La protéine Tau hyperphosphorylée (Tau-PHF) correspondant à la forme pathogène hyperphosphorylée située dans le cerveau d'un patient est prélevée à un stade post-mortem. En revanche, étant donné la difficulté de connaître exactement la concentration initiale dans le prélèvement, des essais réalisés par le CHU de Lyon ont permis d'évaluer une dilution au 250^{ième} de la solution prélevée sur le patient comme possédant une concentration détectable. Dans le cadre de nos expériences, une dilution au 500^{ième} a également été réalisée afin de pouvoir évaluer la sensibilité des supports traités par rapport au support témoin.

La figure IV.9 présente la densité optique pour différentes concentrations en protéine Tau-PHF. Les résultats obtenus correspondent à la moyenne des valeurs des densités optiques obtenues avec plusieurs expériences identiques.

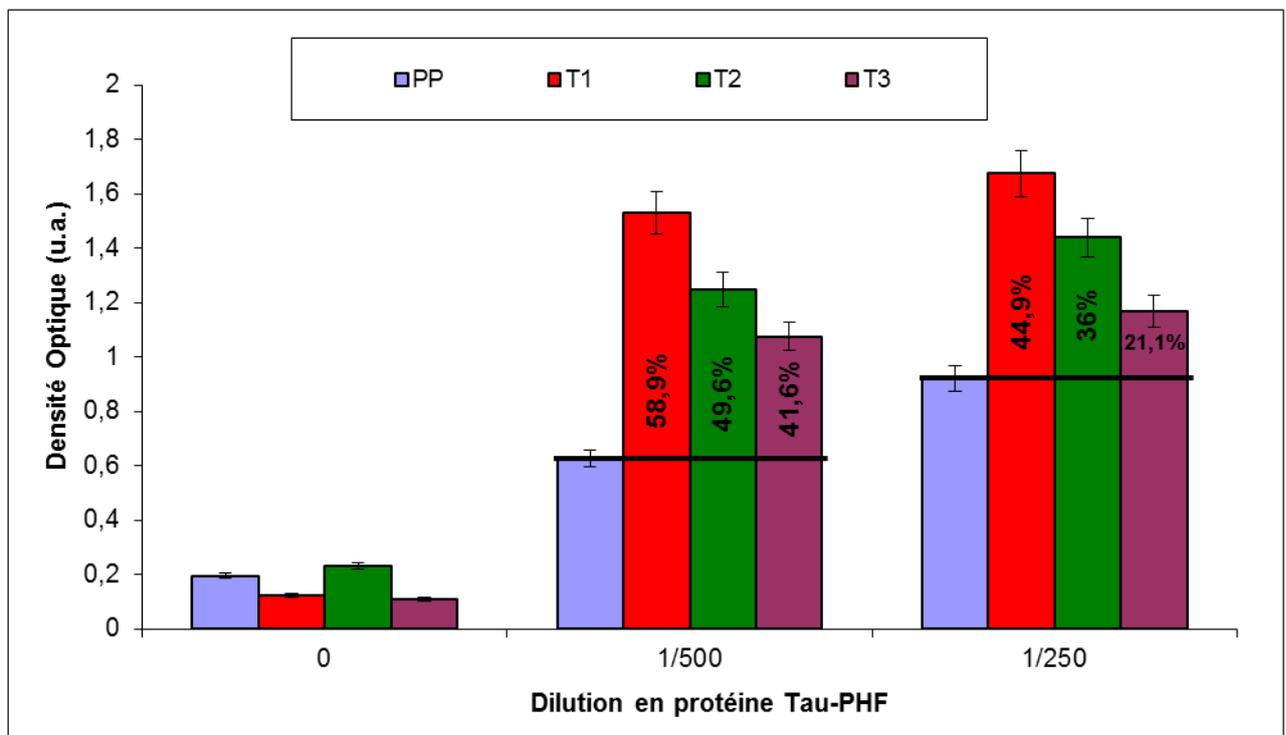


Figure IV.9 : Evaluation de la détection de la protéine Tau hyperphosphorylée par les supports fonctionnalisés ([anticorps de capture]=2 µg/mL, anticorps secondaire issu d'un kit INNOGenetics)

La figure IV.9 montre que le bruit de fond des supports traités T1 et T3 est réduit par rapport à celui du support témoin bien que celui-ci soit déjà faible (0,197 u.a.), ce qui correspond aux objectifs à atteindre pour améliorer la détection.

En revanche, le traitement T2 présente une augmentation du bruit de fond, ce qui signifierait que l'anticorps secondaire serait légèrement attiré par le traitement de surface ou se lierait directement sur le fragment Fc de l'anticorps primaire et donnerait lieu à un faux-positif.

Néanmoins, les résultats obtenus présentent une amélioration du signal jusqu'à 58.9% pour le traitement T1 et 49.6% pour le traitement T2 à une dilution de 1/500.

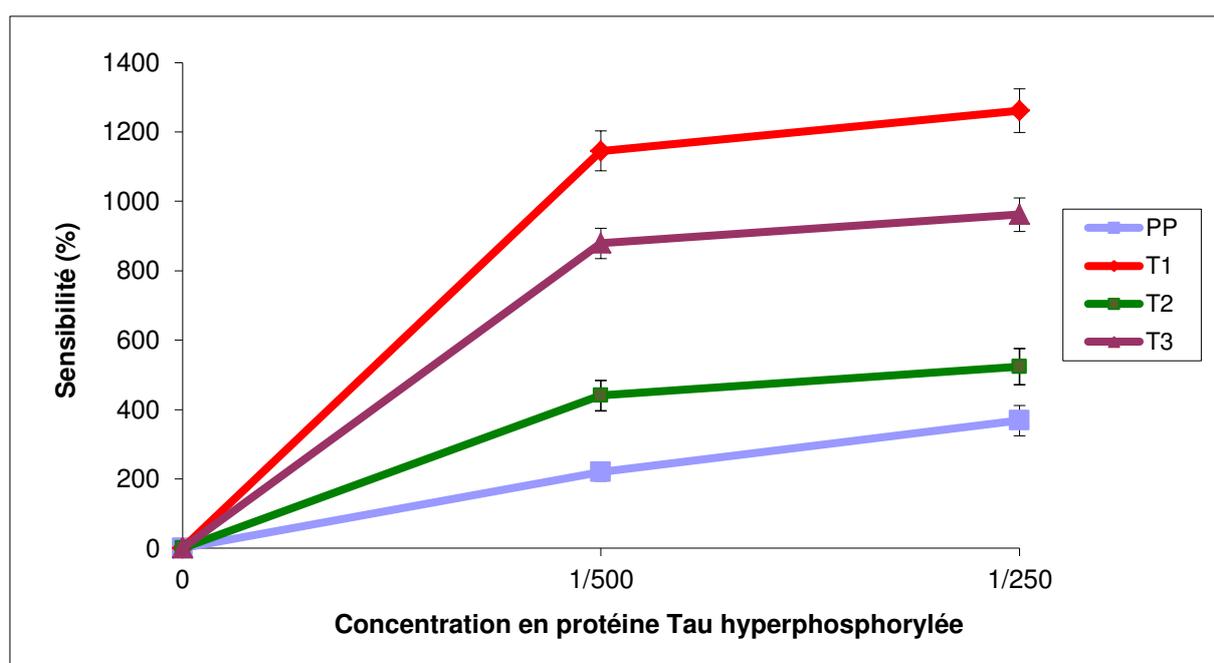


Figure IV.10 : Evolution de la sensibilité des différents supports en fonction de la concentration en protéines Tau hyperphosphorylées

La figure IV.10 montre que la présence des groupements fonctionnels de type amine à la surface des supports de polypropylène semblent permettre une meilleure détection de la protéine Tau-PHF. En effet, la sensibilité est meilleure pour le support traité T1 avec une augmentation de la sensibilité de détection de 80.9% pour une dilution de 1/500 et de 70.8% pour une dilution de 1/250. Contrairement aux traitements T2 et T3, le traitement T1 présente une surface initialement chargée qui pourrait expliquer une augmentation de l'affinité de l'anticorps de capture pour le support de détection.

Par ailleurs, pour les supports traités T1, T2 et T3, le seuil de détection semble atteint pour une dilution de 1/500, ce qui n'est pas le cas pour le support témoin. Dans le cas du support témoin, cette augmentation de la sensibilité peut être due à une adsorption de la protéine qui ne se fait pas uniquement sur les sites récepteurs de l'anticorps de capture mais également sur la surface du support. Ainsi, qu'elle soit fixée sur l'anticorps de capture ou directement sur la surface, la protéine peut être détectée par l'anticorps secondaire. Par conséquent, le dépôt de couches minces peut permettre alors d'éviter toutes adsorptions non spécifiques et d'obtenir une détection sans faux-positifs. Cependant, le traitement T2, de part la présence d'un bruit de fond à une concentration nulle en agent pathogène, voit sa sensibilité de détection augmenter de seulement 29.7% pour une dilution à 1/250.

La figure IV.11 présente le vieillissement des supports vis-à-vis de la détection de la protéine Tau hyperphosphorylée sur une période de 8 mois.

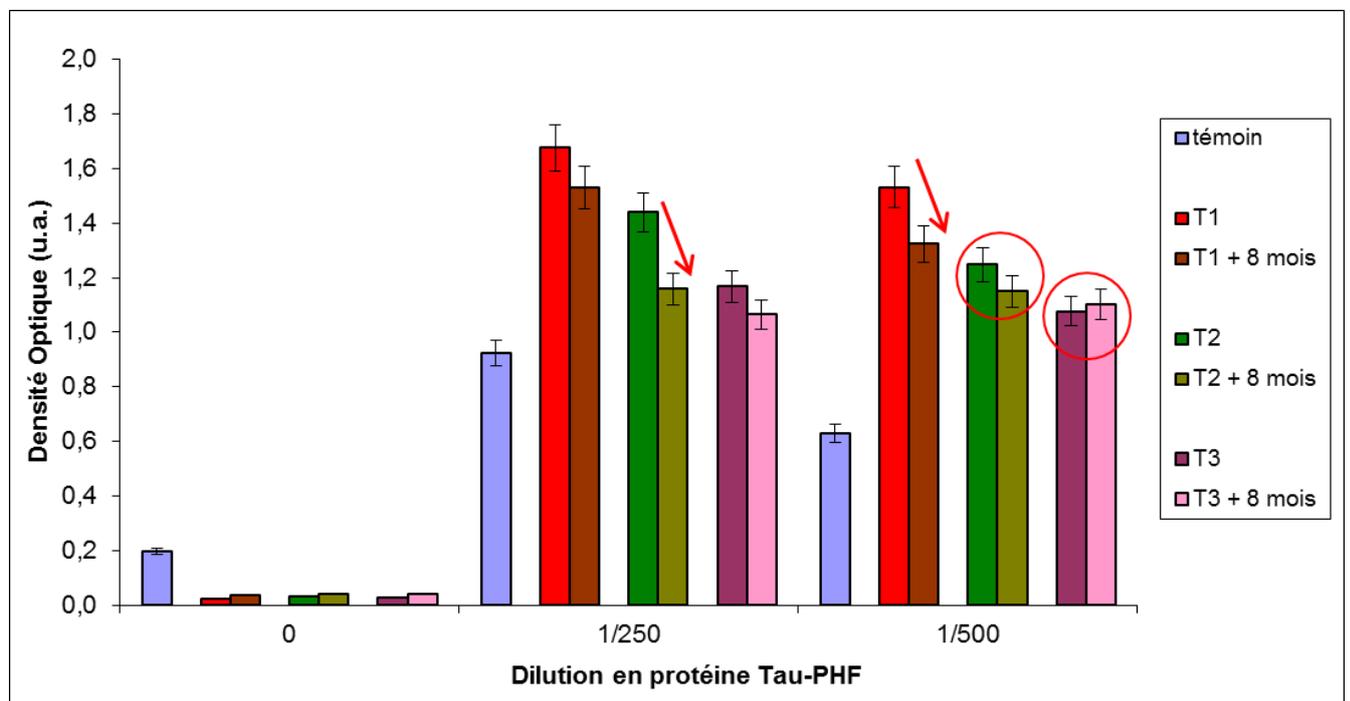


Figure IV.11 : Evaluation de l'influence du vieillissement des supports sur la détection de la protéine Tau hyperphosphorylée.

Bien que l'efficacité des traitements restent meilleur que le support brut après 8 mois, les dépôts de couches minces T1 et T2 présentent une légère baisse de la valeur de la densité optique de 19.6% pour T2 et de 13.6% pour T1. Il serait donc intéressant de renouveler

l'expérience en considérant des supports traités jusqu'à 12 mois et 16 mois, ceci afin de mieux évaluer l'influence du temps sur une éventuelle dégradation des couches minces.

II.3) Evaluation de l'efficacité de la fonctionnalisation des supports sur la détection de la protéine synucléine alpha sous forme oligomère

La protéine synucléine alpha étudiée ici est également issue de patients présentant les syndromes Parkinsoniens, c'est-à-dire qu'elle se présente sous forme oligomère. Des difficultés rencontrées quant au choix de l'anticorps de détection et des concentrations utilisées, n'ont pas permis de réaliser des systèmes ELISA complets. Cependant, le but principal étant d'améliorer la fixation de l'anticorps de capture afin d'augmenter la quantité d'antigène détectée, seule la fixation de l'anticorps primaire 10C3 sur les supports traités a été évaluée.

La figure IV.12 présente l'évolution de la densité optique obtenue sur les supports traités T1, T2 et T3 par rapport au support témoin pour deux concentrations en anticorps de capture (0,5 et 5 $\mu\text{g/mL}$) et permet de montrer les différences d'affinité de l'anticorps primaire pour les différentes surfaces considérées.

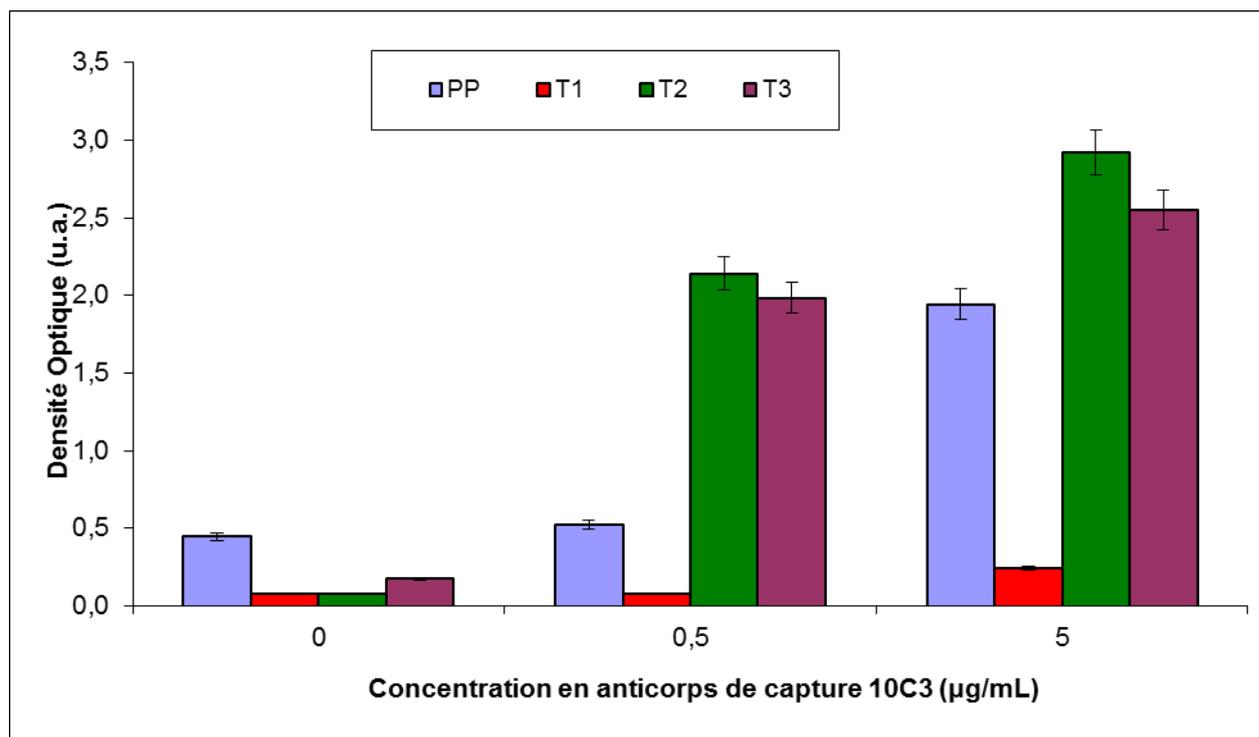


Figure IV.12 : Evaluation de l'affinité de l'anticorps de capture de la synucléine alpha vis-à-vis des supports traités par rapport au support témoin ([anticorps de détection]= 0,3 $\mu\text{g/mL}$)

L'anticorps de détection utilisé ici possède une affinité particulière pour l'anticorps de capture puisqu'ils diffèrent uniquement par la présence sur l'anticorps secondaire de la peroxydase de Raifort. Ainsi, lorsque la concentration en anticorps de capture est nulle, l'affinité de l'anticorps de détection pour la surface est directement évaluée. Le but étant de ne pas avoir de détection ne correspondant pas au système complet, il est nécessaire que l'anticorps de détection ne se fixe pas en l'absence de l'anticorps de capture et que la valeur de la densité optique correspondante soit la plus faible possible.

Les valeurs des densités optiques présentées sur la figure IV.12 en l'absence d'anticorps primaire montrent que les supports traités ne fixent pas aléatoirement l'anticorps secondaire. En effet, les DO des supports traités sont plus faibles que celle du support témoin. Ceci permet de démontrer que les valeurs des densités optiques obtenues en présence de l'anticorps de capture ne sont pas dues à une détection non spécifique.

En revanche, le support de polypropylène brut, présente une valeur de densité optique de 0.447 u.a. lorsque la concentration en anticorps primaire est nulle. Il y a donc adsorption de l'anticorps de détection à la surface du PP. La valeur obtenue à une concentration de 5 $\mu\text{g/mL}$ signifie que le support ne présente pas une meilleure affinité mais simplement que cette valeur est due à la plus forte concentration en anticorps 10C3 puisque la valeur de la densité optique pour une concentration de 0.5 $\mu\text{g/mL}$ est équivalente au bruit de fond.

La figure IV.13 présente l'évolution de la sensibilité des supports vis-à-vis de l'anticorps de capture. Il apparaît que le support traité T2 est le plus sensible. Il permet d'augmenter la sensibilité de détection à faible concentration en anticorps de capture (0.5 $\mu\text{g/mL}$) de 99.3% par rapport au support de polypropylène témoin.

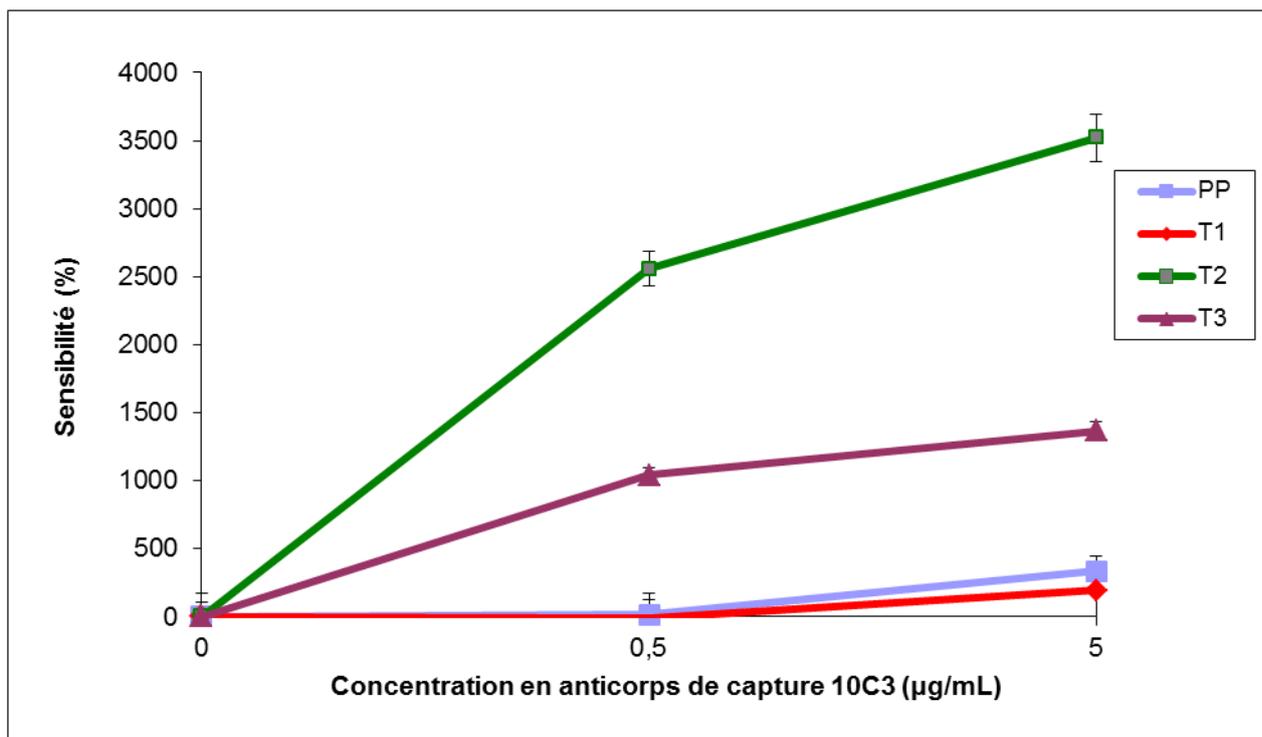


Figure IV.13 : Evolution de la sensibilité des différents supports en fonction de la concentration en anticorps de capture de la synucléine alpha

En revanche, le support traité par le bromure d'hexatriméthylammonium ne présente aucune affinité pour l'anticorps de capture puisque les valeurs des sensibilité de détection obtenues pour chaque concentration ne dépassent pas le bruit de fond du témoin. En effet, pour une concentration de 5 µg/mL en anticorps 10C3, la sensibilité de détection est réduite de près de 42%. Ce manque d'affinité de la part de la couche mince T1 peut être dû à la présence du groupement ammonium comportant une charge positive qui pourrait être à l'origine d'une répulsion envers l'anticorps de capture.

Dans le but de mieux interpréter les résultats obtenus en ELISA et de pouvoir comprendre les différences d'affinité des traitements vis-à-vis des biomolécules, des analyses de surface ont été réalisées.

III . Evaluation de l'affinité des biomolécules d'intérêts pour les surfaces traitées

Le système de détection ELISA Sandwich (Cf. figure I.9) met en jeu différentes biomolécules qui ont toutes une affinité particulière pour la molécule avec laquelle elles doivent réagir au cours de la détection. Sont donc introduit dans le milieu d'analyse l'anticorps de capture, l'agent bloquant de surface (la BSA ou le Tween20[®]), l'antigène, l'anticorps de détection et selon que ce dernier soit couplé ou non à de la biotine, la streptavidine couplée à la peroxydase de Raifort (HRP) et le 3,3', 5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB), dans cet ordre.

Lorsque l'une de ces biomolécules manque, il est nécessaire de s'assurer que des associations non spécifiques n'aient pas lieu et ne déclenchent pas un signal de détection majoritairement constitué de faux positifs. En effet, une détection erronée aurait pour conséquence de déclarer comme atteint un patient sain.

L'intérêt de ce travail d'analyses est de pouvoir s'assurer que les supports traités n'entraînent pas de fixations ou d'associations aspécifiques. Il permettra également de mieux comprendre l'influence des traitements du support vis-à-vis de la fixation des anticorps de capture et des adsorptions non spécifiques. Pour cela, les tests effectués à l'aide du système ELISA ont été mis en relation avec des analyses par microscopie confocale. L'élimination, au sein du protocole de détection, des principales biomolécules (anticorps de capture, protéine ou anticorps de détection) a permis d'évaluer l'existence ou non de ces adsorptions aspécifiques et l'influence des molécules de fonctionnalisation des supports sur ces résultats.

L'élimination de l'anticorps de capture peut entraîner différentes associations des autres biomolécules en fonction de leur affinité les unes par rapport autres mais également du support considéré. La figure IV.14 présente les schémas des différentes associations possibles. Il en va de même lorsque l'antigène et l'anticorps de détection sont absents du protocole. Les figures IV.15 et IV.16 présentent les schémas des absorptions pouvant alors être obtenues. Ainsi pour chaque protéine précédemment étudiée en détection, les mêmes expériences ont été réalisées sans l'anticorps de capture correspondant, l'antigène lui-même et l'anticorps de détection. Les résultats sont présentés par protéine pour chaque traitement.

Rappelons que chaque protéine est associée à un anticorps de capture et un anticorps de détection qui la reconnaissent de façon spécifique par le couple épitope - récepteur. Ainsi, lorsque l'une des entités est absente, il ne devrait pas y avoir de signal de détection. En

revanche, la mesure d'une densité optique montre qu'une association non spécifique est réalisée. Cette association peut avoir lieu entre les biomolécules elles-mêmes ou entre les biomolécules et la surface du support d'analyse.

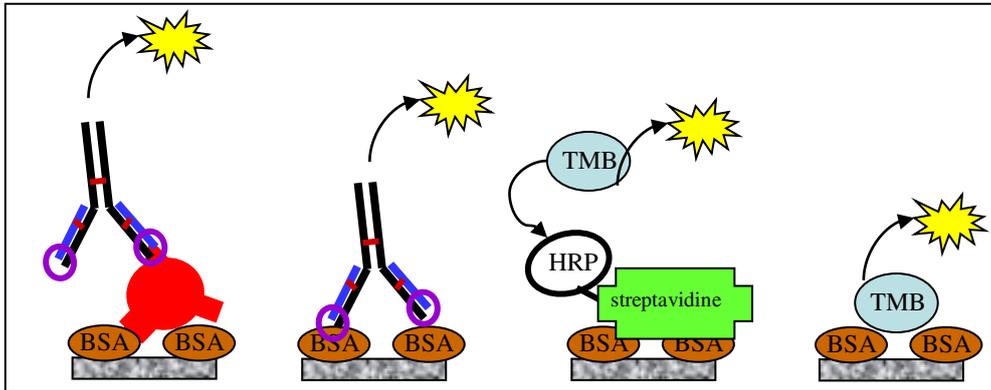


Figure IV.14 : Schéma des diverses fixations non spécifiques possibles en l'absence d'anticorps de capture

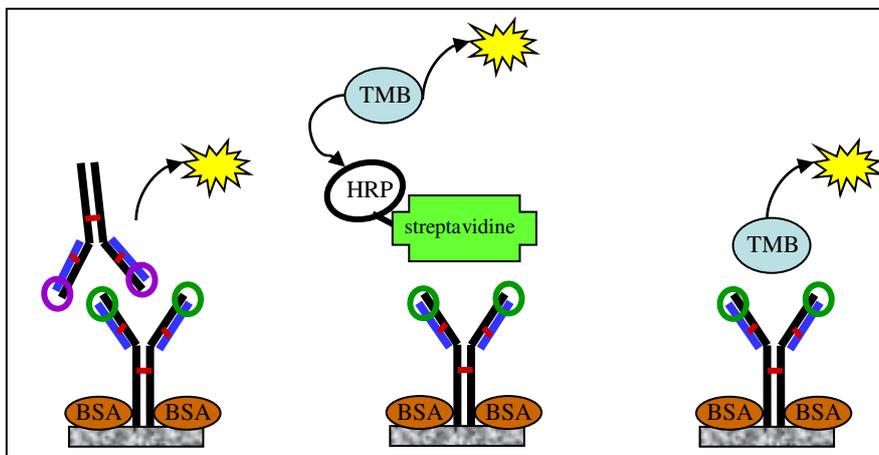


Figure IV.15 : Schémas des adsorptions possibles en l'absence d'antigène

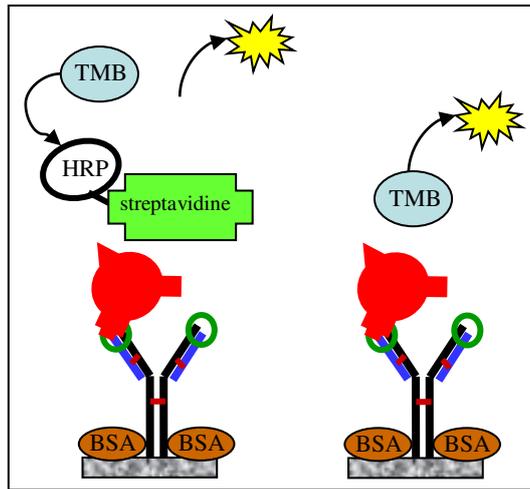


Figure IV.16 : Schémas des associations pouvant avoir lieu lorsque l'anticorps de détection est absent

III.1) Etude des associations aspécifiques par le système ELISA sandwich

III.1.1) L'environnement de la protéine Prion recombinante humaine

La figure IV.17 présente les valeurs des densités optiques relevées en fonction de différentes conditions d'expériences où l'anticorps de capture, l'antigène et l'anticorps de détection ont été chacun à leur tour enlevé du protocole.

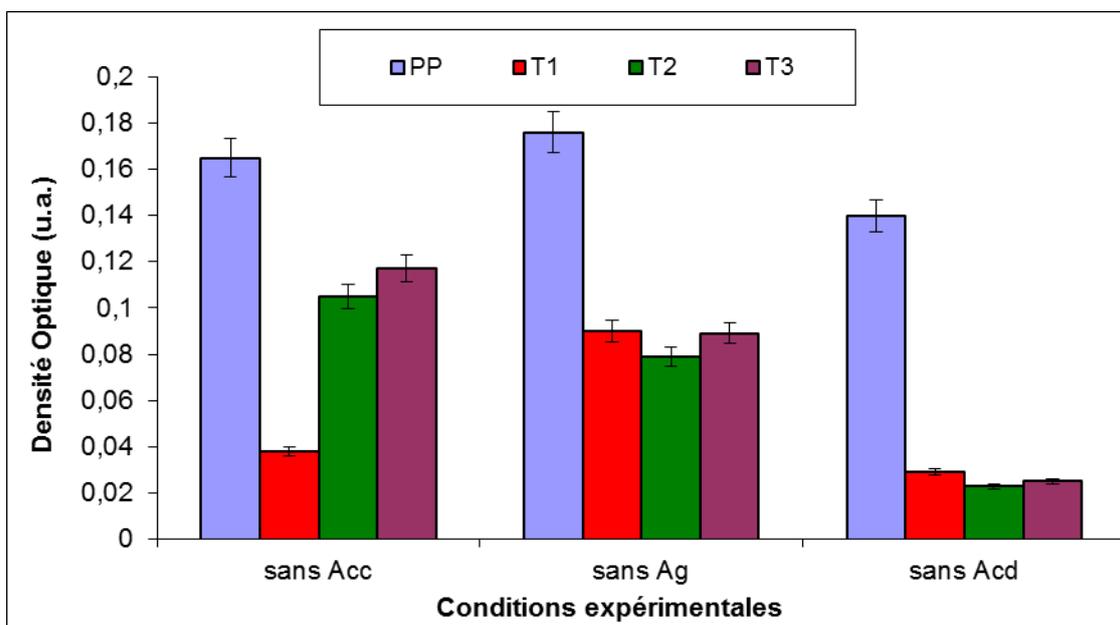


Figure IV.17 : Evaluation des associations non spécifiques pour chaque traitement.

Nous constatons dans un premier temps que les densités optiques sont toutes relativement faibles, en dessous de 0,2 u.a., quelle que soit la biomolécule soustraite. De plus, les surfaces traitées présentent une densité optique plus faible que le support témoin.

Dans le cas où l'anticorps de capture est absent, la surface T1 traitée par le bromure d'hexatriméthylammonium présente une densité optique plus faible que les deux autres traitements T2 et T3. Cette différence est due à la fixation de l'antigène sur l'agent bloquant, et donc la surface. Il semblerait que la présence de la charge positive du traitement T1 portée par l'ammonium repousse l'antigène, permettant ainsi de limiter les faux positifs. Par ailleurs, l'étape suivant l'introduction dans le milieu d'analyse de l'antigène étant l'ajout de l'anticorps de détection, ces signaux de détection pourraient également être dus à la fixation de cet anticorps secondaire. Ainsi, l'expérience suivante consiste à retirer l'antigène du protocole et de vérifier que l'anticorps secondaire n'entraîne pas de détection aspécifique en se fixant sur l'anticorps primaire.

En l'absence d'antigène, les valeurs des signaux de détection sont en moyenne plus élevées qu'en absence d'anticorps de détection. Cela peut être dû à l'association de l'anticorps primaire avec l'anticorps secondaire. Néanmoins, on constate que le support témoin présente une valeur de densité optique quasiment deux fois plus importante que celle des supports traités. L'hydrophobie naturelle du polypropylène favoriserait donc l'association des deux anticorps et donc la présence d'un signal de détection. En revanche, la présence d'amines, chargées ou non, permettrait de réduire les fixations non spécifiques.

La dernière expérience consiste à ne pas ajouter l'anticorps de détection afin de s'assurer que le complexe streptavidine-HRP ne s'adsorbe pas, puisque dans ce cas-là, la détection est indirecte, c'est-à-dire que l'anticorps secondaire est couplée à de la biotine. Ainsi, lorsque l'anticorps de détection n'est pas présent et qu'une valeur de densité optique est relevée, cela signifie que le système de détection est affiné soit pour l'antigène soit pour la surface d'analyse. Les supports traités T1, T2 et T3 présentent des signaux de détection bien inférieurs à celui associé au support témoin : 0,26 u.a. en moyenne sur les trois supports traités pour 0,14 u.a. pour le témoin.

Considérant les valeurs des signaux de détection obtenues lors de la première expérience (sans anticorps de capture), il semble intéressant de conserver le support traité par

le bromure d'hexatriméthylammonium (T1) pour améliorer la détection de la protéine Prion recombinante humaine.

III.1.2) L'environnement de la protéine Prion native

Les résultats des expériences sont reportés sur la figure IV.18. Les variations des valeurs des densités optiques obtenues en fonction de l'affinité de chaque biomolécule pour chacun des traitements par rapport au support témoin permettent d'évaluer le support le mieux adapté à la détection de la protéine PrP-DVE.

Première constatation, le support témoin semble fortement fixer l'antigène et/ou l'anticorps de détection lorsque l'anticorps primaire est absent du protocole. En effet, la valeur du signal associé est de 2 à 8 fois supérieure à ceux des supports traités. Ainsi, le traitement T1 donne lieu à la fixation non spécifique de l'antigène sur l'agent de blocage, ici l'albumine de sérum bovin (BSA), ou de l'anticorps de détection soit sur l'antigène préalablement fixée soit sur la BSA. En revanche, les traitements T2 et T3 ne donnent lieu à aucune association aspécifique.

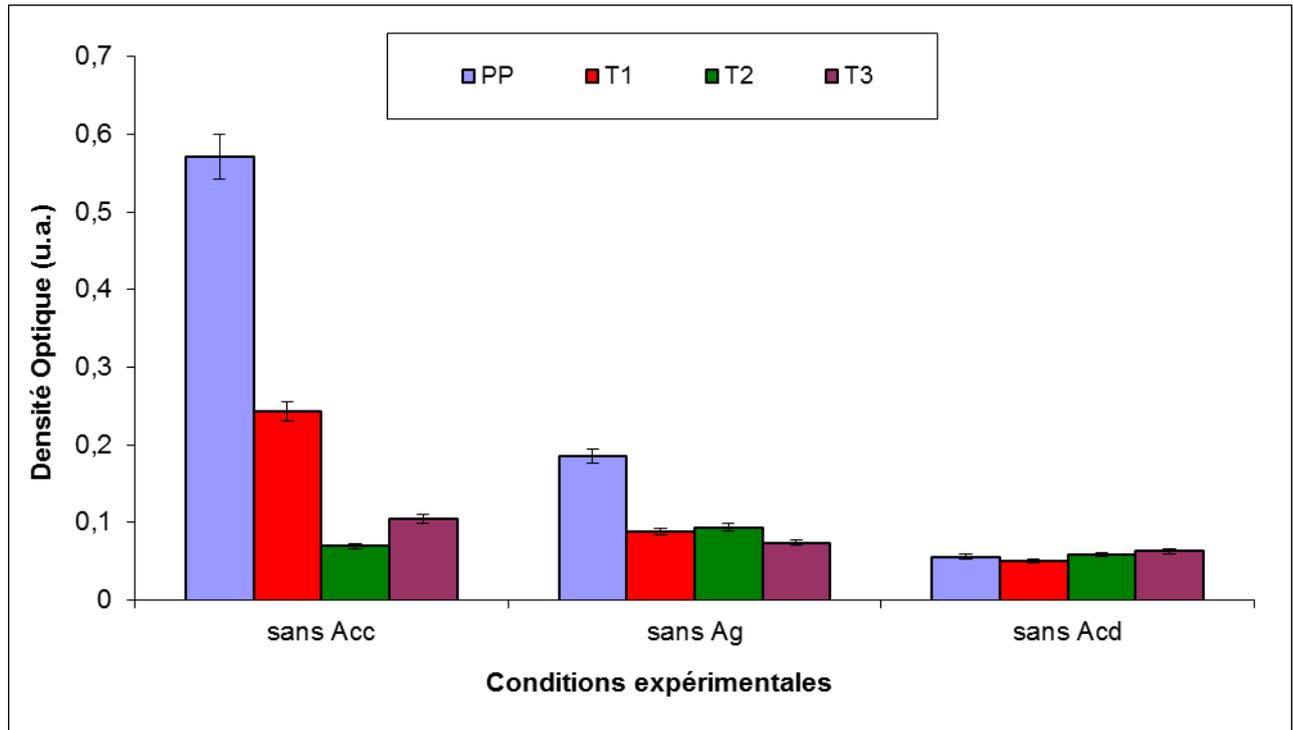


Figure IV.18 : Evaluation des associations non spécifiques pour chaque traitement

L'absence d'antigène permet de définir l'affinité de l'anticorps secondaire pour l'anticorps primaire ou la surface. En effet, dans ce cas-là, si la valeur du signal est faible, de l'ordre de 0,1 u.a., et prenant en compte les résultats de l'expérience précédente, cela signifie que l'antigène se fixe sur l'agent de blocage et non l'anticorps secondaire. Rappelons que les anticorps ont entre eux une affinité particulière puisqu'ils se lient par le fragment Fc commun à tous les anticorps. Les faibles valeurs de DO obtenues nous permettent de conclure que seule l'association anticorps – anticorps a lieu. Néanmoins, les valeurs des densités optiques relatives aux supports traités sont de moitié celle du témoin. La présence des charges et des groupements amines à la surface du polypropylène permet donc de réduire le bruit de fond relatif à la fixation de l'anticorps secondaire sur l'anticorps primaire.

Par ailleurs, la dernière expérience correspondant à l'absence d'anticorps de détection, permet de confirmer que le signal est bien dû à l'association des anticorps entre eux puisqu'en moyenne le signal est de 0,057 u.a. pour chaque support traité ou non.

Donnant des valeurs de densité optique systématiquement inférieures à 0,1 u.a. dans chaque cas expérimental, le traitement T2 au 3-butenylamine hydrochloride semble le plus approprié à la détection de la protéine prion issue de la DVE puisque diminuant le bruit de fond lié aux fixations non spécifiques.

III.1.3) L'environnement de la protéine Tau hyperphosphorylée

Comme expliqué dans le chapitre 1, la protéine Tau issue du liquide encéphalo-rachidien (LCR) est hyperphosphorylée, c'est-à-dire qu'elle est associée à des paires de filaments sous forme hélicoïdale. La détection de cette protéine met donc en évidence aussi bien la protéine Tau elle-même que les filaments auxquels elle est liée.

La figure IV.19 présente les valeurs des densités optiques correspondant aux associations non spécifiques des biomolécules mises en jeu dans le protocole ELISA, entre-elles ou avec la surface. Comme pour les cas précédents, trois expériences éliminant tour à tour l'anticorps de capture, l'agent pathogène et l'anticorps de détection ont été réalisées.

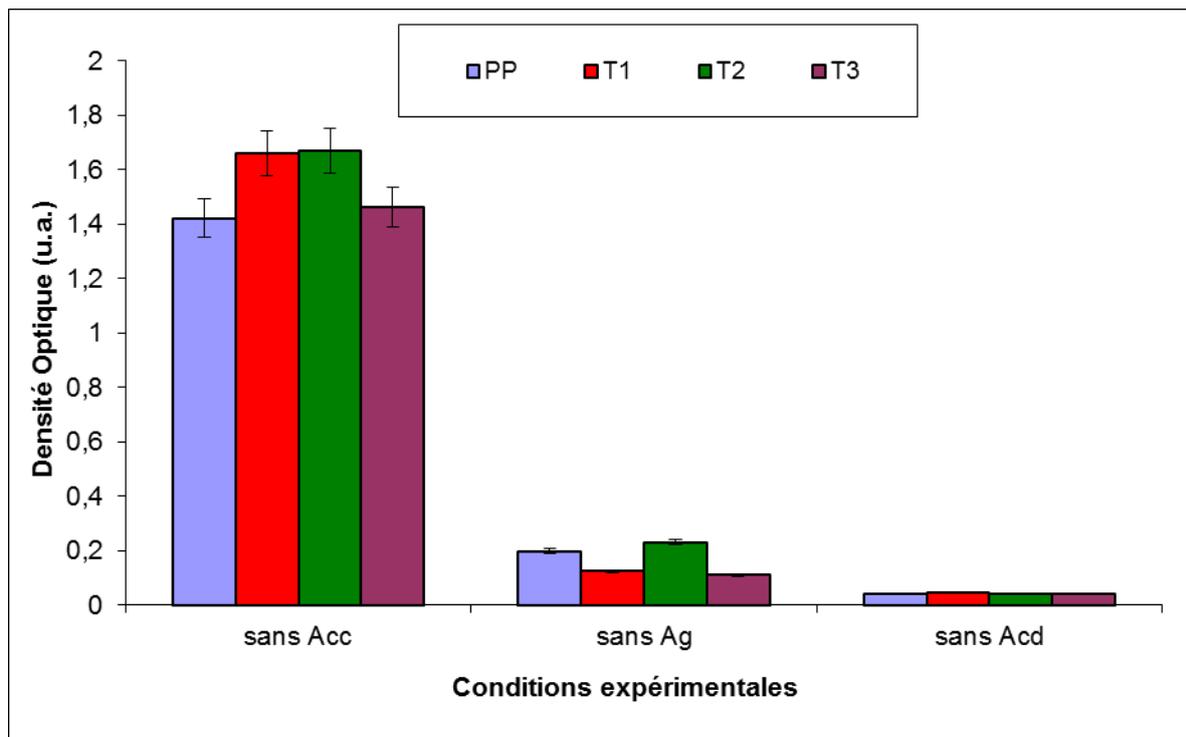


Figure IV.19 : Evaluation des associations non spécifiques pour chaque traitement.

Nous pouvons observer dans un premier temps, les fortes valeurs des densités optiques obtenues pour tous les supports, témoin et traités T1, T2 ou T3, en absence d'anticorps de capture. Ces valeurs montrent que l'antigène se fixe fortement à la surface des supports d'analyses, permettant ainsi à l'anticorps secondaire de se lier et donner lieu à un signal de détection. Ceci signifie que, quel que soit le support utilisé, une détection par ELISA direct (en adsorbant directement la protéine sur la surface) pourrait être réalisée et détecterait la protéine Tau-PHF. Ainsi une expérience complémentaire a été réalisée en ELISA direct où l'anticorps de capture et l'agent bloquant, ici le Tween20[®], ont été retirés du protocole d'analyse. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure IV.20. Ils permettent de confirmer cette hypothèse.

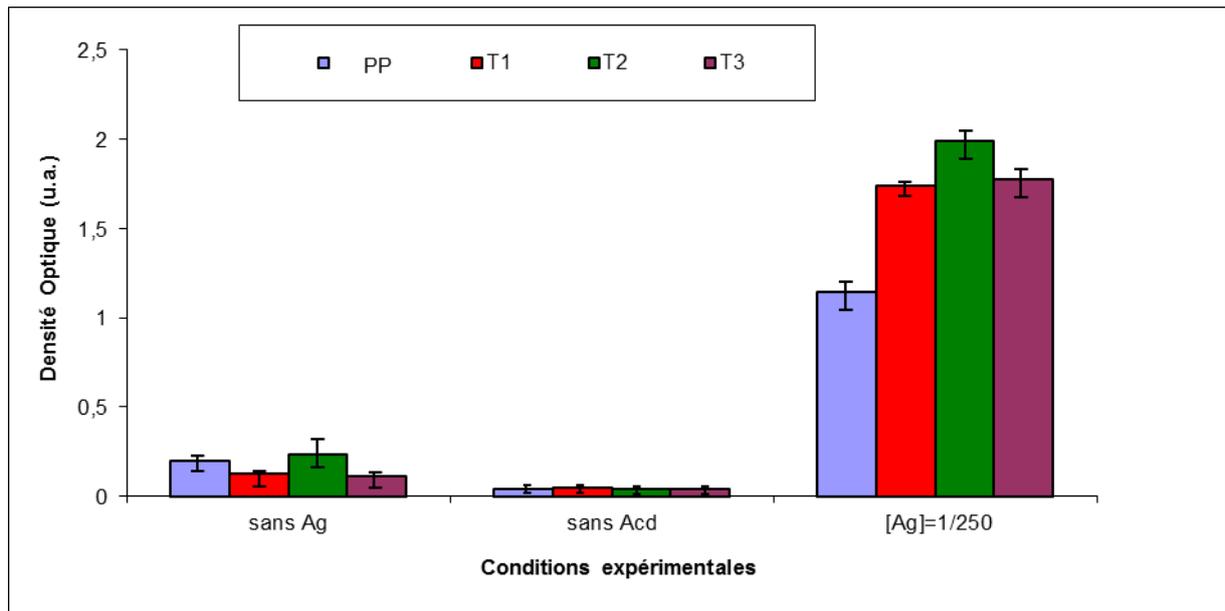


Figure IV.20 : Evaluation de l'efficacité des supports dans le cas d'une détection par ELISA direct

En l'absence d'antigène et d'anticorps de détection, et ce pour toute surface, aucun signal ne traduit une détection associée à une fixation aspécifique. Ainsi, les valeurs obtenues quand le système est complet sont uniquement significatives d'une détection de l'agent pathogène. En effet, ceci est confirmé par les valeurs élevées des signaux optiques obtenus pour une dilution au 250^{ième} de l'antigène dans le LCR, en particulier pour le traitement T2. La protéine Tau-PHF aurait donc plus d'affinité pour des couches minces possédant des groupements amines que pour le polypropylène non traité.

En revanche, considérant à nouveau la figure IV.19, en l'absence d'antigène, les supports traités et témoin présentent des valeurs de densité optique relativement faibles. Il n'y a donc pas d'association entre les deux anticorps.

De plus, les valeurs obtenues sans anticorps de détection sont en moyenne de 0,040 u.a., ce qui signifie qu'en son absence, la streptavidine couplé HRP ainsi que le TMB ne se lient pas aux biomolécules déjà adsorbées.

D'une manière générale, les supports traités et non traités permettent une détection de la protéine pathogène sans faux positifs. Néanmoins, les résultats obtenus en détection par ELISA sandwich (paragraphe I – 2) permettent de définir le support T1 comme pouvant donner lieu aux meilleurs résultats de détection, comparativement aux autres supports analysés.

En conclusion, le support traité par le bromure d'hexatriméthylammonium (T1) devrait permettre d'améliorer le signal de détection des protéines tout en réduisant le bruit de fond lié aux associations non spécifiques des biomolécules d'intérêt ; ceci particulièrement pour les protéines Prion recombinante et native, mais aussi pour la protéine Tau hyperphosphorylée. Néanmoins, le traitement T2 (3-butenylamine hydrochloride) pourrait également convenir.

Dans le but de confirmer ces hypothèses, des analyses en microscopie confocale ont été réalisées dans le but d'observer l'homogénéité de l'adsorption des protéines et des anticorps de capture associés sur les surfaces en fonction de leur traitement.

III.2) Evaluation de l'adsorption des biomolécules par microscopie confocale

Bien que les analyses ELISA permettent d'évaluer l'adsorption des protéines à la surface des supports, elles ne permettent pas de définir l'homogénéité de cette fixation. Dans cette optique, des analyses par microscopie confocale ont permis de rendre compte de cette homogénéité et de comprendre ainsi les résultats obtenus en détection.

La microscopie confocale permet de visualiser les protéines par fluorescence. Les biomolécules étudiées dans ce projet n'étant pas naturellement fluorescentes, il est nécessaire de les lier à un agent de fluorescence qui ne dégrade pas leur structure. La rhodamine a été choisie pour réaliser cette étude. Elle est additionnée aux solutions contenant les biomolécules à analyser et se fixe grâce à ses groupements cycliques.

Chaque surface, témoin et traitées T1, T2 ou T3, a, dans un premier temps, été immergée dans une solution aqueuse contenant uniquement la rhodamine afin de voir si par la suite, la fluorescence observée était majoritairement due à l'adsorption des biomolécules d'intérêt ou à celle de la rhodamine. Dans un second temps, les surfaces ont été immergées dans des solutions contenant la rhodamine liée soit à l'agent pathogène, soit à l'anticorps de capture associé.

Les images issues des analyses en microscopie confocale sont présentées sur les figures IV.21, IV.22 et IV.23. La figure IV.21 met en comparaison les supports témoin et traités après immersion dans une solution aqueuse de rhodamine. Les figures IV.22 et IV.23 présentent, quant à elles, les surfaces après immersion dans les solutions aqueuses protéiques ou contenant les anticorps liés à la rhodamine. La légende de couleur permet d'évaluer la fixation des biomolécules d'intérêt. Lorsqu'aucune adsorption n'est faite, la surface est de

couleur noire. En revanche dès qu'une protéine s'adsorbe à la surface, une coloration rouge apparaît. Lorsque la densité devient importante, la coloration passe du rouge au vert.

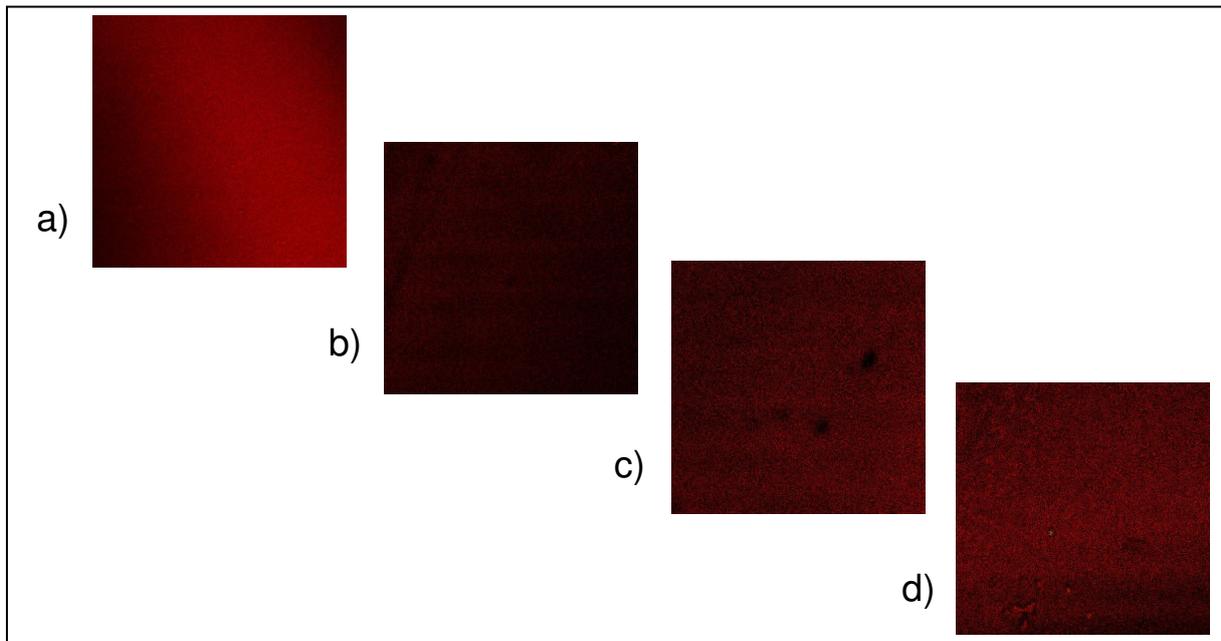


Figure IV.21 : Evaluation de l'affinité de la rhodamine pour les différentes surfaces : a) surface témoin, b) surface T1, c) surface T2 et d) surface T3

Les images présentées sur la figure IV.21 montrent l'affinité de la rhodamine pour chacune des surfaces. On constate que le support témoin présente une coloration rouge plus prononcée que les surfaces traitées. Ce qui signifie que la rhodamine a plus d'affinité pour le caractère hydrophobe du polypropylène que pour les surfaces hydrophiles obtenues après traitement. Ceci est confirmé par les images relatives aux traitements. En effet, le caractère hydrophile diminue entre les surfaces T1, T2 et T3, la valeur de l'angle de contact avec l'eau ultra pure étant plus importante pour la surface T1 que pour les surfaces T2 et T3 : 34°, 36° et 45° respectivement pour T1, T2 et T3. Bien que les angles de contact des traitements T1 et T2 soient proches, il semblerait que la rhodamine soit plus affine pour le traitement au 3-butenylamine (T2) en raison de l'absence de charge à sa surface.

La figure IV.22 présente la répartition des protéines Prion recombinante, Tau hyperphosphorylée et synucléine alpha sous forme oligomère vis-à-vis des surfaces témoin et traitées T1, T2 et T3.

Première constatation, il existe une grande différence du mode d'adsorption des protéines sur les surfaces. Le support témoin permet de visualiser, les filaments des paires

hélicoïdales de la protéine Tau et la forme oligomère de la protéine α -synucléine (en vert sur les images). D'après la première image, la protéine Prion recombinante humaine semble former des agrégats sphériques à la surface du polypropylène. D'une manière générale, le support témoin possède une plus forte affinité pour chacune des protéines que les surfaces traitées.

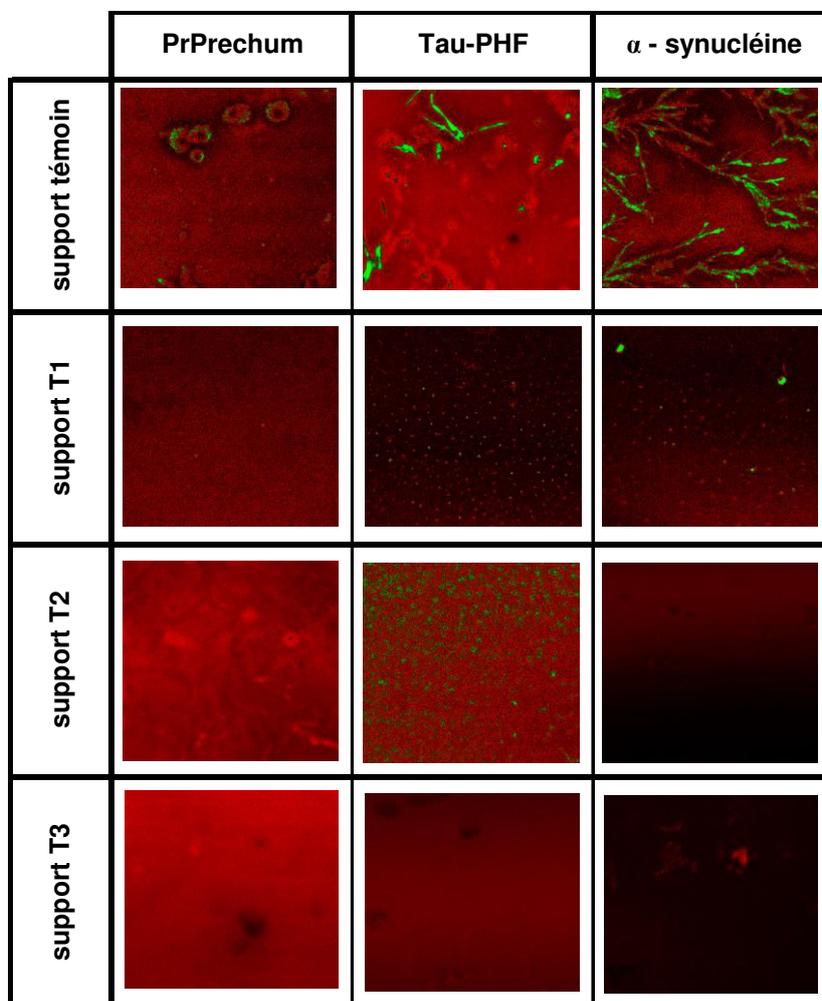


Figure IV.22 : Influence des propriétés des surfaces témoin et traités T1, T2 et T3 sur l'adsorption des protéines PrPrechum, Tau-PHF et α -synucléine

En comparant les supports traités T1, T2 et T3 pour chaque protéine, on constate que la PrPrechum a plus d'affinité pour les surfaces T2 et T3 que pour le support T1, la coloration étant plus prononcée sur ces traitements. Néanmoins, il semblerait que la fixation de la protéine soit plus homogène sur la surface T3 que sur la surface T2. Ces résultats confirment les analyses en détection ELISA puisque lorsque l'anticorps de capture n'est pas présent, la

détection est plus importante sur le support témoin que sur les surfaces traitées, mais les supports T2 et T3 ont un signal supérieur au support T1.

La protéine Tau-PHF s'adsorbe également moins sur les surfaces traitées que sur la surface témoin, les paires de filaments hélicoïdales n'apparaissant pas à l'image. Cependant, la fixation de la protéine Tau sur les surfaces T1 et T2 est homogène, ce qui est montré par la présence des points verts sur les images. Cette homogénéité peut alors expliquer que tous les types de supports donnent lieu à un fort signal de détection lorsque l'anticorps de capture n'est pas au préalable adsorbé à la surface des supports d'analyses.

Bien que les analyses en ELISA sandwich n'aient pas pu être réalisées dans leur intégralité sur la protéine α -synucléine, l'étude de l'affinité d'adsorption sur les différentes surfaces par microscopie confocale permet d'émettre une hypothèse quant à une détection possible de la protéine. Nous constatons que le support témoin fixe beaucoup plus la protéine que les supports traités. Ainsi, la détection de la protéine synucléine alpha réalisée avec les supports T1, T2 et T3 permettrait de réduire les bruits de fond liés à de faux positifs, et ce particulièrement pour les surfaces T2 et T3.

L'étude de l'affinité des différentes protéines pour les surfaces témoin et traitées confirme les analyses ELISA réalisées. Les fonctionnalisations des surfaces de polypropylène réduisent donc bien le bruit de fond relatif à des associations et adsorptions non spécifiques, les supports traités fixant en plus faible quantité les protéines par rapport à la surface témoin.

La deuxième série d'analyses réalisées sur les surfaces vise à évaluer l'adsorption de l'anticorps de capture de chaque protéine. En effet, l'objectif principal du projet est d'améliorer l'accroche des anticorps primaires et donc la détection des protéines antigéniques. L'observation de l'affinité de ces anticorps de capture pour les surfaces traitées permettra de comprendre l'amélioration des signaux de détection. La figure IV.23 présente les images obtenues par microscopie confocale des supports témoin et T1, T2 et T3 après immersion dans les différentes solutions aqueuses contenant chacune les anticorps de capture propres aux protéines Prion recombinante, Tau hyperphosphorylée et α -synucléine.

Les clichés de microscopie confocale obtenus après immersion dans les solutions d'anticorps présentent trois colorations différentes s'étendant du noir au vert. Comme mentionné précédemment, une coloration rouge ou verte est synonyme d'adsorption tandis que la couleur noire signifie qu'aucune molécule ne s'est fixée en surface.

Ainsi, le support témoin fixe moins l'anticorps de capture de la protéine Prion recombinante humaine que les supports traités T1, T2 et T3. En revanche, le traitement T3

présente des zones d'agglomération de l'anticorps primaire. Ceci pourrait expliquer les valeurs des densités optiques plus faibles que celles du support témoin obtenues en détection. Cette agrégation ne permettrait pas à l'antigène de se fixer correctement sur les récepteurs de l'anticorps de capture qui peuvent alors se retrouver masqués par l'agrégation. Le support fonctionnalisé par le traitement T2 présente une surface plus rouge que celle du traitement T1, rendant compte d'une meilleure fixation de l'anticorps primaire ainsi qu'une meilleure homogénéité. Ces résultats concordent avec ceux obtenus en détection où le support T2 donne lieu au signal optique le plus élevé.

L'adsorption de l'anticorps de capture de la protéine Tau-PHF entraîne une forte coloration verte sur les surfaces T1, T2 et T3 tandis que la surface témoin, bien que présentant une bonne homogénéité, ne semble pas autant fixer l'anticorps, la coloration étant rouge foncée. L'augmentation du caractère hydrophile de la surface de polypropylène semble améliorer la fixation de l'anticorps primaire. En comparant les trois traitements, on constate que la surface T3 présente une plus faible adsorption de l'anticorps ainsi qu'un effet de granulosité pouvant être dû à une fixation légèrement plus importante de ce même anticorps. Ceci étant en corrélation avec les résultats obtenus en détection où la valeur de la densité optique est légèrement inférieure à celles des deux autres traitements T1 et T2. Par ailleurs, comme observé en détection ELISA, les surfaces T1 et T2 présentent les meilleurs résultats. En effet, les deux surfaces sont recouvertes de façon très homogène et montrent une très bonne fixation de l'anticorps de capture.

| | Anticorps de capture de la PrPrechum | Anticorps de capture de la Tau-PHF | Anticorps de capture de l' α -synucléine |
|----------------|--------------------------------------|------------------------------------|---|
| support témoin | | | |
| support T1 | | | |
| support T2 | | | |
| support T3 | | | |

Tableau IV.23 : Influence des propriétés des surfaces témoin et traités T1, T2 et T3 sur l'adsorption des anticorps de capture des protéines PrPrechum, PrP-DVE et Tau-PHF

Lors de la détection de l'anticorps de capture associé à la protéine α -synucléine, le support témoin présentait une valeur de densité optique correcte bien qu'inférieure à celles obtenues avec les surfaces T2 et T3. Au contraire, la surface T1 ne semblait pas fixer l'anticorps de capture, son signal étant de l'ordre du bruit de fond. Ces résultats sont confirmés par les clichés de microscopie confocale. En effet, la surface T1 présente une coloration noire, montrant que rien ne s'est fixé à la surface des couches minces. Les groupements ammonium présents au sein du dépôt semblent repousser l'anticorps de capture. De plus, les images relatives aux surfaces T2 et T3 présentent, au vu de la coloration rouge, une bonne fixation de l'anticorps de capture de la protéine synucléine alpha.

En conclusion, les résultats présentés permettent de définir le support traité par le bromure d'hexatriméthylammonium (T1) comme étant le plus à même de répondre aux exigences du système de détection ELISA sandwich. Il permet en effet de réduire les bruits de fond parasites relatifs aux associations aspécifiques et améliore ainsi la valeur du signal de détection. De plus, il répond également à la nécessité d'effectuer une détection multiple, correspondant ici aux agents pathogènes de trois maladies neurodégénératives (Creutzfeld-Jakob, Alzheimer et Parkinson).

IV . Conclusion

L'objectif principal de ce projet est de fournir de nouveaux supports de détection permettant de pouvoir détecter plusieurs types de protéines pathogènes tout en réduisant les adsorptions aspécifiques pouvant donner lieu à des densités optiques incluant de faux positifs. Il a été montré précédemment, qu'en fonction de la nature de la protéine à détecter, les traitements T1, T2 ou T3 du support de PP permettent d'augmenter l'intensité du signal de détection, la sensibilité, et de diminuer le bruit de fond et donc les associations non spécifiques. En revanche, le support traité T3 vieillissant mal pour deux des protéines étudiées, il semblerait que les traitements T1 et T2 soient les plus appropriés à la détection multiple et répondent aux critères de sélection.

Conclusion générale

Conclusion générale

Le travail de ce projet de thèse était de créer de nouvelles surfaces bio-fonctionnelles permettant une meilleure sensibilité de détection des protéines (recombinantes, natives et infectieuses) des maladies neurodégénératives que sont les maladies de Creutzfeld-Jakob, Alzheimer et Parkinson. L'amélioration de la bio-adhésion de l'anticorps de capture à la surface des réglettes de détection et la compréhension des interactions surface-biomolécules se trouvaient au cœur de ces recherches.

Rappelons que pour détecter les agents pathogènes, le système ELISA met en jeu un premier anticorps dit de capture (ou primaire) qui se fixe à la surface de puits de dosage. Ce dernier va ensuite se lier avec la protéine infectieuse par un système de reconnaissance clé-serrure propre à chaque couple anticorps-protéines. Un anticorps secondaire (ou de détection) vient à son tour se fixer sur un autre épitope de l'agent pathogène et donne lieu au signal de détection.

Actuellement, la faible concentration de leur agent pathogène respectif dans les milieux lymphatiques et sanguins en début de maladie ne permet pas une détection suffisamment sensible par les systèmes immunoenzymatiques utilisés, comme les systèmes ELISA ou PCR. De plus, le manque de biocompatibilité des surfaces des supports de polypropylène utilisés ne permet pas aux biomolécules, particulièrement les anticorps primaires, de se fixer correctement, ni de façon homogène et donc n'autorise pas par la suite un seuil de détection plus faible, donc plus sensible, des protéines antigéniques pour lesquelles ils sont spécifiques. Par ailleurs, le polypropylène constituant les réglettes de détection ELISA possède un fort caractère hydrophobe qui engendre une répulsion plutôt qu'une adhésion des biomolécules, ces dernières possédant un caractère hydrophile.

Fort d'un savoir-faire du laboratoire dans le domaine de la physico-chimie des polymères et de la modification de surface de ces derniers aussi bien d'un point de vue chimique qu'au travers des plasmas dits « froids », une idée originale a été développée, associant dans le traitement des supports de polypropylène l'activation de leurs surfaces par plasma froid à un dépôt de couches minces sensibles et biocompatibles.

Dans un premier temps, les expériences menées sur l'optimisation des paramètres de décharges pour l'activation des surfaces de polypropylène ont permis de définir l'hélium

comme gaz efficace d'activation avec de bonnes répétabilités et stabilités des traitements dans le temps, avec comme paramètres à $p=10^{-2}$ mbar : $P=60W$, $d=60sccm$, $t=60s$. Les radicaux libres obtenus à la surface des supports de détection de polypropylène sont répartis de manière homogène et accroissent le caractère hydrophile du polypropylène, la valeur de l'énergie polaire de surface passant de $1mJ.m^{-2}$ à $36mJ.m^{-2}$. La présence d'impuretés (Si, Na, Cl, S) relevée par spectrométrie des rayons X a été assignée aux appareils et ustensiles utilisés durant l'analyse. Par ailleurs, les mesures AFM ont permis de montrer une augmentation de la rugosité du polypropylène permettant une meilleure fixation des dépôts de couches minces.

Dans un second, nous nous sommes intéressés aux dépôts de couches minces. La fonctionnalisation de la surface des supports alors activée s'est orientée sur le choix de trois molécules amphiphiles dont les parties hydrophiles possèdent des dérivés amines chargés ou non, et des longueurs de chaînes hydrophobes allant de 4 à 16 carbones et possédant ou non des doubles liaisons C-C. Ceci afin d'obtenir le support de détection possédant la surface dont l'hydrophilie, l'épaisseur, la rugosité et la biocompatibilité serait la plus adaptée aux milieux biologiques considérés pour chaque maladie neurodégénérative étudiée et la plus à même de fixer avec une bonne répartition les biomolécules d'intérêt. La maximalisation des paramètres de fonctionnalisation des surfaces de polypropylène en fonction de la concentration molaire, du temps d'immersion et de la valeur de l'angle de contact relatif au caractère hydrophile a permis d'obtenir des surfaces stables et homogènes. Les mesures par goniométrie ont montré que les surfaces possèdent une énergie polaire de surface leur conférant un caractère semi-hydrophile permettant de lier les anticorps sans pour autant repulser les agents pathogènes. Les mesures réalisées en potentiel zêta ont montré que les surfaces se stabilisaient plus rapidement que sans traitement, particulièrement les traitements T1 et T2 dont les valeurs de potentiel zêta à $pH=7.4$ et $pH=9.6$ confirme la stabilité du dépôt de couches et permettra donc une meilleure interaction avec les biomolécules d'intérêts. Les analyses MEB et AFM ont confirmé la répartition homogène de la couche minces et l'augmentation de l'épaisseur et de la rugosité de la surface. Les essais de stérilisation ont montré une différence de réactivité vis-à-vis du gaz choisi pour stériliser les supports, à savoir l'éthylène oxyde. En effet, bien que les valeurs d'angles de contact mesurées par goniométrie soient restées proches de celles avant stérilisation pour le support brut de polypropylène et le T1, elles ont fortement variées pour les traitements T2 et T3 qui présentent après stérilisation une augmentation du caractère hydrophobe de 60% et 39%, respectivement ; il serait judicieux d'étudier par XPS le

changement de la composition de ces surfaces, voire de définir un autre protocole de stérilisation plus à même de ne pas altérer les dépôts de couches minces.

L'objectif de ces travaux étant d'améliorer la sensibilité de détection des protéines neurodégénératives, nous avons réalisé une série d'expérience ELISA au sein des centres hospitaliers universitaires de Liège et de Lyon. Les différents traitements ont été évalués selon les protocoles propres à chaque entité antigénique. Nous avons constaté que le milieu biologique (solution tampon, solution protéique) ainsi que le comportement de chaque anticorps et protéine pathogène influençait directement la détection. En effet, selon le traitement T_x considéré, les seuils de détection n'étaient pas franchis par le même dépôt de couches minces. Le tableau ci-après présente les ordres de détection pour chaque traitement en fonction de la biomolécule à détecter.

| Biomolécules considérée | Ordre de détection des traitements |
|--------------------------------|---|
| PrPrechum | T2 > T1 > T3 ~ PP |
| PrP-DVE | T3 > T1 > T2 >> PP |
| Tau-PHF | T1 > T3 > T2 > PP |
| Acc- α sin | T2 > T3 >> T1 ~PP |

En nous basant sur ces résultats tout en prenant en compte les essais réalisés sur la stérilisation, nous pouvons considérer que le traitement T1, dans l'optique où un seul traitement permettrait de réaliser un kit de multidiagnostic, serait le plus à même de répondre à nos attentes.

Les expériences réalisés et les analyses physico-chimiques (XPS, MEB, AFM...) associées ont permis de mettre en évidence l'efficacité du traitement T1 réalisé avec le bromure d'hexatriméthylammonium dont la longueur de chaîne et le dérivé amine de sa partie hydrophile donne lieu à une surface fonctionnalisée homogène, biocompatibilité, non toxique et de rugosité suffisante pour améliorer l'accroche des anticorps primaires de chaque maladie neurodégénérative et donc un meilleur taux de détection des agents infectieux correspondant. Les résultats obtenus présentant une augmentation de la sensibilité de détection de 66% à 98% par rapport au support initial.

Au devenir, il serait intéressant de réaliser des analyses pH par mesures de l'angle de contact d'une goutte de solution tamponnée afin de déterminer le caractère acido-basique des surfaces traitées et d'associer ces résultats à ceux obtenus par mesure du potentiel d'écoulement. Dans le but de mieux comprendre comment la surface modifiée interagit avec les biomolécules d'intérêt, il faudrait pouvoir évaluer avec certitude l'épaisseur du dépôt de couches du traitement T1 par des mesures en ellipsométrie et de confirmer les types et les modes d'interactions qui se créent entre le dépôt de couches à la surface des supports de polypropylène au travers d'études de modélisation numérique. Des études cinétiques par SPRi permettraient d'évaluer le temps d'accroche de chaque biomolécule et les images correspondantes pourraient être associées aux études menées en microscopie confocale. Ceci dans le but de créer des surfaces fonctionnalisées encore plus biocompatibles et plus sensibles.

