Définition d'un biocapteur

Le capteur

Mesure et instrumentation

Microfluidique

Combinaison acoustique-optique

Mesures

Combinaison acoustique/sonde locale

Plasmons à λ variable

Conclusions

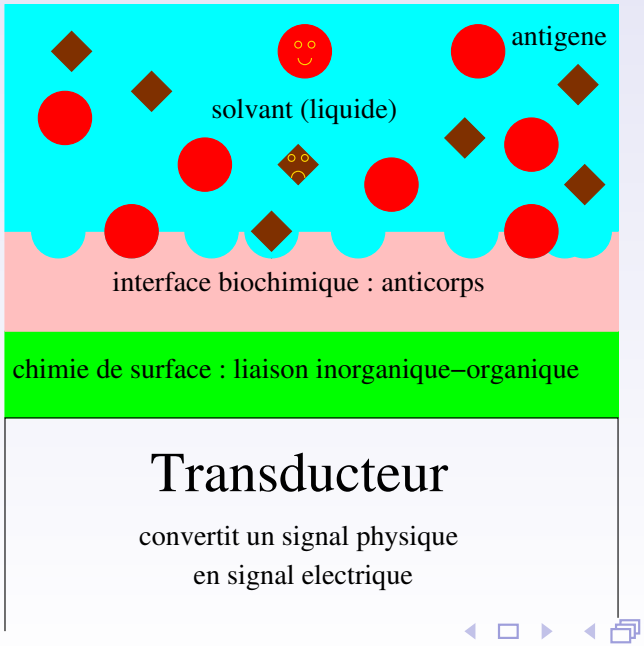
Mesure des propriétés physiques de couches minces biologiques et chimiques

J.-M Friedt (L. Francis, K.-H. Choi, F. Frederix, Z. Cheng, K. Bonroy, W. Laureyn, G. Reekmans, C. Bartic, A. Campitelli, G. Borghs)

24 mai 2005

Le biocapteur

- traduit un signal chimique en signal physique
- nécessite pour cela un capteur (plasmon, miroir resonant, QCM, SAW, microlevier, AFM, électrochimie si enzyme ...) : **sensibilité**
- et des couches chimique (liaison inorganique-organique : thiols, silanes, dendrimères ...) et biologique (anticorps attaché par liaison électrostatique, hydrophobe, covalente ...) : **sélectivité**
- une instrumentation appropriée (microfluidique, mesure du signal à analyser et traitement du signal)

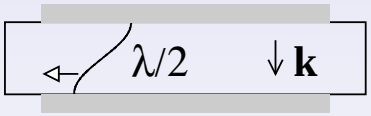


La physique du capteur

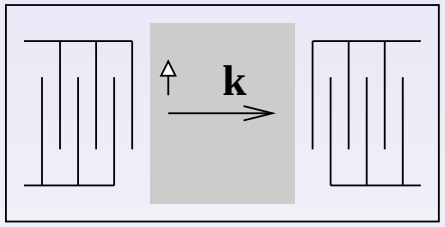
Solutions commerciales (basées sur des technologies simples à mettre en œuvre) :

- plasmons de surface ($\gg$ellipsométrie) : Biacore, Ibis & Autolab, TI Spreeta
- ellipsométrie en milieu liquide, miroir résonant (IAsys)
- acoustique : Maxtek, QSense (microbalance à quartz)

QCM (c=constant)



SAW device (λ=constant)



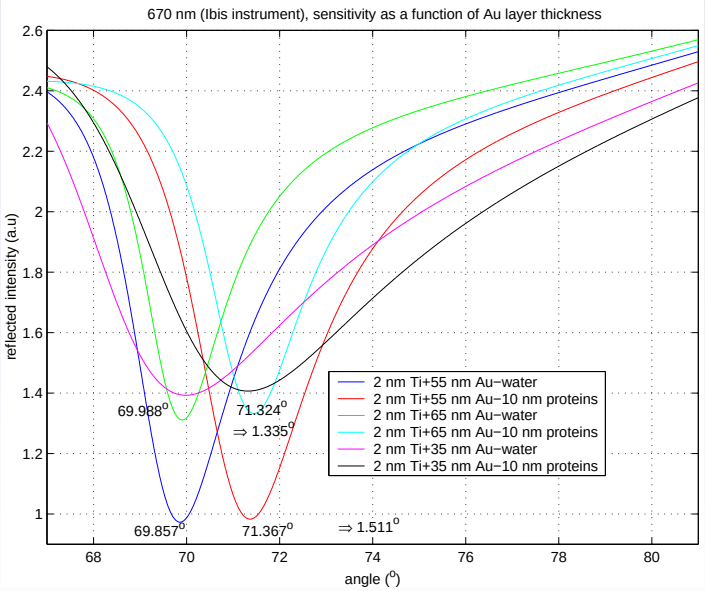
$$\left.\begin{array}{r} \text{QCM} : \Delta m \rightarrow \Delta\lambda \rightarrow \Delta f \\ \text{SAW} : \Delta m \rightarrow \Delta c \rightarrow \Delta\Phi \rightarrow \Delta f \end{array}\right\} \text{n'inclut que effets de masse}$$

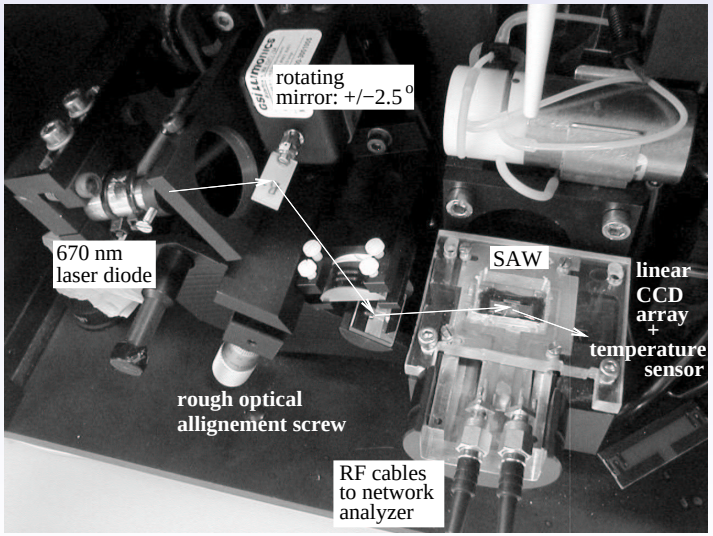
(viscosité ?)

E. Gizeli, and C.R. Lowe (Ed), *Biomolecular Sensors* Taylor & Francis, London (2002)

Plasmons de surface (SPR)

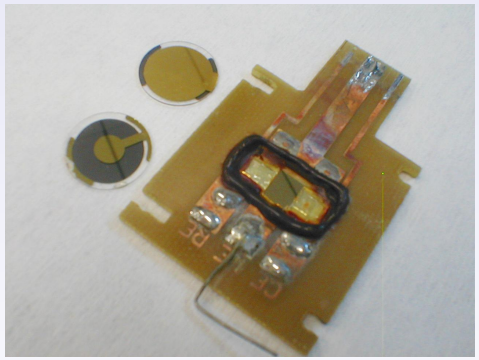
- Génération d'une onde électromagnétique évanescente sur un fin film métallique déposé sur un diélectrique (Kretschmann)
- nécessité de coupler l'onde incidente à l'angle plasmon ($>$ Brewster $\Rightarrow$ prisme/réseau)
- observation de la réflectivité en fonction de l'angle (balayage/barette CCD)
- l'angle de couplage varie ($\simeq$ 100m^o-1°) avec la présence d'une couche diélectrique sur la surface sensible (protéines, polymère, ...)

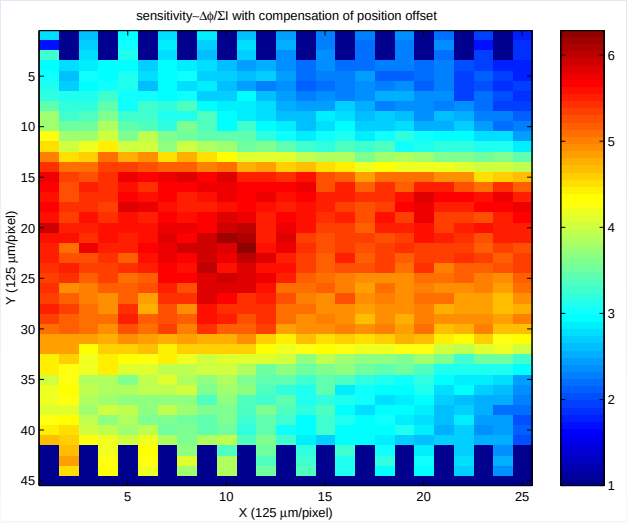


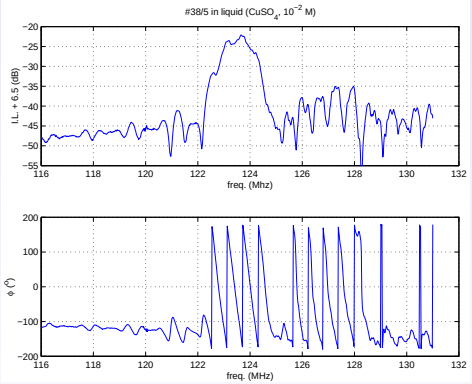


Onde de Love (SAW)

- Onde acoustique guidée (SiO2, parylene, PMMA, SU8 ...)
- Électrodes isolées par la couche guidante
- Onde transverse peu sensible aux interactions visqueuses (-3 dB avec l'eau)
- Coefficient thermique modeste



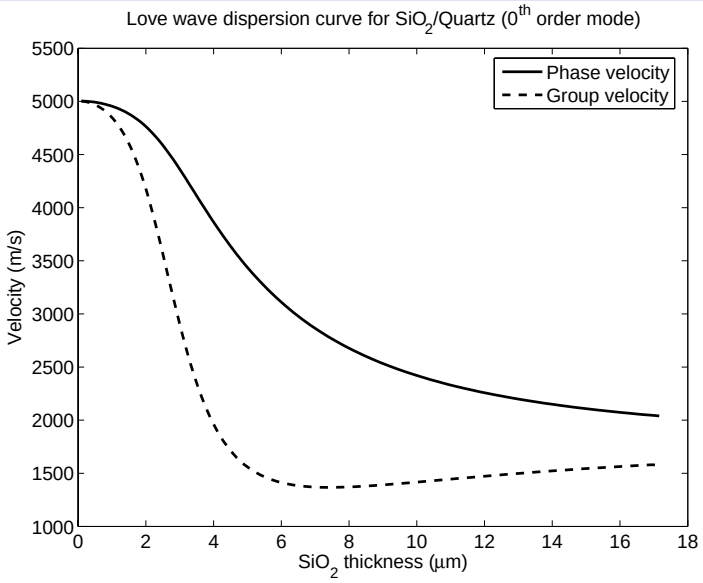


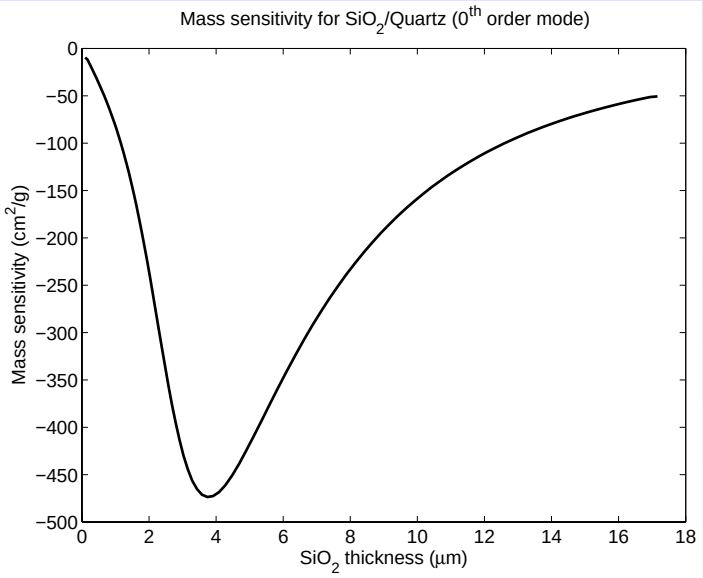


A. C. Hillier, and M. D. Ward, *Scanning electrochemical mass sensitivity mapping of the quartz crystal microbalance in liquid media*, Anal. Chem. **64** 2539- (1992), `http://www1.cems.umn.edu/research/ward/Publications/Publications.html`

Onde de Love (SAW)

- Onde de Love : onde de cisaillement (SSBW) guidée dans une couche fine
- La célérité de l'onde varie en fonction de l'épaisseur de la couche guidante $\Rightarrow$ la sensibilité aussi (comme gradient de la vitesse de groupe)





Vitesses : modèle en ligne de transmission (L densité, $1/C$ rigidité)

$S = \frac{1}{\rho h} \times \frac{v_g - v}{v}$ (modèle d'interaction rigide)

Définition d'un biocapteur

Le capteur

Mesure et instrumentation

Microfluidique

Combinaison acoustique-optique

Mesures

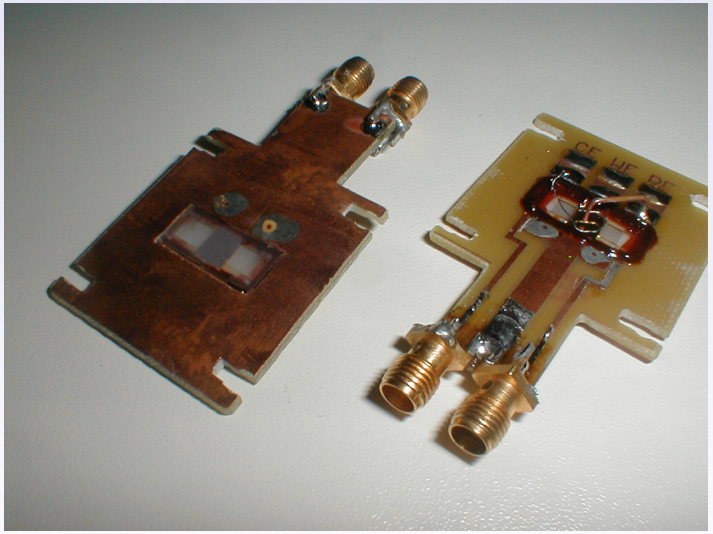
Combinaison acoustique/sonde locale

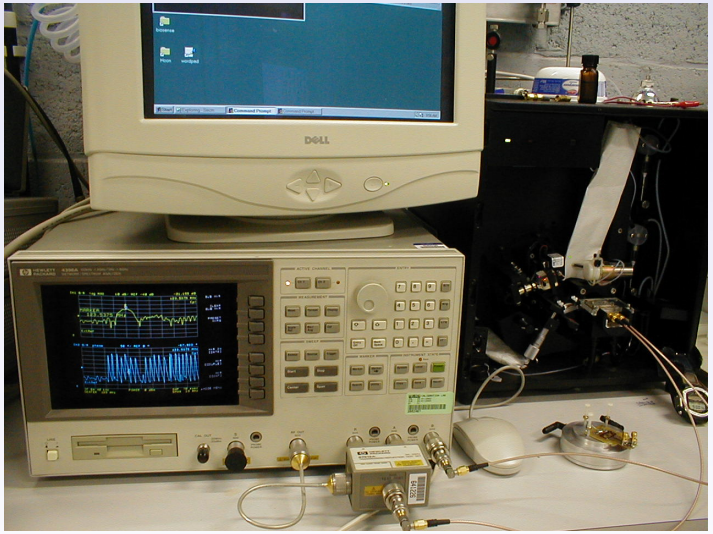
Plasmons à λ variable

Conclusions

Méthodes de mesure

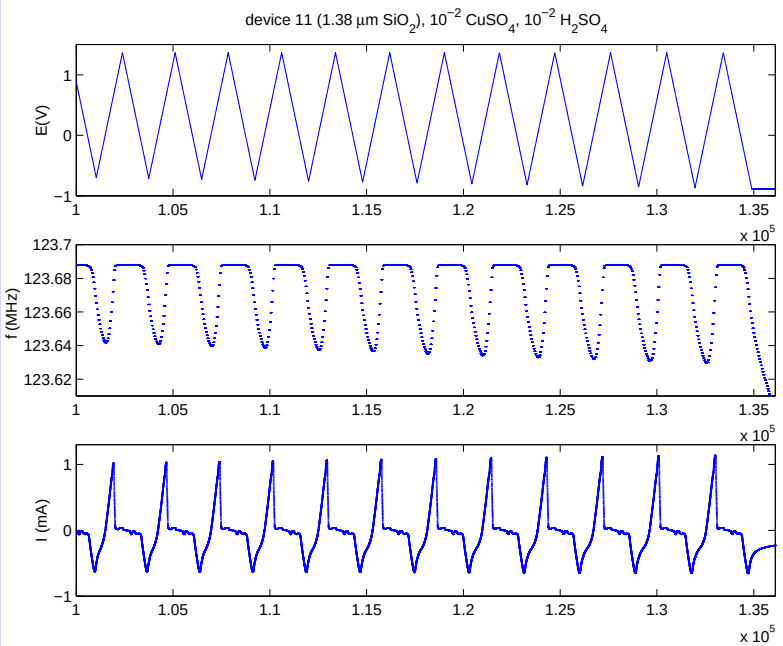
- Informations acquises : variation de fréquence, pertes d'insertion
- Méthode : analyseur de réseau à fréquence donnée, mesure dans une portion où la relation phase-fréquence est linéaire (problème de la boucle fermée : AGC pour avoir l'amplitude).
- Résolution temporelle : $\simeq$ 1 point/s





Électrodéposition (Cu)

- Cycles successifs de déposition et dissolution du cuivre sur électrode de travail (Au)
- Électrode de référence : fil de Cu (couple Cu/Cu^{2+})
- Contre-électrode : boucle de fil de Pt



$$m_{Cu} = \frac{\sum I \times \delta t}{N \times e} \times \frac{M_{Cu}}{n_e}$$

$N \times e = 96440$ C : 1 Faraday

$M_{Cu} = 63.5$ g/mol, $n_e = 2$

mais $\Delta m = m_{Cu} + m_{fuite}$ avec

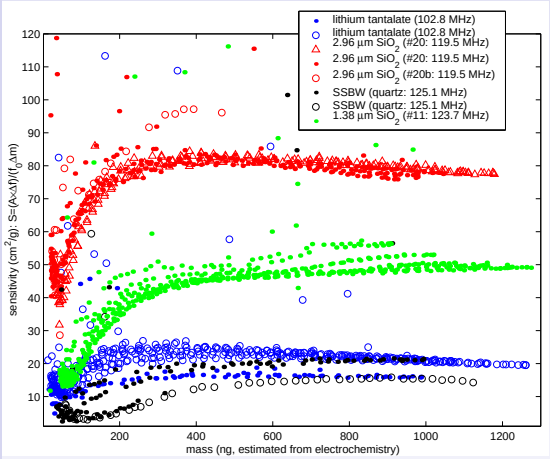
$$m_{fuite} = \frac{I_{fuite}}{N \times e} \times \frac{M_{Cu}}{n_e}$$

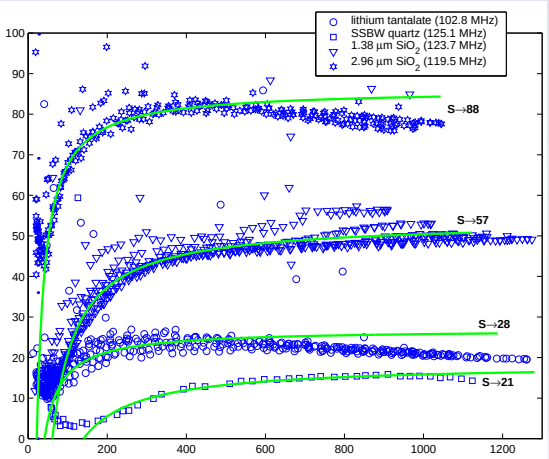
Conclusion : $S_{observé} = \frac{\Delta f}{f_0} \times \frac{A}{\Delta m} = S_{th} \times \frac{m_{Cu}}{m_{Cu} + m_{fuite}}$

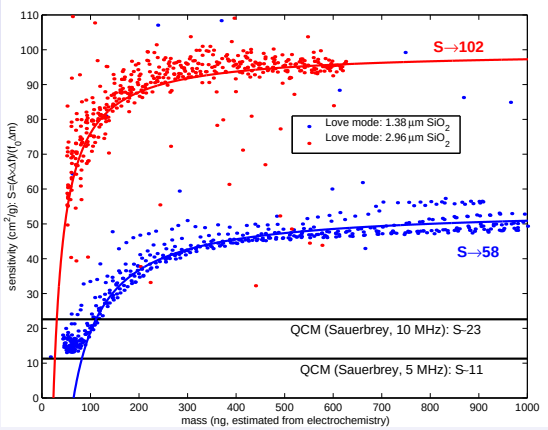
Sensibilité à la charge massique

La conversion de signal (phase/fréquence) en densité surfacique de masse est fondamentale.

$$S = \frac{\Delta f}{f_0} \times \frac{A}{\Delta m} \ \mathrm{cm}^2/\mathrm{g}$$







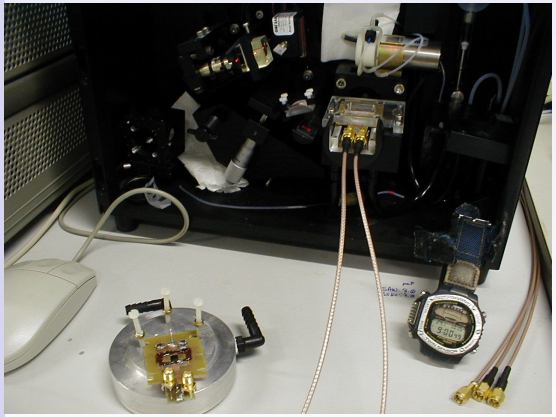
Notre méthode de calibration : électrodéposition (mesure de la masse Δm par le courant circulant dans le potentiostat)

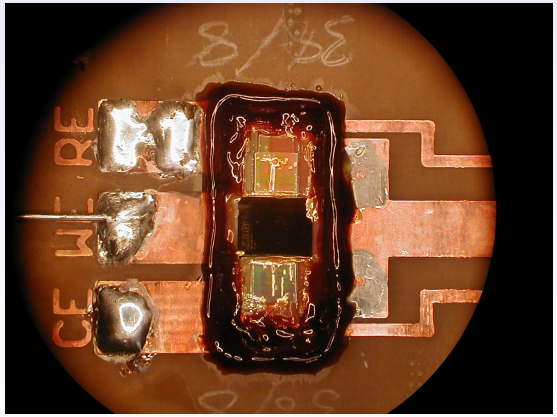
J.-M. Friedt, L. Francis, K.-H. Choi, and A. Campitelli, *Combined Atomic Force Microscope and Acoustic Wave Devices : Application to Electrodeposition*, JVST A **21** (4), 1500- (July-Aug. 2003)

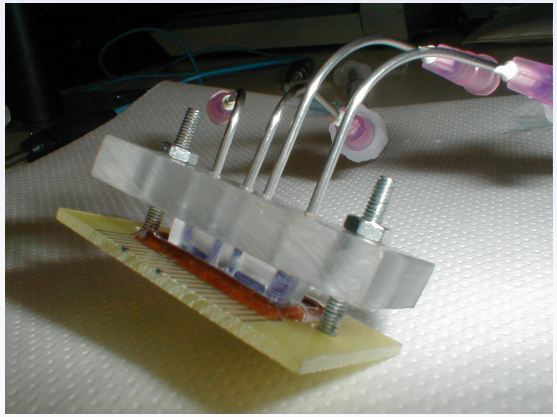
Définition d'un biocapteur
Le capteur
Mesure et instrumentation
Microfluidique
Combinaison acoustique-optique
Mesures
Combinaison acoustique/sonde locale
Plasmons à λ variable
Conclusions

La fluidique

- Détermine la stabilité du signal et donc la limite de détection (cf Biacore et QSense)
- Notre approche : une microfluidique compatible avec le capteur (SU8), suivi d'une macrofluidique pour l'interface avec le monde (PDMS+plexiglas)
- Un capteur de masse est aussi sensible à la *pression hydrostatique* $\Rightarrow$ niveau de liquide/pression constant
- objectif ultime : fonction de filtrage ? (éliminer les cellules p.ex)



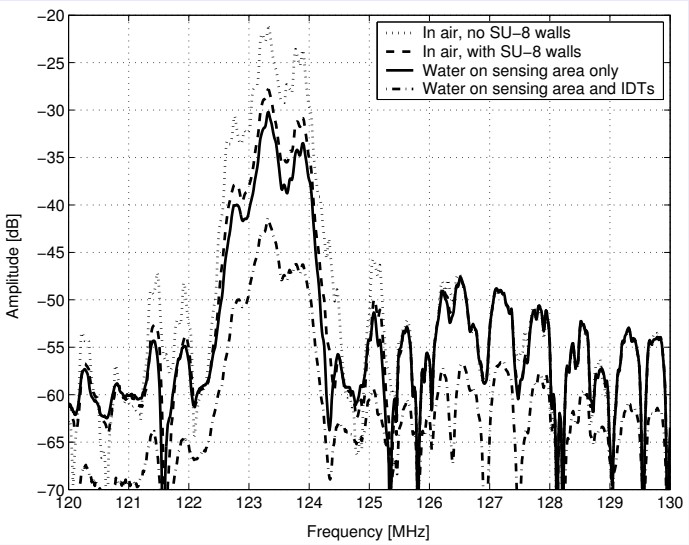


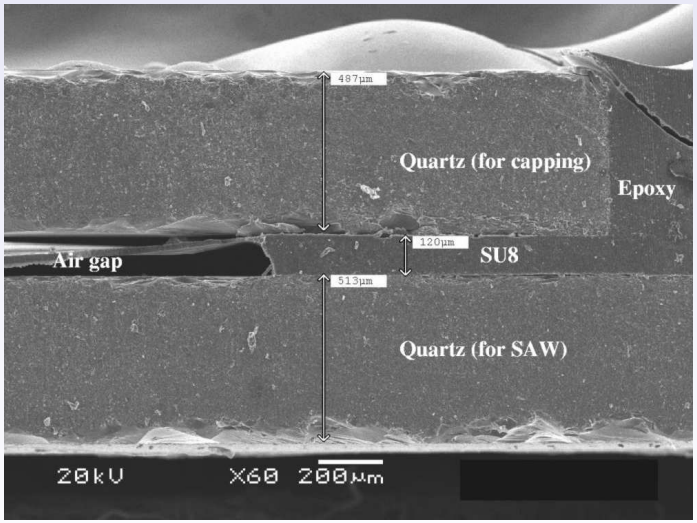


Importance de protéger les transducteurs

- Un mur de SU8 (120 μm épaisseur, 50-100 μm de largeur) sur le chemin acoustique protège les IDTs
- Collage d'une plaque de quartz (5×5 mm^2) sur le SU8 pour fermer la protection des IDTs
- La même epoxy couvre le bord des dispositifs pour protéger les fils de connexions et former une cuvette

$\Rightarrow$ **effet de contamination sur la chimie de surface ?**



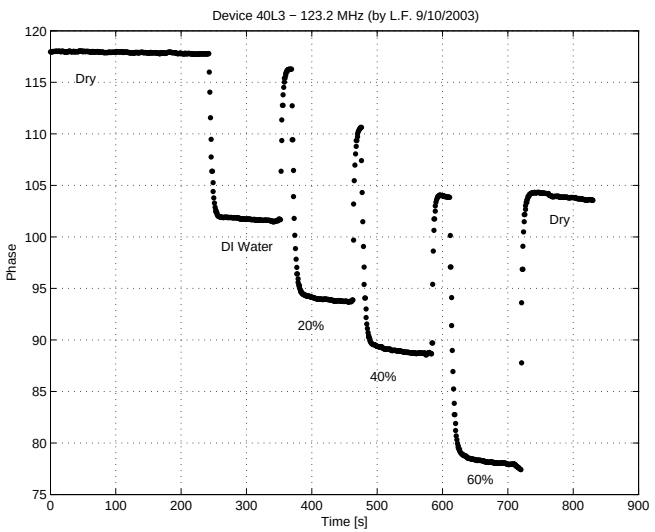


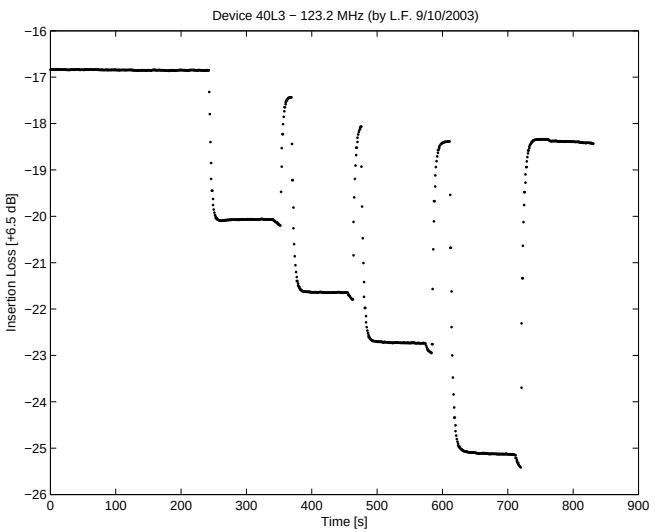
L. Francis, J.-M Friedt, C. Bartic, and A. Campitelli, *A SU8 liquid cell for surface acoustic waves biosensors*, SPIE Photonics Europe 2004, Strasbourg (France), 26-30 Avril 2004

Comment différencier masse de viscosité ?

Définition d'un biocapteur
Le capteur
Mesure et instrumentation
Microfluidique
Combinaison acoustique-optique
Mesures
Combinaison acoustique/sonde locale
Plasmons à λ variable
Conclusions

Nous (au départ) : tout n'est que masse
Saha & Gizeli : tout n'est que viscosité ? !



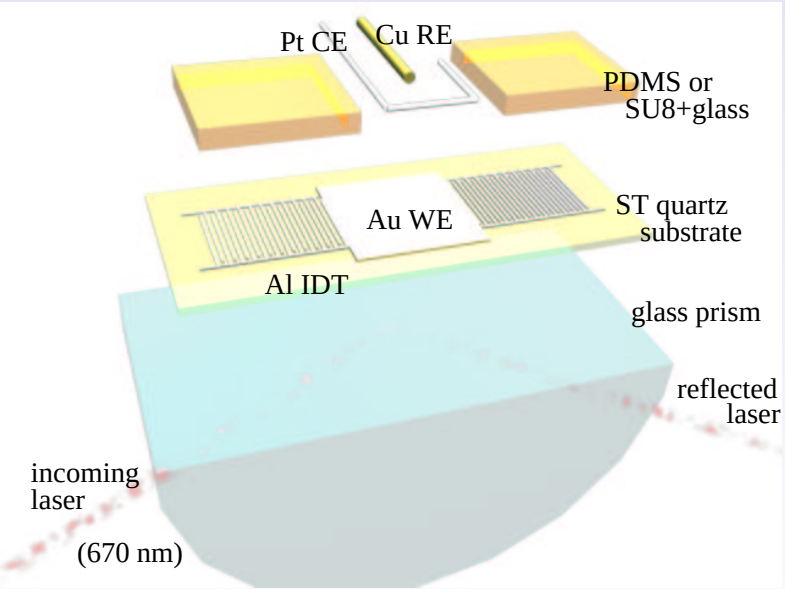


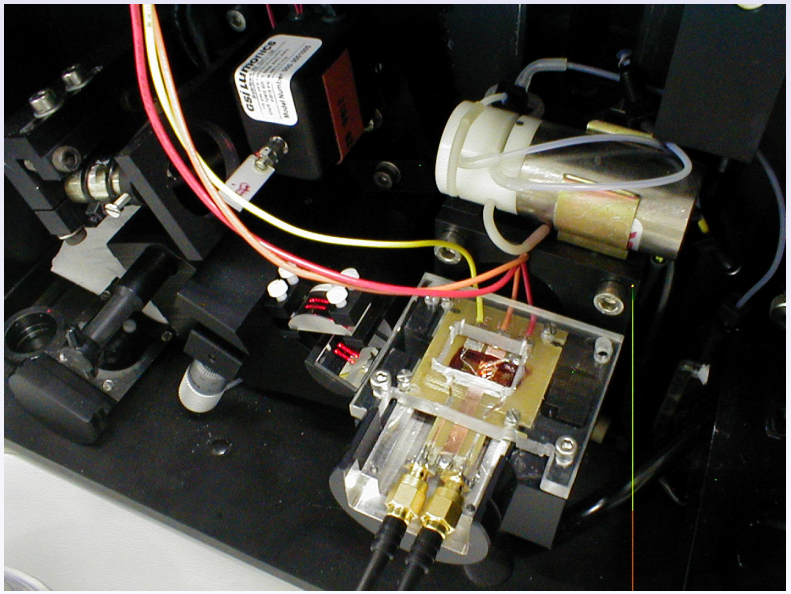
Il faut plus de données pour séparer les deux paramètres
$\Rightarrow$ déterminer indépendamment l'épaisseur de la couche

K. Saha, F. Bender, A. Rasmusson, and E. Gizeli, *Probing the Viscoelasticity and Mass of a Surface-Bound Protein Layer with an Acoustic Waveguide Device* Langmuir **19** (4), 1304-1311 (2003)

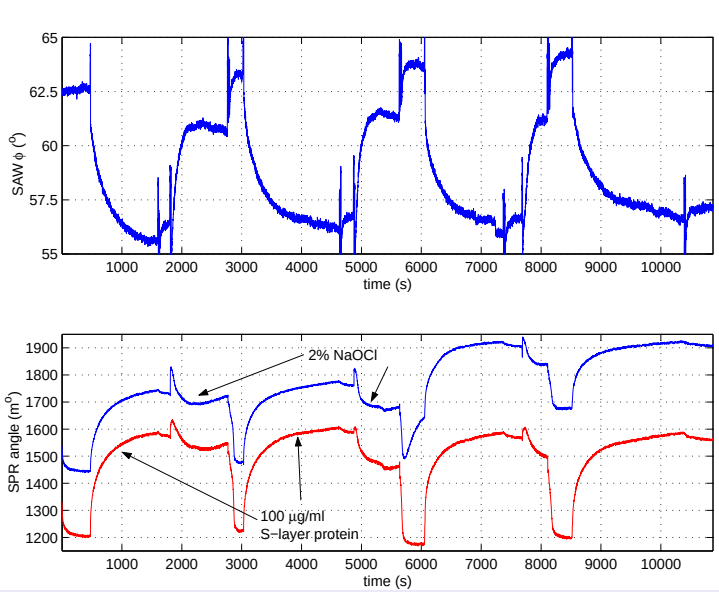
Plasmon à longueur d'onde fixée

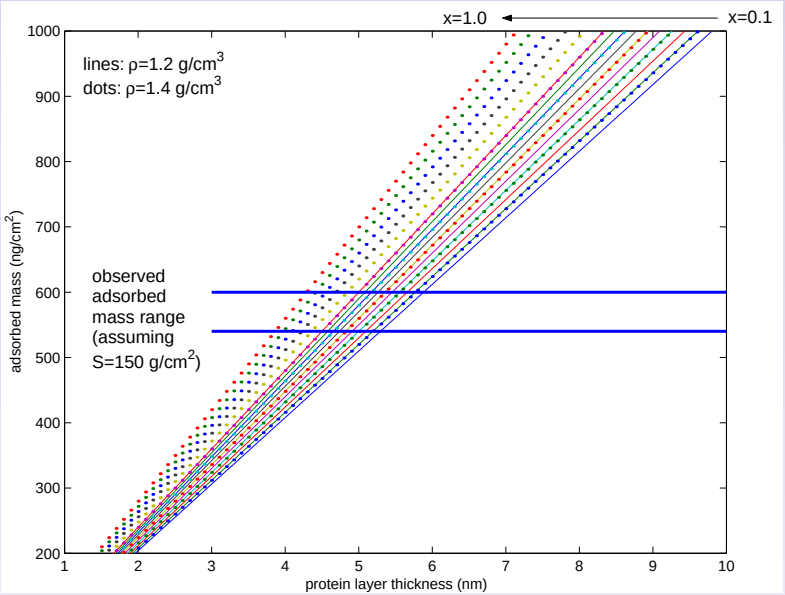
Principe : la région sensible du SAW est couverte de 10 nm Ti/55 nm Au
$\Rightarrow$ électrode de travail (électrochimie) ou à la masse (influence des ions du buffer)
$\Rightarrow$ supporte un plasmon de surface
$\Rightarrow$ le prisme + huile d'adaptation d'indice optique absorbe toute onde acoustique de volume et agit comme radiateur





SAW/SPR : S-layer

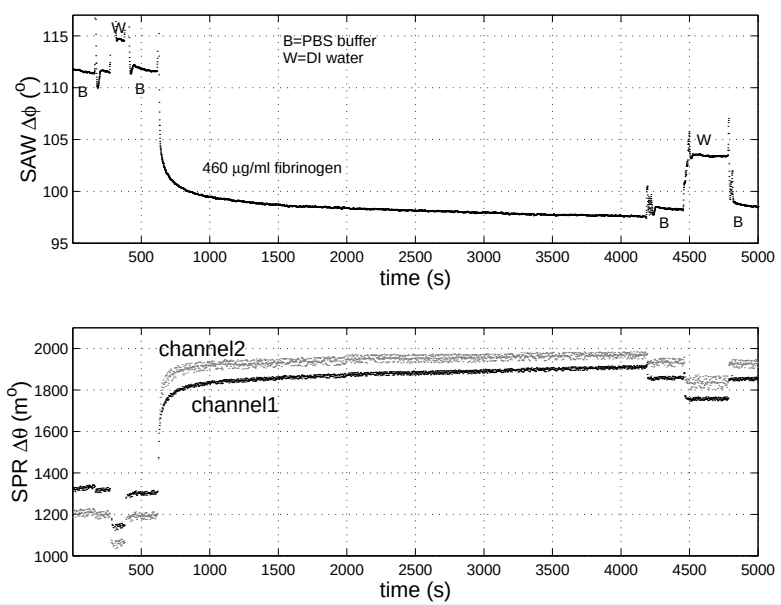




1. mesure expérimentale de la sensibilité du capteur acoustique
2. mesure de la phase ($\rightarrow$ fréquence) SAW et angle plasmon pendant la réaction
3. tracer un abaque reliant ces signaux expérimentaux à l'épaisseur d et concentration de solvant x de la couche adsorbée
4. recherche *l'unique* couple (x, d) vérifiant les mesures expérimentales

J.-M Friedt, L. Francis, G. Reekmans, R. De Palma, A. Campitelli, and U.B. Sleytr, *Simultaneous surface acoustic wave and surface plasmon resonance measurements : electrodeposition and biological interactions monitoring*, J. Appl. Phys. **95** (4) 1677-1680 (15 February 2004)

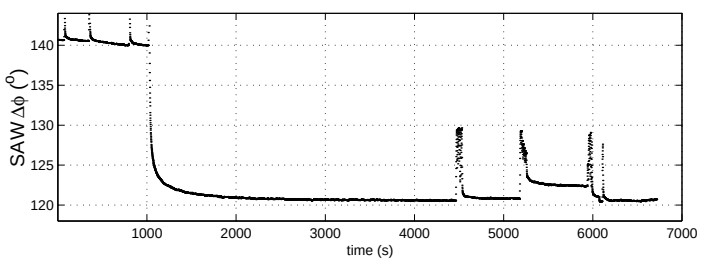
SAW/SPR : fibrinogène

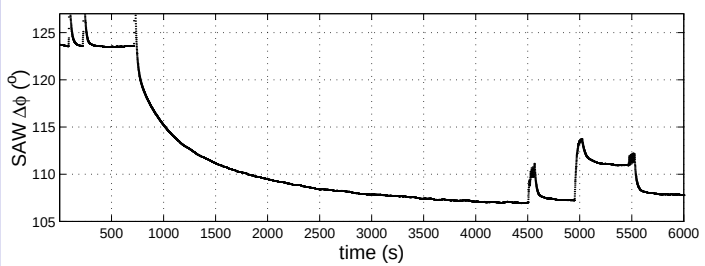


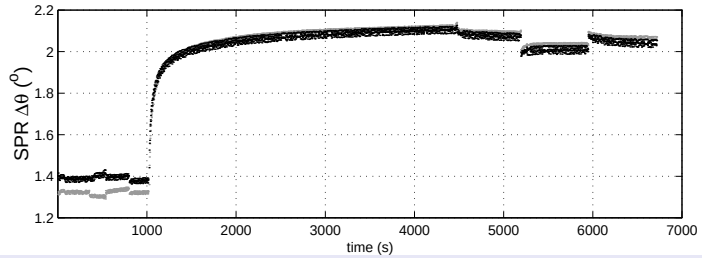
460 μg/ml : 650 mdeg, 1500 ng/cm^2

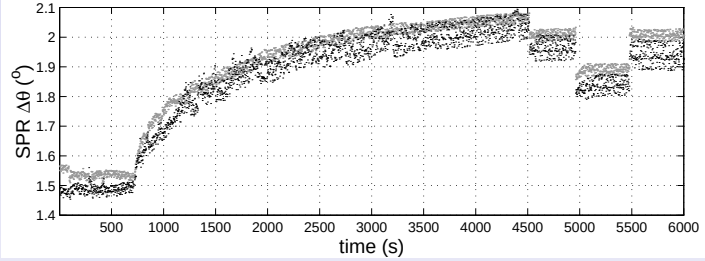
.3	22.5	2520	
.3	19.8	2218	
.4	16.5	1914	
.4	14.7	1705	
.5	13.2	1584	$\leftarrow$ 50%$\pm$10%
.5	11.7	1404	$\leftarrow$
.6	11.0	1364	
.6	9.8	1215	
.7	9.5	1216	
.7	8.5	1088	
.8	8.4	1109	
.8	7.4	977	
.9	7.5	1020	
.9	6.7	911	
1.0	6.7	938	
1.0	6.1	854	

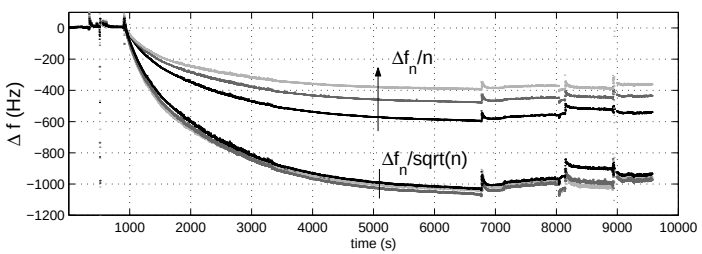
SAW/SPR : collagène

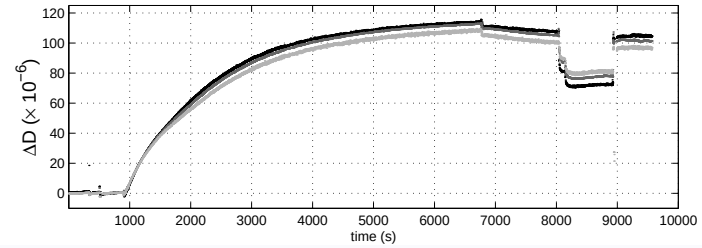


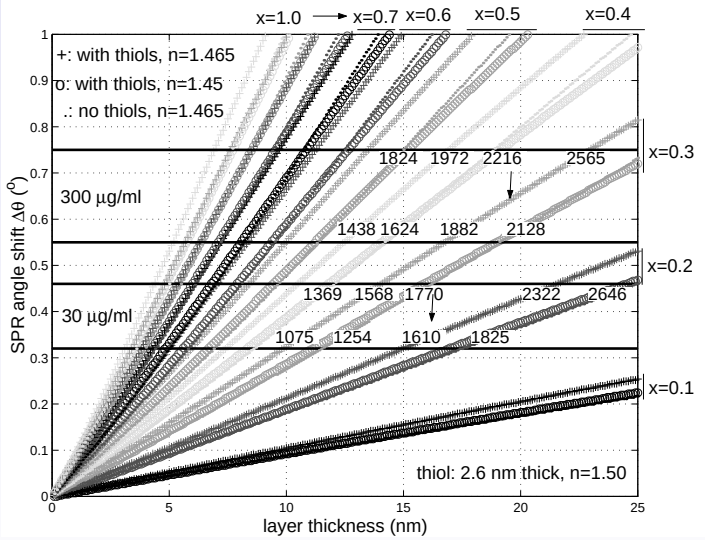










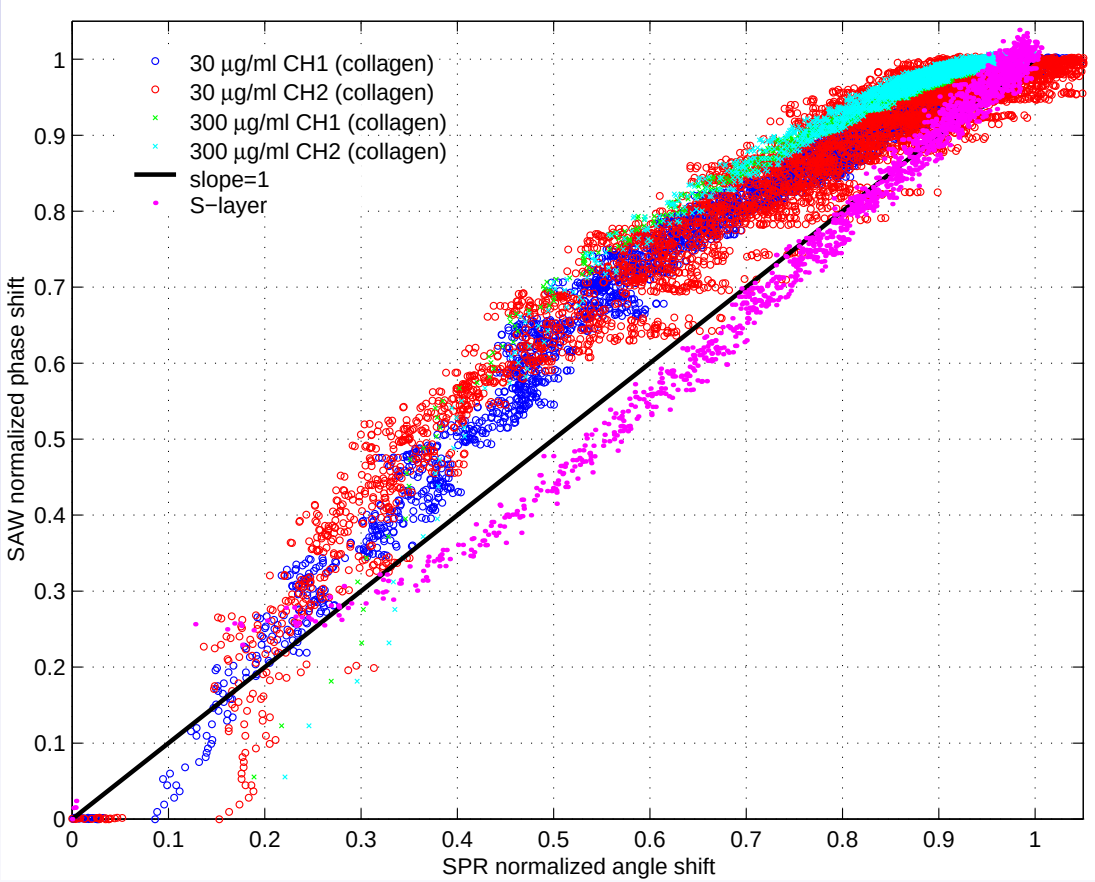


QCM : les variations de fréquence normalisées par $\sqrt{(n)}$ se superposent

QCM : dissipation élevée

Plasmon à longueur d'onde fixée : cinétique

Définition d'un biocapteur
Le capteur
Mesure et instrumentation
Microfluidique
Combinaison acoustique-optique
Mesures
Combinaison acoustique/sonde locale
Plasmons à λ variable
Conclusions



La relation des signaux SPR-SAW normalisés n'est pas la première bissectrice dans le cas du collagène !

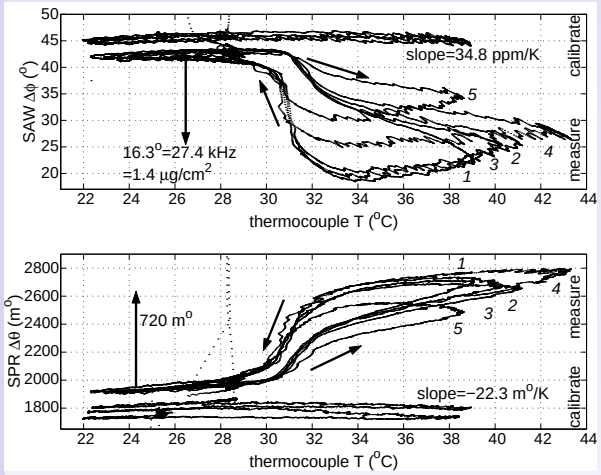
Cas des différentes concentrations en solvants

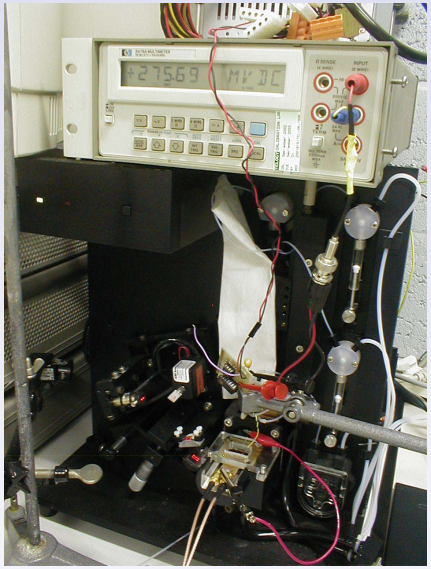
- S-layer, IgG : comportement de masse rigidement liée (Sauerbrey)
- collagène : présente un comportement fortement visqueux
- fibrinogène : entre les deux ...

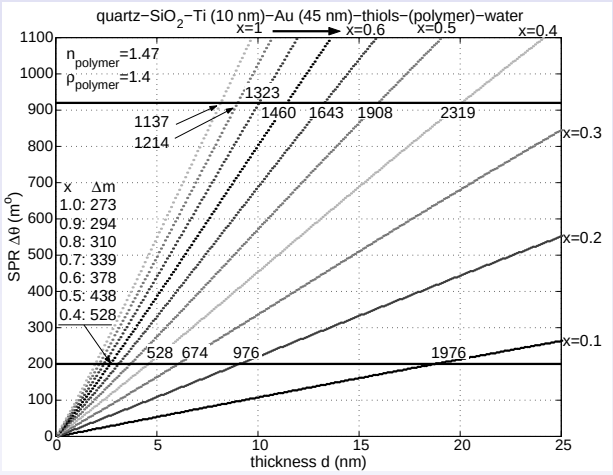
Analyte (bulk concentration, μg/ml)	surface density (ng/cm^2)	d (nm) SAW/SPR	x (%) SAW/SPR	$\Delta f_n/\sqrt{n}$ (Hz) QCM	$\Delta f_n/n$ (Hz) QCM	ΔD ($\times 10^{-6}$) QCM
Cu		2 − 12	?	?-1000	NO	50
S-layer	560±20	4.7 ± 0.7	75 ± 15	NO	45=900	3-5
CTAB	135±15	1.0 ± 0.1	100	NO	8=160	0.2-0.5
collagen (30μg/ml)	1750±150	16.0 ± 3.0	25 ± 15	1000	NO	100
collagen (300μg/ml)	2100±200	19.0 ± 3.0	35 ± 10	1200	NO	>120
fibrinogen (46μg/ml)	750±100	6.0 ± 1.5	50 ± 10	110±5	55±5≃ 1110	4-10
fibrinogen (460μg/ml)	1500±500	13.0 ± 2.0	50 ± 10	NO	100=1700	8-10

Exemple d'un polymère

Le pNIPAAM est un polymère qui change de conformation (hydrophobie) avec la température.



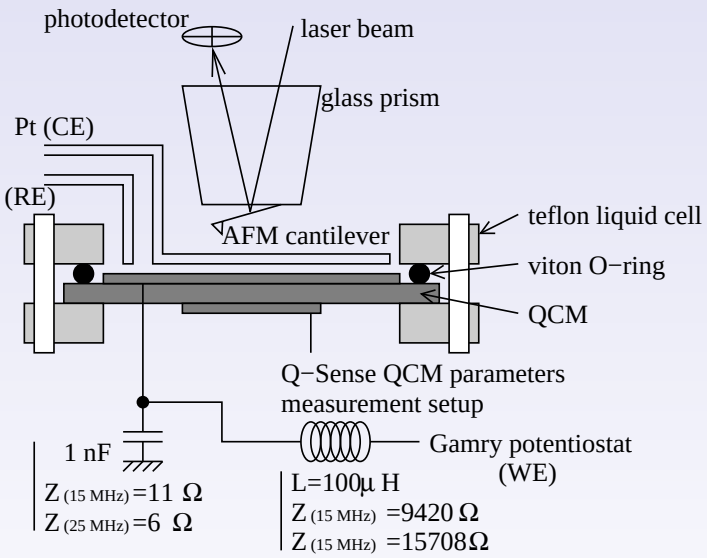


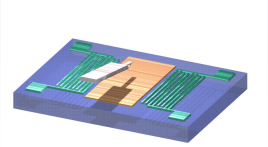


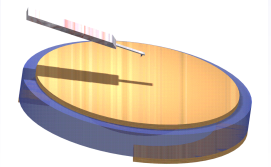
Acoustique/sonde locale

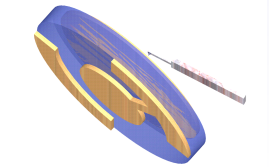
Objectif : comparer une information globale (cm^2), intégrée sur une large surface, et une information locale (morphologie/épaisseur de couche)

Problème : encombrement du levier de microscopie+support (prisme pour détection optique)









Définition d'un biocapteur

Le capteur

Mesure et instrumentation

Microfluidique

Combinaison acoustique-optique

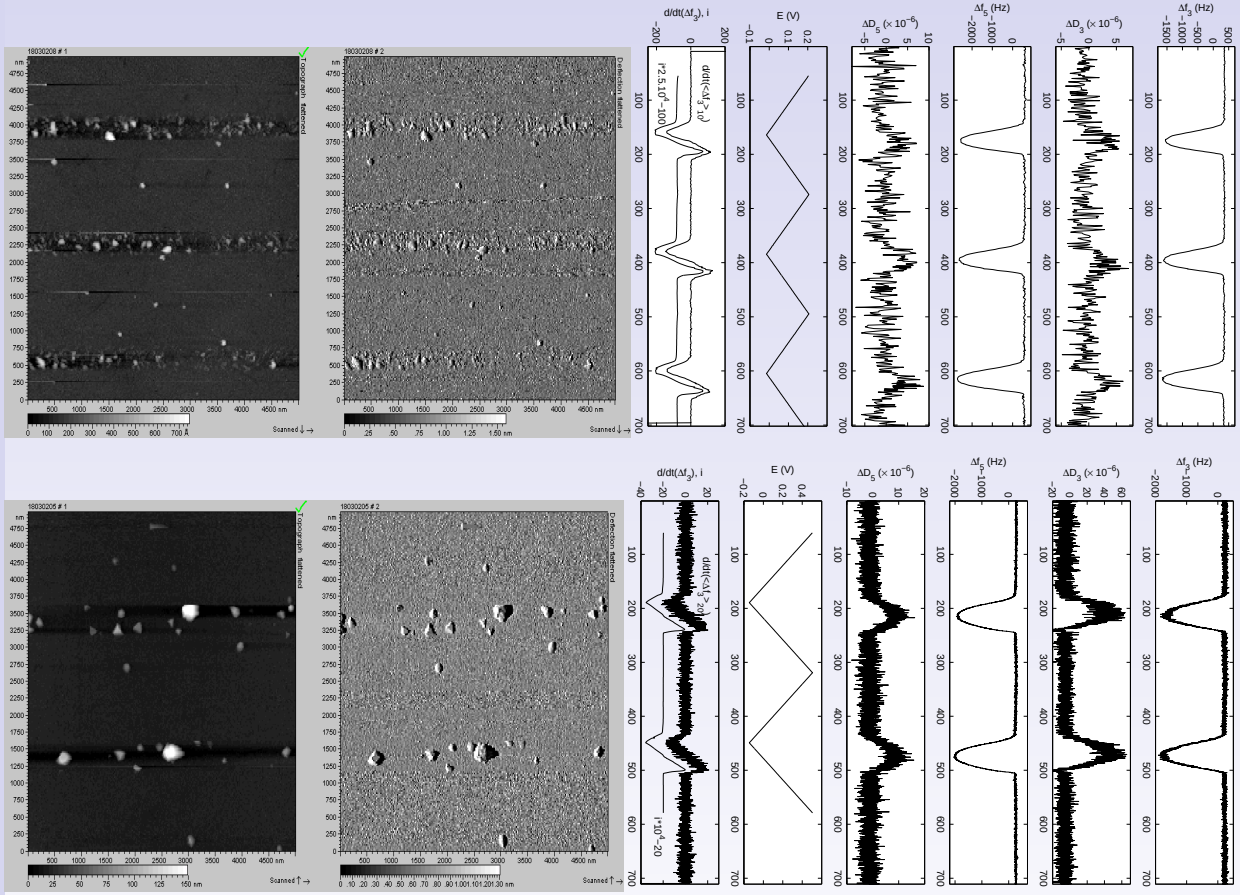
Mesures

Combinaison acoustique/sonde locale

Plasmons à λ variable

Conclusions

Acoustique/sonde locale : électrodéposition

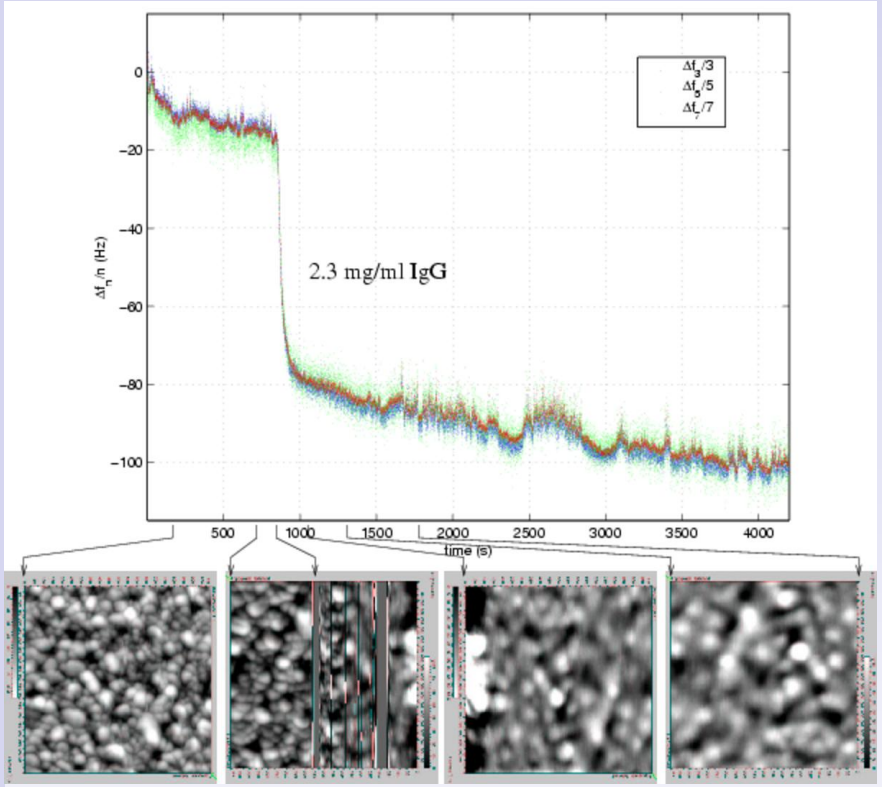


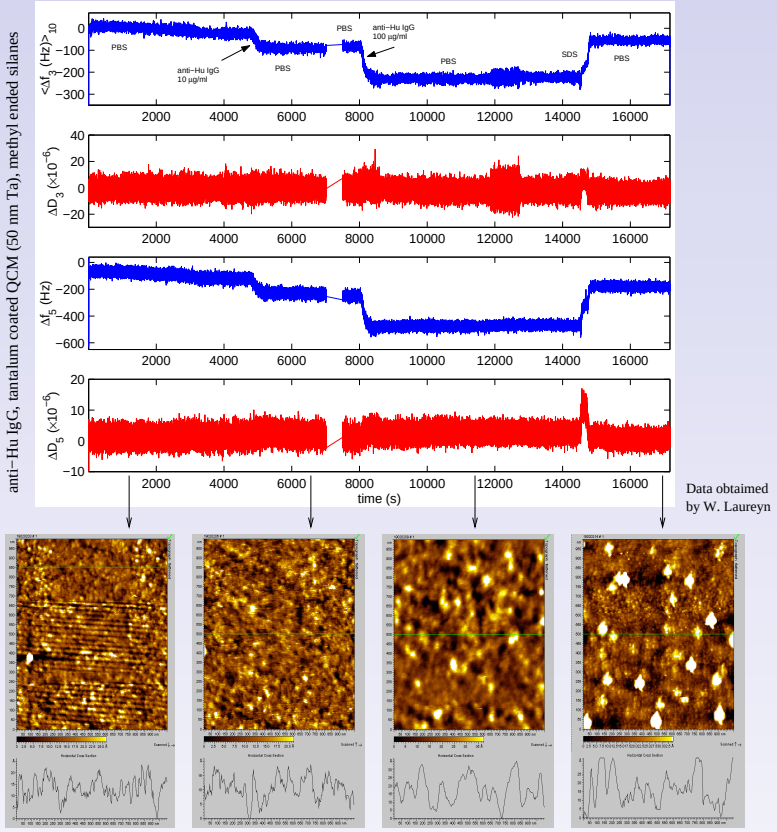
Couche rigide $\Rightarrow \Delta f_n/n \propto \Delta m_{layer}$ (dissipation faible)

Couche visqueuse $\Rightarrow \Delta f_n/\sqrt{n} \propto \{\Delta m_{liquid}, \Delta m_{layer}\}$ (dissipation élevée)

(n : numéro du mode)

Acoustique/sonde locale : biologie



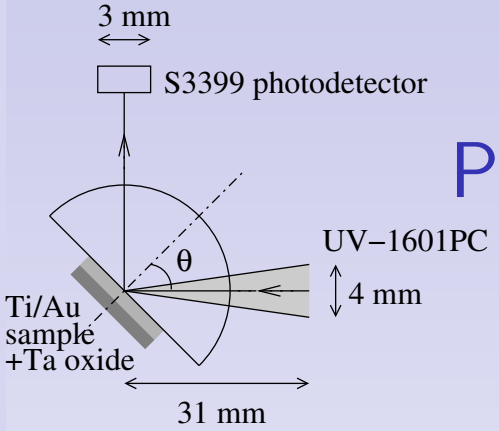


IgG sur thiols hydrophobes

IgG sur silanes/ Ta_2O_5

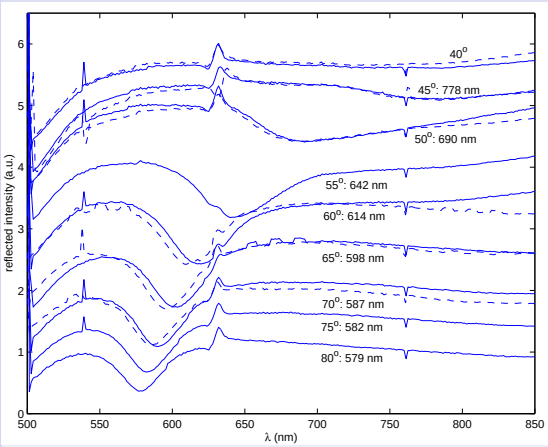
La topographie n'est pas une information intéressante dans la plupart des cas

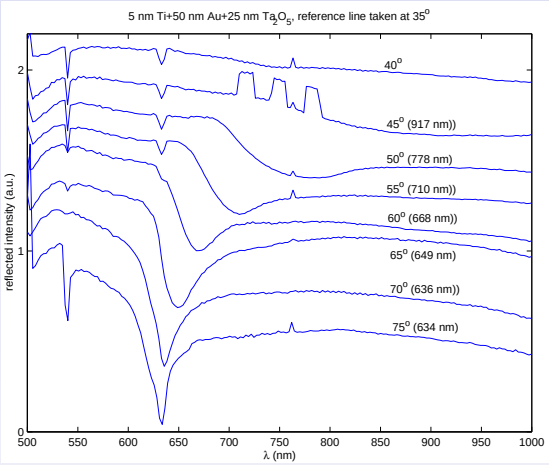
C. Zhou, J.-M. Friedt, A. Angelova, K.-H. Choi, W. Laureyn, F. Frederix, L. A. Francis, A. Campitelli, Y. Engelborghs, G. Borghs, *Human Immunoglobulin Adsorption Investigated by Means of Quartz Crystal Microbalance Dissipation, Atomic Force Microscopy, Surface Acoustic Wave, and Surface Plasmon Resonance Techniques*, Langmuir **20** (14), pp.5870-5878 (June 2004)

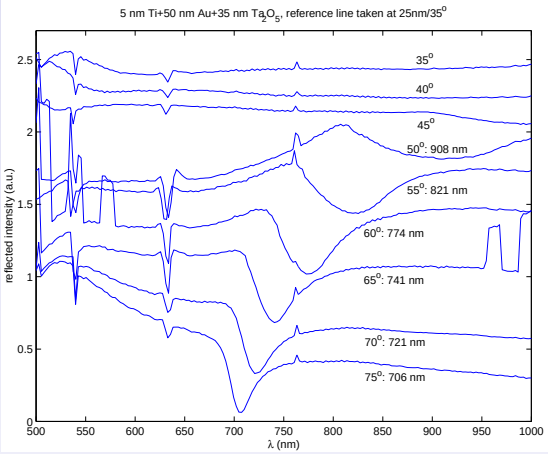


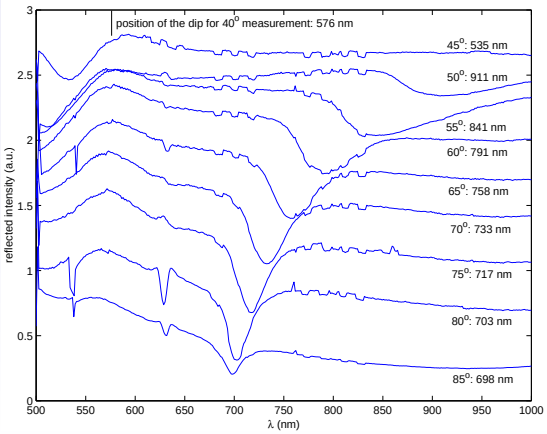
Plasmons de surface (mesures)

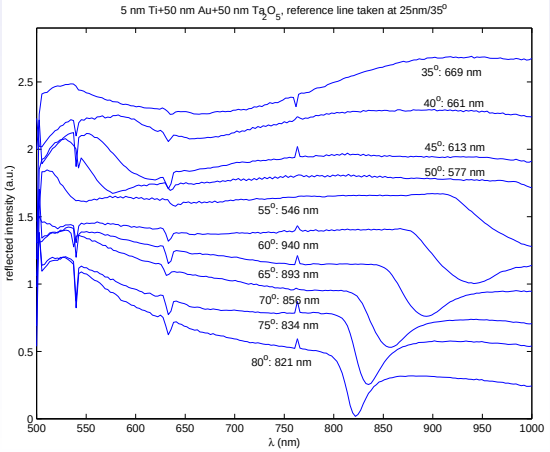
Source lumineuse incohérente (spectromètre UV-Vis)











Plasmons de surface (interprétations)

Définition d'un biocapteur

Le capteur

Mesure et instrumentation

Microfluidique

Combinaison acoustique-optique

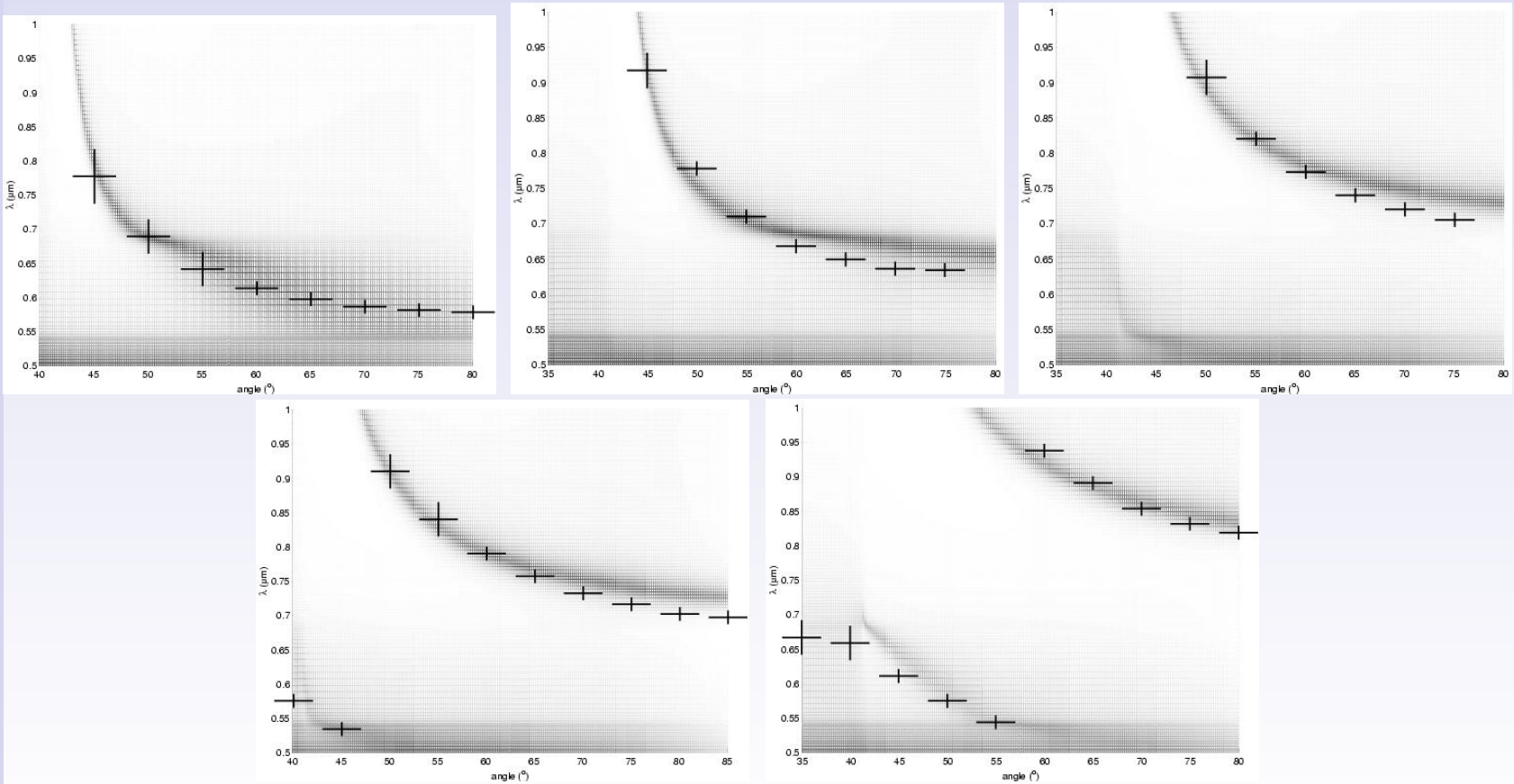
Mesures

Combinaison acoustique/sonde locale

Plasmons à λ variable

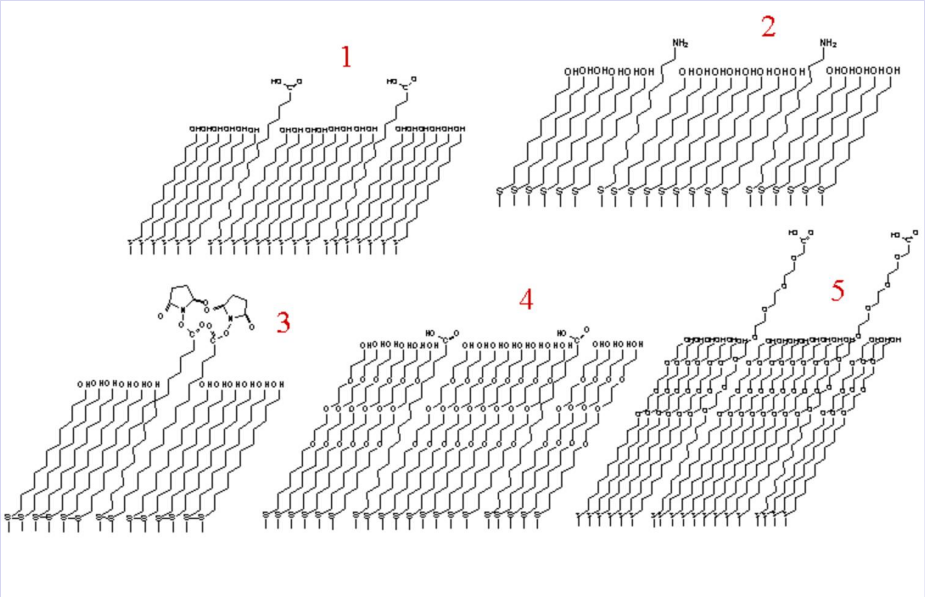
Conclusions

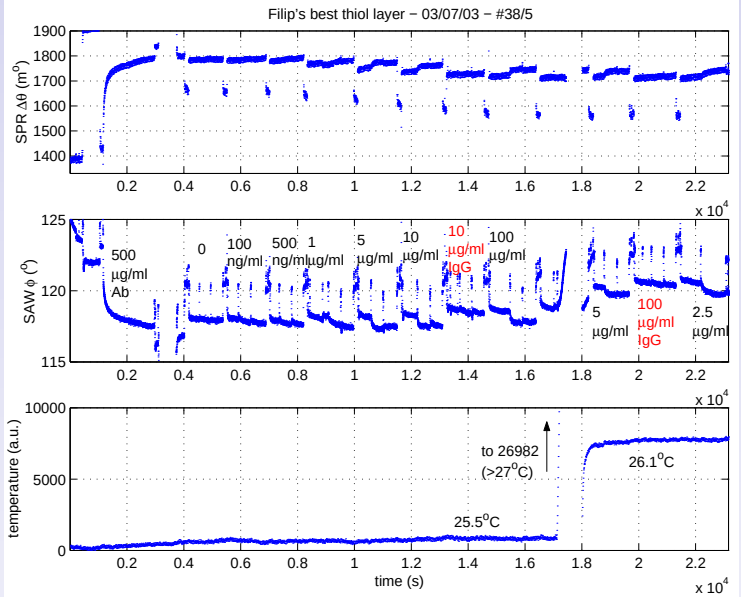
Hypothèse : indice optique constant sur la plage visible (500-1000 nm)
$\Rightarrow$ la spectroscopie donne un unique couple (n, d) d'une couche



Importance de la chimie de surface

Deux thèses sur ce sujet (silanes pour les oxides, thiols pour l'or)





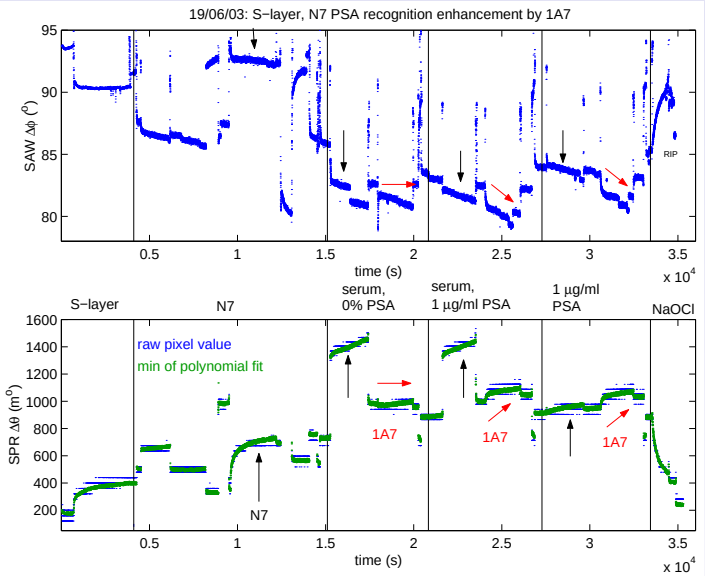
- La chimie de surface détermine la capacité du biocapteur à retenir les anticorps (liaison covalente ?) et à repousser les espèces indésirables.
- Le capteur universel n'existe pas

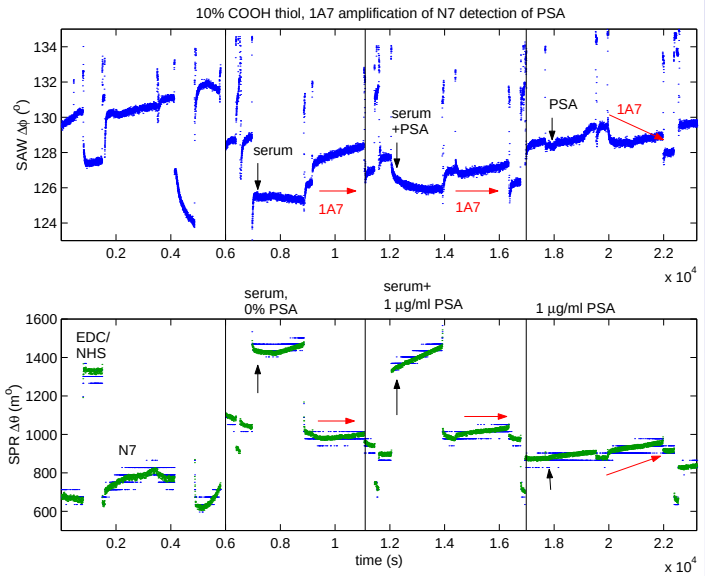
Filip Frederix, *The Use of Self-Assembly for the Realisation of Immunosensor Interfaces and Detection Systems*, doctorat de KU Leuven (2004)

Wim Laureyn, *Physico-chemical study on the use of silanes for the realisation of oxide-based biosensor interfaces*, doctorat de KU.Leuven (2002)

De l'intérêt des biocapteurs ?

- ELISA détecte PSA dans la plage 0-50 ng/ml, kits jetables
- Utilité de diagnostiquer en temps réel ?
- Surtout applicable dans l'observation de l'environnement et de la nourriture (développement d'anticorps détectant les petites molécules – insecticides, dioxine ...)





L. Huang, G. Reekmans, D. Saerens, J.-M Friedt, F. Frederix, L. Francis, S. Muyldermans, A. Campitelli, and C. Van Hoof, *Prostate-specific antigen immunosensing based on mixed self-assembled monolayers, camel antibodies and colloidal gold enhanced sandwich assays*, Biosensors & Bioelectronics (accepted 11/22/2004)

Définition d'un biocapteur

Le capteur

Mesure et instrumentation

Microfluidique

Combinaison acoustique-optique

Mesures

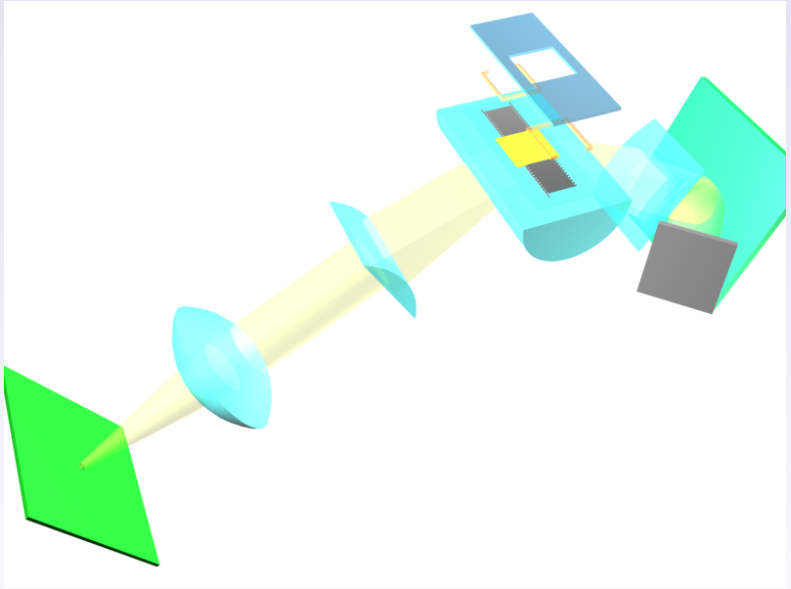
Combinaison acoustique/sonde locale

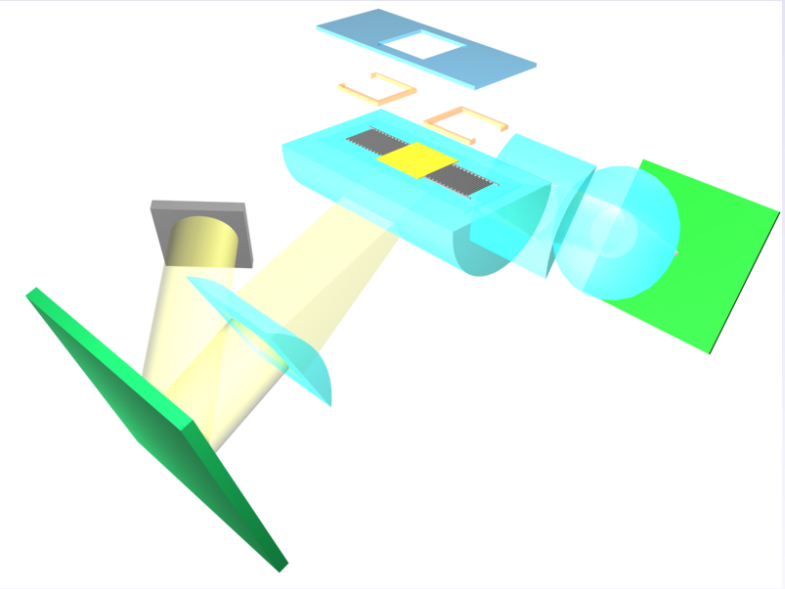
Plasmons à λ variable

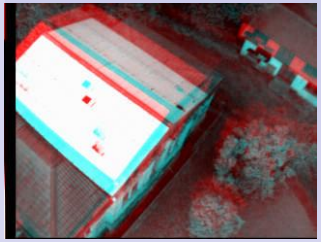
Conclusions

Perspective

- Utiliser un laser blanc+réseau de diffraction pour multiplexer les longueurs d'onde (FEMTO/LOPMD)
- Ajouter une microscopie à sonde locale *utile* : SECM, Kelvin ...
  $\Rightarrow$ encombrement implique shear-force







Définition d'un biocapteur

Le capteur

Mesure et instrumentation

Microfluidique

Combinaison acoustique-optique

Mesures

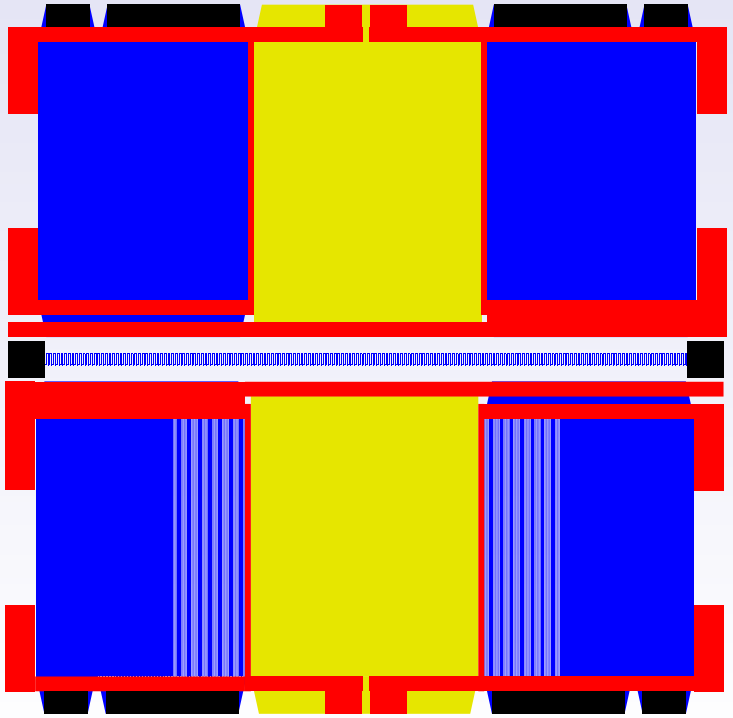
Combinaison acoustique/sonde locale

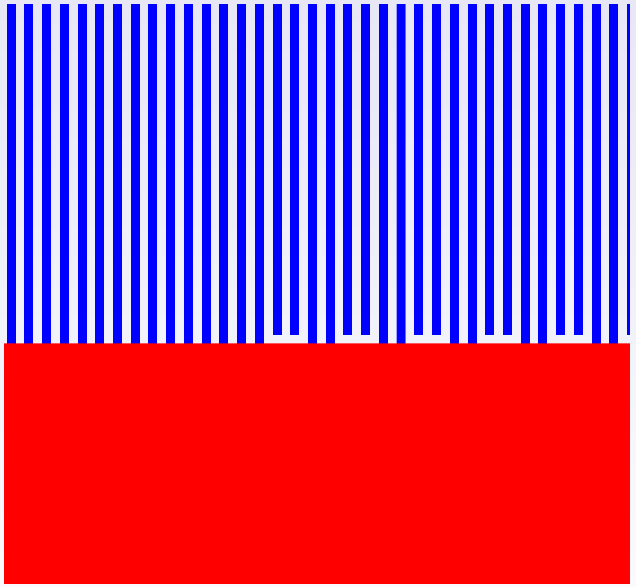
Plasmons à λ variable

Conclusions

Nouveau dispositif (FEMTO-ST/LPMO)

- dual delay line avec 4 doigts/période acoustique
- zone sensible couverte ou non d'or (thiols, électrodépoisition, SPR)
- fluidique en SU8 avec injection par capillaire $\emptyset$ =100 μm
- couche de 1-4 μm SiO_2, ouverture des bonding pads





Définition d'un biocapteur

Le capteur

Mesure et instrumentation

Microfluidique

Combinaison acoustique-optique

Mesures

Combinaison acoustique/sonde locale

Plasmons à λ variable

Conclusions

Le groupe biocapteurs (IMEC, 2000-2003)

Tous les articles/références ainsi que cette présentation sont disponibles à `http://jmfriedt.free.fr/`