

# Détermination des anticorps anti-*tetanus Clostridium* dans le sérum par détection immunoampérométrique.

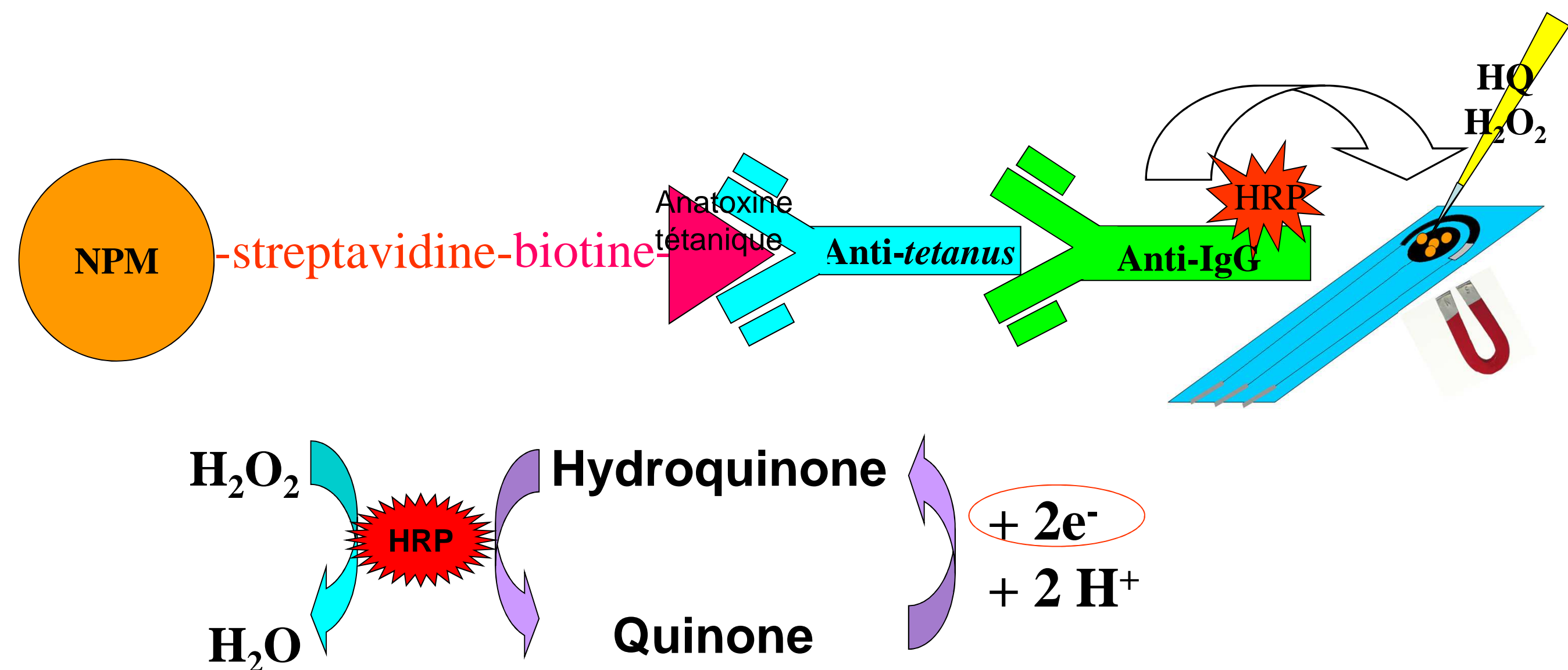
Stéphanie Patris<sup>‡\*</sup>, Carine De Vriese<sup>‡</sup>, Françoise Prohoroff<sup>++</sup>, Encarnación Burgoa Calvo<sup>+</sup>, Julia Arcos Martínez<sup>+</sup> et Jean-Michel Kauffmann<sup>‡</sup>

<sup>‡</sup>Université libre de Bruxelles, Institut de Pharmacie, Campus Plaine, Boulevard du Triomphe, CP 205/6, 1050 Bruxelles, Belgique.

<sup>++</sup>Association Pharmaceutique Belge, 11 rue Archimède, 1000 Bruxelles, Belgique.

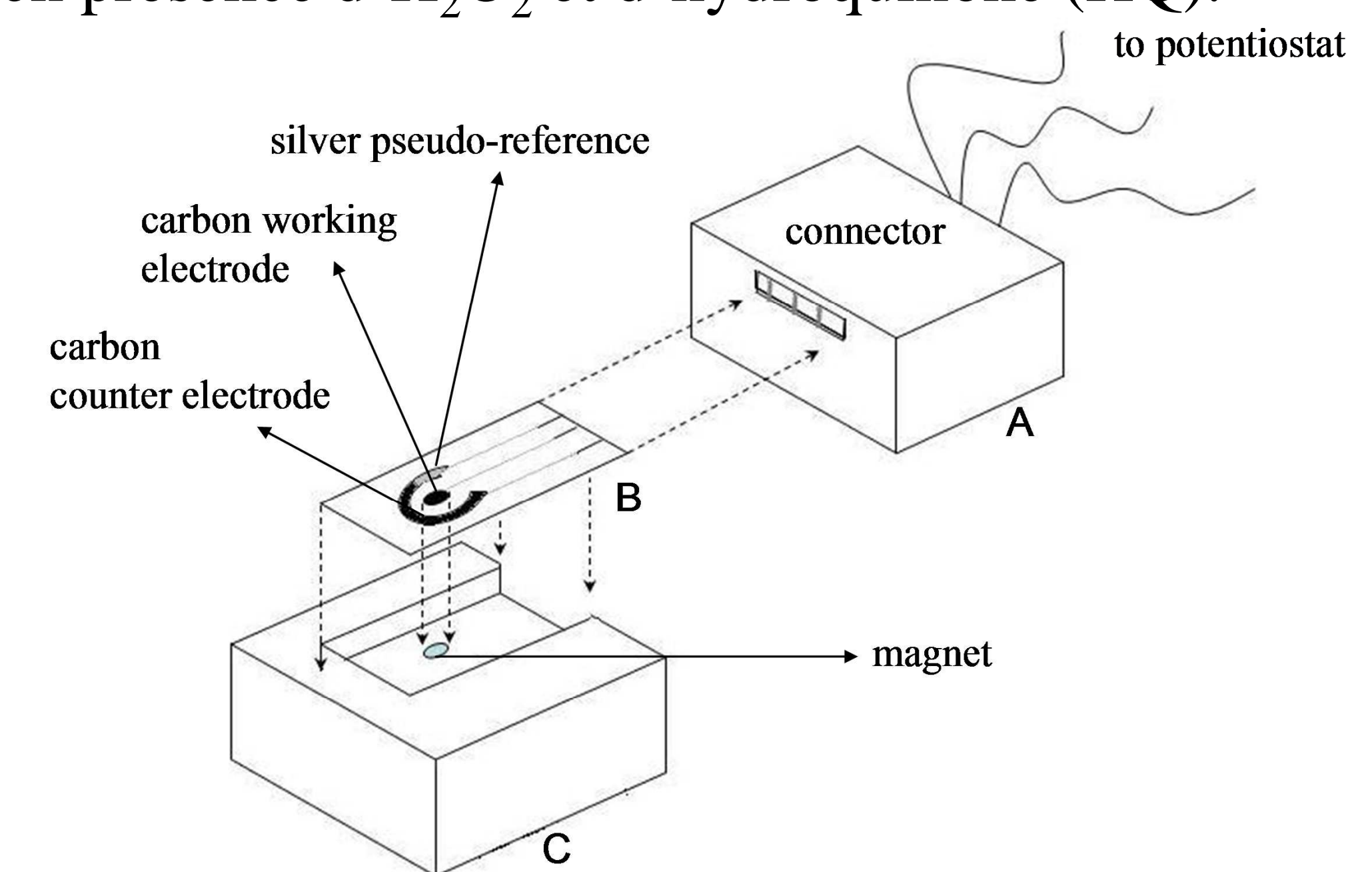
<sup>+</sup> Université de Burgos, Département de Chimie, 09001 Burgos, Espagne.

\*spatris@ulb.ac.be



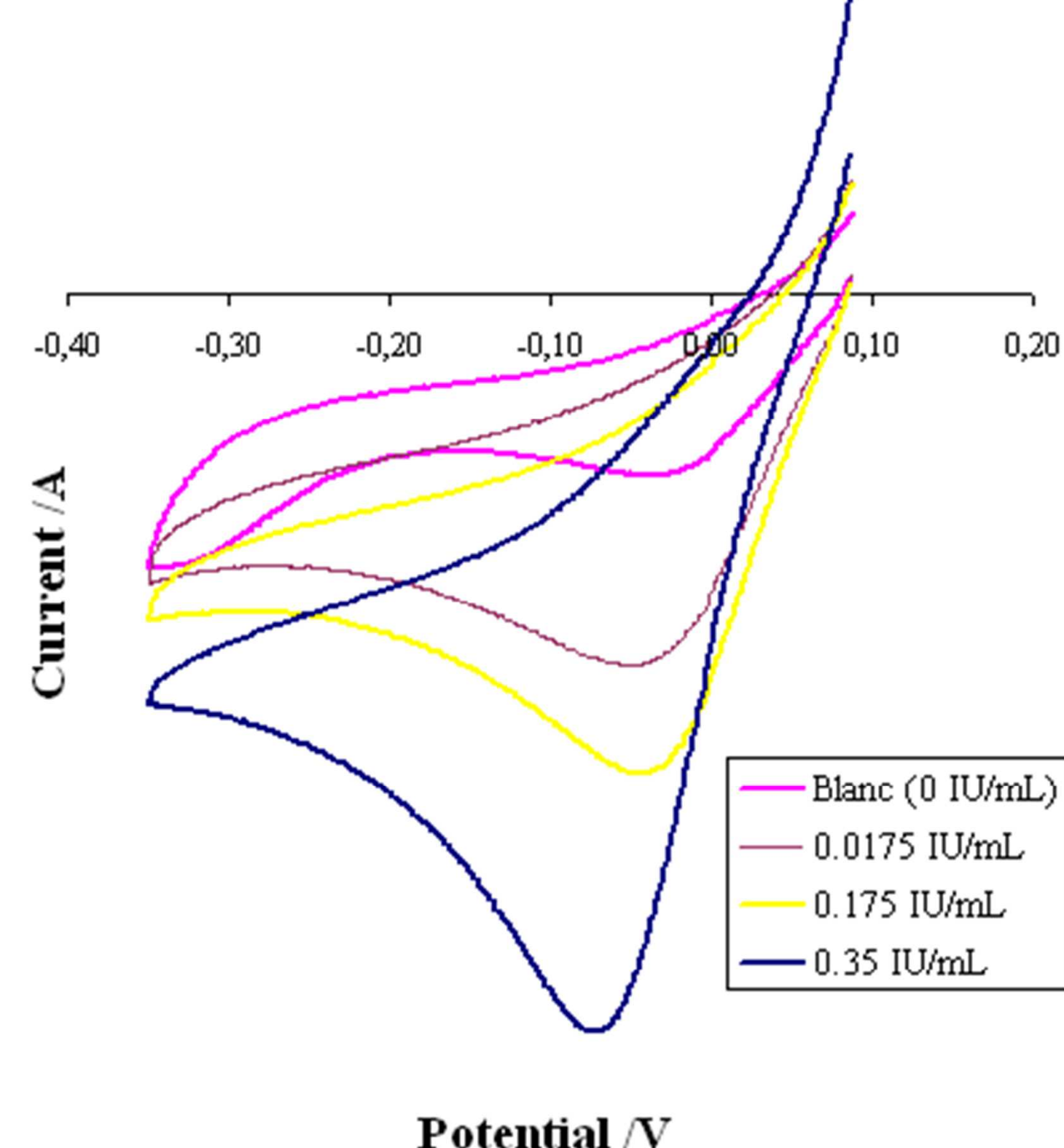
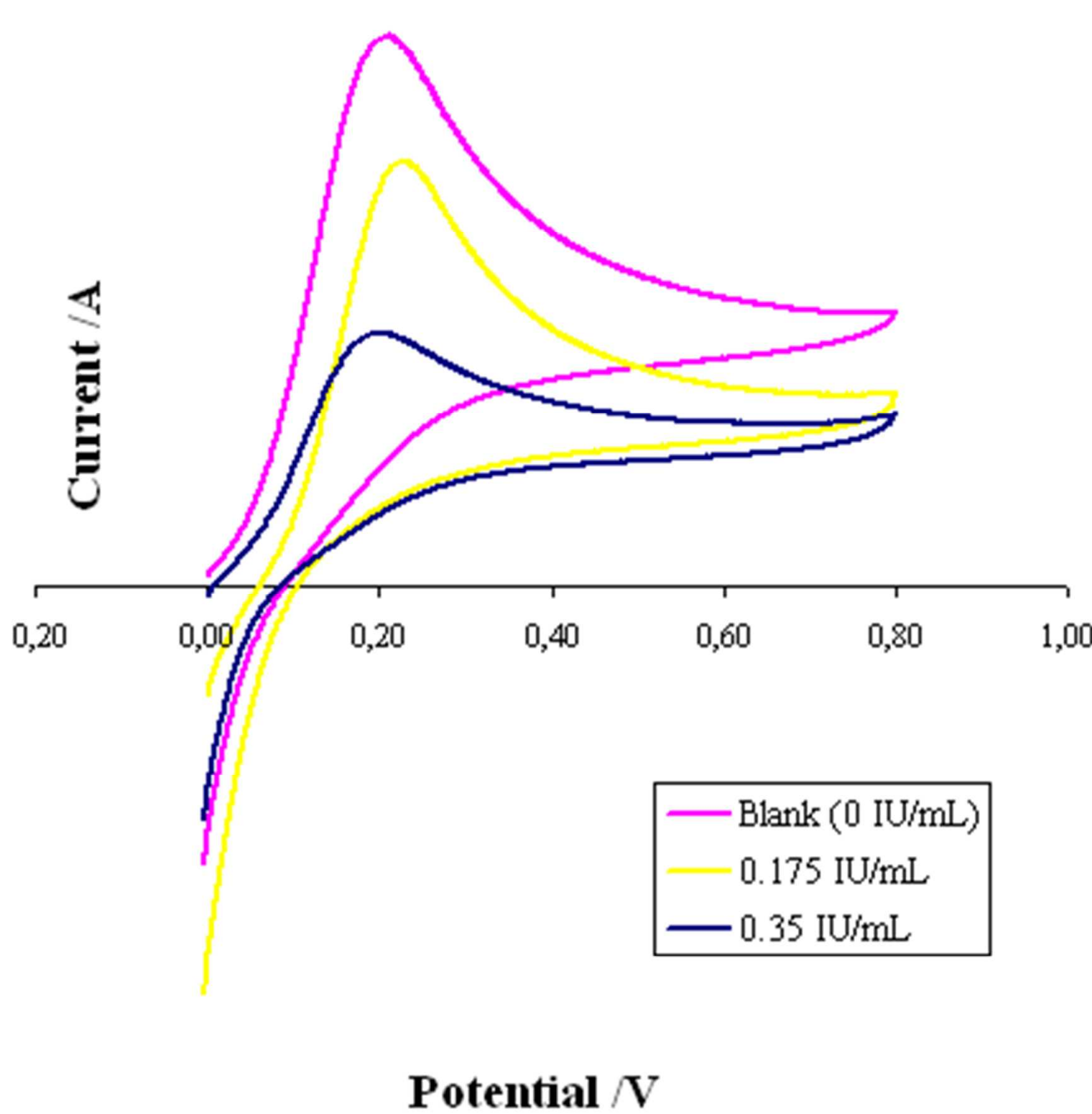
- Lors de la détection ampérométrique, la tigelette d'électrodes sérigraphiées est insérée dans le connecteur (A).
- Les nanoparticules (500nm) super paramagnétiques sont déposées à la surface des électrodes sérigraphiées (B).
- Un aimant, présent dans le support accueillant la tigelette d'électrodes sérigraphiées, maintient les NPM en contact étroit avec les électrodes (C).
- Les électrodes de travail et auxiliaire sont en carbone tandis que la pseudo référence est en argent. Le courant de réduction est mesuré à -280 mV.

- La méthode d'immunodétection ampérométrique permet de déterminer le titre en anticorps anti-*tetanus Clostridium* dans des échantillons de sérum
- L'anatoxine tétanique est immobilisée sur des nanoparticules super paramagnétiques (NPM) servant de support solide à l'immunoessai. La surface est bloquée par une solution d'albumine sérique bovine.
- Les NPM sont mises en présence, dans un premier temps, de la solution de sérum à doser et dans un second temps, d'une solution d'anti-IgG marqué par la Peroxydase de Raifort (HRP).
- Les NPM sont ensuite déposées sur les électrodes sérigraphiées. Le courant de réduction est mesuré en présence d' $\text{H}_2\text{O}_2$  et d'hydroquinone (HQ).



1. 0 mV to 800 mV and return to 0 mV

2. 88 mV to -350 mV and return to 88 mV



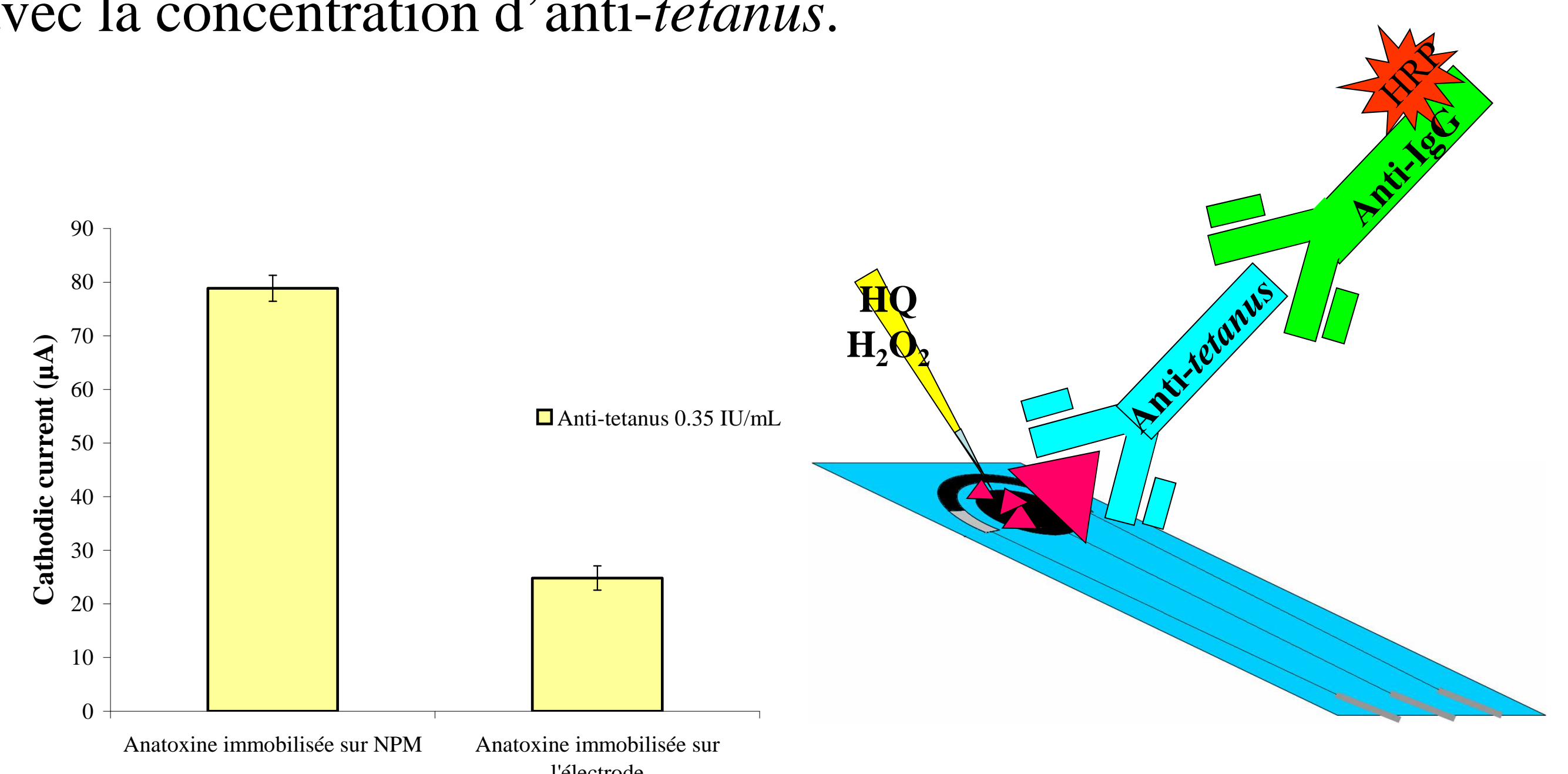
1. Voltampérométries cycliques de l'HQ (0 → 800 → 0 mV; 10 mV/s) réalisées en présence des NPM après immunoréaction (concentration en anti-*tetanus* : 0 IU/mL, 0,350 IU/mL et 0,175 IU/mL, volume de la goutte déposée : 50 µl):

- Une diminution du courant d'oxydation de 54% et de 23.5% est observée respectivement, pour les essais à 0.35 IU/mL et 0.175 IU/mL: en présence de l'immunocomplexe, le pic d'oxydation de HQ diminue : une partie de HQ est oxydée par HRP présente à la surface des particules.

2. Voltampérométries cycliques l'HQ (88 → 350 → 88 mV; 10 mV/s) réalisées en présence des nanoparticules après immunoréaction (concentration en anti-*tetanus* : 0 IU/mL; 0,350 IU/mL; 0,175 IU/mL et 0,0175 IU/mL) :

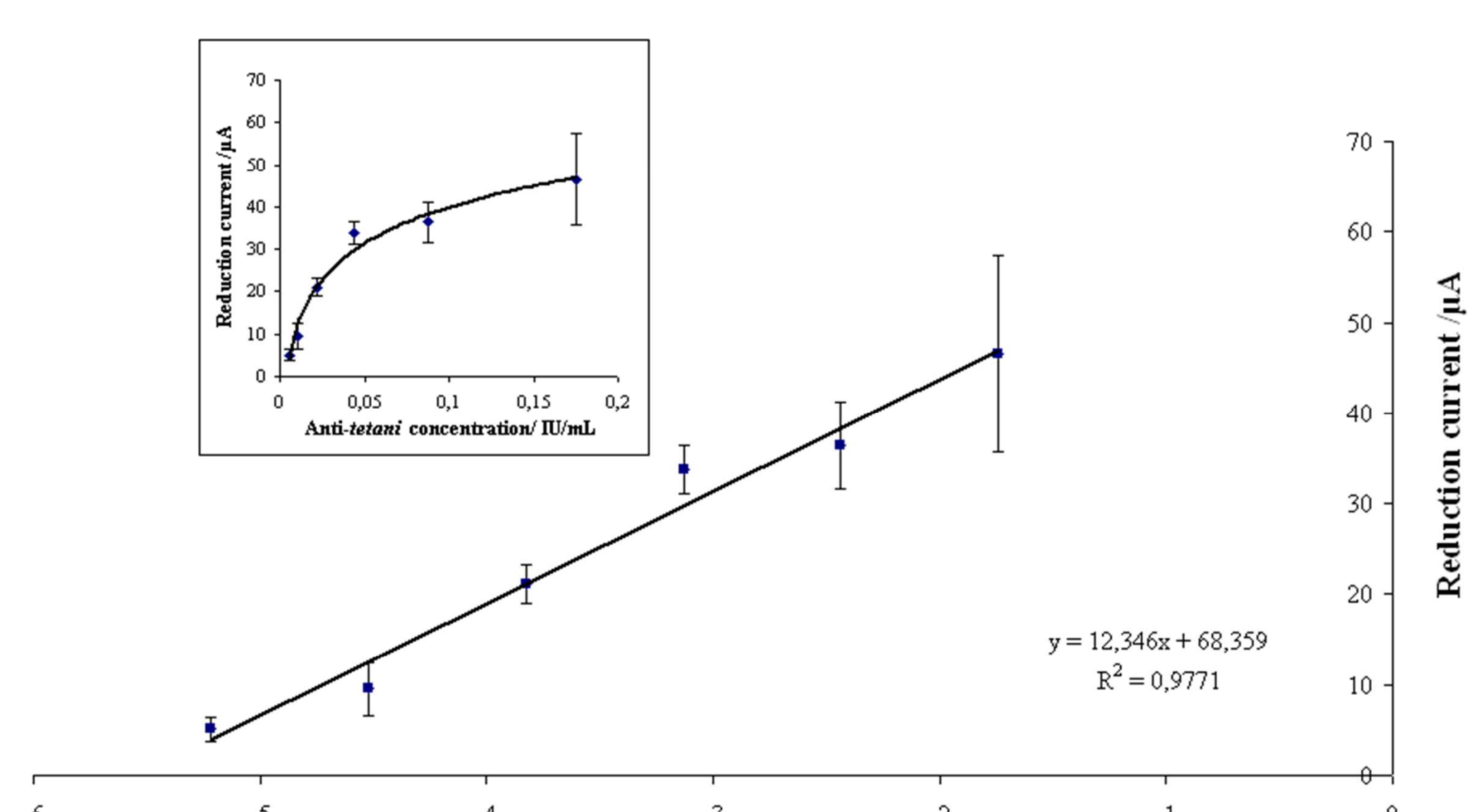
- Le courant de réduction augmente avec la concentration d'anti-*tetanus* : la quantité d'HRP augmente avec la concentration d'anti-*tetanus*.

- La méthode immunoampérométrique utilisant des NPM a été comparée à un immunocapteur à électrode modifiée par l'anatoxine tétanique.
- Seul le support pour les immunoréactions diffère: nanoparticules super paramagnétiques vs électrodes sérigraphiées modifiées par l'anatoxine
- Le signal obtenu avec une solution contenant 0.35 IU/mL est plus de 2 fois plus important dans la méthode utilisant les NPM.
- L'utilisation des NPM permet:
  - une augmentation de la surface réactionnelle,
  - une bonne agitation,
  - l'isolement du milieu réactionnel.



Électrode sérigraphiée modifiée par l'anatoxine:

Après un prétraitement de la tigelette d'électrodes sérigraphiées (par  $\text{H}_2\text{SO}_4$  déposé à sa surface et application d'un potentiel de +1,30 V pendant 2min) une solution de streptavidine est laissée une nuit à 4°C à son contact. L'anatoxine biotylée est ensuite immobilisée sur les électrodes par une liaison biotine-streptavidine. Toutes les immunoréactions sont réalisées à la surface des électrodes.



- Le signal ampérométrique est directement proportionnel au logarithme de la concentration en anti-*tetanus*.
- La limite de détection (LOD) est de 0,0046 IU/mL
- La limite de quantification (LOQ) est de 0,0057 IU/mL.
- Ces valeurs sont bien inférieures à la valeur considérée comme la concentration limite protectrice qui est de 0,06 IU/mL mesurée par test ELISA.