HAL
open science

Suivi quantitatif in situ d'interactions biomoléculaire par microscopie optique SEEC

Ludovic Roussille

To cite this version:

Ludovic Roussille. Suivi quantitatif in situ d'interactions biomoléculaire par microscopie optique SEEC. Physique [physics]. Le Mans Université, 2012. Français. NNT : 2012LEMA1030 . tel-01220922

HAL Id: tel-01220922

https://theses.hal.science/tel-01220922v1

Submitted on 27 Oct 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

thèse de doctorat de l'université du Maine
spécialité Physique

Présentée par

Ludovic Roussille

Intitulée

Suivi quantitatif *in situ* d'interactions biomoléculaires par microscopie optique SEEC

Soutenue au Mans, le 19 juin 2012

Encadrants :

Dominique Ausserré (DR CNRS, IMMM, UMR 6283, Le Mans) - **Directeur de thèse**
Sylvie Ricard-Blum (Pr Université Claude Bernard, IBCP, UMR 5086, Lyon) - **Co-directrice de thèse**
Guillaume Brotons (MCF Université du Maine, IMMM, UMR 6283, Le Mans) - **Co-encadrant de thèse**

Rapporteurs :

Pierre Nassoy (DR CNRS, Institut Curie, UMR 168, Paris)
Eliane Souteyrand (DR CNRS, INL, UMR 5270, Lyon)

Examinateurs :

Alain Brisson (Pr Université de Bordeaux 1, IECB, UMR 5248, Bordeaux) - **Président du jury**
Claude Amra (DR CNRS, Institut Fresnel, UMR 7249, Marseille)
Laurent Vonna (MCF Université de Haute-Alsace, IS2M, LRC 7228, Mulhouse)

Cette thèse s'inscrit dans le cadre d'un projet collaboratif soutenu par l'ANR (PNANO-07 SEEC) qui implique trois partenaires : l'Institut Fresnel (UMR 7249) à Marseille, l'Institut de Biologie et de Chimie des Protéines (UMR 5086) à Lyon et l'Institut des Molécules et des Matériaux du Mans (UMR 6283).

La microscopie SEEC (Surface Enhanced Ellipsometric Contrast) est une technique inventée au Mans il y a une dizaine d'années. Elle permet de visualiser des objets de taille nanoscopique entre polariseur et analyseur croisés en utilisant les propriétés non dépolarisantes de surfaces multicouches. Jusqu'au début de la thèse, seules des observations à l'air étaient possibles. Le but de ce projet de thèse était d'adapter cette technique à l'observation de surfaces d'or immergées, puis d'en évaluer les performances par rapport à la technique de Résonance Plasmonique de Surface (SPR) qui est une technique de référence pour l'étude des interactions biomoléculaires.

Pour adapter la technique SEEC à cette application, nous avons dû inventer et réaliser, en collaboration avec nos partenaires de Marseille, de nouvelles surfaces pour le SEEC (dites de première génération). Leur utilisation exigeant des conditions d'éclairage très particulières, nous avons dû entreprendre la modification d'un microscope optique. Des progrès effectués en parallèle dans nos calculs numériques ont montré l'existence d'un autre point de fonctionnement optique qui sort du cadre de la technique SEEC et qui nécessite d'autres surfaces (dites de seconde génération), beaucoup plus simples à utiliser. Des prototypes de ces nouvelles surfaces ont aussi été réalisés et ce sont ces surfaces de deuxième génération que nous avons utilisées dans la plupart des études qui sont présentées.

Pour évaluer notre technique d'imagerie, nous l'avons mise en œuvre dans deux expériences modèles, l'immobilisation de l'albumine sérique bovine et la capture d'une immunoglobuline G biotinylée par la streptavidine. Ces expériences ont été menées en parallèle en microscopie optique et en SPR en collaboration avec nos partenaires de Lyon. Cette comparaison a demandé un travail de préparation très important, notamment pour obtenir une fonctionnalisation biochimique des surfaces d'or et un dispositif de fluidique comparables à ceux des instruments SPR commerciaux, et plus particulièrement à ceux du Biacore T100.

Nos résultats montrent que si notre technique optique ne peut pas encore en l'état se substituer à la SPR pour l'étude des interactions biomoléculaires, elle est par contre une base solide pour le développement d'instruments de diagnostic immunologique à faible coût. Notre travail donne finalement le chemin à suivre pour cette application.

Mots clés : microscopie optique, SPR, surface d'or, protéines, fonctionnalisation de surface, biopuces.

.

Je remercie tous ceux qui ont participé de près ou de loin à l'écriture de ce manuscrit de thèse et aux recherches présentées

À Viktoriia Chorna (1987-2013) ma très chère amie.

« Toute théorie scientifique plongée dans un bain d'expériences subit une poussée horizontale dirigée d'aujourd'hui vers demain, égale au poids du volume de chercheurs affirmant que lesdites expériences sont en accord avec la théorie et ce, jusqu'à ce que la poussée soit annulée par des expériences contradictoires auquel cas la théorie boit la tasse, les chercheurs s'engueulent et la baignoire déborde. »

Théorème d'Archimède version Damien Jayat

Abréviations présentes dans ce manuscrit

µCP	Impression microcontact
11-MUA	Acide 11-mercaptoundécanoïque
16-MHDA	Acide 16-mercaptohexadécanoïque
3-MPA	Acide 3-mercaptopropionique
AFM	Microscope à force atomique
ANR	Agence National de la Recherche
ATR	Réflexion totale atténuée
BSA	Albumine de serum de bovin
BTBP	Bleu de tétrabromophénol
CNRS	Centre National de la Recherche Scientifique
CONE	nouvelle technique de microscopie optique découverte durant la thèse
DRX	Diffraction des Rayons X
EDC	1-éthyl-3-(3-diméthyl-aminopropyl)carbodiimide
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfert ou Förster Resonance Energy Transfert
HRP	Peroxydase de raifort ou horseradish peroxidase
IBCP	Institut de Biologie et de Chimie des Protéines
IgG	Immunoglobuline G anti-endostatine
IgG-biot	Immunoglobuline G anti-endostatine biotinylée
IMMM	Institut des molécules et des matériaux du Mans
IRRAS	Spectroscopie infrarouge en réflexion-absorption
IS2M	Institut de Science des Matériaux de Mulhouse
LPEC	Laboratoire de Physique de l'État Condensé
NHS	N-hydroxysuccinimide
QCM	Microbalance à quartz
RIA	Dosage radioimmunologique
RX	Réflectivité des rayons X
SAM	Monocouche auto-assemblée
SEEC	Surface amplificatrice de contraste
SPR	Résonance plasmonique de surface
SPRi	Imageur SPR
XPS	Spectroscopie de photoélectrons X

Symboles utilisés dans ce manuscrit

b	Atténuation de la constante de propagation β_{sp}
c	Célérité de la lumière
C	Contraste
d	Epaisseur
E	Champ électrique
E_a	Champ électrique à la sortie de l'analyseur
E_i	Champ électrique incident
e_i	Epaisseur de la couche i
E_r	Champ électrique réfléchi
F	Flux
H	Champ magnétique
I_f	Intensité du fond
I_o	Intensité de l'objet
k	Vecteur de propagation
L	Largeur du canal de microfluidique
n_d	Indice de réfraction du diélectrique
n_{ef}	Indice effectif de la constante de propagation β_{sp}
n_i	Indice de réfraction du milieu i
n_m	Indice de réfraction du métal
Re	Nombre de Reynolds
r_p	Coefficient de réflexion de Fresnel de la composante parallèle au plan de réflexion
r_s	Coefficient de réflexion de Fresnel de la composante perpendiculaire au plan de réflexion
S	Section du canal
v	Vitesse
V_M	Vitesse maximale
α	Ouverture numérique
β	Déphasage du champ électrique
β_{sp}	Constante de propagation du plasmon de surface
η	Viscosité dynamique
θ_c	Angle critique
Λ	Profondeur de pénétration
λ	Longueur d'onde
ν	Viscosité cinématique
ρ	Masse volumique
φ	Azimut
Φ	Angle entre l'analyseur et l'axe des abscisses

Sommaire du manuscrit de thèse

Chapitre I : Introduction 2

1 Enjeux scientifiques et état de l'art 6

1.1 Le diagnostic faible coût 6

1.2 Qu'est ce qu'un biocapteur ? 10

2 Techniques de détection de molécules 11

2.1 Détection via des marqueurs 11

2.2 Techniques de lecture sans marquage 17

3 Potentiel de la microscopie « SEEC » pour la lecture de biopuces 28

Références du chapitre I 30

Chapitre II : Utilisation de la Résonance Plasmonique de Surface pour le suivi quantitatif d'interactions biologiques modèles 34

1 Principes de la SPR et développements récents 38

2 Formalisme théorique utilisé pour décrire la Résonance Plasmonique de Surface ... 39

2.1 Formalisme SPR 39

2.2 Utilisation de milieux vecteurs pour propager l'onde lumineuse 42

2.3 Epaisseurs optimales de la couche métallique 45

2.4 Les différentes techniques de mesure du signal SPR 46

2.5 Estimation de la quantité de matière apportée à l'interface métal/diélectrique 48

3 Les systèmes de mesure SPR commerciaux les plus utilisés 50

3.1 L'imagerie SPR 50

3.2 Le BIAcore T100 52

4 Fonctionnalisation des biocapteurs et protocole utilisé en SPR 55

4.1 Réalisation d'une monocouche sur un film mince d'or par auto assemblage . 55

4.2 Mise en place des biocapteurs réalisés, préparation des solutions d'injection et protocole de mesure SPR 56

5 Présentation des résultats et de l'article publié 62

5.1 La fonctionnalisation et caractérisation des biocapteurs d'or 62

5.2 L'étude quantitative de deux interactions modèles 63

Références du chapitre II 65

Plan du chapitre III : Mise en œuvre de la microscopie SEEC en immersion 68

1 Principes de la microscopie SEEC 71

2 Mise en œuvre de la microscopie SEEC en immersion 78

2.1 Fabrication de surfaces adaptées à la microscopie SEEC en immersion 79

2.2 Réalisation d'un système de microfluidique 98

2.3 Traitement des images 105

3 Fabrication et évaluation de surfaces microstructurées 110

3.1 Impression par microcontact d'un tampon de PDMS 110

4 Observations CONE en immersion 124

4.1 Effet de la polarisation de la lumière 124

4.2 Observation de plots de différentes épaisseurs 126

4.3 Dérive du signal au cours du temps 133

4.4 Variation de l'intensité en fonction de l'indice de réfraction des solutions : « Bulk effect » en microscopie CONE 139

Conclusion du chapitre III 150

Références du chapitre III 152

Annexe III.1 : couche mince antireflet, calcul classique 154

Annexe III.2 : indice de réfraction de l'or en fonction de la longueur d'onde 159

Annexe III.3 : indice de réfraction du glycérol 161

Plan du chapitre IV : Evaluation de la microscopie « SEEC » . 162

1 Comparaison avec la microscopie de fluorescence à l'air 166

1.1 Rappel sur la quantité de molécules de BSA fixée en fonction de la surface utilisée (résultat du Chapitre II) 169

1.2 Protocole expérimental 171

1.3 Cinétique d'adsorption de la BSA fluorescente suivie ex situ par microscopie de fluorescence et SEEC 173

1.4 Cinétique d'immobilisation de la BSA fluorescente suivie ex situ par microscopie de fluorescence et SEEC 180

2 Comparaison avec la microscopie de fluorescence en immersion par le suivi in situ de l'immobilisation de la BSA fluorescente 183

2.1 Protocole expérimental 184

2.2 Comparaison des micrographies CONE et de fluorescence après l'immobilisation de la BSA fluorescente 185

2.3 Comparaison des cinétiques d'immobilisation de la BSA fluorescente 187

3 Comparaison des expériences CONE et SPR 193

3.1 Etude comparative d'une cinétique CONE et d'une cinétique SPR 193

3.2 Analyse quantitative des cinétiques d'adsorption et d'immobilisation de la BSA fluorescente 202

3.3 Adsorption et immobilisation de la BSA non fluorescente 214

3.4 Interaction entre IgG biotinylée et streptavidine immobilisée 235

Conclusion du chapitre IV 243

Références du chapitre IV 244

Annexe 1 : Indice de réfraction des solutions 246

Plan du chapitre V : Conclusion de ce manuscrit de thèse .....… 248

Chapitre I :

Introduction et problématique.

Plan du chapitre I

1 Enjeux scientifiques et état de l'art 6

1.1 Le diagnostic faible coût 6

1.1.1 Fluidique sur « papier buvard » 7

1.1.2 Séchage d'une goutte de sang 9

1.2 Qu'est ce qu'un biocapteur ? 10

2 Techniques de détection de molécules 11

2.1 Détection *via* des marqueurs 11

2.1.1 Dosage radio-immunologique (RIA) 11

2.1.2 FRET 13

2.1.3 ELISA 15

2.2 Techniques de lecture sans marquage 17

2.2.1 Microbalance à Quartz (QCM) 18

2.2.2 Résonance Plasmonique de Surface (SPR) 19

2.2.3 Ellipsométrie 20

2.2.4 La spectroscopie Raman ou infrarouge 22

2.2.5 Microscopie à force atomique (AFM) 23

2.2.6 Systèmes dédiés, exemple des capteurs de glucoses. 25

3 Potentiel de la microscopie « SEEC » pour la lecture de biopuces 28

Références. 30

Cette thèse s'inscrit dans un projet financé par l'Agence National de la Recherche comprenant trois partenaires : l'institut Fresnel à Marseille, l'Institut de Biologie et Chimie des Protéines (IBCP) à Lyon et le Laboratoire de Physique de l'Etat Condensé (LPEC devenue l'Institut des Molécules et des Matériaux du Mans – IMMM) au Mans dans lequel s'est déroulé cette thèse. L'objectif du projet (et de la thèse) est la mise en œuvre de la microscopie SEEC (Surface Enhanced Ellipsometric Contrast) [1, 2] pour l'étude *in situ* d'interactions protéine/protéine en immersion et son évaluation par rapport à la résonance plasmonique de surface (SPR). La technique SEEC présente en effet quelques atouts qui en font *a priori* une bonne candidate pour concurrencer la SPR : le coût de l'équipement nécessaire, sa flexibilité notamment en termes de matériaux de surface utilisables et ses capacités d'imagerie. Cela justifie le travail de comparaison des deux techniques mené de façon systématique tout au long de cette thèse. Il nous a conduit à considérer des signaux moyens calculés à partir des images SEEC et donc à privilégier les caractéristiques de sensibilité sur celles d'imagerie.

D'autres possibilités de la technique doivent pourtant être aussi envisagées qui reposent essentiellement sur ses possibilités de former des images et qui sont donc peu accessibles à la SPR. Ce sont les applications à la lecture sans marquage de biopuces qui pourraient s'avérer très utiles pour le diagnostic immunologique. Ici, le principal avantage de la technique sur les techniques installées, notamment l'ELISA, est son faible coût en équipement, en quantité de produits et en temps d'analyse. Cet avantage s'inscrit dans un mouvement très actuel qu'on peut appeler le diagnostic à faible coût, et qui mérite donc aussi d'être évoqué dans cette introduction. Nous présentons dans le premier chapitre les enjeux scientifiques de la lecture de biopuces à protéines et les techniques avec ou sans marquage utilisées dans ce domaine.

Pour mener à bien notre projet, nous avons réalisé des mesures de référence par SPR pour l'adsorption et l'immobilisation (liaison covalente) d'albumine sérique bovine (BSA), l'interaction de molécules d'immunoglobuline G (IgG) biotinylée sur des molécules de streptavidine immobilisées sur une surface d'or fonctionnalisée et l'interaction de molécules d'IgG sur des molécules d'endostatine immobilisées (interaction antigène/anticorps). Ces mesures, présentées dans le Chapitre II, ont été menées à Lyon sur le BIAcore T100 de l'Unité Mixte de Service 344 (UMS 344) qui est hébergé par l'IBCP. Nous avons comparé les adsorptions, immobilisations et interactions obtenues avec des surfaces d'or fonctionnalisées du commerce ou fonctionnalisées au laboratoire.

La mise en œuvre de la technique SEEC en immersion a demandé la création de nouvelles surfaces définies au Mans et fabriquées par nos partenaires marseillais. Nous avons choisi de travailler avec une couche externe d'or pour avoir la même chimie de surface que lors des expériences SPR, ce qui était nécessaire pour la comparaison des deux techniques. Différents prototypes ont été essayés au cours de ces trois années de thèse. Ils correspondent à plusieurs modes d'observation voisins que nous regroupons parfois abusivement sous l'appellation « SEEC ». Nous présenterons les résultats les plus significatifs. Pour suivre la fixation des protéines au cours du temps par la technique « SEEC », nous avons réalisé un montage de microfluidique monté sur un microscope inversé. La microscopie SEEC et ces variantes sont basées sur l'exaltation du contraste optique entre une surface nue et une couche moléculaire déposée sur cette surface. Afin d'utiliser au mieux ce contraste, nous avons modifié le mode de fonctionnalisation de nos surfaces par rapport à la SPR. Nous sommes passés de surfaces homogènes à des surfaces microstructurées réalisées par impression microcontact (µCP) suivant le protocole de Laurent Vonna (Institut de Science des Matériaux de Mulhouse, IS2M). Cela offre la possibilité de suivre les interactions simultanément sur l'or

nu et sur l'or fonctionnalisé. Ces surfaces ont été évaluées d'un point de vue structurel par microscopie à force atomique (AFM) et d'un point de vue fonctionnel par SPR. Ces éléments font l'objet du Chapitre III.

Le Chapitre IV décrit les mêmes études biologiques qu'en SPR effectuées cette fois-ci en microscopie « SEEC » et en microscopie de fluorescence. Nous avons suivi l'adsorption et l'immobilisation de molécules de BSA, puis l'interaction de molécules d'IgG biotinylée avec des molécules de streptavidine préalablement immobilisées. Nos résultats ont été comparés à ceux de nos expériences SPR.

Le Chapitre V enfin tente de synthétiser l'ensemble des résultats obtenus pour conclure sur les possibilités de substitution de la SPR par la technique « SEEC » et sur le positionnement de cette dernière.

1 Enjeux scientifiques et état de l'art

La microscopie « SEEC » s'intègre dans l'effort actuel autour des techniques de détection et de diagnostic à faible coût. Nous allons présenter deux exemples qui nous semblent illustrer parfaitement ce mouvement avant de nous intéresser aux biocapteurs et aux différentes techniques de détection usuelles.

1.1 Le diagnostic faible coût

Une préoccupation dans l'air du temps est le coût des choses. Le premier acte médical est le diagnostic. Une méthode simple pour réduire les coûts médicaux, et ainsi faciliter leur

accès, consiste à diminuer ceux du diagnostic. Cela ouvre également la possibilité de l'utilisation dans les pays en voie de développement où la majorité des gens meurent du fait d'un manque d'accès aux soins. Une preuve que ce mouvement est très actuel est l'appel d'offres lancé en septembre 2009 par la Fondation Bill et Melinda Gates : « Create low cost diagnostics for priority global health conditions » [3].

Pour diminuer le coût du diagnostic, on peut agir sur plusieurs maillons de la chaîne qui incluent le support, les réactifs, la fonctionnalisation, la fluidique, la transduction, les protocoles et l'analyse. On peut aussi progresser sur le coût des pratiques, comme le prélèvement des échantillons biologiques, leur purification ou la quantité de matière biologique nécessaire à l'analyse. Un exemple récent de progrès spectaculaire sur la fluidique est donné dans le paragraphe ci-dessous. On peut aussi agir sur le principe de l'analyse, c'est à dire sur la conception de la chaîne toute entière. Nous en donnons un exemple dans le paragraphe 1.1.2, p.9.

1.1.1 Fluidique sur « papier buvard »

L'équipe de George Whitesides a développé récemment une technique de microfluidique sur du papier [4, 5]. Sa fabrication est simple et de très bas coût. Elle est très intéressante pour les essais biologiques où les molécules sont liées à la surface car le rapport surface/volume est très important. Il y a donc peu de perte de matière biologique. Les premières expériences publiées ont été menées sur la détection de la BSA et du glucose dans de l'urine synthétique. La révélation a été effectuée par chromatographie. Pour les protéines, une solution de bleu de tétrabromophénol (BTBP) est déposée dans un coin du papier. Le BTBP change de couleur (de jaune à bleu) lorsqu'il est ionisé et lié à une protéine. Pour le

glucose, les auteurs ont utilisé l'oxydation de l'ion iodure (incolore) en iode (marron), oxydation obtenue par la réaction enzymatique de la HRP-glucose oxydase sur le glucose (Figure I.1).

Depuis, plusieurs méthodes de détection compatibles avec cette microfluidique sur papier ont été développées : électrochimique, par transmittance, par chimiluminescence et par fluorescence [6]. Cette technique a récemment permis d'étudier des interactions anticorps/antigène *via* la méthode ELISA. L'ELISA sur papier est plus rapide et moins couteuse que l'ELISA sur puits (description au paragraphe 2.1.3, p.15), mais reste dix fois moins sensible.

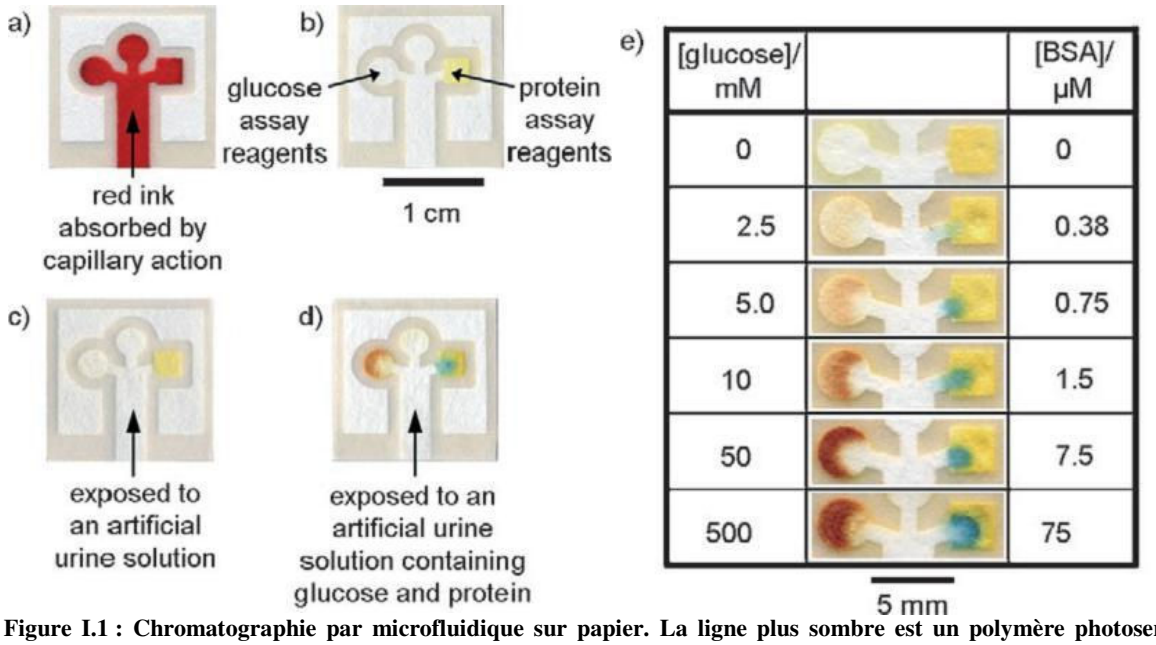


Figure I.1 : Chromatographie par microfluidique sur papier. La ligne plus sombre est un polymère photosensible utilisé pour délimiter les canaux. a) canal après absorption de 5 mL d'encre rouge, b) dépôt des réactifs dans les zones de test : HRP glucose oxydase/iodure à droite et BTBP à gauche, la zone centrale est vierge et sert de contrôle, c) contrôle négatif par injection de 5 mL d'urine artificiel et d) essai positif avec l'injection de 5 mL d'urine artificielle contenant 550 mmol/L de glucose et 75 mmol/L de BSA ; e) essais de détection du glucose et des protéines en faisant varier leur concentration dans l'urine artificielle. [4]

Les études menées par Whitesides *et al.* ont été réalisées à partir d'urine. L'urine est souvent un vecteur moins précis que le sang mais présente l'avantage d'être plus simple à prélever (et de manière non invasive). L'utilisation de seringue pour prélever le sang

augmente le coût par trois voies : la fabrication de la seringue, le retraitement de la seringue et le prélèvement.

1.1.2 Séchage d'une goutte de sang

En 2011, des chercheurs marseillais de l'Institut Universitaire des Systèmes Thermiques Industriels (IUSTI) en collaboration avec l'INSERM ont mis en évidence une manière simple de détecter l'anémie et l'hyperlipidémie à partir d'une simple goutte de sang [7, 8]. Lors du séchage de la goutte, les éléments en suspension (protéines, lipides…) se déplacent vers la périphérie. Des gouttes de sang sain vont toujours présenter des motifs identiques (Figure I.2-a et c). Ce n'est pas le cas si le sujet présente certaines pathologies. Dans le cas de l'anémie (Figure I.2-b), la couronne extérieure de la goutte est pâle comparée au centre. La zone intermédiaire ne montre presque pas de craquelures, ce qui est synonyme de non mouillage de la goutte. Le centre de la goutte présente quant à lui de petites plaques. Dans le cas de l'hyperlipidémie, la couronne extérieure est épaisse et grasse. La zone intermédiaire et le centre présentent les mêmes caractéristiques que dans le cas de l'anémie.

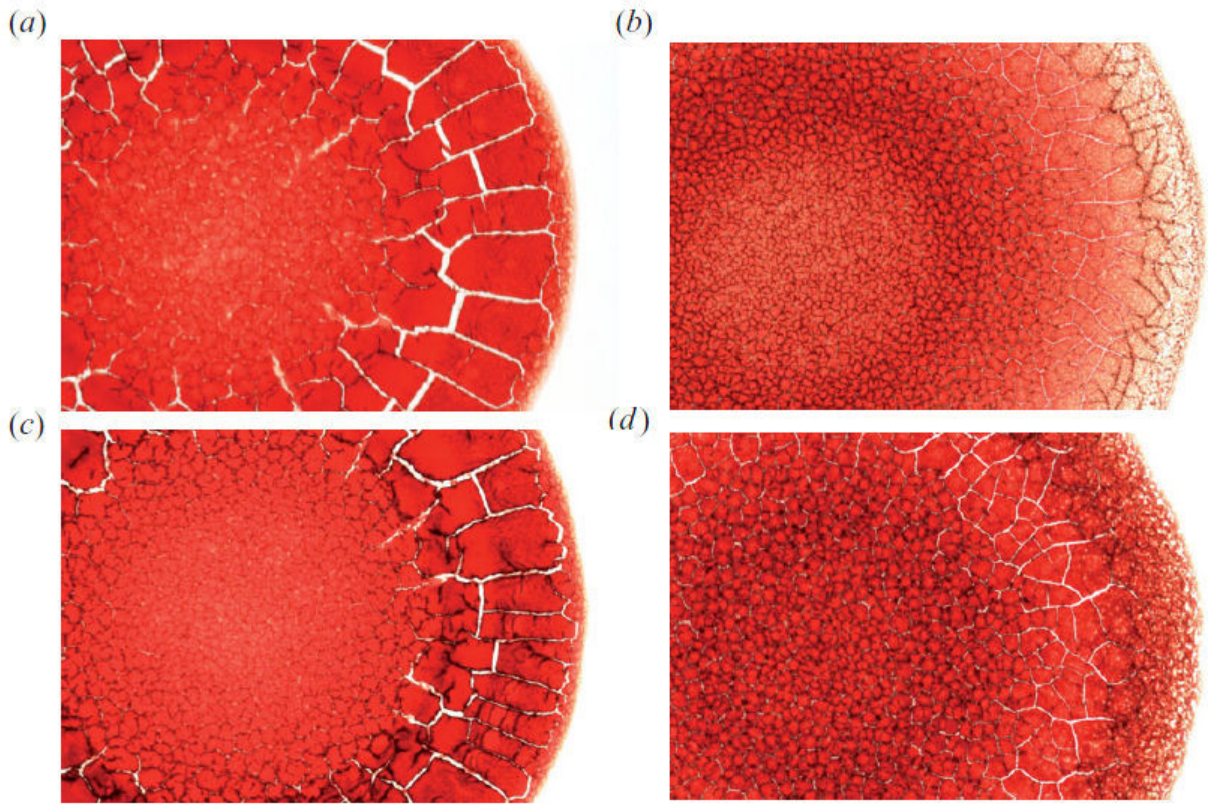


Figure I.2 : gouttes de sang séché provenant a) d'une femme de 27 ans en bonne santé, b) d'un patient atteint d'anémie, c) d'un homme de 31 ans en bonne santé et d) d'un patient atteint d'hyperlipidémie.

En analysant plus finement ces motifs, il devrait être possible de diagnostiquer simultanément de nombreuses maladies affectant le sang à partir d'une simple goutte.

1.2 Qu'est ce qu'un biocapteur ?

La microscopie SEEC peut-être classée dans les techniques de transduction. Un biocapteur est un dispositif d'analyse comprenant un élément biologique sur une surface permettant des interactions réversibles avec l'analyte (l'objet qu'on veut détecter) en solution, et un transducteur [9]. Le transducteur est le moyen de traduire l'information biologique en information mesurable. Il en existe plusieurs types: mécaniques (microbalances à quartz), optiques (SPR), électrochimiques ou thermiques. Beaucoup de biocapteurs intègrent également un système de microfluidique pour transporter l'analyte vers la surface sur laquelle

l'interaction est mesurée. Les meilleurs biocapteurs combinent une spécificité d'analyse élevée avec une grande sensibilité de détection. Bien qu'il en existe de nombreux types peu d'entre eux sont utilisés couramment pour le diagnostic clinique. Pour être commercialisé en temps qu'outil de diagnostic, un biocapteur doit répondeur à plusieurs critères : une bonne précision (faible barre d'erreur sur la mesure), une grande reproductibilité de mesure, une sensibilité élevée (besoin de peu de matière pour être efficace), une forte spécificité et une absence de dérive temporelle. Il doit aussi être peu coûteux et simple d'utilisation. Nous allons dans la suite de ce chapitre présenter deux familles de biocapteurs : avec marquage (radioactif, fluorescent ou enzymatique), puis sans. La détection sans marquage est particulièrement importante pour la détection des protéines.

2 Techniques de détection de molécules

Il existe beaucoup de techniques de détection moléculaire différentes. Nous ne prétendons pas ici en faire une liste exhaustive mais seulement en présenter quelques unes, choisies pour leur intérêt historique ou pédagogique, ou parce qu'elles nous semblent tout particulièrement prometteuses.

2.1 Détection *via* des marqueurs

2.1.1 Dosage radio-immunologique (RIA)

Le dosage radio-immunologique (RIA pour RadioImmuno Assay) a été mis au point par Rosaline Sussman Yalow et Salomon Aaron Berson en 1959 [10]. R.S. Yalow est co-lauréate du prix Nobel de physiologie et de médecine 1977 pour le développement de cette technique. Son principe repose sur la compétition entre un antigène connu et marqué radioactivement et les antigènes à doser. Les deux types d'antigènes (marqué et à tester) sont incubés ensemble dans un tube à essai (Figure I.3-a). Plus il y a d'antigènes à doser dans la solution et moins les antigènes marqués sont fixés. Après un temps de réaction approprié, les antigènes liés et libres sont par exemple séparés par centrifugation. Il existe beaucoup de techniques de séparation différentes (Tableau I.1, [11]). On en déduit la quantité d'antigènes présents dans la solution grâce à des courbes de calibration [12]. Les atomes radioactifs les plus utilisés sont ^{131}I qui a un temps de demi-vie ($T_{1/2}$) de 8 jours et ^{125}I ($T_{1/2}$ = 60j). Les atomes d'iode radioactif sont substitués ou ajoutés aux groupes phénols d'un acide aminé, la thyronine. Quatre atomes d'iode peuvent ainsi être incorporés à chaque thyronine [11].

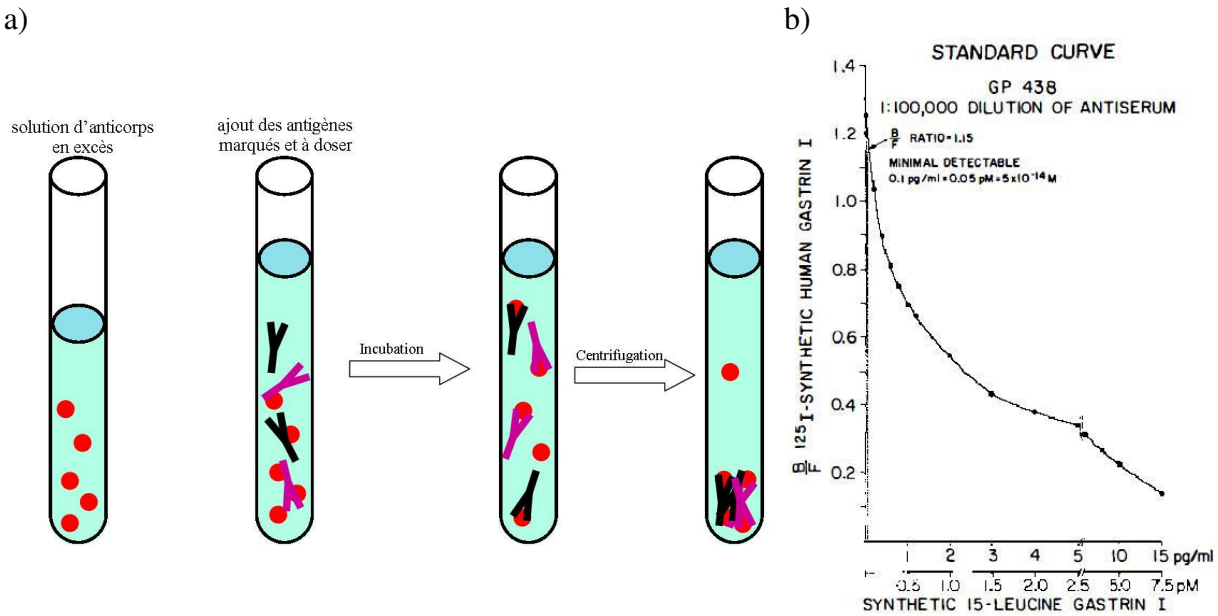


Figure I.3 : a) principe du dosage radio-immunologique avec les anticorps en rouge, les antigènes à doser en noir et les antigènes marqués en mauve et b) courbe de calibration pour le dosage par RIA de la gastrine [12].

Method	Reference
Electrophoresis (starch gel, cellulose acetate, polyacrylamide gel)	Hunter and Greenwood 1964.
Gel filtration (column or batch)	Haber et al. 1965.
Adsorption (charcoal, silicates, hydroxy-apatite)	Herbert et al. 1965; Rosselin et al. 1969; Trafford et al. 1974.
Fractional precipitation (ethanol, dioxan, polyethylene glycol, sodium sulphite, ammonium sulphate, trichloroacetic acid)	Grodsky and Forsham 1960; Heding 1966; Thomas and Ferrin 1968; Chard et al. 1971; Desbuquois and Aurbach 1971; Mitchell and Byron 1971.
Second-antibody precipitation (soluble and solid phase)	Utiger et al. 1962; Hales and Randle 1963; Morgan and Lazarow 1963; den Hollander and Schuurs 1971.
Solid-phase antibody (particles, discs, tubes, gel entrapment, polymerised antibody)	Wide and Porath 1966; Catt and Tregear 1967; Donini and Donini 1969; Updike et al. 1973.

Tableau I.1 : différentes méthodes pour séparer les ligands liés et ligands libres [11].

2.1.2 FRET

Il existe beaucoup de techniques de détection de protéines par fluorescence (microscopie confocale [13], spectroscopie de fluorescence [14]…). La fluorescence est un phénomène d'émission lumineuse induite par la désexcitation du cortège électronique d'une molécule après qu'elle ait absorbé de l'énergie (souvent sous forme lumineuse). Cette fluorescence peut être naturelle (autofluorescence) ou bien plus souvent produite par l'ajout d'un fluorochrome (également appelé chromophore).

Nous allons ici ne présenter succintement que le FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfert ou Förster Resonance Energy Transfert) [15-18]. Cette technique est basée sur une perte de fluorescence induite par une désexcitation non radiative du fluorochrome (quenching). Cette perte de fluorescence est provoquée par la présence d'un second fluorochrome proche du premier. Pour qu'il y ait quenching, il faut que ces fluorochromes

soient proches l'un de l'autre (< 8 nm) et que le spectre d'émission du premier ait un recouvrement avec le spectre d'excitation du second [19] (Figure I.4). L'extinction est maximale pour une distance entre les molécules, r, de l'ordre de 30 à 60 Å et décroit en r^{-6}. En mesurant cette extinction de fluorescence, on est capable de remonter à la quantité de protéines.

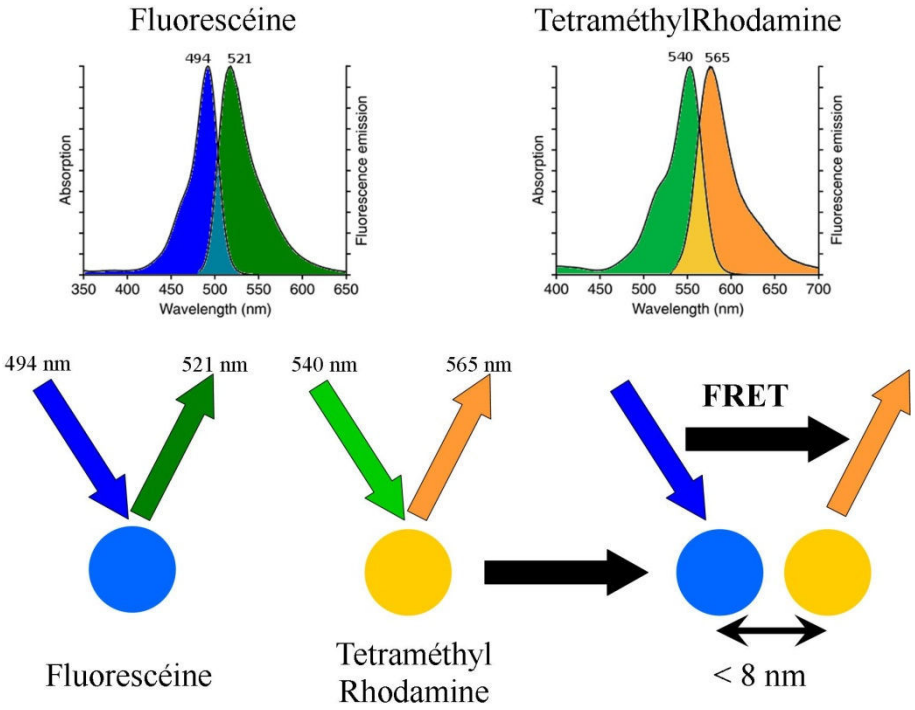


Figure I.4 : principe du FRET avec le cas particulier de la fluorescéine et du tetraméthylRhodamine.

Les principales limites de cette technique sont le manque de sélectivité spectrale des fluorochromes et la luminescence parasite (autofluorescence, diffraction lumineuse, lumière réfléchie…). Un moyen d'améliorer la technique est l'utilisation d'atomes de terre rare dans les fluorochromes [20, 21]. En effet les cations lanthanides possèdent des $T_{1/2}$ de l'ordre de la milliseconde alors que les fluorochromes classiques possèdent des $T_{1/2}$ plus proches de la nanoseconde, tout comme les phénomènes pouvant parasiter les mesures. Avec de tels fluorochromes, il est donc possible d'augmenter le délai entre l'excitation et la détection, ce qui permet d'obtenir un meilleur rapport signal/bruit.

2.1.3 ELISA

La technique ELISA (Enzime Linked ImmunoSorbent Assay) est un procédé de mesure indirect inventé par Ava Engvall et Peter Perlmann en 1971 [22].On dit que cette technique est indirecte car l'on ne détecte pas la molécule à doser mais celle avec laquelle elle a réagi et qui a préalablement été marquée. Le marqueur utilisé en ELISA est un enzyme. Cet enzyme pigmente la solution, on dit qu'il est chromogène. La sensibilité et la spécificité de la technique ELISA ont été évaluées meilleures que celles du dosage radio-immunologique (RIA), qui était alors la technique de référence.

2.1.3.1 Principe de la détection ELISA

La technique ELISA est basée sur la reconnaissance spécifique entre un anticorps et un antigène. Si l'on veut détecter la présence d'anticorps, on va marquer l'antigène correspondant et inversement pour mesurer la quantité d'antigène, on va marquer l'anticorps complémentaire. Il ne reste plus qu'à faire interagir l'anticorps et l'antigène l'un avec l'autre, à rincer et à mesurer la quantité de marqueurs fixés. Plusieurs enzymes peuvent être utilisés. Un bon enzyme doit avoir un bon rendement, être peu coûteux, stable, soluble et les produits qu'il génère doivent être facilement mesurables. Les principaux enzymes utilisés sont le phosphatase alcaline, le peroxydase de raifort (HRP pour HorseRadish Peroxidase en anglais), le glucose oxydase et la β-d-galactosidase [23]. À chaque enzyme correspond des révélateurs spécifiques qui changent la couleur de la solution en présence de l'enzyme (Tableau I.2). Le changement de couleur est ensuite mesuré, le plus souvent, par spectroscopie UV/Visible. La loi de Beer-Lambert permet ensuite de relier l'intensité lumineuse à la concentration en enzyme et par conséquent à la concentration en molécule à titrer.

Enzyme	Révélateur	Détection	Références
HRP	3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB)	bleu => jaune	[24]
	H_2O_2 + orthophénylène diamine (OPD)	incolore => brun	[25]
Phosphatase alcaline	4-nitrophényl-phosphate (PNPP)	incolore => jaune	[25]
β-d-galactosidase	2-nitrophényl β- galactoside (ONPG)	incolore => jaune	[25]

Tableau I.2 : enzymes couramment utilisés en détection ELISA et révélateurs associés.

2.1.3.2 Divers procédures de mesure ELISA

Il existe plusieurs techniques ELISA différentes. La première dite **méthode indirecte** consiste comme pour le RIA en un dosage par compétition. Dans un premier temps, la surface de puits est recouverte d'anticorps. Ensuite, on injecte simultanément une quantité connue d'antigènes marqués et les antigènes à doser. Après rinçages, les antigènes marqués sont détectés, on remonte ainsi à la quantité d'antigènes inconnus présents dans le milieu.

Dans la **méthode sandwich** (Figure I.5-b), on tapisse les parois des puits d'anticorps. La solution contenant les antigènes à doser est ensuite injectée. Après rinçage, on ajoute une solution d'anticorps marqués. Ce sont eux qui vont être détectés. Pour que cette méthode soit possible, il faut que l'antigène à doser possède au moins deux sites d'interaction avec les anticorps.

Dans le cas où l'antigène ne possède pas plusieurs sites d'interaction, il est possible d'utiliser la **méthode dite « directe »** (Figure I.5-a). Dans ce cas, les antigènes à doser sont directement adsorbés sur les parois des puits. On injecte ensuite les anticorps marqués.

a)

b)

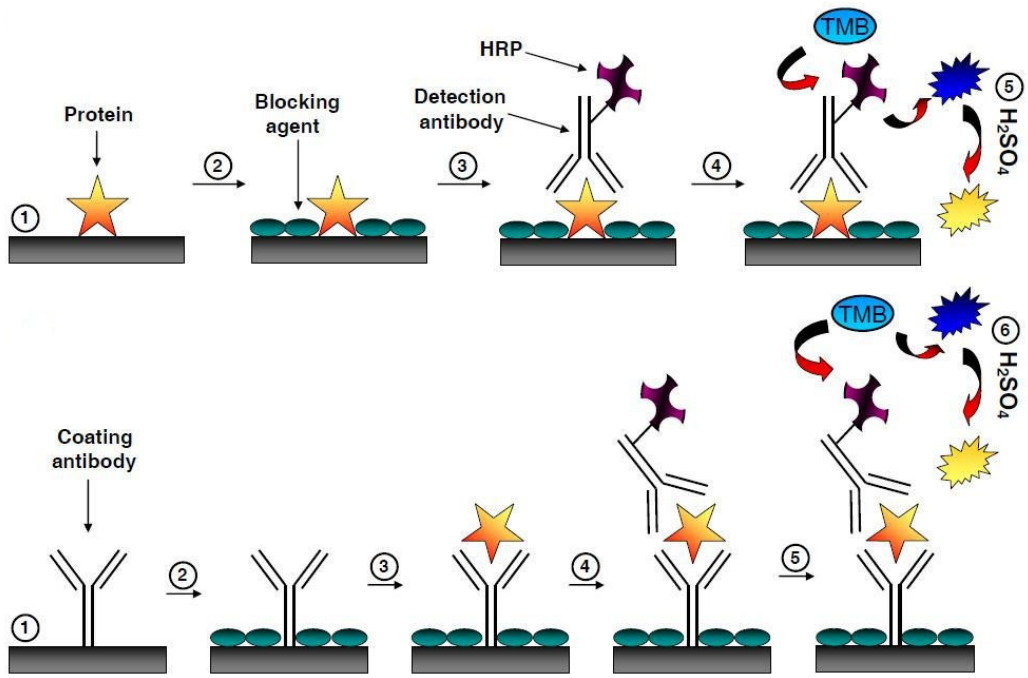


Figure I.5 : a) méthode directe et b) méthode sandwich pour la détection d'interactions anticorps/antigène par la technique ELISA. Dessins extraits de la thèse de Tjasa Vrlinic [24].

Pour toutes ces techniques, il est courant de recouvrir les puits d'agents bloquants après adsorption de la première protéine (anticorps ou antigène selon la technique) afin de minimiser les interactions non spécifiques. Ces agents bloquants sont la plupart du temps de la BSA ou un surfactant.

La technique ELISA ne permet pas de faire un suivi *in situ* du couplage anticorps/antigène. La plaque standard d'ELISA possède 96 puits. Il est donc possible d'étudier 96 interactions en simultané, ce qui, malgré le temps long de la mesure (3-5h), permet d'obtenir un bon rapport quantité d'information/temps.

2.2 Techniques de lecture sans marquage

2.2.1 Microbalance à Quartz (QCM)

La microbalance à quartz (QCM pour Quartz Crystal Microbalance) est basée sur les propriétés piézoélectriques du quartz [26]. Un piézoélectrique est un matériau qui se déforme lorsqu'on lui applique une différence de potentiel. Inversement, il délivre un courant électrique lorsqu'il est déformé mécaniquement. Pendant la seconde guerre mondiale, les résonateurs à base de quartz (Figure I.6) ont été très utilisés pour les communications radiophoniques militaires. Une méthode utilisée pour accorder les résonateurs entre eux était de faire une marque au crayon sur une des électrodes. En effet, cet ajout de graphite laissé par le crayon entraine une légère chute de la fréquence de résonnance du cristal de quartz. Günter Sauerbrey a modélisé ce phénomène en 1959 [27]. L'équation reliant la variation de fréquence Δf avec la variation de masse Δm qui la provoque porte à présent son nom :

$$\Delta f = \frac{-2f^2}{A\rho c}\Delta m$$ **Équation I.1**

où A est l'aire de recouvrement des électrodes, ρ = 2650 kg.m^{-3} la masse volumique du quartz et c = 3340 m.s^{-1} la célérité de l'onde acoustique dans le quartz [26].

À partir de ce moment, il a été possible de suivre un très faible ajout de matière sur la surface d'un cristal, afin de mesurer des épaisseurs de couches minces déposées en microélectronique par exemple. Avec une microbalance à quartz, on est capable de mesurer des dépôts de quelques nanogrammes par centimètre carré.

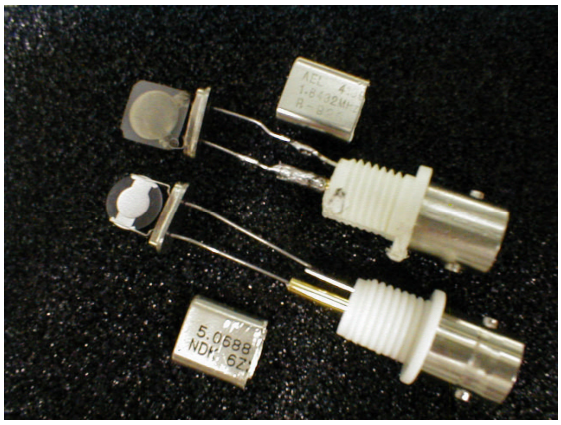


Figure I.6 : deux résonateurs à quartz soudés sur des connecteurs BNC femelles [26].

L'utilisation de la QCM comme biocapteur est arrivée bien plus tard, le frein principal étant le changement d'environnement avec le passage de l'air (ou vide) au liquide. Il faut alors tenir compte de sa viscosité ainsi que des interactions entre les molécules adsorbées sur la surface vibrante et celles présentes dans la solution comme les sels. Il est nécessaire de suivre en plus de la fréquence d'oscillation du cristal de quartz la résistance du circuit équivalent [26]. Cette résistance équivalente correspondant à la dissipation de la résonance au cours du temps et informe sur les frottements occasionnés par le milieu.

On trouve dans le commerce de nombreux biocapteurs basés sur la microbalance à quartz [28]. Pour les applications biologiques, un polymère ou une couche d'or est souvent déposée sur le cristal de quartz. Cette couche est ensuite fonctionnalisée pour fixer les récepteurs spécifiques des analytes à doser dans la solution. Une monocouche de protéines adsorbées sur une électrode de 1 cm² pèse quelques centaines de nanogrammes [26]. La sensibilité d'une QCM est de 1 ng/cm² [29], soit 10 pg/mm².

2.2.2 Résonance Plasmonique de Surface (SPR)

Lorsqu'une onde lumineuse est envoyée sur une couche mince métallique avec un angle supérieur à l'angle critique, il y a réflexion totale de cette onde et création d'un plasmon dans la couche métallique. Il existe alors un angle de résonance pour lequel l'intensité réfléchie chute fortement. Cette chute est brusque et dépend de l'indice de réfraction du milieu au dessus de la couche métallique. Par conséquent, lorsqu'une protéine s'accroche sur cette couche métallique, le changement d'indice engendre un déplacement du minimum. En suivant la variation de l'angle, on peut connaitre le changement de l'indice de réfraction et ainsi remonter à la quantité de protéine sur la surface. En travaillant à angle fixe, on observe une variation d'intensité qui renseigne aussi sur le déplacement de ce minimum. Enfin, le minimum peut être retrouvé en modifiant la longueur d'onde de la source.

Lors de sa première utilisation pour des études de biochimie, la SPR a été comparée à la microbalance à quartz [30]. C'est aujourd'hui la technique de référence pour les études d'interactions protéine/protéine. Sa sensibilité est de 1 pg/mm². De plus en 1988, Benno Rothenhäusler et Wolganag Knoll ont inventé une technique d'imagerie basée sur la SPR [31, 32]. Pour toutes ces raisons, nous avons continuellement comparé notre travail en microscopie « SEEC » avec des mesures SPR. C'est pourquoi le Chapitre II de ce manuscrit est consacré à cette technique.

2.2.3 Ellipsométrie

L'ellipsométrie est une technique optique non destructive permettant de mesurer des épaisseurs de film. Elle est aussi bien utilisée pour déterminer des épaisseurs organiques qu'inorganiques. Cette technique est basée sur la réflexion d'une onde lumineuse sur une surface. Si cette onde est polarisée et arrive sur la surface avec une incidence oblique, la

polarisation est elliptique après réflexion. La forme et l'orientation de cette ellipse dépendent des conditions initiales de l'onde (angle d'incidence, polarisation…) mais aussi de l'état de la surface. Cette technique est donc sensible à tout dépôt de surface et renseigne sur la variation de l'indice de réfraction et l'épaisseur de la couche superficielle [9].

Comme pour la SPR, il est possible de faire de l'imagerie par ellipsométrie. Jin *et al.* ont, par exemple, étudié des interactions anticorps/antigène par imagerie ellipsométrique [32, 33]. La Figure I.7 présente des résultats de leurs expériences. Des biopuces contenant des plots de fibrinogène (Fib), d'albumine sérique humaine (HSA) et d'immunoglobuline G (IgG) ont été incubées dans une solution d'anticorps anti-IgG. Seuls les plots d'IgG ont augmenté d'épaisseur ce qui prouve la capacité de la technique à détecter des interactions protéine/protéine spécifiques. Dans cette expérience, les plots de HSA sont peu visibles car pour minimiser les fixations non spécifiques sur la surface, de l'albumine sérique bovine (BSA) a été utilisée. Elle a une épaisseur et un indice de réfraction très proche de ceux de la HSA.

a) avant incubation b) après incubation

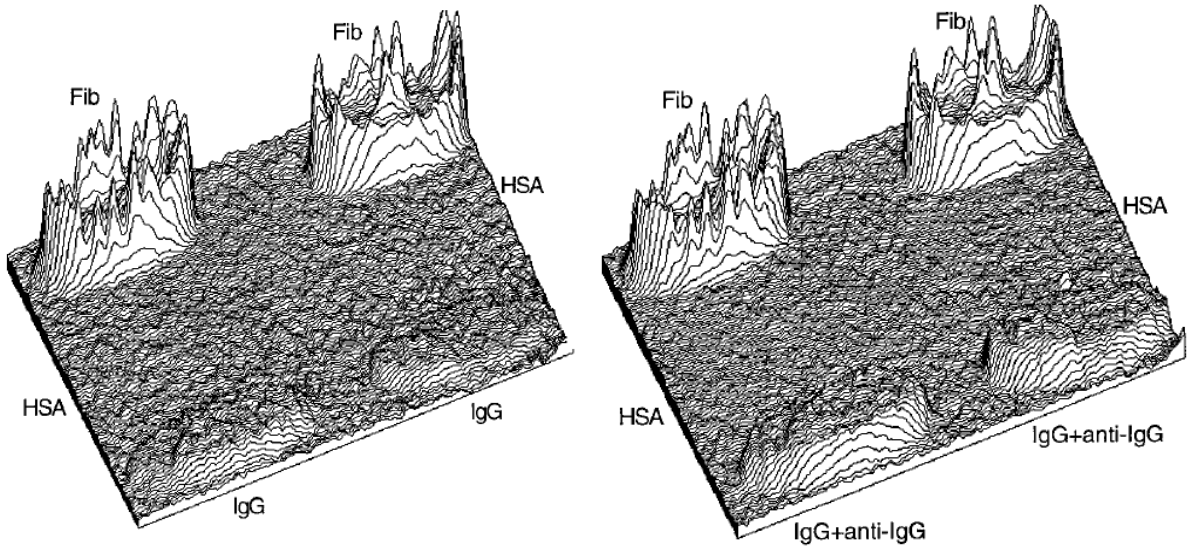


Figure I.7 : Interaction spécifique anticorps/antigène visualisée par imagerie ellipsométrique [33].

L'ellipsométrie peut aussi être utilisée pour un suivi *in situ*, même si ce n'est pas le cas dans l'expérience présentée ci-dessus. Cela reste cependant une technique peu répandue car relativement complexe notamment dans son analyse.

2.2.4 La spectroscopie Raman ou infrarouge

Les techniques de spectroscopie vibrationnelle Raman et infrarouge sont très souvent complémentaires. Elles sont aussi bien utilisées en laboratoire pour déterminer la conformation de protéines en fonction de différents paramètres (pH [34, 35], température [36] ou potentiel électrochimique de la solution [37]…) que pour la détection de bactéries dans l'industrie agroalimentaire [38]. Ce sont des techniques simples d'utilisation et très facile d'accès. Elles sont rapides, faciles à mettre en œuvre et spécifiques lorsque les bandes spécifiques à chaque bactérie sont connues.

L'avantage de la spectroscopie Raman par rapport à la spectroscopie infrarouge dans le cadre d'études biologiques est qu'en spectroscopie Raman on utilise la lumière visible qui n'est pas absorbé par les milieux aqueux contrairement aux infrarouges. Par contre la spectroscopie infrarouge présente des raies bien plus intenses, la section efficace de la spectroscopie infrarouge étant supérieure à celle de la spectroscopie Raman. La spectroscopie Raman est de plus handicapée par la fréquente luminescence des objets biologiques étudiés.

La bonne résolution spatiale de la spectroscopie Raman (0,5 µm) permet de la combiner facilement avec de l'imagerie. La cartographie Raman n'est pas encore très répandue à cause d'un temps de mesure excessivement long si l'on désire une bonne

sensibilité et exploiter au mieux la forte résolution de la technique. Depuis le milieu des années 90 est apparue la microscopie infrarouge [39]. La microscopie infrarouge est plus sensible que la microscopie Raman, mais présente une résolution spatiale beaucoup plus faible (seulement 10 µm). Cette résolution spatiale pauvre est inhérente aux infrarouges qui possèdent une longueur d'onde supérieure à la lumière visible et qui, par conséquent, est plus sensible à la diffraction. La microscopie en proche infrarouge peut être un bon compromis entre microscopie infrarouge et Raman, soit entre sensibilité et résolution. Les techniques de microscopie infrarouge par réflexion totale atténuée (ATR pour Attenuated Total Reflection en anglais) permettent d'augmenter la résolution spatiale jusqu'à 3 à 4 µm [40, 41]. La Figure 8 présente des micrographies infrarouges ATR d'une artère atteinte d'athérosclérose (région en rouge sur la micrographie (a)) accompagnées du spectre infrarouge de trois zones caractéristiques [39].

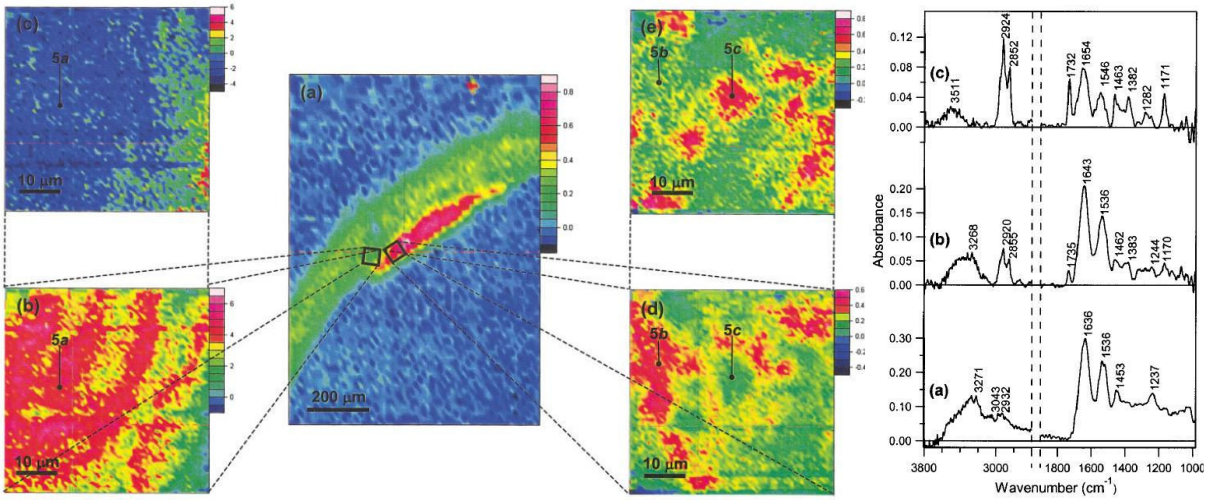


Figure 8 : a) macrographie infrarouge d'une artère atteinte d'athérosclérose (en rouge), b-e) micrographies infrarouge ATR basées sur l'intégration de la bande d'absorbance Amide II à 1530 cm^{-1} (intégration de 1485 – 1580 cm^{-1}). Les spectres a-c à droite des micrographies correspondent aux spectres infrarouges aux points de coordonnées symbolisées par un point noir sur les micrographies b-e. [39]

2.2.5 Microscopie à force atomique (AFM)

Pour faire des mesures d'interaction en microscopie à force atomique, on fonctionnalise une pointe AFM avec une protéine. Cette protéine réagit avec la protéine complémentaire présente sur la surface. On mesure ainsi une courbe de force associée à l'interaction entre les protéines [42]. Pour ce type de mesures, il est nécessaire que les interactions protéine/surface et protéine/pointe AFM soient supérieures à l'interaction protéine/protéine. Deux types de fixation sont couramment utilisées pour obtenir une liaison covalente entre une surface et une protéine : *via* un thiol sur une surface d'or ou *via* un silane sur de la silice. Les molécules portant le thiol ou le silane sont alors appelés espaceurs. Les liaisons covalentes sont dix fois plus fortes (~ 1-2 nN) que les liaisons récepteur/ligand usuelles, qui impliquent des liaisons hydrogènes. Le plus souvent, les pointes AFM sont recouvertes d'une couche d'or. Cette couche est ensuite fonctionnalisée par un thiol possédant un groupement carboxylique comme fonction terminale. Ce groupement carboxylique permet de réaliser la fixation de la protéine sur la pointe AFM *via* un couplage amine par une solution aqueuse d'EDC/NHS. Par cette méthode, il est admis que l'on obtient une densité de 200 à 500 molécules/µm², soit en moyenne une seule molécule sur la zone utile de la pointe pour une pointe de 20-50 nm de rayon. Il est ainsi possible d'étudier les forces d'interaction de molécules uniques.

La Figure I.9 montre les courbes de force obtenues lors de l'interaction entre une molécule d'oligo-glucose (en bleu) présente sur la pointe AFM et une molécule de concanavaline A (en orange) accrochée à la surface. Lorsqu'il y a interaction (Figure I.9-a), on observe une chute sur la courbe de force. La rupture de la liaison se traduit par une courbure du signal de force à cause de l'élasticité de l'espaceur. La Figure I.9-b présente le cas où il n'y a pas d'interaction, car tous les sites sont déjà occupés.

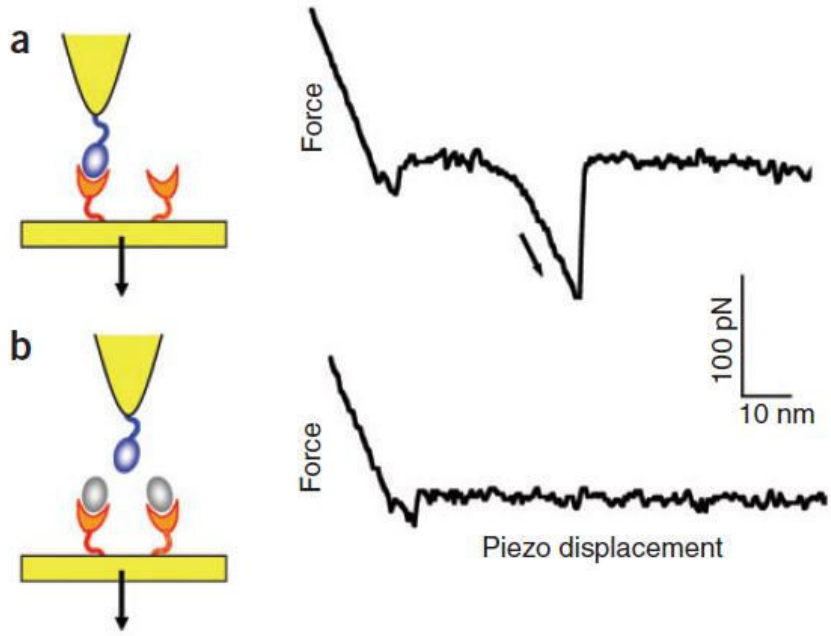


Figure I.9 : a) courbe de force obtenue pour l'interaction entre une molécule de carbohydrate d'oligo-glucose (en bleue) sur la pointe AFM et une molécule de concanavaline A (en orange) sur la surface et b) expérience identique où les sites ont été bloqués [42].

La microscopie de force AFM est surtout utilisée pour l'étude d'interactions entre deux molécules uniques ainsi que pour sa capacité à mesurer des interactions faibles. Elle conserve de plus sa haute résolution en imagerie. L'inconvénient majeur de cette technique est le temps qu'elle prend mais avec l'essor des techniques AFM ultra rapide [43, 44] ce frein est en train de disparaitre.

2.2.6 Systèmes dédiés, exemple des capteurs de glucoses.

En application clinique, la grande partie des biocapteurs sont des systèmes dédiés à la reconnaissance d'un type de molécules comme par exemple le test de grossesse qui est capable de détecter la présence d'une seule hormone : la gonadotrophine chorionique (HCG ou β-HCG) dans l'urine.

Un autre type de capteur dédié et très utilisé est le capteur à glucose employé principalement par les diabétiques pour mesurer leur taux de sucre dans le sang et pouvoir ajuster leurs injections d'insuline et ainsi éviter l'hyper ou l'hypoglycémie engendré par un mauvais dosage. Pour les diabétiques devant se faire plusieurs fois par jour des injections d'insuline, il a été nécessaire d'inventer des techniques de détection du glucose simples pour que tout le monde puisse les utiliser au quotidien. Les lignes qui suivent sont extraites de l'article de Dufait-Patouraux *et al.* intitulé « technologie et fiabilité de l'autosurveillance glycémique : historique et état actuel » [45].

L'autosurveillance glycémique débute dans les années 40, elle est alors effectuée par la mesure de la quantité de sucre dans les urines (glycosurie). Le docteur Walter Ames Compton invente un comprimé (Clinitest ®) changeant de couleur en présence de sucre dans les urines puis des bandelettes colorimétriques (Clinitix ®). On lit alors la présence de sucre dans les urines avec une gamme étalon comme pour le papier pH. Cette méthode est la première technique semi-quantitative de détection de la glycémie. La quantité de sucre dans l'urine (glucosurie) et dans le sang (glycémie) n'est cependant pas la même. En 1956, le premier test sur bandelette à partir d'une goutte de sang est mis au point. L'utilisation de lecteurs photométriques à partir des années 70 affine la précision de la détection. Leur usage nécessite cependant la présence d'un personnel médical. Au bout de quelques années la technique devient plus maniable et est utilisable directement par le patient.

Les avancées technologiques s'accélèrent dans les années 80 aussi bien dans la maniabilité des détecteurs que dans le temps de mesure. Le premier capteur de glucoses personnel est le Glucometer I ® en 1981, il est basé sur une double réaction enzymatique, glucose oxydase et peroxydase qui donne un dérivé coloré.

Le premier lecteur de glycémie basé sur la technologie biocapteur (ExaTech ®) est commercialisé en 1987. Il utilise l'électrochimie comme principe de détection (ampérométrie

dans ce cas précis). Dans le détecteur, une électrode contient du glucose oxydase qui se réduit au contact du glucose. L'électrolyte (ferricyanure) va également être réduit (en ferrocyanure), la ré-oxydation de l'électrolyte génère un courant induit. L'intensité de ce courant est proportionnelle à la concentration en glucose. La Figure 10 ci-dessous présente différents types de capteurs de glucoses commerciaux.

Appareil	Laboratoire	Date	Quantité de sang	Durée de mesure	Technologie	Enzyme	Alarme quantité insuffisante	Poids sans pile
Reflomat*	Roche	1976	18 µl	2 mn	Colorimétrie	GOD	Non	
Glucometer 1*	Ames	1981	1 goutte	30 s	Colorimétrie	GOD	Non	1 kg
Reflolux*	Roche	1983	15 µl	2 mn	Colorimétrie	GOD	Non	
Reflolux F, MF, SF*	Roche	1985/88/90	15 µl	2 mn	Colorimétrie	GOD	Non	
Glucometer II*	Ames	1987	8 µl	30 s	Colorimétrie	GOD	Non	200 g
Glucoscan	Lifescan	1988	10 µl	45 s	Colorimétrie	GOD	Non	174 g
Tracer*	Roche	1989	13 µl	2 mn	Colorimétrie	GOD	Non	
Exatech*	Baxter	1990	10 µl	20 s	Electrochimie	GOD	Non	30 g
One Touch II	Lifescan	1990	10 µl	45 s	Colorimétrie	GOD	Oui	135 g
Glucometer III et Print*	Bayer Diagnostics	1991	8 µl	30 s	Colorimétrie	GOD/POD	Non	100/ 233 g
Accuchek Easy*	Roche	1993	10 µl	30 s	Colorimétrie	GOD		
One Touch Basic**	Lifescan	1993	10 µl	45 s	Colorimétrie	GOD	Oui	135 g
Glucometer IV**	Bayer Diagnostics	1994	4 µl	30 s	Colorimétrie	Hexokinase	Non	150 g
Precision Quid**	Abbott	1995	3,5 µl	20 s	Electrochimie	GOD	Non	40 g
One Touch Profile**	Lifescan	1996	10 µl	45 s	Colorimétrie	GOD	Oui	127 g
Glucomatic Esprit 1***	Bayer Diagnostics	1997	3 µl	30 s	Electrochimie	GOD	Oui	100 g
Glucotrend, Premium**	Roche	1997	2 µl	10 s	Colorimétrie	GlucDOR	Oui	80 g
EuroFlash**	Lifescan	1999	2,5 µl	15 s	Electrochimie	GOD	Non	45 g
Glucotrend 2**	Roche	1999	2 µl	10 s	Colorimétrie	GlucDOR	Oui	58 g
Gluco Touch Plus**	Lifescan	2000	7 µl	15 s	Colorimétrie	GOD	Oui	108 g
One Touch Basic Plus	Lifescan	2000	10 µl	45 s	Colorimétrie	GOD	Oui	116 g
Optium**	Abbott	2000	3,5 µl	20 s	Electrochimie	GDH***/NAD	Oui	79 g
Optium**	Abbott	2000	5 µl	30 s	Electrochimie	β OHB	Oui	79 g
Prestige Plus**	Chronolys	2002	3 µl	20 à 30 s	Colorimétrie	GOD	Oui	30 g
Glucomen Glyco**	Menarini	2001	3 µl	30 s	Electrochimie	GOD	Non	50 g
One Touch Ultra**	Lifescan	2001	1 µl	5 s	Electrochimie	GOD	Non	45 g
Ascensia Esprit 2	Bayer Diagnostics	2001	3 µl	28 s	Electrochimie	GOD	Oui	100 g
Accu-chek Active**	Roche	2002	2 µl	5 s	Colorimétrie	GlucDOR	Oui	45 g
Softact**	Abbott	2002	2 µl	20 s	Electrochimie	GDH***/NAD	Oui	312 g
Free Style Papillon**	Disetronic	2002	0,3 µl	5 à 20 s	Electrochimie Coulométrie		Oui	95 g avec pile

* Lecteurs anciens. ** Lecteurs sur le marché. *** GDH : glucose déshydrogénase.

Figure 10 : tableau résumant les différents capteurs de glucoses commerciaux historiques [45].

Il existe encore bien d'autres techniques de détection très intéressantes tel que l'interférométrie optique [46] ou l'électrochimie [47]. Nous ne pouvons pas toutes les décrire ici. On en retrouve beaucoup dans divers articles de revue tel que ceux de Ray *et al.*[48] (sur les techniques de biopuces sans marquage), de Brecht *et al.*[49] (sur les transducteurs optiques) et de Luppa *et al.* [9] (sur l'utilisation de biocapteur en milieu médical).

3 Potentiel de la microscopie « SEEC » pour la lecture de biopuces

La microscopie SEEC a déjà été utilisée pour la lecture de biopuces par Ausserré *et al* [50] et Souplet *et al* [51] – Vianney Souplet a d'ailleurs soutenu sa thèse de doctorat sur ce sujet en 2007 [52] – mais la lecture des puces par microscopie SEEC n'a été faite jusqu'à présent qu'à l'air après interaction et séchage. Cette méthode ne permet pas le suivi en temps réel et le séchage est un frein important pour l'étude d'objets biologiques. Le but de cette thèse est justement de lever le verrou du suivi *in situ* des interactions entre protéines. Souplet a prouvé dans son étude à l'air que la microscopie SEEC permettait de détecter la formation de complexes peptide/anticorps spécifiques et montré une variation linéaire de l'intensité mesurée avec la quantité d'anticorps fixés. Bien que la sensibilité SEEC soit légèrement plus faible que celle de la microscopie de fluorescence, la microscopie SEEC présente le fort avantage de ne demander aucune modification des matériaux biologiques (protéines, ADN, peptides…). Nous nous proposons donc dans ce travail de thèse de continuer sur la voie empruntée par Souplet et d'essayer de lever le dernier frein pour une utilisation de la

microscopie SEEC à une échelle plus importante, à savoir l'observation en immersion dans l'eau. En rendant la technique exploitable pour l'étude des cinétiques de capture entre molécules biologiques complémentaires, cette possibilité amènerait le SEEC sur le terrain exploité par la SPR et la positionnerait comme une technique concurrente.

À ce jour, notre travail montre que les choses ne sont pas si simples et qu'il n'y a pas encore de recouvrement entre les possibilités de la SPR et celles du « SEEC », les deux techniques apparaissent plutôt comme complémentaires. Nous verrons aussi comment la comparaison entre les deux techniques nous a guidés dans la manière de faire progresser la seconde, pour aboutir finalement à la mise en œuvre d'un principe de détection optique différent et d'une application plus répandue encore que l'étude des cinétiques d'interaction entre biomolécules et surfaces, qui est le diagnostic immunologique à faible coût.

Références.

1. Ausserre, D.; Valignat, M. P., Surface enhanced ellipsometric contrast (SEEC) basic theory and lambda/4 multilayered solutions. *Optics Express* **2007,** 15, (13), 8329-8339.

2. Ausserre, D.; Valignat, M. P., Wide-field optical imaging of surface nanostructures. *Nano Letters* **2006,** 6, (7), 1384-1388.

3. http://www.grandchallenges.org/MeasureHealthStatus/Topics/CreateLowCostDiagnostics/Pages/Round4.aspx

4. Martinez, A. W.; Phillips, S. T.; Butte, M. J.; Whitesides, G. M., Patterned Paper as a Platform for Inexpensive, Low-Volume, Portable Bioassays. *Angewandte Chemie International Edition* **2007,** 46, (8), 1318-1320.

5. Martinez, A. W.; Phillips, S. T.; Nie, Z.; Cheng, C.-M.; Carrilho, E.; Wiley, B. J.; Whitesides, G. M., Programmable diagnostic devices made from paper and tape. *Lab on a Chip* **2010,** 10, (19), 2499-2504.

6. Martinez, A. W., Microfluidic paper-based analytical devices: from POCKET to paper-based ELISA. *Bioanalysis* **2011,** 3, (23), 2589-2592.

7. Brutin, D.; Sobac, B.; Loquet, B.; Sampol, J., Pattern formation in drying drops of blood. *Journal of Fluid Mechanics* **2011,** 667, 85-95.

8. Escalon, S., Une goutte de sang qui en dit long. *CNRS Le journal* avril 2011, p 8.

9. Luppa, P. B.; Sokoll, L. J.; Chan, D. W., Immunosensors - principles and applications to clinical chemistry. *Clinica Chimica Acta* **2001,** 314, 1-26.

10. Yalow, R. S.; Berson, S. A., Assay of Plasma Insulin in Human Subjects by Immunological Methods. *Nature* **1959,** 184, (4699), 1648-1649.

11. Chard, T., Chapter 5 Requirements for a binding assay - separation of bound and free ligand. In *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Elsevier: 1978; Vol. Volume 6, pp 401-426.

12. Yalow, R. S., Radioimmunoassay. *Annual Review of Biophysics and Bioengineering* **1980,** 9, (1), 327-345.

13. Togashi, D. M.; Ryder, A. G.; Heiss, G., Quantifying adsorbed protein on surfaces using confocal fluorescence microscopy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2009,** 72, (2), 219-229.

14. Wangoo, N.; Suri;, C. R.; Shekhawat;, G., Interaction of gold nanoparticles with protein: A spectroscopic study to monitor protein conformational changes. *Applied Physics Letters* **2008,** 92, (13), 133104.

15. Stryer, L., Fluorescence Energy Transfer as a Spectroscopic Ruler. *Annual Review of Biochemistry* **1978,** 47, (1), 819-846.

16. Selvin, P. R.; Kenneth, S., [13] Fluorescence resonance energy transfer. In *Methods in Enzymology*, Academic Press: 1995; Vol. Volume 246, pp 300-334.

17. Gambin, Y.; Deniz, A. A., Multicolor single-molecule FRET to explore protein folding and binding. *Molecular BioSystems* **2010,** 6, (9), 1540-1547.

18. Wu, P. G.; Brand, L., Resonance Energy Transfer: Methods and Applications. *Analytical Biochemistry* **1994,** 218, (1), 1-13.

19. Ratinaud, M.-H.; Petit;, J.-M.; Christian, C., Les fluorochromes utilisés en cytométrie et leurs précautions d'emploi. In *Cytométrie par fluorescence - Apports comparatif des techniques flux, image et confocale*, INSERM, l. é., Ed. 1994; pp 35-80.

20. Selvin, P. R., Lanthanide-based resonance energy transfer. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics* **1996,** 2, (4), 1077-1087.

21. Vuojola, J.; Lamminmäki, U.; Soukka, T., Resonance Energy Transfer from Lanthanide Chelates to Overlapping and Nonoverlapping Fluorescent Protein Acceptors. *Analytical Chemistry* **2009,** 81, (12), 5033-5038.

22. Engvall, E.; Perlmann, P., Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* **1971,** 8, (9), 871-874.

23. Voller, A.; Bartlett, A.; Bidwell, D. E., Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. *Journal of clinical pathology* **1978,** 31, (6), 507-20.

24. Vrlinic, T. Development of new anti-bioadhesive surfaces for specific neurodegenerative agents. Université du Maine, le mans, 2011.

25. Méthodes physiques de séparation et d'analyse et méthodes de dosage des biomolécules. http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/lafont/dosages/D3.html

26. Friedt, J.-M., Introduction à la microbalance à quartz: aspects théoriques et expérimentaux. *Bulletin de l'union des physiciens* **2003,** 852, 429-440.

27. Sauerbrey, G., Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung. *Zeitschrift für Physik A Hadrons and Nuclei* **1959,** 155, (2), 206-222.

28. Vashist, S. K.; Vashist, P., Recent Advances in Quartz Crystal Microbalance-Based Sensors. *Journal of Sensors* **2011,** 2011.

29. Ward, M. D.; Buttry, D. A., In Situ Interfacial Mass Detection with Piezoelectric Transducers. *Science* **1990,** 249, (4972), 1000-1007.

30. Liedberg, B.; Nylander, C.; Lunström, I., Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. *Sensors and Actuators* **1983,** 4, 299-304.

31. Rothenhäusler, B.; Knoll, W., Surface-plasmon microscopy. *Nature* **1988,** 332, (6165), 615-617.

32. Hickel, W.; Kamp, D.; Knoll, W., Surface-plasmon microscopy. *Nature* **1989,** 339, (6221), 186-186.

33. Jin, G.; Tengvall, P.; Lundström, I.; Arwin, H., A Biosensor Concept Based on Imaging Ellipsometry for Visualization of Biomolecular Interactions. *Analytical Biochemistry* **1995,** 232, (1), 69-72.

34. Shimada, H.; Caughey, W. S., Dynamic protein structures. Effects of pH on conformer stabilities at the ligand-binding site of bovine heart myoglobin carbonyl. *Journal of Biological Chemistry* **1982,** 257, (20), 11893-11900.

35. Estey, T.; Jichao, K.; Schwendeman, S., P.;; Carpenter, J., F.;, *BSA degradation under acidic conditions : A model for protein instability during release from PLGA delivery systems*. American Pharmaceutical Association: Washington, DC, ETATS-UNIS, 2006; Vol. 95, p 14.

36. Wang, J.; El-Sayed, M. A., Temperature Jump-Induced Secondary Structural Change of the Membrane Protein Bacteriorhodopsin in the Premelting Temperature Region: A Nanosecond Time-Resolved Fourier Transform Infrared Study. *Biophysical Journal* **1999,** 76, (5), 2777-2783.

37. Hellwig, P.; Behr, J.; Ostermeier, C.; Richter, O.-M. H.; Pfitzner, U.; Odenwald, A.; Ludwig, B.; Michel, H.; Mäntele, W., Involvement of Glutamic Acid 278 in the Redox Reaction of the Cytochrome c Oxidase from Paracoccus denitrificans Investigated by FTIR Spectroscopyâ€ *Biochemistry* **1998,** 37, (20), 7390-7399.

38. Davis, R.; Mauer, L. J., Fourier tansform infrared (FT-IR) spectroscopy: A rapid tool for detection and analysis of foodborne pathogenic bacteria. In *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, A.Mendez-Vilas, Ed. Formatex Research Center: 2010; Vol. 2, pp 1582-1594.

39. Lewis, E. N.; Gorbach, A. M.; Marcott, C.; Levin, I. W., High-Fidelity Fourier Transform Infrared Spectroscopic Imaging of Primate Brain Tissue. *Applied Spectroscopy* **1996,** 50, (2), 263-269.

40. Colley, C. S.; Kazarian, S. G.; Weinberg, P. D.; Lever, M. J., Spectroscopic imaging of arteries and atherosclerotic plaques. *Biopolymers* **2004,** 74, (4), 328-335.

41. Kazarian, S. G.; Chan, K. L. A., Micro- and Macro-Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared Spectroscopic Imaging. *Applied Spectroscopy* **2010,** 64, (5), 135A-152A.

42. Hinterdorfer, P.; Dufrene, Y. F., Detection and localization of single molecular recognition events using atomic force microscopy. *Nature Methods* **2006,** 3, (5), 347-355.

43. Busch, D.; Ren, J.; Qingze, Z.; Ganapathysubramanian, B. In *Rapid online quantification of tip-sample interaction for high-speed dynamic-mode atomic force microscope imaging*, American Control Conference (ACC), 2011, June 29 2011-July 1 2011, 2011; 2011; pp 2879-2884.

44. Nasrallah, H.; Mazeran, P.-E.; Noel, O., Circular mode: A new scanning probe microscopy method for investigating surface properties at constant and continuous scanning velocities. *Review of Scientific Instruments* **2011,** 82, (11), 113703.

45. Dufaitre-Patouraux, L.; Vague, P.; Lassmann-Vague, V., Technologie et fiabilité de l'autosurveillance glycémique : historique et état actuel. *Diabetes & Metabolism* **2003,** 29, (2, Part 2), 2S7-2S14.

46. Baksh, M. M.; Kussrow, A. K.; Mileni, M.; Finn, M. G.; Bornhop, D. J., Label-free quantification of membrane-ligand interactions using backscattering interferometry. *Nat Biotech* **2011,** 29, (4), 357-360.

47. Mirsky, V. M.; Riepl, M.; Wolfbeis, O. S., Capacitive monitoring of protein immobilization and antigen-antibody reactions on monomolecular alkylthiol films on gold electrodes. *Biosensors and Bioelectronics* **1997,** 12, (9â€"10), 977-989.

48. Ray, S.; Mehta, G.; Srivastava, S., Label-free detection techniques for protein microarrays: Prospects, merits and challenges. *PROTEOMICS* **2010,** 10, (4), 731-748.

49. Brecht, A.; Gauglitz, G., Optical probes and transducers. *Biosensors and Bioelectronics* **1995,** 10, (9-10), 923-936.

50. Ausserre, D.; Abou Khachfe, R., Real-time quantitative imaging of submolecular layers. *Langmuir* **2007,** 23, (15), 8015-8020.

51. Souplet, V.; Desmet, R.; Melnyk, O., Imaging of protein layers with an optical microscope for the characterization of peptide microarrays. *Journal of Peptide Science* **2007,** 13, (7), 451-457.

52. Souplet, V. Nouvelles méthodologies pour la préparation et la lecture de biopuces à peptides. Science physico-chimique et technologies pharmaceutiques, Université de Lille 2, 2007.

Chapitre II :

Utilisation de la Résonance Plasmonique de Surface pour le suivi quantitatif d'interactions biologiques modèles.

Plan du chapitre II

1 Principes de la SPR et développements récents..... 38

2 Formalisme théorique utilisé pour décrire la Résonance Plasmonique de Surface. 39

2.1 Formalisme SPR 39

2.2 Utilisation de milieux vecteurs pour propager l'onde lumineuse..... 42

2.3 Epaisseurs optimales de la couche métallique..... 45

2.4 Les différentes techniques de mesure du signal SPR 46

2.4.1 Mesure du signal SPR par variation de la longueur d'onde..... 46

2.4.2 Mesure du signal SPR par variation d'angle..... 47

2.4.3 Mesure du signal SPR par variation de l'intensité ou de la phase de l'onde réfléchie48

2.5 Estimation de la quantité de matière apportée à l'interface métal/diélectrique :..... 48

3 Les systèmes de mesure SPR commerciaux les plus utilisés..... 50

3.1 L'imagerie SPR 50

3.2 Le BIAcore T100..... 52

3.2.1 Microfluidique du BIAcore T100 53

4 Fonctionnalisation des biocapteurs et protocole utilisé en SPR..... 55

4.1 Réalisation d'une monocouche sur un film mince d'or par auto assemblage 55

4.2 Mise en place des biocapteurs réalisés, préparation des solutions d'injection et protocole de mesure SPR 56

4.2.1 Immobilisation du ligand (Figure II.14, états de surface 1 - 4)..... 58

4.2.2 Interaction du ligand avec l'analyte (Figure II.14, états de surface 4 - 6)..... 60

5 Présentation des résultats et de l'article publié [3]..... 62

5.1 La fonctionnalisation et caractérisation des biocapteurs d'or..... 62

5.2 L'étude quantitative de deux interactions modèles 63

Références 65

La première partie de ce chapitre présente la technique de résonance plasmonique de surface (SPR pour Surface Plasmon Resonance en anglais) utilisée pour mesurer une quantité de matière adsorbée sur un film mince métallique. Le formalisme présenté ici est décrit dans plusieurs ouvrages récents dont les revues de Jiří Homola de 2003 [1] et de 2008 [2]. La seconde partie du chapitre décrit les différents instruments commerciaux utilisant la SPR et l'imagerie SPR. Elle porte plus spécifiquement sur le BIAcore T100 (GE Healthcare) et sa fluidique ainsi que sur le protocole expérimental que nous avons utilisé pour l'étude SPR (troisième partie de ce chapitre). Nous présentons la fabrication de biocapteurs par auto assemblage en milieu liquide de molécules d'acide 16-mercaptohexadécanoïque (16-MHDA) sur un film mince d'or. La suite décrit la biofonctionnalisation des surfaces par couplage amine et immobilisation d'une protéine appelée ligand. Une seconde protéine nommée analyte est ensuite injectée sur cette surface et interagit avec le ligand. La quatrième partie de ce chapitre décrit la caractérisation physique des biocapteurs. Dans un second temps, elle expose les résultats obtenus par SPR pour des interactions entre protéines modèles : streptavidine (ligand)/IgG biotinylée (analyte) et endostatine/IgG anti-endostatine (antigène/anticorps). Nous avons comparé les résultats obtenus sur nos biocapteurs avec ceux obtenus sur des biocapteurs commerciaux (CM5 et C1, GE Healthcare). L'article publié présentant le détail des biocapteurs réalisés ainsi que leur efficacité de mesure en utilisant ces deux systèmes d'interactions biologiques modèles est inséré en fin de chapitre [3] (article publié dans le journal Analytical Bioanalytical Chemistry en 2011) .

1 Principes de la SPR et développements récents

La première observation d'un phénomène de résonnance plasmonique de surface (SPR) a été faite par Robert H. Wood en 1902 [4]. Il remarque la présence d'une anomalie des spectres de diffraction de la lumière blanche sur des grilles métalliques. Ce n'est qu'en 1941 que Ugo Fano associe cette anomalie à une excitation collective des électrons de la surface métallique [5]. L'une des années les plus importantes dans le développement de la SPR est 1968. Andreas Otto fait le lien entre expérience et théorie en démontrant que la diminution de la réflectivité de la lumière tombant en réflexion totale interne sur un film d'or est due à une excitation plasmonique de surface (Figure II.1-a) [6]. Cette même année Erich Kretschmann et Heinz Raether [7] proposent une nouvelle configuration expérimentale (Figure II.1-b) pour obtenir une résonance plasmonique de surface. Ce montage SPR est encore utilisé de nos jours pour de nombreux instruments commerciaux comme les systèmes BIAcore de chez GE Healthcare, les systèmes Reichert SPR de chez Reichert analytical ou l'appareil Biosuplar de chez Analytical µ-Systems [8].

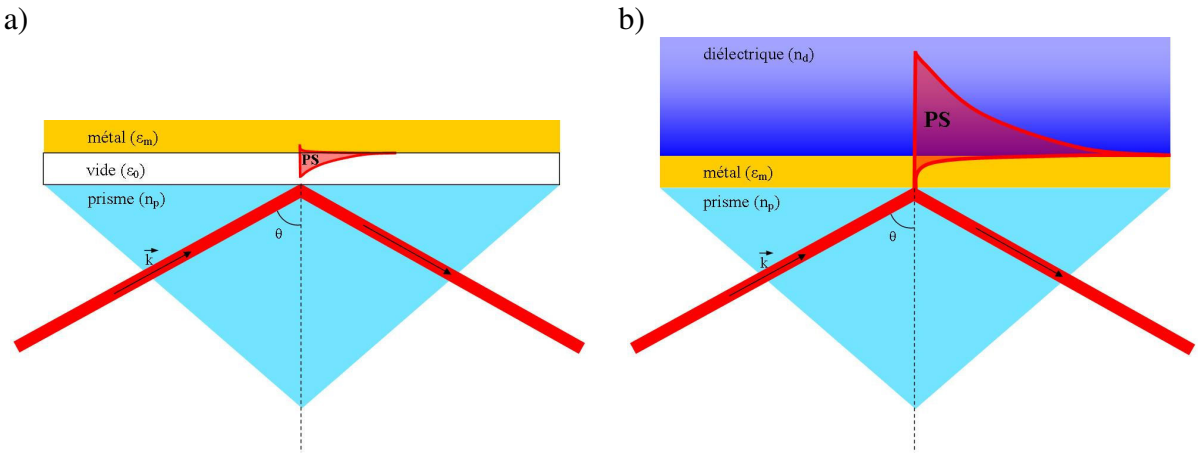


Figure II.1 : schémas de montages illustrant la SPR : a) configuration expérimentale utilisée par Andreas Otto et constituée d'un film métallique de permittivité et d'indice complexes (ε_m, n_m) et d'un prisme d'indice (n_p) emprisonnant un espace de vide de permittivité ε_0 ; b) configuration expérimentale de Kretschmann avec contact du prisme et du film métallique supportant un milieu diélectrique d'indice (n_d). Nous notons *PS* le plasmon de surface, $\vec{k}$ le vecteur de propagation de l'onde incidente et θ l'angle que fait cette onde incidente avec la surface d'or.

Ce n'est qu'en 1983 que Liedberg *et al.* démontrent que la résonance plasmonique de surface peut être utilisée pour détecter des molécules biologiques en solution [9, 10]. Pour ce faire, ils comparent leurs mesures SPR avec les résultats obtenus sur une microbalance à quartz, technique de référence pour la quantification de la masse d'un film biomoléculaire à cette époque. Depuis, la SPR est devenue la technique de référence pour l'étude des interactions moléculaires. C'est l'une des raisons pour laquelle nous l'avons choisie pour évaluer l'apport de la microscopie SEEC à ce domaine d'étude.

2 Formalisme théorique utilisé pour décrire la Résonance Plasmonique de Surface

2.1 Formalisme SPR

Le phénomène de résonance plasmonique de surface est basé sur la réflexion totale interne d'une onde électromagnétique tombant sur l'interface séparant un métal et un diélectrique d'indice de réfraction inférieur. Cette résonnance entraîne une extinction de la lumière réfléchie. Pour qu'il y ait une réflexion totale interne, il faut que l'onde électromagnétique arrive sur cette interface avec un angle supérieur à l'angle critique (θ_c) compté par rapport à la normale au dioptre (Figure II.2). La valeur de cet angle critique est déterminée par les indices du métal (n_m) et du diélectrique (n_d) tel que :

$$n_m \sin\theta_c = n_d \text{ soit } \theta_c = \sin^{-1}\left(\frac{n_d}{n_m}\right)$$ **Équation II.1**

avec n_m l'indice du métal et n_d l'indice du diélectrique couvrant.

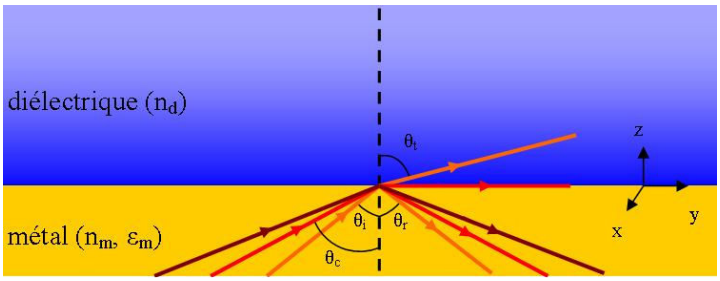


Figure II.2 : loi de Snell-Descartes avec θ_i l'angle d'incidence, θ_r l'angle de réflexion, θ_t l'angle de transmission et θ_c l'angle critique de réfraction limite entre un milieu incident métallique d'indice et de permittivité complexe (n_m et ε_m) et un diélectrique d'indice (n_d).

L'onde évanescente créée dans le diélectrique pour les angles d'incidence supérieurs à θ_c se propage selon l'axe des z et son amplitude décroit exponentiellement avec la distance à l'interface métal/diélectrique (située à z = 0). Par convention sa profondeur de pénétration Λ est définie comme la distance pour laquelle son amplitude $E\ exp(-k_z)$ devient égale à E/e^1, soit :

$$\Lambda = \frac{1}{k_z} = \frac{\lambda}{2\pi\sqrt{n_m^2\, sin^2\,\theta_1 - n_d^2}}$$ **Équation II.2**

avec k_z le vecteur propagation selon z.

Elle est de l'ordre de quelques dixièmes de microns.

Pour simplifier les équations et éliminer les effets de bord, nous considérons un métal de permittivité complexe ($\varepsilon_m = \varepsilon'_m + \varepsilon''_m$) et un diélectrique ($\varepsilon_d = \varepsilon'_d + \varepsilon''_d$)), tous deux de dimensions semi-infinies. L'utilisation des équations de Maxwell avec les bonnes conditions aux limites (Équation II.3) aboutit à exprimer le plasmon de surface comme une onde transverse magnétique perpendiculaire à la direction de propagation de l'onde.

$$E_{x,0}^m = E_{x,0}^d = E_{x,0} \qquad E_{y,0}^m = E_{y,0}^d = E_{y,0}$$
$$H_{x,0}^m = H_{x,0}^d = H_{x,0} \qquad H_{y,0}^m = H_{y,0}^d = H_{y,0}$$ Équation II.3
$$k_x^m = k_x^d = k_x$$

avec $E_{x,0}^i$ et $E_{y,0}^i$ le champs électrique selon x et y respectivement, $H_{x,0}^i$ et $H_{y,0}^i$ le champ magnétique selon x et y respectivement et k_x^i la propagation de l'onde où l'indice i est m pour le métal et d pour le diélectrique.

Si on utilise un système de coordonnées cartésiennes (Figure II.3) de telle sorte que le film mince métallique occupe la région des z < 0 et que le plasmon de surface se propage selon l'axe x, alors le champ magnétique $\vec{H}$ du plasmon de surface peut s'écrire :

$$H_{plasmon,j} = \begin{pmatrix} 0 \\ H_{plasmon,y} \\ 0 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 0 \\ 1 \\ 0 \end{pmatrix} \times A.exp\left[-\alpha_j z + i(\beta_x - \omega t)\right]$$ **Équation II.4**

Avec ω la pulsation, *t* le temps, β_x la constante de propagation et $\alpha_j = \sqrt{\beta^2 - \left(\frac{\omega}{c}\right)^2 \varepsilon_j}$ où l'indice *j* est noté *m* pour le métal et *d* pour le diélectrique.

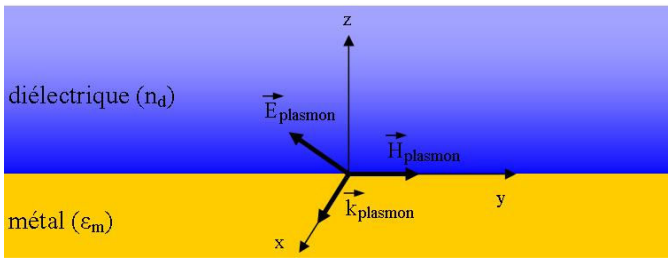


Figure II.3 : Schéma des conventions utilisées pour exprimer la théorie SPR.

L'onde évanescente créée à l'interface métal/diélectrique se propage selon l'axe des z aussi bien dans le métal que dans le diélectrique (courbe rouge sur la Figure II.1). Elle a théoriquement une amplitude maximale en z = 0 et décroit suivant une loi exponentielle avec la distance à l'interface.

La constante de propagation du plasmon de surface à l'interface métal/diélectrique peut s'exprimer de la manière suivante :

$$\beta_{SP} = \frac{\omega}{c}\sqrt{\frac{\varepsilon_d \varepsilon_m}{\varepsilon_d + \varepsilon_m}} = \frac{2\pi}{\lambda}\sqrt{\frac{\varepsilon_d \varepsilon_m}{\varepsilon_d + \varepsilon_m}}$$ **Équation II.5**

avec c la célérité de la lumière dans le vide et λ la longueur d'onde de la lumière dans le vide.

Dans le cas d'une propagation sans pertes d'énergie, soit pour des permittivités purement réelles ($\varepsilon_m'' = \varepsilon_d'' = 0$), l'onde ne se propage que si ε_m' et ε_d' sont de signes opposés et $\varepsilon_m' < \varepsilon_d'$. Des métaux comme l'or, l'argent ou l'aluminium possèdent des parties réelles de

leur permittivité diélectrique non nulles dans le domaine de la lumière visible. Ils sont par conséquent de bons candidats pour créer un plasmon de surface dans cette gamme de longueur d'onde. Contrairement à ce cas idéal, les métaux ne possèdent en aucun cas une partie imaginaire négligeable. Par conséquent, la partie imaginaire de la constante de propagation β_{SP} rend compte de l'atténuation du plasmon de surface dans sa direction de propagation. On peut donc représenter la constante de propagation par deux termes : l'indice effectif n_{ef} et l'atténuation b, tels que :

$$n_{ef} = \frac{c}{\omega} Re\{\beta_{SP}\} \quad \text{et} \quad b = \frac{0,2}{\lambda} Im\{\beta_{SP}\}$$

où b a pour unité dB/cm si β est donné en m^{-1}.

2.2 Utilisation de milieux vecteurs pour propager l'onde lumineuse

Plusieurs systèmes optiques peuvent être utilisés pour conduire l'onde électromagnétique jusqu'à l'interface métal/diélectrique. Le plus couramment utilisé est un prisme de verre. Ce prisme est souvent hémisphérique afin d'éviter la réfraction sur l'interface extérieure air/prisme. Il est également possible d'utiliser un guide d'onde, une fibre optique ou un réseau (Figure II.4).

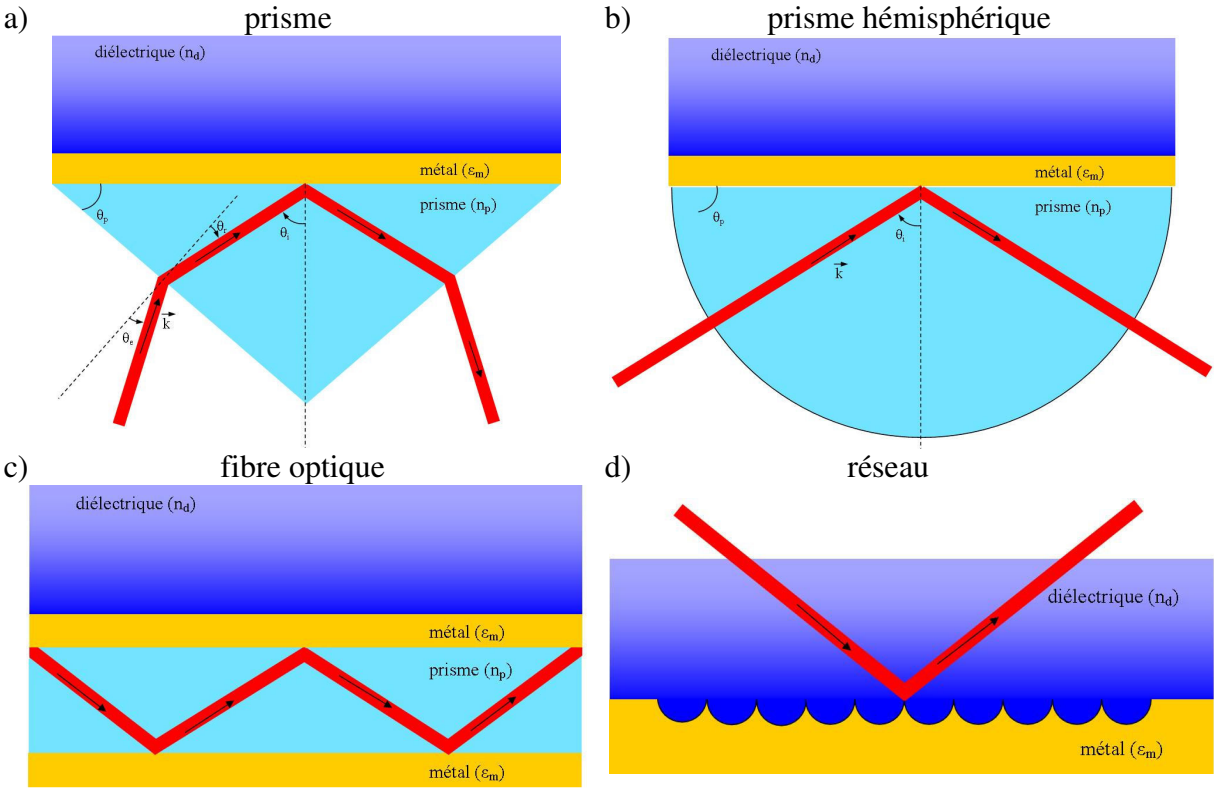


Figure II.4 : vecteur utilisé dans divers montages SPR : a) prisme, b) prisme hémisphérique, c) fibre optique et d) réseau.

Dans le cas d'un réseau, nous ne sommes cependant plus dans une configuration de Kretschmann. Cette configuration est notamment utilisée pour des imageurs SPR comme le Flexchip de chez GE Healthcare. Nous détaillerons la particularité de cette technique au paragraphe 3.1, p.50.

Dans tous les cas de figure, pour qu'il y ait exaltation du plasmon, il faut que la projection sur l'interface métal/diélectrique du vecteur de propagation de l'onde incidente soit égale à la constante de propagation du plasmon soit $n_i \sin \theta_i = n_{ef}$ avec n_i et θ_i l'indice de réfraction et l'angle d'incidence dans le milieu précédant le métal respectivement. Par construction géométrique $0° \leq \theta_i < 90°$ soit $0 \leq \sin \theta_i < 1$, l'indice de réfraction du milieu incident doit être supérieur à l'indice effectif de propagation du plasmon de surface, soit : $n_i > n_{ef}$.

Il est impossible d'exalter le plasmon de surface sans matériau conduisant l'onde avant le métal (premier milieu dit vecteur). Il est facile de montrer cela par une application numérique. Dans une configuration de Kretschmann avec une source monochromatique (λ = 660 nm), l'or comme métal (n = 0,13 + i 3,69) et l'eau (n = 1,3316) comme diélectrique, n_i doit être supérieur à n_{ef} = 1,43. La Figure II.5 présente la variation des indices de réfraction et de n_{ef} en fonction de la longueur d'onde dans le domaine du visible. Ni l'air, ni l'eau n'atteignent un indice de réfraction supérieur à n_{ef} (courbe jaune, Figure II.5). Du verre de type BK7 le permet (courbe bleue en haut de la Figure II.5) [11]. La longueur d'onde limite pour du BK7 est 570 nm. Pour une longueur d'onde plus faible, l'indice efficace devient supérieur à celui du BK7, il ne peut donc plus être utilisé comme vecteur.

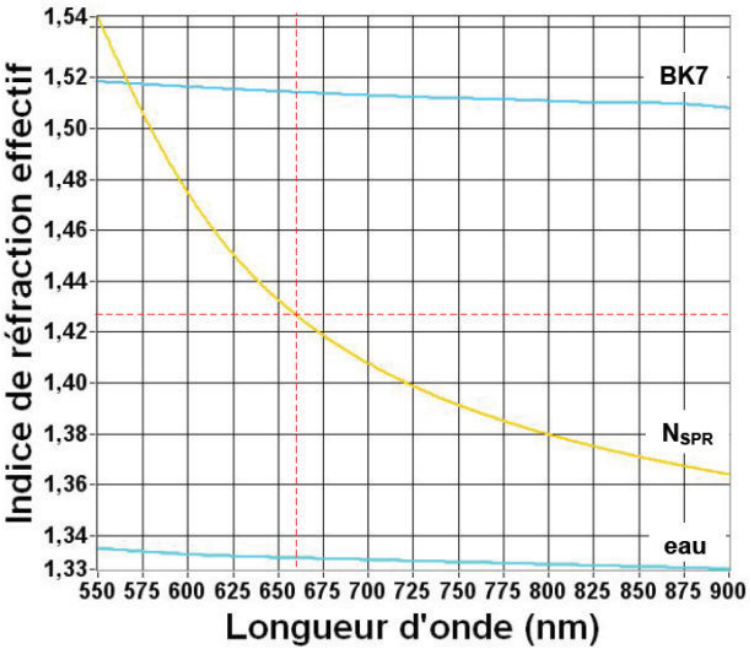


Figure II.5 : indice de réfraction effectif du plasmon de surface à l'interface entre l'or et l'eau en fonction de la longueur d'onde (courbe jaune). Indice de l'eau (courbe bleue entre 1,33 et 1,34) et du verre de type BK7 (courbe bleue entre 1,50 et 1,52) [11].

- Il est indispensable d'utiliser un matériau diélectrique vecteur pour conduire l'onde lumineuse jusqu'à l'interface métal diélectrique pour avoir un phénomène de résonance plasmonique.
- Le verre BK7 est un bon vercteur pour la SPR pour $\lambda > 570$ nm.

2.3 Epaisseurs optimales de la couche métallique

Les courbes d'indice effectif présentées ci-dessus sont extraites de la thèse d'Emmanuel Maillart [11]. Il a basé ses calculs et réflexions sur un point de fonctionnement dans le rouge à λ = 660 nm et une épaisseur d'or de 48 nm [11]. En milieu aqueux, d'après Fontana [11], il ne travaille pas sur un optimum du signal SPR (Figure II.6). Pour une longueur d'onde de 660 nm l'optimum est atteint pour une épaisseur d'or de 63 nm. Pour une épaisseur de 48 nm d'or, il est atteint avec une longueur d'onde de 600 nm.

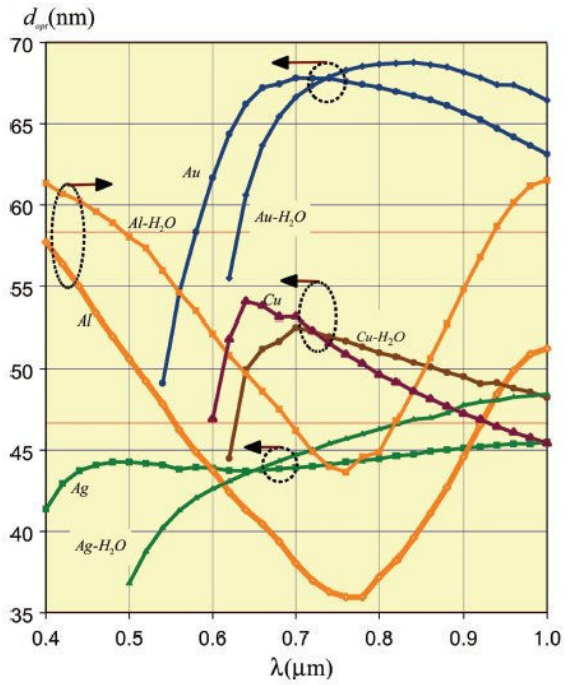


Figure II.6 : variation de l'épaisseur optimale du film mince métallique (or, cuivre, argent ou aluminium) avec la longueur d'onde pour les deux milieux diélectriques supportés les plus courants : l'air et l'eau , utilisés pour une onde incidente traversant un prisme de BK7 en configuration dite de Kretschmann [12].

Beaucoup de métaux peuvent être utilisés en SPR. L'argent par exemple présente la grande particularité d'avoir une variation très faible de l'épaisseur optimale en fonction de la longueur d'onde. La même surface peut donc être utilisée quelque soit la longueur d'onde. Ce

n'est pas le cas pour les autres métaux présentés sur la Figure II.6. La résonnance maximale est cependant tout le temps obtenue pour une couche métallique fine (< 70 nm).

- Forte variation de l'épaisseur optimale du film métallique en fonction de la longueur d'onde utilisée pour la majorité des métaux sauf pour l'argent.

2.4 Les différentes techniques de mesure du signal SPR

Le dépôt de molécules sur l'interface métal/diélectrique supportée modifie localement la constante diélectrique de ce milieu et provoque généralement une altération de l'onde évanescente et/ou de l'onde électromagnétique réfléchie (*eg* : angle de réflexion totale, extinction à des longueurs d'onde particulières, variation de l'intensité ou de la phase…). Il existe autant de techniques de détection SPR que de grandeurs altérées mesurables, en voici quelques unes.

2.4.1 Mesure du signal SPR par variation de la longueur d'onde

On focalise un faisceau de lumière polychromatique sur l'interface métal/diélectrique. La longueur d'onde optimale de la résonance plasmonique correspond à une extinction de l'intensité réfléchie. Elle diminue en fonction de l'indice de réfraction du dépôt sur l'interface métal/diélectrique comme présentée sur la Figure II.7. En suivant la variation de cette longueur d'onde, il est possible de mesurer la quantité de matière présente à l'interface métal/diélectrique.

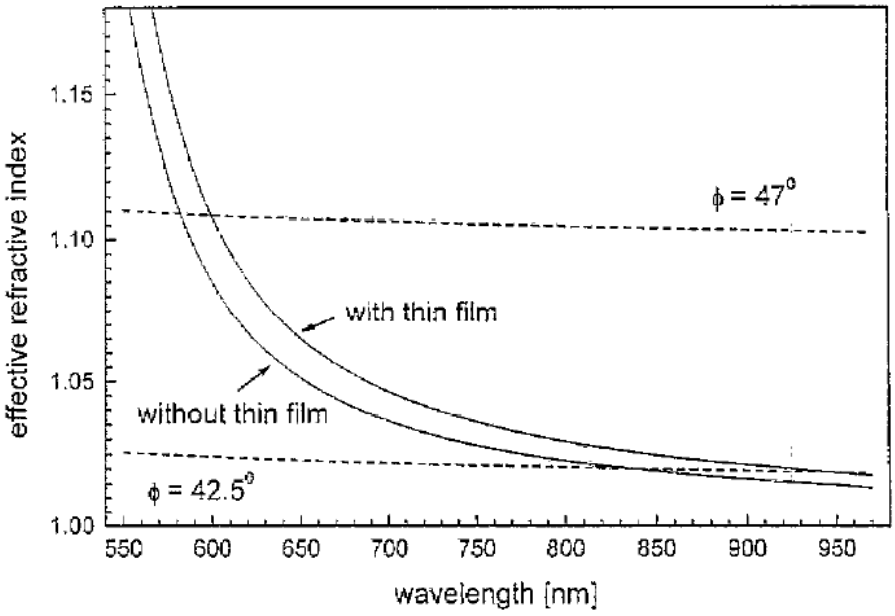


Figure II.7 : variation de la longueur d'onde réfléchie optimale en fonction de l'indice de réfraction du dépôt dans le cas à l'air (without thin film) et dans celui avec une fine couche d'eau (with fine film) [13].

2.4.2 Mesure du signal SPR par variation d'angle

Une onde électromagnétique monochromatique est généralement utilisée dans ce cas pour obtenir un plasmon de surface. Lorsque ce plasmon est affecté par le dépôt de molécules à l'interface métal/diélectrique, il y a une diminution de l'angle de réflexion (θ_r). L'angle d'incidence est par conséquent ajusté afin d'obtenir à nouveau le maximum de réflexion et c'est cette variation de l'angle d'incidence qui est mesurée pour l'analyse (Figure II.8). C'est la méthode la plus utilisée pour suivre la modification locale de l'interface métal/diélectrique et étudier des interactions biomoléculaires proches de l'interface. Une variation d'angle de 0.0001° correspond approximativement à une adsorption de 1 pg/mm² soit 1 monocouche de protéine de 1 pm d'épaisseur [14].

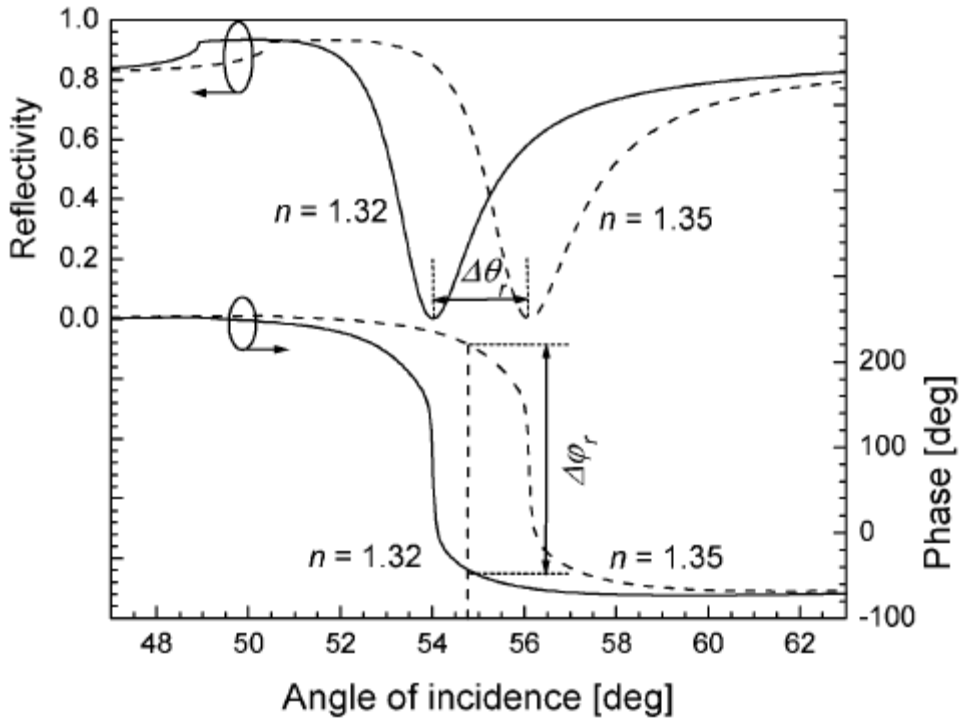


Figure II.8 : variation de la réflectivité et de la phase en fonction de l'angle d'incidence dans la configuration de Krechtmann avec un prisme de verre SF14, une couche d'or de 50 nm et une longueur d'onde incidente de 682 nm [1].

2.4.3 Mesure du signal SPR par variation de l'intensité ou de la phase de l'onde réfléchie

Dans ces modes, une lumière monochromatique est projetée sur l'interface avec un angle d'incidence fixe. La chute de l'intensité lumineuse permet de remonter à la quantité de matière fixée. De la même manière que pour la SPR avec variation de l'intensité, une lumière monochromatique est projetée sur l'interface métal/diélectrique selon un angle d'incidence fixe. L'ajout de matière sur l'interface produit un déphasage de la lumière réfléchie. Ce déphasage est fonction de la quantité de matière fixée (Figure II.8).

2.5 Estimation de la quantité de matière apportée à l'interface métal/diélectrique :

Les variations observées avec les différentes techniques de détection peuvent être converties en une unité commune le RIU (Réfractive Index Unit soit en français unité d'indice de réfraction Tableau II.1). Les instruments commercialisés par BIAcore maintenant intégré dans GE Healthcare utilisent une autre unité de mesure : le RU (Resonance Unit soit en français unité de résonance). D'après la littérature [15] :

$$1RU = \Delta R/\Delta n \approx 10^{-6} = 1\mu RIU = 1.10^{-4}\,° \text{ de déviation}$$

avec R = réflectance et n l'indice de réfraction.

Technique ou instrument	Unité	RIU
Variation de l'angle	0,0001°	10^{-6} RIU
Variation de la longueur d'onde	1 µm	-
Variation de la réflectivité	1 %	-
GE Healthcare/BIAcore	1 RU	10^{-6} RIU

Tableau II.1 : conversion des différentes unités trouvées dans la littérature pour rendre compte de l'ajout de matière à l'interface métal/diélectrique par la mesure du signal SPR [15].

Dans la pratique, la résolution du signal SPR (Δ_N) est exprimée comme étant la déviation standard (σ) du signal divisée par la sensibilité (S_N) [16]. Maillart a déterminé dans sa thèse des sensibilités théoriques en utilisant les paramètres suivants : un prisme en verre BK7 comme vecteur d'exaltation du signal SPR, une couche mince d'or de 48 nm, un milieu diélectrique supporté d'indice n_d = 1,333 (l'eau) et une longueur d'onde incidente de 660 nm (rouge) [11]. Les résultats de ses calculs sont résumés dans le Tableau II.2.

Mesure du signal SPR par	Sensibilité (S_N)	Résolution (Δ_N)
Variation de l'angle	2,4628 rad/RIU	$9,5.10^{-6}$ RIU
Variation de la longueur d'onde	2,3629 µm/RIU	$7,1.10^{-6}$ RIU
Variation de la réflectivité	5288 %/RIU	$4,2.10^{-5}$ RIU

Tableau II.2 : sensibilité et résolution SPR en fonction de la technique de détection suite à l'exaltation d'un prisme de BK7.

D'après ces valeurs, la technique utilisant la variation de l'angle pour suivre l'ajout de matière à l'interface métal/diélectrique est la plus précise, suivie par celle mesurant la

variation de la longueur d'onde puis par celle mesurant la variation de la réflectivité. La technique de détection par variation de la phase de l'onde réfléchie est peu utilisée. Il est difficile de trouver des informations sur cette technique.

3 Les systèmes de mesure SPR commerciaux les plus utilisés

Dès 1990 la société BIAcore ® était créée et fût la première entreprise à vendre un montage de détection d'interactions moléculaires par analyse SPR. En 2012, il existe plusieurs fabricants d'instruments de détection par résonance plasmonique de surface (BIAcore rachetée par General Electric (GE-healthcare), Xantec, Biosensing Instrument, Affinity sensors…).

La majorité des appareils SPR vendus pour des analyses biologiques sont de type « classique ». Avec la SPR classique, nous ne pouvons suivre qu'une seule interaction analyte/ligand à la fois.

3.1 L'imagerie SPR

En 1998, une nouvelle catégorie d'appareils de mesure SPR est apparue : les imageurs SPR [17, 18]. Dès le début des années 2000, des imageurs SPR commerciaux ont commencé à voir le jour (Flexchip de chez GE Healthcare, SPRi-Plex ou Lab+ de chez Genopics/Horiba Jobin Yvon… ; Tableau II.3). L'imagerie SPR (notée SPRi) repose sur le même phénomène physique, mais utilise un détecteur multiple (*e.g.* une caméra CCD) permettant d'imager la surface du biocapteur. La SPRi permet de suivre quelques centaines d'aires d'interaction en

parallèle. Le mode de détection par variation de l'angle n'est pas le plus courant en SPRi. Le balayage nécessaire à la variation de l'angle d'incidence rend le temps de mesure incompatible avec la résolution recherchée. Par conséquent, le mode principalement utilisé pour la SPRi est la variation de l'intensité due à la chute de réflectivité mesurée simultanément sur différentes zones du biocapteur.

Appareil SPRi	Marque	Vecteur de mesure utilisé	Limite de détection	Références
Flexchip	GE Healthcare	réseau	-	[19, 20]
SPRi-Plex II	Genoptics	prisme	5 pg/mm²	[21]
SPRi-Lab+	Genoptics	prisme	10 pg/mm²	[21]

Tableau II.3 : exemple d'imageur SPR commerciaux.

Il est quand même possible d'utiliser le principe de la variation de l'angle d'incidence. Pour cela, il faut envoyer simultanément tous les angles d'incidence. Les capteurs dans une direction de la caméra 2D servent à mesurer l'angle optimal de réflexion alors que l'autre direction de mesure permet d'analyser la réflectivité provenant des différentes zones du biocapteur. Dans ce cas, une dimension de la caméra seulement permet l'analyse spatiale et la surface n'est caractérisée que suivant l'une de ses directions. La configuration d'analyse du signal SPR basée sur la variation d'intensité, permet quant à elle de caractériser la surface du biocapteur suivant ses deux dimensions.

L'imagerie SPR possède intrinsèquement une faible résolution latérale (Figure II.9). Certaines techniques essayent de pallier ce défaut par une nano-structuration des surfaces avec, par exemple, des nano-trous. Ces nano-trous créent des miroirs de Braggs ce qui augmente fortement la résolution latérale des observations sur ces puces (résolution sub-micronique). La procédure de structuration de la surface est cependant très compliquée et augmente fortement le prix des puces.

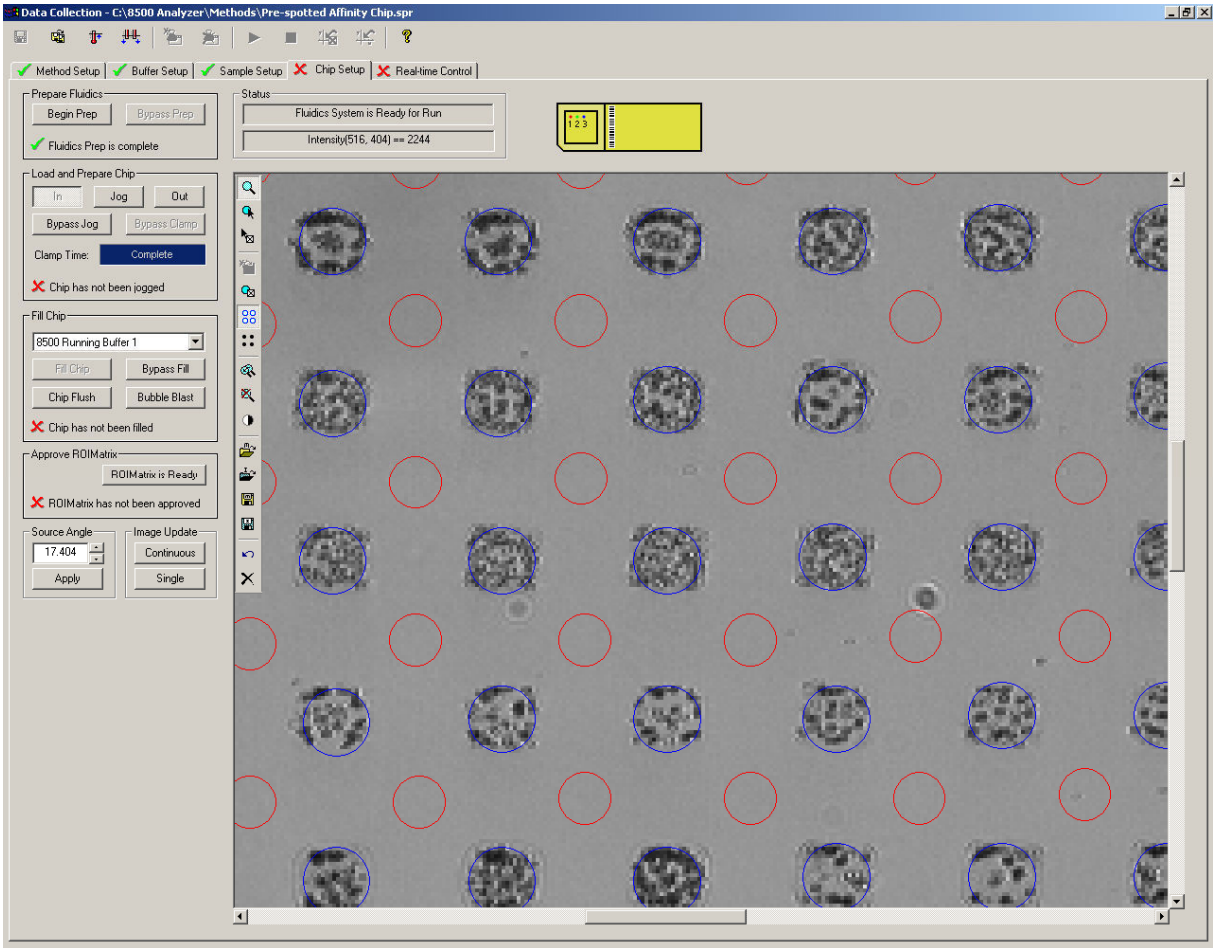


Figure II.9 : impression d'écran présentant des spots de 200 µm de large vus par imagerie SPR (Flexchip, GE Healthcare). Les cercles bleus montrent les spots de mesures et les cercles rouges ceux de références [19].

3.2 Le BIAcore T100

Nous avons utilisé le BIAcore T100 (GE healthcare) de l'Unité Mixte de Service 344 (UMS 344) qui est hébergé par l'Institut de Biologie et Chimie des Protéines (IBCP) de Lyon. Les points forts du BIAcore T100 sont son automatisation, sa sensibilité et la grande flexibilité qu'offre l'asservissement de sa fluidique par le logiciel de contrôle « BIAcore T100 software ».

Figure II.10 : photographie d'un BIAcore T100 (GE Healthcare) [22].

Pour mener à bien une expérience d'interaction protéine/protéine, il convient d'amener les solutions jusqu'au capteur SPR de manière continue et sans bulle pour éviter tout séchage prolongé. Le matériel biologique pouvant être rare et/ou cher, il est nécessaire de travailler avec des volumes très petits et par conséquent d'avoir une microfluidique très performante.

3.2.1 Microfluidique du BIAcore T100

Un système pousse seringue à deux seringues contrôle l'écoulement des différentes solutions. Les tubes contenant les solutions sont placés sur un rack à multiples compartiments numérotés dans un tiroir thermostaté. Toutes les solutions injectées sont préalablement passées dans un vortex pour les homogénéiser puis centrifugées pendant quelques secondes pour s'assurer de l'absence de bulles. Les solutions sont pipetées automatiquement par une aiguille rincée à l'eau déminéralisée entre deux prélèvements et envoyées dans une boucle d'injection (Figure II.11). Entre chaque solution, du tampon de course (HBS-P+ : HEPES 10 mmol/L, NaCl 150 mmol/L et Tween 20 ® 0,05 % en volume, pH 7,4) est injecté. Il passe systématiquement par un dégazeur avant injection. Pour éviter toute diffusion des solutions

dans le tampon de course lors de l'injection, une microbulle d'air est volontairement injectée entre le tampon de course et la solution injectée. La taille de cette microbulle varie en fonction du mode d'injection [23].

HBS-P+	HEPES	NaCl	Tween 20 ®	pH
Quantités	10 mmol/L	150 mmol/L	0,05 % en volume	7,4

Tableau II.4 : composition du tampon de course (HBS-P+) utilisée dans nos expériences SPR.

Pour faire circuler les solutions, le tampon de course est introduit soit dans les canaux soit dans la boucle d'injection pour injecter les molécules d'intérêt. Le débit des injections et les différentes électrovalves pneumatiques (points rouges sur la Figure II.11-b), sont gérés par le programme informatique permettant d'utiliser des scripts de séquences d'injections.

Entre deux mesures, du tampon de course est continuellement injecté avec un flux de 65 mL/24h (soit ~ 45 µL/min) afin d'éviter tout séchage dans le système de microfluidique, l'appareil est en mode « standby ».

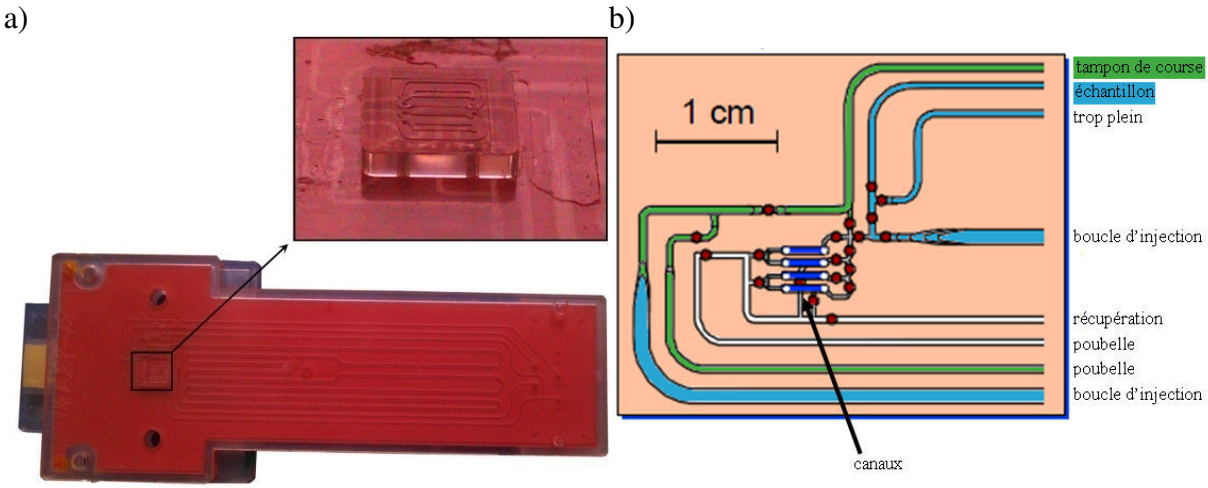


Figure II.11 : cartouche de micro-fluidique du BIAcore T100 a) photographie avec zoom sur les canaux, b) schéma avec les tubes où circulent le tampon de course en vert et les solutions à injecter en bleu, les points rouges représentent les valves [15].

L'application de la surface sur la cartouche de microfluidique définit quatre zones. Elles correspondent aux quatre canaux de fluidiques.

4 Fonctionnalisation des biocapteurs et protocole utilisé en SPR

4.1 Réalisation d'une monocouche sur un film mince d'or par auto assemblage

L'or et l'argent présentent des performances optiques très proches. L'argent possède même certains avantages par rapport à l'or pour la mesure du plasmon de surface. En effet, il présente un pic de résonance plasmon plus fin angulairement et moins asymétrique que l'or [24]. On préfèrera cependant l'or pour toutes les applications biologiques, car bien que tous deux soient fonctionnalisables par auto assemblage d'une monocouche greffée à leur surface (SAM pour Self-Assembled Monolayer), l'or est plus stable après greffage que l'argent [25]. De plus, l'or est quasiment inerte chimiquement, ne s'oxyde pas et peut être facilement nettoyé par exposition à un plasma d'air sous irradiation UV intense. Par conséquent, il permet sa manipulation au laboratoire en dehors des salles blanches et d'atmosphères inertes [26].

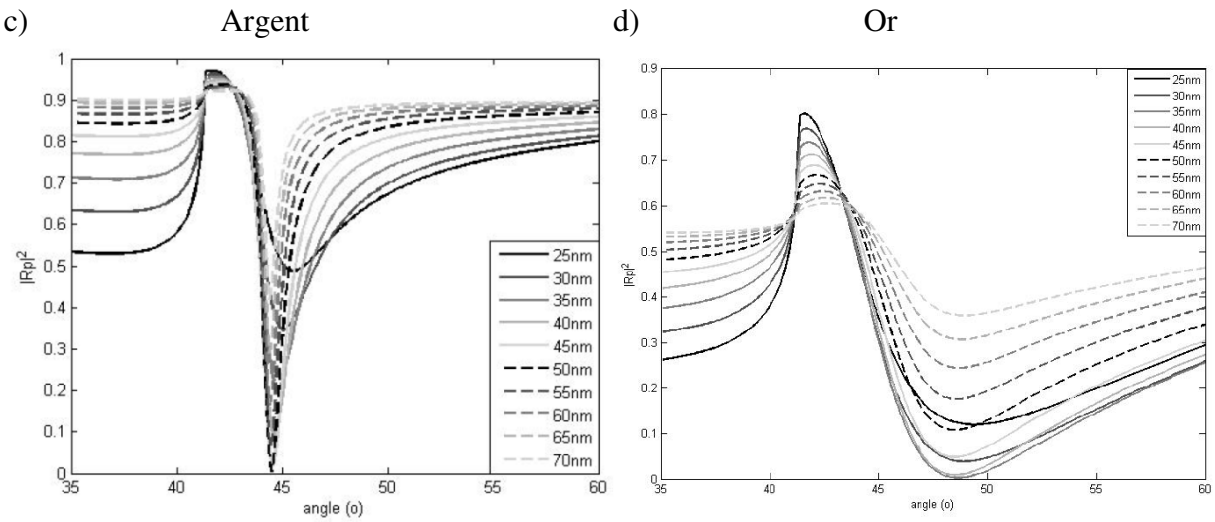


Figure II.12 : variation du pic plasmon en fonction de l'épaisseur de la couche a) d'argent et b) d'or [24].

L'or est un métal facilement fonctionnalisable par greffage des fonctions thiols placées en bout de chaînes aliphatiques portant la fonction réactive à introduire sur la surface à l'autre extrémité (molécules de type HS-C_nH_{2n}-X où X est le groupement fonctionnel). Il est possible de réaliser cette fonctionnalisation par voie gazeuse [27] ou liquide [28]. Nous avons préféré la voie liquide qui est moins contraignante, mais exige des conditions de propreté draconiennes ainsi que la conservation et l'utilisation de solutions pures à plus de 99%. Arnold *et al.* ont montré que la présence de seulement 50 nmol/L d'ions sodium dans une bouteille d'éthanol pouvait dégrader considérablement la fonctionnalité de la SAM réalisée [29]. La disparition de l'hydrogène lors de la formation de la liaison Au-S n'est pas totalement comprise à ce jour. Il est cependant communément admis qu'en phase gazeuse, il y a formation de dihydrogène et qu'en phase liquide l'hydrogène couplé à l'oxygène dissout dans le milieu forme de l'eau [26].

La caractérisation de la SAM d'acide 16-mercaptohexadécanoïque (16-MHDA) préparée à différentes concentrations et températures de préparation est décrite dans notre article publié dans Analytical Bioanalytical Chemistry en 2011 [3]. Cette caractérisation est couplée à des mesures SPR d'interactions protéine/protéine modèles (streptavidine/immunoglobuline G biotinylée et anticorps/antigène). Cet article est inséré à la fin de ce chapitre.

4.2 Mise en place des biocapteurs réalisés, préparation des solutions d'injection et protocole de mesure SPR

Nous avons aussi utilisé des biocapteurs fonctionnalisés par GE Healthcare qui sont livrés prêts à l'emploi. L'une des originalités du travail publié est que nous avons fonctionnalisé nos propres biocapteurs en partant des surfaces d'or nu commercialisées par GE healthcare et utilisées par GE healthcare pour fonctionnaliser les surfaces

commercialisées. Ceci permet de réaliser une comparaison quantitative de leurs efficacités. Pour les fonctionnalisations que nous avons réalisées, les films minces d'or sont nus, supportés sur du verre BK7 et livrés par 10 fixés côté verre par un gel adhésif. Chaque surface fait 11x10 mm² de côtés. La réflectivité des rayons X montre une épaisseur du film d'or d'environ 41,7 ± 0,5 nm. GE healthcare donne une épaisseur indicative de 50 nm d'or, mais n'effectue pas de telles caractérisations.

La méthode de montage des surfaces sur les supports plastiques adaptés et spécifiques à l'instrument BIAcore T100 requiert l'utilisation d'un carré de scotch double face qui fixe pratiquement définitivement la surface à sa languette d'insertion [30]. Elle est ensuite introduite dans une cassette (Figure II.13) qui est introduite dans le BIAcore T100 ce qui correspond à l'étape dite de « Docking » du biocapteur.

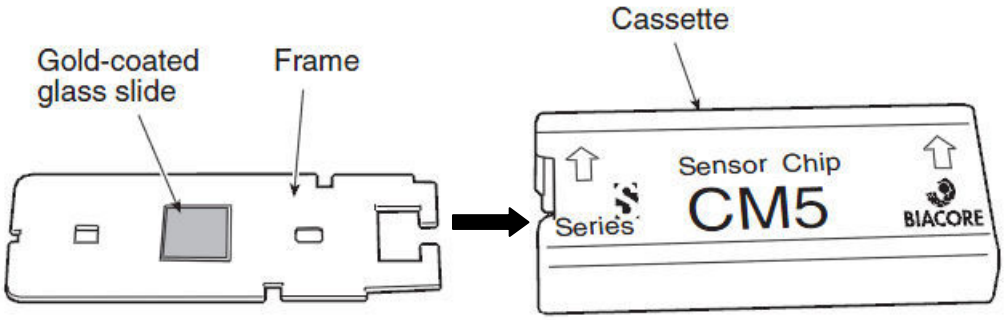


Figure II.13 : schéma d'une surface d'or fonctionnalisée montée sur un support pour le BIAcore T100 et sa cassette d'introduction dans l'appareil [23].

Au cours du nettoyage et de la fonctionnalisation des films d'or, il peut arriver que la surface se retourne. Il est remarquable que les surfaces de faible épaisseur d'or donnent une réflexion de la lumière blanche : jaunâtre du côté verre et blanche du côté or. Malheureusement, cette méthode visuelle n'est pas applicable pour ces épaisseurs d'or. Si la surface est collée du mauvais côté le signal SPR est bien évidemment nul, mais la surface ne peut plus être remontée.

Sur le BIAcore T100, il existe une procédure qui permet de normaliser le signal SPR pour améliorer la reproductibilité des résultats obtenus sur plusieurs surfaces : procédure appelé « Normalize ». Cette opération de 9 minutes est automatisée et consiste à injecter du glycérol à 70 % dans l'eau (n=1,42789 à 20 °C) sur la surface et à optimiser la détection du signal en variant l'angle d'incidence afin d'être sur le pic SPR le plus net [14]. Ensuite une autre procédure automatisée, « Prime », est effectuée trois fois. Chaque « Prime » dure environ 7 min pendant lesquelles du tampon de course est injecté à fort débit (100 µL/min) sur la surface. Ceci permet d'équilibrer l'appareil, de désorber d'éventuelles impuretés résiduelles sur la surface ainsi que d'acclimater la surface et la molécule utilisée pour la fonctionnalisation au tampon de course (*i.e.* hydratation, acidification ou basification pour la fonction –COOH que nous utilisons à ce stade…).

Une fois ces deux procédures réalisées, la bio-fonctionnalisation de la SAM, ou la mesure d'interaction s'il s'agit d'une puce déjà bio-fonctionnalisée par une protéine, peut commencer.

4.2.1 Immobilisation du ligand (Figure II.14, états de surface 1 - 4)

Pour ces étapes, les solutions sont injectées avec un débit de 5 µL/min à 25°C.

Après avoir vérifié qu'il n'y a pas de dérive de la ligne de base sous flux de tampon de course (≤ 1 RU/min), on injecte pendant 10 min une solution aqueuse de 0,2 mol/L de 1-éthyl-3-(3-diméthyl-aminopropyl)carbodiimide (EDC) et de 0,05 mol/L de N-hydroxysuccinimide (NHS). L'EDC réagit avec l'acide carboxylique pour former un intermédiaire réactionnel : une amine réactive isourée acylée. Cet intermédiaire est peu stable et a tendance à s'hydrolyser pour redonner l'acide carboxylique (constante de dissociation

k_d = 2-3 s^{-1} [31]). L'ajout de NHS conduit à un intermédiaire réactionnel plus stable, l'ester succinimide *(état de surface 2)* [32-34]. Le mélange EDC/NHS doit être préparé extemporanément. Nous avons utilisé dans notre étude l'EDC couplé au NHS principalement, car ce sont les réactifs proposés par GE Healthcare pour l'immobilisation covalente de protéine. Ils sont donc disponibles directement aux concentrations usuelles commercialement. Il convient cependant de mentionner qu'il existe d'autres routes réactionnelles comme celle utilisant du pentafluorophénol à la place du NHS. La réactivité de l'ester formé est dix fois plus grande [35]. Le temps pour recouvrir 90 % de la surface par l'immobilisation de protéines s'en retrouve diminué d'un facteur dix [36].

À la suite de cette activation des groupements carboxyliques de la surface, le ligand est injecté durant 10 min dans une solution tampon ayant un pH inférieur au point isoélectrique du ligand. Les résidus de lysine du ligand sont par conséquent sous forme NH_3^+. Les lysines réagissent avec les groupements acides carboxyliques et forment une liaison covalente, immobilisant ainsi le ligand protéique sur la surface. *(état 3).* Nous avons immobilisé le ligand sur un des quatre canaux définis sur la surface. Un deuxième canal est utilisé pour évaluer la fixation non spécifique de l'analyte sur la surface. Ce canal de référence est préparé comme le canal sur lequel est immobilisé le ligand, mais l'injection de ce dernier est remplacé par celle du tampon non réactif.

Toutes les fonctions acide carboxylique activées de la surface ne réagissent pas avec une molécule de ligand. Seulement 40 % environ de la surface est couverte d'esters activés [19] On injecte par conséquent pendant 10 min une solution d'éthanolamine (1 mol/L, pH 8,5) pour désactiver et bloquer tous les groupements –COOH activés qui n'ont pas réagit avec le ligand *(état de surface 4).* Les temps nécessaires à l'activation et à la désactivation des groupements –COOH sont proches.

Deux courtes injections (1 min) de tampon de course sont réalisées ensuite sur les deux types de canaux afin d'éliminer les molécules fixées de manière non covalente.

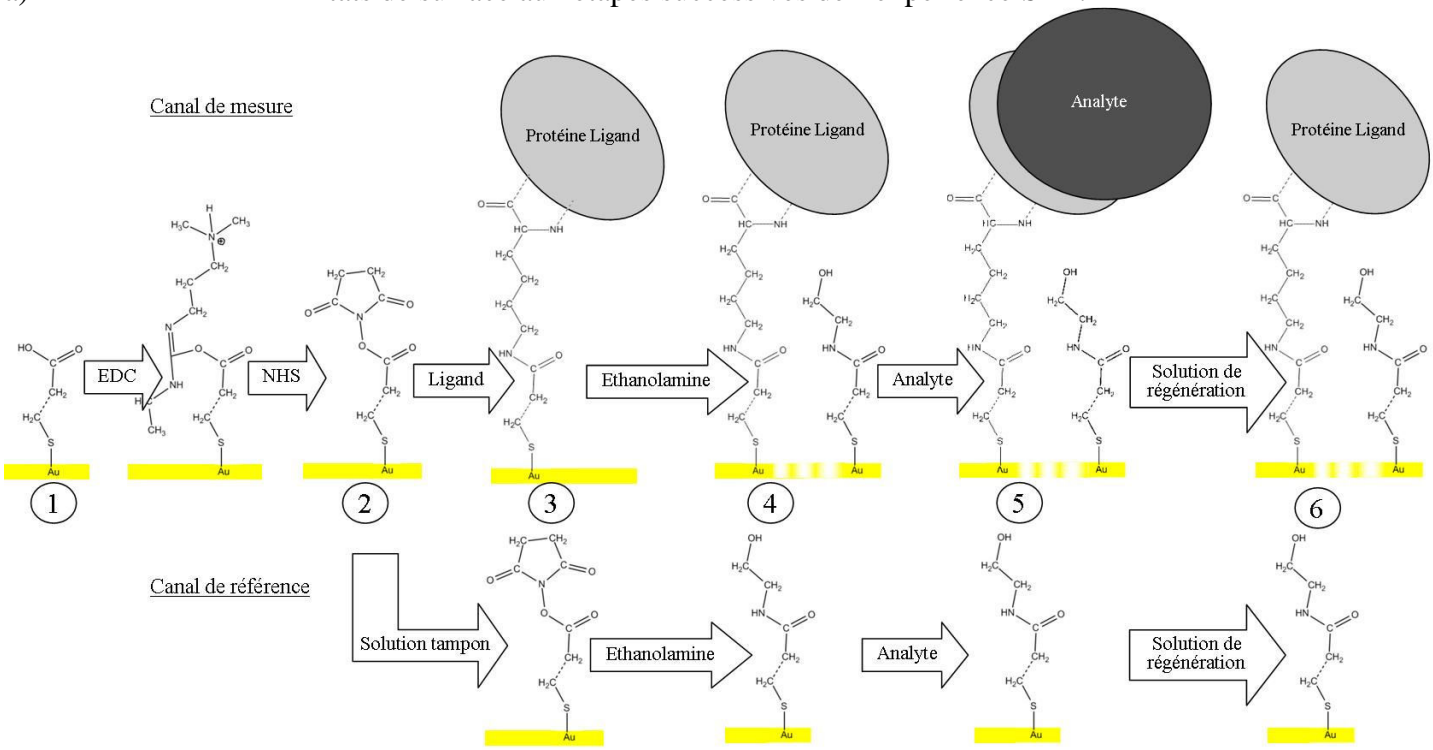
4.2.2 Interaction du ligand avec l'analyte (Figure II.14, états de surface 4 - 6)

Pour ces étapes les solutions sont injectées avec un débit de 30 µL/min à 25 °C.

Une solution de la protéine dite analyte, diluée dans le tampon de course est injectée pendant 3 min sur la surface. L'analyte réagit de manière spécifique avec le ligand précédemment immobilisé, mais peut aussi s'adsorber ou se lier de façon covalente à la surface sur un défaut de la SAM, une pollution ou une liaison pendante n'appartenant pas au ligand. Dans ce cas, on parle d'interaction non spécifique entre l'analyte et le biocapteur. Le signal du canal de référence permet d'estimer la proportion d'analyte ayant réagit de manière non spécifique avec le biocapteur *(état de surface 5).* Il est important de noter qu'il s'agit d'une estimation puisque la surface permettant l'interaction non-spécifique est plus grande sur le canal de référence que sur le canal de mesure en raison de la présence du ligand déjà immobilisé et que l'homogénéité latérale du biocapteur doit être excellente pour que cette référence soit bonne puisque ces canaux sont séparés de plusieurs millimètres.

Dans le cas où l'interaction entre le ligand et l'analyte n'est pas irréversible, il est possible de régénérer la surface et effectuer une nouvelle injection par la suite (le biocapteur retrouve ainsi l'*état de surface 4* après régénération). Pour cela on injecte pendant 30 s à 1 min des solutions de régénération *(état de surface 6)*. On peut ainsi réaliser plusieurs cycles d'injections de l'analyte en variant, par exemple, sa concentration pour déterminer les constantes cinétiques puis thermodynamiques et quantifier l'affinité de l'interaction.

a) Etats de surface aux étapes successives de l'expérience SPR.



b)

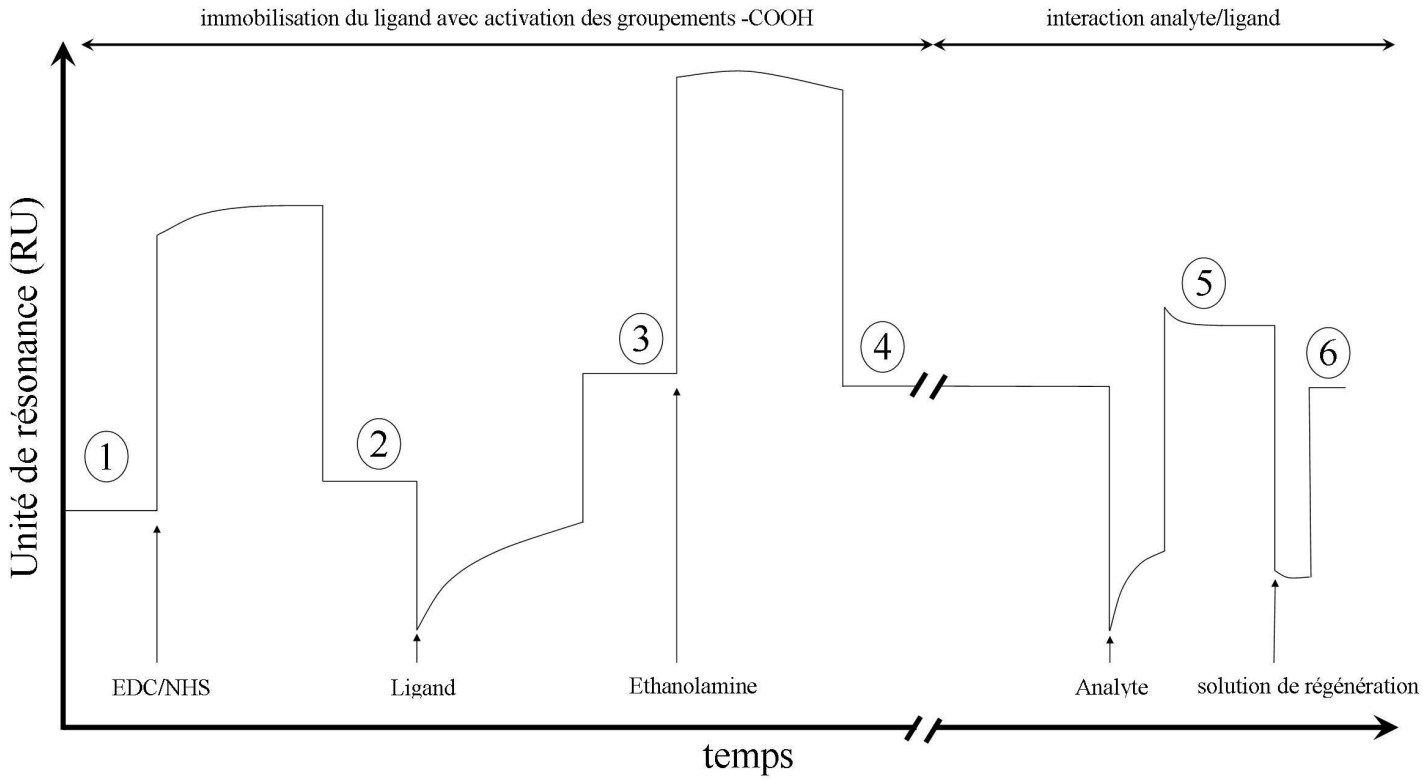


Figure II.14 : schéma d'une expérience d'immobilisation d'un ligand sur la surface puis de son interaction avec un analyte en solution : a) schéma des modifications de la surface au cours des étapes décrites dans le texte et b) sensorgrame SPR schématique associé à ces étapes (d'après Roussille *et al.* [3]).

5 Présentation des résultats et de l'article publié [3]

5.1 La fonctionnalisation et caractérisation des biocapteurs d'or

Les surfaces d'or fonctionnalisées par SAM à la suite d'une immersion de 24 h dans une solution éthanolique de 16-MHDA ont été caractérisées par plusieurs techniques. Les mesures de spectroscopie infrarouge en mode absorption-réflexion (IRRAS pour Infrared reflection-absorption spectroscopy) et de spectroscopie de photoélectron induit par rayon X (XPS pour X-ray photoelectron spectroscopy) ont montré la présence de couche dense de 16-MHDA sur les surfaces fonctionnalisées. Les mesures XPS ont également montré la présence de quelques défauts de type dimères. Aucune bicouche n'a cependant été révélée par les images de microscopie à force atomique (AFM pour Atomic force microscopy). Les mesures réalisées par réflectivité des rayons X (RX) ont donné une épaisseur de la couche organique de 15,5 ± 3,0 Å et sont en adéquation avec les valeurs de la littérature issues d'autres mesures [37-39].

Nous avons proposé d'utiliser la mesure SPR pour évaluer de même la couverture d'une SAM possédant une fonction acide carboxylique comme groupement terminal. Pour cela, on quantifie l'immobilisation de l'albumine issue du sérum de bovin (appelée dans la suite de ce manuscrit BSA pour Bovin Serum Albumin en anglais) à 2,5 mg/mL dans un tampon acétate (10 mol/L, pH 4). En effet, Tang *et al.* ont montré par mesure AFM *ex situ* que la BSA s'adsorbe fortement sur l'or nu (81 ± 2 % de couverture en 1 h d'immersion statique), mais très peu sur un tapis de groupements –COOH (2,0 ± 0,4 % de couverture) [40]. Pour notre part, nous avons évalué après 10 min d'injection de la BSA à 5 µL/min une couverture de 49 % de la surface d'or et seulement de 3 % de la couche dense de groupements

–COOH. Après activation des groupements carboxyliques par la solution d'EDC/NHS, la BSA recouvre entièrement la surface (96 %). Il est par conséquent possible avec ces trois mesures d'estimer le taux de couverture de la SAM. Ces résultats ont été obtenus pour une SAM réalisée avec de la 16-MHDA pure à 99 %. D'autres biocapteurs ont été fonctionnalisées avec de la 16-MHDA pure à seulement 95 %. Le taux de couverture de la surface par la SAM déterminé par l'immobilisation de la BSA suivie par mesure SPR a chuté de 96 à 65 %.

5.2 L'étude quantitative de deux interactions modèles

Nous avons sélectionné deux interactions biologiques modèles entre protéines : une interaction forte (ligand : streptavidine et analyte : IgG biotinylée) et une interaction entre antigènes et anticorps (ligand : endostatine et analyte : IgG anti endostatine). Ces deux interactions ont été étudiées en SPR dans un appareil BIAcore T100 avec des surfaces d'or nu simplement nettoyées (GE Healthcare), les surfaces fonctionnalisées présentées ci-dessus et des surfaces commerciales (C1 et CM5, GE Healthcare). Les surfaces C1 possède un tapis de groupement –COOH et sont le pendant commercial des surfaces que nous avons fonctionnalisées. Peu de renseignements sur leur état de surface précis sont disponibles dans la littérature. Les surfaces CM5 quant à elles possèdent une couche de dextran d'environ 100 nm d'épaisseur. Tous ces biocapteurs ont le même support : du verre BK7 et un film d'or équivalent que nous mesurons à 41,7 ± 0,5 nm par RX. Il a donc été possible de comparer leurs efficacités pour l'étude des mêmes interactions biomoléculaires.

L'immobilisation de l'endostatine a été efficace sur les biocapteurs que nous avons fonctionnalisés ainsi que sur la CM5. Par contre, l'immobilisation sur les surfaces C1 a été

trop faible pour se révéler exploitable. Nous supposons que des groupements additionnels existent sur les C1 dont GE Healthcare ne parle pas. Bien que la quantité d'endostatine immobilisée sur les CM5 soit nettement supérieure aux surfaces fonctionnalisées avec la 16-MHDA, le rapport IgG anti endostatine/endostatine immobilisée est supérieur sur notre biocapteur à base de 16-MHDA (tableau 5 de l'article).

Les mesures d'interaction entre la streptavidine et l'IgG biotinylée ont pu être effectuées sur toutes les surfaces. Une plus grande quantité de streptavidine a été immobilisée sur nos biocapteurs (avec la 16-MHDA pure à 99 % ou à 95 %) par rapport à la surface C1, entraînant une multiplication par deux de la quantité d'IgG biotinylée fixée sur la streptavidine. Le rapport de quantités d'IgG biotinylé fixé à la streptavidine immobilisée est identique quel que soit le degré de pureté de la 16-MHDA utilisée. La surface CM5 capture plus de streptavidine que les autres surfaces, mais seulement une streptavidine sur vingt fixe un IgG biotinylé alors qu'une streptavidine sur deux a fixé un analyte pour nos capteurs (tableau 7 de l'article).

Anal Bioanal Chem (2011) 401:1601–1617
DOI 10.1007/s00216-011-5220-z

ORIGINAL PAPER

Surface characterization and efficiency of a matrix-free and flat carboxylated gold sensor chip for surface plasmon resonance (SPR)

L. Roussille · G. Brotons · L. Ballut · G. Louarn · D. Ausserré · S. Ricard-Blum

Received: 21 December 2010 / Revised: 15 June 2011 / Accepted: 27 June 2011 / Published online: 14 July 2011
© Springer-Verlag 2011

Abstract We report the preparation and characterization of a matrix-free carboxylated surface plasmon resonance (SPR) sensor chip with high sensing efficiency by functionalizing a bare gold thin film with a self-assembled monolayer of 16-mercaptohexadecanoic acid (SAM–MHDA chip). The self assembled monolayer surface coverage of the gold layer was carefully evaluated and the SAM was characterized by infrared reflection absorption spectroscopy, X-ray photoemission spectroscopy, atomic force microscopy, X-ray reflectivity-diffraction, and SPR experiments with bovine serum albumin. We compared the SPR signal obtained on this chip made of a dense monolayer of carboxylic acid groups with commercially available carboxylated sensor chips built on the same gold substrate, a matrix-free C1 chip, and a CM5 chip with a ~100 nm dextran hydrogel matrix (GE Healthcare). Two well-studied interaction types were tested, the binding of a biotinylated antibody (immunoglobulin G) to streptavidin and an antigen–antibody interaction. For both interactions, the well characterized densely functionalized SAM–MHDA chip gave a high signal-to-noise ratio and showed a gain in the availability of immobilized ligands for their partners injected in buffer flow. It thus compared favourably with commercially available sensor chips.

Keywords Self-assembled monolayer · gold surface · surface characterization · biosensor · protein–protein interaction · surface plasmon resonance

L. Roussille and G. Brotons contributed equally to the work

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00216-011-5220-z) contains supplementary material, which is available to authorized users.

L. Roussille · G. Brotons (✉) · D. Ausserré
Laboratoire de Physique de l'Etat Condensé,
UMR 6087 CNRS-Université du Maine,
molecular landscape and biophotonic horizons,
Avenue Olivier Messiaen,
72085 Le Mans, France
e-mail: guillaume.brotons@univ-lemans.fr

L. Ballut · S. Ricard-Blum
Institut de Biologie et Chimie des Protéines,
UMR 5086 CNRS-Université Lyon 1,
IFR 128 Biosciences Lyon-Gerland,
7 Passage du Vercors,
69367 Lyon Cedex 07, France

G. Louarn
Institut des Matériaux Jean Rouxel,
UMR 6502 CNRS-Université de Nantes,
BP 32229, Nantes 44322, France

Introduction

Surface plasmon resonance (SPR) is widely used to study biomolecular interactions in research or clinical applications. In a typical experiment, a target molecule, referred to as the ligand, is immobilized on a functionalized gold film, and the interacting partner, referred to as the analyte, is injected in a buffer flow with real-time and label-free monitoring of the binding [1]. A classical SPR detection system with monochromatic and polarized light consists of following the specific angle of reflected light at which the surface plasmon wave couples to the evanescent wave at the gold–solution interface [2]. At a precise angle of incidence, the light reflected under specular total external conditions goes through an intensity minimum. The SPR angle position is highly sensitive to the refractive index profile of the interface, which is probed by an exponentially decaying field. Because the solution refractive index scales as the protein concentration, the real-time magnitude of the

SPR angular shift can be interpreted in terms of mean protein mass adsorption. The SPR response is expressed in terms of resonance units (RU) and it is well accepted that 1 RU corresponds to an angular shift of 0.0001 and to a protein surface excess of 1 pg mm^{-2} (for most proteins with a refractive index increment $dn/dc \approx 0.18$ [3]). A number of instruments have been developed to characterize biomolecular interactions [2, 4]. In commercially available instruments, reagents, buffers and analytes are delivered to the sensor chip surface through an integrated microfluidic cartridge controlled by software. Commercially available sensor chips are usually functionalized with chemical groups to capture proteins either covalently via their amino groups or by affinity using streptavidin for biotinylated molecules or Ni–nitrilotriacetic acid for histidine-tagged proteins [5]. One of the most common sensor chips used to study protein–protein interactions comprises a carboxymethylated dextran hydrogel laid above the gold film (CM5, GE Healthcare) [6, 7]. Other companies, for example Xantec, have also developed hydrogels (e.g. linear polycarboxylate, carboxymethylpoly(ethylene glycol)) with different functionalization of the hydrophilic and flexible graft polymer. A matrix-free C1 chip lacking carboxymethylated dextran and designed with reactive carboxyl groups obtained from a 16-mercaptohexadecanol monolayer [8] is also commercially available (GE Healthcare). The flat C1 surface allows interactions to take place closer to the gold layer and this is an advantage when working with large molecules, molecular complexes, and particles. This chip is also useful for those few interactions that may be affected by the presence of dextran and mass transport. A challenge for sensor chip chemistry is to increase the SPR signal level corresponding to specific binding and to reduce non-specific binding. The use of mixed carboxylated self assembled monolayers (SAMs) can be an efficient way of reducing non-specific binding of proteins to the sensor chip surface when hydrophilic groups such as –OH or –OEO (oligo(ethylene oxide)) are mixed with the –COOH functions [9]. Accordingly, mixed SAMs result in a smaller amount of immobilized ligands (proportional to the –COOH surface fraction) but improve their accessibility to their binding partners [10, 11].

Many other reasons exist for developing new sensor-chip functionalization and this is made easier by the availability of bare gold chips. We try to prepare sensor chips with a surface functionalization usable for both SPR and the new optical microscopy technique we developed to visualize biomolecular interactions at the gold–liquid interface based on surface enhanced ellipsometric contrast (SEEC [12]). We report here the SPR data obtained on a chip with well-characterized SAM prepared with a simple chemical method, with high surface reactivity, and made of a single chemical species because the SAM surface coverage is a key property for the raw SPR signal. Because the SEEC technique is also sensitive to the SAM composition, the use of mixed SAMs was precluded. Indeed, mixed SAMs can exhibit some in-plane phase separation [13]. Their SPR response is thus not solely controlled by the carboxyl groups coverage ratio [10, 11], making the SPR–SEEC comparison, to be presented in a forthcoming publication, more difficult. Moreover, the prepared 16-MHDA SAM compared favourably with commercial SPR chips with weak non-specific binding, a high SPR signal-to-noise ratio, and a higher SPR response with both interaction types studied. Thus, we prepared a matrix-free chip based on the same bare gold substrate (SIA kit Au chip, GE Healthcare) as the C1 chip. The chip was functionalized with a dense layer of –COOH groups from a self assembled monolayer of 16-mercaptohexadecanoic acid (SAM–MHDA chip).

We first report here the chip chemistry and the extensive structural and functional characterization of the SAM, and the chemical method used in SPR experiments performed with bovine serum albumin (BSA) to evaluate the SAM coverage of the gold surface. Then, the SAM–MHDA sensor chip was tested in SPR binding experiments with two types of interaction (an antigen–antibody interaction and a biotinylated immunoglobulin G (IgG)–streptavidin), and compared with two commercially available sensor chips, a matrix-free carboxylated C1 sensor chip and a CM5 sensor chip with a carboxymethylated dextran matrix (GE Healthcare), which is the most commonly used sensor chip [6]. It is made of a ~100-nm hydrogel layer of unbranched carboxymethylated dextran chains grafted on to the gold layer. On the CM5 chip, the carboxylic acid groups are distributed in a flexible hydrophilic gel containing 98% water under physiological buffer conditions, further away from the gold surface than for the C1 and functionalized SAM–MHDA chips. The three types of functionalization were made on the same thin gold film (GE Healthcare), in contrast with other reports of SAM characterization and SPR assays carried out on different gold substrates [14, 15].

Experimental

Surface chemistry

SPR sensor-chips made of a thin gold layer on glass slides purchased from GE Healthcare (SIA Kit Au; GE Healthcare, Uppsala, Sweden); these are referred to as bare gold in the text. They are made of a gold thin layer with a (111) preferred orientation, an optimized thickness for the SPR signal detection (~50 nm from GE Healthcare), and are deposited on a thin BK7 glass slide of 1×1.2 cm^2. The gold surface was functionalized after covalent grafting of a self-assembled monolayer of 16-mercaptohexadecanoic acid

(16-MHDA depicted in Fig. 1a) [6]. Gold surfaces were first washed for ten minutes in an ultrasonic bath with the solvent used for the SAM deposition, then dried under a laminar flow cabinet (Class 1000) and exposed for 1 min to a UV–O_3 plasma (UVO cleaner model 42–220) to remove residual traces of organic compounds. AFM and X-ray reflectivity were used to check that the gold film roughness did not increase after this pretreatment. The thiol-gold grafting was performed by immersion for 24 h in an ethanol solution of 16-MHDA at 0.02 mmol L^{-1}, 0.1 mmol L^{-1}, or 1 mmol L^{-1}. The use of several concentrations of thiol compounds at several temperatures (4 °C, 20 °C, and 70 °C in an oven with a sealed vial) is known to give different SAM surface coverage and defects [15-17]. Addition of 10% (*w*/*w*) acetic acid to the ethanol reduced the formation of hydrogen bonds, inducing bilayer formation on the surface (Fig. 1e–i) [17]. The SAM-functionalized surface was rinsed in ultrasonic baths with the SAM solvent (ethanol+acetic acid), pure ethanol, and pure water and stored at 4 °C until use. Because organic or ionic pollutant strongly affect the SAM coverage quality [17], all vials and laboratory equipment were pre-cleaned twice before use with a 1 mol L^{-1} KOH and 5% (*v*/*v*) 2-propanol solution, and then with 1 mol L^{-1} HCl solution. All items and tools were rinsed between each step, the final washing step being performed with Milli-Q water. Immediately before use, the

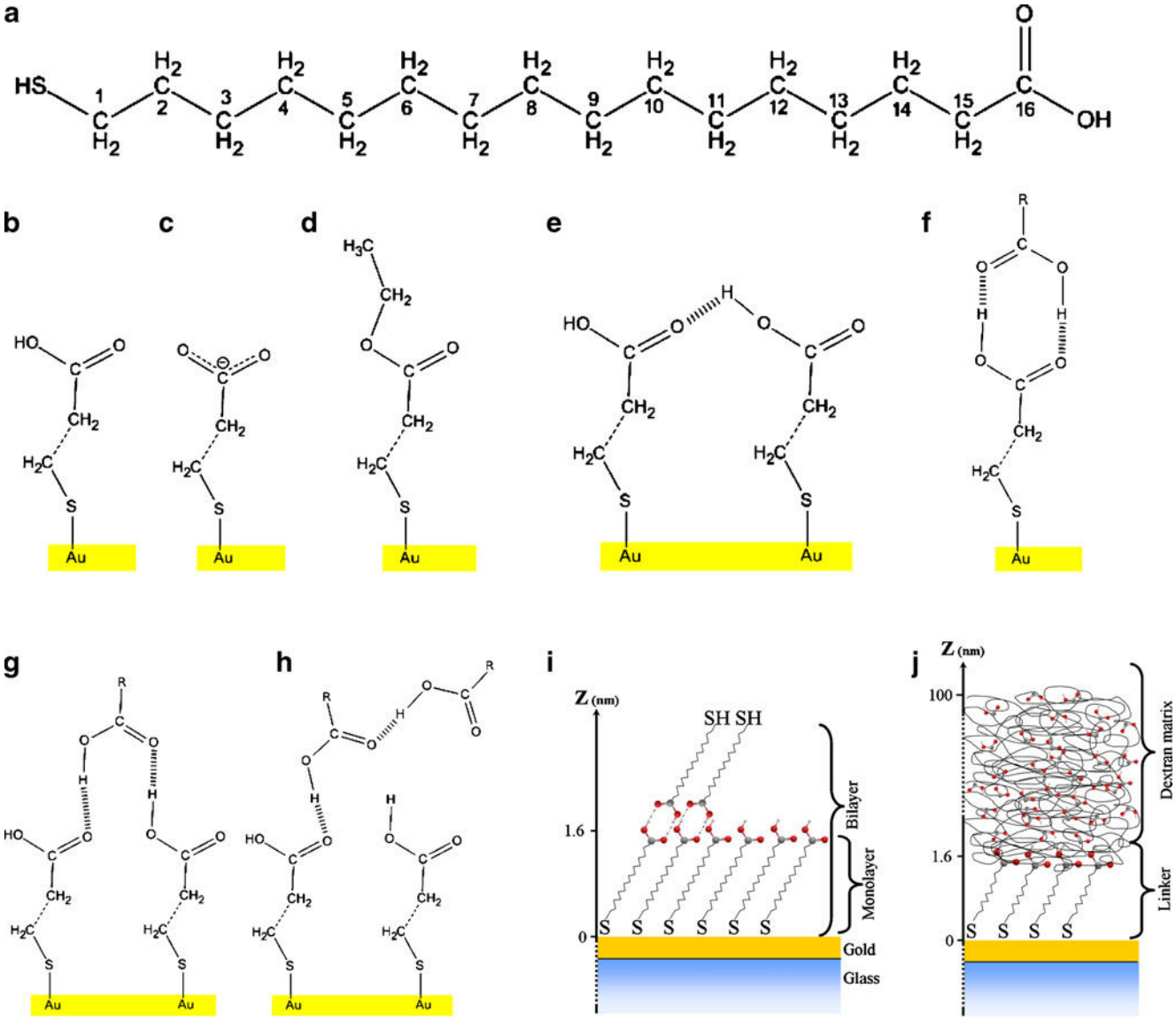


Fig. 1 Molecular structure of (**a**) the 16-mercaptohexadecanoic acid (with numbered carbons atoms) and possible SAM end-group structures, (**b**) carboxylic acid, (**c**) carboxylate, (**d**) ester and possible hydrogen bonding (where R can be CH_3 or $C_{15}H_{31}S$ depending on the presence of acetic acid or 16-MHDA, respectively, bound to the SAM), (**e**) hydrogen bonding between two grafted 16-MHDA molecules of the SAM, (**f**) cyclic dimer binding, (**g**) acyclic dimer binding, and(**h**) random orientation of hydrogen bonds. (**i**) Schematic diagram of monolayer and bilayer domains with tilted 16-MHDA alkyl chain, (**j**) schematic diagram of the CM5 sensor chip [6]

bottles were flushed with pure acetone, dichloromethane, 2-propanol, and the pure solvent to be used.

For comparison, measurements were carried out with the same procedure on the GE Healthcare certified sensor chip C1, a matrix-free surface functionalized with carboxyl groups to immobilize ligands and described as a flat carboxylated layer in the Biacore Sensor Surface Handbook [7]. The bare gold substrates and several functionalized surfaces were studied by X-ray reflectivity (XR), infrared reflection absorption spectroscopy (IRRAS) also called polarized infrared external reflectance spectroscopy (PIERS), X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), and atomic force microscopy (AFM) before performing surface plasmon resonance experiments. Because several of these characterization techniques (e.g. long X-ray exposure, XPS high vacuum, AFM tip contacts) can damage or pollute the SAM, we checked the SPR results were similar to those obtained with freshly prepared gold surfaces.

Chemicals

Ethanol (EtOH, 99.8%), hydrochloric acid (HCl, 37%), sodium hydroxide (NaOH, 90%), acetone (99.5 %), dichloromethane (99.9%), 2-propanol (99.9%,), acetic acid (AA, 99.7%), and mercaptohexadecanoic acid (16-MHDA, 99% and 95%,) were from Sigma–Aldrich (St Quentin Fallavier, France) and used without further purification. Milli-Q water and sterile distilled water (Versol, Aguettant, Lyon, France) were used.

Infrared measurements

Infrared measurements (IRRAS) were performed on a Vertex 70 (MIR source, KBr beam splitter and MCT detector) combined with an infrared microscope Hyperion 2000 from Bruker at the Jean Rouxel Materials Institute (IMN, Nantes, France). We used a grazing angle objective (×15) and an infrared polarizer in the source to sample path in order to suppress the s-polarized light which enhances the signal-to-noise ratio. The spectra were the result of a Fourier transformation of 512 or 2000 successive wave-length scans with a spectral resolution of 4 cm^{-1} over a wave number range of 4000–500 cm^{-1}. The IRRAS signal of a bare gold film was subtracted from each sample datum using the same instrument settings. Data treatment was evaluated by use of OPUS 5.5 software.

X-ray photoemission spectroscopy

X-ray photoemission spectroscopy (XPS) measurements were performed at the IMN on Leybold LH12 equipment with polychromatic X-ray Mg radiation (1253.6 eV), a hemispherical analyzer, and an electron multichannel detector. The binding energies were based on the Au $4f_{7/2}$ core level used as a reference at 84.0 eV [18]. The vacuum in the sample compartment of the spectrometer reached 4×10^{-8} mbar. The entire data were fitted by use of CasaXPS software using a peak fit function obtained as the product of a Gaussian function and 30% of a Lorentzian function with addition of a linear background level:

$$G(x:E,F,m) = \exp\left[-4ln\,2(1-m)\left(\frac{x-E}{F}\right)^2\right]$$

$$L(x:E,F,m) = \frac{1}{1+4m\left(\frac{x-E}{F}\right)}$$

$$GL(x:E,F,m) = G(x:E,F,m)L(x:E,F,m) \quad (1)$$

where x is the energy coordinate, F the full width at half maximum (FWHM) of the peak, and E the energy peak position. The Lorentzian to Gaussian weight factor m was fixed at 0.3 for the fits. The results were not affected by the peak line shape asymmetry correction.

Atomic force microscopy

Atomic force microscopy (AFM) images were measured on commercial equipment from Veeco (Dimension Nanoscope V) using the tapping mode with SiN_3 tips, and using Nanoscope 7.20 software. The AFM images were obtained under ambient conditions with a slow scan rate of 0.25 Hz. We used 1024×1024 resolution and saved the retrace lines systematically. The tip slavery in the z direction corresponded to 12.5 nm V^{-1}. Measurements performed on new surfaces directly from the container or on cleaned surfaces as described above were not significantly different. For each sample we systematically analyzed several images of 250×250 nm^2, 1×1 μm^2, and 10×10 μm^2 taken at different positions of the surface in order to estimate the surface homogeneity and the topography on different scales.

X-ray reflectivity

X-ray reflectivity measurements were carried out on Philips X'Pert equipment with a copper sealed tube running at 40 kV and 30 mA. The primary beam FWHM was set to 0.08° from a set of slits before the sample and the detector was a low-noise gas counter set after a graphite crystal analyzer selecting Cu-K_α radiation with an effective wavelength, λ, of 1.54Å. Three types of in-plane of incidence scans were collected on each sample. The specular reflection was measured by keeping the incident angle, α_{in}, and the out-coming angle equal ($\alpha_{out}=\alpha_{in}$) by use of coupled ($\alpha_{in}/2\alpha_{in}$) reflectivity scans. Therefore, the momentum transfer vector q, was

perpendicular to the film interface ($q=q_z$). To record non-specular intensities we performed standard longitudinal scans (offset scans) and rocking scans (transverse scans). The longitudinal scan was similar to the reflectivity scan except that the detection angle was intentionally offset by a fixed angle $\Delta\alpha_{offset}$. In the rocking scan, the detector did not move (i.e. the sum $2\theta=\alpha_{in}+\alpha_{out}$ was fixed) while the sample was rocked in the incident beam so that α_{in} varied from 0 to 2θ. From the width of the specular peak measured from the rocking curves (not shown) we defined the incident angle offset for the longitudinal scans to $\Delta\alpha_{offset}=0.1°$. These scans were subtracted from the specular scans to obtain the so-called true specular reflectivity curves that were fitted. Without this subtraction, specular reflectivity was overestimated at large angles and the film roughness was underestimated of several angstroms. At small angles, the beam footprint overspilled the film surface and a geometrical correction was used to compensate for this effect by integrating the incident flux reaching the surface at each angle of incidence.

Surface plasmon resonance

Surface plasmon resonance binding assays were carried out in a Biacore T100 system (technical facility of IFR 128 Gerland – Lyon Sud, Lyon, France). SAM–MHDA surfaces were sonicated in water before use to minimize the baseline drift. The SAM–MHDA and bare gold sensor surfaces were mounted on a supported plastic frame (GE Healthcare) and inserted into the Biacore T100 system. As recommended by the manufacturer [19], each sensor chip was washed three times with 10 mmol L^{-1} Hepes (4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid), 150 mmol L^{-1} NaCl pH 7.4 buffer containing 0.05% (*v*/*v*) surfactant P20 (HBS-P^+, GE Healthcare). A normalization procedure was carried out by injecting a 70% (*v*/*v*) glycerol solution in water to adjust the detector response and compensate for slight differences between different sensor chips. Bovine serum albumin (BSA, A4503, Sigma–Aldrich) was injected over bare gold, and on the SAM–MHDA surface to evaluate the coverage of the surface, BSA adsorption to surfaces being monitored by SPR. A continuous flow of running buffer, HBS-P^+, was maintained over the sensor chip throughout the experiments that were conducted at 25 °C. Four independent flow cells (flow cell height 40 μm, flow cell volume 0.06 μL) were defined on the sensor chip. Streptavidin (*Streptomyces avidinii*, S-S4762, Sigma–Aldrich) and recombinant human endostatin expressed in human embryonic kidney cells [20, 21] were covalently immobilized on SAM–MHDA, C1 and CM5 chips by reacting their primary amino groups with reactive succinimide esters formed by activation of the carboxyl groups (Electronic Supplementary Material). The carboxylic acid groups of the four flow cells of the sensor chip surface were first activated for 10 min by injecting at 5 μL min^{-1} a mixture of 0.2 mol L^{-1} 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) in water and 0.05 mol L^{-1} *N*-hydroxysuccinimide (NHS) in water (amine coupling kit, GE Healthcare). EDC reacted with the carboxyl groups to form an amine-reactive *O*-acylisourea intermediate. If this intermediate does not react immediately with an amine group, it hydrolyzes and regenerates the carboxyl group. Addition of NHS stabilized this intermediate by transforming it into a reactive succinimide ester, thus increasing the efficiency of EDC-mediated coupling reactions [22-24]. Endostatin was diluted at 160 μg mL^{-1} in 10 mmol L^{-1} maleate buffer pH 6, and streptavidin at 200 μg mL^{-1} in 10 mmol L^{-1} sodium acetate, pH 4. After activation, both proteins were injected into individual flow cells at 5 μL min^{-1} for 10 min over the sensor chip. Residual active succinimide esters were deactivated by injecting 1 mol L^{-1} ethanolamine pH 8.5 at 5 μL min^{-1} for 10 min. Running buffer (HBS-P^+) was then injected twice at 5 μL min^{-1} for 1 min to remove molecules that were non-covalently linked to the sensor chip surface. The amount of immobilized proteins on the gold surface and the amount of analyte bound to the ligand were expressed in resonance units (RU). One RU represents a change of 0.1 millidegree in the angle of the intensity minimum. Generally, one RU is approximately equivalent to a change in concentration of about 1 pg mm^{-2}. A control flow cell was prepared by use of the same procedure except that the protein was omitted in order to measure the non-specific binding of analyte (biotinylated IgG and anti-endostatin antibody) to the sensor chip surface. Biotin-SP-conjugated AffiniPure goat anti-mouse IgG H+L (115-065-146; Jackson ImmunoResearch Laboratories, UK) was injected over immobilized streptavidin and the polyclonal anti-endostatin antibody [25] was injected over immobilized endostatin for 180 s at 30 μL min^{-1}. Both analytes were diluted in running buffer and injected. Report points were taken 10 s post-injection to calculate the amount of analyte bound to the immobilized protein. Bound antibody was dissociated from endostatin by injection of regeneration solutions (10 mmol L^{-1} glycine pH 2.5 then 2 mol L^{-1} guanidinium chloride and 1.5 mol L^{-1} sodium chloride) to enable the sensor chip to be re-used. The resonance signal was collected as a function of time and was referred to as a sensorgram [3]. All data used to calculate the mean values discussed below are given in the added material section.

Results and discussion

Surface characterization of matrix-free SPR sensor chips (SAM–MHDA and C1)

The following section reports the extensive SAM characterization and discusses the most efficient way to measure

the SAM density and gold surface coverage. The surface of bare gold (SIA Au Kit), SAM–MHDA (99% pure), and matrix-free C1 sensor chips were studied by spectroscopies (IRRAS and XPS), AFM, and X-ray surface-sensitive techniques. Because such analyses (e.g. long X-ray exposure, high vacuum for XPS) and manipulations can damage or pollute the SAM grafted on to the gold surface, we checked that all characterizations and SPR results were identical on freshly prepared surfaces.

Infrared reflection absorption spectroscopy (IRRAS)

The IR spectra were measured on three surfaces functionalized with different concentrations of 16-MHDA solution (0.02, 0.1, or 1 mmol L^{-1}) and on the C1 sensor chip (Fig. 2). They all showed a high ratio of CH_2 asymmetric (d^+) and symmetric (d^-) stretching at 2920 cm^{-1} and 2850 cm^{-1}, respectively, which are characteristic of the aliphatic 16-MHDA chains. The asymmetric CH_2 stretching indicated high molecular packing quality for the SAM. Indeed, SAMs with high density and organization come with asymmetric CH_2 stretching near 2916 cm^{-1} whereas for more disordered SAMs there is a shift towards 2930 cm^{-1} [11]. In this study, the CH_2 stretching is observed at 2920 cm^{-1} for SAMs prepared from 0.02 mmol L^{-1} and 1 mmol L^{-1} 16-MHDA solutions. For the SAMs prepared with a 0.1 mmol L^{-1} 16-MHDA solution and the commercial C1 sensor chip this band was at 2924 cm^{-1} (Fig. 2a). The specific IR bands expected at 2955 and 2962 cm^{-1} [26] and corresponding to the formation of an ester group linking an ethanol molecule to the 16-MHDA (Fig. 1d), were not observed. Another group of IR bands characteristic of the 16-MHDA and corresponding to C=O stretching of the carboxylic acid function was found between 1800 and 1400 cm^{-1} (Fig. 2b). In the raw data, these peaks were hidden by the intense water vibration peaks that were removed in the data treatment by use of measurements made on the bare gold substrate. The –COOH stretching of the 16-MHDA monomers (Fig. 1b) appeared at 1735 cm^{-1}, whereas stretching of the acyclic (Fig. 1e, g, and h) and cyclic 16-MHDA dimers (Fig. 1f) was found at 1706 and 1693 cm^{-1}, respectively (shoulder peak). The asymmetric (1566 cm^{-1}) and symmetric (1465 cm^{-1}) stretching of the O–C–O group were also observed. IR peaks were assigned according Nuzzo's and Arnold's calculations [17, 26]. The shoulder IR peak at 1693 cm^{-1} should correspond to traces of a bilayer formation (Fig. 1f, g, h) linked via hydrogen bonds to the grafted SAM. These results are indicative of good grafting of the SAM but we cannot conclude from the IRRAS experiments that the SAM coverage changed on variation of 16-MHDA concentration because all spectra looked similar and variations in band intensities could not be interpreted quantitatively. All the above IR bands were observed for the commercial C1 chip.

X-ray photoemission spectroscopy (XPS)

Several X-ray photoemission spectra were recorded over a large energy range (1150 to −5 eV) (Fig. 3). For all the samples studied, the expected chemical elements were the only ones detected, except for traces of sodium on the certified commercial C1 chip. Higher energy resolution was used to measure the O 1 s, C 1 s, S 2p, and Au 4f binding energy peak regions which are shown on Fig. 4 for the 1 mmol L^{-1} sample with our best fit to the data. The

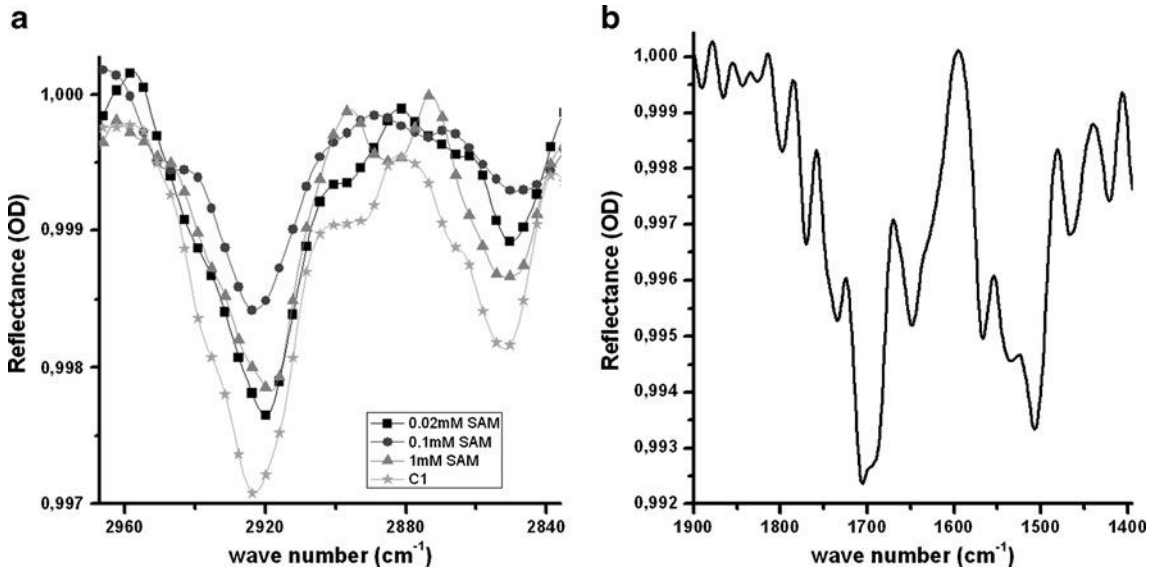


Fig. 2 Infrared (IR) spectra of 16-MHDA SAM: (**a**) IR band positions of the CH_2 symmetric and asymmetric vibration of the polymethylene chain of adsorbed 16-MHDA. (2000 scans, 4 cm^{-1}). (**b**) IR carbonyl vibration bands of 16-MHDA SAM (512 scans, 4 cm^{-1})

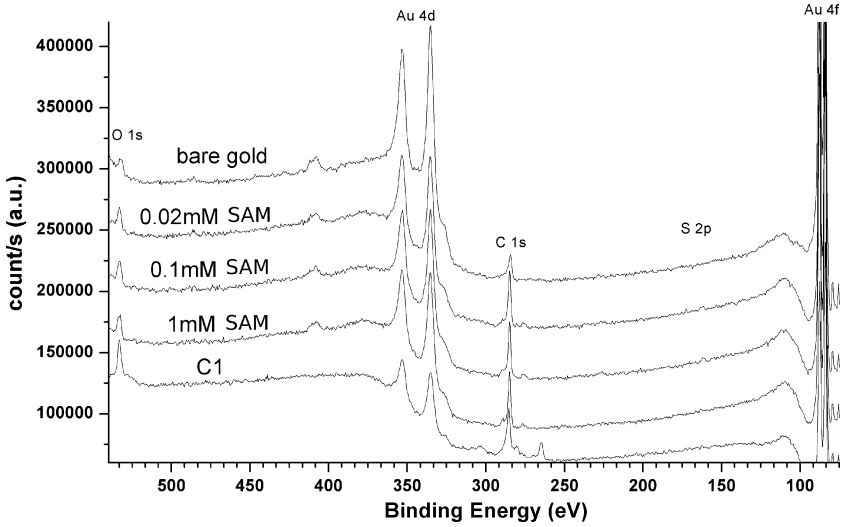


Fig. 3 XPS curves of bare gold surfaces, of gold surfaces functionalized by immersion in 0.02, 0.1 and 1 mmol L^{-1} SAM solution at 20 °C, and of a commercial C1 surface. (a.u. arbitrary unit)

samples obtained with different 16-MHDA concentrations gave identical results (summarized in the supplementary material). The carbon peaks (Fig. 4b) were fitted with three components at 284.9, 286.6 and 289.2 eV with

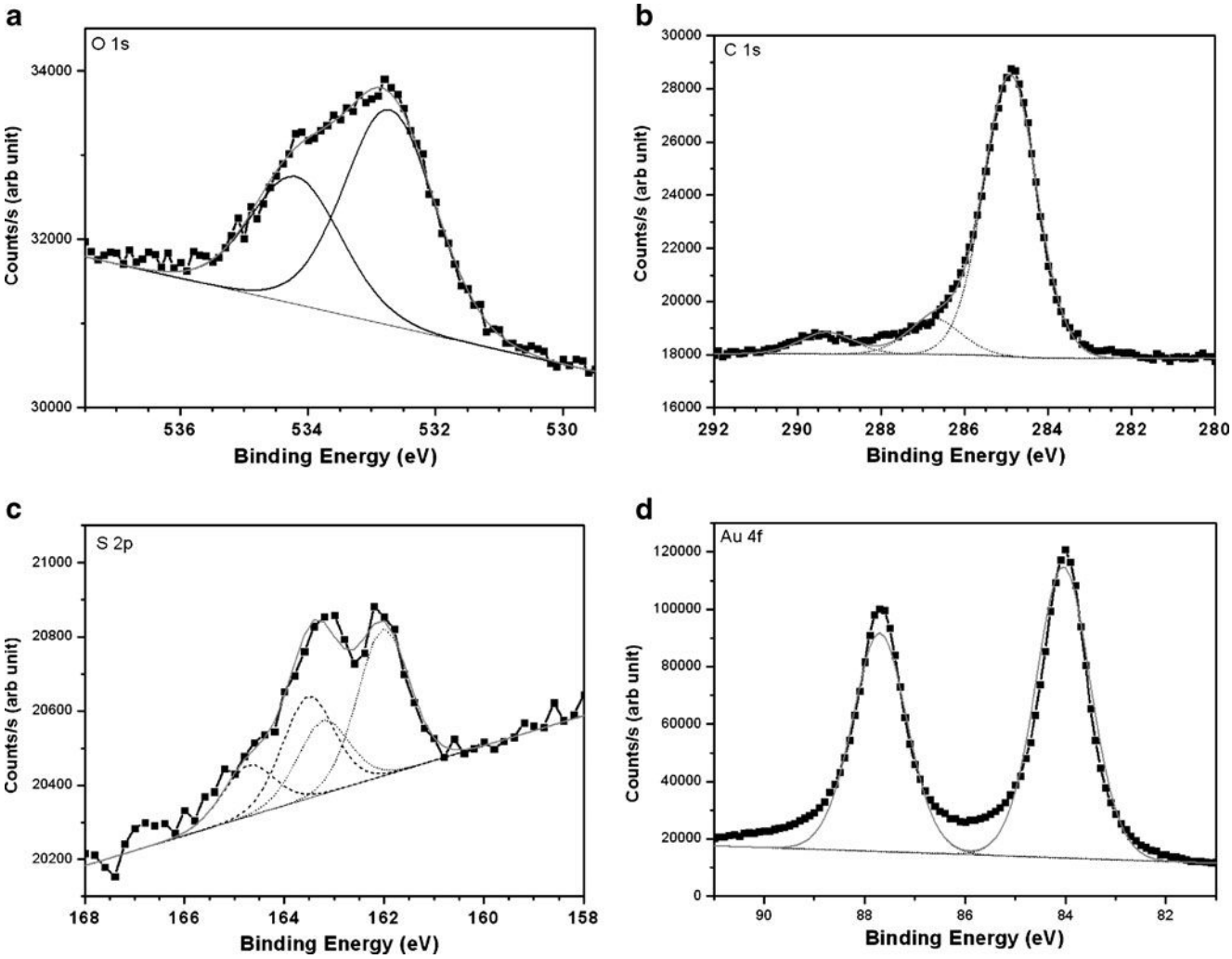


Fig. 4 X-ray photoemission spectra of (**a**) the O 1 s, (**b**) the C 1 s, (**c**) the S 2p, and (**d**) the Au 7f core level region. *Short dotted lines*: fitted experimental lines

corresponding surface ratios of 82.0%, 11.0%, and 7.0%, respectively. Published energy positions are 284.7, 285.6, and 289.2 [18]. Finally, the lowest binding energy peak was the most intense and should correspond to the 13 carbon atoms numbered from 2 to 14 in Fig. 1a. The shoulder line at 286.6 came from two carbons: the first, C_1 bonded to the sulfur, and the second, C_{15}, the α carbon to the carbonyl group. The highest energy line came from the carboxyl carbon, C_{16}, in agreement with the results published by Mendoza [18] and Bain [27]. The fitted element ratios obtained in this way corresponded to those expected for the 16-MHDA molecule (81.25% for the C_2 to C_{14}, 6.25% for C_1, 6.25% for C_{15} and 6.25% for C_{16}). The oxygen peak (Fig. 4a) can be fitted with two energy lines at 532.7 and 534.2, corresponding, respectively, to O=C and O–C of the carboxylic acid group. The best fit was obtained with element ratios of 2/3 for O=C and 1/3 for O–C. The fact that the binding energy of the C_{15} atom was shifted from the aliphatic chain carbons because of the presence of the double bond with the O on the C_{16} could explain that this oxygen comes with a larger peak surface. Note that the oxygen peak could also be accounted for, but with less agreement, assuming an equal surface for the two oxygen peaks, as expected from the molecule stoichiometry. The sulfur peaks were difficult to distinguish from the background and appeared very noisy. The S 2p spectrum near 162 eV (Fig. 4c) was fitted with a doublet structure from the S $2p_{3/2}$ and S $2p_{1/2}$ peaks with area ratios of 2 to 1 and an energy split of 1.2 eV [18]. The best fit for SAM chips gave 60% of molecules bound to the gold (S-Au) and showed the presence of unbound thiols. The commercial C1 surface had a larger fraction of S atoms linked to the gold layer (75%). This higher ratio of S–Au binding did not mean that the C1 surface offers more functional –COOH groups than the SAM–MHDA chips, because absolute intensities of S peaks from different samples were not compared here. A good fit was also obtained for all samples excluding the presence of bilayers and S–H groups, but it was obtained with peak FWHM much too large for the S–Au doublet peaks (FWHM 2.4 eV, instead of 1.2 eV used previously). No oxidized sulfur species (>166 eV), for example sulfonates, were detected by XPS on any samples [28]. Note that the photoelectrons from sulfur atoms linked to the gold layer must go through the whole SAM before detection. This is not the case for the photoelectrons from an unbound sulfur group present if a bilayer structure is formed (Fig. 1f, g, h). Thus, the percentage of monolayer (Fig. 1b, c, e) was certainly underestimated compared with the bilayer (Fig. 1f, g, h) for all samples. The difference in the X-ray excitation flux that reaches these two sulfur atoms can be neglected.

The intensity of the Au 4f photoelectron peaks (Fig. 4d) was also attenuated by the presence of the SAM, and depended on the SAM thickness and surface coverage. From this absorption due to the SAM thickness, Mendoza and co-workers [18] found a 16-MHDA SAM thickness equal to 19 Å and a 30° tilt of chains relative to the substrate normal. In the same way, we calculated the expected attenuation factor from the integrated peak intensity, noted Au_1, of the Au $4f_{7/2}$ peak attenuated by a complete SAM. The transmission of the photoelectron intensity through the SAM is equal to [18]:

$$\frac{Au_1}{Au_0} = e^{\frac{-d}{\lambda(\sin\varphi)}} = 0.64 \quad (2)$$

where Au_0 is the intensity of Au $4f_{7/2}$ photoelectrons measured on the bare gold layer (equal to 22,680 a.u. (arbitrary units from the integrated peak surface)), λ is the attenuation length equal to 42±1.4 Å for alkanethiols on gold [29], and φ is the photoelectrons takeoff angle to the detector, equal to 90°.

For all the functionalized sensor chips, the intensity of the Au $4f_{7/2}$ peaks was lower than that measured on bare gold. This was interpreted as an attenuation factor because of the surface coverage of the 16-MHDA SAM. Our functionalized surfaces showed an intensity attenuation corresponding to an SAM surface coverage in the range 87–98% (Table 1). A packing density of 21.4 $Å^2$/thiolate was found by Harder et al. [30] for an idealized SAM with a hexagonal structure where the S to S smaller distance along the surface is 4.97 Å [31]. All functionalization showed a dense 16-MHDA monolayer in the range 24.6 to 21.8 $Å^2$ per molecule. Note that the commercial gold surfaces used for SPR are not an atomically flat Au (111) interface but rather come with some roughness (see the AFM characterizations). Once again the results were not systematically different between samples prepared at different concentrations of 16-MHDA. This analysis did not take into account the attenuation that would come from bilayers and it was assumed that the values from the literature correspond to a 100% SAM surface coverage without bilayers. The fact that the commercial C1 chip gave higher attenuation than a complete 16-MHDA SAM could be interpreted as evidence of different SAM thickness and/or chemical composition. This is further supported by the fact that the XPS analysis showed twice as many oxygen atoms per sulfur on the C1 chip than the 16-MHDA SAM we made. Moreover the ratio of oxygen atoms in O–C or in O=C bonds was 1/3 to 2/3 respectively for our surfaces whereas it was 2/3 to 1/3 for the C1 chip. This could be because of, for instance, extra –C–O–C– groups in the molecule backbone used for the C1 chip, for example an interchain anhydride [32] or the presence of –OH groups from preparation [8]. In conclusion, XPS data were consistent with the 16-MHDA stoichiometry and an SAM

Table 1 SAM surface coverage ratios estimated from the gold Au $4f_{7/2}$ XPS intensity attenuation through the SAM. The value calculated for the C1 chip is discussed in the text

	XPS experiment	Calculated	XPS experiment	XPS experiment	XPS experiment	XPS experiment
Samples:	Bare gold (no SAM)	Complete SAM [30]	1 mmol L^{-1} 16-MHDA SAM	0.1 mmol L^{-1} 16-MHDA SAM	0.02 mmol L^{-1} 16-MHDA SAM	Commercial C1 chip
Peak area (in arbitrary units)	22 680	14 427	14 727	16 644	15 365.7	10 719
Calculated SAM surface coverage	–	100%	98%	87%	94%	"135%"
Lateral packing density in the SAM (molecules nm^{-2})	–	4.67	4.58	4.06	4.39	–
Surface per 16-MHDA (Å2)	–	21.4	21.8	24.6	22.8	–

with a high surface coverage. The XPS analysis also showed the presence of unbonded –SH groups from 16-MHDA molecules linked to the SAM via a hydrogen bond with the –COOH function (Fig. 1f, g, h). If we took into account the attenuation correction of the XPS peaks corresponding to the grafted sulfur, the molecular ratio was in the range 70/30 for bound/unbound sulfur respectively. For the C1 chips we obtained a molecular ratio of 86/14 (S bound/S unbound) taking into account higher photoelectron absorption. We expected that ungrafted 16-MHDA molecules self-assembled to form bilayers and domains over the SAM. AFM experiments were carried out before and after functionalization to check the presence of such structures.

Atomic force microscopy (AFM)

All bare substrates were characterized by AFM in order to measure the root mean square roughness (RMS, denoted σ). It varied from σ=0.6±0.2 nm for 250×250 nm^2 scans to σ= 1.3±0.4 nm for 10×10 μm^2 scans (Fig. 5c). All samples compared come from the same batch of Biacore SIA Kit Au surfaces. We noticed that a batch usually contains similar substrates but that small differences in gold roughness were observed for different batches. We compared clean bare gold on a 1×1 μm^2 scale scan before (Fig. 5a) and after (Fig. 5b) 16-MHDA functionalization with a 1 mmol L^{-1} solution at 20 °C for 24 h. The surface RMS roughness decreased slightly after functionalization (0.59 versus 0.53 nm) but the surface topography did not change visually (Fig. 5c). Because the thickness of the 16-MHDA SAM was expected to be in the 16–19 Å range [18, 33, 34], we did not see evidence of an incomplete monolayer, for example pits with bare gold regions, or bilayers with upside down 16-MHDA molecules on top of the SAM (Fig. 1f, g, h). As a matter of fact, such defects would have been hard to detect using the tapping mode if their diameter was lower than 5 nm or if they had a lateral extension comparable with the gold domains seen before functionalization. Indeed, the bare gold surfaces had round-shaped domains with a height comparable with the values expected for the SAM and in-plane characteristic lengths in the range 45 to 65 nm (Fig. 5a, AFM-line). Because a high grafting ratio of 16-MHDA molecules was detected by IRRAS and XPS, AFM images looked as if the SAM was a complete layer following the bare gold topography. The scanning tunnel microscopy (STM) mode would have been more suitable for study of SAM defects such as holes with diameters below 1 nm and thus we cannot exclude their existence [15].

X-ray reflectivity and diffraction (XR, XD)

Figure 6a shows the raw specular and longitudinal reflectivity measurements of a bare sensor chip and of the same substrate after 16-MHDA SAM functionalization using a 1 mmol L^{-1} solution at room temperature. Perfect repositioning of the surface was compulsory for comparison and we checked that they overlapped at grazing incident angles including first points where half of the primary beam was hidden by sample horizon. More than twenty "Kiessig" fringes were visible before the intensity reached the longitudinal scan level. Pronounced oscillations were only expected for a very well defined gold thickness over the whole surface. After footprint correction we obtained a plateau in the total reflection region (Fig. 6b) that was slightly lower than one due to strong absorption of gold. The absorption and refraction of X-rays by gold reduces the amplitude of the first oscillations after the critical angle (α_{in}= 0.556° equivalent to q_z=0.079 $Å^{-1}$). Additionally, the instrumental resolution contributed to smearing out the oscillations over the entire q_z range but the loss of the Kiessig fringes after q_z=0.375 $Å^{-1}$ came from the roughness of the interfaces. At larger angles, specular and off-specular (longitudinal) scattering merged but were still above the instrument background. The main differences between the two measurements remained after data treatment and appeared in the form of a slight dephasing and shift of the Kiessig fringes in the presence of the SAM (zoom in Fig. 6a).

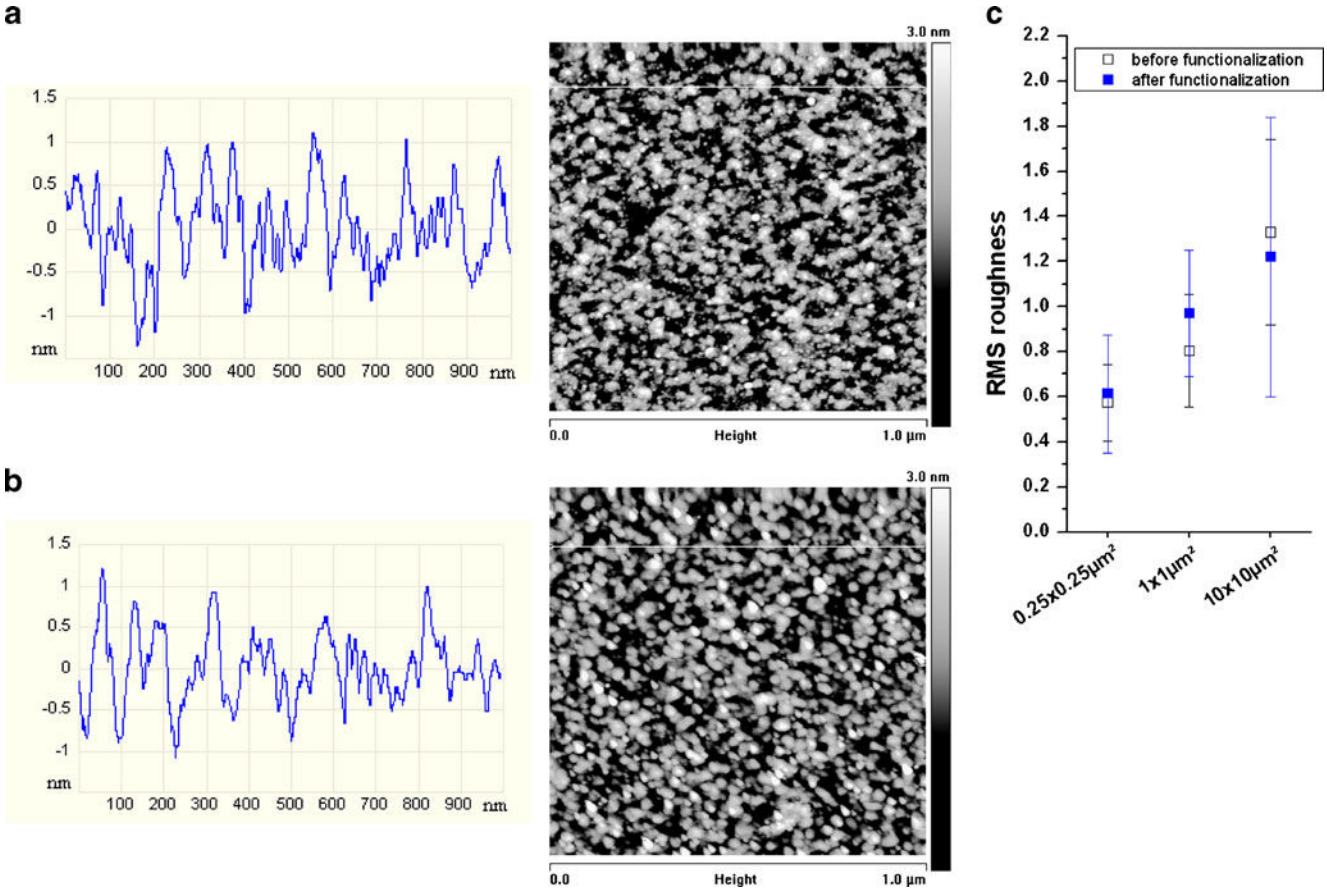


Fig. 5 AFM images (1×1 µm^2) and cross-section on a bare gold surface before (**a**) and after (**b**) functionalization by immersion in an ethanolic solution of 16-MHDA at 1 mmol L^{-1} at 20 °C for 24 h. (**c**) Root means square (RMS) roughness of bare gold surfaces (*open squares*) and functionalized surfaces (*solid squares*) showing the standard deviation obtained from several measurements from at least seven different surfaces

Good fits of the true specular reflectivity were obtained in the frame of Fresnel optics: for each sample, an index of refraction profile was built from homogeneous layers separated by rough interfaces. The profile was adjusted with the help of a finite set of data per layer: the thickness (d), the real and imaginary part of the index of refraction expressed in the form of a complex scattering length density (SLD, Re(ρb)+i Im(ρb)), and the RMS roughness (σ). The reflectivity of the

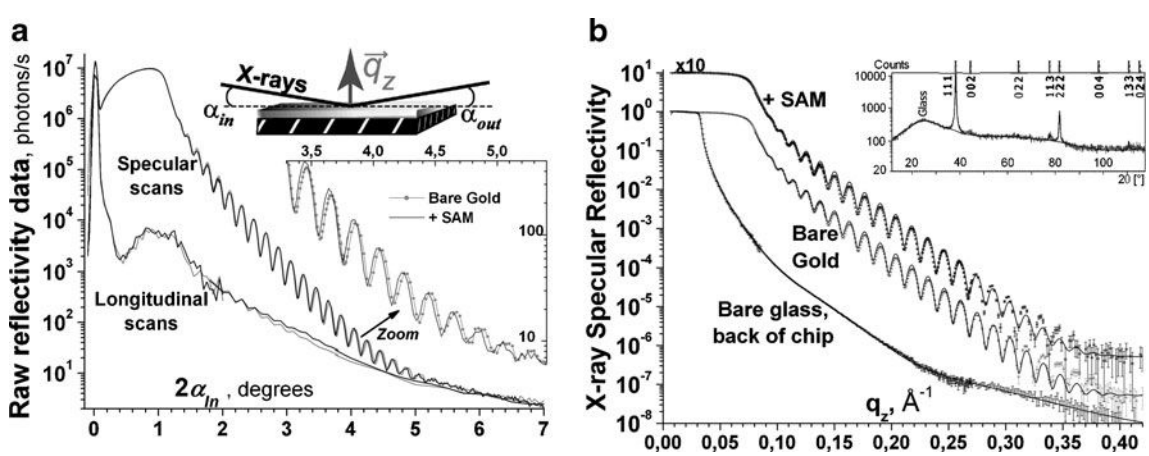


Fig. 6 (**a**) Raw X-ray reflectivity measurements obtained from specular and longitudinal scans carried out on a bare gold sensor chip and on the same substrate after grafting of a 16-MHDA SAM (1 mmol L^{-1} at 20 °C). (**b**) Corresponding true specular reflectivity curves obtained after data treatment with the best fits to the data (*solid lines*). The XR curve of the glass side is also shown. The *inset* corresponds to X-ray diffracted intensities of the bare SPR chip with the best Rietveld refinement obtained

multilayer was calculated using the Parrat's recursive algorithm [35] based on the original dynamic formalism of Airy [36] for light, and was exact when including the instrumental X-ray resolution effects. The best fit corresponds to the smaller distance between experimental and calculated data, measured in the form of the classical χ^2 function and refining the set of data with a Monte Carlo routine. A minimum value of χ^2 does not ensure that this minimum is absolute and several sets of data can give acceptable fits. Thus, we reduced the number of fitting data in the following way: we determined the glass refraction index by fitting the bare glass curve measured on the accessible back part of the chip (Fig. 6b with corresponding data in Table 2). On the back of the chip are residual traces of the polymer used to hold the surfaces in the delivery box. Thus, we had to include this pollution layer at the glass–air interface to obtain a good fit over the entire q_z range shown. Without it, we could not fit the data for q_z>0.12 Å^{-1} but we obtained the same glass properties in both cases: Re(ρb_{Sub})=22×10^{-6} Å^{-2} and Im (ρb_{Sub})=2.28×10^{-7} Å^{-2}. The real part corresponds to an electron density of 0.78 Å^{-3} (from Re(ρb_{Sub})/r_0, with r_0= 2.818×10^{-5} Å, the classical electron radius). We fixed these values for the fit of the bare gold layer from the other side of the chip and obtained a gold thickness of 417 Å with a roughness of 8 Å on both interfaces. The gold scattering length density obtained corresponded to an electron density of 4.4 Å^{-3} as expected [37]. Anchoring of gold on glass is often reinforced by use of a few nanometers of sputtered chromium or titanium. We noticed that adding such a layer did not really improve the quality of the fit, except for increasing the number of parameters to fit, because of the strong absorption of the gold layer and the poor sensitivity of the fit to the precise profile at the gold/glass interface. We did not detect such layers in the X-ray diffraction pattern either (XD inset of Fig. 6b). Angular positions of the cubic reflections are shown but the best Rietveld refinement (Philips X'Pert High Score Plus software 2.0a) indicated a Au (111) orientation with a lattice parameter a=4.082 Å that matched the literature value [37]. The bare substrate data were fixed for fitting the SAM curve and we checked that they kept similar values when floated, indicating that the gold layer was not noticeably affected by the SAMs chemistry. XD measurements performed on all samples were identical (data not shown). The best XR fit corresponded to an SAM thickness of 15.5±3 Å, an SLD of 11.7±4 10^{-6} Å^{-2} (i.e. electron density of ~0.4 Å^{-3}) in agreement with the 16.1±1.1 Å measured by Chi et al. from ellipsometry experiments [33]. The top SAM roughness (8.9±0.5 Å) followed that for the gold layer. It is worth mentioning that the reflectivity technique is a unique tool for characterizing gold layer thickness, density, and roughness, but it should not be regarded as a routine technique to investigate SAM deposition. The gold was too rough on these chips for a detailed SAM profile to be obtained. We conclude that X-ray data are in agreement with a flat 16-MHDA SAM grafted on to a Au (111) thin film of 42 nm with conformal roughness and amplitude (RMS) equal to those measured by AFM.

Evaluation of the SAM gold coverage by SPR experiments

Bovine serum albumin is strongly adsorbed by gold but does not bind significantly to a non-activated carboxylated SAM [38]. We used this protein to check if bare gold patches persisted after SAM functionalization. A significant amount of BSA was adsorbed on bare gold whereas its adsorption on the SAM–MHDA without activation of the carboxylic acid groups was negligible (Table 3) suggesting that the SAM coverage was complete. Indeed if this was not the case, BSA should have bound strongly to residual bare gold patches without activation. Activation of the carboxylic acid groups by use of EDC/NHS resulted in a small change in SPR response (100–400 RU) [7] but was not interpreted in terms of mass adsorption because the binding group is very small (ΔM≈+97 g mol^{-1} per activation; supplementary material). Activation of the carboxylic acid groups doubled the amount of BSA bound to the surface in comparison with physical adsorption on bare gold. Tang et al. [38] observed from ex-situ AFM measurements a surface coverage of BSA of 81±2% on gold and of 2±0.4% on the carboxyl SAM after immersion in an aqueous BSA solution for 1 h (2.5 mg mL^{-1}, pH 6). We used the same BSA concentration and a ten-minutes

Table 2 Best-fitting values obtained for the XR data of Fig. 6b. Values marked with an asterisk symbol were fixed during the fitting procedure

Sample	d(Å)	Re(ρb) (×10^{-6} Å^{-2})	Im(ρb) (×10^{-6} Å^{-2})	σ(Å)	d(Å)	Re(ρb) (×10^{-6} Å^{-2})	Im(ρb) (×10^{-6} Å^{-2})	σ(Å)	Re(ρb) (×10^{-6} Å^{-2})	Im(ρb) (×10^{-6} Å^{-2})	σ (Å)
Glass on back of SIA Kit Au					Traces on glass				Glass substrate		
					30±3	5.1±0.5	0.57±0.2	11±1	22±2	0.228±0.1	10.3±1
Bare SIA Kit Au					Gold thin film				Glass substrate		
					416.8±0.5	124.2±2	14.6±1	8.2±0.3	22*	0.228*	8.4±0.5
+ SAM	SAM				Gold thin film				Glass substrate		
	15.5±3	11.7±4	0.056±1	8.9±0.5	416.8*	124.2*	14.6*	8.2*	22*	0.228*	8.4*

Table 3 Calculated amounts of BSA bound to the surface after injection of a solution of BSA at 2.5 mg mL^{-1} (38 μmol L^{-1}) in 10 mmol L^{-1} sodium acetate buffer pH 4 for 10 min at 5 μL min^{-1}

Surfaces	Amount of BSA immobilized on the surface (RU)	BSA (10^{-3} molecules nm^{-2})	Mean surface available on the chip per BSA molecule (nm^2)	Surface fraction covered with BSA $\left(0 < \phi_{BSA}^{Surf} < 1\right)$
Bare gold (physical adsorption)	934	8.5	117	0.49
1 mmol L^{-1} SAM with non-activated –COOH	52.8	0.5	2000	0.03
1 mmol L^{-1} SAM with activated –COOH (covalent coupling)	1871.5	17.1	59	0.96

injection at 5 μL min^{-1}, but a more acidic buffer (10 mmol L^{-1} sodium acetate pH 4) with a pH below the BSA isoelectric point (4.8) [39]. The SAM surface thus had a very low percentage of bare gold pits large enough to enable direct adsorption on gold of the 14×4 nm^2 ellipsoid BSA molecule (covalent binding via at least one of the 35 cysteine residues of BSA). Because the SPR response is directly proportional to the mass concentration of material close to the surface, it was possible to estimate the amount of molecules adsorbed per square millimetre of the gold surface, and to calculate the fraction of surface covered with BSA $\left(\phi_{BSA}^{Surf}\right)$, assuming that each molecule occupied approximately 56 nm^2.

$$surface\ concentration\left(\frac{molecules}{mm^2}\right) = \frac{resonance\ units\ \times\ 10^{-12}}{molecular\ weight} \times Na \tag{3}$$

where Na is the Avogadro Number.

A high SAM coverage was found (monolayer, Fig. 1b, e, i), although we cannot exclude the presence of tiny gold pits smaller than the surface occupied by one BSA molecule. Ungrafted 16-MHDA molecules with one –SH group (bilayer, Fig. 1f, g, h, i) was shown to be present on dry surfaces by ex-situ IRRAS and XPS experiments but they were not revealed by AFM in the form of large bilayer surface domains and they did not capture BSA in SPR experiments. The SAM prepared from 0.02 mmol L^{-1} and 1 mmol L^{-1} 16-MHDA solutions gave identical results (less than 1% variation, data not shown). We also performed functionalization several times using a 1 mmol L^{-1} solution of 95% pure, rather than 99% pure, 16-MHDA. As a result the surface fraction coated with BSA dropped from 96% to 65% (1,276 RU of BSA immobilized) because of gold pollution from impurities [17] giving a reduced surface density of –COOH groups.

SPR binding assays on bare gold, SAM–MHDA, C1, and CM5 sensor chips

We selected two interaction types for SPR experiments, a very high-affinity interaction corresponding to the irreversible binding of a biotinylated immunoglobulin G to immobilized streptavidin, and an antigen–antibody interaction (i.e. binding of a polyclonal anti-endostatin antibody to immobilized endostatin). SPR assays were performed on bare gold and on three sensor surfaces built on the same gold thin film, namely customized SAM–MHDA (95% or 99% pure 16-MHDA), C1, and CM5 sensor chips (commercially available from GE Healthcare). In contrast with SAM–MHDA and C1, the CM5 sensor chip comprises a carboxylated dextran. After insertion of the sensor chip in the Biacore T100 system, endostatin or streptavidin were covalently immobilized on the three sensor surfaces and their partners, polyclonal anti-endostatin antibody and biotinylated IgG respectively, were injected in buffer flow through a microfluidic cartridge over the sensor chip surface. The specific binding was calculated by subtracting the binding of the polyclonal anti-endostatin antibody or of biotinylated IgG for the reference flow cells prepared without immobilized proteins (referred to as non-specific binding) from the raw signal measured for flow cells with immobilized streptavidin and endostatin.

Antigen–antibody interaction (anti-endostatin IgG/endostatin)

Endostatin was either adsorbed on the bare gold surface or was covalently immobilized in significant amounts on the activated SAM–MHDA and CM5 sensor chips. A very small amount of endostatin, if any, was covalently bound to the activated C1 sensor chip under our experimental conditions (Fig. 7a, Table 4a). This was expected, because the immobilization process is usually reduced on a C1 sensor chip compared with a CM5 sensor chip [8]. A polyclonal anti-endostatin antibody was injected over immobilized endostatin (Fig. 7b, Table 4). We calculated that 26×10^{-3} endostatin molecules nm^{-2} and 1.4×10^{-3} antibody molecules nm^{-2} (Table 5) were present on the SAM–MHDA surface (99% pure 16-MHDA) for the 162.5 nmol L^{-1} injection, giving an antibody-to-endostatin ratio of 1/20 (calculated from eq. (3) with $M_{endostatin}$=20 kDa and M_{IgG}= 160 kDa). The amount of immobilization on the C1 sensor chip was too low to calculate the IgG antibody-to-endostatin

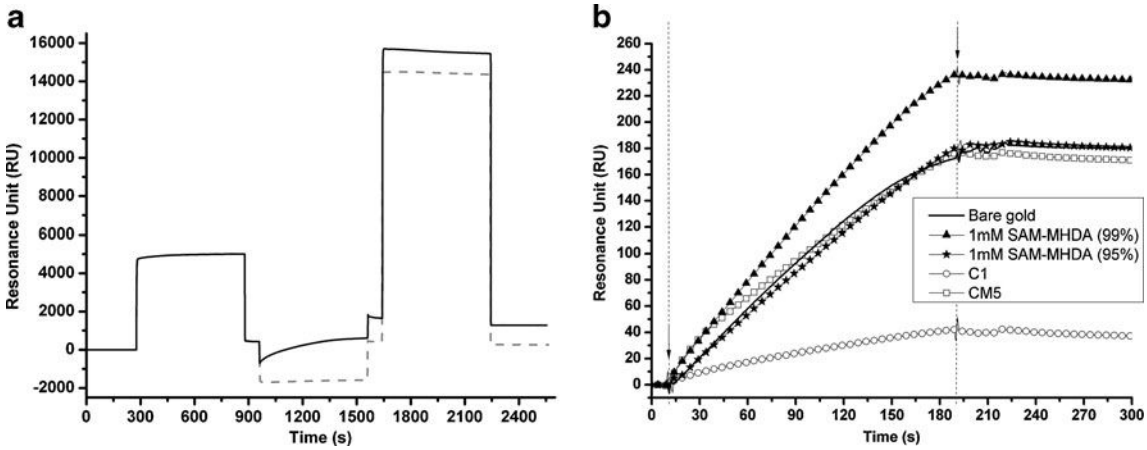


Fig. 7 (**a**) Sensorgrams obtained for covalent immobilization of endostatin on a 1 mmol L^{-1} SAM–MHDA (99% pure 16-MHDA) sensor chip (*solid line*), a control flow cell lacking endostatin (*dashed line*) including the following steps: activation of carboxylic acid groups by injection of EDC–NHS for 600 s, injection of endostatin in 10 mmol L^{-1} maleate buffer pH 6 (*solid line*) or of maleate buffer alone (*dashed line*) for 600 s, injection of 1 mol L^{-1} ethanolamine pH 8.5 for 600 s, two injections of HBS-P+for 60 s each (data not shown). All steps were performed at 5 μL min^{-1} and sharp increases in the SPR signal were because of changes in refractive index. (**b**) Injection of a polyclonal anti-endostatin antibody (162.5 nmol L^{-1}) over immobilized endostatin on different sensor chips at 30 μL min^{-1} (after subtraction of the non-specific SPR signal measured on the control flow cell). The *arrows* indicate the beginning and the end of the IgG injection

ratio. This ratio was strongly overestimated for the C1 chip, which gave no immobilization signal (Table 4), so that such calculation should only be considered when the signal-to-noise ratio is sufficient. Regeneration was performed by injecting two pulses of 10 mmol L^{-1} glycine pH 2.5 and one of 2 mol L^{-1} guanidinium chloride and 1.5 mol L^{-1} NaCl. This led to the dissociation of more than 80% of the bound antibody. Using 95% pure 16-MHDA (instead of 99%), the amount of immobilized endostatin dropped in proportion with the –COOH surface coverage measured from the BSA

Table 4 SPR binding assays. Amount of immobilized endostatin and of bound anti-endostatin antibody expressed in resonance units (RU). The bare gold measurements were performed in HBS running buffer lacking the P-20 surfactant

Sensor chip [number of measurements]	Immobilized endostatin (RU)	Specific binding of IgG antibody (RU)		Non-specific binding of the antibody to the control flow cell (RU)
		65 nmol L^{-1}, i.e. 10 μg mL^{-1}	162.5 nmol L^{-1}, i.e. 26 μg mL^{-1}	
Bare gold [×1]	323.3		178.4	62.7
1 mmol L^{-1} SAM–MHDA				
16-MHDA (99% pure) [×2]	874.7±32.5	235.0		2.7
			380.0±7.8[a]	45.9±34.9[a]
16-MHDA (95% pure) [×3]	716.57±66.6		178.93±31.72	24.6
		95.00±16.63[a]		11.9[a]
		95.97±17.04[b]		11.5[b]
C1 [×2]	–[c]		20.1	–[c]
			17.6[a]	–[c]
		4.7		–[c]
C1 2nd sensor chip [×3]	28.27±5.74		38.03±2.57	4.1
		27.07±1.54[a]		2.9[a]
CM5 [×1]	1114.0	61.9		1.6
CM5 2nd sensor chip [×3]	3284.37±112.43		164.70±25.93	3.3

[a] Values for a second injection obtained after a regeneration step

[b] Values obtained for a third injection after two regeneration steps

[c] Values too close to the baseline to be significant under these experimental conditions

Table 5 Calculated amounts of endostatin bound to the sensor chip surfaces and anti-endostatin IgG bound to immobilized endostatin (calculated from Table 4 using eq. (3) with $M_{endostatin}$=20 kDa and M_{IgG}=160 kDa)

Sensor chip [number of measurements]	Immobilized endostatin (10^{-3} molecules nm^{-2})	Captured IgG antibody (10^{-3} molecules nm^{-2})		Captured IgG antibody/ immobilized endostatin
		65 nmol L^{-1}, i.e. 10 μg mL^{-1}	162.5 nmol L^{-1}, i.e. 26 μg mL^{-1}	
Bare gold [×1]	9.73		0.67	0.069
1 mmol L^{-1} SAM–MHDA				
16-MHDA (99% pure) [×2]	26.34±0.97	0.88		0.034
			1.43±0.03[a]	0.054±0.003[a]
16-MHDA (95% pure) [×3]	21.58±2.01		0.67±0.12	0.031±0.09
		0.36±0.06[a]		0.017±0.004[a]
		0.36±0.06[b]		0.017±0.004[b]
C1 [×2]	– [c]		0.07	– [c]
			0.07[a]	– [c]
		0.02		– [c]
C1 2nd sensor chip [×3]	0.85±0.17[c]		0.14±0.01	0.174±0.047[c]
		0.10±0.01[a]		0.124±0.032[a,c]
CM5 [×1]	33.54	0.23		0.007
CM5 2nd sensor chip [×3]	98.89±3.39		0.62±0.10	0.006±0.001

[a] Values for a second injection obtained after a regeneration step

[b] Value obtained for a third injection after two regeneration steps

[c] Value not calculated, or unreliable, because of a low signal-to-noise ratio

immobilization (96% for 99% pure and 65% for 95% pure). We also achieved 80% surface regeneration for the SAM–MHDA functionalized with 95% pure 16-MHDA, with a second and a third injection that gave the same amount of bound polyclonal anti-endostatin antibody at 65 nmol L^{-1}. The non-specific binding on the SAM–MHDA was low for the first injection of antibody (~1.1% of the binding at 65 nmol L^{-1} of IgG for the 99% pure 16-MHDA; Table 4). The non-specific binding of the polyclonal antibody at 162.5 nmol L^{-1} to the sensor chip surface was 10.8% on SAM prepared with 16-MHDA of the lowest purity, 10.7% on the C1 sensor chip, but reached 35.2% of the binding on the bare gold surface.

The amount of immobilized endostatin was 27.4% and 275%, respectively, higher on the first and second CM5 chips tested than on the flat SAM–MHDA chip (Table 4). The spread of immobilization values remained small if one compares data collected for the different flow cells of a single sensor chip, but increased when considering values from different sensor chip batches. In the following text we discuss mean values calculated from flow cells on the same chip. For both CM5 sensor chips, the hydrogel resulted in

Table 6 SPR binding assays. Amount of immobilized streptavidin (3.8 μmol L^{-1}, i.e. 200 μg mL^{-1} for immobilization) and of bound biotinylated IgG (7.5 nmol L^{-1}, i.e. 1.2 μg mL^{-1} injected for 180 s at 30 μL min^{-1}) expressed in resonance units (RU). The running buffer was HBS–P+buffer containing 0.05% P20

Sensor chips [number of measurements]	Immobilized streptavidin (RU)	Specific binding of biotinylated IgG (RU)	Non-specific binding of biotinylated IgG to the reference surface (RU)
Bare gold [×1]	157.0	162.2	5.6
1 mmol L^{-1} SAM–MHDA			
with 99% pure 16-MHDA [×2]	486.5±29.1	702.2±19.0	2.3
with 95% pure 16-MHDA [×3]	317.9±83.1	442.9±63.1	3.4
C1 [×5]	460.3±95.1	402.8±145.0	5.6±4.4
CM5[×4]	5815.1±1300.2	863.8±164.5	5.8±1.5

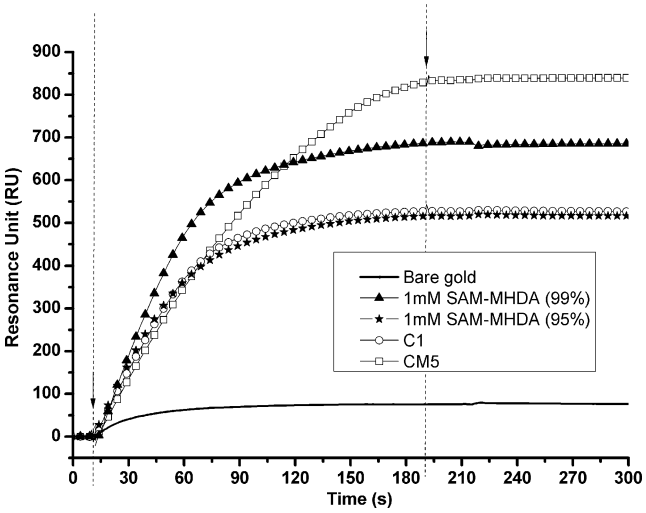


Fig. 8 Injection of a biotinylated antibody (7.5 nmol L^{-1}) over immobilized streptavidin on different chips at 30 μL min^{-1} (after subtraction of the non specific SPR signal measured on the control flow cell). The *arrows* indicate the beginning and the end of biotinylated IgG injection

more interaction sites for the IgG partners than the SAM–MHDA sensor chip, inasmuch as endostatin was immobilized in the dextran layer, farther away from the gold layer than on the SAM–MHDA sensor chip, and should thus give a lower SPR signal because of the exponential decay of the evanescent wave. As a matter of fact, the antibody bound to a lesser extent to endostatin immobilized on the CM5 sensor chip than to endostatin immobilized on the SAM–MHDA chip (ratios were 0.054±0.003 for the 99% pure 16-MHDA and 0.006±0.001 for the CM5 at 162.5 nmol L^{-1} IgG injection, Table 5). This might be because some immobilized endostatin molecules trapped within the three-dimensional dextran hydrogel were not reached by the antibody. Alternatively the covalent immobilization on the dextran layer could interfere with the recognition of endostatin by the antibody. Both surfaces gave comparable non-specific interaction signals.

A strong interaction (biotinylated IgG/streptavidin)

Streptavidin was adsorbed either on the bare gold surface or covalently immobilized on the activated SAM–MHDA, C1, and CM5 sensor chips (Table 6). Biotinylated IgG was injected over immobilized streptavidin (Fig. 8). Because the SPR signal was high for all sensor chips, we calculated the sample standard deviation using data from different sensor chips (all values used are given in the supplementary material). The amount of streptavidin immobilized on the SAM–MHDA surface (99% pure) was 5.7% higher than on the C1 chip but was only 8.4% of the amount immobilized on the CM5 sensor chip. The RU signal is expected to be approximately 10 times larger for a CM5 chip than for a C1 chip [7].

The non-specific binding of biotinylated IgG to the control surface was low for bare gold (3.45% of the specific signal), SAM–MHDA (0.32% and 0.76%, for 99% and 95% pure, respectively), C1 (1.84%), and CM5 (0.61%) chips. A higher amount of biotinylated IgG bound to streptavidin immobilized on the activated SAM–MHDA surface than to streptavidin immobilized on the activated C1 sensor chip. Using eq. (3) (with $M_{streptavidin}$=53 kDa and M_{IgG}=160 kDa), we calculated there were 5.5×10^{-3} streptavidin molecules nm^{-2} and 2.6×10^{-3} biotinylated IgG nm^{-2} on the activated SAM–MHDA surface (99% pure). On the C1 sensor chip, there were 5.2×10^{-3} streptavidin molecules nm^{-2} and 1.5×10^{-3} biotinylated IgG molecules nm^{-2}. The biotinylated IgG to streptavidin ratio was ~0.5 on the SAM–MHDA surface and ~0.28 on the C1 sensor chip. Because the SAM–MHDA and C1 sensor chips were two matrix-free activated sensor chips, the increased binding of biotinylated IgG to the SAM–MHDA surface could be because of different organization of the streptavidin layer on this surface compared with the C1 sensor chip. Note that for the SAM–MHDA prepared with 16-MHDA of lower purity, we only obtained 65% streptavidin immobilization compared with chips prepared with 99% pure MHDA as shown for immobilization of BSA (66%). Nevertheless, immobilized streptavidins kept

Table 7 Calculated amounts of streptavidin bound to the surfaces and biotinylated IgG (calculated from Table 6 values using eq.(3) with $M_{streptavidin}$=53 kDa and $M_{biotinylated\ IgG}$=16 kDa)

Sensor chips [number of measurements]	Immobilized streptavidin (10^{-3} molecules nm^{-2})	Captured biotinylated IgG (10^{-3} molecules nm^{-2})	Captured biotinylated IgG/ immobilized streptavidin
Bare gold [×1]	1.78	0.61	0.34
1 mmol L^{-1} SAM–MHDA			
16-MHDA (99% pure) [×2]	5.53±0.33	2.64±0.07	0.48±0.04
16-MHDA (95% pure) [×3]	3.61±0.95	1.67±0.24	0.47±0.19
C1 (from 2 sensor chips) [×5]	5.23±1.08	1.52±0.55	0.28±0.16
CM5 (from 2 sensor chips) [×4]	66.07±14.77	3.25±0.62	0.05±0.02

the same capture efficiency on both SAM–MHDA surfaces (0.48±0.04 compared with 0.47±0.19, Table 7).

We estimated there were 66×10^{-3} streptavidin molecules nm^{-2} immobilized on the CM5 sensor chip with carboxymethylated dextran, a 11.9-fold increase compared with the SAM–MHDA sensor chip (99% pure 16-MHDA, a 18.3-fold increase compared with the 95% pure 16-MHDA), and 3.25×10^{-3} biotinylated IgG nm^{-2}. Thus according to this calculation, only one out of twenty streptavidin molecules immobilized on the CM5 sensor chip bound to a biotinylated IgG whereas it was one out of two on the SAM–MHDA sensor chip. Biotin binds to streptavidin with very high affinity (K_D 4×10^{-14} mol^{-1} L [40]). This interaction being too strong to be dissociated, the sensor chips were used only once.

We prepared SAMs at different temperatures and using different concentrations of 16-MHDA (99% pure) because these conditions are known to affect the number and the size of bare gold domains on the surface, and SAM crystallinity [15, 17]. Functionalization performed at low (4 °C) and high temperature (70 °C) resulted in higher non-specific binding of biotinylated IgG than for SAMs prepared at 20 °C (data not shown). The non-specific binding represented 8.2% and 27.1% of the raw SPR signal at 4 °C and 70 °C—temperature of SAM preparation—respectively. Use of 0.02 mmol L^{-1} SAM resulted in lower immobilization of streptavidin (242.4 versus 486.4 RU) but a slightly higher biotinylated IgG-to-streptavidin ratio (~2/3) than the 1 mmol L^{-1} SAM (ratio ~1/2). This might be because of a change in SAM organization, in carboxylic acid groups, and streptavidin density and hence in the availability of binding sites for biotinylated IgG.

Conclusions

Sensor chips functionalized with carboxylic acid groups are widely used for SPR binding assays and are now available from several manufacturers. Use of mixed SAMs [10, 11] or grafted hydrogels [6, 7] is an efficient way to reduce non-specific interactions and to increase ligand accessibility by reducing steric hindrance effects. Our results show that a dense and flat 16-MHDA SAM made with a single molecule can be used to build a very efficient SPR chip. The SAM–MHDA sensor chips were built on commercially available bare gold supports (SIA Au kit, GE Healthcare) and compared with the matrix-free C1 sensor chip and with the CM5 sensor chip coated with a carboxymethylated dextran layer deposited on the gold support from the same company.

In contrast with most of the studies published so far, the sensor chips we tested in SPR assays are those characterized by other techniques (AFM, IRRAS, RX, XPS) and have the same gold layer and glass substrate that are known to affect the SPR measurements. We observed a packed monolayer from IRRAS measurements with the expected stoichiometry according to XPS experiments and reproducible gold surface coverage from 87 to 98%. Residual sulfhydryl groups corresponded to unbound isolated molecules rather than to bilayer domains, which were not visualized by AFM either. The low levels of BSA adsorption on the non-activated SAM excluded the presence of significant bare gold pits known to trap proteins. After EDC–NHS activation, we obtained a full coverage ratio of the immobilized BSA showing a very high capture efficiency of the activated 16-MHDA SAM. When using 16-MHDA of lower purity (95% instead of 99%), the surface BSA coverage dropped from 96% to 65% and the streptavidin or endostatin immobilization level dropped accordingly. Nevertheless, the ratio of captured analyte per ligand molecule remained similar. A higher level of immobilized streptavidin was obtained on SAM–MHDA chips (99% and 95% pure 16-MHDA) than on the matrix-free C1 chip, associated with a twofold increase in biotinylated IgG binding. The CM5 chip containing a carboxymethylated dextran layer resulted in a 12-fold increase in streptavidin immobilization, but the mean ratio of streptavidin that bound a biotinylated IgG was 1/2.1 on the SAM–MHDA chip, 1/3.6 on the C1 chip, and 1/20 on the CM5 chip. Thus, according to our results each streptavidin molecule on the flat SAM–MHDA chip bound to a greater number of biotinylated IgG than on the C1 and CM5 chips (1.7 and 10-fold increase, respectively). This was evaluated from the number of captured biotinylated IgG molecules divided by the number of specifically immobilized streptavidin molecules. The SPR data established for a dense and flat 16-MHDA SAM revealed that a high level of SPR response for analyte–ligand interactions can be achieved with a high density of coplanar immobilized ligands giving a high specific binding level of partners while maintaining a low level of non-specific interactions.

Acknowledgments This work was supported by a grant from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-07-NANO-050). The authors are grateful to V. Fernandez for his help in the XPS experiment and J-Y. Mevelec for his help in the IR microscope experiment (IMN, Nantes, France).

References

1. Liedberg B, Nylander C, Lunström I (1983) Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. Sensors Acuat 4:299–304
2. Homola J (2008) Surface Plasmon Resonance Sensors for Detection of Chemical and Biological Species. Chem Rev 108 (2):462–493
3. Stenberg E, Persson B, Roos H, Urbaniczky C (1991) Quantitative determination of surface concentration of protein with surface

plasmon resonance using radiolabeled proteins. J Colloid Interface Sci 143(2):513–526
4. Cooper MA (2006) Optical biosensors: where next and how soon? Drug Discov Today 11(23–24):1061–1067
5. Johnsson B, Löfås S, Lindquist G (1991) Immobilization of proteins to a carboxymethyldextran-modified gold surface for biospecific interaction analysis in surface plasmon resonance sensors. Anal Biochem 198(2):268–277
6. Löfås S, Johnsson B (1990) A novel hydrogel matrix on gold surfaces in surface plasmon resonance sensors for fast and efficient covalent immobilization of ligands. J Chem Soc Chem Commun 21:1526–1528
7. Biacore (Edition October 2003) Sensor Surface Handbook.
8. Karlsson R, Fält A (1997) Experimental design for kinetic analysis of protein–protein interactions with surface plasmon resonance biosensors. J Immunol Methods 200(1–2):121–133
9. Silin V, Weetall H, Vanderah DJ (1997) SPR Studies of the Nonspecific Adsorption Kinetics of Human IgG and BSA on Gold Surfaces Modified by Self-Assembled Monolayers (SAMs). J Colloid Interface Sci 185(1):94–103
10. Ayela C, Roquet F, Valera L, Granier C, Nicu L, Pugnière M (2007) Antibody–antigenic peptide interactions monitored by SPR and QCM-D: A model for SPR detection of IA-2 autoantibodies in human serum. Biosens Bioelectron 22(12):3113–3119
11. Frederix F, Bonroy K, Laureyn W, Reekmans G, Campitelli A, Dehaen W, Maes G (2003) Enhanced Performance of an Affinity Biosensor Interface Based on Mixed Self-Assembled Monolayers of Thiols on Gold. Langmuir 19(10):4351–4357
12. Ausserre D, Valignat MP (2006) Wide-field optical imaging of surface nanostructures. Nano Lett 6(7):1384–1388. doi:10.1021/nl060353h
13. Stranick SJ, Atre SV, Parikh AN, Wood MC, Allara DL, Winograd N, Weiss PS (1996) Nanometer-scale phase separation in mixed composition self-assembled monolayers. Nanotechnology 7(4):438
14. Lee JK, Kim YG, Chi YS, Yun WS, Choi IS (2004) Grafting Nitrilotriacetic Groups onto Carboxylic Acid-Terminated Self-Assembled Monolayers on Gold Surfaces for Immobilization of Histidine-Tagged Proteins. J Phys Chem B 108(23):7665–7673
15. Li L, Chen S, Jiang S (2003) Protein Adsorption on Alkanethiolate Self-Assembled Monolayers: Nanoscale Surface Structural and Chemical Effects. Langmuir 19(7):2974–2982. doi:10.1021/la0262957
16. Schreiber F (2004) Self-assembled monolayers: From 'simple' model systems to biofunctionalized interfaces. J Phys Condens Matter 16(28)
17. Arnold R, Azzam W, Terfort A, Woll C (2002) Preparation, Modification, and Crystallinity of Aliphatic and Aromatic Carboxylic Acid Terminated Self-Assembled Monolayers. Langmuir 18 (10):3980–3992
18. Mendoza SM, Arfaoui I, Zanarini S, Paolucci F, Rudolf P (2007) Improvements in the Characterization of the Crystalline Structure of Acid-Terminated Alkanethiol Self-Assembled Monolayers on Au(111). Langmuir 23(2):582–588. doi:10.1021/la0605539
19. Biacore (Edition February 2005) T100 Instrument Handbook.
20. Ricard-Blum S, Feraud O, Lortat-Jacob H, Rencurosi A, Fukai N, Dkhissi F, Vittet D, Imberty A, Olsen BR, van der Rest M (2004) Characterization of Endostatin Binding to Heparin and Heparan Sulfate by Surface Plasmon Resonance and Molecular Modeling. J Biol Chem 279(4):2927–2936. doi:10.1074/jbc.M309868200
21. Faye C, Moreau C, Chautard E, Jetne R, Fukai N, Ruggiero F, Humphries MJ, Olsen BR, Ricard-Blum S (2009) Molecular Interplay between Endostatin, Integrins, and Heparan Sulfate. J Biol Chem 284(33):22029–22040. doi:10.1074/jbc.M109.002840
22. Carraway KL, Koshland DE, Hirs CHW, Serge NT (1972) [56] Carbodiimide modification of proteins. In: Methods in Enzymology, vol Volume 25. Academic Press, pp 616–623
23. Timkovich R (1977) Detection of the stable addition of carbodiimide to proteins. Anal Biochem 79(1–2):135–143
24. Staros JV, Wright RW, Swingle DM (1986) Enhancement by N-hydroxysulfosuccinimide of water-soluble carbodiimide-mediated coupling reactions. Anal Biochem 156(1):220–222
25. Faye C, Inforzato A, Bignon M, Hartmann DJ, Muller L, Ballut L, Olsen BR, Day AJ, Ricard-Blum S (2010) Transglutaminase-2: a new endostatin partner in the extracellular matrix of endothelial cells. Biochem J 427(3):467–475. doi:10.1042/bj20091594
26. Nuzzo RG, Dubois LH, Allara DL (1990) Fundamental studies of microscopic wetting on organic surfaces. 1. Formation and structural characterization of a self-consistent series of polyfunctional organic monolayers. J Am Chem Soc 112(2):558–569. doi:10.1021/ja00158a012
27. Bain CD, Troughton EB, Tao YT, Evall J, Whitesides GM, Nuzzo RG (1989) Formation of monolayer films by the spontaneous assembly of organic thiols from solution onto gold. J Am Chem Soc 111(1):321–335
28. Castner DG, Hinds K, Grainger DW (1996) X-ray Photoelectron Spectroscopy Sulfur 2p Study of Organic Thiol and Disulfide Binding Interactions with Gold Surfaces. Langmuir 12(21):5083–5086. doi:10.1021/la960465w
29. Bain CD, Whitesides GM (1989) Attenuation lengths of photoelectrons in hydrocarbon films. J Phys Chem 93(4):1670–1673. doi:10.1021/j100341a095
30. Harder P, Grunze M, Dahint R, Whitesides GM, Laibinis PE (1998) Molecular Conformation in Oligo(ethylene glycol)-Terminated Self-Assembled Monolayers on Gold and Silver Surfaces Determines Their Ability To Resist Protein Adsorption. J Phys Chem B 102(2):426–436. doi:10.1021/jp972635z
31. Dubois LH, Zegarski BR, Nuzzo RG (1993) Molecular ordering of organosulfur compounds on Au(111) and Au(100): Adsorption from solution and in ultrahigh vacuum. J Chem Phys 98(1):678–688
32. Yan L, Marzolin C, Terfort A, Whitesides GM (1997) Formation and Reaction of Interchain Carboxylic Anhydride Groups on Self-Assembled Monolayers on Gold. Langmuir 13(25):6704–6712. doi:10.1021/la970762g
33. Chi YS, Jung YH, Choi IS, Kim YG (2005) Surface-Initiated Growth of Poly d(A-T) by Taq DNA Polymerase. Langmuir 21 (10):4669–4673
34. Peterlinz KA, Georgiadis R (1996) In Situ Kinetics of Self-Assembly by Surface Plasmon Resonance Spectroscopy. Langmuir 12 (20):4731–4740. doi:10.1021/la9508452
35. Parratt LG (1954) Surface Studies of Solids by Total Reflection of X-Rays. Phys Rev 95(2):359
36. Airy GB (1833) Phil Mag 2(20)
37. Couderc JJ, Garigue G, Lafourcade L, Nguyen QT (1959). ZMetallkd: 708
38. Tang Q, Xu C-H, Shi S-Q, Zhou L-M (2004) Formation and characterization of protein patterns on the surfaces with different properties. Synth Met 147(1–3):247–252
39. Hirayama K, Akashi S, Furuya M, K-i F (1990) Rapid confirmation and revision of the primary structure of bovine serum albumin by ESIMS and frit-FAB LC/MS. Biochem Biophys Res Commun 173 (2):639–646
40. Green M, N, Meir W, Edward AB (1990) [5] Avidin and streptavidin. In: Methods in Enzymology, vol Volume 184. Academic Press, pp 51–67

Références

1. Homola, J., Present and future of surface plasmon resonance biosensors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2003,** 377, (3), 528-539.

2. Homola, J., Surface Plasmon Resonance Sensors for Detection of Chemical and Biological Species. *Chemicals Reviews* **2008,** 108, (2), 462-493.

3. Roussille, L.; Brotons, G.; Ballut, L.; Louarn, G.; Ausserré, D.; Ricard-Blum, S., Surface characterization and efficiency of a matrix-free and flat carboxylated gold sensor chip for surface plasmon resonance (SPR). *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2011,** 401, (5), 1605-1621.

4. Wood, R. W., On a Remarkable Case of Uneven Distribution of Light in a Diffraction Grating Spectrum. *Proceedings of the Physical Society of London* **1902,** 18, (1), 269.

5. Fano, U., The Theory of Anomalous Diffraction Gratings and of Quasi-Stationary Waves on Metallic Surfaces (Sommerfeld's Waves). *Journal of the Optical Society of America* **1941,** 31, (3), 213-222.

6. Otto, A., Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection. *Zeitschrift für Physik A Hadrons and Nuclei* **1968,** 216, (4), 398-410.

7. Kretschmann, E.; Raether, H., Radiative decay of nonradiative surface plasmons excited by light. *Z. Naturforsch. A* **1968,** 23, 2135.

8. Mandenius, C.-F.; Björkman, M., Surface Plasmon Resonance Biosensor Devices. In *Biomechatronic Design in Biotechnology*, John Wiley & Sons, Inc.: 2011; pp 85-111.

9. Liedberg, B.; Nylander, C.; Lunström, I., Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. *Sensors and Actuators* **1983,** 4, 299-304.

10. Liedberg, B.; Nylander, C.; Lundström, I., Biosensing with surface plasmon resonance -- how it all started. *Biosensors and Bioelectronics* **1995,** 10, (8), i-ix.

11. Maillart, E. Developpement d'un système optique d'imagerie en résonance de plasmon de surface pour l'analyse simultanée de multiples interactionsbiomoléculaire en temps réel. Paris XI Orsay, Paris, 2004.

12. Fontana, E., Thickness optimization of metal films for the development of surface-plasmon-based sensors for nonabsorbing media. *Applied Optics* **2006,** 45, (29), 7632-7642.

13. Homola, J., On the sensitivity of surface plasmon resonance sensors with spectral interrogation. *Sensors and Actuators B: Chemical* **1997,** 41, 207-211.

14. Stenberg, E.; Persson, B.; Roos, H.; Urbaniczky, C., Quantitative determination of surface concentration of protein with surface plasmon resonance using radiolabeled proteins. *Journal of Colloid and Interface Science* **1991,** 143, (2), 513-526.

15. Roos, H., Biosensor systems and Biacore technology. In.

16. Ince, R.; Narayanaswamy, R., Analysis of the performance of interferometry, surface plasmon resonance and luminescence as biosensors and chemosensors. *Analytica Chimica Acta* **2006,** 569, (1-2), 1-20.

17. Hickel, W.; Kamp, D.; Knoll, W., Surface-plasmon microscopy. *Nature* **1989,** 339, (6221), 186-186.

18. Rothenhäusler, B.; Knoll, W., Surface-plasmon microscopy. *Nature* **1988,** 332, (6165), 615-617.

19. note BIAcore, GE Healthcare. In.

20. Rich, R. L.; Cannon, M. J.; Jenkins, J.; Pandian, P.; Sundaram, S.; Magyar, R.; Brockman, J.; Lambert, J.; Myszka, D. G., Extracting kinetic rate constants from surface plasmon resonance array systems. *Analytical Biochemistry* **2008,** 373, (1), 112-120.

21. http://www.horiba.com/scientific/products/surface-plasmon-resonance-imaging-spri/

22. http://www.ifr128.prd.fr/Images/plateau_techniques/PAP/BiacoreT100.pdf

23. Biacore, *T100 Instrument Handbook*. Edition February 2005.

24. Du, C.; Le, L.; Suihua, M.; Zhiyi, L.; Jingtao, Z.; Yonghong, H.; Zhanshan, W.; Jihua, G. In *Experimental study of the optimal metal film for surface plasmon resonance*, Eighth International Conference on Photonics and Imaging in Biology and Medicine, Wuhan, China 2009; Qingming, L.; Lihong, V. W.; Valery, V. T.; Pengcheng, L.; Ling, F., Eds. SPIE: Wuhan, China 2009; p 75190J.

25. Earp, R. L. J., Multiwavelength Surface Plasmon Resonance sensor designs for chemical and biochemical detection. In 1998.

26. Love, J. C.; Estroff, L. A.; Kriebel, J. K.; Nuzzo, R. G.; Whitesides, G. M., Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. *Chemical Reviews* **2005,** 105, (4), 1103-1169.

27. Nuzzo, R. G.; Allara, D. L., Adsorption of bifunctional organic disulfides on gold surfaces. *Journal of the American Chemical Society* **1983,** 105, (13), 4481-4483.

28. Bain, C. D.; Troughton, E. B.; Tao, Y. T.; Evall, J.; Whitesides, G. M.; Nuzzo, R. G., Formation of monolayer films by the spontaneous assembly of organic thiols from solution onto gold. *Journal of the American Chemical Society* **1989,** 111, (1), 321-335.

29. Arnold, R.; Azzam, W.; Terfort, A.; Woll, C., Preparation, Modification, and Crystallinity of Aliphatic and Aromatic Carboxylic Acid Terminated Self-Assembled Monolayers. *Langmuir* **2002,** 18, (10), 3980-3992.

30. Nedelkov, D.; Nelson, R., W. , Practical considerations in BIA/MS: optimizing the biosensor-mass spectrometry interface. *Journal of Molecular Recognition* **2000,** 13, (3), 140-145.

31. Hoare, D. G.; Koshland, D. E., Jr., A Method for the Quantitative Modification and Estimation of Carboxylic Acid Groups in Proteins. *J. Biol. Chem.* **1967,** 242, (10), 2447-2453.

32. Carraway, K. L.; Koshland, D. E.; Hirs, C. H. W.; Serge, N. T., [56] Carbodiimide modification of proteins. In *Methods in Enzymology*, Academic Press: 1972; Vol. Volume 25, pp 616-623.

33. Timkovich, R., Detection of the stable addition of carbodiimide to proteins. *Analytical Biochemistry* **1977,** 79, (1-2), 135-143.

34. Staros, J. V.; Wright, R. W.; Swingle, D. M., Enhancement by N-hydroxysulfosuccinimide of water-soluble carbodiimide-mediated coupling reactions. *Analytical Biochemistry* **1986,** 156, (1), 220-222.

35. Lahiri, J.; Ostuni, E.; Whitesides, G. M., Patterning Ligands on Reactive SAMs by Microcontact Printing. *Langmuir* **1999,** 15, (6), 2055-2060.

36. Kovacs, J.; Mayers, G. L.; Johnson, R. H.; Cover, R. E.; Ghatak, U. R., Racemization of amino acid derivatives. III. Rate of racemization and peptide bond formation of cysteine active esters. *The Journal of Organic Chemistry* **1970,** 35, (6), 1810-1815.

37. Peterlinz, K. A.; Georgiadis, R., In Situ Kinetics of Self-Assembly by Surface Plasmon Resonance Spectroscopy. *Langmuir* **1996,** 12, (20), 4731-4740.

38. Chi, Y. S.; Jung, Y. H.; Choi, I. S.; Kim, Y. G., Surface-Initiated Growth of Poly d(A-T) by Taq DNA Polymerase. *Langmuir* **2005,** 21, (10), 4669-4673.

39. Mendoza, S. M.; Arfaoui, I.; Zanarini, S.; Paolucci, F.; Rudolf, P., Improvements in the Characterization of the Crystalline Structure of Acid-Terminated Alkanethiol Self-Assembled Monolayers on Au(111). *Langmuir* **2007,** 23, (2), 582-588.

40. Tang, Q.; Xu, C.-H.; Shi, S.-Q.; Zhou, L.-M., Formation and characterization of protein patterns on the surfaces with different properties. *Synthetic Metals* **2004,** 147, (1-3), 247-252.

Chapitre III :

Mise en œuvre de la microscopie SEEC en immersion

Plan du chapitre III :

1 Principes de la microscopie SEEC 71

2 Mise en œuvre de la microscopie SEEC en immersion 78

2.1 Fabrication de surfaces adaptées à la microscopie SEEC en immersion 79

2.1.1 Etude théorique 79

2.1.2 Observation avec une lumière non polarisée (NP) 84

2.1.3 Influence de l'épaisseur du plot sur le contraste CONE 86

2.1.4 Effet de la longueur d'onde 88

2.1.5 Effet de l'absorbance de la couche déposée 94

2.2 Réalisation d'un système de microfluidique 98

2.2.1 Fabrication d'une cellule de microfluidique 98

2.2.2 Le système de pompage des solutions 101

2.2.3 Propriétés de l'écoulement obtenu au sein de la cellule de microfluidique 102

2.3 Traitement des images 105

2.3.1 Utilisation du programme de traitement d'image 106

2.3.2 Fluctuations de l'intensité de la source 106

3 Fabrication et évaluation de surfaces microstructurées 110

3.1 Impression par microcontact d'un tampon de PDMS 110

3.1.1 Fabrication d'un tampon de PDMS 110

3.1.2 Protocole d'impression de plot de 16-MHDA 111

3.1.3 Caractérisation des plots par microscopie AFM et SEEC, à l'air puis en immersion *114*

3.1.4 Evaluation par SPR du comportement biochimique des surfaces à plots *119*

4 Observations CONE en immersion 124

4.1 Effet de la polarisation de la lumière 124

4.2 Observation de plots de différentes épaisseurs 126

4.3 Dérive du signal au cours du temps 133

4.3.1 En CONE entre polariseur et analyseur croisés (P) *133*

4.3.2 En lumière non polarisée *137*

4.4 Variation de l'intensité en fonction de l'indice de réfraction des solutions : « Bulk effect » en microscopie CONE 139

4.4.1 Injections successives de solutions de glycérol *139*

4.4.2 Variation d'indice engendrée par la salinité du tampon de course entre polariseur et analyseur croisés *146*

Conclusion du chapitre III 150

Références. 152

Annexe III.1 : couche mince antireflet, calcul classique 154

Annexe III.2 : indice de réfraction de l'or en fonction de la longueur d'onde [25] 159

Annexe III.3 : indice de réfraction du glycérol 161

La microscopie SEEC est une technique qui existe depuis bientôt dix ans [1, 2]. Nous rappellerons dans un premier temps la théorie. Une seconde partie de ce chapitre sera consacrée à la mise en place de la microscopie SEEC en immersion en détaillant les étapes de fabrication des surfaces, du traitement des images et de fabrication d'une cellule de microfluidique pour les études de cinétiques *in situ*. Pour utiliser au mieux les capacités de la microscopie SEEC, nous avons réalisé des surfaces microstructurées à l'aide de tampons de PDMS. La troisième partie de ce chapitre présente la fabrication de ces surfaces ainsi que leur évaluation structurelle par AFM et fonctionnelle par SPR. La dernière partie présente les images optiques obtenues en lumière polarisée et non polarisée ainsi que les variations d'intensité observées en fonction de l'indice des solutions injectées.

1 Principes de la microscopie SEEC

La technique SEEC [1, 2] est basée sur le principe d'extinction de la lumière entre polariseur et analyseur croisés à la suite de sa réflexion sur une couche mince avant le dépôt de l'échantillon. Pour ce faire, cette surface doit posséder certaines propriétés dont celle de ne pas modifier la polarisation de la lumière lors de la réflexion.

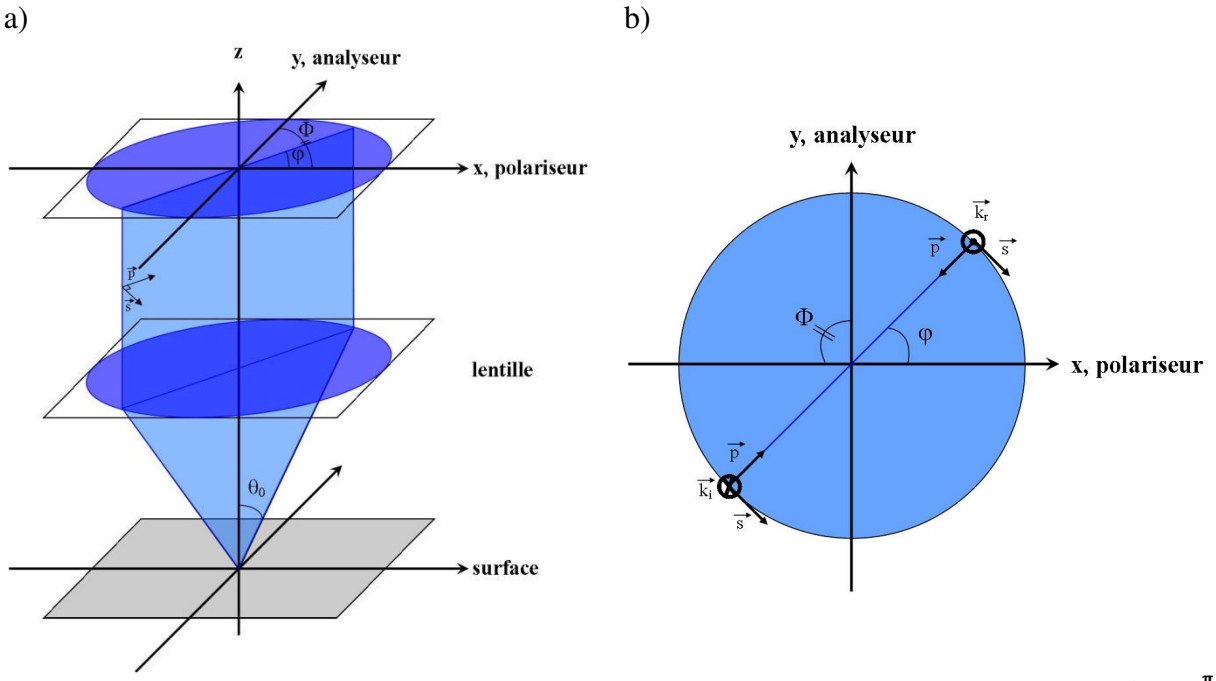


Figure III.1 : principe de fonctionnement de la microscopie SEEC : a) vue de perspective, b) vue de dessus (où $\Phi = \frac{\pi}{2}$ est l'angle entre le polariseur et l'analyseur) [2].

On note E_i le champ électrique incident avec deux composantes : l'une parallèle (E_{ip}) et l'autre perpendiculaire (E_{is}) au plan d'incidence.

$$E_i = \begin{pmatrix} E_{ip} \\ E_{is} \end{pmatrix}_{(\vec{p},\vec{s})} = \begin{pmatrix} E\cos\varphi \\ E\sin\varphi \end{pmatrix}_{(\vec{p},\vec{s})}$$ **Équation III.1**

Soit E_r le champ électrique réfléchi avec r_p et r_s les coefficients de réflexions de Fresnel en amplitude respectifs des composantes parallèle et perpendiculaire au plan de réflexion qui est identique à celui d'incidence. Puisque la surface est considérée comme isotrope, les coefficients de réflexion r_p et r_s sont les mêmes pour tous les azimuts φ. Ainsi, après réflexion sur la surface, le champ s'écrit :

$$E_r = \begin{pmatrix} r_p E\cos\varphi \\ r_s E\sin\varphi \end{pmatrix}_{(\vec{p},\vec{s})}$$ **Équation III.2**

Le champ électrique à la sortie de l'analyseur (E_a) est obtenu par la projection de E_r sur l'axe de l'analyseur faisant un angle Φ avec l'axe des x :

$$E_a = \mathrm{E}\left[\mathrm{r_p} \cos\varphi \cos(\mathrm{p_r}, \mathrm{A}) + \mathrm{r_s} \cos\varphi \cos(\mathrm{s}, \mathrm{A})\right]$$ **Équation III.3**

avec p_r,A = (p_r,x) + (x,A) = π-φ+Φ et s,A = (p_r,A) - (p_r,s) = π-φ+Φ-π/2.

soit

$$E_a = E\left[r_p \cos\varphi \cdot (-\cos(\Phi - \varphi)) + r_s \sin\varphi \cdot (-\sin(\Phi - \varphi))\right]$$ **Équation III.4**

soit

$$E_a = -E\left[r_p \cos\varphi \cos(\Phi - \varphi) + r_s \sin\varphi \sin(\Phi - \varphi)\right]$$ **Équation III.5**

Comme le polariseur et l'analyseur sont croisés, on a $\Phi = \frac{\pi}{2}$. On obtient donc :

$$E_a = -E\left(r_p + r_s\right) \cos\varphi \sin\varphi = -E\left(r_p + r_s\right) \frac{\sin 2\varphi}{2}$$ **Équation III.6**

L'intensité à la sortie de l'analyseur est donc :

$$I_a = |E_a|^2 = \frac{E^2}{4} \left|r_p + r_s\right|^2 \sin^2 2\varphi$$ **Équation III.7**

En moyennant la contribution de tous les azimuts et en utilisant $\langle \sin^2 2\varphi \rangle_\varphi = \frac{1}{2}$, on obtient :

$$I_a = \frac{E^2}{8} \left|r_p + r_s\right|^2$$ **Équation III.8**

La surface est totalement non réfléchissante si et seulement si $r_p + r_s = 0$. Pour une couche mince le coefficient de réflexion s'écrit $r_{cm} = \frac{r_{01} + r_{12}.e^{-2i\beta}}{1 + r_{01} r_{21}.e^{-2i\beta}}$ avec un déphasage $\beta = \frac{2\pi}{\lambda} nd \cos\theta$ où n est l'indice de réfraction de la couche mince et θ l'angle par rapport à la normale fait par l'onde réfractée entre le milieu incident et la couche mince (annexe III.1), soit :

$$r_{cm,p} + r_{cm,s} = \frac{r_{01,p} + r_{12,p}.e^{-2i\beta}}{1 + r_{01,p} r_{21,p}.e^{-2i\beta}} + \frac{r_{01,s} + r_{12,s}.e^{-2i\beta}}{1 + r_{01,s} r_{21,s}.e^{-2i\beta}} = \frac{N}{D} = 0$$ **Équation III.9**

Ceci revient à déterminer les conditions pour lesquelles N=0. Pour simplifier les notations, on définit les sommes et les produits entre les coefficients de réflexion tels que :

$$\Sigma_{01} = r_{01,p} + r_{01,s} \qquad \Sigma_{12} = r_{12,p} + r_{12,s}$$
$$\Pi_{01} = r_{01,p} r_{01,s} \qquad \Pi_{12} = r_{12,p} r_{12,s}$$

On peut donc écrire le numérateur de la façon suivante :

$$N = \Sigma_{01} + \Sigma_{12}(1 + \Pi_{01})e^{-2i\beta} + \Sigma_{01}\Pi_{12}\left(e^{-2i\beta}\right)^2 = 0$$ **Équation III.10**

Pour des milieux purement diélectriques, les conditions d'extinction peuvent alors s'écrire de la façon suivante :

$$\begin{cases} e^{-2i\beta} = \pm 1 \\ \Sigma_{01} + \Sigma_{01}\Pi_{12} = \mp\Sigma_{12}(1 + \Pi_{01}) \end{cases}$$ **Équation III.11**

Il existe par conséquent deux solutions mathématiques à ce système :

$$\begin{cases} e^{-2i\beta} = 1 \\ \dfrac{\Sigma_{01}}{1 + \Pi_{01}} = -\dfrac{\Sigma_{12}}{1 + \Pi_{12}} \end{cases} \quad \text{Ou} \quad \begin{cases} e^{-2i\beta} = -1 \\ \dfrac{\Sigma_{01}}{1 + \Pi_{01}} = \dfrac{\Sigma_{12}}{1 + \Pi_{12}} \end{cases}$$ **Équation III.12**

Avec les coefficients de Fresnel :

$$r_{01,p} = \frac{n_1 \cos\theta_0 - n_0 \cos\theta_1}{n_1 \cos\theta_0 + n_0 \cos\theta_1} \quad \text{Et} \quad r_{01,s} = \frac{n_0 \cos\theta_0 - n_1 \cos\theta_1}{n_0 \cos\theta_0 + n_1 \cos\theta_1}$$

on peut écrire :

$$\frac{\Sigma_{01}}{1 + \Pi_{01}} = \frac{2n_0 n_1(\cos^2\theta_0 - \cos^2\theta_1)}{2n_0 n_1(\cos^2\theta_0 + \cos^2\theta_1)} = \frac{\cos^2\theta_0 - \cos^2\theta_1}{\cos^2\theta_0 + \cos^2\theta_1}$$ **Équation III.13**

et

$$\frac{\Sigma_{12}}{1 + \Pi_{12}} = \frac{\cos^2\theta_1 - \cos^2\theta_2}{\cos^2\theta_1 + \cos^2\theta_2}$$ **Équation III.14**

La **<u>première solution</u>** devient donc:

$$\begin{cases} e^{-2i\beta} = 1 \\ \dfrac{\cos^2\theta_0 - \cos^2\theta_1}{\cos^2\theta_0 + \cos^2\theta_1} = -\dfrac{\cos^2\theta_1 - \cos^2\theta_2}{\cos^2\theta_1 + \cos^2\theta_2} \end{cases}$$ **Équation III.15**

La première équation donne 2β = 2πm (avec m entier), soit $\frac{2\pi}{\lambda} n_1 d \cos\theta_1 = m\pi$ d'où une épaisseur de la couche $d = m\frac{\lambda}{2n_1\cos\theta_1}$.

La seconde équation quant à elle donne :

$$(\cos^2\theta_0 - \cos^2\theta_0)(\cos^2\theta_1 + \cos^2\theta_2) = -(\cos^2\theta_1 - \cos^2\theta_2)(\cos^2\theta_0 + \cos^2\theta_1)$$

Après développement et simplification, la seconde équation peut s'écrire tout simplement :

$$\cos^2\theta_0 = \cos^2\theta_2$$

Ceci revient à avoir des indices identiques pour les deux milieux extrêmes $n_0 = n_2$ ce qui n'est généralement pas le cas.

La **<u>seconde solution</u>** peut quant à elle s'écrire :

$$\begin{cases} e^{-2i\beta} = -1 \\ \dfrac{\cos^2\theta_0 - \cos^2\theta_1}{\cos^2\theta_0 + \cos^2\theta_1} = \dfrac{\cos^2\theta_1 - \cos^2\theta_2}{\cos^2\theta_1 + \cos^2\theta_2} \end{cases}$$ **Équation III.16**

La première équation donne 2β = π(2m+1) (avec m entier), d'où une couche d'épaisseur $d = \left(m + \frac{1}{2}\right)\frac{\lambda}{2n_1\cos\theta_1}$.

soit exprimée par rapport à l'angle d'incidence θ_0 :

$$dn_1 \cos\theta_1 = d\sqrt{{n_1}^2 - {n_1}^2 \sin^2\theta_1} = \left(m + \frac{1}{2}\right)\frac{\lambda}{2}$$ **Équation III.17**

soit en appliquant la relation de Snell-Descartes ($n_1 \sin\theta_1 = n_0 \sin\theta_0$) :

$$d\sqrt{{n_1}^2 - {n_0}^2 \sin^2\theta_0} = \left(m + \frac{1}{2}\right)\frac{\lambda}{2}$$ **Équation III.18**

La seconde équation quant à elle donne :

$$(\cos^2\theta_0 - \cos^2\theta_1)(\cos^2\theta_1 + \cos^2\theta_2) = (\cos^2\theta_1 - \cos^2\theta_2)(\cos^2\theta_0 + \cos^2\theta_1)$$

Après développement et simplification, la seconde équation peut s'écrire tout simplement :

$$\cos^4\theta_1 = \cos^2\theta_0 \cos^2\theta_2$$ **Équation III.19**

La relation de Snell-Descartes nous permet d'écrire :

$$(1 - \sin^2\theta_1)^2 = \left(1 - \frac{{n_1}^2 \sin^2\theta_1}{{n_0}^2}\right)\left(1 - \frac{{n_1}^2 \sin^2\theta_1}{{n_2}^2}\right)$$ **Équation III.20**

Si on pose $X^2 = {n_0}^2 \sin^2\theta_0 = {n_1}^2 \sin^2\theta_1 = {n_2}^2 \sin^2\theta_2$, on obtient :

$$\left(1 - \frac{X^2}{{n_1}^2}\right)^2 = \left(1 - \frac{X^2}{{n_0}^2}\right)\left(1 - \frac{X^2}{{n_2}^2}\right)$$ **Équation III.21**

soit en développant

$$X^4\left(\frac{1}{{n_1}^4} - \frac{1}{{n_0}^2{n_2}^2}\right) + X^2\left(\frac{1}{{n_0}^2} + \frac{1}{{n_2}^2} - \frac{2}{{n_1}^2}\right) = 0$$ **Équation III.22**

En excluant le cas d'une incidence selon la normale où X = 0, il reste :

$$\frac{2}{{n_1}^2} - \frac{1}{{n_2}^2} - \frac{1}{{n_0}^2} = X^2\left(\frac{1}{{n_1}^4} - \frac{1}{{n_0}^2{n_2}^2}\right) = {n_0}^2 \sin^2\theta_0\left(\frac{1}{{n_1}^4} - \frac{1}{{n_0}^2{n_2}^2}\right)$$ **Équation III.23**

soit

$$2{n_1}^2 - {n_1}^4\left(\frac{1}{{n_0}^2} + \frac{1}{{n_2}^2}\right) = {n_0}^2 \sin^2\theta_0 - \frac{{n_1}^4 \sin^2\theta_0}{{n_2}^2}$$ **Équation III.24**

On obtient ainsi une équation du second degré en n_1^2 :

$${n_1}^4\left(\frac{1}{{n_0}^2} + \frac{\cos^2\theta_0}{{n_2}^2}\right) - 2{n_1}^2 + {n_0}^2 \sin^2\theta_0 = 0$$ **Équation III.25**

Cette équation du second degré a pour discriminant :

$$\Delta = 4 - 4\left(\frac{1}{{n_0}^2} + \frac{\cos^2\theta_0}{{n_2}^2}\right){n_0}^2 \sin^2\theta_0 = 4\left(\cos^2\theta_0 - \frac{{n_0}^2}{{n_2}^2}\sin^2\theta_0 \cos^2\theta_0\right)$$

Dans le cas où $n_0 \leq n_2$ et $0 \leq \theta_0 \leq \frac{\pi}{2}$, le discriminant est positif. Par conséquent, la seule solution possible pour $n_1^2 > 0$ est :

$${n_1}^2 = \frac{2 + 2\sqrt{\cos^2\theta_0 - \frac{{n_0}^2}{{n_2}^2}\sin^2\theta_0 \cos^2\theta_0}}{2\left(\frac{1}{{n_0}^2} + \frac{\cos^2\theta_0}{{n_2}^2}\right)}$$ **Équation III.26**

soit :

$${n_1}^2 = \frac{{n_0}^2{n_2}^2 + {n_0}^2\sqrt{{n_2}^4\cos^2\theta_0 - {n_2}^2{n_0}^2\sin^2\theta_0\cos^2\theta_0}}{{n_2}^2 + {n_0}^2\cos^2\theta_0}$$ **Équation III.27**

ce qui revient à :

$${n_1}^2 = {n_0}^2\frac{{n_2}^2 + \sqrt{{n_2}^2\cos^2\theta_0\,({n_2}^2 - {n_0}^2\sin^2\theta_0)}}{{n_2}^2 + {n_0}^2\cos^2\theta_0}$$ **Équation III.28**

En conclusion, en microscopie SEEC, la couche d'indice n_1 doit répondre aux deux conditions suivantes pour qu'il y ait extinction de la lumière entre polariseur et analyseur croisés.

$$\begin{cases} d\sqrt{{n_1}^2 - {n_0}^2 \sin^2\theta_0} = \left(m + \frac{1}{2}\right)\frac{\lambda}{2} \\ {n_1}^2 = {n_0}^2 \frac{{n_2}^2 + \sqrt{{n_2}^2 \cos^2\theta_0 \left({n_2}^2 - {n_0}^2 \sin^2\theta_0\right)}}{{n_2}^2 + {n_0}^2 \cos^2\theta_0} \end{cases}$$

Équation III.29

Il faut noter que cette solution est obtenue pour un angle d'incidence θ_0 quelconque.

La théorie présentée ci-dessus est valide aussi bien pour la microscopie SEEC à l'air que pour la microscopie SEEC en immersion.

Comme nous l'avons précisé plus haut, ces développements ne sont valides que pour des milieux purement diélectriques. Avec des couches métalliques dont l'indice de réfraction présente une partie imaginaire (couches d'or par exemple), la résolution de l'Équation III.10 est plus complexe. Nous avons donc adopté une approche numérique qui n'est pas détaillée dans cette thèse. Ce travail théorique a été mené par Dominique Ausserré.

2 Mise en œuvre de la microscopie SEEC en immersion

Dans des études précédentes, la technique SEEC a été mise en œuvre à l'air, notamment sur des surfaces de silicium recouvertes d'une couche de silice de 106 nm d'épaisseur. L'une de ces études a montré que la technique était capable de détecter des interactions spécifiques peptide/anticorps et de lire des biopuces dans l'air [3].

Dans ce travail de thèse, nous cherchons à évaluer les possibilités d'utiliser la technique SEEC pour l'étude d'interactions entre biomolécules en solution et biomolécules attachées à des surfaces. Nous nous sommes imposés comme contrainte de travailler avec une

couche finale d'or afin de pouvoir reproduire une chimie identique à celle des surfaces SPR. Il sera ainsi possible de comparer les capacités du SEEC avec celle de la SPR.

Les surfaces d'or utilisées sont soit homogènes (nues ou modifiées) soit de type biopuces (avec des plots et un fond). Les observations sont effectuées avec un microscope optique travaillant :

1. Soit en géométrie droite à l'air. Cela implique un séchage des échantillons après contact avec la solution.
2. Soit en géométrie inversée et en immersion. Cette géométrie présente deux avantages : on peut installer un système de fluidique et on s'affranchit des inconvénients du séchage.

Nous nous intéressons au second cas.

2.1 Fabrication de surfaces adaptées à la microscopie SEEC en immersion

2.1.1 Etude théorique

Notre premier objectif était de mettre en œuvre la technique SEEC sur des surfaces d'or observées en géométrie inversée. Pour une longueur d'onde donnée, le point de fonctionnement SEEC correspond aux valeurs de l'angle d'incidence θ et de l'épaisseur e_1 de la couche d'or pour lesquelles le contraste C entre l'image d'une couche organique très mince et celle de la surface nue devient maximum, c'est-à-dire théoriquement égal à 100 %.

$$C = \frac{I_o - I_f}{I_o + I_f} = \frac{\Delta I}{I_o + I_f}$$ **Équation III.30**

avec I_o l'intensité de l'objet et I_f l'intensité du fond.

Dans la suite, les caractéristiques de la couche organique sont choisies arbitrairement. Par défaut, son épaisseur est de 1 nm et la valeur de son indice optique est 1,4.

La Figure III.2 montre comment le contraste C de cet objet varie avec θ et e_1. La longueur d'onde utilisée est 630 nm (rouge). L'indice du verre et de l'or sont respectivement fixés à 1,51 et 0,3 + 3,2j. Il existe un point de fonctionnement SEEC tel que C = 1, obtenu pour θ = 64deg. et e_1 = 22 nm.

a) b)

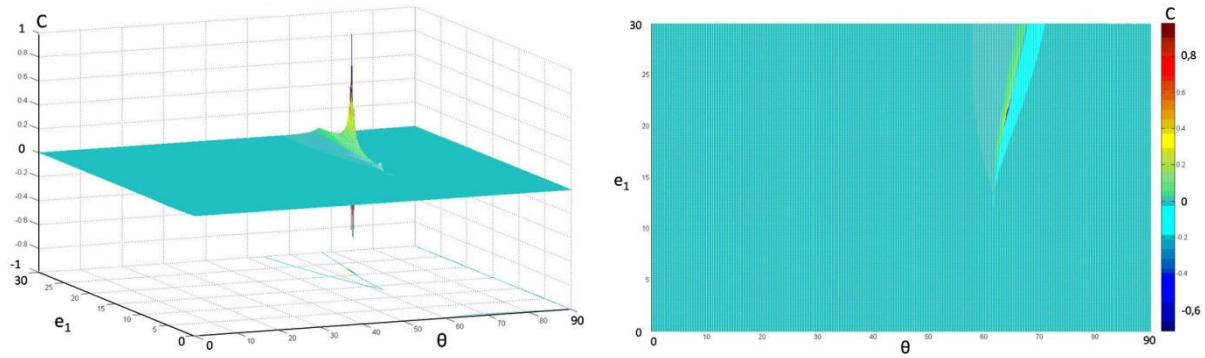


Figure III.2 : courbes théoriques du contraste SEEC en fonction de l'angle d'incidence et de l'épaisseur (e_1) de la couche d'or.

L'angle est très élevé, ce qui conduit à utiliser des objectifs à très grande ouverture numérique. L'optimum de contraste vaut pour un angle d'incidence unique qui peut être sélectionné avec un diaphragme d'ouverture annulaire, réalisé par exemple au moyen d'un masque mais ce contraste se dégrade très vite quand on élargit la plage des incidences délivrées par l'éclairage, c'est-à-dire la largeur de cet anneau. La Figure III.3 présente la variation du contraste avec l'épaisseur d'or lorsque l'anneau sélectionne une plage d'incidences de largeur 5 deg. prise entre 60 et 65 deg. Le pic de contraste SEEC est tombé au-dessous de 6.10^{-3}.

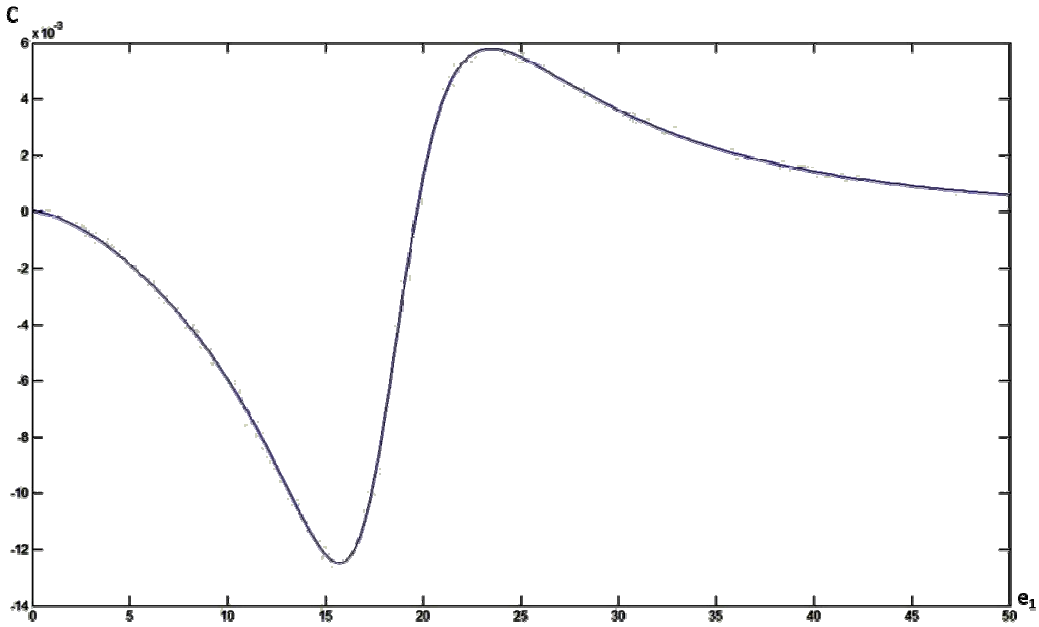


Figure III.3 : courbes de contraste théoriques SEEC en fonction de l'épaisseur de la couche d'or, avec un éclairage annulaire de 5deg..

Pour conserver un bon contraste, il faut donc garder cette plage angulaire très étroite ; de l'ordre de 1 ou 2 degrés. Or, la technique SEEC étant une technique d'extinction, le flux sortant de l'analyseur est très faible. Le diaphragme en anneau étroit, qui n'est qu'un masque, réduirait encore ce flux d'un facteur très important et l'intensité de l'image deviendrait trop faible pour travailler. Il est donc impossible de mettre en œuvre la technique SEEC en immersion dans la configuration inversée à moins de construire un éclairage spécifique, ce qui représente une modification instrumentale importante. Cette modification très lourde a été entreprise en parallèle avec le travail des deux premières années de thèse, consacrées à la mise au point des modifications chimiques des surfaces par greffage de 16-MHDA et à la réalisation des expériences SPR de référence sur 3 systèmes biologiques : BSA, Streptavidine/IgG biotinylée et endostatine/IgG (anticorps/antigène). Un autre calcul effectué par Dominique Ausserré pendant cette période a permis d'identifier une autre configuration optique intéressante, qui échappe à la définition du contraste SEEC, mais qui apporte de fait un contraste comparable dans des conditions instrumentales extrêmement simples. La

description de cette configuration s'appuie sur la Figure III.4. Nous l'appellerons méthode CONE dans la suite de ce document afin de la différencier du SEEC.

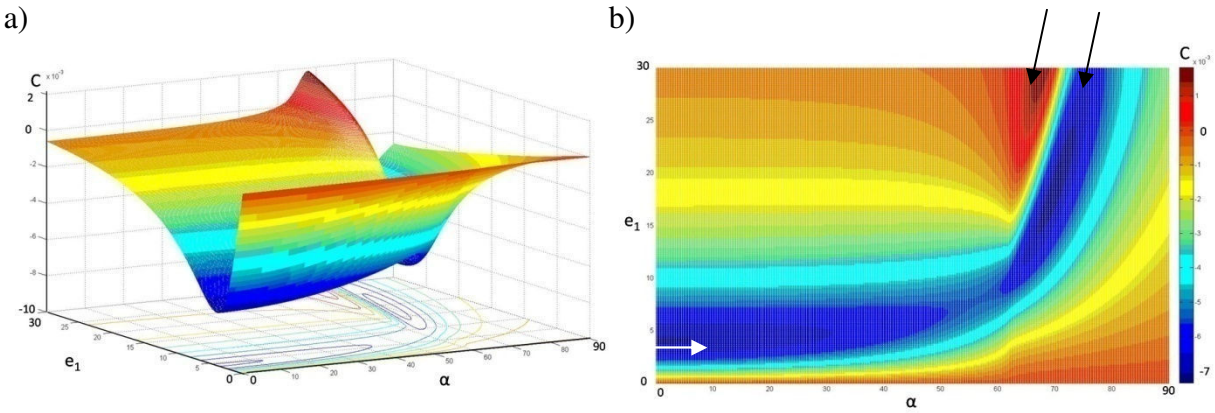


Figure III.4 : courbes théoriques CONE a) 3D et b) vue de dessus.

La Figure III.4 montre comment le contraste varie en fonction de deux paramètres (α et e_1), le premier représentant l'angle d'ouverture du faisceau d'éclairage. L'échantillon n'est donc plus éclairé à une incidence fixe, mais simultanément sous tous les angles compris entre 0 et α. Le second paramètre est toujours l'épaisseur de la couche d'or en nm. On remarque deux régions très intéressantes, soulignées par des flèches sur la Figure III.4. La première (flèches noires) montre la trace du point de fonctionnement SEEC, altéré par la superposition des incidences. Le contraste y reste inférieur à 2.10^{-3} quand il est positif et atteint – 7.10^{-3} quand il est négatif (soit + 0,2 % et – 0,7 %). La seconde (flèche blanche) montre la nouvelle région d'intérêt. Il s'agit d'une zone correspondant typiquement à l'intervalle ([α], [e_1]) = ([0 deg., 40 deg.], [2 nm, 7 nm]) dans laquelle le contraste est négatif et de module supérieur ou égal à 6.10^{-3}. **Cette zone présente la très grande particularité d'être pratiquement parallèle à l'axe des α, ce qui signifie qu'elle permet de travailler avec une ouverture quelconque pourvu qu'elle soit inférieure à 40 deg. sans affecter la valeur du contraste.**

SEEC vs CONE :

- Le contraste SEEC est meilleur que le contraste CONE, mais très difficile à mettre en œuvre.
- Le meilleur point de fonctionnement pour le contraste CONE est très différent du meilleur point de fonctionnement pour le contraste SEEC. Il se situe dans une vallée du plan (α, e_1) qui correspond à des épaisseurs d'or très faibles et qui est parallèle à l'axe des α.

Les paramètres choisis pour ces calculs sont résumés dans le Tableau III.1:

Couche	Verre	Or	Objet
Indice réel	1,51	0,3	1,4
Indice imaginaire	0	3,2	0
Epaisseur	-	Variable	1

Tableau III.1 : paramètres des couches utilisés pour les calcules aboutissants aux figures précédentes.

En pratique, nous avons travaillé avec une couche d'or d'épaisseur 7 nm. La Figure III.5 montre comment varient les contrastes SEEC et CONE de la couche organique en fonction de l'incidence unique θ dans le premier cas et de l'ouverture numérique α dans le second.

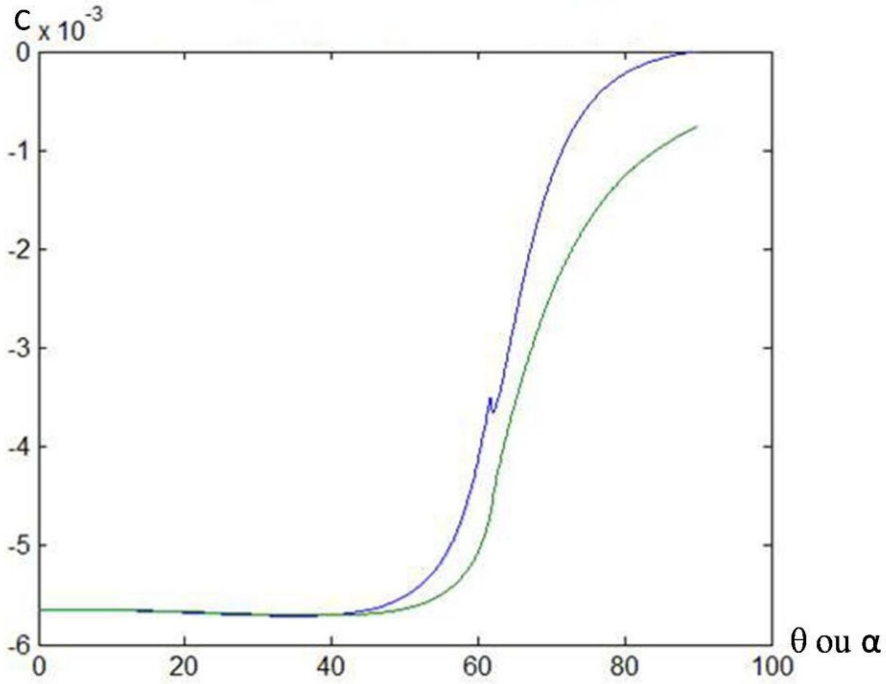


Figure III.5 : courbes de contrastes SEEC en bleu (en fonction de θ) et CONE en vert (en fonction de α) pour une épaisseur d'or de 7 nm.

Pour de telles épaisseurs d'or, le contraste est aussi bon avec l'éclairage conique qu'à angle fixe, mais l'intensité lumineuse est très supérieure. Le contraste est remarquablement indépendant de l'ouverture du faisceau sur la gamme de 0 à 50 deg., ce qui permet de travailler sans précautions particulières avec toutes les ouvertures courantes. Nous avons donc choisi de travailler dans cette configuration.

2.1.2 Observation avec une lumière non polarisée (NP)

Nous avons découvert expérimentalement que ces surfaces se révélaient également très sensibles en lumière non polarisée. Cette découverte est confirmée par le calcul, comme le montrent les Figure III.6 et Figure III.7. Elles ont été obtenues avec les mêmes paramètres que précédemment. Ce sont les équivalents des Figure III.2 et Figure III.4 pour une lumière non polarisée.

a) b)

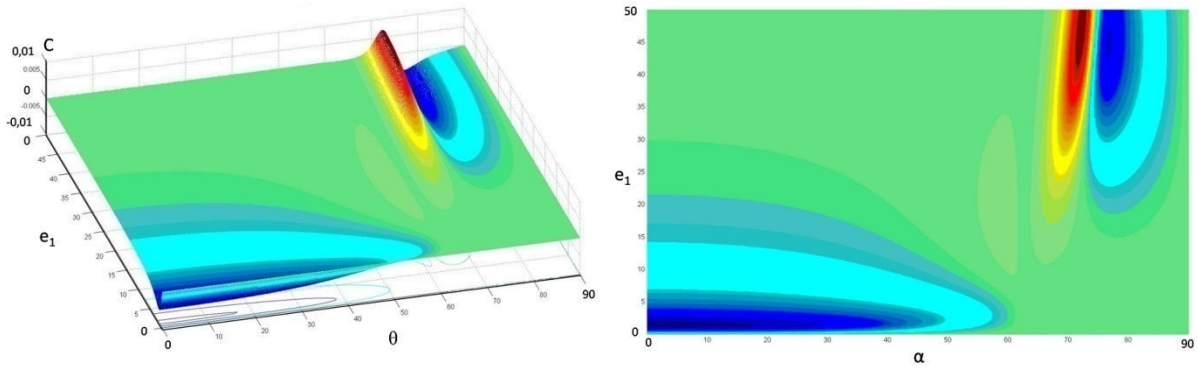


Figure III.6 : contraste à angle d'incidence unique en lumière non polarisée en fonction de l'épaisseur d'or (e_1).

a) b)

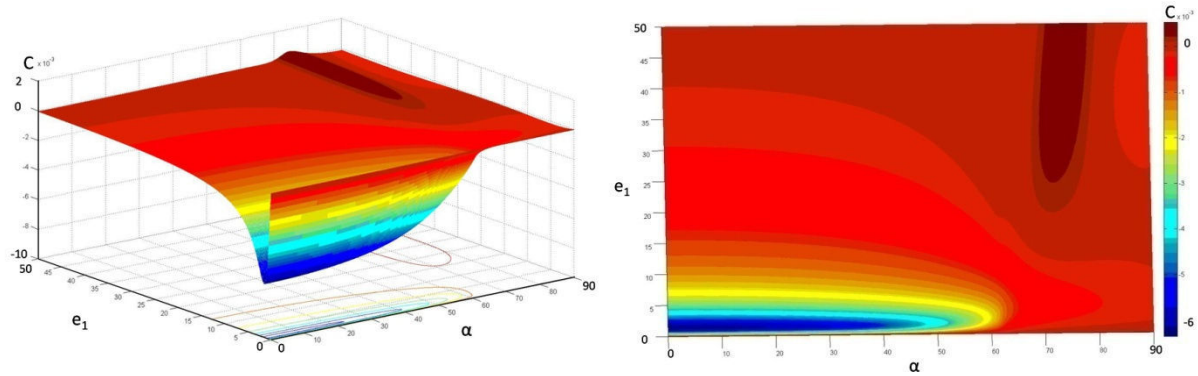


Figure III.7 : courbe de contraste CONE en lumière non polarisée en fonction de l'ouverture numérique (α) et de l'épaisseur de la couche d'or.

La Figure III.8 est l'équivalent de la Figure III.5 pour une lumière non polarisée.

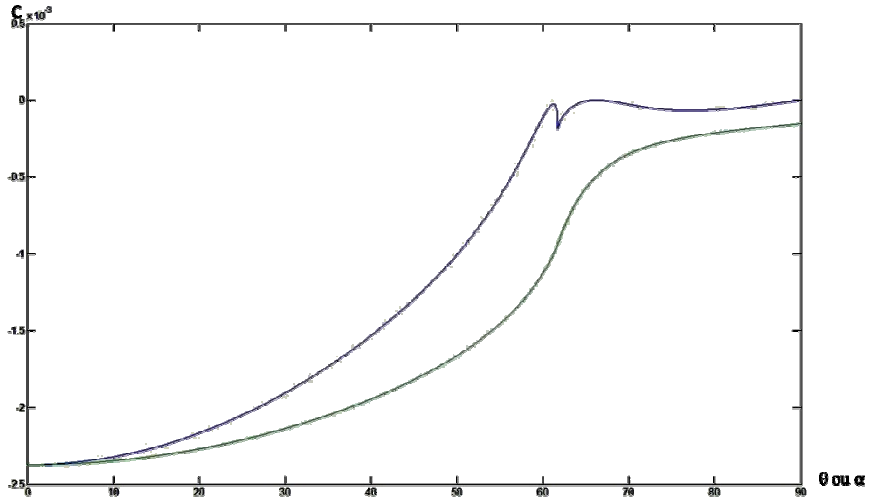


Figure III.8 : courbes de contrastes SEEC (en fonction de *θ*) et CONE (en fonction de *α*) en lumière non polarisée pour une épaisseur d'or de 7 nm.

Qu'il s'agisse d'une lumière polarisée ou non polarisée, la configuration choisie conduit donc toujours à un contraste négatif.

- Contraste CONE toujours négatif quel que soit l'éclairage utilisé (polarisé ou non).
- Bon contraste CONE en lumière non polarisée
- Faible dépendance du contraste CONE avec l'ouverture numérique.

2.1.3 Influence de l'épaisseur du plot sur le contraste CONE

La Figure III.9 montre comment varie le contraste CONE d'un plot d'indice 1,464 (indice de réfraction du 16-MHDA [4]) avec son épaisseur entre 0 et 4 nm en lumière polarisée, en considérant toujours une couche d'or de 7 nm d'épaisseur. **Cette variation est linéaire et pratiquement indépendante de l'ouverture du microscope.** La pente est de $-1{,}125.10^{-2}$/nm. Rappelons que la sensibilité de la SPR est typiquement de 1 000 RU/nm. La sensibilité de notre technique sera donc comparable à celle de la SPR si nous détectons des variations de contraste de l'ordre de 10^{-5}.

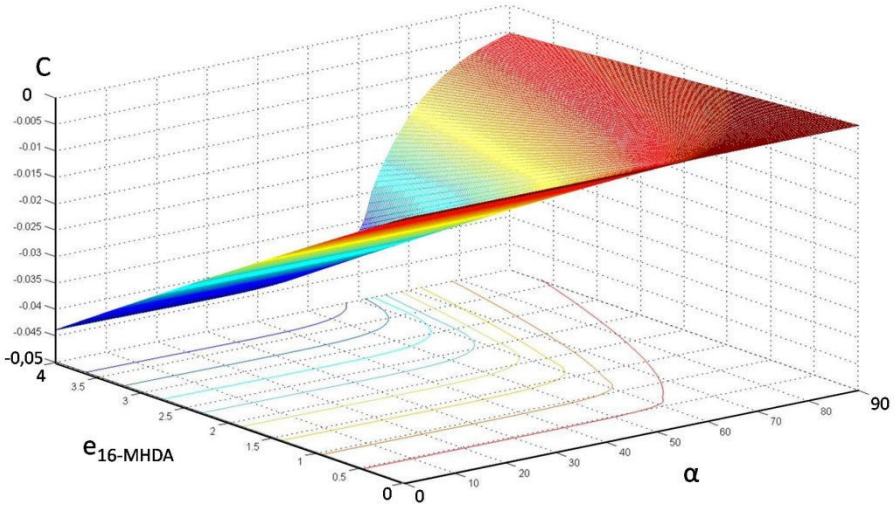


Figure III.9 : variation du contraste d'un plot organique d'indice 1,464 (indice de réfraction identique à celui des molécules de 16-MHDA) en fonction de l'épaisseur du plot et de l'ouverture numérique avec une lumière polarisée.

Le Tableau III.2 résume les paramètres utilisés pour tracer les figures précédentes.

Couche	Verre	Or	Objet
Indice réel	1,51	0,3	1,464
Indice imaginaire	0	3,2	0
Epaisseur (nm)	-	7	Variable

Tableau III.2 : paramètre utilisé pour les calculs aboutissants aux figures précédentes.

La Figure III.10 donne la même information pour une même épaisseur d'or en lumière non polarisée.

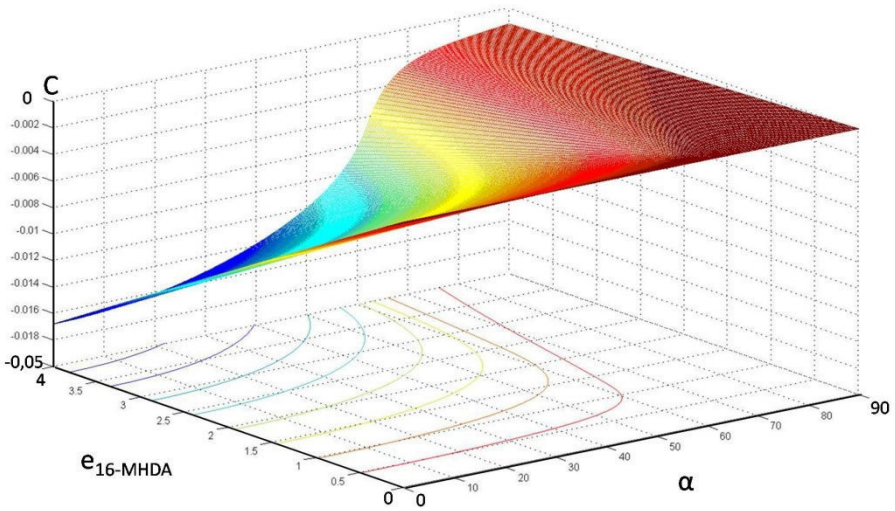


Figure III.10 : variation du contraste d'un plot d'indice 1,464 en fonction de l'épaisseur du plot organique et de l'ouverture numérique avec une lumière non polarisée.

Cette variation est typiquement deux fois plus faible et chute avec l'ouverture, mais l'intensité lumineuse sur la caméra est beaucoup plus grande, ce qui permet de gagner en simplicité de réglage, en rapidité d'acquisition (facilitant l'enregistrement de cinétiques) et en rapport signal/bruit à la détection.

Il ressort des Figure III.9 et Figure III.10 que le contraste d'un plot est pratiquement une fonction linéaire de son épaisseur. Si ce plot capture des molécules biologiques de même

indice, on s'attend donc à ce que tout se passe comme si le plot avait changé d'épaisseur. Le plot que nous imaginons est le spot d'une biopuce.

- Variation linéaire du contraste CONE en fonction de l'épaisseur du plot avec une lumière polarisée ou non.

2.1.4 Effet de la longueur d'onde

L'indice de l'or est très variable dans le visible et on s'attend donc à ce que les courbes des Figure III.9 et Figure III.10 soient très dépendantes de la longueur d'onde. Comme l'effet de la longueur d'onde est double (calibration des épaisseurs optiques et changement de l'indice de réfraction), nous utilisons un artifice qui consiste à changer cet indice sans changer la longueur d'onde de travail. Cette longueur d'onde sera modifiée dans une seconde étape. Les Figure III.11 et Figure III.12 sont à comparer aux Figure III.9 et Figure III.10 pour une longueur d'onde de 630 nm et un indice de l'or $n = 0,6 + 2,12j$ qui correspondrait à $\lambda = 516,62$ nm (couleur verte) selon la base de donnée SOPRA (Annexe III.2, [5]).

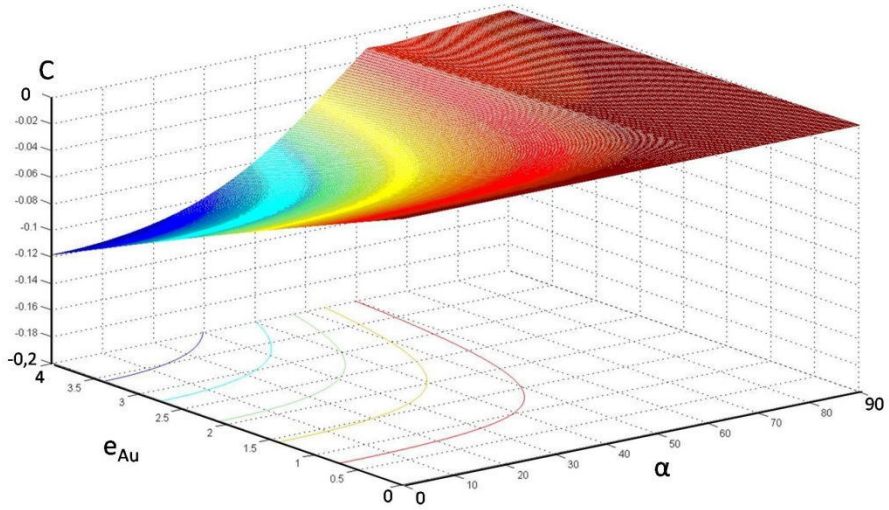


Figure III.11 : Contraste CONE du plot en lumière polarisée en fonction de l'ouverture du cône et de l'épaisseur du plot organique pour n_{Au} = 0,6 + 2,12j et e_{Au} = 7 nm.

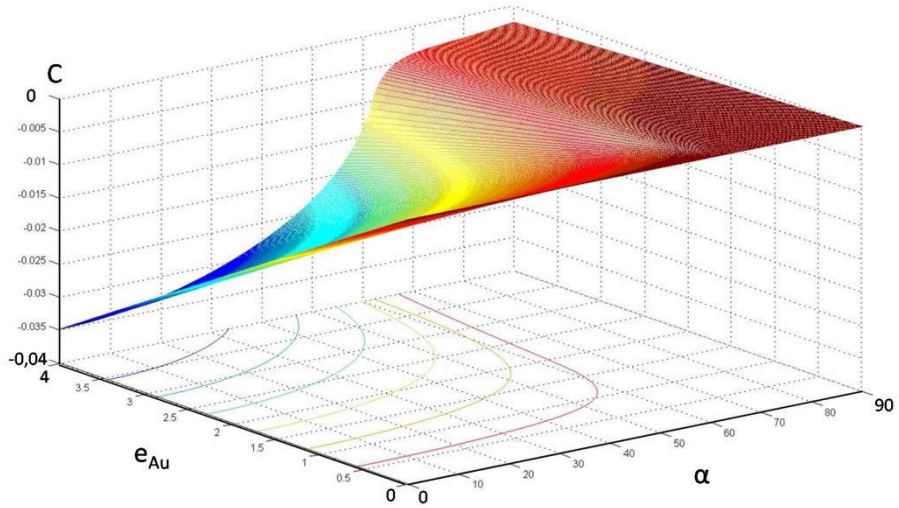


Figure III.12 : Contraste CONE du plot en lumière non polarisée en fonction de l'ouverture du cône α et de l'épaisseur du plot organique.

Par rapport à la situation précédente, les choses sont inversées. La sensibilité la plus grande est maintenant obtenue en lumière non polarisée mais cette variation importante de l'indice de l'or ne modifie pas la conclusion essentielle qui est la (quasi)linéarité du contraste, qui semble toujours négatif, avec l'épaisseur du plot.

La Figure III.13 montre l'évolution du contraste d'un plot avec l'ouverture numérique pour e_1 = 7 nm et n_1 = 0,2 + 2,12j à 630 nm. Cette courbe vaut donc en fait pour λ = 515 nm et e_1 = 515/630 x 7 nm.

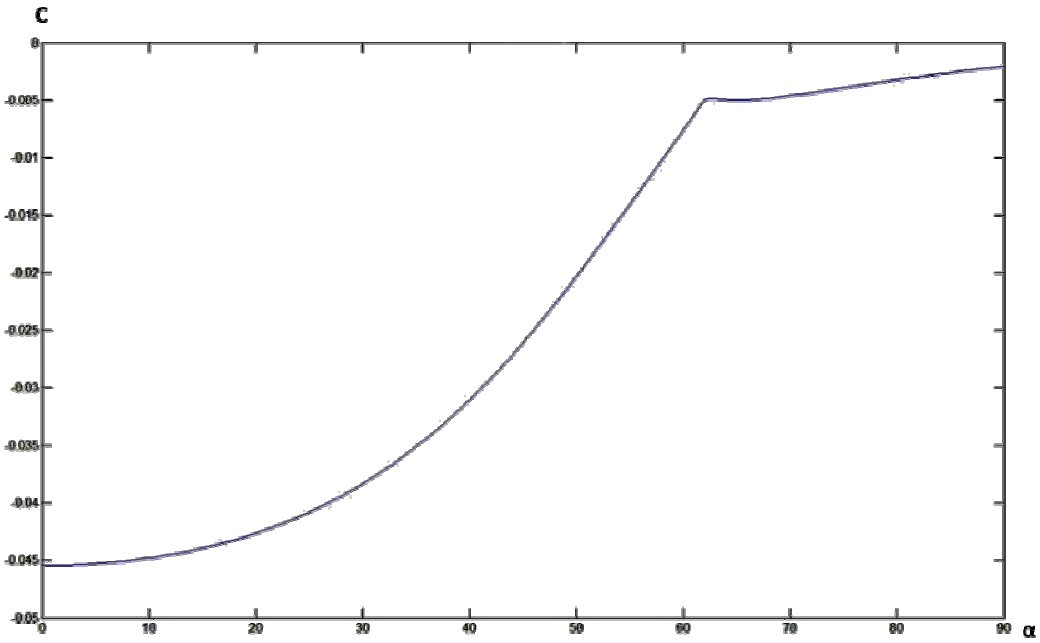


Figure III.13 : courbe de contraste CONE d'un plot d'épaisseur 1,6 nm et d'indice 1,464 en fonction de α pour une épaisseur d'or de 7 nm avec une lumière non polarisée.

Ces fluctuations de sensibilité avec l'indice de l'or correspondent en fait à des déplacements des extrema de contraste. Nous le montrons sur les Figure III.14 et Figure III.15, qui sont le pendant pour cet indice de l'or des Figure III.6 et Figure III.7. La longueur d'onde reste toujours artificiellement fixée à 630 nm.

a) b)

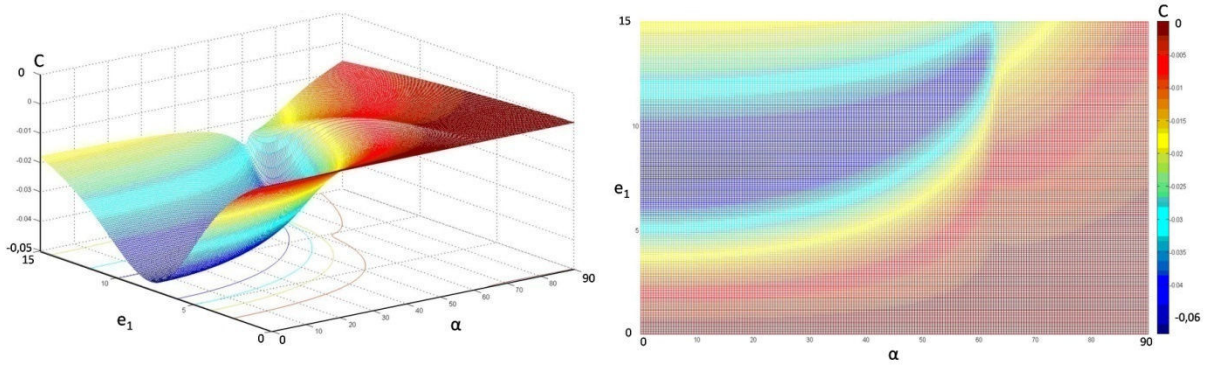


Figure III.14 : contraste CONE d'un plot d'épaisseur 1 nm pour une lumière polarisée en fonction de l'ouverture α et de l'épaisseur e_1 de l'or pour un indice de l'or n_1 = 0,6 + 2,12j.

Dans le cas polarisé, pour une épaisseur de 7 nm, le contraste varie avec l'ouverture dès 30 deg. comme montré sur la Figure III.14. L'invariance du contraste en fonction de

l'ouverture numérique est légèrement plus faible que précédemment, mais reste cependant très acceptable et permet toujours de travailler confortablement avec une bonne résolution.

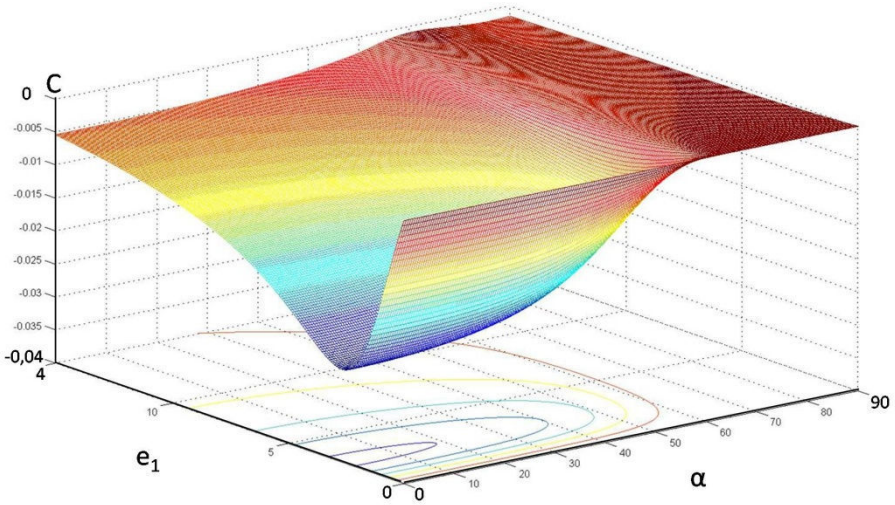


Figure III.15 : contraste CONE d'un d'épaisseur 1 nm pour une lumière non polarisée en fonction de l'ouverture α et de l'épaisseur e_{Au} pour un indice de l'or n = 0,6 + 2,12j.

En lumière non polarisée avec une couche d'or de 7 nm (Figure III.15), le contraste n'est plus exactement constant avec l'ouverture optique α. La variation de contraste reste cependant faible.

- Avec une couche d'or de 7 nm, le contraste CONE reste négatif quelque soit la longueur d'onde et sa valeur absolue augmente toujours avec l'épaisseur du plot, que la lumière soit polarisée ou non.
- La sensibilité maximale peut s'obtenir en lumière polarisée (P) ou non polarisée (NP) selon l'indice de l'or, c'est-à-dire selon la longueur d'onde utilisée.
- Quand on s'écarte de l'indice de l'or pour 630 nm (n = 0,3+ 3,2j), on doit corriger l'épaisseur de l'or affichée d'un facteur λ/630, où λ est la longueur d'onde qui correspond à l'indice de l'or choisi.

Nous revenons maintenant sur le double impact de la longueur d'onde. Afin d'isoler les effets de la calibration des épaisseurs et des coefficients d'absorption avec λ, nous reprenons le calcul précédent (Figure III.14, lumière polarisée) en conservant l'indice de l'or, mais en changeant la longueur d'onde, que nous fixons maintenant à 517 nm (vert).

On obtient ainsi la Figure III.16, à comparer avec la Figure III.14. Le changement de longueur d'onde se traduit sur le contraste seulement par un facteur d'échelle. Le même constat est fait pour le mode sans polarisation (figures non présentées). **On pourra donc utiliser des courbes maîtresses avec des variables d'épaisseur réduites ε = e/λ.**

a) b)

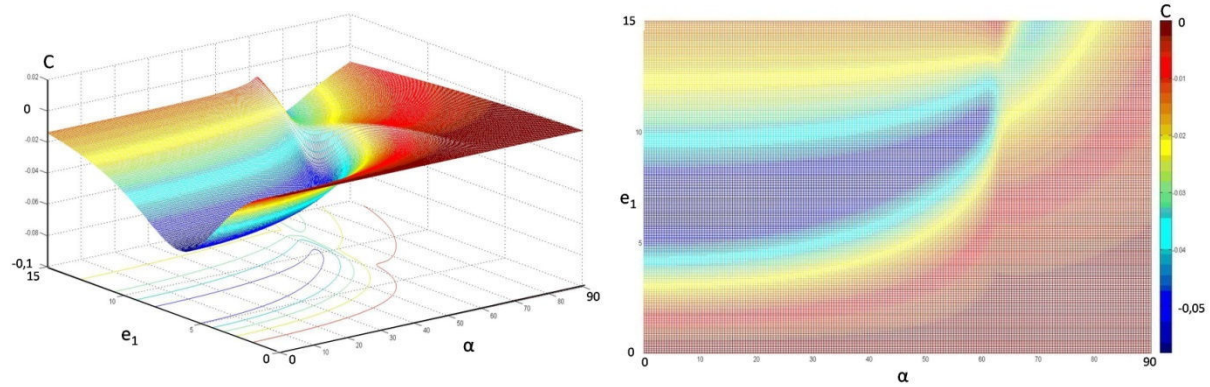


Figure III.16 : contraste CONE pour une lumière polarisée en fonction de l'angle α et de l'épaisseur e_1 pour une longueur d'onde λ = 517 nm.

Nous verrons dans la suite de ce Chapitre et dans le Chapitre IV qu'il est fréquent de constater des inversions du contraste des plots entre deux canaux de couleurs différentes de la caméra RGB, voir entre deux expériences. La suite des études théoriques a été effectuée avec une longueur d'onde de 630 nm (rouge). La Figure III.14 présentant un optimum de contraste pour une couche d'or d'environ 8 nm en lumière polarisée, nous regardons comment le contraste d'un plot varie avec son épaisseur pour deux épaisseurs d'or, respectivement 6 et 10 nm, situées de part et d'autre de cet optimum. La Figure III.17 montre que dans les deux

cas le contraste décroît avec l'épaisseur du plot quand la lumière est polarisée. Elle décroit légèrement plus pour une couche d'or de 10 nm (-12 %) que pour une couche de 6 nm (-10 %)

a) couche d'or de 6 nm b) couche d'or de 10 nm

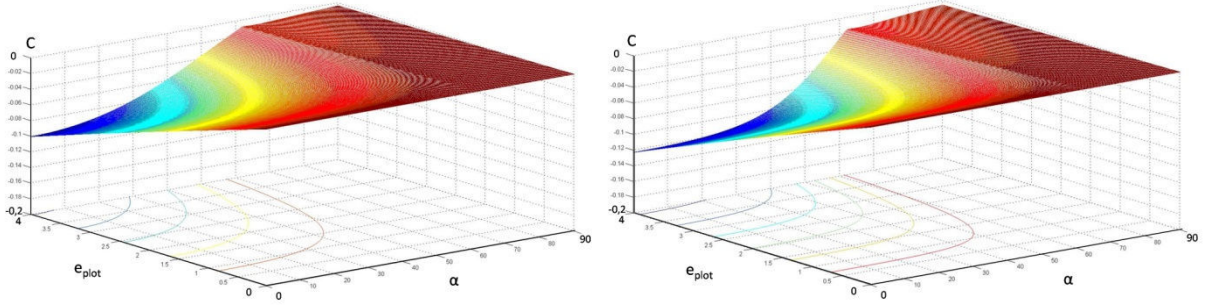


Figure III.17 : variation du contraste en fonction de l'angle *α* et de l'épaisseur du plot organique a) pour une couche d'or de 6 nm et b) pour une couche d'or de 10 nm avec une lumière polarisée.

La Figure III.18 présente les résultats obtenus avec une lumière non polarisée.

a) couche d'or de 6 nm b) couche d'or de 10 nm

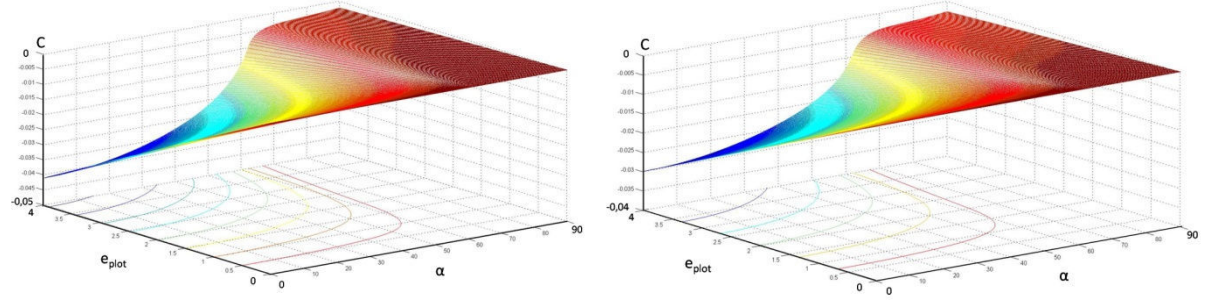


Figure III.18 : variation du contraste en fonction de l'angle *α* et de l'épaisseur du plot organique a) pour une couche d'or de 6 nm et b) pour une couche d'or de 10 nm avec une lumière non polarisée.

On peut aussi simuler la croissance sur le plot d'une couche diélectrique d'indice supérieur ou inférieur à 1,464 sans réussir à inverser le contraste.

- Pas d'inversion du contraste calculé pour une couche de diélectrique quel que soit l'épaisseur de cette dernière ou la polarisation de la lumière.

2.1.5 Effet de l'absorbance de la couche déposée

La croissance d'une couche métallique sur l'ensemble de l'échantillon se traduit par une croissance du contraste par ailleurs négatif. Exemple avec une couche d'or (Figure III.19):

a) lumière polarisée b) lumière non polarisée

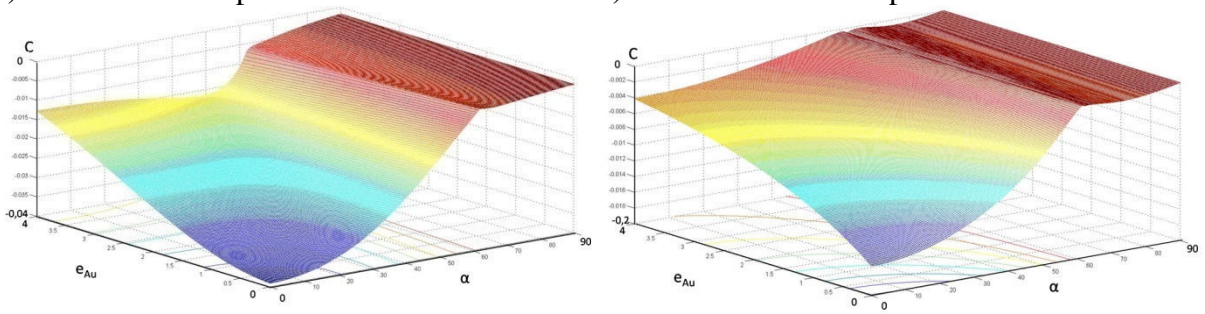


Figure III.19 : évolution du contraste CONE avec la croissance d'une couche d'or sur une surface d'or nu a) en lumière polarisée et b) en lumière non polarisée.

Le tableau ci-dessous résume les paramètres utilisés pour obtenir la Figure III.20.

Couche	Verre	Or	Objet (16-MHDA)	Couche métallique
Indice réel	1,51	0,3	1,464	0,3
Indice imaginaire	0	3,2	0	3,2
Epaisseur (nm)	-	6 ou 10	1,6	Variable

Tableau III.3 : paramètre utilisé pour calculer le contraste créé par le dépôt d'une couche d'or de 1 nm d'épaisseur sur une surface possédant une SAM de 16-MHDA.

Dans la Figure III.20, la couche d'or de 7 nm d'épaisseur est recouverte d'une SAM de 1,6 nm d'épaisseur. On fait croître des plots d'or sur ce support et on regarde l'évolution du contraste des images de ces plots avec l'épaisseur de cette couche et l'ouverture numérique. Les plots d'or sont aussi un exemple très simple de molécules optiquement absorbantes.

a) lumière polarisée b) lumière non polarisée

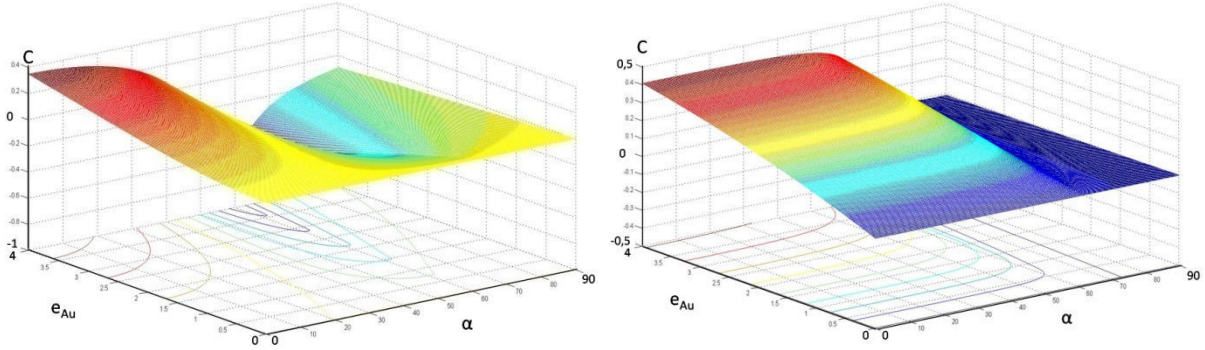


Figure III.20 : évolution du contraste CONE d'une SAM de 16-MHDA avec l'ouverture numérique du microscope et de l'épaisseur d'une couche d'or recouvrant l'ensemble a) en lumière polarisée et b) en lumière non polarisée.

La Figure III.20-b montre, en lumière non polarisée, une sensibilité du contraste de 10 % par nm déposé, soit 1 % par Å. La Figure III.20 montre une intéressante possibilité d'inversion de contraste avec l'ouverture numérique pour toute épaisseur de la seconde couche d'or sur la SAM.

La Figure III.21 montre la topographie du contraste présenté par des plots faits d'autres molécules absorbantes. Nous avons choisi n= 1,5 et k = 0,5 en pensant à une molécule organique absorbante, une protéine fluorescente par exemple.

a) lumière polarisée b) lumière non polarisée

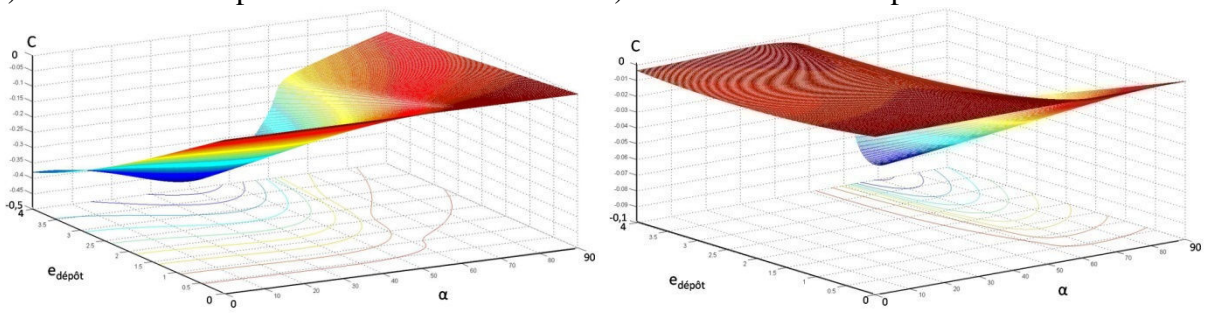


Figure III.21 : évolution du contraste CONE lors du dépôt de molécules absorbantes d'indice n = 1,5 et k = 0,5 a) avec une lumière polarisée et b) avec une lumière non polarisée.

On trouve une variation de contraste inversée par rapport à celle de la figure précédente en lumière polarisée et un contraste quasiment nul en lumière non polarisée dans

la gamme d'ouverture optique de travail (à savoir de 0 à 40 deg.). **Tout semble donc possible et le rôle de la partie imaginaire de l'objet joue donc un rôle primordial.** Nous le confirmons avec la Figure III.22 qui juxtapose les résultats obtenus en lumière non polarisée avec une partie imaginaire de 0,1 puis de 2. Nous avons conservé une partie réelle de l'indice de 1,5. La Figure III.23 montre le même calcul effectué avec une lumière polarisée.

a) indice imaginaire k = 0,1 b) indice imaginaire k = 2,0

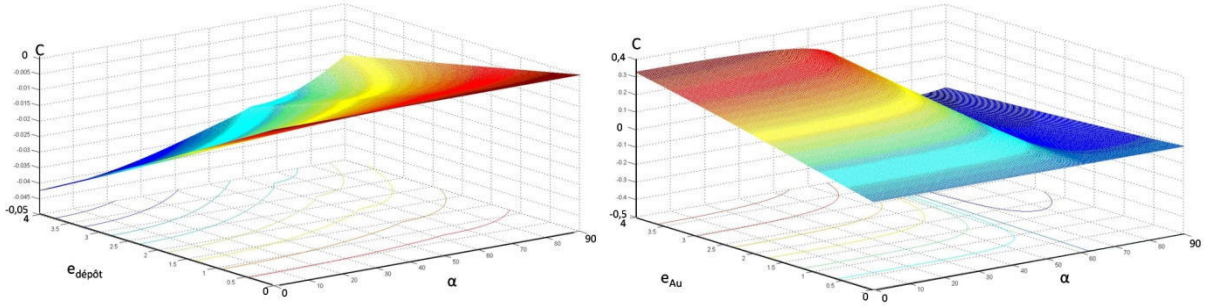


Figure III.22 : évolution du contraste CONE, en une lumière non polarisée, lors du dépôt de molécules absorbantes a) k = 0,1 et b) k = 2,0.

a) indice imaginaire k = 0,1 b) indice imaginaire k = 2,0

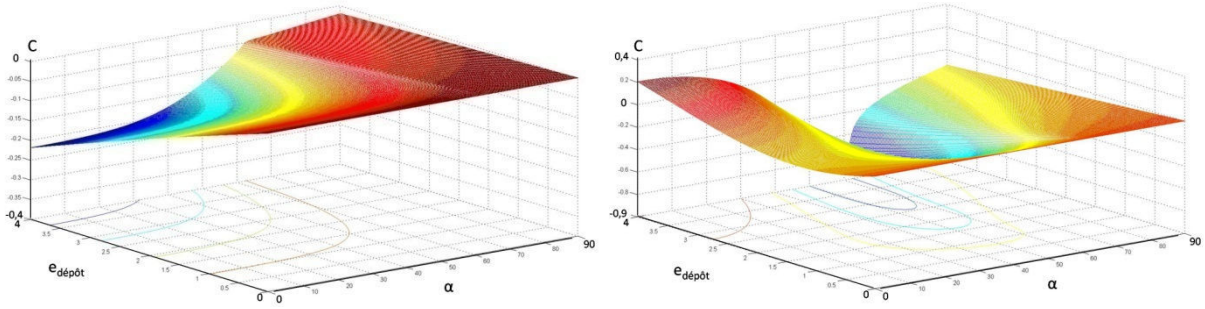


Figure III.23 : évolution du contraste CONE, en une lumière polarisée, lors du dépôt de molécules absorbantes a) k = 0,1 et b) k = 2,0.

L'évolution du contraste avec l'épaisseur du dépôt est très différente selon la partie imaginaire de l'indice de la couche rapportée et la polarisation de la lumière. Retenons donc que la variation de contraste avec l'épaisseur du plot (ou de la couche capturée) peut s'inverser lorsque la partie imaginaire de cette couche passe en deçà ou au-delà d'une valeur seuil proche de k = 0,5 pour la lumière non polarisée et de k = 2 pour la lumière polarisée.

La Figure III.24 est une perspective différente de la Figure III.23-b. Elle montre que le contraste peut s'inverser avec l'épaisseur d'une couche absorbante. La ligne de niveau rouge en bas à gauche de la figure correspond au contraste nul. Dans cette situation, l'ouverture du microscope devient aussi un paramètre critique. En travaillant avec une grande ouverture (40 à 50 deg.), le contraste est une fonction monotone décroissante de l'épaisseur rapportée et la sensibilité est grande (2.10^{-4} par pm).

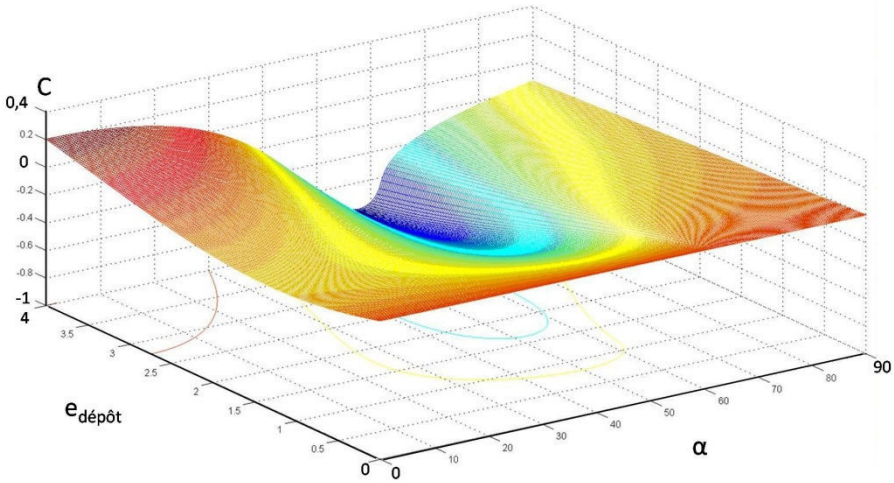


Figure III.24 : perspective différente de la Figure III.23-b.

- La valeur de l'indice imaginaire (l'absorbance optique) des molécules déposées est extrêment importante pour comprendre l'évolution du contraste à la fois en lumière polarisée et non polarisée.
- Toutes les évolutions du contraste avec l'épaisseur d'un plot sont envisageables selon l'indice imaginaire du dépôt.
- **L'évolution dans le temps ou avec la longueur d'onde de la partie imaginaire de l'indice des molécules capturées par un plot suffit à inverser le contraste.**

2.2 Réalisation d'un système de microfluidique

Pour les observations en microscopie SEEC en immersion, nous avons besoin d'une cellule ouverte pour pouvoir fixer la surface à observer. Il faut que cette cellule ait un canal avec des dimensions raisonnables par rapport à la taille des lamelles que nous utilisons et comparables à celles des canaux utilisés en SPR sur le BIAcore T100 pour avoir des écoulements similaires.

2.2.1 Fabrication d'une cellule de microfluidique

Pour ne pas partir dans des systèmes trop complexes, notre choix s'est arrêté sur la fabrication de cellules en polydiméthylsiloxane (PDMS). Il existe différents types de PDMS. Celui que nous avons utilisé est le RTV 615 (Eleco-produit, France). Une des particularités du RTV 615 est son adhésion très forte avec lui-même permettant de créer facilement des systèmes multicouches, raison pour laquelle il est généralement utilisé pour la fabrication de canaux en microfluidique [6]. Il se présente sous forme de deux produits, désignés A et B.

2.2.1.1 « Recette de cuisine » pour la fabrication d'une cellule de microfluidique en PDMS

- Peser dans un récipient assez grand une masse m de A et y ajouter une masse m/10 de B.
- Agiter énergiquement le mélange à l'aide d'une spatule pendant environ 5 min. Le mélange devient blanc. Il est chargé de nombreuses petites bulles.
- Dégazer le mélange en tirant sous vide. Les bulles vont grossir avant d'exploser en surface, raison pour laquelle il est judicieux de prendre un grand contenant dès le début de la pesée pour éviter que le mélange ne déborde. Si le volume devient trop

important à cause des bulles, il est possible de faire éclater celles-ci en rompant d'un sec coup le vide. Le dégazage à froid peut facilement prendre 30 à 45 min selon la puissance de la pompe utilisée.

- Couler le PDMS dans les moules préalablement réalisés. La fabrication du moule est présentée plus loin (p.100).
- Dégazer à nouveau le tout, puis mettre le tout à l'atmosphère ambiante.
- Laisser le PDMS réticuler à froid pendant une nuit, puis chauffer le tout à 70 °C pendant 10 à 12 h [7]. Le fait de le laisser réticuler à froid sans tirer sous vide permet d'avoir un bloc de PDMS plus homogène, sans bulles. Le recuit permet quant à lui de finir la réticulation et de rigidifier le bloc de PDMS.
- Démouler la cellule de PDMS.
- Ajouter les tubes permettant l'acheminement des solutions dans la cellule ainsi que leur évacuation. Pour cela, utiliser une aiguille comme gouge. Cette aiguille doit avoir un diamètre légèrement inférieur au diamètre extérieur des tubes. Dans notre cas, nous utilisons une aiguille Terumo® 1,20 x 40 mm pour des tubes 1/16 de pouce de diamètre extérieur. Si l'on insère les tubes sans ôter de la matière, le PDMS se déforme et crée des bourrelets autour du tube gênant le scellement de la cellule.
- Etanchéifier la jonction entre la cellule et les tubes de microfluidique en coulant du PDMS frais préparé comme expliqué précédemment. Pour la nouvelle étape de dégazage, il est important que la cellule soit remise dans son moule et que les tubes soient bouchés avec une tige métallique. Si ces précautions ne sont pas prises, la cellule ou les tubes risquent de se remplir de PDMS. Le tout est à nouveau recuit à 70°C pendant une nuit. Ce joint en PDMS donne plus de flexibilité entre les tubes et la cellule que la colle cyanoacrylate (loctite 401). Cela augmente fortement la durée de vie de la cellule.

- Laver la cellule avec un papier optique imbibé d'acétone pour retirer les morceaux de PDMS non réticulé pour la première utilisation de la cellule. Pour les utilisations suivantes, ce lavage permet d'éliminer les résidus des expériences précédentes.

2.2.1.2 Réalisation du moule

Le moule servant à la fabrication de la cellule en PDMS (Figure III.25-a) est constitué d'une lame de microscopie en verre, d'un morceau de scotch de cuivre de 40 µm d'épaisseur (15 x 5 mm²) et d'une lame d'inox (de même dimension que la lame de microscopie). Cette lame d'inox possède une ouverture en son centre de 15 x 15 mm². Les éléments du moule seront maintenus entre eux par du scotch d'aluminium.

On colle le scotch de cuivre sur la lame de microscopie. Il est positionné au centre de la lame dans le sens de la largeur et servira d'empreinte pour la formation du canal. À l'aide d'un pavé en inox, nous positionnons la lame d'inox à 6 mm de celle en verre. L'ouverture sur la lame d'inox se retrouve en face du scotch de cuivre comme présenté sur la Figure III.25-a. La lame d'inox a préalablement été nettoyée à l'acétone et irradiée dans un plasma UV/O_3. Cette irradiation permet une meilleure adhésion du PDMS sur la lame.

La lame d'inox sert à rigidifier la cellule. L'ouverture sur la lame à deux buts :

- permettre l'ajout des tubes de microfluidique.
- éviter la réflexion de la lumière incidente pendant l'observation.

Mettre la lame d'inox trop proche du scotch de cuivre entraîne une déformation du canal.

L'ouverture sur la lame d'inox est ensuite bouchée avec un scotch d'aluminium ainsi que l'espace entre la lame d'inox et celle de verre. On laisse juste une petite ouverture pour pouvoir couler le PDMS et extraire les bulles lors du dégazage.

Une fois le PDMS réticulé, on enlève tout le scotch d'aluminium. On désolidarise précautionneusement la cellule de PDMS de la lame de verre. La lame d'inox fait partie intégrante de la cellule. La cellule ainsi obtenue est représenté sur la Figure III.25-b avec le canal au premier plan et la lame d'inox à l'arrière plan. Sur cette figure, nous avons représenté les orifices d'entrée et de sortie des solutions dans le canal.

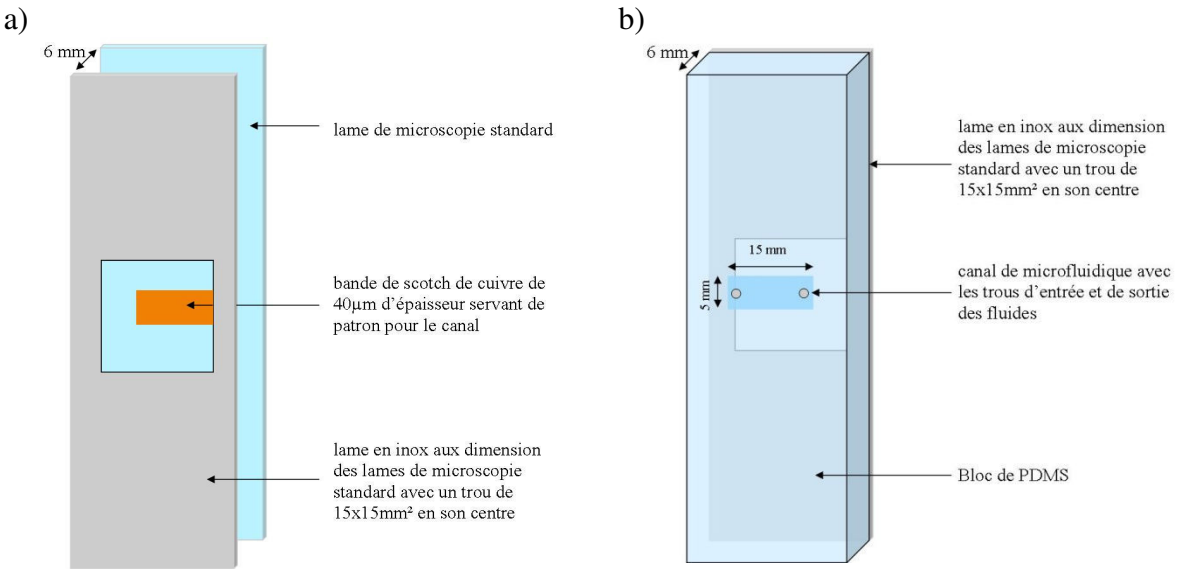


Figure III.25 : a) schéma du moule utilisé pour la fabrication de la cellule de microfluidique en PDMS (sans le scotch d'aluminium servant à fermer la cellule) et b) schéma de la cellule de PDMS avec ses dimensions caractéristiques. La face au premier plan est celle sur laquelle nous collons la surface d'or. La lame d'inox est donc à l'arrière plan sur le schéma b.

2.2.2 Le système de pompage des solutions

Dans un premier temps, nous avons utilisé une pompe péristaltique. Le liquide ne circulait pas de manière continue, mais par à-coups en fonction de la rotation de la pompe. La

variation de pression au cours du temps entraînait une fluctuation de position de la surface produisant des pertes de focalisation intermittentes très problématiques pour l'imagerie.

Pour pallier ce défaut, nous avons opté pour un autre type de pompe : une pompe à air comprimé de chez Fluigent.

Malgré l'utilisation de cette nouvelle pompe, des respirations de la lame, étaient toujours présentes bien que de plus faible amplitude, la période augmentant avec le débit. L'explication se trouvait en aval de la cellule de microfluidique. La chute de la goutte de liquide dans la poubelle s'accompagnait d'une brusque dépression. Le positionnement de l'embouchure de la microfluidique contre la paroi de la poubelle ou sous le niveau de liquide contenu dans celle-ci a définitivement réglé ces respirations de la lamelle d'or.

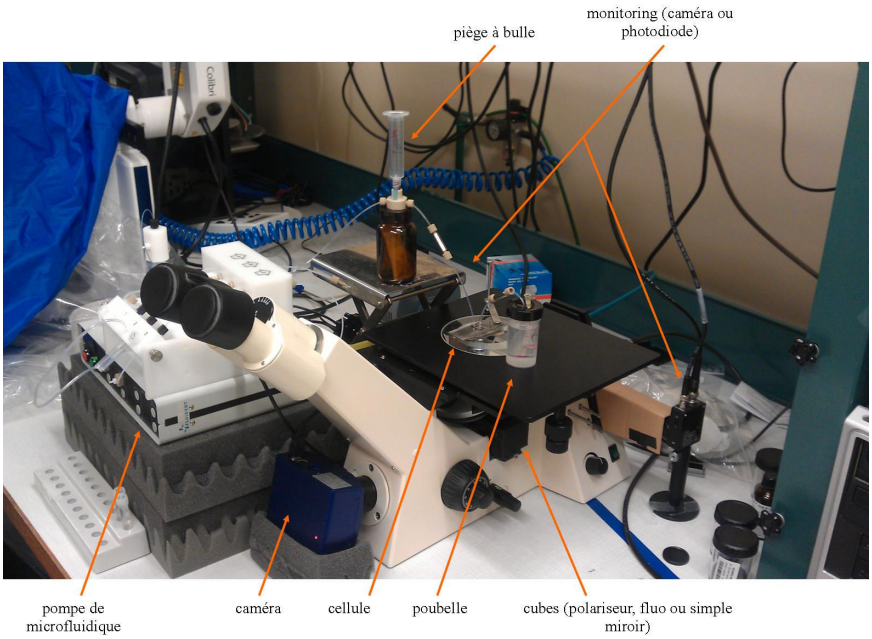


Figure III.26 : montage de microscopie SEEC en immersion avec sa microfluidique (pompe, piège à bulles, cellule et poubelle) et son monitoring.

2.2.3 Propriétés de l'écoulement obtenu au sein de la cellule de microfluidique

En microfluidique, compte tenu des dimensions des tubes et canaux, on considère que le flux est laminaire, car le nombre de Reynolds (défini par l'Équation III.31) des liquides

utilisés est faible. Pour que l'effet d'inertie joue un rôle, il faudrait que la vitesse atteigne quelques mètres par seconde, ce qui est loin d'être notre cas [8].

$$Re = \frac{\rho \mathrm{v} S}{\eta} = \frac{\mathrm{v} S}{\nu}$$ **Équation III.31**

avec ρ la masse volumique, v la vitesse, S la section du canal, η la viscosité dynamique et ν la viscosité cinématique [9].

Soit un canal de hauteur $2h$ = 40 µm dans lequel un liquide coule avec une vitesse $\vec{\mathrm{v}}$ (Figure III.27). En se plaçant au centre du canal, on peut négliger les « effets d'extrémités » et considérer que l'on a un flux laminaire et un écoulement unidirectionnel, soit $\vec{\mathrm{v}} = \mathrm{v}(x, y)\overrightarrow{e_x}$. La conservation de masse (div $\vec{\mathrm{v}} = 0$) permet d'établir immédiatement que $\vec{\mathrm{v}}$ est indépendant de x, soit v(x,y) = v(y). En utilisant la condition de vitesse nulle à la paroi, le profil d'écoulement est parabolique avec une vitesse maximale ($\mathrm{v_M}$) au centre du canal, soit :

$$\begin{cases} \mathrm{v} = \mathrm{v}_M - \alpha y^2 \\ 0 = \mathrm{v}_M - \alpha h^2 \end{cases}$$ **Équation III.32**

où α est une constante.

soit

$$\mathrm{v} = \alpha(h^2 - y^2)$$ **Équation III.33**

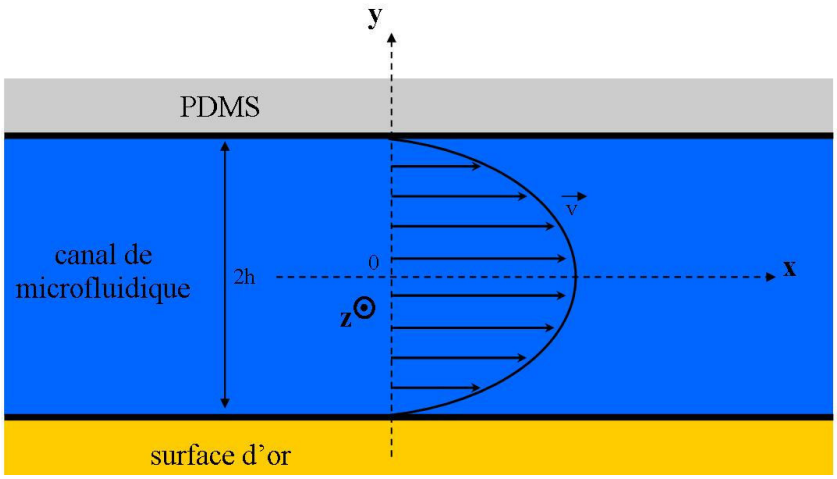


Figure III.27 : schéma de l'écoulement au sein de la cellule de microfluidique.

Notre canal de microfluidique possède une largeur $2L$ = 5 mm, bien supérieure à sa hauteur. On néglige les frottements sur les bords latéraux du canal et on considère que le profil de vitesse est invariant selon z ce qui est faux lorsqu'on visualise près du bord du canal. Il serait possible dans l'avenir de décrire les profils de vitesse en trois dimensions. Avec ces approximations, le flux dans le canal peut donc s'écrire :

$$F = \mathrm{v}S = 2L\int_0^h \mathrm{v}(y)dy = 2L\left[\alpha h^2 y - \alpha\frac{y^3}{3}\right]_0^h = \frac{4}{3}L\alpha h^3$$ **Équation III.34**

d'où

$$\alpha = \frac{3F}{4Lh^3}$$ **Équation III.35**

La vitesse locale s'exprime donc comme suit :

$$\mathrm{v} = \frac{3F}{4Lh^3}(h^2 - y^2)$$ **Équation III.36**

et sa dérivée :

$$\dot{\gamma} = \frac{d\mathrm{v}}{dy} = -2\alpha y$$ **Équation III.37**

soit à la paroi :

$$\left|\dot{\gamma}_{paroi}\right| = 2\alpha h = \frac{3F}{2Lh^2}$$ **Équation III.38**

En microscopie SEEC, on utilise un débit de 55 µL/min avec un canal de 5 mm de large et de 40 µm de hauteur, soit $\left|\dot{\gamma}_{paroi}\right|_{SEEC}$ = 82500 min^{-1}. Sur le BIAcore T100, le canal mesure 400 µm de large pour 40 µm de haut et nous travaillons à une vitesse de 5 µL/min pour l'immobilisation des protéines, soit $\left|\dot{\gamma}_{paroi}\right|_{SPR}$ = 93750 min^{-1}. Les deux gradients sont du même ordre de grandeur pour les deux techniques et les profils de vitesse dans les cellules

sont relativement proches. Les temps caractéristiques pour l'immobilisation des protéines doivent donc être comparables d'une technique à l'autre.

Dans la microfluidique du BIAcore T100, une microbulle est introduite avant et après chaque solution injectée (Figure III.28-a). Ces microbulles éliminent les effets de diffusion entre liquides miscibles, ce qui permet d'obtenir des sauts d'indices (« Bulk effects ») francs. Dans le cas de notre montage, nous n'avons pas de création de microbulles. La diffusion des liquides l'un dans l'autre (Figure III.28-b) engendre une variation d'indice étalée sur 2 à 4 min. C'est un handicap important pour l'étude quantitative des cinétiques.

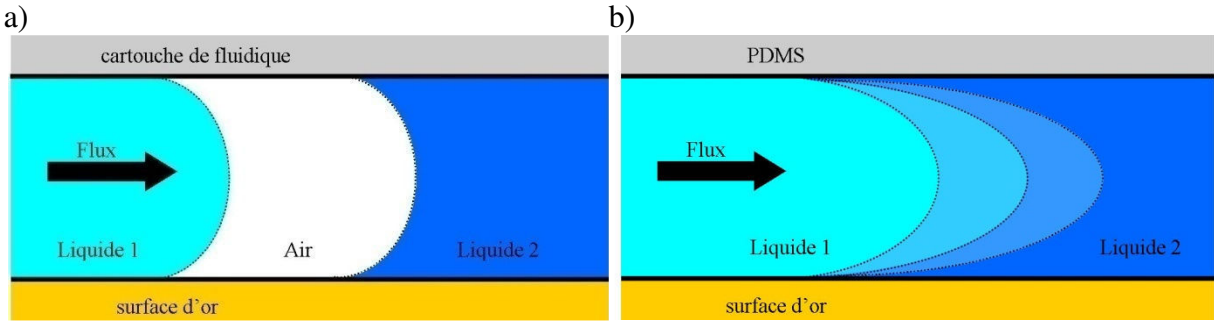


Figure III.28 : jonction entre deux liquides dans la microfluidique a) du BIAcore T100 et b) de notre montage SEEC.

- Réalisation d'une microfluidique en PDMS avec une vitesse linéaire proche de celle du Biacore T100 au niveau de la zone observée.
- Temps caractéristique de la variation d'indice plus long sur notre montage que sur le BIAcore T100 dû à l'absence d'injection de nanobulles avant et après chaque solution.

2.3 Traitement des images

Pour traiter les images acquises en microscopie SEEC en immersion, nous avons utilisé un programme Matlab développé par Yasmina Fedala durant son stage post-doctoral d'un an au Mans.

2.3.1 Utilisation du programme de traitement d'image

On commence le traitement en définissant le contour des plots, ce qui permet de générer un masque binaire différenciant les deux régions : les plots et le fond.

Le fond pris seul est utilisé pour estimer les hétérogénéités de l'éclairage et les tâches présentes sur les différents éléments optiques du microscope. L'image entière est ensuite corrigée à partie de ces estimations.

Après nettoyage des images, le masque binaire nous permet d'extraire de chaque cinétique les intensités moyennes des plots et du fond.

2.3.2 Fluctuations de l'intensité de la source

Nous avons constaté de fortes variations de l'intensité de la lampe dans le temps (HXP 120c, Zeiss). Pour corriger cela, nous mesurons l'intensité de la source au cours du temps. L'enregistrement de cette intensité ne peut pas se faire avant la fibre optique. En effet, nous avons essayé et constaté des décalages temporels aléatoires dans les sauts d'intensité entre les images de microscopie et les mesures d'intensité de la lampe. Par contre, si les variations de la source sont enregistrées après la fibre optique, les intensités mesurées et celles des images sont bien corrélées. Nous avons donc enregistré les variations de la source au niveau de la fente permettant d'insérer des filtres de densité optique, c'est-à-dire juste avant le diaphragme d'ouverture. Pour cet enregistrement, nous avons utilisé une caméra Andor Luca^{EM} EMCCD pilotée avec un programme d'acquisition mis au point par Laurent Berger au LPEC. L'acquisition des images de la lampe et de microscopie est déclenchée simultanément par l'expérimentateur. Nous utilisons un temps d'exposition et un intervalle entre chaque image identiques pour les deux caméras. Dans l'avenir, nous souhaitons utiliser une photodiode

couplée à un multimètre électronique et synchroniser directement l'acquisition de l'intensité de la source avec l'acquisition des images de microscopie.

Avec un script Matlab, nous extrayons l'intensité moyenne de chaque image de l'enregistrement de la source que nous appellerons I_m. L'intensité du fond des images de microscopie est notée I_f dans les équations ci-dessous.

On définit un facteur de correction I_c :

$$I_c(t) = I_m(t) \times \frac{\langle I_f \rangle_{ref}}{\langle I_m \rangle_{ref}}$$ **Équation III.39**

où $\langle I_f \rangle_{ref}$ et $\langle I_m \rangle_{ref}$ sont respectivement les intensités moyennes du fond et de l'enregistrement de la source mesurées sur une plage de référence.

On définit une intensité du fond et une intensité des objets corrigés en divisant les intensités brutes par cette intensité de correction. Pour ne pas changer la dynamique du signal, il est nécessaire de multiplier les intensités corrigées par la moyenne des intensités du fond sur la plage de référence. Ce qui donne pour l'intensité corrigée du fond :

$$I_f^c(t) = \frac{I_f(t)}{I_c(t)} \langle I_f \rangle_{ref} = \frac{I_f(t)}{I_m(t)} \langle I_m \rangle_{ref}$$ **Équation III.40**

et pour l'intensité corrigée des objets :

$$I_o^c(t) = \frac{I_o(t)}{I_c(t)} \langle I_f \rangle_{ref} = \frac{I_o(t)}{I_m(t)} \langle I_m \rangle_{ref}$$ **Équation III.41**

Ce traitement n'est valable que si l'intensité de la lampe et celle mesurée sur l'image sont proportionnelles. Or, en général : $I_m = a\ I_f + b$. Nous travaillons dans une pièce sans fenêtre, lumières éteintes et le bruit des caméras (dans le noir) est soustrait avant chaque début de mesure. Dans de telles conditions, on peut considérer la constante b comme nulle.

À l'heure actuelle, la plage de référence ne correspond qu'à la valeur obtenue pour la deuxième image de la cinétique. Nous excluons la première image sur laquelle est calculé le fond servant à la correction d'homogénéité.

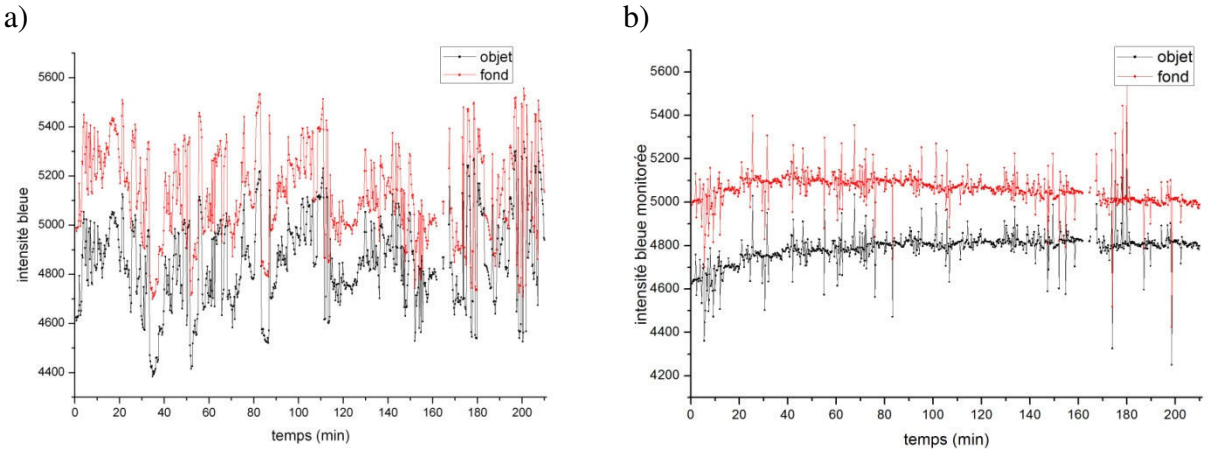


Figure III.29 : évolution de l'intensité du fond (en rouge) et des plots (en noir) en fonction du temps avec un flux d'eau Versol ® filtré à 0,45 µm a) avant correction et b) après correction des fluctuations de la lampe.

Nous définissons le contraste C entre le fond et les objets présents sur la surface (les plots dans notre cas) comme suit :

$$C = \frac{I_p - I_f}{I_p + I_f} = \frac{\Delta I}{I_p + I_f}$$ **Équation III.42**

avec I_p l'intensité de l'objet (plots dans notre cas) et I_f l'intensité du fond.

On peut définir l'intensité mesurée I^m comme étant :

$$I_j^m = I_j + \delta I_j = I_j(1 + \delta)$$

avec j = p pour les plots et f pour le fond et δ l'influence de l'intensité de la lampe.

On en déduit un contraste mesuré C^m tel que :

$$C^m = \frac{I_p^m - I_f^m}{I_p^m + I_f^m} = \frac{(I_p - I_f)}{(I_p + I_f)}\frac{(1+\delta)}{(1+\delta)} = \frac{I_p - I_f}{I_p + I_f} = C$$ **Équation III.43**

Le contraste mesuré et le contraste sont identiques. Les variations de l'intensité de la lampe n'ont pas d'effet sur le contraste (Figure III.30). Le contraste est auto-monitoré. Il est

par conséquent très intéressant pour le développement d'une technique à faible coût. Néanmoins, il est moins précis que les intensités, car on ne sait pas si l'évolution du contraste est due aux plots ou au fond de l'image. Pour une technique de recherche en laboratoire, il est donc très important d'améliorer le rapport signal/bruit des intensités.

a) avant correction b) après correction

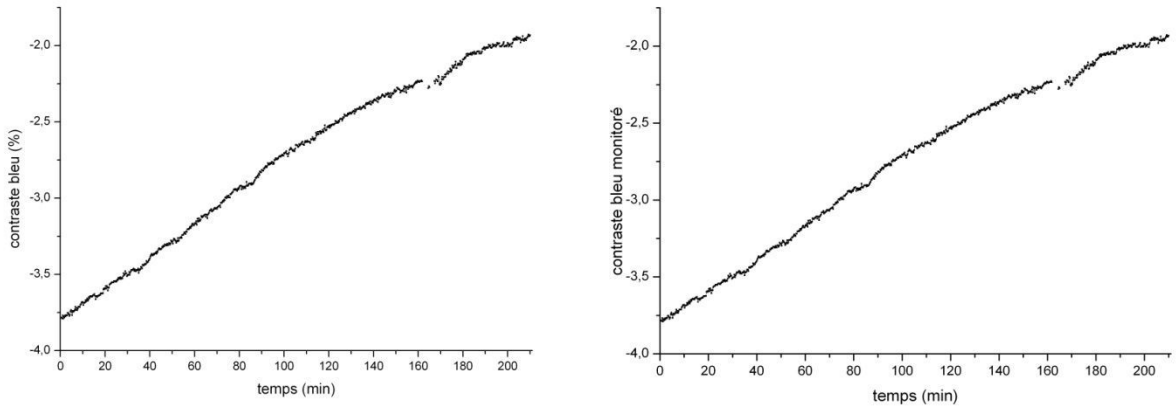


Figure III.30 : évolution du contraste entre les plots et le fond en fonction du temps avec un flux d'eau Versol ® filtré à 0,45 µm a) avant correction et b) après correction des fluctuations de la lampe.

La dérive du contraste observée sur la Figure III.30 sera étudiée en profondeur dans le paragraphe 4.3 à la page 133.

- Cette méthode corrige bien les fluctuations d'intensité (Figure III.29).
- L'exploitation du contraste plutôt que de l'intensité permet de s'affranchir des fluctuations d'intensité de la source.
- L'information contenue dans le contraste est cependant moins complète que celle fournie par les intensités.

Dans la partie expérimentale, nous utiliserons le terme contraste pour parler de la valeur algébrique du contraste et le terme |contraste| pour la valeur absolue de celui-ci. Le |contraste| rend mieux compte de ce que l'on observe à l'image.

3 Fabrication et évaluation de surfaces microstructurées

Pour calculer un contraste en microscopie SEEC, il convient d'avoir des surfaces microstructurées. Ceci permet de comparer à chaque instant l'intensité de l'objet et du fond. Grâce à une collaboration avec Laurent Vonna (IS2M, Mulhouse), nous avons fabriqué ces surfaces par impression microcontact (µCP, pour micro Contact Printing en anglais) de tampons de polydiméthylsiloxane (PDMS).

3.1 Impression par microcontact d'un tampon de PDMS

L'impression microcontact (µCP) est une méthode simple et rapide pour réaliser une micro-structuration de la surface. Elle est développée depuis le milieu des années 1990 [10-14].

3.1.1 Fabrication d'un tampon de PDMS

Une plaque de silicium est microstructurée dans un premier temps par lithographie par un faisceau d'électrons. Cette matrice de silicium est ensuite silanisée avec du fluoro-trichlorosilane puis on coule dessus du PDMS de type Silgar 184. On recuit le tout à 180 °C pendant 12 h (Figure III.31-a). Ces opérations ont été réalisées à l'Institut de Science des Matériaux de Mulhouse par Laurent Vonna.

3.1.2 Protocole d'impression de plot de 16-MHDA

Les surfaces d'or sont placées dans un plasma UV/O_3 (uvo-cleaner model 42-220) pendant 15 min pour être nettoyées et sont ainsi plus réactives chimiquement.

Le tampon de PDMS est tout d'abord nettoyé avec de l'acétone pour éliminer les résidus de PDMS non réticulés. Il est ensuite imbibé d'éthanol puis appliqué sur une lame de microscope propre. Cette opération permet de supprimer les éventuelles traces « d'encre » restant de la précédente série d'impressions. Il est également bon d'utiliser cette lame de verre et l'éthanol pour répéter les gestes à faire lors de l'impression des motifs qui demande de la dextérité. Les différentes étapes s'enchainent très rapidement (Figure III.31-b-e). Après avoir remplacé la lame de verre par la lamelle d'or à imprimer, on procède aux étapes suivantes :

Etape 1 : immersion complète du tampon dans « l'encre » (thiol, protéine…) pendant 60 s.

Etape 2 : séchage du tampon avec de l'air comprimé ou un gaz inerte comme l'azote ou l'argon pendant 45 s.

Etape 3 : application pendant 30 s du tampon en posant en premier un bord puis en le laissant délicatement tomber. Pour appuyer sur le tampon, on utilise un flacon de 100 mL rempli d'eau que l'on pose sur une petite mousse. On se contente de maintenir le flacon pour qu'il ne tombe pas.

Etape 4 : pour retirer le tampon, il faut agir d'un coup sec avec une pince. Il faut à la fois fermer la pince et tirer la main vers le haut le plus verticalement

possible. Ceci permet d'éviter le glissement du tampon qui entrainerait une déformation du motif.

Il est important d'avoir deux pinces distinctes : la première pour manipuler le tampon et la seconde pour manipuler la surface d'or pour éviter de polluer cette dernière.

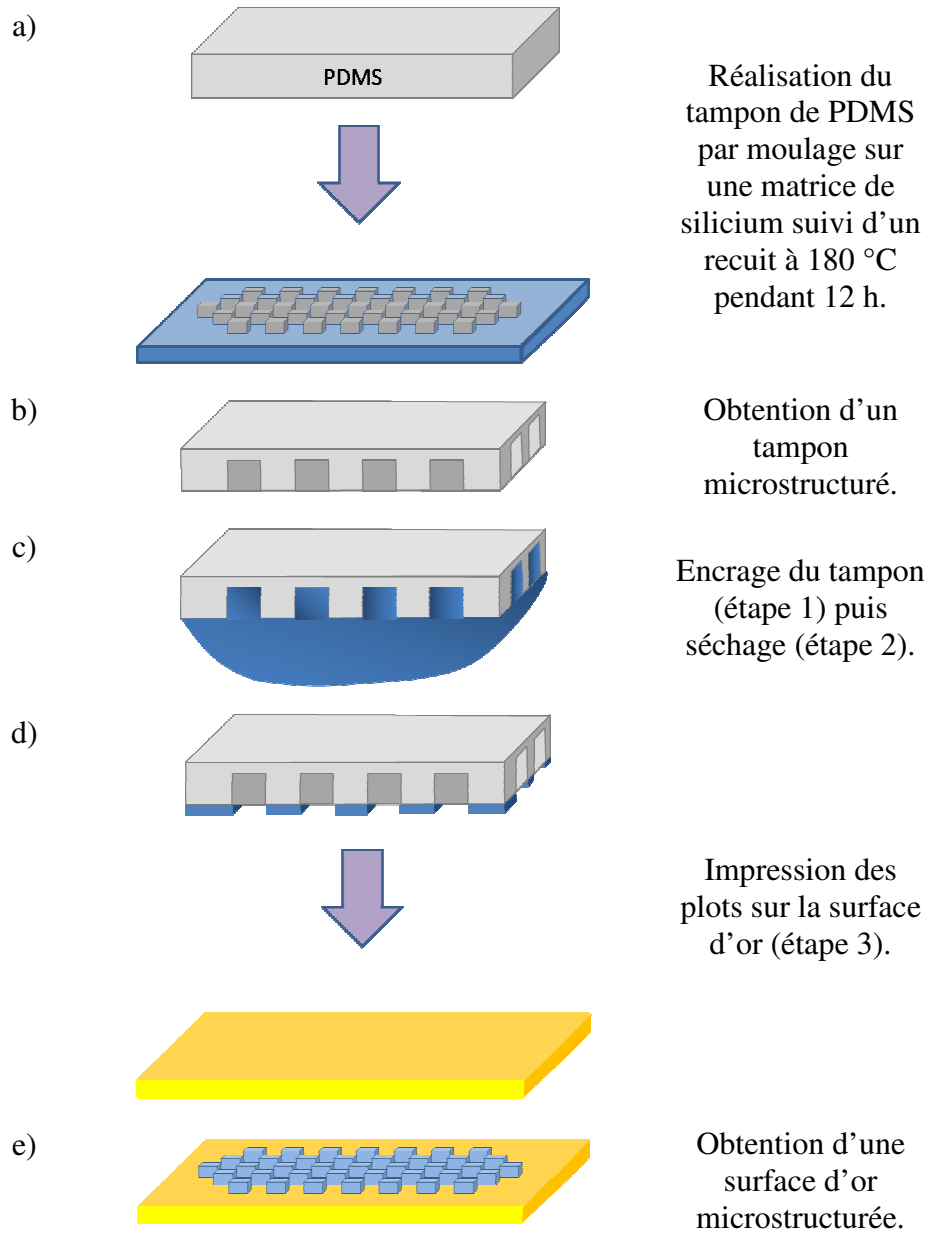


Figure III.31 : schéma expliquant la fabrication d'un tampon de PDMS et l'impression par microcontact de celui-ci sur une surface d'or.

Etant donné le mouvement sec que l'on doit faire pour retirer le tampon, il convient de fixer la lamelle pour éviter que celle-ci ne suive le tampon par capillarité. Le moyen le plus utilisé est le scotch double face. Il faut cependant avoir un scotch pas trop adhérant car la surface risquerait d'y rester collée ou bien de casser lors de son décollement. Pour diminuer l'adhérence du scotch, il est possible, préalablement, de l'appliquer et le retirer plusieurs fois sur une surface ou un bout de tissu. Nous avons utilisé cette méthode du scotch pour les premières impressions. Un inconvénient de ce mode de fixation est le dépôt de résidus de colle sur le côté en verre de la lamelle. Pour certaines applications ce n'est pas dérangeant, mais dans notre cas le côté verre de la surface doit rester propre, car c'est la face en contact avec l'objectif *via* une goutte d'huile. Nous avons donc utilisé une pompe à vide primaire pour fixer la surface (Figure III.32). Il faut faire attention à ce que l'aspiration ne crée pas de courbure de la lame en son centre. Ceci entraine une hétérogénéité de l'impression avec pas ou peu de matière au centre de la surface. Il convient donc de couper l'aspiration pendant la phase d'impression. Mettre un morceau d'élastofilm entre le support de l'aspirateur et la lame permet d'avoir une bonne adhésion même après l'arrêt de la pompe à vide. Pour plus de sécurité, il est possible de relancer la pompe au moment du retrait du tampon. Pour décoller la lamelle, il suffit de passer délicatement une pointe de pince fine entre le support et l'élastofilm.

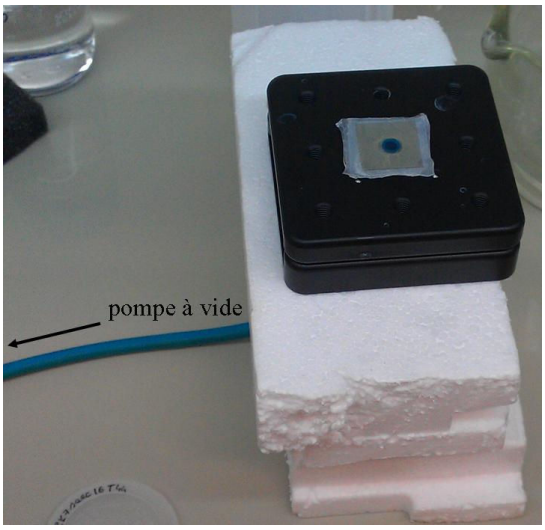


Figure III.32 : montage utilisé pour la fixation de la lamelle d'or lors de l'impression microcontact.

3.1.3 Caractérisation des plots par microscopie AFM et SEEC, à l'air puis en immersion

Les surfaces obtenues par µCP ont été évaluées par microscopie SEEC à l'air et par AFM (Figure III.33). Nous avons imprimé des plots hexagonaux de 16-MHDA de 16 µm ou 32 µm de diamètre, espacés respectivement de 16 et 32 µm, sur des surfaces d'or d'environ 20 nm d'épaisseur. Ces plots montrent une épaisseur de l'ordre de 16 ± 3 Å équivalente à celle d'une SAM de 16-MHDA (voir le Chapitre II). En AFM, la RUgosité mesurée sur les plots est équivalente à celle du fond (3,18 Å contre 3,25 Å). Les plots de 16-MHDA recouvrent un quart de la superficie totale de la surface, le reste étant de l'or nu (Figure III.33-a). La micrographie SEEC de la (Figure III.33-a) a été obtenue à l'air avec une balance des blancs automatique. Dans ce mode, les gains des composantes RVB s'ajustent afin que les maxima de leurs histogrammes soient superposés.

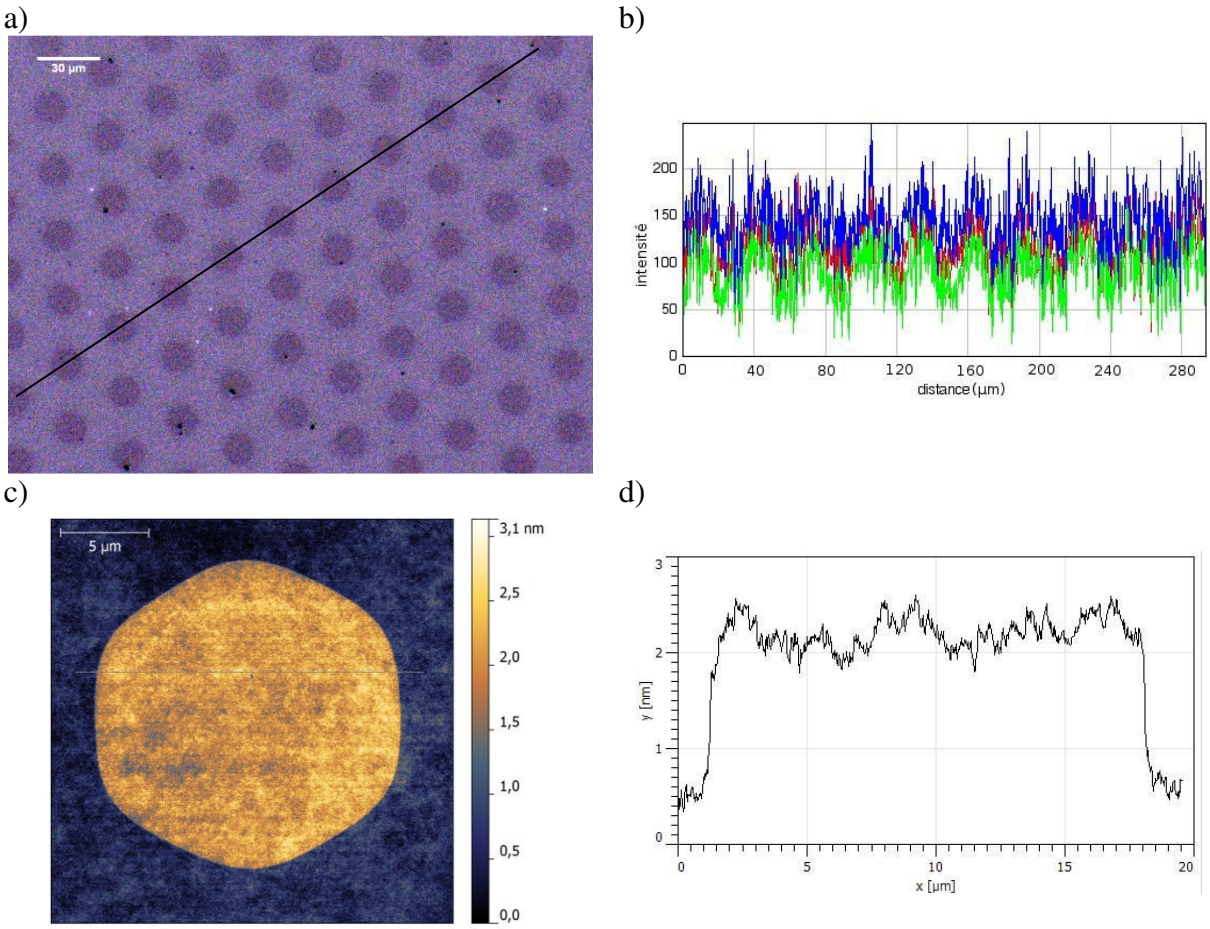


Figure III.33 : Impression de plots de 16-MHDA de 16 µm de diamètre sur des surfaces d'or observés par dessus. a) image SEEC à l'air avec un objectif x20 et une lentille de tube x2,5 et b) profil RVB associé, c) image AFM 25x25 µm² mesurée à 0,25 Hz avec une résolution de 1024 points sur 1024 lignes et d) profil associé. Surface recouverte d'environ 20 nm d'or.

Si les surfaces d'or ont une mauvaise accroche sur la lamelle de verre, l'impression microcontact risque de déstructurer la fine couche d'or et des amas d'or de plusieurs dizaines de nanomètres vont se retrouver à la surface des plots. C'est ce qu'on observe sur l'image AFM (Figure III.34), avec un niveau constant du plot de l'ordre de 2 nm surmonté d'amas allant de 10 à 42 nm d'épaisseur et d'environ 0,5 µm de large en moyenne. On remarque que presque tout le bord du plot est constitué d'amas.

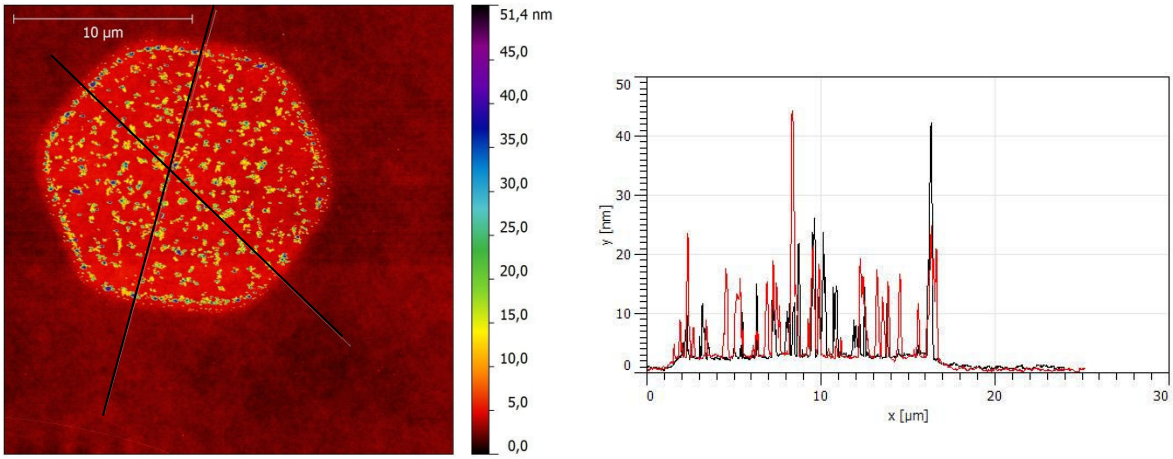


Figure III.34 : image AFM et profils associés de plots de 16-MHDA de 16 µm de diamètre imprimés sur une couche d'or ayant une mauvaise accroche sur la lamelle de verre.

La technique d'impression microcontact permet aussi de fixer directement des protéines sur diverses surfaces [15-17]. La Figure III.35 montre une surimpression de plots de BSA (théoriquement de 4 nm d'épaisseur [18]) de 8 µm de diamètre (espacé de 8 µm les uns des autres) déposés sur une surface déjà microstructurée avec des plots de 16-MHDA de 16 µm de diamètre. Sur l'image SEEC à l'air (Figure III.35-a), on distingue clairement le réseau de BSA, mais plus difficilement celui de 16-MHDA. On voit quand même certains plots de 16-MHDA, notamment dans les trous du réseau de BSA au centre de l'image. Tous les plots sont plus sombres que le fond, on a bien un contraste négatif. Sur l'image AFM (Figure III.35-b) les deux réseaux sont visibles même si les plots de thiol sont un peu cachés par le fond. L'analyse du détail de l'image AFM (Figure III.35-c) montre clairement deux niveaux. Le premier (à 3,8 nm) correspond aux plots de BSA (en orange) situés autour du plot de 16-MHDA et le second (à 5,3 nm) correspond aux plots pour le plot de BSA (en jaune) recouvrant celui de 16-MHDA. On peut en déduire une épaisseur du plot de 16-MHDA avoisinant les 1,5 nm, ce qui correspond bien à l'épaisseur attendue.

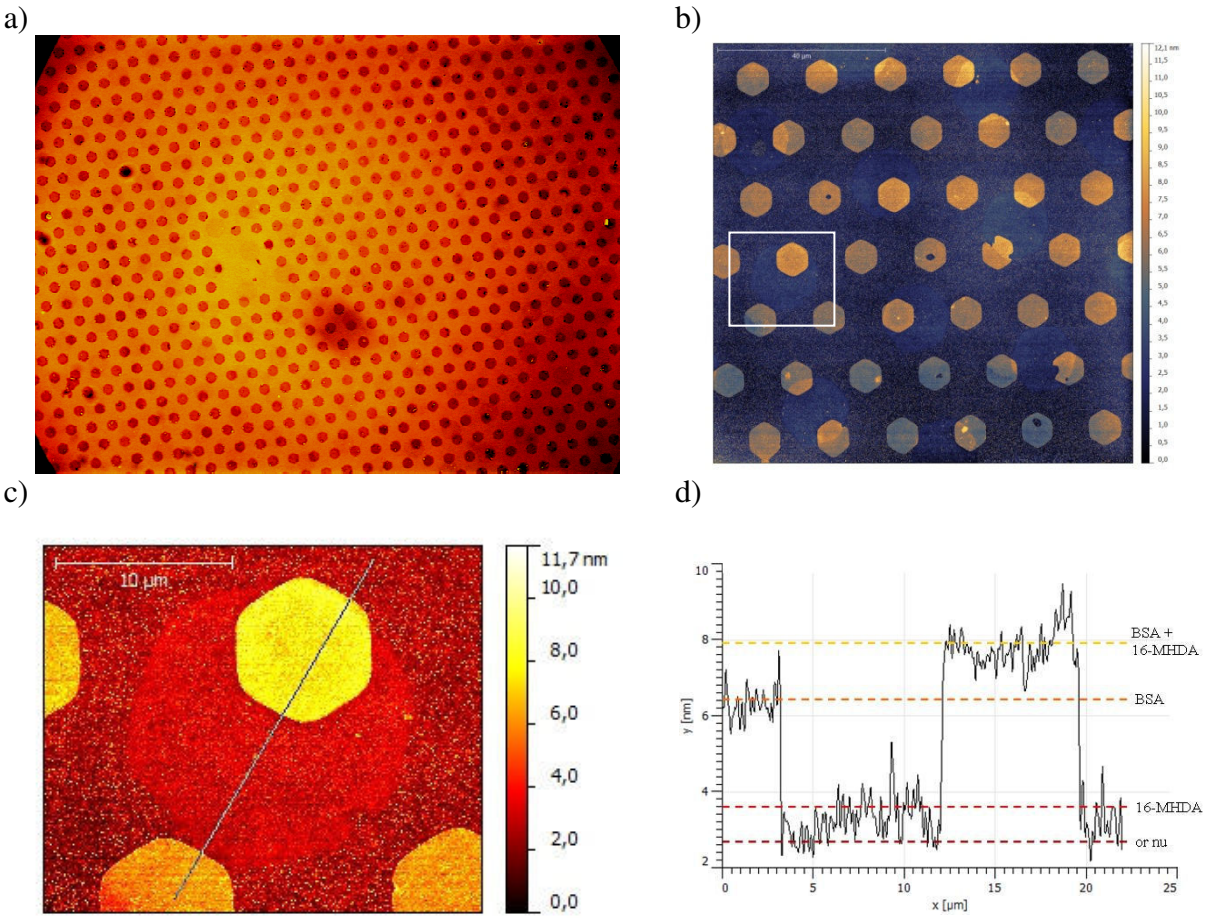


Figure III.35 : Impression d'un réseau de plots de BSA de 8 µm de diamètre sur un réseau de plots de 16-MHDA de 16 µm de diamètre. a) image SEEC à l'air avec un objectif x20 d'ouverture numérique 0,5 et une lentille de tube x1,6, (non traitée) b) image AFM 100x100 µm² mesurée à 0,25 Hz avec une résolution de 1024 pts sur 1024 lignes, c) détail de l'image AFM précédente et d) profil associé. Couche d'environ 20 nm.

En utilisant un objectif x63 avec une ouverture numérique de 1,4, il est possible d'observer nettement à l'air cette double impression de plots (BSA sur 16-MHDA) à travers la lamelle de verre *via* une goutte d'huile (Figure III.36-a). Cette géométrie d'observation est appelée inversée en opposition à la géométrie droite où l'on observe directement la surface d'or.

Sur la Figure III.36-a, les quatre niveaux (fond, 16-MHDA, BSA et BSA sur 16-MHDA) sont clairement identifiables. Lorsque l'on passe en immersion dans l'eau, on constate une forte chute du contraste (Figure III.36-c). Il nous est impossible d'extraire des valeurs d'intensité pour les quatre niveaux après immersion. Les images n'ont subit aucun

traitement. Les pentes sur les profils sont très dérangeantes pour extraire les intensités des différents niveaux. Dans la suite de ce manuscrit, toutes les images ont été traitées comme expliqué précédemment pour s'en affranchir.

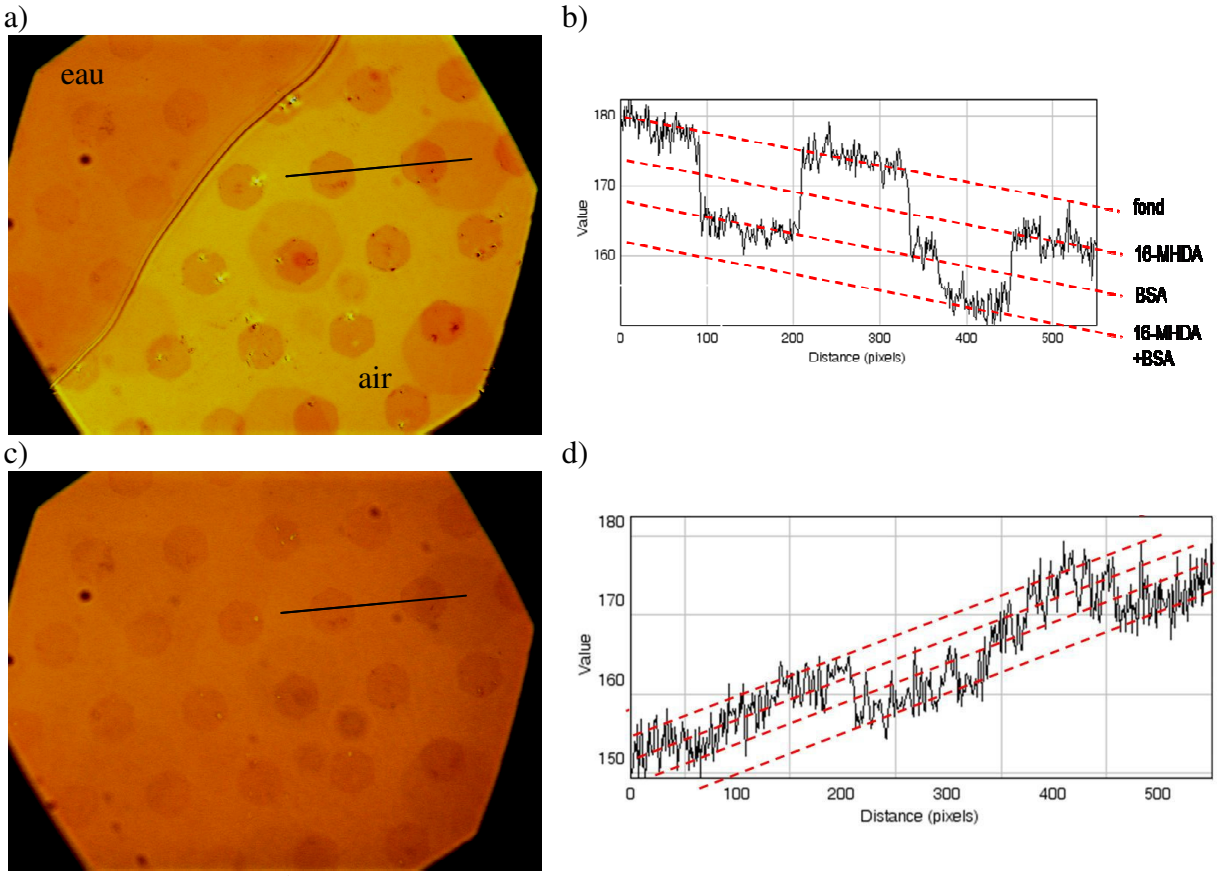


Figure III.36 : observation à travers la lamelle de verre de la double impression de plots (BSA et 16-MHDA) sur une surface d'or avec un objectif x63 d'ouverture numérique 1,4. a) micrographie SEEC à l'air et b) le profil associé, c) micrographie SEEC en immersion dans l'eau Versol ® et d) le profil associé. Image non traitée. Couche d'environ 20 nm.

- Les impressions de plots par microcontact donnent bien une épaisseur de plots de 1,6 nm pour la 16-MHDA et de 4 nm pour la BSA.
- Ces plots ont été visualisés en microscopie SEEC aussi bien à l'air en géométrie droite et inversée, qu'en immersion dans l'eau en géométrie inversée.
- Sur des surfaces de 20 nm d'or, le changement de milieu d'observation (de l'air à l'eau) entraine une forte chute du contraste SEEC.

3.1.4 Evaluation par SPR du comportement biochimique des surfaces à plots

Dans la partie précédente, nous avons montré que d'un point de vue structurel, les surfaces obtenues par impression microcontact de 16-MHDA présentent les bonnes topologies. Dans cette partie, nous allons tester leur comportement biochimique, la question posée étant : est ce que les surfaces microstructurées fixent les protéines proportionnellement à la quantité de surface d'or nu ($1-\alpha = 3/4$) et de surface de 16-MHDA ($\alpha = 1/4$) ? Pour y répondre, nous avons procédé à l'adsorption de la BSA puis à l'immobilisation de deux protéines, la BSA et la streptavidine, ainsi qu'à l'étude de l'interaction entre la streptavidine et l'IgG biotinylée.

Nous utilisons le terme « fixation » pour parler indifféremment de l'immobilisation et/ou de l'adsorption d'une protéine.

3.1.4.1 Adsorption et immobilisation de la BSA sur des surfaces microstructurées suivies par SPR

Rappelons que dans le Chapitre II [19], nous avons mesuré en SPR une adsorption de la BSA (2,5 mg/mL) environ vingt fois plus importante sur les surfaces d'or nu (934,0 RU) que sur l'or recouvert d'une SAM de 16-MHDA (52,8 RU). En pondérant ces signaux par les fractions de surface correspondant au fond et aux plots, on attend donc un signal moyen de 713,7 RU. La mesure donne 1741,1 ± 58,6 RU soit 2,5 fois le niveau attendu (Tableau III.4). Il faut souligner que cette valeur est nettement en dehors de l'intervalle défini par les valeurs correspondant aux deux surfaces homogènes. Cette expérience a été effectuée deux fois. Nous ne comprenons pas ce résultat SPR.

Les mesures de l'immobilisation de la BSA (2,5 mg/mL) sur des surfaces homogènes ont montré une efficacité accrue sur les surfaces possédant un tapis moléculaire de 16-MHDA

(1871,5 RU) par rapport à l'or nu (934,0 RU). Si l'on applique à ces valeurs les taux α et 1-α des surfaces à plots, soit un quart de 16-MHDA et trois quart d'or nu, le signal SPR devrait être de 1168,4 RU. La mesure a donné 1275,5 ± 142,7 RU, soit un écart de seulement 5 % par rapport à l'estimation (Tableau III.4).

La seule différence entre les expériences d'immobilisation et d'adsorption d'une protéine est respectivement l'activation ou non des groupements –COOH de la 16-MHDA par une solution aqueuse d'EDC/NHS. On considère que l'or nu se comporte dans les deux cas de la même manière.

L'écart mesuré entre les surfaces homogènes et non homogène peut provenir du comportement des plots de 16-MHDA. Dans le cas d'une immobilisation, les plots se comportent comme les SAM homogènes alors que dans le cas de l'adsorption les plots fixent beaucoup plus de molécules de BSA qu'une SAM. L'excès d'adsorption peut être dû à une activité accrue des bords des plots (à l'intérieur ou autour des plots) ou à la présence de bicouches dans les plots ou autres défauts discutés au Chapitre II.

La même solution a été utilisée en adsorption et en immobilisation, ce qui exclut l'hypothèse de la présence d'amas de BSA dans le premier cas.

Surfaces	Quantité de BSA (RU)	BSA (10^{-3} molécules/nm²)	Surface occupée par une molécule de BSA (nm²)	Couverture de la surface par la BSA (%)
Or nu	934,0	8,5	117	49
SAM de 16-MHDA non activée	52,8	0,5	2000	3
SAM de 16-MHDA après activation par EDC/NHS	1871,5	17,1	59	96
Estimation de l'adsorption sur surfaces à plots	713,7	6,5	154	36
Estimation de l'immobilisation sur surfaces à plots	1168,4	20,7	94	60
Plots de 16-MHDA non activées	1741,1 ± 58,6	15,9 ± 0,5	63,0 ± 2,1	89 ± 3
Plots de 16-MHDA après activation par EDC/NHS	1275,5 ± 147,2	11,6 ± 1,3	86,5 ± 10,0	65 ± 8

Tableau III.4 : fixation de la BSA sur des surfaces homogènes d'or nu, de 16-MHDA non activée et activée par une solution d'EDC/NHS [19]. Valeurs calculées puis mesurées pour des surfaces microstructurées par des plots de 16-MHDA (32 µm de côté) sans ou avec activation par EDC/NHS. Le quart de la surface est recouvert par les plots.

- Pour l'adsorption de la BSA, le signal SPR d'une surface hétérogène ne correspond pas du tout à la moyenne des signaux des surfaces homogènes correspondantes. Il est même supérieur aux valeurs obtenues pour ces surfaces homogènes.
- Pour l'immobilisation de la BSA, cette correspondance est par contre très bonne.

3.1.4.2 Mesure par SPR de la fixation de molécules d'IgG biotinylée par des molécules de streptavidine immobilisées sur des surfaces à plots

Lors des expériences menées sur des surfaces homogènes, nous avions relevé une immobilisation moyenne de la streptavidine (200 µg/mL) de 486,5 ± 29,1 RU sur une surface d'or recouverte de 16-MHDA et une adsorption de 157,0 RU sur une surface d'or nu (Chapitre II) [19]. Nous estimons donc à 239,44 RU l'immobilisation de la streptavidine sur des surfaces à plots. Nous avons mesuré 272,3 ± 22,5 RU (Tableau III.5) soit un écart de 13,7 % pour ces valeurs. Les résultats SPR pour l'immobilisation de la streptavidine sur les surfaces homogènes et hétérogènes sont donc concordants (Figure III.37-a).

Les molécules d'IgG biotinylée injectées à une concentration de 1,2 µg/mL (Figure III.37-b) sur les molécules de streptavidine immobilisées sur les surfaces à plots ont interagi, donnant un signal SPR de 314,2 ± 11,9 RU. L'estimation faite à partir des mesures réalisées sur les surfaces homogènes (702,2 ± 19,0 RU sur la SAM et 162,2 RU sur l'or nu) est de 297,2 RU (Tableau III.5). On constate donc un écart de 5,7 % entre l'estimation et la mesure. La fixation non spécifique de l'IgG biotinylée qui est faible sur des surfaces homogènes (2,3 RU sur la SAM et 5,6 RU sur l'or nu) est beaucoup plus importante sur les surfaces microstructurées (118,8 RU). Cette hausse de la fixation non spécifique peut être due à une activité accrue sur le bord, autour des plots ou sur leurs défauts, comme dans le cas de l'adsorption de la BSA.

Surfaces	Streptavidine fixée (RU)	Fixation spécifique de l'IgG biotinylée (RU)	Fixation non spécifique de l'IgG biotinylée (RU)
Or nu	157,0	162,2	5,6
SAM de 16-MHDA	486,5 ± 29,1	702,2 ± 19,0	2,3
Estimation surface à plots	239,4	297,2	3,1
Plots de 16-MHDA	272,3 ± 22,5	314,2 ± 11,9	118,8

Tableau III.5 : fixation de la streptavidine (200 µg/mL) sur des surfaces homogènes d'or nu (adsorption) et de 16-MHDA (immobilisation) puis fixation de l'interaction de l'IgG biotinylée (1,2 µg/mL) [19]. Valeurs calculées et mesurées sur des surfaces à plots (32 µm de côté). Pour les surfaces à plots, le quart de la surface est recouvert par de la 16-MHDA.

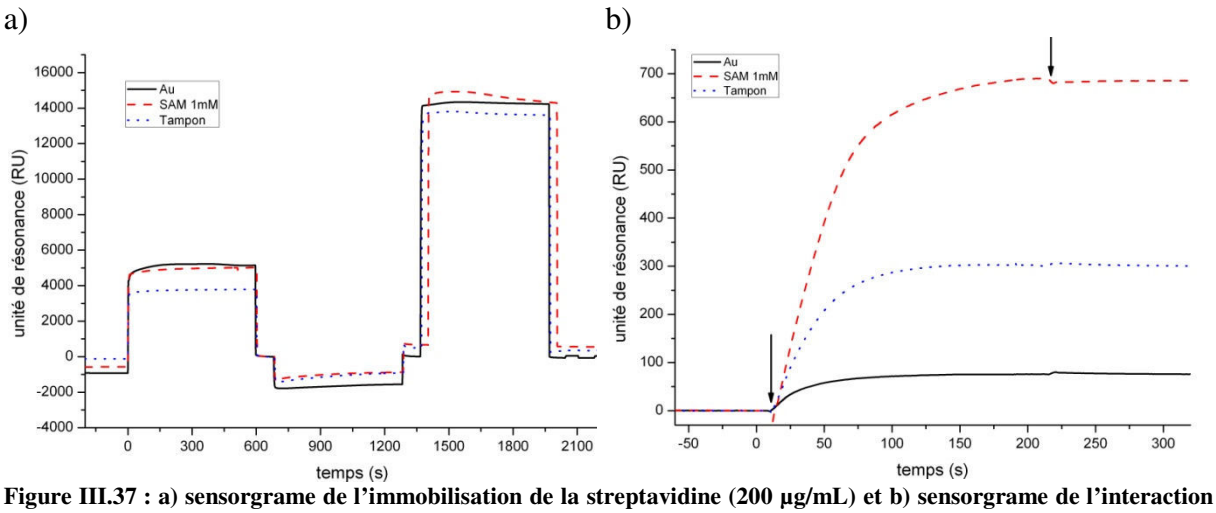


Figure III.37 : a) sensorgrame de l'immobilisation de la streptavidine (200 µg/mL) et b) sensorgrame de l'interaction spécifique entre les molécules d'IgG biotinylée (1,2 µg/mL) et les molécules de streptavidine adsorbées sur l'or nu (courbe pleine noire), immobilisées sur une SAM de 16-MHDA (courbe tiret rouge) et sur une surface microstructurée par des plots de 16-MHDA de 32µm de diamètre (courbe pointillé bleu). Les flèches sur les courbes de fixation de l'IgG biotinylée indiquent le début et la fin de l'injection de cette dernière.

- En SPR, l'immobilisation de la streptavidine sur les plots est conforme aux mesures réalisées avec les surfaces homogènes.
- L'interaction des molécules d'IgG biotinylées avec les molécules de streptavidine immobilisée est elle aussi en accord avec les mesures faites sur les surfaces homogènes.
- Néanmoins, les surfaces à plots présentent une interaction non spécifique plus importante.
- Les surfaces obtenues par impression de plots de 16-MHDA par microcontact sont bien utilisables pour observer l'immobilisation de protéines et suivre des interactions protéine/protéine.

Les surfaces microstructurées ont montré un pouvoir d'immobilisation des protéines (BSA et streptavidine) en accord avec les proportions d'or nu et de 16-MHDA. De même, la quantité de molécules d'IgG biotinylées interagissant avec la streptavidine immobilisée suit les estimations réalisées à partir des résultats obtenue en SPR avec des surfaces homogènes. La fixation non spécifique de l'IgG biotinylée est quant à elle beaucoup plus importante sur

des surfaces microstructurées que sur des surfaces homogènes tout comme l'adsorption de la BSA. Les bords des plots et la présence de défauts sur ceux-ci sont peut-être une explication de cette activité accrue pour l'adsorption des protéines.

4 Observations CONE en immersion

Nous avons effectué des observations de plots de différentes épaisseurs entre polariseur et analyseur croisés ainsi que sans polariseur. Le contraste entre le fond et les plots varie fortement en fonction de l'épaisseur, de la longueur d'onde et de la polarisation de la lumière. Pour mesurer la stabilité de la fonctionnalisation par microcontact à la suite d'une immersion prolongée, nous avons mesuré la variation d'intensité des plots et du fond au court du temps sous un flux d'eau stérile Versol ®. Enfin nous avons étudié la variation de l'intensité engendrée par le changement d'indice de la solution en variant la concentration d'une solution de glycérol puis en variant la salinité du tampon en faisant des aller-retours entre l'eau Versol ® et l'HBS-P+.

Toutes les micrographies CONE présentées par la suite ont été obtenues sur des couches d'or de 7 nm avec une balance des blancs de la caméra à 3200 K.

4.1 Effet de la polarisation de la lumière

La théorie SEEC est basée sur la non dépolarisation de la lumière lors de sa réflexion sur la surface entre analyseur et polariseur croisés (Figure III.38-a). Nous nous sommes aperçus qu'avec les couches d'or que nous utilisons il était également possible de visualiser des plots de 16 Å d'épaisseur avec un bon contraste sans polarisation de la lumière (Figure III.38-b). En l'absence de polarisation, la profondeur de champ est plus importante et la mise

au point plus facile. La planéité de la surface pose moins de problèmes qu'entre polariseur et analyseur croisés. L'absence des filtres polariseurs fait que l'intensité lumineuse arrivant à la caméra est beaucoup plus importante. Le temps d'exposition doit être fortement diminué (220 ms en lumière non polarisée contre 3,2 s entre polariseur et analyseur croisés) ainsi que l'intensité de la source (d'un facteur 4) pour éviter la surexposition de la caméra. Il est par conséquent possible de réaliser le suivi de cinétiques beaucoup plus rapides en mode non polarisé.

a) b)

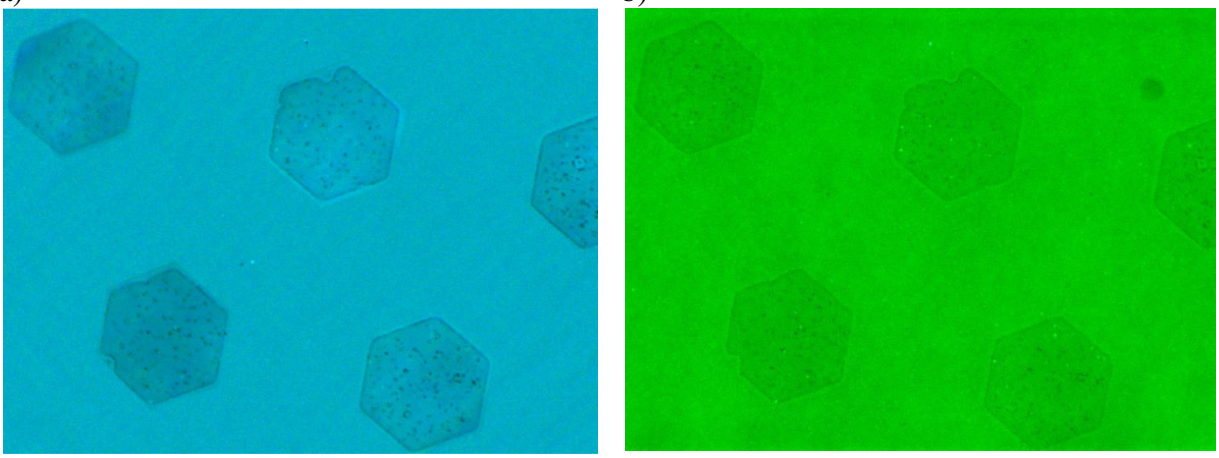


Figure III.38 : a) micrographie CONE entre polariseur et analyseur croisés et b) micrographie CONE des mêmes plots en lumière non polarisée sur une couche de 7 nm d'or immergé dans une solution d'HBS-P+.

Le contraste entre polariseur et analyseur croisés est légèrement meilleur que celui sans polarisation (Figure III.39). L'intensité du rouge est par contre très faible. En lumière non polarisée, le contraste bleu est légèrement positif (+ 0,2 %). Pour d'autres surfaces de même épaisseur d'or (7 nm) le contraste bleu a été mesuré légèrement négatif. On remarque également en lumière polarisée la présence de stries apparaissant avec la défocalisation.

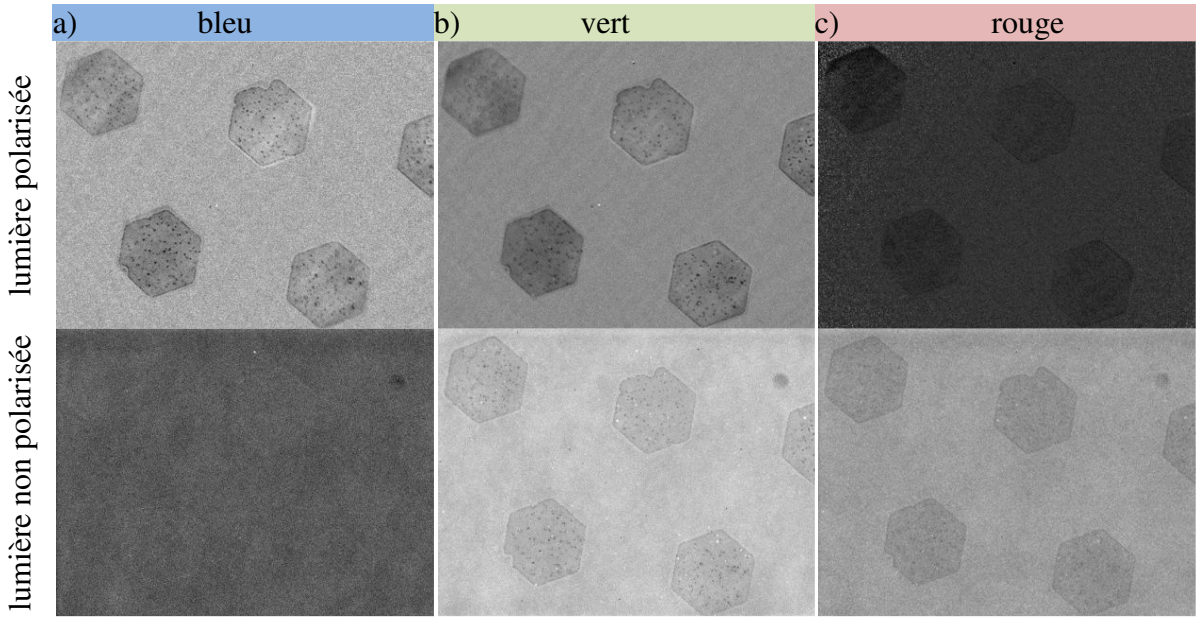


Figure III.39 : composantes RVB des micrographies CONE de plots de 16-MHDA de 32 µm de large polariseurs croisés (en haut) et sans polariseur (en bas), avec une couche de 7 nm d'or immergée dans de l'HBS-P+.

- L'amplification de contraste CONE en microscopie en réflexion est possible avec ou sans polariseur/analyseur croisés.
- En lumière non polarisée, l'intensité est plus importante. La composante bleue présente un contraste faiblement positif, les autres composantes présentant un contraste négatif.
- Entre polariseur et analyseur croisés, le contraste est un peu plus important, mais l'intensité est beaucoup plus faible dans les trois couleurs (RVB).

4.2 Observation de plots de différentes épaisseurs

Nous avons effectué des impressions par microcontact de plots d'acide 3-mercaptopropionique (3-MPA), d'acide 11-mercaptoundécapropionique (11-MUA) et d'acide 16-mercaptohexadécanoïque (16-MHDA). Ces plots ont été observés par AFM en mode tapping et par microscopie CONE en immersion dans l'HBS-P+.

En microscopie AFM, les plots de 3-MPA sont à peine visibles en topographie. Une monocouche de 3-MPA mesure 3 Å d'épaisseur [20], ce qui correspond à la rugosité de nos surfaces d'or nu. Les plots sont par contre bien visibles en imagerie de phase. En imagerie de phase, les plots apparaissent plus sombres que le fond (déphasage négatif), ceci pour les trois longueurs de chaîne utilisées. Pour les plots de 11-MUA et de 16-MHDA, nous retrouvons les épaisseurs de la littérature, à savoir 11 Å pour les premiers et 16 Å pour les seconds [20]. On notera que l'épaisseur de la couche en Å suit le nombre d'atomes de carbone de la molécule.

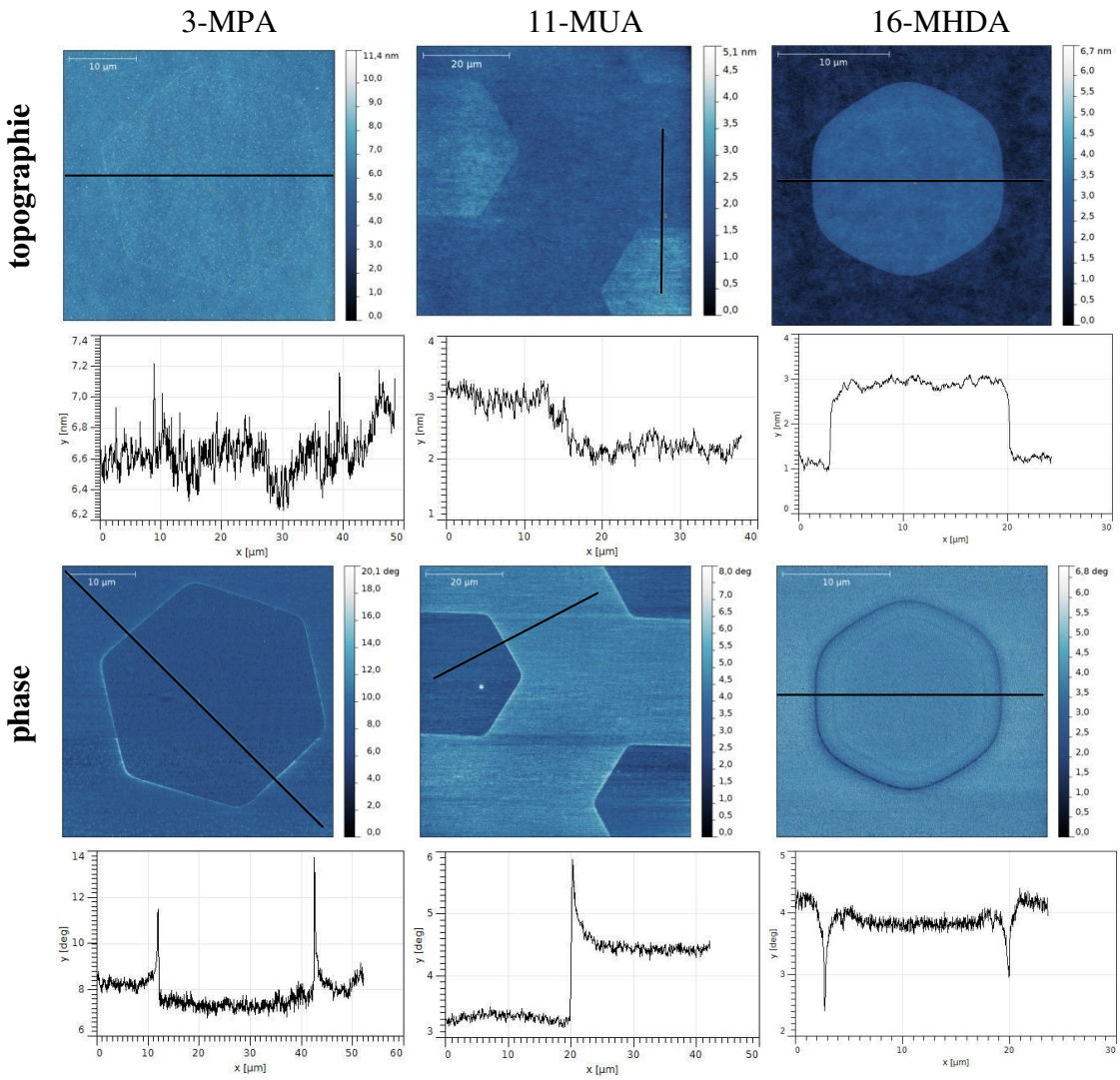


Figure III.40 : micrographies AFM de plots de 3-MPA, de 11-MUA et de 16-MHDA avec les profils associés.

En microscopie CONE en immersion, les plots de 3-MPA sont peu ou pas visibles sans correction des images à cause de l'hétérogénéité de l'éclairage. Pour être en mesure de les observer, il convient de faire une « shading correction ». La shading correction consiste à enregistrer une image puis à diviser les autres images par celle-ci. Cette opération sert à corriger les défauts de l'éclairage ainsi que les tâches du microscope et elle est intégrée dans le logiciel d'acquisition AxioVision que nous utilisons. Dans le canal de microfluidique, toute la superficie de la biopuce est recouverte de plots. Si l'on réalise la shading correction à partir d'une surface à plots, on obtient le genre d'image de la Figure III.41-b. Cette image a été enregistrée sur la même surface que celle utilisée comme référence. On observe des plots sombres et clairs. Les uns proviennent de la référence et les autres sont physiquement présents sur la surface. En comparant les micrographies avant et après correction (Figure III.41), on remarque que les plots clairs (au centre de l'image) sont présents sur les deux micrographies. Nous en concluons que les plots de 3-MPA présentent un contraste positif contrairement aux plots de 16-MHDA observés précédemment.

La zone de recouvrement entre les plots de l'image observés (en clairs) et ceux de l'image utilisée pour la correction (en sombre) présente une intensité identique à celle du fond de l'image. C'est particulièrement visible sur l'image en 3D de la figure (Figure III.42). Cela prouve la bonne homogénéité des plots sur la surface.

a) b)

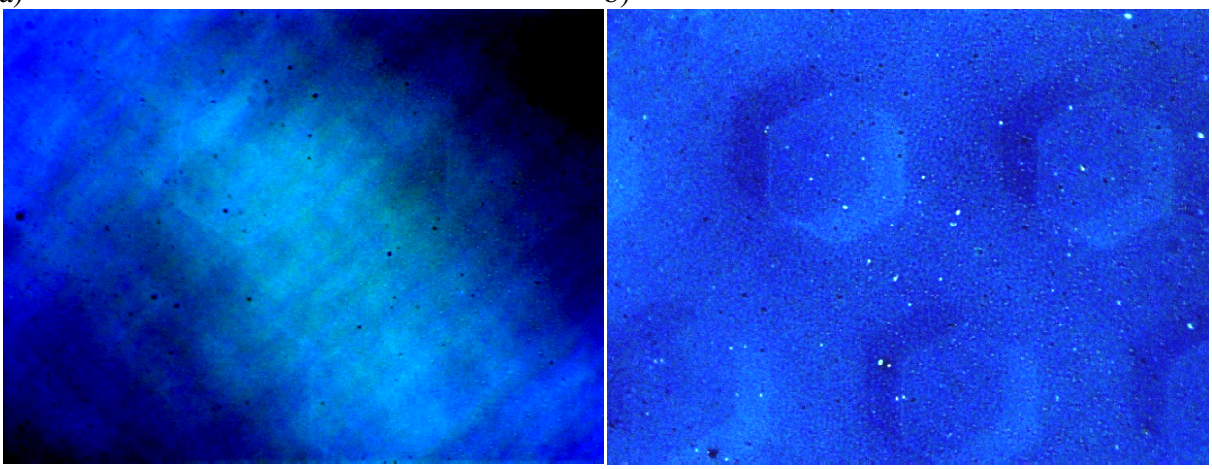


Figure III.41 : micrographie CONE des mêmes plots de 3-MPA a) avant et b) après shading correction faite sur une autre zone de la surface qui comportait des plots.

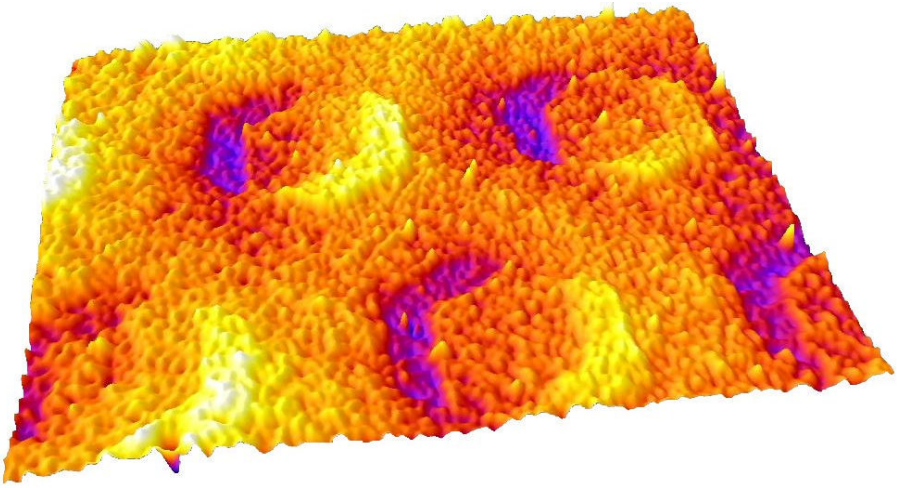


Figure III.42 : mise en 3D de la composante verte de la micrographie CONE après shading correction de la Figure III.41-b.

Les micrographies qui suivent, présentant des plots de 3-MPA et 11-MUA, ont été obtenues en immersion dans HBS-P+, après enregistrement d'une image de référence sur une surface d'or nu pour la shading correction. Sur les images RVB de la Figure III.43, on relève une inversion du contraste entre les plots de 11-MUA et ceux de 16-MHDA avec ou sans polarisation de la lumière et une inversion de contraste entre les plots de 3-MPA et de 11-MUA en lumière non polarisée seulement.

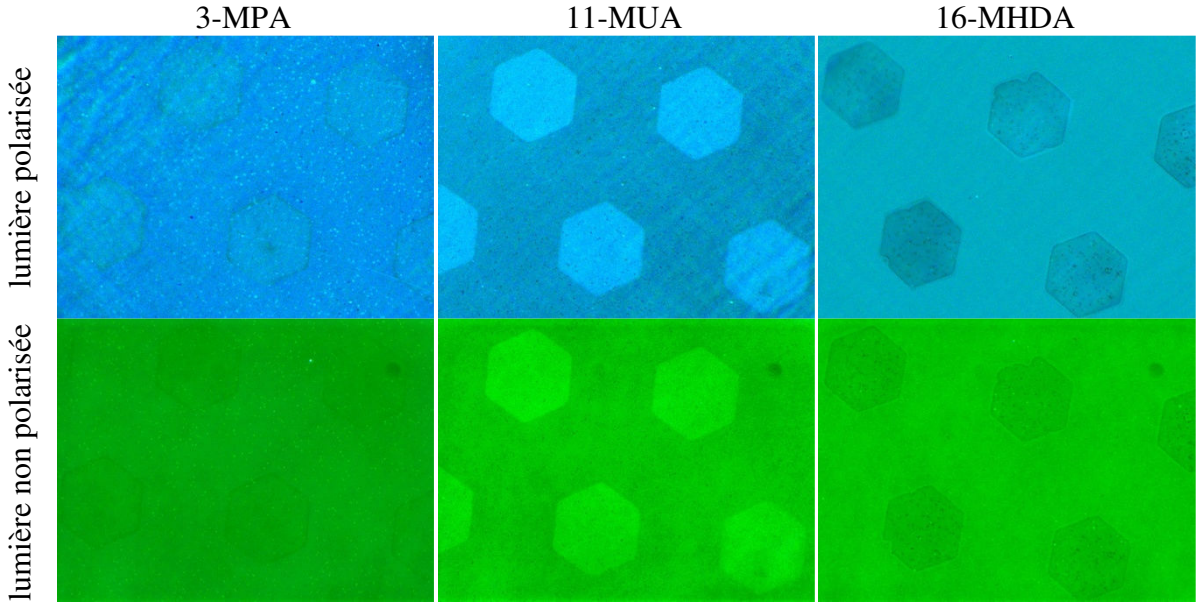


Figure III.43 : micrographies CONE obtenues pour des plots de 3-MPA, 11-MUA et 16-MHDA entre polariseur et analyseur croisés ou en lumière non polarisée sur des surfaces possédant une couche de 7 nm d'or.

Ces observations d'inversion du contraste entre le fond et les plots de 3 Å, de 11 Å et de 16 Å est contraire à la linéarité du contraste en fonction de l'épaisseur du plot prévue par le calcul dans la partie théorique de ce chapitre (paragraphe 2.1.3, p.86).

- Non linéarité du contraste mesuré en fonction de l'épaisseur des plots.
- Désaccord avec la théorie sur ce point.

En lumière polarisée (Figure III.44), on constate une inversion du contraste de la composante rouge entre les plots de 3 Å (contraste positif) et ceux de 11 Å (contraste négatif). Pour la composante verte, cette inversion de contraste apparaît entre les plots de 11 Å et ceux de 16 Å. La composante bleue présente quant à elle une double inversion du contraste. En effet, les plots de 3 et 16 Å sont plus sombres que le fond alors que les plots de 11 Å sont nettement plus clairs que le fond. Ces caractéristiques sont résumées par les courbes pleines de la Figure III.46.

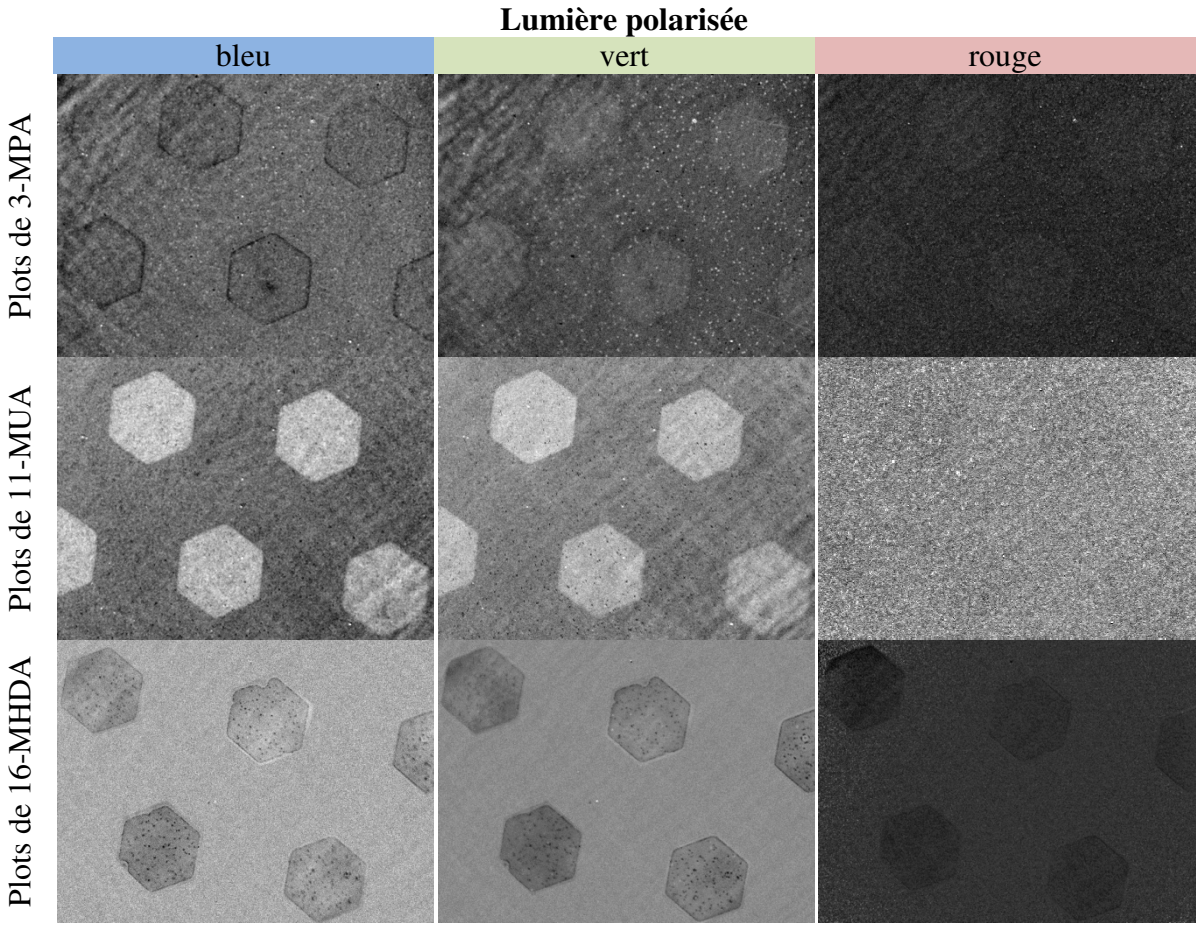


Figure III.44 : composante RVB des micrographies CONE obtenues entre polariseur et analyseur croisés pour des plots de 3-MPA, 11-MUA et 16-MHDA sur des surfaces possédant une couche de 7 nm d'or.

En lumière non polarisée (Figure III.45), on constate un contraste rouge nul pour les plots de 3 Å alors que les deux autres sont clairement négatifs. Les contrastes obtenus pour les plots de 11 Å sont tous positifs avec un contraste bleu très faible. Pour les plots de 16 Å, on observe une inversion du contraste entre le bleu (contraste positif) et le vert et le rouge (contrastes négatifs). Il y a donc une double inversion du contraste pour la composante verte. Quelle que soit l'épaisseur ou la composante, le contraste en lumière non polarisée est plus faible qu'en lumière polarisée. Ces tendances sont résumées par les courbes pointillées de la Figure III.46.

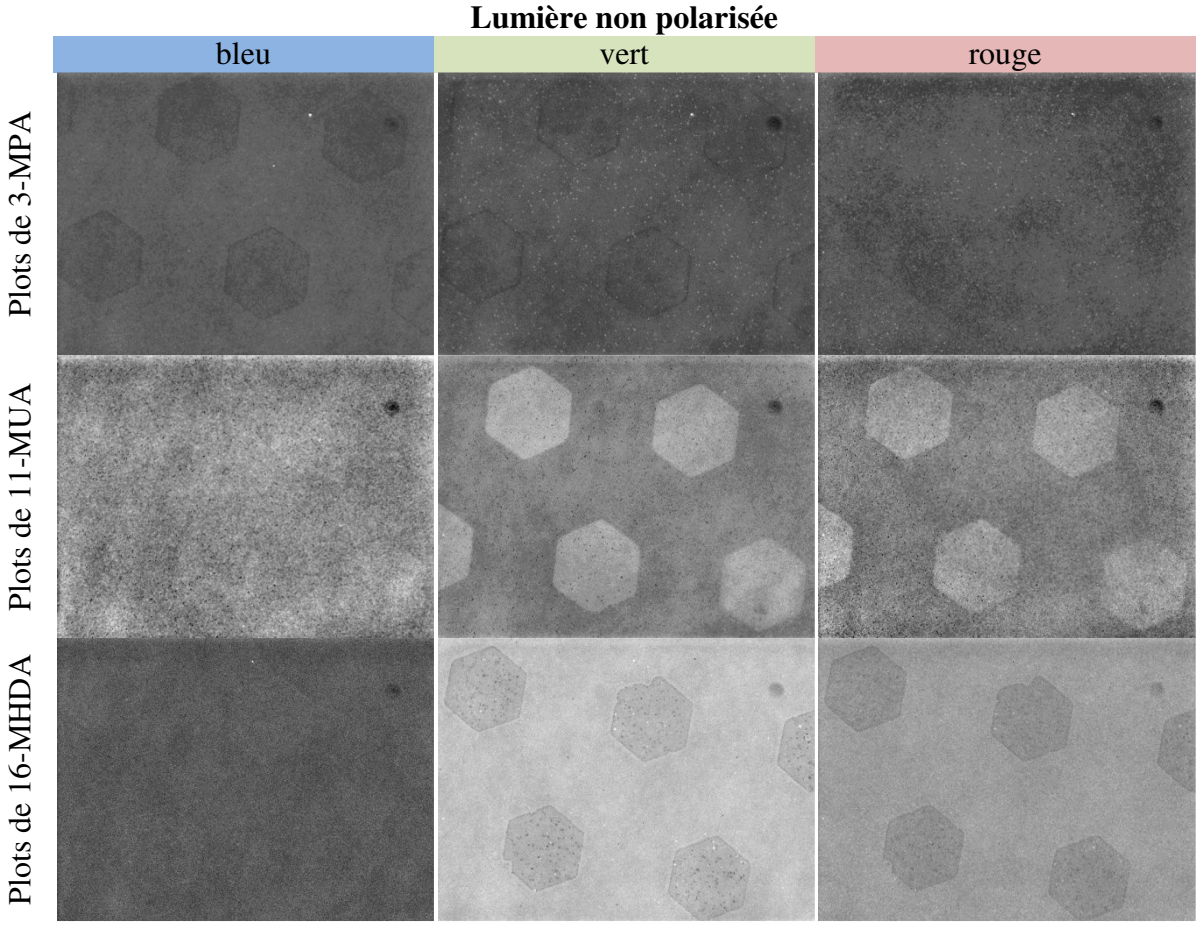


Figure III.45 : composante RVB des micrographies CONE obtenues en lumière non polarisée pour des plots de 3-MPA, 11-MUA et 16-MHDA sur des surfaces possédant une couche de 7 nm d'or.

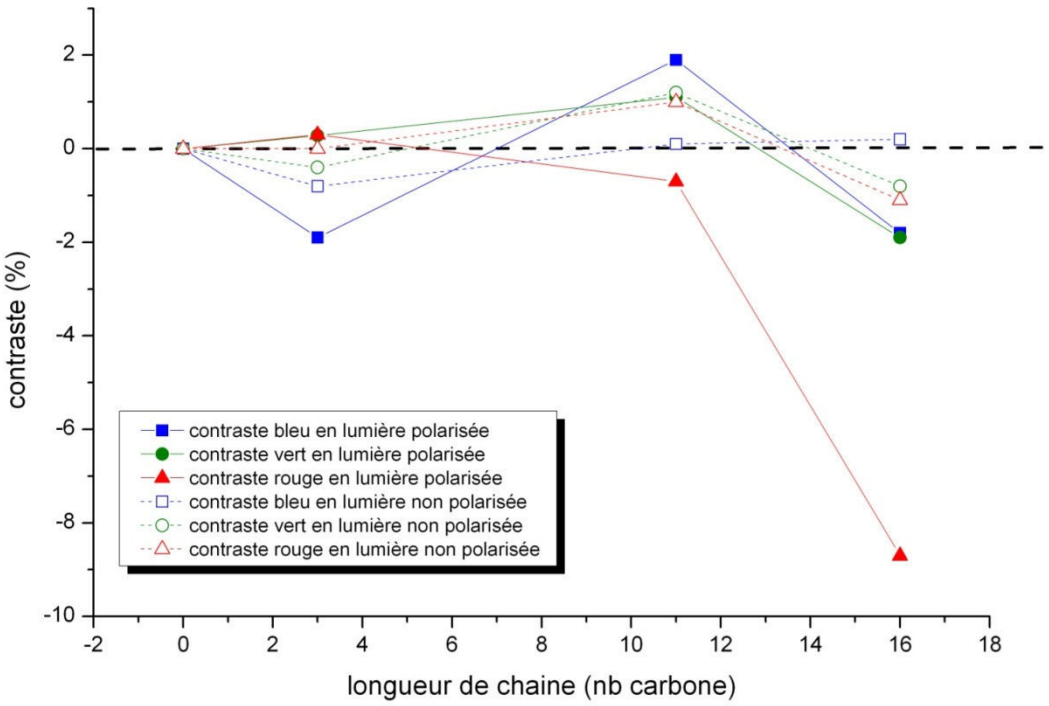


Figure III.46 : évolution du contraste des plots visualisés par microscopie CONE en fonction de la longueur de la chaîne carbonée du thiol déposée par impression microcontact sur une surface d'or de 7 nm.

Il est très troublant de n'obtenir dans aucun cas une variation monotone du contraste avec la longueur de chaîne.

- La microscopie CONE est utilisable pour l'observation en immersion sur l'or d'objets de quelques angströms d'épaisseur.
- Le |contraste| est plus faible en lumière non polarisée.
- Le contraste des plots n'est jamais une fonction monotone de leur épaisseur, quel que soit le mode (polarisé ou non polarisé) et la composante de couleur considérés.

4.3 Dérive du signal au cours du temps

4.3.1 En CONE entre polariseur et analyseur croisés (P)

Lors d'une immersion prolongée de la surface sous un flux d'eau stérile à 55 µL/min, nous avons constaté une perte de contraste conséquente (Figure III.47) qui pourrait correspondre à une relaxation exponentielle avec un temps caractéristique de l'ordre de 2 h. Cette dérive est telle qu'on observe une inversion du contraste rouge entre polariseur et analyseur croisés entre le début et la fin de cette cinétique. Cette inversion du contraste intervient au bout de 133 min. Les images de la composante bleue ont un bruit supérieur à celles des images de la composante verte. Elles présentent par contre un meilleur contraste (plus grand en valeur absolue et moins bruité). Nous utiliserons dans la suite du document le terme |contraste| pour exprimer la valeur absolue du contraste et garderons le terme contraste pour sa valeur algébrique.

Sur la Figure III.47, la variation d'intensité générale (plot et fond) entre les premières et les dernières images de la cinétique est la conséquence des fluctuations de la source. Les intensités présentées ont été corrigées, mais pas les images.

Pour les composantes bleue et verte, on remarque une légère augmentation de l'intensité des plots et du fond sur les 37 premières minutes. Pour la composante rouge, il est plus difficile de statuer compte tenu du bruit trop important. L'intensité des plots est ensuite stable sur tout le reste de la cinétique. L'intensité du fond diminue par contre à la vitesse de 0,77 NB/min et de 0,82 NV/min. La chute du |contraste| n'est donc pas la conséquence d'une désorption des plots. Elle est par contre compatible avec une pollution du fond.

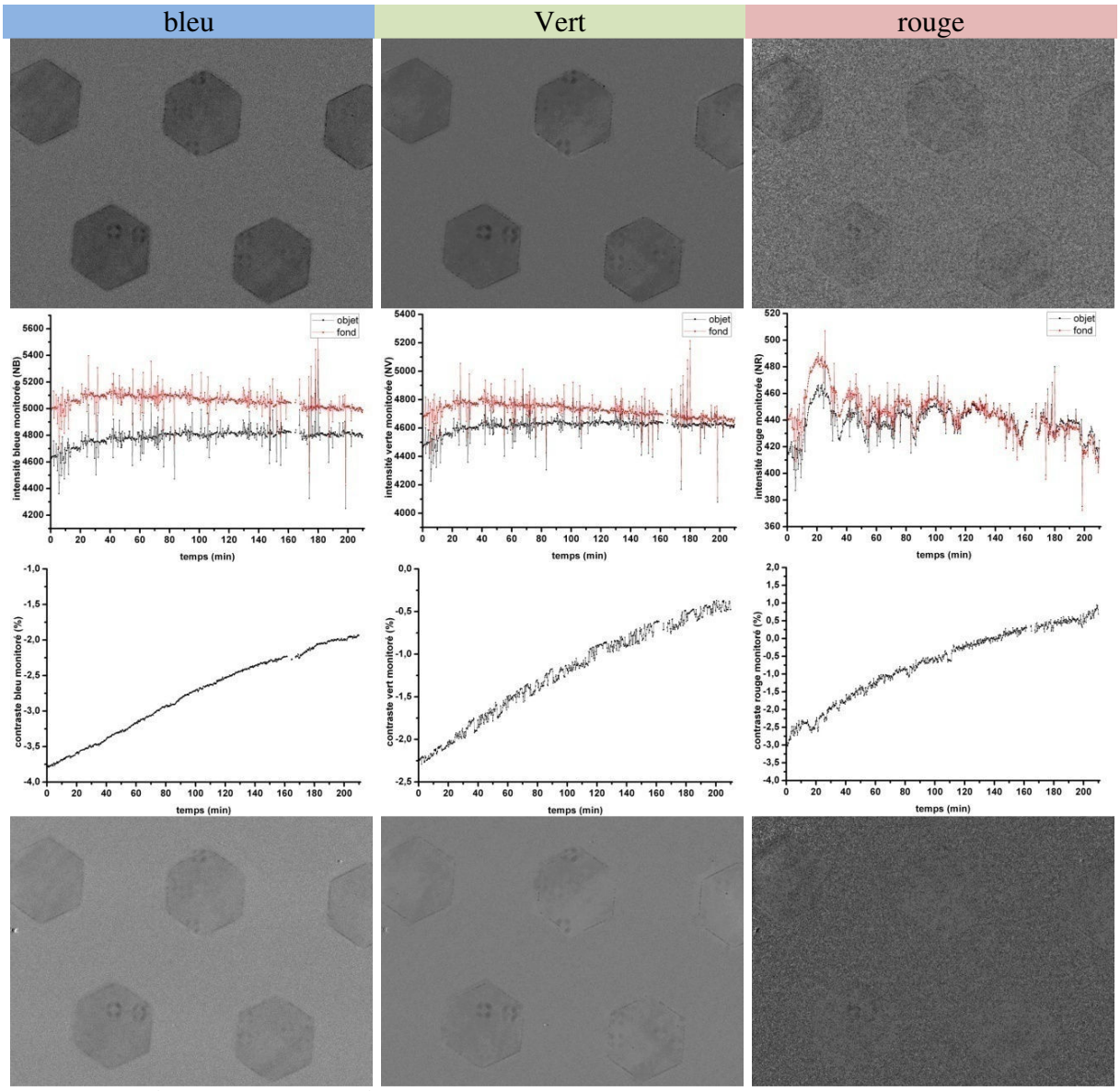


Figure III.47 : évolution de l'intensité (du fond en rouge et des plots en noir) et du contraste au cours du temps pendant une injection d'eau Versol ® à 55 µL/min pour chaque composante de l'image obtenue entre polariseur et analyseur croisés. La première ligne d'images correspond aux micrographies CONE en début de cinétique pour chaque composante et la seconde en fin de cinétique. Mesures menées sur des surfaces de 7 nm d'or.

Cette perte de |contraste| n'est pas présente sur toute la surface, mais uniquement sur la zone éclairée. Le contraste reste intact sur les autres zones de la surface. On observe la présence de la marque du diaphragme de champ après une exposition suffisamment longue (Figure III.48). Le contraste dans la zone protégée à gauche est bon alors que celui de droite est très amoindri. Cette dérive du contraste n'est donc pas due à la désorption des plots ni à une simple adsorption sur l'or. C'est un phénomène photo-induit. Plusieurs hypothèses sont

envisagées : l'infiltration d'une couche d'eau entre l'or et le verre, l'adsorption photo-induite ou la restructuration thermique de l'or.

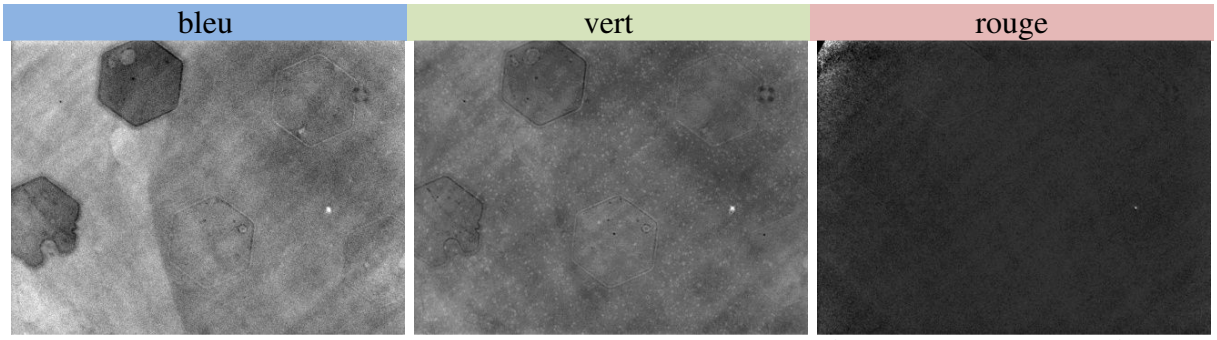


Figure III.48 : marque du diaphragme de champ dans les trois composantes après une observation prolongée dans la région à droite de l'image. Mesures menées sur des surfaces de 7 nm d'or.

Nous avons réalisé la même expérience en coupant l'illumination pendant 30 min, après 30 min d'éclairage. La dérive reprend au même niveau qu'avant l'extinction de la lampe (Figure III.49). Cet effet de la lumière est donc irréversible, ce qui va dans le sens d'une transformation photo-induite.

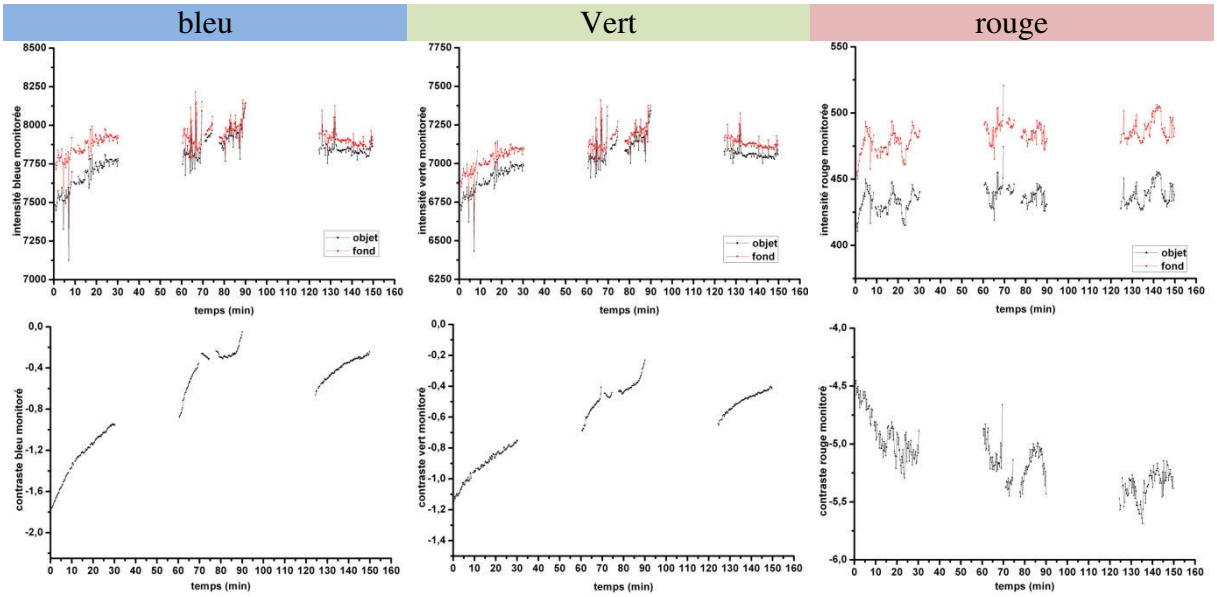


Figure III.49 : évolution de l'intensité (du fond en rouge et des plots en noir) et du contraste au cours du temps pendant une injection d'eau Versol ® à 55 µL/min en fonction de la composante de l'image obtenue entre polariseur et analyseur croisés. Les plages de 30 min sans point de mesures correspondent aux périodes d'extinction de la source Mesures menées sur des surfaces de 7 nm d'or.

- En lumière polarisée, l'intensité du fond chute alors que celle des plots reste constante.
- La chute du |contraste| n'a lieu que sur la zone illuminée.
- La dérive du contraste reprend au même niveau après interruption de l'illumination, elle est donc irréversible.

4.3.2 En lumière non polarisée

Comme nous l'avons précisé précédemment, nous avons aussi un très bon contraste en lumière non polarisée. Nous avons suivi son évolution dans les mêmes conditions (Figure III.50). Au départ, le |contraste| bleu est le plus faible (-0,8 %). L'intensité bleue du fond et des plots s'accroît avec le temps, engendrant une augmentation du |contraste|. C'est l'inverse pour les composantes verte et rouge pour lesquelles le |contraste| diminue.

Pour les trois composantes, la dérive du contraste est beaucoup plus faible qu'en lumière polarisée (Tableau III.6).

Aucune marque du diaphragme de champ n'a d'ailleurs été observée après la mesure.

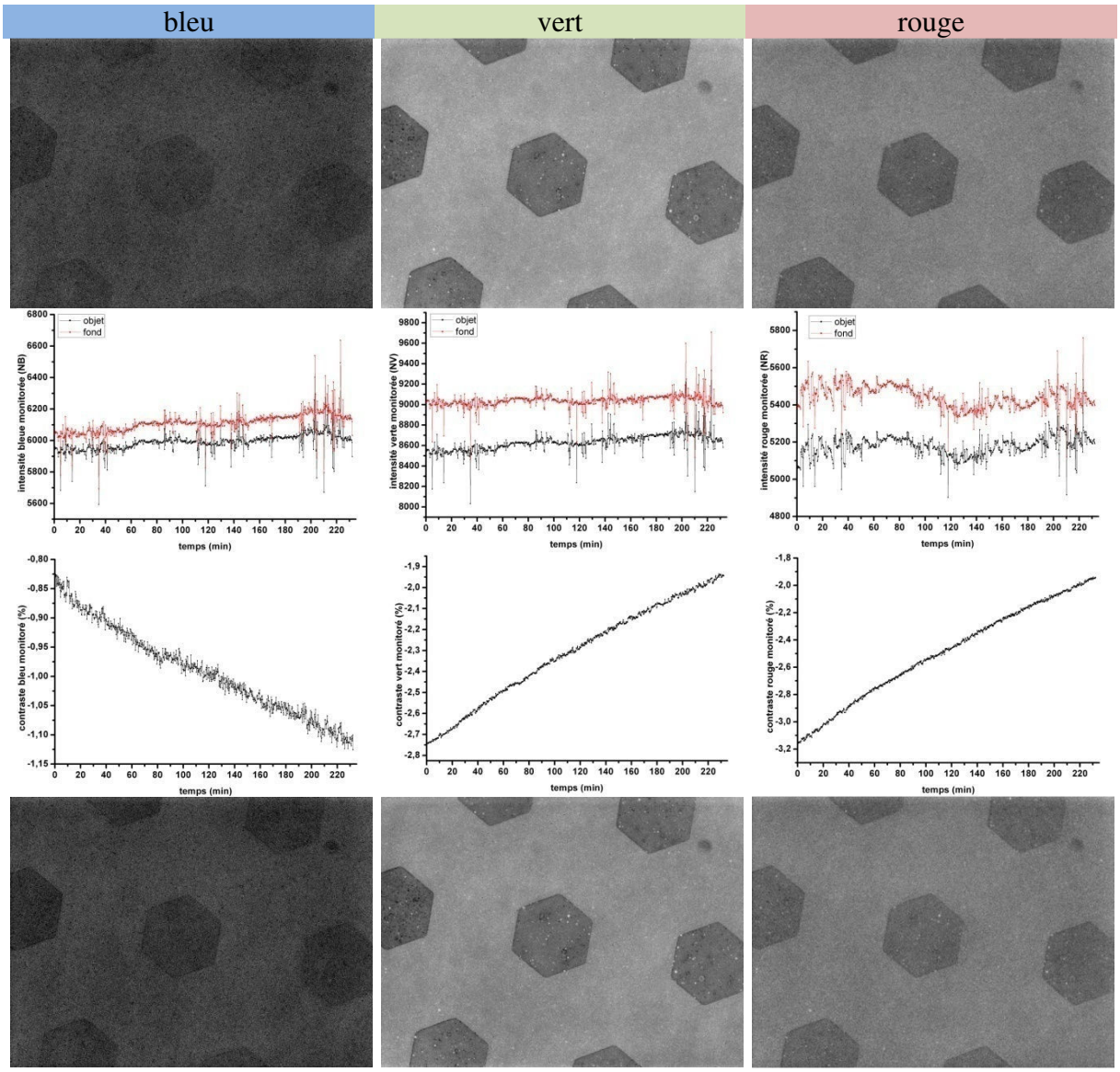


Figure III.50 : évolution de l'intensité (du fond en rouge et des plots en noir) et du contraste au cours du temps pendant une injection d'eau Versol ® à 55 µL/min pour chaque composante de l'image obtenue sans polarisation de la lumière. La première ligne d'images correspond au début de la cinétique pour chaque composante et la seconde à la fin de la cinétique. Mesures menées sur des surfaces de 7 nm d'or.

	Lumière polarisée		Lumière non polarisée	
	dC (%/min)	dC/C (%/min)	dC (%/min)	dC/C (%/min)
Bleu	$- 8{,}4.10^{-3}$	$+ 2{,}2.10^{-3}$	$+ 1{,}2.10^{-3}$	$- 1{,}5.10^{-3}$
Vert	$- 7{,}8.10^{-3}$	$+ 3{,}5.10^{-3}$	$- 3{,}2.10^{-3}$	$+ 1{,}2.10^{-3}$
Rouge	$- 17{,}0.10^{-3}$	$+ 5{,}7.10^{-3}$	$- 5{,}4.10^{-3}$	$+ 1{,}7.10^{-3}$

Tableau III.6 : dérive du contraste mesuré entre le fond et les plots sous un flux d'eau Versol ® à 55 µL/min.

- La dérive du contraste est plus grande en lumière polarisée qu'en lumière non polarisée.

4.4 Variation de l'intensité en fonction de l'indice de réfraction des solutions : « Bulk effect » en microscopie CONE

En SPR, on observe de forts sauts du signal à la suite de l'injection des différentes solutions, dus aux changements d'indice de réfraction du liquide. Pour évaluer l'influence de ces changements d'indice en microscopie CONE, nous avons réalisé des injections de solution de glycérol de concentration croissante. Lors d'une seconde expérience, nous avons observé l'effet de la salinité du tampon de course en faisant des allers-retours entre l'eau Versol ® et l'HBS-P+.

4.4.1 Injections successives de solutions de glycérol

L'indice de réfraction des solutions de glycérol est bien connu et se prêtent donc bien à une étude de la variation de l'intensité en fonction de l'indice de réfraction. L'indice de réfraction varie de manière quasi linéaire avec la concentration (Figure III.51, [21]). Les valeurs exactes sont données en annexe (p.161). Dans la littérature, on trouve dn/dc = 0,115 mL/mg pour le glycérol [22]. Cette valeur n'est valable que pour une concentration en glycérol dans l'eau comprise entre 0 et 5 % soit jusqu'à une concentration de 50 mg/mL. Pour une plage de 0 à 100 % comme sur la Figure III.51, on obtient dn/dC = 0,142 mL/mg avec un coefficient de régression linéaire de 99,85 %. Comme on peut le voir sur la Figure III.51, la pente est légèrement inférieure pour des concentrations faibles, ce qui explique les différences trouvées dans la littérature.

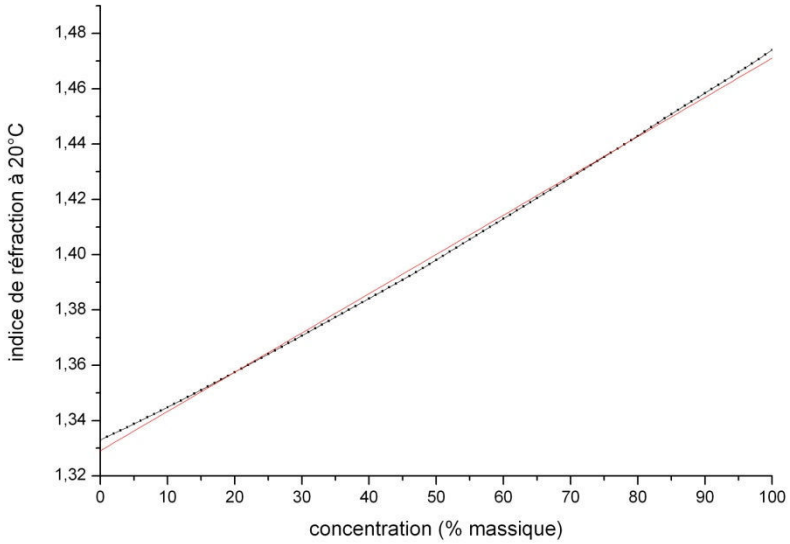


Figure III.51 : évolution de l'indice de réfraction du glycérol en fonction de la concentration de la solution à 20 °C [23]. ***La courbe rouge est la régression linéaire calculée (R^2=99,85 %).***

À la suite de l'injection de glycérol, les intensités des trois composantes diminuent entre polariseur et analyseur croisés (Figure III.52-a). On est bien dans le cadre d'un contraste négatif où plus il y a de matière sur la surface et plus l'intensité est faible. La composante verte montre les sauts d'intensité les plus grands. Lorsque l'on injecte l'eau à la fin de la mesure, on retrouve une intensité proche de celle de départ. Il n'y a donc pas eu ou peu de fixation du glycérol sur la surface.

Pour l'expérience réalisée sans polariseur, on constate une inversion des sauts d'intensité entre la composante bleue (sauts positifs) et la composante rouge (saut négatifs) (Figure III.52-b). La composante verte de ce mode ne montre que très peu de variation d'intensité avec l'indice.

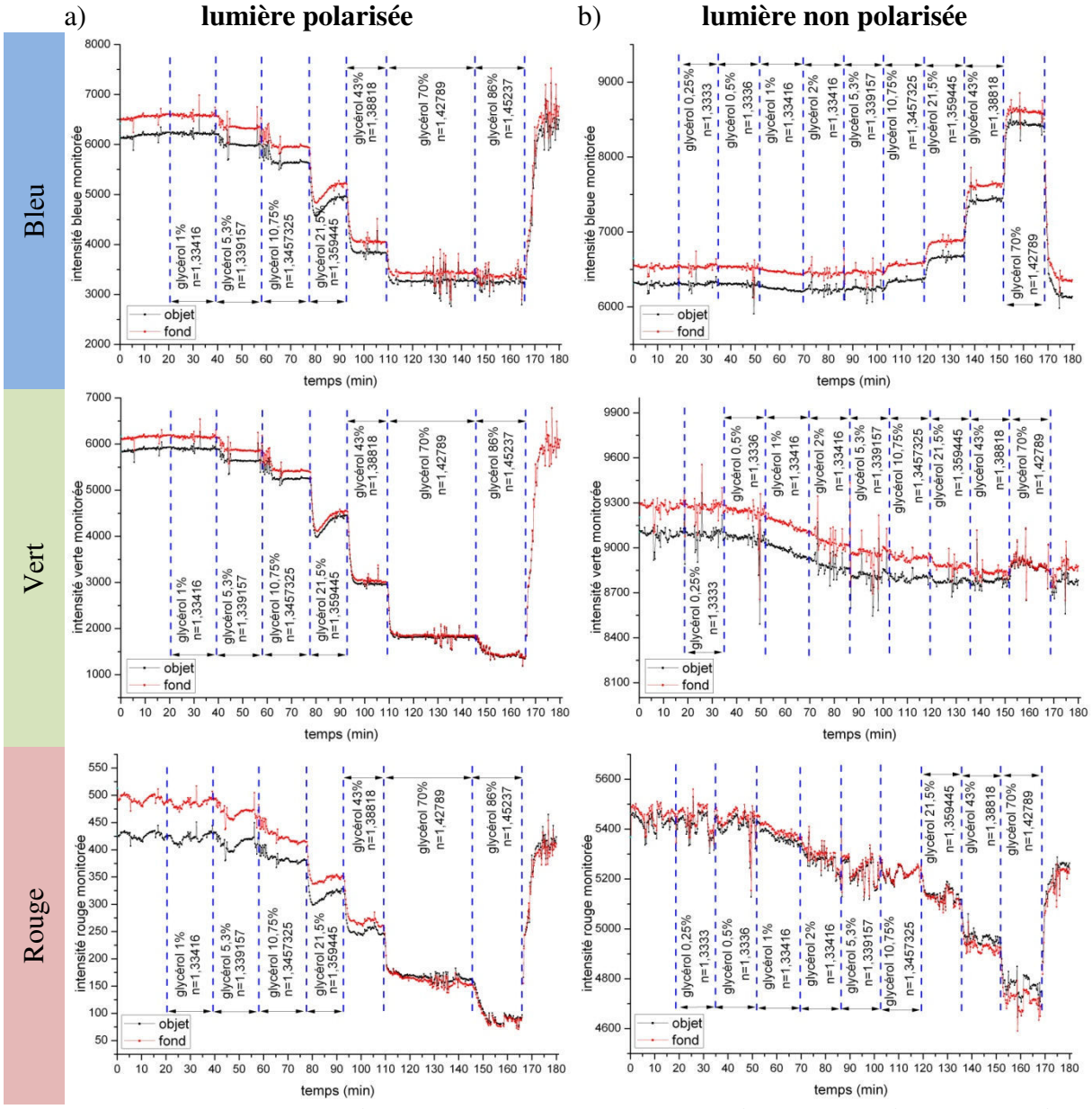


Figure III.52 : variation de l'intensité a) entre polariseur et analyseur croisés et b) en lumière non polarisée en fonction de la concentration en glycérol, de la zone prise en compte (fond en rouge et plots en noirs) et de la composante RVB de l'image avec une balance des blancs de 3200 K. Nous avons débuté et fini la mesure par l'injection d'eau Versol ®. Mesures menées sur des surfaces de 7 nm d'or.

Pour observer une variation franche de l'intensité, il faut une concentration de la solution de glycérol supérieure à 1%. Les intensités en microscopie CONE P et NP sont donc peu sensibles aux variations d'indice des solutions. On observe également peu de variation des contrastes compte (Figure III.53).

L'intensité des plots suit celle du fond. La chute d'intensité du fond peut être mise sur le compte de la dérive. On constate une inversion du contraste rouge pour les deux modes. Elle intervient après 110 min en lumière polarisée et après 119 min en lumière non polarisée, soit approximativement au même instant que dans l'expérience précédente visant à apprécier la dérive (paragraphe 4.3, p.133). L'écart peut s'expliquer par le temps de préparation de la mesure qui n'a pas été forcément le même pour les deux expériences. Durant ce laps de temps, la surface a été éclairée, mais aucune image n'a été enregistrée. Cela confirmerait l'importance de la durée d'éclairage dans le phénomène de dérive du signal.

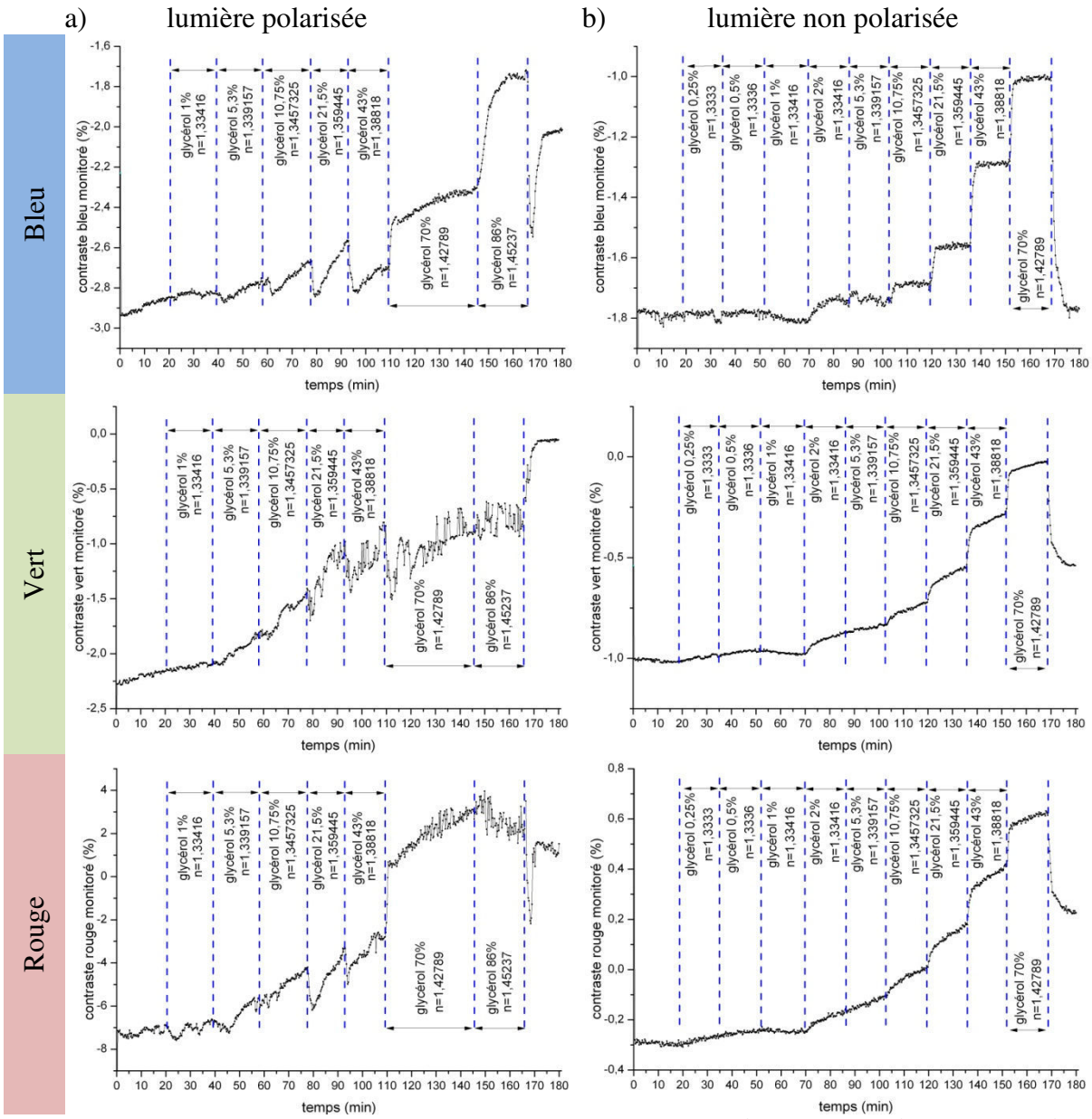


Figure III.53 : variation du contraste a) entre polariseur et analyseur croisés et b) en lumière non polarisée en fonction de la concentration en glycérol pour chaque composante RVB de l'image, avec une balance des blancs à 3200 K. Nous avons débuté et fini la mesure par l'injection d'eau Versol ®. Mesures menées sur des couches de 7 nm d'or.

- Pas de variation de l'intensité supérieure au bruit pour des injections de glycérol à des concentrations inférieures à 1 %.
- Les plots et le fond sont affectés de la même manière par le changement d'indice soit peu de variation du contraste.
- La microscopie en lumière polarisée est plus sensible aux variations de l'indice de réfraction de la solution que la microscopie en lumière non polarisée.
- En lumière polarisée, la composante verte montre les sauts d'intensité les plus grands.
- En lumière non polarisée, il y a une inversion des sauts d'intensité entre la composante rouge et la composante bleue. La composante verte est quant à elle pratiquement insensible aux variations d'indices des solutions.

Silin *et al.* ont effectué une expérience identique sur un montage SPR [24]. Ils ont utilisé un montage SPR non commercial à variation d'angle. Dans leurs mesures, le signal SPR est exprimé en pixel. Un pixel correspond à une variation d'angle de 0,0048 °. On peut donc faire la conversion en RU (1pix = 48 RU). On constate (Figure III.55-b) une variation linéaire du signal SPR en fonction de la concentration de 184,5 RU/(mg/mL). En microscopie CONE, la variation d'intensité la plus importante sur cette gamme de concentration (de 0 à 40 mg/mL) est de 8 % pour la composante verte entre polariseur et analyseur croisés.

a) b)

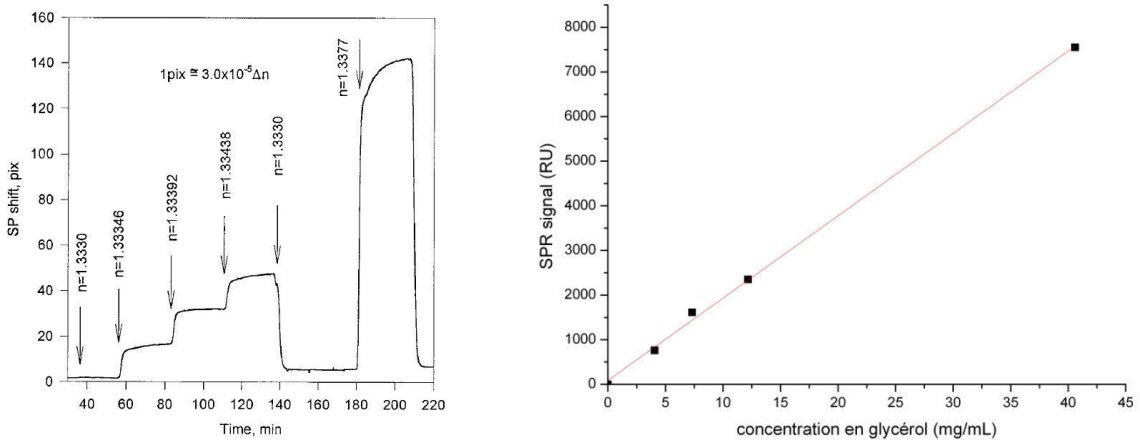


Figure III.54 : a) variation de l'angle SPR en fonction de l'indice de réfraction de la solution de glycérol. Les flèches indiquent les injections de glycérol successives. Les concentrations de glycérol utilisées sont : 0 ; 4,06 ; 7,33 ; 12,18 et 40,6 mg/mL. [24] b) Signal SPR exprimé en RU en fonction de la concentration massique en glycérol.

En CONE, l'intensité varie également de manière linéaire avec la concentration pour les trois composantes jusqu'à une concentration de 40 % soit 400 mg/mL (R^2 > 99 %). La composante rouge suit cette loi linéaire sur toute la gamme de concentration testée (Figure III.57). En lumière non polarisée, la variation linéaire de l'intensité est au contraire observée pour les concentrations élevées (> 5 %, soit > 50 mg/mL).

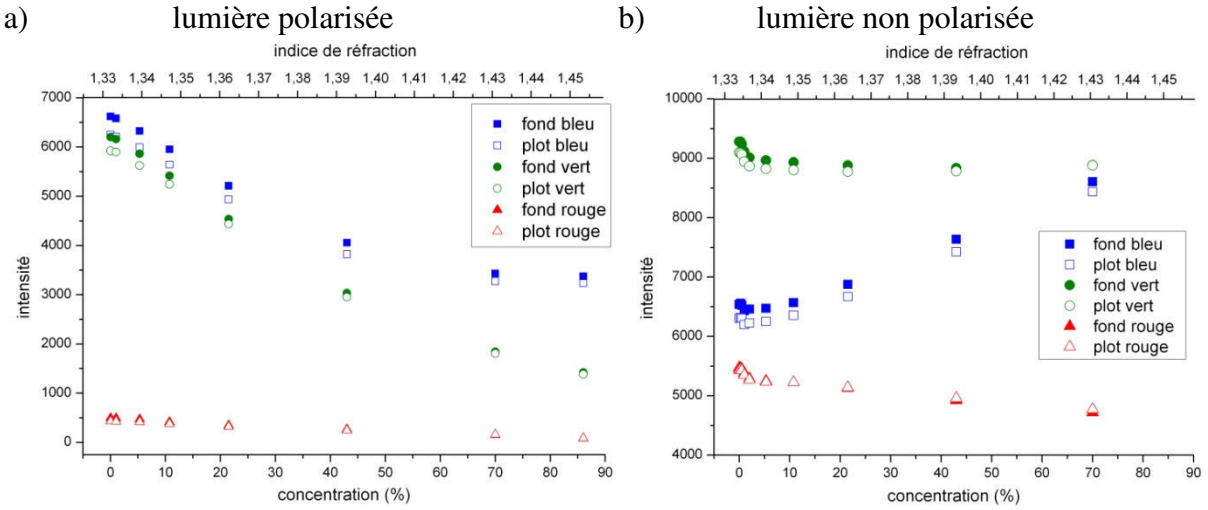


Figure III.55 : évolution de l'intensité des plots et du fond en fonction de l'indice de réfraction et de la concentration des solutions de glycérol injectées a) suivie entre polariseur et analyseur croisé et b) suivie sans polarisation de la lumière.

- Evolution linéaire de l'intensité avec la concentration jusqu'à 400 mg/mL en lumière polarisée.
- Evolution linéaire de l'intensité avec la concentration en lumière non polarisée de 50 à 700 mg/mL.

Seule la courbe du contraste bleu en lumière non polarisée présente une dérive suffisamment faible pour être exploitable. On constate une variation linéaire du contraste avec la concentration de la solution de glycérol. Cette variation est néanmoins très faible 0,01 %/%,

ce qui correspond à une variation du contraste de seulement 1 % pour une variation d'indice $\Delta n = 1{,}42$.

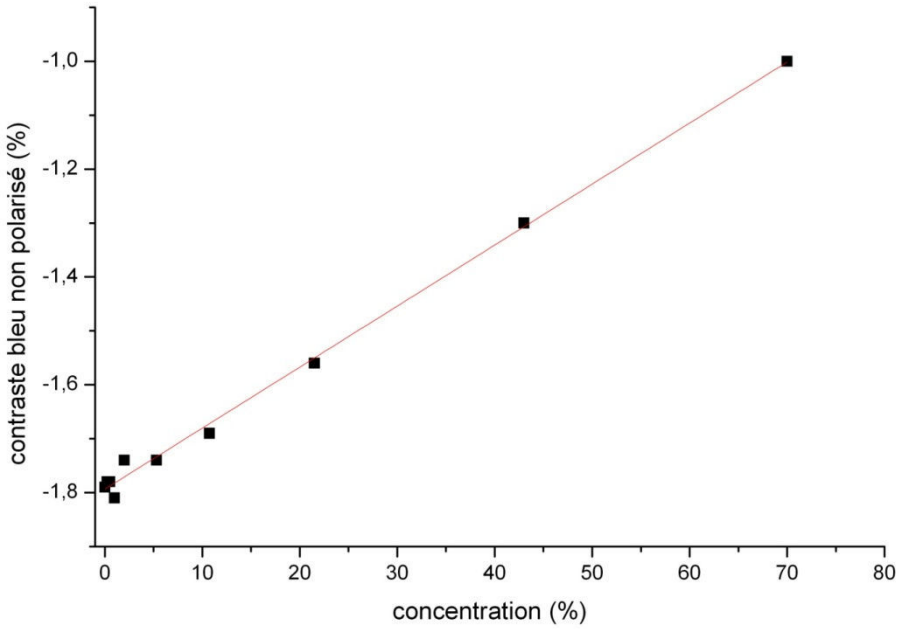


Figure III.56 : évolution du contraste bleu non polarisé entre les plots et le fond en fonction de l'indice de la concentration des solutions de glycérol injectées. ***La courbe rouge est la régression linéaire calculée (R^2=99,57 %).***

4.4.2 Variation d'indice engendrée par la salinité du tampon de course entre polariseur et analyseur croisés

Lors des mesures CONE et SPR, nous travaillons en milieu salin. Or la quantité de sel présente dans la solution modifie son indice de réfraction. Pour mesurer l'évolution de l'intensité quand on change de solution, nous considérons la variation de l'intensité *dI* entre deux solutions, ou bien la variation relative *dI/I*, en divisant *dI* par l'intensité prise avant l'injection de la seconde solution.

$$\frac{dI}{I} = \frac{I_{après\ injection} - I_{avant\ injection}}{I_{avant\ injection}}$$ **Équation III.44**

L'intensité varie peu lors du passage de l'eau Versol ® à la solution tampon HBS-P+. Cette variation est invisible sur la composante rouge qui est trop bruitée (Figure III.57). Elle

est du même ordre de grandeur sur les composantes verte et bleue, avec une amplitude légèrement plus importante sur la composante verte, comme pour le glycérol. Le saut d'intensité est négatif, car l'indice de réfraction augmente avec la salinité. Le même comportement est observé sur le fond et sur les plots (Tableau III.7).

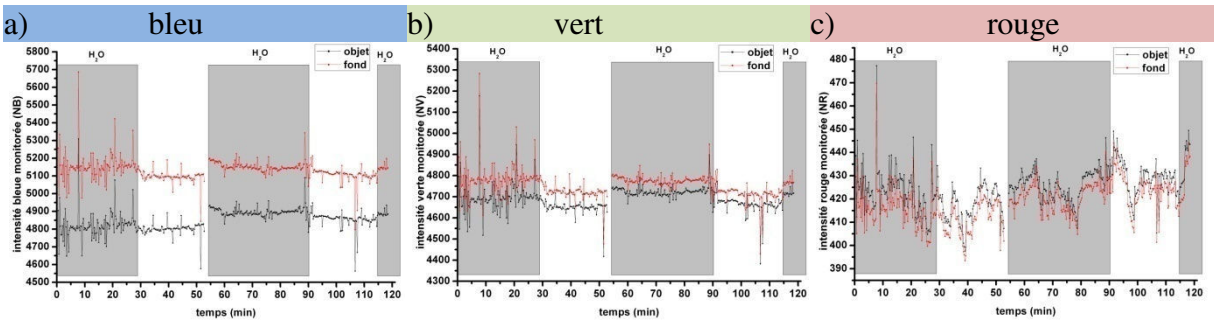


Figure III.57 : variation de l'intensité du fond (en rouge) et des plots (en noirs) pour les composantes RVB de l'image CONE avec une balance des blancs de 3200 K. Les zones grisées correspondent aux périodes d'injection de l'eau Versol ® et les zones blanches sont celles d'injection de l'HBSP+. Surface surmontée de 7 nm d'or.

Le passage inverse de la solution HBS-P+ à l'eau montre des sauts opposés et de même amplitude que ceux observés pour le passage de l'eau à l'HBS-P+. Lors de cette expérience, nous avons fait deux changement H2O → HBS-P+ et deux changement HBS-P+ → H2O. Les valeurs présentées dans le Tableau III.7 sont les moyennes et les écarts types correspondants.

3200 K	**Variation d'indice des solutions H_2O → HBS-P+**		**Variation d'indice des solutions HBS-P+ → H_2O**	
	dI	**dI/I (%)**	**dI**	**dI/I (%)**
Fond	- 46,7 ± 12,7 NB	- 0,9 ± 0,2	+ 59,3 ± 25,5 NB	+ 1,2 ± 0,5
Plots	- 36,1 ± 2,1 NB	- 0,7 ± 0,0	+ 61,5 ± 31,8 NB	+ 1,3 ± 0,6
Fond	- 65,3 ± 5,4 NV	- 1,4 ± 0,1	+ 62,1 ± 12,2 NV	+ 1,3 ± 0,2
Plots	- 50,2 ± 3,6 NV	- 1,1 ± 0,1	+ 61,0 ± 17,9 NV	+ 1,3 ± 0,4
Fond	-	-	-	-
Plots	-	-	-	-

Tableau III.7 : évolution moyenne de l'intensité CONE du fond et des plots engendrée par les variations d'indice entre l'eau et l'HBS-P+ en fonction de la composante des images. Données obtenues avec une balance des blancs de 3200 K.

Les valeurs du Tableau III.7 confirment bien les observations faites sur les courbes d'intensité, à savoir :

- Faible influence de la variation d'indice des solutions sur l'intensité CONE.
- Effet de la variation d'indice des solutions du même ordre de grandeur pour les composantes verte et bleue, mais légèrement supérieur pour la composante verte.
- Variations d'intensité symétriques à l'aller et au retour.

Les mêmes mesures ont été menées avec une balance des blancs automatique. Dans ce mode d'acquisition, le logiciel AxioVision (Zeiss) applique des gains aux trois composantes pour superposer leurs niveaux moyens d'intensité. Ces gains diffèrent d'une mesure à l'autre, mais permettent d'avoir un meilleur rapport signal sur bruit pour la composante rouge (Figure III.58). Avec ce mode d'acquisition, on relève comme précédemment une variation négative de l'intensité lors du passage de l'eau à une solution d'HBS-P+ et une variation positive pour le passage d'une solution d'HBS-P+ à de l'eau (Tableau III.8).

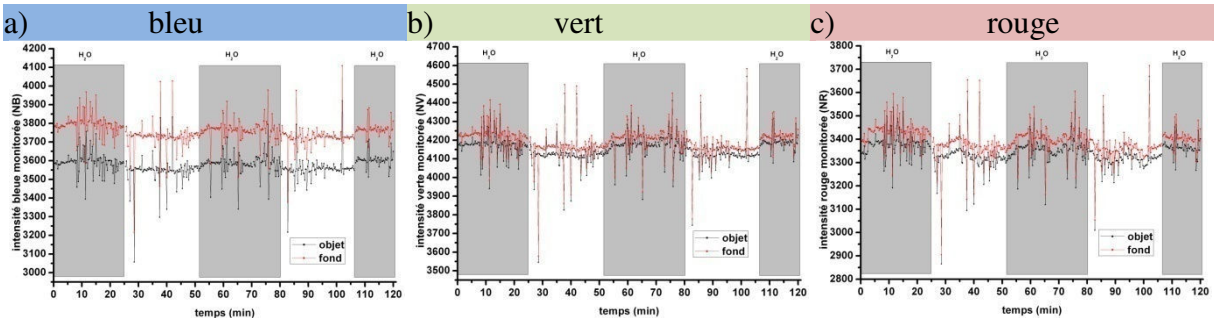


Figure III.58 : variation de l'intensité CONE du fond (en rouge) et des plots (en noirs) pour les composantes RVB des images avec une balance des blancs automatique. Les zones grisées correspondent aux périodes d'injection de l'eau Versol ® et les zones blanches sont celles d'injection de l'HBSP+. Surface surmontée de 7 nm d'or.

automatique	Variation d'indice des solutions $H_2O \rightarrow$ HBS-P+		Variation d'indice des solutions HBS-P+ $\rightarrow H_2O$	
	dI	dI/I (%)	dI	dI/I (%)
Fond	- 42,8 ± 2,0 NB	- 1,1 ± 0,1	+ 40,8 ± 4,1 NB	+ 1,1 ± 0,1
Plots	- 36,7 ± 4,1 NB	- 1,0 ± 0,1	+ 38,7 ± 6,1 NB	+ 1,1 ± 0,2
Fond	- 48,9 ± 0,0 NV	- 1,2 ± 0,0	+ 61,2 ± 8,2 NV	+ 1,5 ± 0,2
Plots	- 55,1 ± 2,0 NV	- 1,3 ± 0,0	+ 61,2 ± 8,2 NV	+ 1,5 ± 0,2
Fond	- 52,2 ± 19,6 NR	- 1,5 ± 0,6	+ 45,7 ± 6,5 NR	+1,4 ± 0,2
Plots	- 55,5 ± 0,0 NR	-1,7 ± 0,0	+ 44,0 ± 1,6 NR	+ 1,3 ± 0,1

Tableau III.8 : évolution moyenne de l'intensité CONE du fond et des plots engendrée par les variations d'indice entre l'eau et l'HBS-P+ pour les composantes RVB des images. Données obtenues avec une balance des blancs automatique.

Conclusion du chapitre III

La microscopie SEEC a été adaptée par le calcul à l'observation d'objets en solution. Lors de ce travail numérique, Dominique Ausserré a découvert un point de fonctionnement différent du pic SEEC et très intéressant. En effet, il a la particularité de présenter un contraste appréciable et constant avec l'ouverture optique jusqu'à 40 degrés. Cela permet de travailler facilement avec tout type de microscope optique sans avoir à faire de lourds changements des modules d'illumination. Ce point de fonctionnement est efficace aussi bien entre polariseur et analyseur croisés qu'en lumière non polarisée. La théorie montre une variation du contraste négative et proportionnelle à l'épaisseur du dépôt. Ce contraste est fortement affecté par l'indice imaginaire de la molécule déposée.

D'un point de vue pratique, nous avons été capables de visualiser des plots de 3 à 16 Å d'épaisseur en immersion dans l'eau et dans d'autres solutions telles que le glycérol ou l'HBSP+. Pour ce faire, nous avons réalisé une fonctionnalisation de surface d'or par impression microcontact *via* des tampons de PDMS. Nous avons également monté un système de microfluidique sur un microscope optique qui nous permet de reproduire les écoulements présents sur le BIAcore T100, mais avec des transitions moins nettes entre les fluides successifs.

Nous avons montré que les surfaces microstructurées obtenues par µCP sont fonctionnellement comparables à la juxtaposition d'une surface d'or et d'une SAM de 16-MHDA dans les expériences les plus significatives (fixations spécifiques). Ces surfaces nous ont permis de prouver que la microscopie CONE offrait un bon contraste en immersion entre polariseur et analyseur croisés, mais aussi en lumière non polarisée. Par rapport à la SPR, la

microscopie CONE est peu sensible aux variations d'indice de réfraction des solutions en volume.

Références.

1. Ausserre, D.; Valignat, M. P., Surface enhanced ellipsometric contrast (SEEC) basic theory and lambda/4 multilayered solutions. *Optics Express* **2007,** 15, (13), 8329-8339.

2. Ausserre, D.; Valignat, M. P., Wide-field optical imaging of surface nanostructures. *Nano Letters* **2006,** 6, (7), 1384-1388.

3. Souplet, V. Nouvelles méthodologies pour la préparation et la lecture de biopuces à peptides. Science physico-chimique et technologies pharmaceutiques, Université de Lille 2, 2007.

4. Chien, F. C.; Chen, S. J., Direct determination of the refractive index and thickness of a biolayer based on coupled waveguide-surface plasmon resonance mode. *Optics Letters* **2006,** 31, (2), 187-189.

5. refractive index data base http://www.filmetrics.com/refractive-index-database

6. James M. Spotts; 2008 Microfluidics Course Institute for Systems Biology; November 17, 2008

7. Datasheet on RTV 615 from GE Silicones

8. Tabeling, P., *Introduction à la microfluidique*. Belin: 2003.

9. Reynolds, O., An Experimental Investigation of the Circumstances Which Determine Whether the Motion of Water Shall Be Direct or Sinuous, and of the Law of Resistance in Parallel Channels. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* **1883,** 174, 935-982.

10. Kumar, A.; Abbott, N. L.; Biebuyck, H. A.; Kim, E.; Whitesides, G. M., Patterned Self-Assembled Monolayers and Meso-Scale Phenomena. *Accounts of Chemical Research* **1995,** 28, (5), 219-226.

11. Lahiri, J.; Ostuni, E.; Whitesides, G. M., Patterning Ligands on Reactive SAMs by Microcontact Printing. *Langmuir* **1999,** 15, (6), 2055-2060.

12. Wilbur, J., L; Amit, K.; Hans, A. B.; Enoch, K.; George, M. W., Microcontact printing of self-assembled monolayers: applications in microfabrication. *Nanotechnology* **1996**, (4), 452.

13. Wilbur, J., L.; Kumar, A.; Kim, E.; Whitesides, G., M. , Microfabrication by microcontact printing of self-assembled monolayers. *Advanced Materials* **1994,** 6, (7-8), 600-604.

14. Yan, L.; Huck, W. T. S.; Zhao, X.-M.; Whitesides, G. M., Patterning Thin Films of Poly(ethylene imine) on a Reactive SAM Using Microcontact Printing. *Langmuir* **1999,** 15, (4), 1208-1214.

15. Ross, E. E.; Joubert, J. R.; Wysocki, R. J.; Nebesny, K.; Spratt, T.; O'Brie, D. F., Patterned Protein Films on Poly(lipid) Bilayers by Microcontact Printing. *Biomacromolecules* **2006,** 7, (5), 1393-1398.

16. Inerowicz, H. D.; Howell, S.; Regnier, F. E.; Reifenberger, R., Multiprotein Immunoassay Arrays Fabricated by Microcontact Printing. *Langmuir* **2002,** 18, (13), 5263-5268.

17. Tan, J. L.; Tien, J.; Chen, C. S., Microcontact Printing of Proteins on Mixed Self-Assembled Monolayers. *Langmuir* **2002,** 18, (2), 519-523.

18. De Feijter, J. A.; Benjamins, J.; Veer, F. A., Ellipsometry as a tool to study the adsorption behavior of synthetic and biopolymers at the air-water interface. *Biopolymers* **1978,** 17, (7), 1759-1772.

19. Roussille, L.; Brotons, G.; Ballut, L.; Louarn, G.; Ausserré, D.; Ricard-Blum, S., Surface characterization and efficiency of a matrix-free and flat carboxylated gold sensor chip for surface plasmon resonance (SPR). *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2011,** 401, (5), 1605-1621.

20. Bain, C. D.; Troughton, E. B.; Tao, Y. T.; Evall, J.; Whitesides, G. M.; Nuzzo, R. G., Formation of monolayer films by the spontaneous assembly of organic thiols from solution onto gold. *Journal of the American Chemical Society* **1989,** 111, (1), 321-335.

21. Data sheet from Dow chemical company

22. Roos, H., Biosensor systems and Biacore technology. In.

23. Data sheet from Dow chemical company

24. Silin, V.; Weetall, H.; Vanderah, D. J., SPR Studies of the Nonspecific Adsorption Kinetics of Human IgG and BSA on Gold Surfaces Modified by Self-Assembled Monolayers (SAMs). *Journal of Colloid and Interface Science* **1997,** 185, (1), 94-103.

25. refractive index data base http://www.filmetrics.com/refractive-index-database

26. Data sheet from Dow chemical company

Annexe III.1 : couche mince antireflet, calcul classique

Considérons une couche mince d'indice n_1 et d'épaisseur d comprise entre deux milieux d'indice n_0 et n_2 (Figure III.59). L'interface entre les milieux 0 et 1 est caractérisée par les coefficients de Fresnel r_{01}, r_{10} pour la réflexion et t_{01} et t_{10} pour la réfraction. On définit de même les coefficients r_{12}, r_{21}, t_{12} et t_{21} pour la réflexion et la réfraction à l'interface entre les milieux 1 et 2.

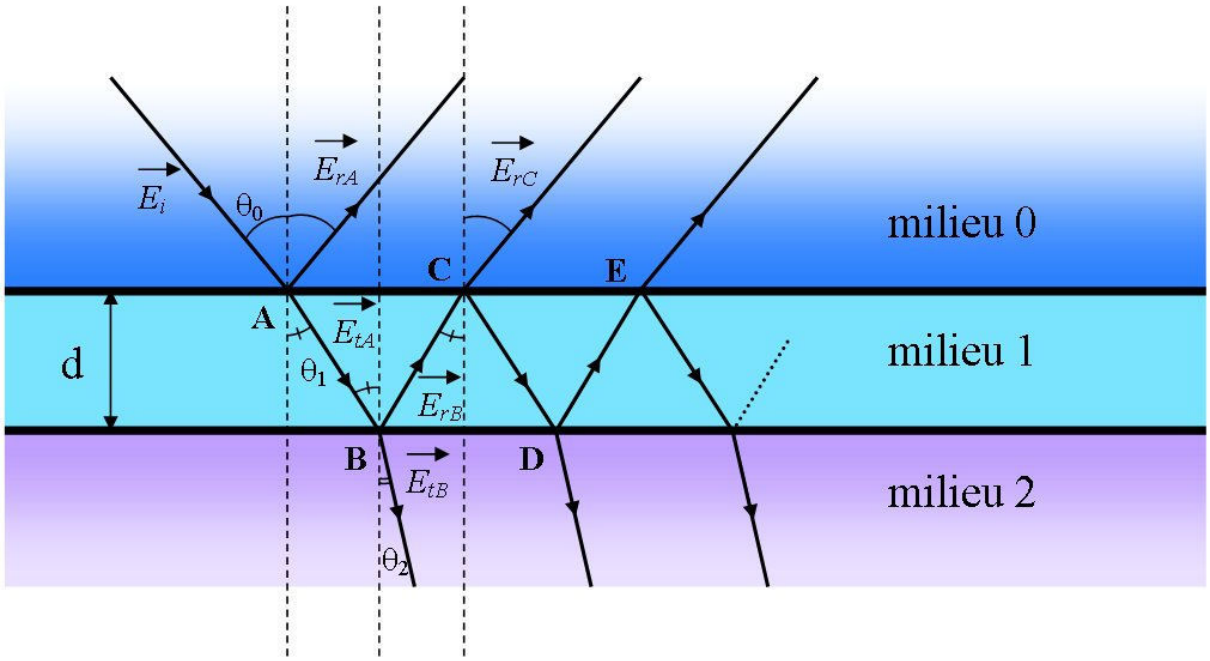


Figure III.59 : schéma d'une réflexion multiple dans une couche mince d'indice n_1 entre deux milieux semi-infini d'indice n_0 et n_2.

Soit une onde monochromatique de longueur d'onde λ incidente arrivant par le milieu 0 sur la couche mince au point **A** et d'amplitude E_i. À ce point, une partie de l'onde est réfléchie ($\overrightarrow{E_{rA}}$) et une autre est réfractée à travers la couche mince ($\overrightarrow{E_{tA}}$) tel que l'amplitude réfléchie vaut :

$$E_{rA} = r_{01} E_i \qquad \textbf{Équation III.45}$$

et l'amplitude de l'onde transmise dans le milieu 1 vaut :

$$E_{t\boldsymbol{A}} = t_{01}E_i$$ **Équation III.46**

Le rayon réfracté parcourt l'épaisseur de la couche mince et arrive sur l'interface entre les milieux 1 et 2 au point **B**. Là encore une partie de l'onde est réfléchie et une autre est transmise de telle sorte que l'amplitude de l'onde réfléchie vaut :

$$E_{r\boldsymbol{B}} = r_{12}E_{t\boldsymbol{A}}e^{-i\beta} = r_{12}t_{01}E_ie^{-i\beta}$$ **Équation III.47**

et l'amplitude de l'onde transmise dans le milieu 2 vaut :

$$E_{t\boldsymbol{B}} = t_{12}E_{t\boldsymbol{A}}e^{-i\beta} = t_{12}t_{01}E_ie^{-i\beta}$$ **Équation III.48**

Le terme $e^{-i\beta}$ avec $\beta = \frac{2\pi}{\lambda}n_1 d\cos\theta_1$ introduit le déphasage occasionné lors de la propagation de l'onde à travers la couche d'indice n_1. Après réflexion sur l'interface 1/2, l'onde parcourt à nouveau l'épaisseur de la couche mince et arrive au point **C**. Une fois encore l'onde est en partie réfléchie et en partie transmise dans le milieu 0. L'amplitude réfléchie au point **C** s'écrit alors :

$$E_{r\boldsymbol{C}} = r_{10}E_{r\boldsymbol{B}}e^{-i\beta} = r_{10}r_{12}t_{01}E_ie^{-2i\beta}$$ **Équation III.49**

et l'amplitude de l'onde transmise dans le milieu 0 vaut :

$$E_{t\boldsymbol{C}} = t_{10}E_re^{-i\beta} = t_{10}r_{12}t_{01}E_ie^{-2i\beta}$$ **Équation III.50**

On obtient ainsi au point **E** une amplitude de l'onde transmise dans le milieu 0 :

$$E_{t\boldsymbol{E}} = t_{10}{r_{12}}^2r_{10}t_{01}E_ie^{-4i\beta}$$ **Équation III.51**

On peut ainsi définir un rayonnement total réfléchi ($\overrightarrow{E_{rTOT}}$) par la couche mince comme étant la somme des rayons sortant de cette couche après ces réflexions multiples.

$$E_{rTOT} = E_{rA} + E_{tC} + E_{tE} \dots$$ **Équation III.52**

$$E_{rTOT} = r_{01}E_i + t_{10}r_{12}t_{01}E_i e^{-2i\beta} + t_{10}{r_{12}}^2 r_{10}t_{01}E_i e^{-4i\beta} + \cdots$$ **Équation III.53**

Soit

$$E_{rTOT} = E_i\left[r_{01} + t_{10}r_{12}t_{01}e^{-2i\beta}\left(1 + r_{12}r_{10}e^{-2i\beta} + \left(r_{12}r_{10}e^{-2i\beta}\right)^2\right)\dots\right]$$ **Équation III.54**

d'où

$$\frac{E_{rTOT}}{E_i} = r_{01} + t_{10}r_{12}t_{01}e^{-2i\beta} \times \sum_{n=0}^{+\infty}\left(r_{12}r_{10}e^{-2i\beta}\right)^n$$ **Équation III.55**

La série géométrique de terme général $Q = r_{12}r_{10}e^{-2i\beta}$ est convergente puisque $\left|r_{12}r_{10}e^{-2i\beta}\right| = |r_{12}| \times |r_{10}| < 1$ et vaut :

$$\sum_{n=0}^{+\infty}\left(r_{12}r_{10}e^{-2i\beta}\right)^n = \frac{1}{1 - r_{12}r_{10}e^{-2i\beta}}$$

L'amplitude du rayonnement total réfléchi vaut :

$$\frac{E_{rTOT}}{E_i} = r_{01} + \frac{t_{10}r_{12}t_{01}e^{-2i\beta}}{1 - r_{12}r_{10}e^{-2i\beta}}$$ **Équation III.56**

En utilisant les relations suivantes $t_{01}t_{10} = 1 - {r_{01}}^2$ et $r_{10} = -r_{01}$, on obtient :

$$\frac{E_{rTOT}}{E_i} = \frac{r_{01} + r_{12}e^{-2i\beta}}{1 - r_{12}r_{10}e^{-2i\beta}}$$ **Équation III.57**

Soit un coefficient de réflexion global r_{cm} égal à :

$$r_{cm} = \frac{E_{r\boldsymbol{TOT}}}{E_i} = \frac{r_{01} + r_{12}e^{-2i\beta}}{1 - r_{12}r_{10}e^{-2i\beta}}$$ **Équation III.58**

Pour que la surface soit non réfléchissante, il convient que le numérateur du coefficient de réflexion global soit nul, soit

$$r_{01} + r_{12}e^{-2i\beta} = 0$$ **Équation III.59**

Deux solutions mathématiques sont envisageables :

$$\begin{cases} e^{-2i\beta} = 1 \\ r_{01} = -r_{12} \end{cases} \quad \text{ou} \quad \begin{cases} e^{-2i\beta} = 1 \\ r_{01} = r_{12} \end{cases}$$ **Équation III.60**

<u>La première solution</u> conduit pour la première équation à la condition suivante :

$$2\beta = 2\left(\frac{2\pi}{\lambda} n_1 d \cos\theta_1\right) = 2m\pi$$ **Équation III.61**

où m est un nombre entier, soit une épaisseur d de la couche mince telle que :

$$d = m\frac{\lambda}{2n_1 \cos\theta_1}$$ **Équation III.62**

et la seconde équation est valide quelle que soit la polarisation de l'onde soit $r_{01,p} = -r_{12,p}$ et $r_{01,s} = -r_{12,s}$, d'où :

$$\begin{cases} n_0 \cos\theta_2 = n_2 \cos\theta_1 \\ n_0 \cos\theta_0 = n_2 \cos\theta_2 \end{cases}$$ **Équation III.63**

Soit la condition générale suivante :

$${n_0}^2 \cos\theta_0 = {n_2}^2 \cos\theta_1$$ **Équation III.64**

Pour avoir extinction totale, il faut une incidence normale ($\theta_0 = \theta_1 = \theta_2 = 0$) et le milieu 0 et le milieu 2 doivent être d'indice identique ($n_0 = n_2$).

<u>La seconde solution</u> conduit pour la première équation à la condition suivante :

$$2\beta = 2\left(\frac{2\pi}{\lambda} n_1 d \cos\theta_1\right) = (2m+1)\pi$$ **Équation III.65**

où m est un nombre entier soit une épaisseur d de la couche mince telle que :

$$d = \left(m + \frac{1}{2}\right)\frac{\lambda}{2n_1 \cos\theta_1}$$ **Équation III.66**

et la seconde équation est valide quelle que soit la polarisation de l'onde soit $r_{01,p} = r_{12,p}$ et $r_{01,s} = r_{12,s}$, d'où :

$$\begin{cases} {n_1}^2 \cos\theta_0 \cos\theta_2 = n_0 n_2 \cos^2\theta_1 \\ {n_1}^2 \cos^2\theta_1 = n_2 n_0 \cos\theta_0 \cos\theta_2 \end{cases}$$ **Équation III.67**

Soit une condition sur l'indice de réfraction du milieu 1:

$$n_1 = \sqrt{n_0 n_2}$$ **Équation III.68**

Annexe III.2 : indice de réfraction de l'or en fonction de la longueur d'onde [25]

λ (nm)	n	k	λ (nm)	n	k
206,64	1,422	1,306	**387,45**	1,674	1,936
208,38	1,427	1,31925	**393,6**	1,666	1,94775
210,14	1,43	1,334	**399,95**	1,658	1,956
211,94	1,431	1,34925	**406,51**	1,647	1,95938
213,77	1,432	1,364	**413,28**	1,636	1,958
215,63	1,435	1,376	**420,29**	1,628	1,95138
217,52	1,438	1,388	**427,54**	1,616	1,94
219,44	1,44	1,403	**435,04**	1,596	1,9245
221,4	1,442	1,418	**442,8**	1,562	1,904
223,4	1,447	1,42963	**450,86**	1,502	1,87588
225,43	1,452	1,442	**459,2**	1,426	1,846
227,5	1,453	1,4595	**467,87**	1,346	1,81463
229,6	1,454	1,478	**476,87**	1,242	1,796
231,75	1,458	1,49375	**486,22**	1,087	1,79738
233,93	1,462	1,51	**495,94**	0,916	1,84
236,16	1,466	1,5295	**506,06**	0,755	1,9565
238,43	1,47	1,55	**516,6**	0,608	2,12
240,75	1,474	1,56963	**527,6**	0,492	2,32625
243,11	1,478	1,59	**539,07**	0,402	2,54
245,52	1,481	1,61163	**551,05**	0,346	2,73063
247,97	1,484	1,636	**563,57**	0,306	2,88
250,48	1,487	1,66675	**576,68**	0,268	2,94063
253,03	1,49	1,698	**590,41**	0,236	2,97
255,64	1,495	1,72463	**604,81**	0,212	3,015
258,3	1,504	1,748	**619,93**	0,194	3,06
261,02	1,523	1,76675	**635,82**	0,178	3,07
263,8	1,546	1,784	**652,55**	0,166	3,15
266,63	1,572	1,80338	**670,19**	0,161	3,44581
269,53	1,598	1,822	**688,81**	0,16	3,8
272,49	1,624	1,8375	**708,49**	0,161	4,08769
275,52	1,648	1,852	**729,32**	0,164	4,357
278,62	1,669	1,86775	**751,43**	0,17	4,61019
281,78	1,69	1,882	**774,91**	0,176	4,86
285,02	1,717	1,89175	**799,9**	0,181	5,12581
288,34	1,742	1,9	**826,57**	0,188	5,39
291,73	1,76	1,91	**855,07**	0,198	5,63125
295,2	1,776	1,918	**885,61**	0,21	5,88
298,76	1,795	1,92038	**918,41**	0,222	6,16813
302,4	1,812	1,92	**953,73**	0,236	6,47
306,14	1,823	1,91888	**991,88**	0,253	6,75313
309,96	1,83	1,916	**1033,21**	0,272	7,07
313,89	1,837	1,91138	**1078,13**	0,291	7,485
317,91	1,84	1,904	**1127,14**	0,312	7,93
322,04	1,834	1,89138	**1180,81**	0,339	8,40375
326,28	1,824	1,878	**1239,85**	0,372	8,77
330,63	1,812	1,86825	**1305,11**	0,41	8,7575
335,1	1,798	1,86	**1377,61**	0,454	8,77
339,69	1,782	1,85175	**1458,65**	0,503	9,20313
344,4	1,766	1,846	**1549,81**	0,559	9,81
349,25	1,753	1,84525	**1653,14**	0,622	10,4575
354,24	1,74	1,848	**1771,22**	0,696	11,2
359,38	1,728	1,85238	**1907,46**	0,785	12,03063
364,66	1,716	1,862	**2066,42**	0,896	13
370,11	1,706	1,883	**2254,28**	1,034	14,14438
375,71	1,696	1,906	**2479,7**	1,205	15,5
381,49	1,685	1,9225			

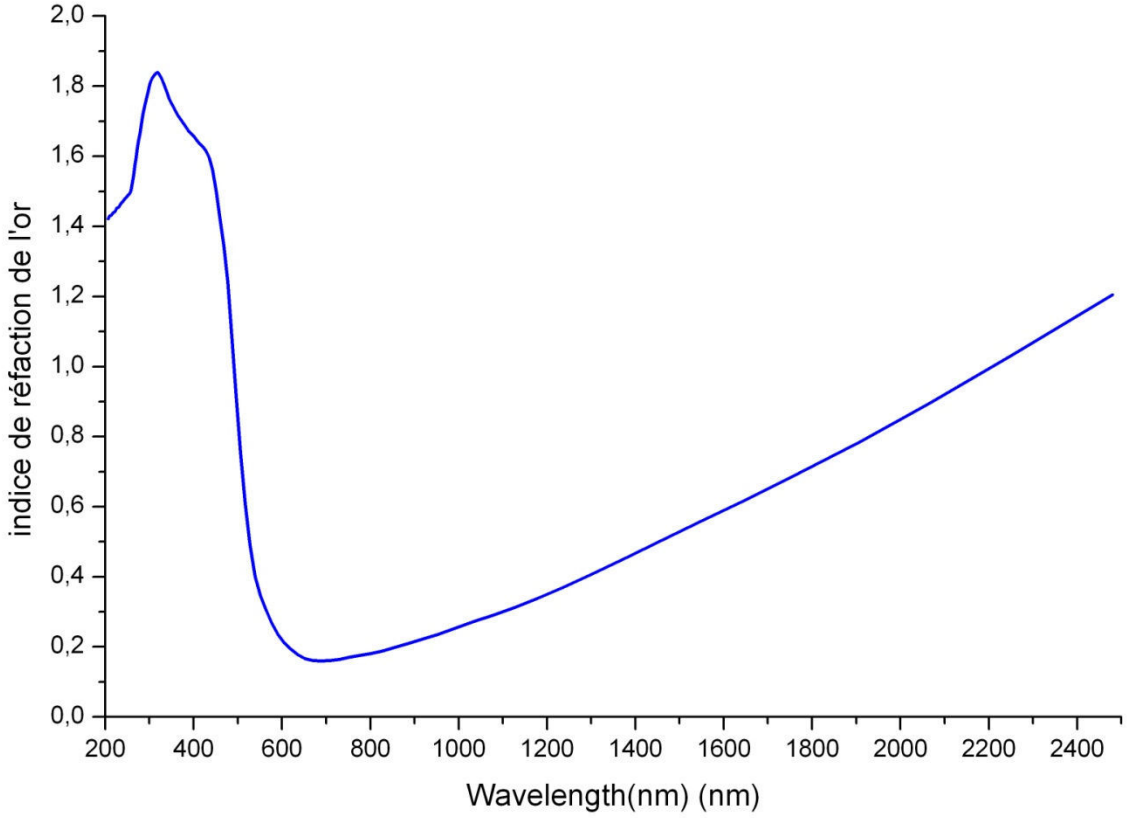


Figure III.60 : indice de réfraction n de l'or en fonction de la longueur d'onde.

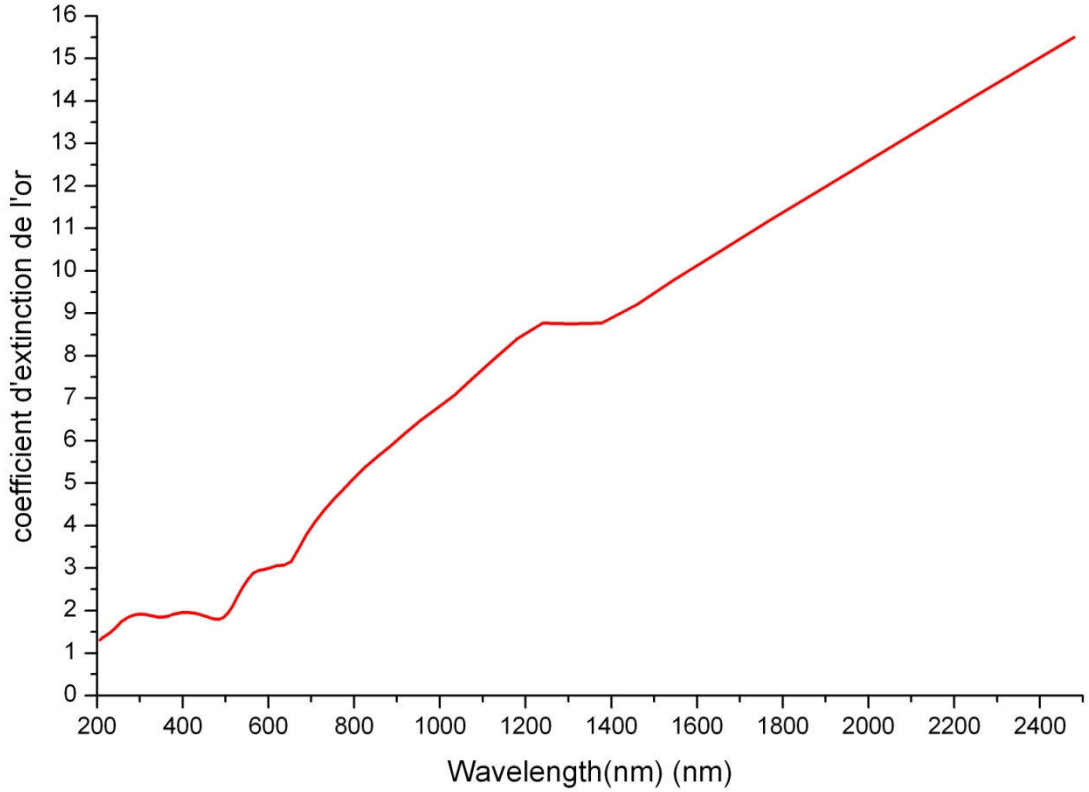


Figure III.61 : coefficient d'extinction k (partie imaginaire de l'indice de réfraction) de l'or en fonction de la longueur d'onde.

Annexe III.3 : indice de réfraction du glycérol

indice de réfraction de solutions aqueuses de glycérol à 20 °C [26]

Glycérol (% massique)	indice de réfraction	différence	Glycérol (% massique)	indice de réfraction	différence
100	1,47399	0,00165	**50**	0 1,3989	0,00149
99	1,47234	0,00163	**49**	1,3966	0,00147
98	1,47071	0,00161	**48**	1,39513	0,00145
97	1,46909	0,00157	**47**	1,39368	0,00141
96	1,46752	0,00156	**46**	1,39227	0,00138
95	1,46597	0,00154	**45**	1,39089	0,00136
94	1,46443	0,00153	**44**	1,38953	0,00135
93	1,4629	0,00151	**43**	1,38818	0,00135
92	1,46139	0,0015	**42**	1,38683	0,00135
91	1,45989	0,0015	**41**	1,38548	0,00135
90	1,45839	0,0015	**40**	1,38413	0,00135
89	1,45689	0,0015	**39**	1,38278	0,00135
88	1,45539	0,0015	**38**	1,38143	0,00135
87	1,45389	0,00152	**37**	1,38008	0,00134
86	1,45237	0,00152	**36**	1,37874	0,00134
85	1,45085	0,00155	**35**	1,3774	0,00134
84	1,4493	0,00156	**34**	1,37606	0,00134
83	1,4477	0,0016	**33**	1,37472	0,00134
82	1,44612	0,00162	**32**	1,37338	0,00134
81	1,4445	0,0016	**31**	1,37204	0,00134
80	1,4429	0,00155	**30**	1,3707	0,00134
79	1,44135	0,00153	**29**	1,36936	0,00134
78	1,43982	0,0015	**28**	1,36802	0,00133
77	1,43832	0,00149	**27**	1,36669	0,00133
76	1,43683	0,00149	**26**	1,36536	0,00132
75	1,43534	0,00149	**25**	1,36404	0,00132
74	1,43385	0,00149	**24**	1,36272	0,00131
73	1,43236	0,00149	**23**	1,36141	0,00131
72	1,43087	0,00149	**22**	1,3601	0,00131
71	1,42938	0,00149	**21**	1,35879	0,0013
70	1,42789	0,00149	**20**	1,35749	0,0013
69	1,4264	0,00149	**19**	1,35619	0,00129
68	1,42491	0,00149	**18**	1,3549	0,00129
67	1,42342	0,00149	**17**	1,35361	0,00128
66	1,42193	0,00149	**16**	1,35233	0,00127
65	1,42044	0,00149	**15**	1,35106	0,00126
64	1,41895	0,00149	**14**	1,3498	0,00126
63	1,41746	0,00149	**13**	1,34854	0,00125
62	1,41597	0,00149	**12**	1,34729	0,00125
61	1,41448	0,00149	**11**	1,34604	0,00123
60	1,41299	0,00149	**10**	1,34481	0,00122
59	1,4115	0,00149	**9**	1,34359	0,00121
58	1,41001	0,00149	**8**	1,34238	0,0012
57	1,40852	0,00149	**7**	1,34118	0,00119
56	1,40703	0,00149	**6**	1,33999	0,00119
55	1,40554	0,00149	**5**	1,3388	0,00118
54	1,40405	0,00149	**4**	1,33762	0,00117
53	1,40256	0,00149	**3**	1,33645	0,00115
52	1,40107	0,00149	**2**	1,3353	0,00114
51	1,39958	0,00149	**1**	1,33416	0,00113
			0	1,33303	

Chapitre IV :

Evaluation de la microscopie « SEEC »

Plan du chapitre IV

1 Comparaison avec la microscopie de fluorescence à l'air 166

1.1 Rappel sur la quantité de molécules de BSA fixée en fonction de la surface utilisée (résultat du Chapitre II, [12]) 169

1.2 Protocole expérimental 171

1.3 Cinétique d'adsorption de la BSA fluorescente suivie *ex situ* par microscopie de fluorescence et SEEC 173

1.3.1 Microscopie de fluorescence 173

1.3.2 Microscopie SEEC 176

1.4 Cinétique d'immobilisation de la BSA fluorescente suivie *ex situ* par microscopie de fluorescence et SEEC 180

1.4.1 Microscopie de fluorescence 180

1.4.2 Microscopie SEEC 181

2 Comparaison avec la microscopie de fluorescence en immersion par le suivi *in situ* de l'immobilisation de la BSA fluorescente 183

2.1 Protocole expérimental 184

2.1.1 Protocole d'observation par microscopie CONE et de fluorescence en immersion 184

2.1.2 Immobilisation de la BSA fluorescente (0,25 mg/ml) 185

2.2 Comparaison des micrographies CONE et de fluorescence après l'immobilisation de la BSA fluorescente 185

2.3 Comparaison des cinétiques d'immobilisation de la BSA fluorescente 187

3 Comparaison des expériences CONE et SPR 193

3.1 Etude comparative d'une cinétique CONE et d'une cinétique SPR..... 193

3.1.1 Comparaison des courbes d'immobilisation CONE et SPR 193

3.1.2 Description étape par étape de la cinétique..... 194

3.1.3 Comparaison quantitative des Bulk effects CONE et SPR..... 198

3.1.4 Quantité de protéines immobilisées 199

3.1.5 Courbe de contraste CONE..... 200

3.2 Analyse quantitative des cinétiques d'adsorption et d'immobilisation de la BSA fluorescente 202

3.2.1 Adsorption de la BSA fluorescente en CONE 202

3.2.2 Cinétique d'immobilisation de la BSA fluorescente par microscopie CONE.. 210

3.3 Adsorption et immobilisation de la BSA non fluorescente 214

3.3.1 Solution de BSA faiblement concentrée (0,25 mg/mL)..... 214

3.3.2 Modélisation des courbes de contraste 221

3.3.3 Adsorption de la BSA non fluorescente observée en CONE à différentes concentrations 224

3.3.4 Immobilisation de la BSA 2,5 mg/mL..... 228

3.3.5 Immobilisation de la BSA fluorescente suivie en microscopie CONE avec une lumière non polarisée..... 230

3.4 Interaction entre IgG biotinylée et streptavidine immobilisée 235

3.4.1 Rappel des résultats SPR (Chapitre II [12]) 235

3.4.2 Expérience CONE P d'interaction entre des molécules d'IgG biotinylée et des molécules de streptavidine immobilisées 236

3.4.3 Comportements constatés sur différents plots de l'image..... 237

3.4.4 Reproductibilité des mesures CONE P 240

3.4.5 Comparaison des signaux CONE P et SPR 241

Conclusion du chapitre IV..... 243

Références. 244

Annexe 1 : Indice de réfraction des solutions 246

Pour évaluer les performances de la microscopie « SEEC » [1, 2] en imagerie, nous avons mené des expériences d'adsorption et d'immobilisation de la BSA (albumine de sérum bovin) dans les mêmes conditions en microscopie « SEEC » et en microscopie de fluorescence. Ces expériences ont dans un premier temps été menées *ex situ* à l'air puis dans un second temps *in situ* en immersion. Ensuite, pour évaluer quantitativement l'efficacité de la technique « SEEC » dans l'étude des interactions biomoléculaires, nous l'avons comparée avec la résonance plasmonique de surface (SPR) pour suivre l'immobilisation et l'adsorption de la BSA et pour étudier l'interaction entre la streptavidine et l'immunoglobuline G biotinylée.

1 Comparaison avec la microscopie de fluorescence à l'air

La détection de molécules biologiques *via* des marqueurs fluorescents est une méthode couramment utilisée dans diverses techniques (FRET [3], microscopie confocale [4], microscopie par épifluorescence [5], spectroscopie de fluorescence [6]…). Pour mettre en œuvre la microscopie de fluorescence, nous avons utilisé de la BSA marquée avec du Bodipy FL® (A2750, Invitrogen, USA, Figure IV.1) qui possède des pics d'excitation et d'émission à 501 et 513 nm respectivement (d'après Invitrogen). Il possède donc un faible déplacement de Stokes (seulement 12 nm) qui est l'écart entre le maximum d'excitation et celui d'émission. Plus cet écart est grand et plus la détection de la molécule fluorescente est facile. En microscopie de fluorescence, on utilise un filtre pour sélectionner la longueur d'onde d'excitation et un autre pour récolter celle d'émission. Par conséquent, si les spectres d'excitation et d'émission de la molécule fluorescente ont un faible recouvrement, il est plus aisé de les séparer et d'éliminer la lumière spéculaire parasite [7]. En pratique, le déplacement

de Stokes doit être de 20 nm pour séparer efficacement la lumière incidente de la fluorescence émise [8].

L'un des inconvénients de la fluorescence est le photoblanchiment (« photobleaching » en anglais). La molécule fluorescente perd définitivement sa luminescence à la suite d'une irradiation prolongée. Sous l'effet de la lumière, le fluorochrome réagit avec l'oxygène de l'air et s'oxyde [9]. Le photoblanchiment du Bodipy FL® apparait d'un coup après 220 ms d'exposition à une puissance de 1 kw/cm² [10]. Le Bodipy FL® possède un fort coefficient d'extinction (ε > 80 000 $cm^{-1}M^{-1}$, d'après Invitrogen). Le coefficient d'extinction d'une molécule (ou absorption molaire) correspond à la quantité de photons absorbés par cette molécule à une longueur d'onde donnée [8]. Un coefficient d'extinction élevé permet d'abaisser le seuil de détection. L'intensité de fluorescence (ou brillance) d'une molécule fluorescente est proportionnelle au produit du coefficient d'extinction moléculaire par son rendement quantique qui est le rapport entre le nombre de photons émis par le fluorochrome et le nombre de photons qu'il avait absorbés. Le Bodipy FL® a un rendement quantique proche de 1 soit une brillance de l'ordre de 80 000 $cm^{-1}M^{-1}$. Ces valeurs sont similaires dans l'air et dans l'eau.

a) b)

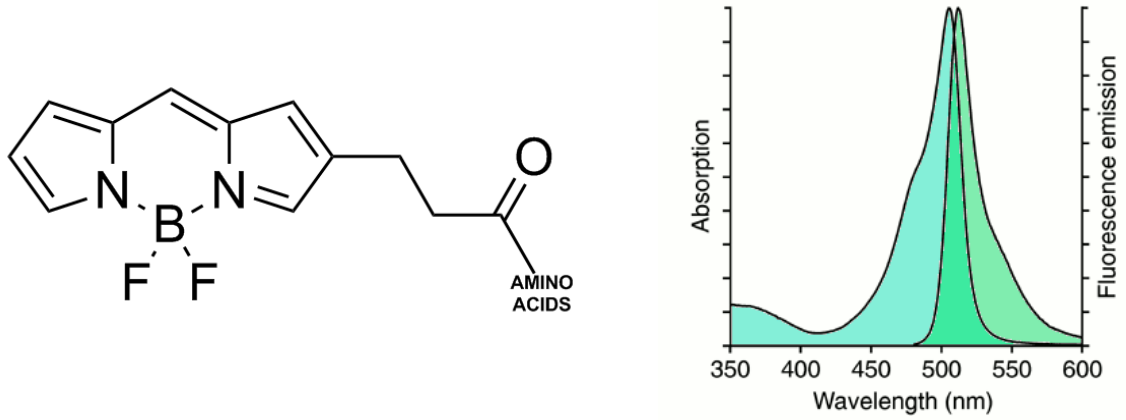


Figure IV.1 : a)Structure du Bodipy FL® [10], b) spectre d'excitation et d'émission du Bodipy FL® (Invitrogen).

Nous avons constaté dans la partie théorique du Chapitre III que l'absorbance des molécules influence grandement le contraste « SEEC ». Il est donc nécessaire de faire le lien entre la concentration C, le coefficient d'extinction molaire ε_λ et l'indice imaginaire k du milieu. La loi de Beer-Lambert exprime l'absorbance A en fonction du coefficient d'extinction molaire et de la concentration (en mol/L) :

$$A = -\log\frac{I}{I_0} = \varepsilon_\lambda dC$$ **Équation IV.1**

avec I et I_0 respectivement l'intensité de fluorescence et l'intensité incidente, ε_λ le coefficient d'extinction molaire ($cm^{-1}(mol/L)^{-1}$) pour la longueur d'onde λ, d trajet optique (cm) par l'onde lumineuse et C la concentration (mol/L).

Le coefficient d'absorption α est défini par le rapport entre l'absorbance et la distance parcourue par l'onde dans le milieu (Équation IV.2).

$$\alpha = \frac{A}{d}$$ **Équation IV.2**

Il peut également être exprimé en fonction de l'indice de réfraction du milieu et de la longueur d'onde [11] :

$$\alpha = \frac{4\pi k}{\lambda}$$ **Équation IV.3**

On en déduit donc la relation suivante :

$$k = \frac{\varepsilon_\lambda C\lambda}{4\pi}$$ **Équation IV.4**

La Figure IV.2 présente la variation de l'indice imaginaire en fonction de la concentration en Bodipy FL ® pour une longueur d'onde de 500 nm. Une couche dense de BSA contient $17{,}8.10^{-3}$ molécules de BSA/nm² soit 7.10^{-4} mol/L [12]. Si l'on suppose que chaque molécule de BSA porte une seule molécule de Bodipy FL ®, l'indice de réfraction d'une couche dense est donc $k = 2{,}23.10^{-3}$, ce qui est très faible.

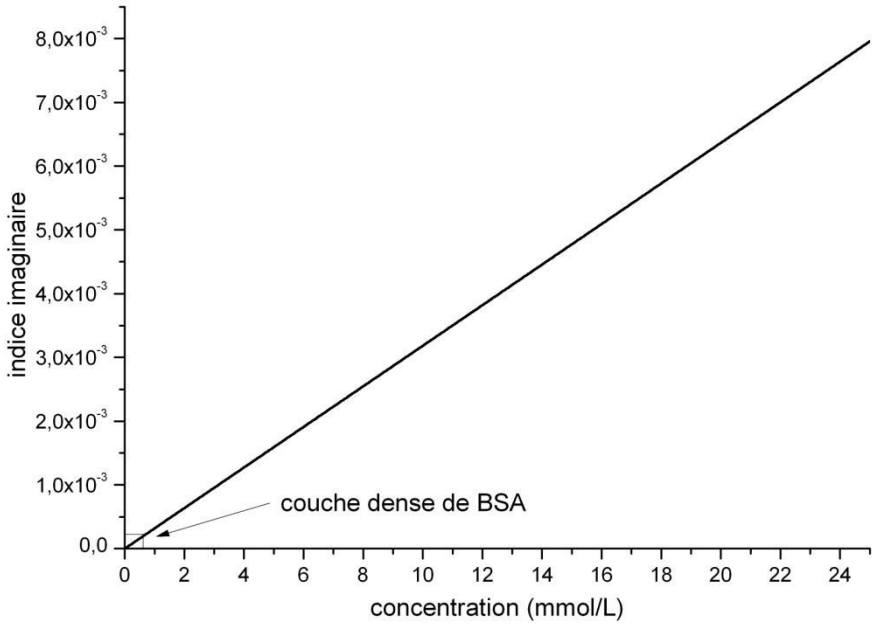


Figure IV.2 : variation de l'indice imaginaire du Bodipy FL ® en fonction de la concentration pour une longueur d'onde de 500 nm.

1.1 Rappel sur la quantité de molécules de BSA fixée en fonction de la surface utilisée (résultat du Chapitre II, [12])

En SPR, nous avons mesuré l'adsorption de la BSA (2,5 mg/mL) sur des surfaces homogènes d'or nu et d'or recouvert d'une SAM de 16-MHDA, ainsi que l'immobilisation covalente de la BSA (2,5 mg/mL) sur ces mêmes surfaces d'or recouvertes d'un tapis dense de 16-MHDA. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau suivant :

Surfaces	BSA (RU)	BSA (10^{-3} molécules/nm)	Couverture de la surface par la BSA (%)
Adsorption sur l'or nu	934,0	8,5	49
Adsorption sur une SAM de 16-MHDA	52,8	0,5	3
Immobilisation sur une SAM de 16-MHDA	1871,5	17,1	96

Tableau IV.1 : fixation de la BSA en fonction de la nature de la surface par SPR [12].

Les chiffres donnés dans le tableau précédent nous ont conduit à la conclusion que la BSA s'adsorbait beaucoup plus sur l'or nu que sur la surface fonctionnalisée avec le

16-MHDA. Si l'on regarde le début des courbes SPR (Figure IV.3), on constate pourtant pendant l'incubation une adsorption beaucoup plus forte et beaucoup plus rapide sur la SAM de 16-MHDA (pointillés bleus) que sur l'or nu (tirets rouges). C'est seulement après l'arrêt de l'injection qu'on observe une forte désorption de la BSA sur la 16-MHDA lorsque celle-ci n'est pas activée par EDC/NHS. L'écart entre les niveaux donnés dans le Tableau IV.1 et sur la Figure IV.3 s'explique par le fait que l'expérience d'adsorption sur la Figure IV.3 n'est pas terminée. Il reste encore l'injection d'éthanolamine. Pendant les dix minutes de cette injection la désorption des molécules de BSA mal accrochées à la surface continue. Le signal SPR atteint finalement les quantités données dans le Tableau IV.1.

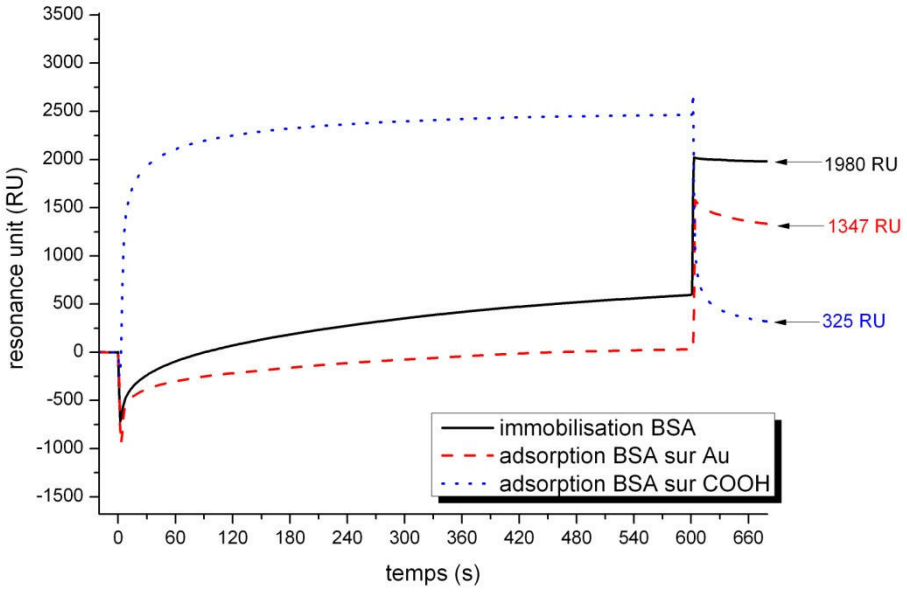


Figure IV.3 : Cinétique d'adsorption de la BSA (2,5 mg/mL) sur l'or nu (tirets rouges), sur de l'or possédant une SAM de 16-MHDA (pointillés bleus) et immobilisation covalente de la BSA (2,5 mg/mL) sur un tapis de 16-MHDA (trait plein noir).

Par conséquent, deux sortes d'observation ont été menées en microscopie de fluorescence sur des surfaces à plots de 16-MHDA :

- l'adsorption de la BSA.
- l'immobilisation de la BSA sur les plots.

1.2 Protocole expérimental

Les observations de fluorescence présentées ont été menées sur des couches de 40 nm d'or à l'aide d'un microscope Leica DMRX avec un objectif x50 d'ouverture numérique 0,8 et un filtre I3 (Leica). Ce cube (Figure IV.4) remplace le cube polariseur utilisé pour la microscopie SEEC. Il se compose d'un filtre passe-haut en fréquence devant la source permettant d'obtenir une excitation du fluorochrome entre 450 et 490 nm, d'un miroir dichroïque à 510 nm (qui réfléchit la lumière incidente vers l'échantillon en dessous de 510 nm et transmet la lumière réémise au-dessus de 510 nm) et d'un filtre passe-bas en fréquence devant la caméra pour ne récupérer que les longueurs d'ondes supérieures à 515 nm, soit uniquement les photons émis par le fluorochrome. Nous avons utilisé une source xénon XBO de 75 W (6000 K) et une caméra monochrome Andor Luca^{EM} EMCCD pilotée par un programme mis au point par Laurent Berger du LPEC en 2010. Les spectres de la source et de la caméra sont reportés sur la Figure IV.5.

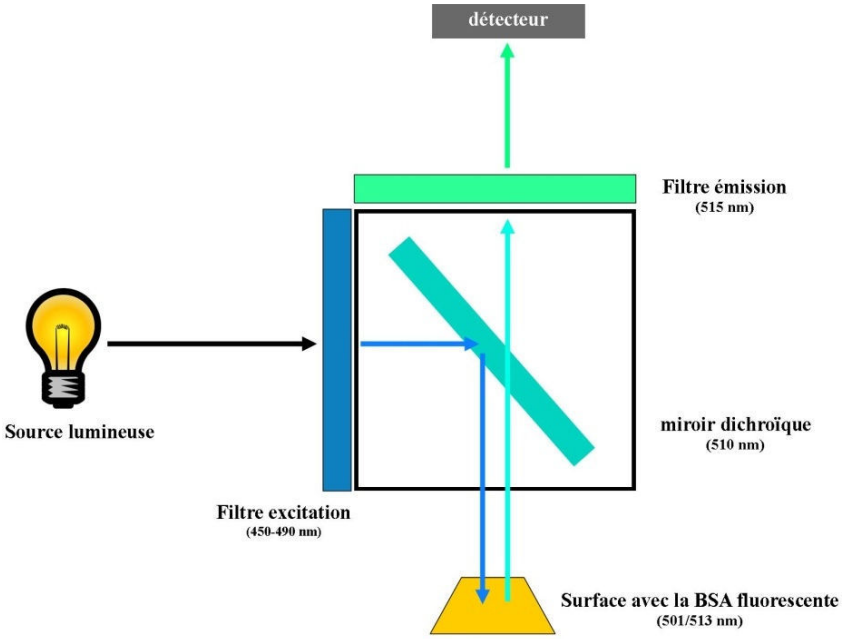


Figure IV.4 : schéma du cube I3 utilisé pour la microscopie de fluorescence avec le parcours de la lumière.

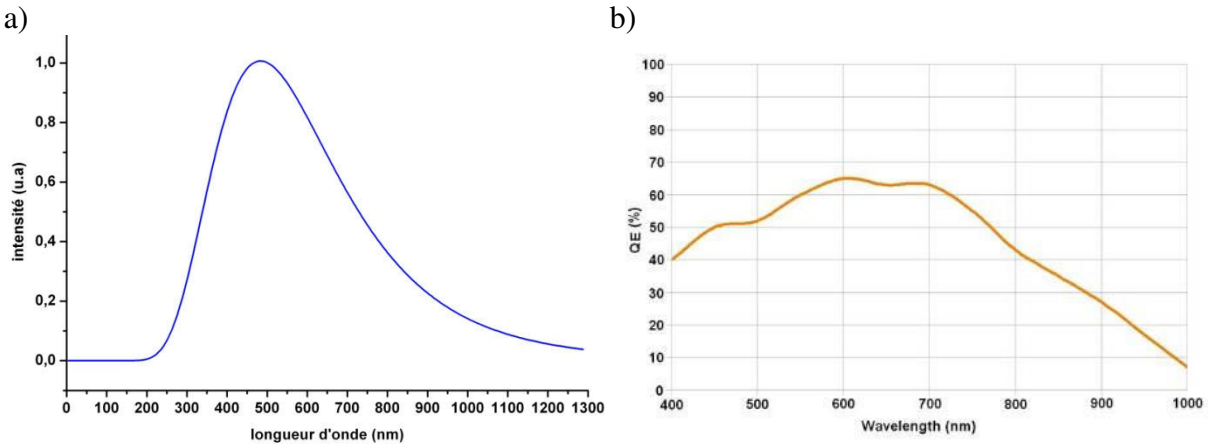


Figure IV.5 : a) spectre du rayonnement de Planck d'un corps noir à 6000 K équivalent à celui de la source xénon XBO et b) spectre de la réponse de la caméra Andor Luca^{EM} EMCCD issu de la brochure du constructeur.

Les observations SEEC ont été menées entre polariseur et analyseur croisés sur un microscope droit Zeiss Axio Scope A.1 muni d'une source HXP 120c (9500 K, Figure IV.6-a), d'un objectif x50 avec une ouverture numérique 0,8. Nous avons utilisé une caméra couleur ZeissAxio Cam HRC (Figure IV.6-b) pilotée par le logiciel AxioVision 4.8. La balance des blancs à « 3200K » a systématiquement été utilisée pour les acquisitions en microscopie SEEC (Tableau IV.2).

Composantes :	Cyan/Rouge	Magenta/Vert	Jaune/Bleue
Gain :	1,00	1,33	0,67

Tableau IV.2 : valeur des gains pour la balance des blancs « 3200K » utilisée pour l'acquisition des images en microscopie SEEC.

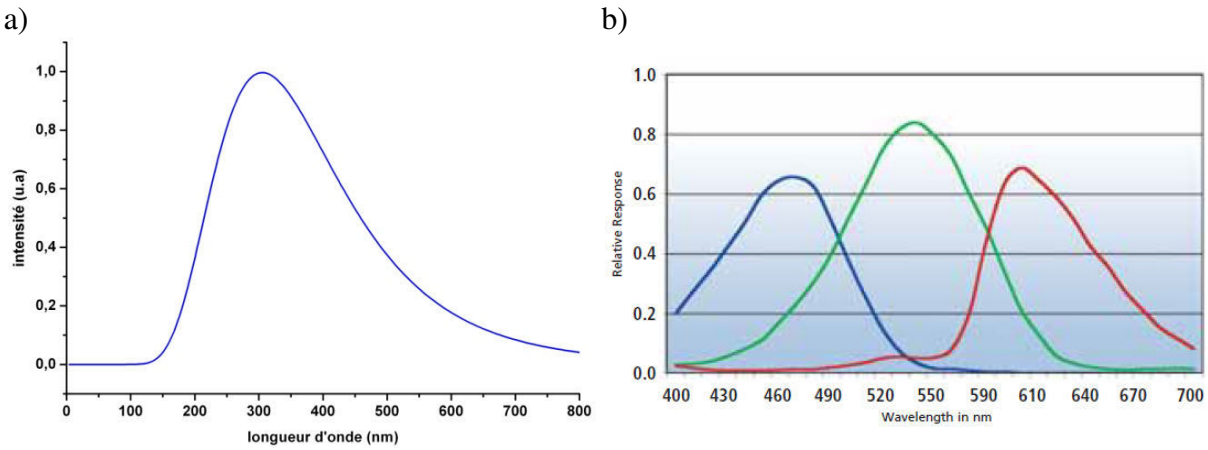


Figure IV.6 : a) spectre du rayonnement de Planck d'un corps noir à 9500 K équivalent à celui de la source HXP 120c et b) spectres de la réponse de la caméra ZeissAxio Cam HRC issue de la brochure de cette dernière.

Nous n'avons pas pu immerger totalement les surfaces d'or (de 4 cm²) par manque de BSA fluorescente. Un dépôt d'une goutte de 300 µL de BSA (0,25 mg/mL) solubilisée dans un tampon acétate (10 mmol/L, pH 4) a été par conséquent effectué, en sachant que cela entraînerait une hétérogénéité sur les bords de cette goutte. Un rinçage abondant à l'eau milliQ a été exécuté. Le séchage des surfaces entraîne par endroits la présence de franges révélant des dépôts très épais.

Les images de fluorescence et de microscopie SEEC ont été faites sur les mêmes surfaces, mais pas sur les mêmes zones de ces surfaces. Il est en effet difficile de retrouver les plots observés parmi des milliers de plots sur la surface après le changement de microscope. Nous avons toutefois veillé à ce que les images soient toutes faites au centre des surfaces afin d'éviter les hétérogénéités du bord de goutte.

1.3 Cinétique d'adsorption de la BSA fluorescente suivie *ex situ* par microscopie de fluorescence et SEEC

1.3.1 Microscopie de fluorescence

L'évolution de l'intensité de fluorescence due à l'adsorption de la BSA sur l'or et sur les plots de 16-MHDA est représentée sur la Figure IV.7 en fonction du temps de contact de la surface avec la solution de BSA fluorescente. Le point appelé temps 0 correspond à une surface conservée dans le tampon acétate sans molécule de BSA durant plus de deux jours. Aucune fluorescence particulière n'a été observée après cette immersion prolongée, puisque les composants du tampon acétate ne fluorescent pas. L'intensité non nulle pour cette image

correspond à la lumière réfléchie par la surface. Cette intensité donne le bruit de fond présent sur toutes les images.

On constate une augmentation de l'intensité du fond et des plots proportionnelle au temps de contact pendant les 10 premières minutes. Pour 30 min d'interaction, on attendait une intensité encore plus grande, au contraire on observe une chute de l'intensité. Comme il fait peu de doutes que le nombre de molécules fluorescentes a continué à croître, nous sommes tentés d'attribuer cette baisse d'intensité au phénomène d'extinction de fluorescence (également appelé atténuation de fluorescence ou « quenching » en anglais). Le quenching est une diminution de la fluorescence d'une molécule *via* son interaction avec les molécules voisines entrainant une relaxation non-radiative des électrons excités vers l'état fondamental. Pour qu'il y ait quenching, il faut que deux conditions soit réunies [8]:

- Il doit y avoir recouvrement entre le spectre d'émission du fluorochrome donneur d'énergie et le spectre d'excitation du fluorochrome qui la reçoit.
- Les molécules doivent être séparées d'une distance inférieure au rayon de Förster qui vaut environ 8 nm [8]. L'efficacité du transfert d'énergie entre deux molécules décroît proportionnellement à R^{-6} (avec R la distance entre les deux molécules). Pour avoir une extinction maximale, il existe un rayon minimal R_0 qui est compris entre 30 et 60 Å en fonction du fluorochrome [13].

Le Bodipy FL ® ayant un faible déplacement de Stokes, il peut à la fois être donneur et récepteur d'énergie. La seconde condition implique que plus il y a de molécules sur la surface et plus les chances de « quenching » sont élevées. L'extinction de fluorescence du Bodipy FL sur lui-même est maximale pour un R_0 = 57 Å (d'après Invitrogen).

Le quenching est plus important en présence de métaux lourds, notamment l'or [8, 14, 15]. La proximité de la couche d'or diminue par contre le blanchiment [16] par un effet de plasmon de surface. L'augmentation de la photostabilité du chromophore par la surface d'or n'est cependant pas un facteur crucial dans nos expériences compte tenu des temps d'observation relativement longs que nous avons réalisés. Un léger phénomène de blanchiment a été observé lors de l'acquisition des images.

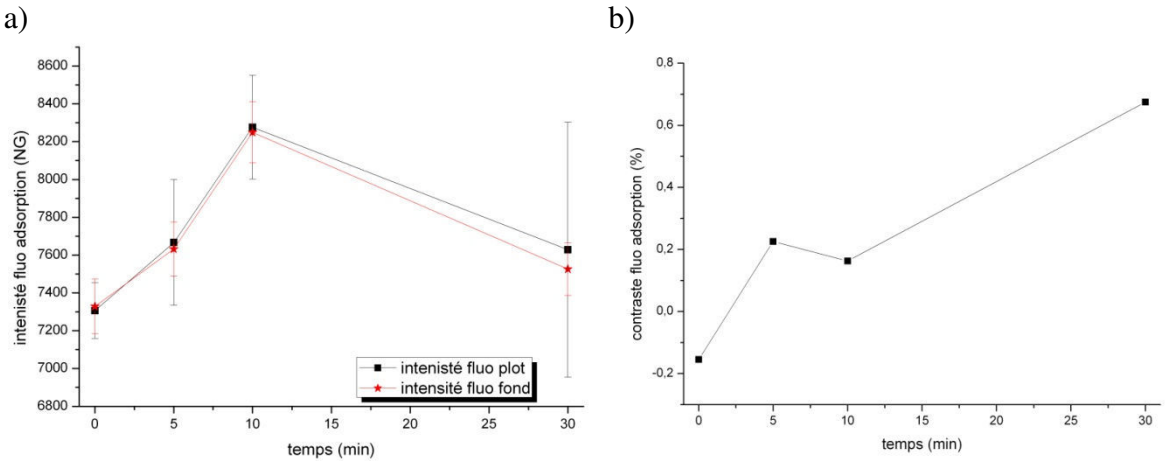


Figure IV.7 : adsorption en fonction du temps de contact entre la surface et la solution de BSA fluorescente (0,25 mg/mL). Variations a) de l'intensité du fond (étoiles rouges) et des plots (carrés noirs) des micrographies de fluorescence et b) le contraste associé.

La Figure IV.7-b montre un contraste entre les plots et le fond positif et croissant. Ceci signifie que les plots adsorbent plus de BSA fluorescente que l'or nu. Ces mesures *ex situ* d'adsorption de la BSA fluorescente ne sont donc pas en accord avec les mesures *in situ* réalisées en SPR. Un rinçage moins efficace et le séchage inhérent aux mesures *ex situ* en est peut-être la cause.

- Chute de l'intensité de fluorescence pour 30 min de contact entre la surface et la solution de BSA attribuée pour l'instant à un phénomène de quenching.
- Adsorption majoritaire de la BSA sur les plots.
- Désaccord entre les mesures d'adsorption réalisées *in situ* par SPR et celles réalisées *ex situ* par microscopie de fluorescence puisque qu'en SPR l'adsorption majoritaire était sur l'or nu.

1.3.2 Microscopie SEEC

En microscopie SEEC, les plots apparaissent plus sombres que le fond de l'image : on est dans un cas de contraste inversé (Figure IV.8-a). Cette inversion du contraste se retrouve pour les trois composantes de l'image (Figure IV.9).

a) micrographie SEEC. b) micrographie de fluorescence.

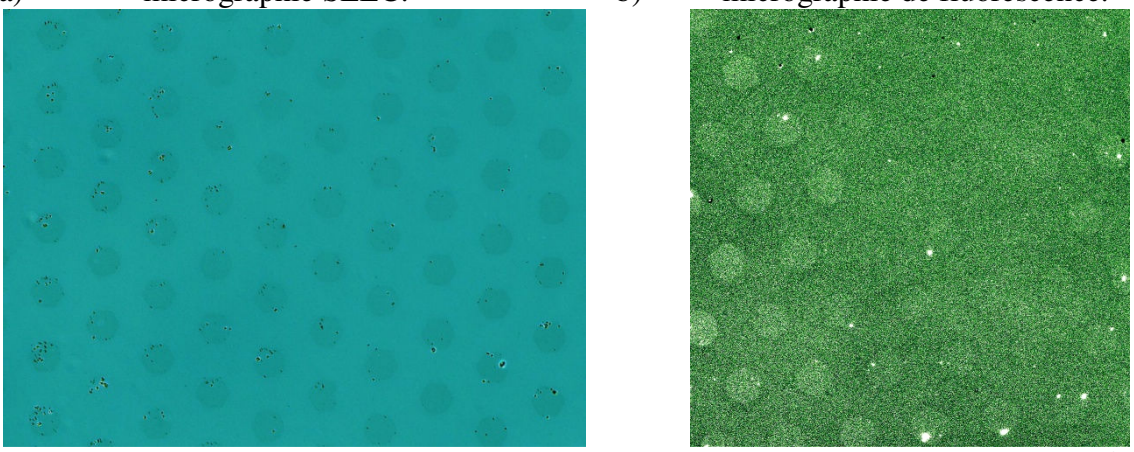


Figure IV.8 : micrographie a) SEEC (RVB) et b) de fluorescence (monochrome) du centre de la surface après 10 min d'adsorption de la BSA. L'image SEEC a subi un prétraitement lors de l'acquisition avec la soustraction d'une image réalisée sur une surface d'or nue.

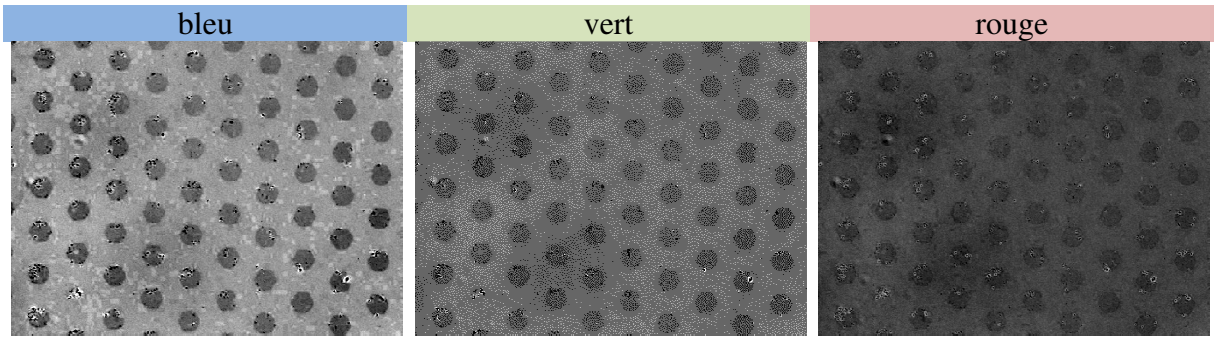


Figure IV.9 : décomposition de l'image SEEC de la Figure IV.8-a en ses trois composantes (bleue, verte et rouge).

L'évolution de l'intensité en fonction du temps de contact avec la solution de BSA (Figure IV.10) est concordante avec ce contraste inversé. Les intensités du fond et des plots diminuent quand le temps de contact augmente. Les trois composantes des images couleurs (Rouge, Vert et Bleu) ont un comportement similaire. Les intensités verte et bleue sont proches l'une de l'autre. L'intensité rouge est 4,5 fois plus faible que les deux autres. Ceci s'explique en partie par le spectre de la lampe qui est centré autour de 350 nm (Figure IV.6-a). La déviation standard de l'intensité moyenne étant approximativement la même pour les trois composantes, l'erreur relative commise sur la composante rouge s'en trouve fortement augmentée.

La microscopie SEEC semble montrer aussi une augmentation de l'intensité globale pour 30 min de contact avec la BSA fluorescente. Ce comportement est analogue à celui observé en fluorescence (compte tenu du contraste inversé). Comme la microscopie SEEC n'est pas sensible au quenching, nous en déduisons que l'hypothèse du quenching était erronée pour interpréter les résultats de fluorescence. À l'heure actuelle nous n'avons pas d'explication pour la chute de l'intensité de fluorescence aux temps longs. Nous atteignons là les limites de notre protocole de mesure en fluorescence et en *ex situ*.

Le quenching n'affecterait pas l'absorption optique des molécules, alors que le blanchiment l'affecterait. Le SEEC étant très sensible à cette absorption, on pourrait préciser

ces effets en comparant les signaux SEEC et de fluorescence après différents temps d'éclairage, mais il faudrait d'abord comprendre ou au moins évaluer la dérive propre au signal SEEC. D'après nos observations (Chapitre III), cette dérive est probablement liée à une évolution photo-induite de l'état de surface.

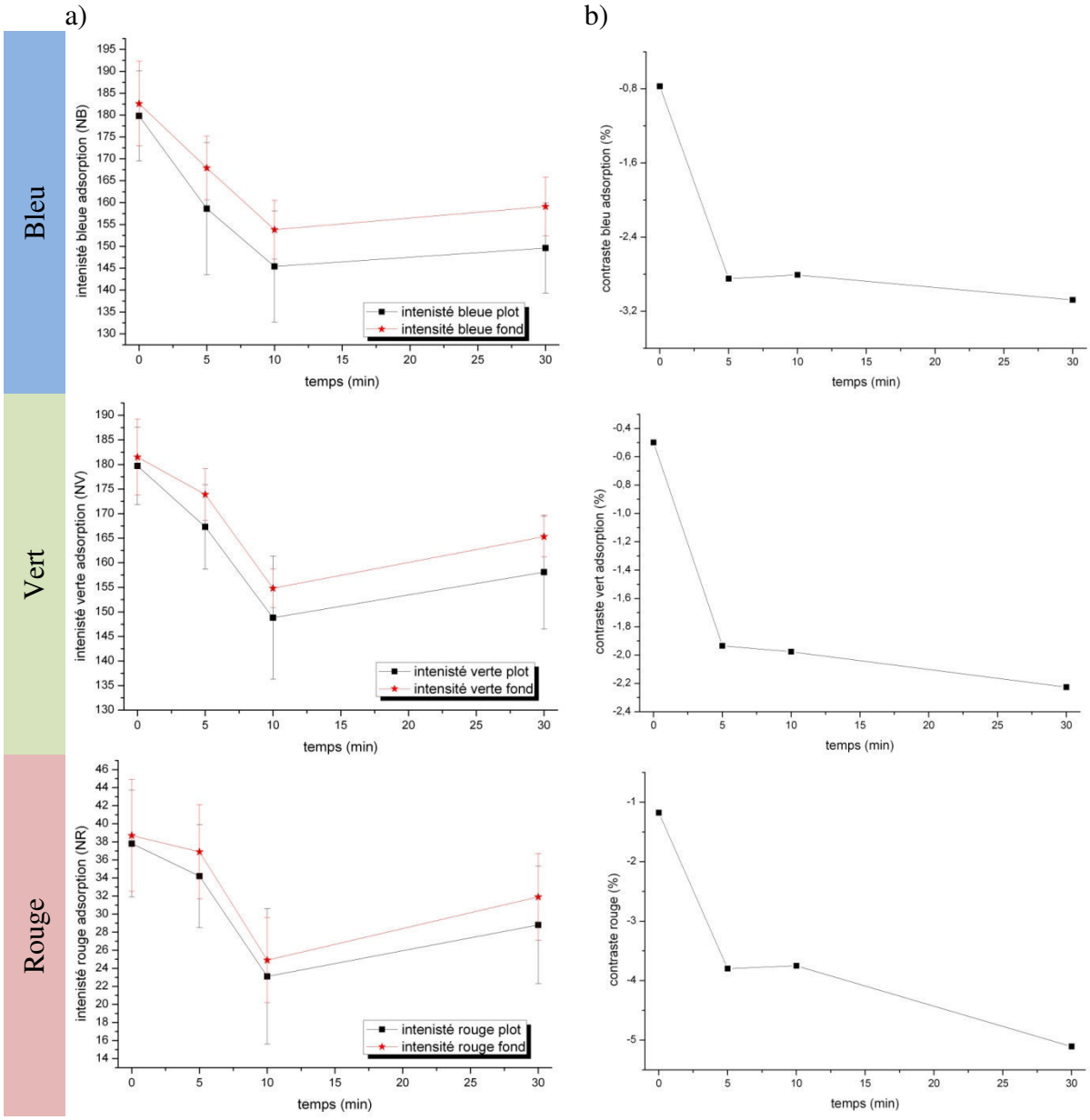


Figure IV.10: adsorption de la BSA fluorescente à 0,25 mg/mL en fonction du temps de contact entre la surface et la solution. Variations a) de l'intensité du fond (étoiles rouges) et des plots (carrés noirs) des micrographies SEEC et b) le contraste associé pour les composantes RVB. Mesures réalisées sur des surfaces de 40 nm d'or.

Comme pour les courbes de fluorescence, les plots en microscopie SEEC montrent une adsorption supérieure à celle du fond. On retrouve également la petite chute du |contraste| observée pour 10 min de contact. Cette chute de |contraste| peut être expliquée par une combinaison d'exponentielles d'adsorption de la BSA sur les plots et sur le fond. Nous discuterons de cela en détail au paragraphe 3.3.2 de ce chapitre à la page 221.

- En tenant compte de l'inversion du contraste entre la microscopie SEEC et la microscopie de fluorescence, nous avons qualitativement observé le même comportement des intensités et du contraste lors de l'adsorption de la BSA fluorescente.

Si l'on essaie de quantifier ces phénomènes, on trouve des variations de l'intensité entre 0 et 10 min d'adsorption également très proches les unes des autres. Alors que l'intensité de fluorescence a augmenté de 14 %, l'intensité SEEC a diminué de 19 % sur la composante bleue, de 17 % sur la composante verte et de 37 % sur la composante rouge. La microscopie SEEC montre une variation d'intensité légèrement plus importante que la fluorescence.

En ce qui concerne le contraste, on retrouve aussi sur cette même période une variation plus importante pour la microscopie SEEC que pour la fluorescence.

- La microscopie SEEC est donc légèrement plus sensible que la microscopie de fluorescence pour des expériences à l'air.

1.4 Cinétique d'immobilisation de la BSA fluorescente suivie *ex situ* par microscopie de fluorescence et SEEC

La fixation de la protéine étant plus efficace par immobilisation que par adsorption nous avons diminué les temps de contact entre la surface et la solution de BSA à une, cinq et dix minutes.

1.4.1 Microscopie de fluorescence

Comme pour l'adsorption de la BSA, les courbes d'immobilisation (Figure IV.11) obtenues en microscopie de fluorescence montrent un accroissement de l'intensité du signal entre 0 et 1 min puis entre 1 et 5 min. Cette augmentation d'intensité correspond à la fixation de la BSA. On constate ensuite une légère chute du signal pour 10 min de contact. Cette chute d'intensité pourrait correspondre à un phénomène de quenching.

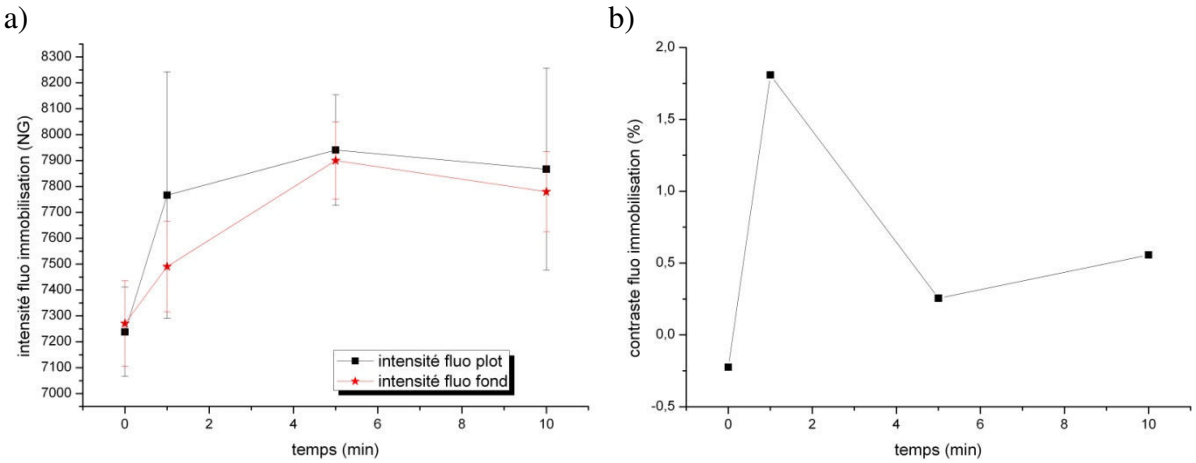


Figure IV.11 : immobilisation en fonction du temps de contact entre la surface et la solution de BSA fluorescente (0,25 mg/mL). Variations a) de l'intensité de fluorescence du fond (étoiles rouges) et des plots (carrés noirs) et b) du contraste associé.

La courbe de contraste est bien positive. Il y a donc bien une immobilisation préférentielle de la BSA sur les plots. La chute du contraste pour 5 min d'immobilisation est

une fois encore la conséquence du couplage des deux cinétiques de fixation de la BSA : sur les plots et sur le fond. On le remarque clairement sur les courbes d'intensité. En effet, pour 1 min de contact, la BSA a été très majoritairement immobilisée sur les plots. Par contre, entre 1 et 5 min de contact, le fond a adsorbé plus de BSA que les plots n'en ont immobilisé.

1.4.2 Microscopie SEEC

On constate sur les courbes d'intensité SEEC (Figure IV.12) une chute de l'intensité entre 0 et 1 min d'immobilisation. Néanmoins, on ne retrouve pas la forte différence de fixation, entre les plots et le fond, observée en fluorescence. Entre 1 et 5 min, on remarque une augmentation de l'intensité puis une diminution entre 5 et 10 min de contact. Sans les mesures de fluorescence, nous pourrions en conclure qu'il y a eu moins de BSA immobilisée après 5 min de contact qu'après 1 min. Pourtant les courbes d'intensité SEEC et de fluorescence étaient similaires pour l'adsorption. Une explication possible de cette variation de l'intensité mesurée pour la surface à 5 min peut être une fluctuation de la lampe comme nous l'avons montré au Chapitre III. En effet, ces mesures SEEC *ex situ* n'ont pas été corrigées des fluctuations de la source.

Cette variation étrange de l'intensité SEEC ne nous permet pas de conclure sur l'hypothèse du quenching pour expliquer la perte d'intensité de fluorescence pour la surface 10 min.

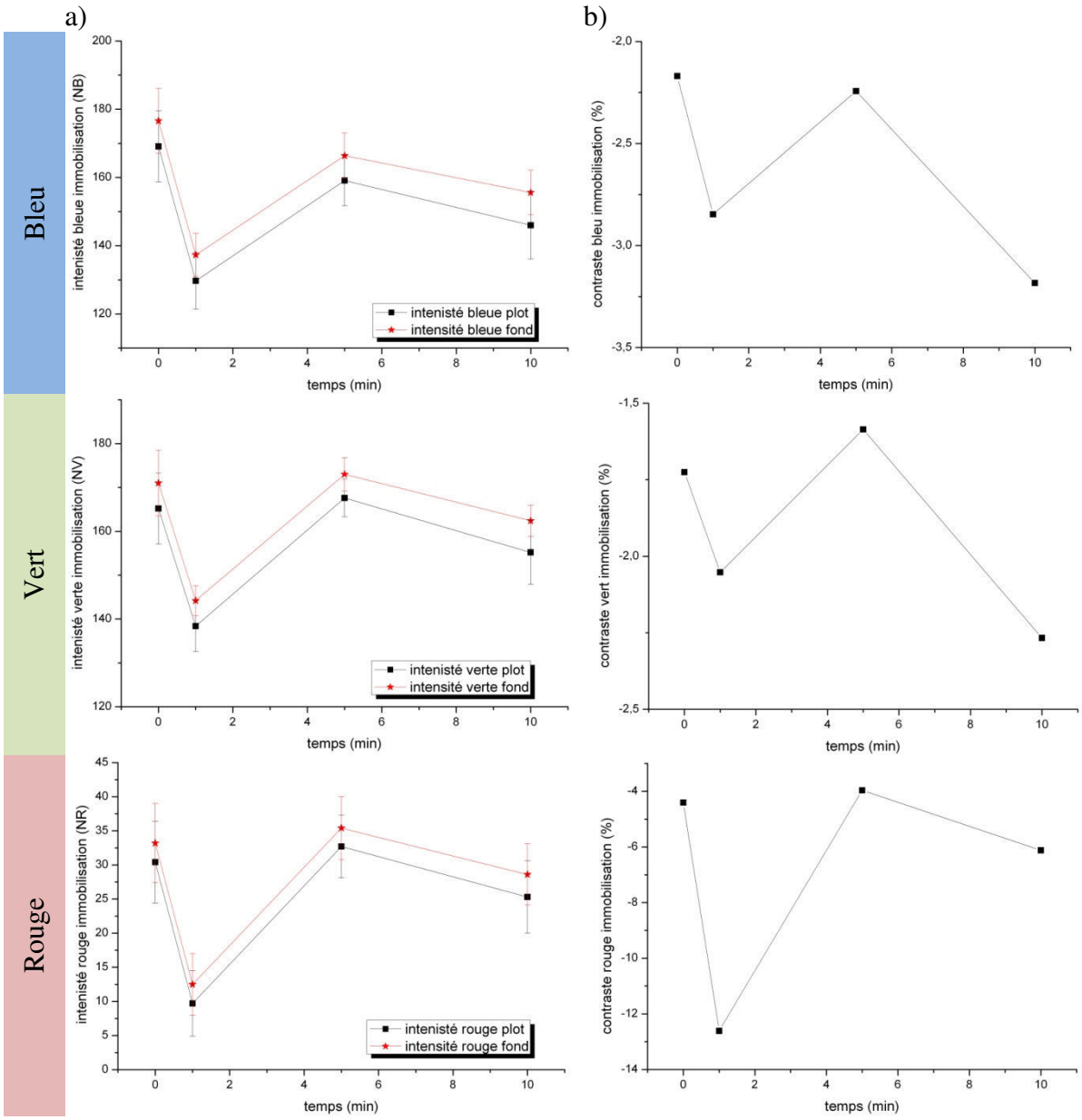


Figure IV.12: immobilisation en fonction du temps de contact entre la surface et la solution de BSA fluorescente 0,25 mg/mL. Variations a) de l'intensité SEEC du fond (étoiles rouges) et des plots (carrés noirs) et b) du contraste associé pour les composantes RVB. Mesures réalisées sur des surfaces de 40 nm d'or.

Comme lors de l'étude de l'adsorption, les intensités des composantes verte et bleue sont très proches l'une de l'autre. La composante rouge reste beaucoup plus faible, mais le contraste associé est plus important que sur les deux autres composantes. Par contre, l'erreur relative est elle aussi plus grande sur le rouge ce qui rend cette composante peu exploitable.

Le contraste SEEC montre deux inversions de pente comme le contraste de fluorescence. L'intensité SEEC montre les mêmes caractéristiques. Les variations du

contraste peuvent être expliquées par la compétition entre les adsorptions sur le fond et sur les plots. Les variations des intensités ne le peuvent pas, car elles ne concernent qu'une des deux régions (plots ou fond). On peut cependant imaginer que le trou d'intensité à une minute est dû à des variations d'intensité de la source, ces variations n'affectant pas le contraste auto-monitoré (Chapitre III).

Compte tenu des différences importantes notées au cours de l'immobilisation *ex situ* de la BSA, nous ne pouvons pas comparer quantitativement les microscopies SEEC et de fluorescence sur les mesures du présent paragraphe.

- Les fluctuations de la source sont un fort handicap pour l'exploitation des intensités en microscopie SEEC. Les mesures *in situ* présentées par la suite seront donc corrigées de ces fluctuations.
- Les trois composantes montrent des variations identiques, mais l'intensité rouge est très faible.
- Les courbes de contraste montrent deux inversions de pente caractéristiques de la compétition entre deux cinétiques.

2 Comparaison avec la microscopie de fluorescence en immersion par le suivi *in situ* de l'immobilisation de la BSA fluorescente

Contrairement à l'étude précédente, il nous a été possible d'enregistrer des micrographies SEEC et de fluorescence des mêmes plots, car l'étude a été menée sur le même microscope. En ce qui concerne les cinétiques, il n'a pas été possible d'effectuer les

expériences SEEC et de fluorescence sur les mêmes surfaces. Nous avons veillé à ce que la qualité des plots et leur position dans le canal de microfluidique soient similaires d'une surface à une autre. Ces précautions permettent de comparer quantitativement les signaux des différentes surfaces.

2.1 Protocole expérimental

2.1.1 Protocole d'observation par microscopie CONE et de fluorescence en immersion

Les mesures de fluorescence en immersion ont été réalisées avec un microscope inversé Zeiss Axiovert 40 MAT muni d'une source HXP 120c, d'un objectif x63 avec une ouverture numérique de 1,4 avec une huile d'immersion immersol 518F (n_e=1,518 à 23 °C) et un filtre 46 HE YFP shift free (Zeiss). Ce cube possède un filtre excitateur avec une bande passante de 500/20 nm, un miroir dichroïque laissant passer la lumière à partir de 515 nm et un filtre émetteur avec une bande passante de 535/30 nm. Le temps d'acquisition des images est de 6,4 s.

Pour la microscopie CONE, nous avons utilisé le même microscope. Le filtre a été remplacé par un cube polariseur/analyseur croisés. Le temps d'acquisition des images est de 3,2 s avec une balance des blancs correspondant à une température de couleur de « 3200K » (Tableau IV.2). La comparaison des temps d'exposition de la fluorescence et du CONE montre que les taux d'extinction des deux techniques sont du même ordre de grandeur.

- Les taux d'extinction de la microscopie CONE et de fluorescence sont du même ordre de grandeur.

2.1.2 Immobilisation de la BSA fluorescente (0,25 mg/ml)

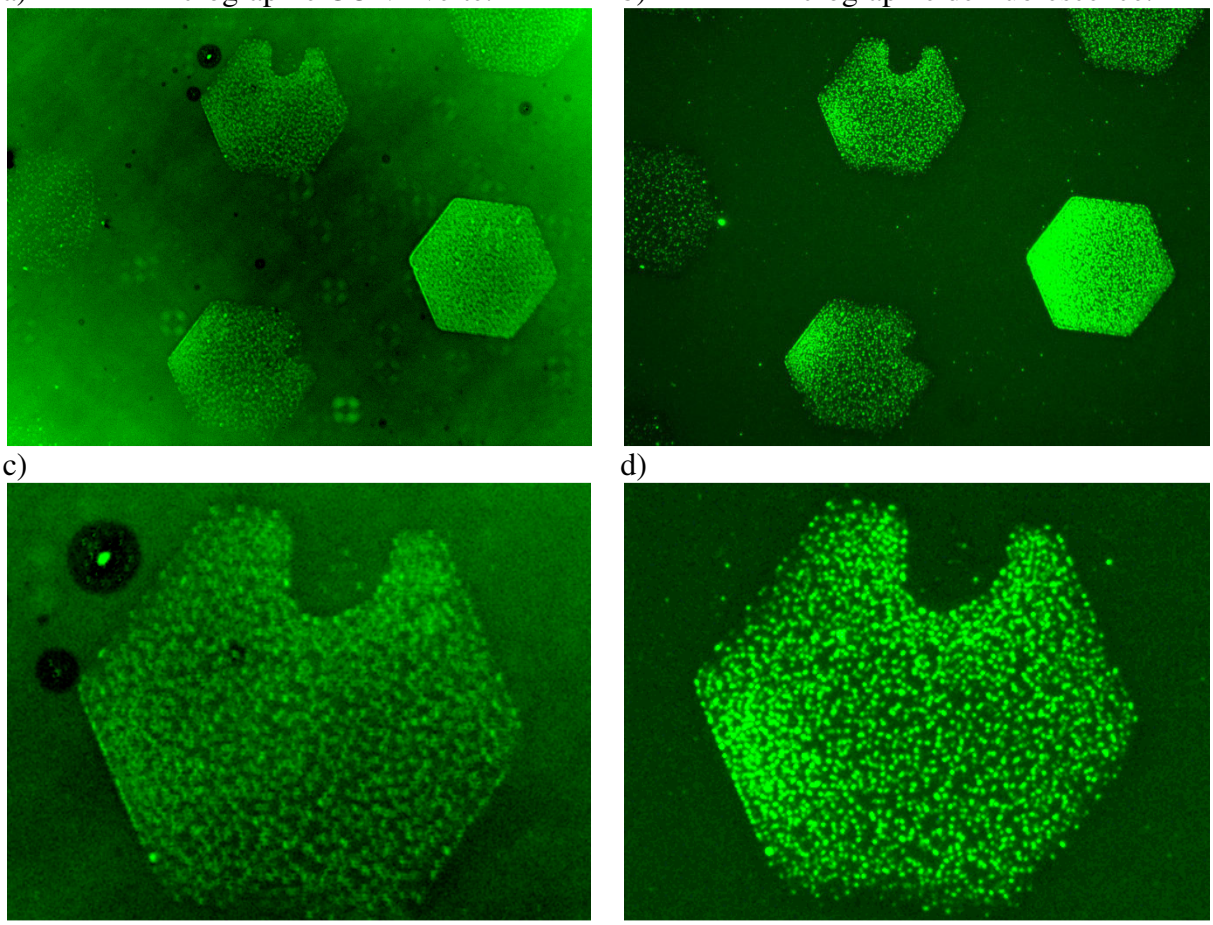
Les solutions sont injectées avec un débit de 55 µL/min. Après l'injection de tampon de course (HBS-P+) pendant 15-20 minutes pour avoir une ligne de base bien stable, nous injectons pendant 12 min une solution aqueuse de 0,2 mol/L de EDC et de 0,05 mol/L de NHS pour activer les fonctions acide carboxylique des plots de 16-MHDA. Si des bulles apparaissent à cette étape, ce qui est rare, nous injectons plus longtemps pour que la surface soit en contact avec la même quantité de solution. Nous injectons ensuite la BSA fluorescente (0,25 mg/mL) dans un tampon acétate (10 mmol/L, pH 4) pendant 12 min. Enfin, nous injectons de l'éthanolamine (1 mol/L, pH 8,5) pendant 12 min pour désactiver et bloquer les groupements -COOH n'ayant pas réagi avec la protéine. Entre deux injections, nous faisons passer du tampon de course pendant 5-10 minutes afin de discerner nettement les plateaux avant et après injection de chaque solution, ce qui permet d'extraire la variation d'intensité ou de contraste occasionnée par le passage de la solution.

2.2 Comparaison des micrographies CONE et de fluorescence après l'immobilisation de la BSA fluorescente

La Figure IV.13 montre des images CONE et de fluorescence (non traitées) acquises après immobilisation de la BSA fluorescente. Contrairement aux images de fluorescence, les images CONE présentent des défauts d'homogénéité de l'éclairage, de tâches sur le chemin optique du microscope et des défauts sur la surface (comme les deux cercles en haut à gauche du plot supérieur de Figure IV.13-a). Comme nous l'avions vu en SPR, le fond adsorbe de la BSA il n'est pas totalement noir sur l'image de fluorescence. Les plots sont plus chargés en BSA fluorescente que le fond. Si l'on fait un agrandissement sur un plot en particulier (Figure

IV.13-c et d), on remarque des motifs identiques en microscopie CONE et en microscopie de fluorescence. Comme nous le verrons plus loin dans ce chapitre, la fluorescence ne joue pas de rôle dans l'imagerie CONE (paragraphe 2.3 p.190).

a) micrographie CONE verte. b) micrographie de fluorescence.



c) d)

Figure IV.13 : micrographies de plots de 16-MHDA après immobilisation de la BSA fluorescente. a) micrographie CONE (composante verte, après inversion puis correction de la dynamique avec le logiciel imageJ) et b) micrographie par fluorescence. c) et d) sont des grossissements respectifs des micrographies a) et b) sur le plot au centre en haut de l'image. Images non corrigées obtenues sur des surfaces supportant 10 nm d'or.

- En immersion, les micrographies CONE montrent les mêmes détails que les micrographies de fluorescence

2.3 Comparaison des cinétiques d'immobilisation de la BSA fluorescente

La Figure IV.14-a montre la cinétique d'immobilisation de la BSA fluorescente (0,25 mg/mL) suivie par l'évolution de l'intensité et du contraste de la composante bleue entre les plots et le fond de l'image en CONE. La Figure IV.14-b montre la même cinétique faite sur une seconde surface, mais suivie cette fois par l'évolution de l'intensité et du contraste entre les plots et le fond en microscopie de fluorescence. L'injection de la solution d'EDC/NHS ne provoque aucune variation du contraste en microscopie de fluorescence alors qu'en microscopie CONE, on identifie bien toutes les phases d'injection (EDC/NHS, BSA et éthanolamine). À la suite de l'injection de la solution d'EDC/NHS, on note une chute de l'intensité et du contraste en microscopie CONE alors qu'aucune évolution n'est observée en microscopie de fluorescence. Pendant l'injection de la BSA, la microscopie CONE montre une forte variation du contraste, de -3,26 % : les plots fixent plus de BSA que le fond. Cette hypothèse est confirmée par les courbes d'intensité de la Figure IV.14-a ainsi que par les micrographies CONE et de fluorescence réalisées après des rinçages au tampon de course (HBSP+) puis à l'eau Versol® (Figure IV.15). La cinétique mesurée par microscopie de fluorescence est beaucoup moins riche d'enseignements à cause d'une gamme dynamique trop faible de la caméra. La seule évolution notable du contraste de fluorescence intervient après la fin de l'injection de la BSA fluorescente. Pour comprendre ceci, il faut regarder directement la variation des intensités (Figure IV.14-b). Il n'y a pas de variation de l'intensité jusqu'à l'injection de la BSA, car ni l'EDC, ni le NHS, ni le tampon de course ne fluorescent. Le contraste de fluorescence entre les plots et le fond pendant l'injection de BSA est nul, non pas à cause du manque de fluorescence, mais au contraire parce que la caméra est saturée par la trop grande quantité de fluorochromes présents dans le canal de microfluidique. **En microscopie de fluorescence, on n'est pas seulement sensible aux molécules présentes à**

la surface comme en microscopie CONE ou en SPR, mais également à celles présentes dans le volume du canal. Dans les conditions où nous travaillons, le signal est à nouveau mesurable seulement après la fin de l'injection de la BSA fluorescente. La chute progressive d'intensité est principalement due au temps nécessaire au tampon de course pour entraîner toutes les molécules de BSA fluorescente hors du canal. On peut estimer à environ 4 min le temps caractéristique de cette décroissance. L'écart entre les plots (carrés noirs) et le fond (ronds rouges) peut quant à lui être interprété comme une désorption plus importante de la BSA sur le fond que sur les plots. Ceci entraîne une augmentation du contraste (Figure IV.14-b) pendant l'écoulement du tampon. La chute du contraste à partir de 90 min de mesure peut être attribuée au blanchiment du fluorochrome. Le photoblanchiment ou « photobleaching » est la perte de luminescence définitive à la suite d'une exposition prolongée à la lumière. Les micrographies de fluorescence et CONE de la Figure IV.16 montrent cette perte d'intensité sur les zones d'illumination prolongée en microscopie de fluorescence. La partie sombre à gauche de la Figure IV.16-b a été illuminée pendant toute la durée de la cinétique par microscopie CONE alors que la partie plus claire à droite était protégée par le diaphragme de champ. On ne constate qu'une très faible altération de la micrographie CONE, visible sur le plot en bas à droite. On peut en déduire qu'il n'y a pas ou très peu de contribution de l'émission de la fluorescence au signal CONE. La modification qu'on peut percevoir en CONE est vraisemblablement liée à la variation de l'indice imaginaire de la BSA fluorescente avec le blanchiment. Le lien entre l'absorption optique et le blanchiment près d'une surface d'or est une question complexe [16]. Son impact sur les mesures CONE reste à explorer.

a) microscopie CONE b) microscopie de fluorescence

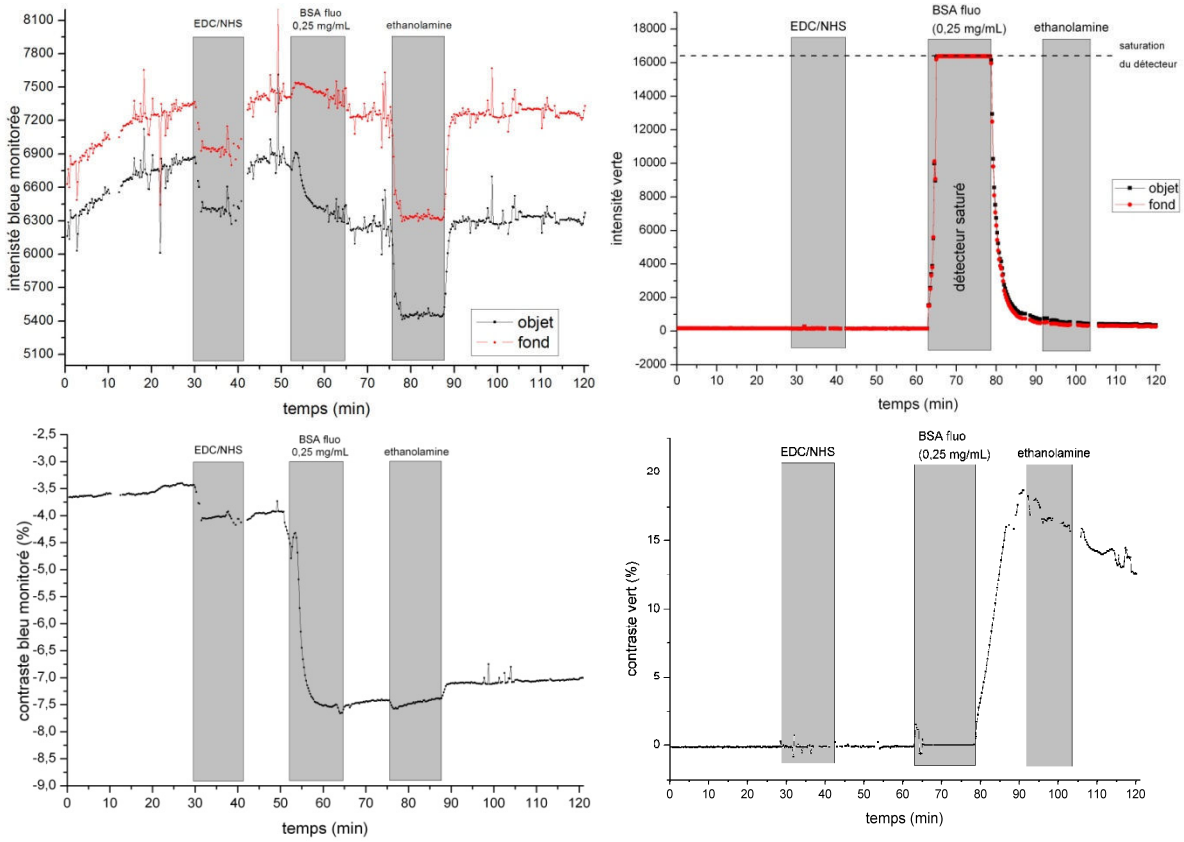


Figure IV.14 : évolution de l'intensité bleue des plots (carrés noirs) et du fond (ronds rouges) en fonction du temps lors de l'immobilisation de la BSA fluorescentes (0,25 mg/mL) et de contraste correspondant, visualisés : a) par microscopie CONE ; et b) par microscopie de fluorescence. La cinétique suivie par microscopie CONE a été enregistrée avec une surface supportant 7 nm d'or et la cinétique suivie par microscopie de fluorescente sur une surface supportant 10 nm d'or.

a) micrographie CONE b) micrographie de fluorescence

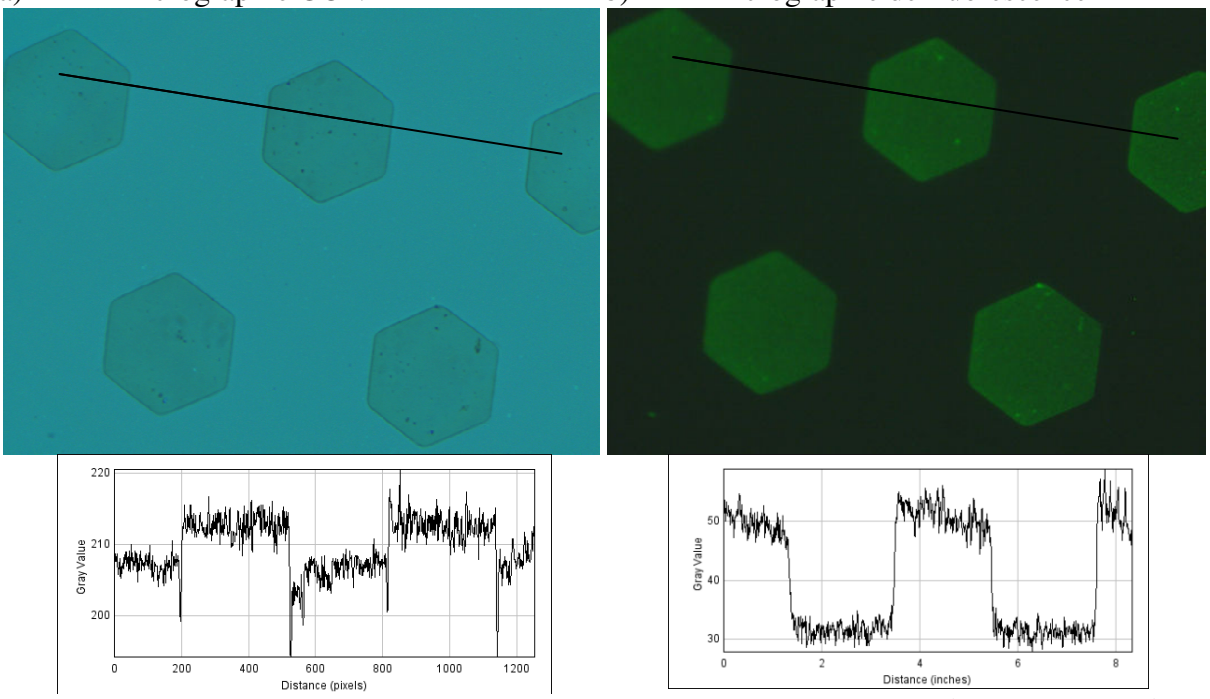


Figure IV.15 : a) micrographie CONE et b) micrographie de fluorescence de la zone à la fin de la cinétique d'immobilisation de la BSA fluorescente (0,25 mg/mL) après avoir rincé avec de l'HBSP+ puis de l'eau Versol ®. Images obtenues sur des surfaces supportant 7 nm d'or.

a) micrographie CONE (non corrigée). b) micrographie de fluorescence.

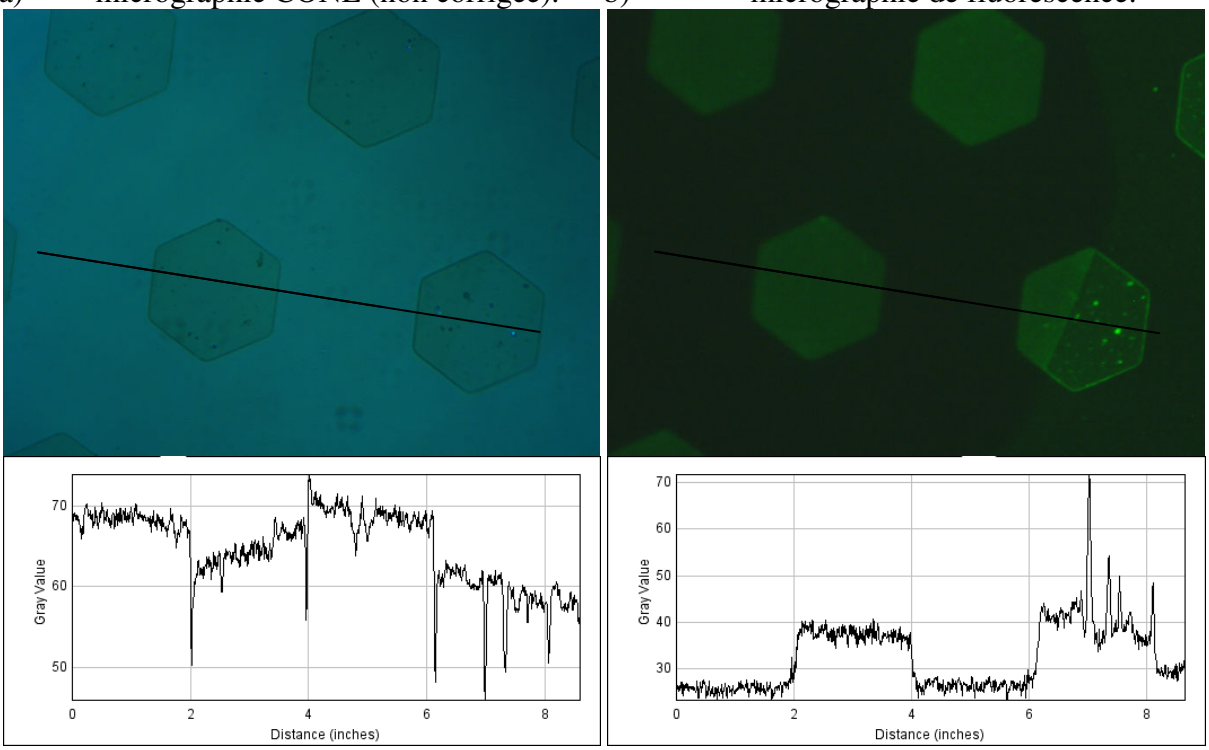


Figure IV.16 : phénomène de blanchiment du Bodipy FL® observé à la limite de la zone d'illumination après de la mesure de la cinétique d'immobilisation de la BSA fluorescente.

On peut reconnaître quatre régions différentes sur la Figure IV.16-b :

- les plots éclairés (PE)
- le fond éclairé (FE)
- les plots non éclairés (PN)
- le fond non éclairé (FN)

On parle ici d'éclairage préalable à celui nécessaire à ces photographies.

Sur la Figure IV.16-b (fluorescence), on trouve par intensité de fluorescence décroissante : PE > PN > FN > FE en faisant l'hypothèse que la lumière ne joue aucun rôle dans l'immobilisation de la BSA, on attend, par quantité de BSA décroissante : PE = PN > FE = FN. L'observation FN > FE suggère donc le photoblanchiment des marqueurs fixés sur l'or nu. On attendrait donc de la même manière PN > PE, mais c'est l'inverse qui est observé ! On doit faire appel à un autre mécanisme, qui peut être le quenching des molécules fluorescentes lorsqu'elles sont très concentrées. **Ainsi le blanchiment d'une partie de ces molécules**

pourrait annihiler leur quenching en désactivant une partie de leur population. On peut donc paradoxalement augmenter le signal en tuant des marqueurs.

Une autre observation remarquable est que l'intensité de fluorescence est beaucoup plus homogène sur PE que sur PN, ce qui va dans le sens de notre explication puisqu'il existe une distance minimum entre marqueurs actifs (rayon de Förster, paragraphe 1.3.1, p.173) pour qu'ils produisent du signal.

La microscopie de fluorescence nous permet également d'évaluer la qualité de notre cellule de microfluidique. En effet, après immobilisation de la BSA fluorescente nous ne distinguons pas de plots à l'extérieur du canal en microscopie de fluorescence alors que la microscopie CONE montre qu'ils sont bien présents (Figure IV.17). Ces plots n'ont donc pas fixé de BSA fluorescente, ce qui prouve que la BSA a bien été confinée dans le canal et que notre cellule de microfluidique est bien étanche. Ces images ont été acquises après que la surface ait été retirée de la cellule et séchée. Les traces de sel sur la micrographie CONE s'arrêtent également à la limite du canal (Figure IV.17).

a) micrographie CONE b) micrographie de fluorescence

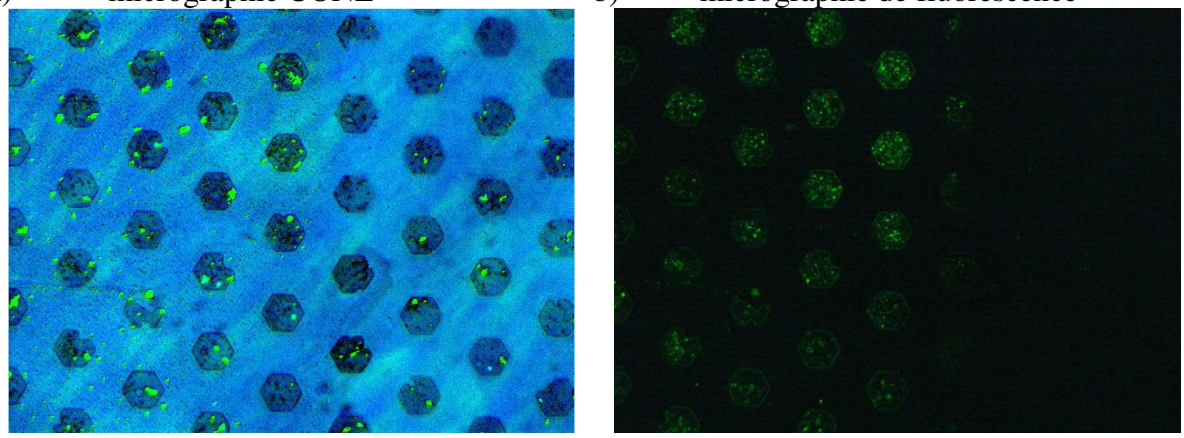


Figure IV.17 : micrographie a) CONE et b) de fluorescence de la limite entre l'intérieur (à gauche) et l'extérieur du canal (à droite) après immobilisation de la BSA fluorescente (observées à l'air avec un objectif x20 HD DIC d'ouverture numérique 0,6).

Dans les paragraphes 1.3 et 1.4, on a relevé une corrélation forte entre les mesures *ex situ* faites en microscopie CONE et celles réalisées en microscopie de fluorescence à l'air. Malheureusement, cette étude contient trop de biais (séchage, observation de plots différents entre la microscopie CONE et de fluorescence…) pour pouvoir être exploitée autrement que qualitativement.

Les mesures réalisées en immersion sont plus propices à une étude quantitative de l'immobilisation de la BSA fluorescente. Après immobilisation de la BSA, on observe les mêmes objets sur les micrographies CONE et de fluorescence comme l'a montré la Figure IV.13. Les cinétiques suivies par microscopie CONE nous permettent de voir l'effet de chaque injection. Ceci n'est pas possible avec la microscopie de fluorescence qui n'est sensible qu'à l'injection de la BSA. Elle y est d'ailleurs biaisée puisqu'elle compte aussi bien les molécules de BSA présentes à la surface que celles en solution dans le canal de microfluidique. De plus, la microscopie de fluorescence est faussée par le photoblanchiment du fluorochrome, ce qui ne permet pas de mesurer la quantité exacte de BSA immobilisée. La microscopie CONE n'est pas ou peu affectée par ces deux phénomènes.

- La microscopie CONE en immersion montre les mêmes objets que la microscopie de fluorescence.
- La fluorescence émise ne contribue pas à la visualisation CONE.
- La microscopie CONE permet de visualiser l'action des solutions d'EDC/NHS et d'éthanolamine, ce que ne permet pas la microscopie de fluorescence.
- La mesure de fluorescence de surface est biaisée par la fluorescence de volume. Ce n'est pas le cas en CONE.
- La mesure de fluorescence est biaisée par le blanchiment et le quenching. Il ne semble pas que ce soit le cas en CONE.

3 Comparaison des expériences CONE et SPR

Les mesures CONE *in situ* ont été réalisées dans les mêmes conditions opératoires que celles exposées lors du paragraphe sur la fluorescence (paragraphe 2.1, p.184).

3.1 Etude comparative d'une cinétique CONE et d'une cinétique SPR

Dans ce paragraphe, nous allons détailler les différentes étapes de l'immobilisation d'une protéine visualisée par microscopie CONE. Pour ce faire, nous utiliserons comme modèle la courbe de l'intensité bleue obtenue pour l'expérience d'immobilisation de la BSA fluorescente à 0,25 mg/mL sur des plots de 16-MHDA. Les courbes présentées dans la suite du chapitre seront exploitées selon les mêmes méthodes.

Sauf indication contraire, les expériences présentées dans ce chapitre ont été menées avec un tampon de course HBS-P+, comme nos mesures SPR du Chapitre II. Les régions non identifiées sur les courbes correspondent au passage de ce tampon. Les zones grises correspondent aux durées des injections.

3.1.1 Comparaison des courbes d'immobilisation CONE et SPR

Sur la courbe CONE (Figure IV.18-a), les points de mesure sont en noirs. La courbe rouge correspond à un lissage avec un filtre médian sur six points. Les courbes SPR et CONE sont très ressemblantes, avec cependant une inversion d'effets de la variation d'indice des solutions (pour simplifier la formulation nous utiliserons le terme anglais « Bulk effect » dans la suite de ce chapitre) pour les deux solutions d'EDC/NHS et d'éthanolamine. En CONE,

l'immobilisation de la protéine engendre aussi une chute d'intensité, alors qu'en SPR elle augmente le signal. Ceci s'explique par le fait qu'en CONE nous avons un contraste négatif.

Une autre différence importante au niveau des Bulk effects est le temps de variation du signal. Il est beaucoup plus long en CONE (typiquement 1-2 minutes) qu'en SPR (2-3 secondes). Cette différence ne tient qu'à la qualité du système de microfluidique. Sur l'appareil SPR, les transitions entre liquides sont assurées par des segments d'air qui interdisent leur mélange. La fluidique utilisée sur notre montage CONE est beaucoup plus rudimentaire, et les liquides successifs se mélangent dans les tubes et la cellule comme présenté dans le Chapitre III. De ce fait, les niveaux des signaux ne peuvent être comparés qu'après la rampe de 1 à 2 minutes du montage CONE. L'ajout de vannes d'injection pourrait minimiser ces effets de miscibilité.

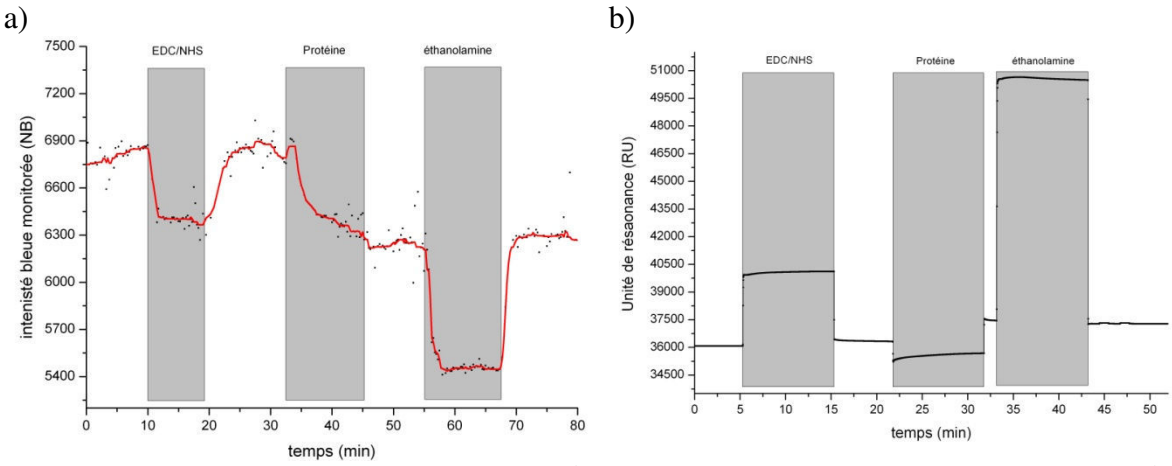


Figure IV.18 : comparaison entre les courbes d'intensité a) CONE et b) SPR lors de l'immobilisation d'une protéine.

3.1.2 Description étape par étape de la cinétique

3.1.2.1 Injection de la solution d'EDC/NHS

Pour immobiliser une protéine, nous injectons tout d'abord une solution d'EDC/NHS pour activer les groupements –COOH présents sur la surface (Figure IV.19). Le changement

de milieu entraîne un saut d'intensité (Bulk effect). Ce Bulk effect est la manifestation la plus visible de cette étape, aussi bien en CONE qu'en SPR.

En CONE, le Bulk effect équivaut à 442,8 ± 10 NB (soit 6 % de l'intensité moyenne) avec un saut négatif lors du passage du tampon à la solution d'EDC/NHS puis un saut positif dans l'autre sens. En SPR, le Bulk effect vaut 3810 ± 50 RU (soit 10 % du signal moyen). Le Bulk effect de l'EDC/NHS est donc plus marqué en SPR.

Il n'y a pas ou peu de changement de l'intensité CONE à la suite de l'injection d'EDC/NHS (+ 20 NB soit 0,3 %). L'effet SPR est lui aussi assez faible (+ 340,1 RU soit 0,1 %).

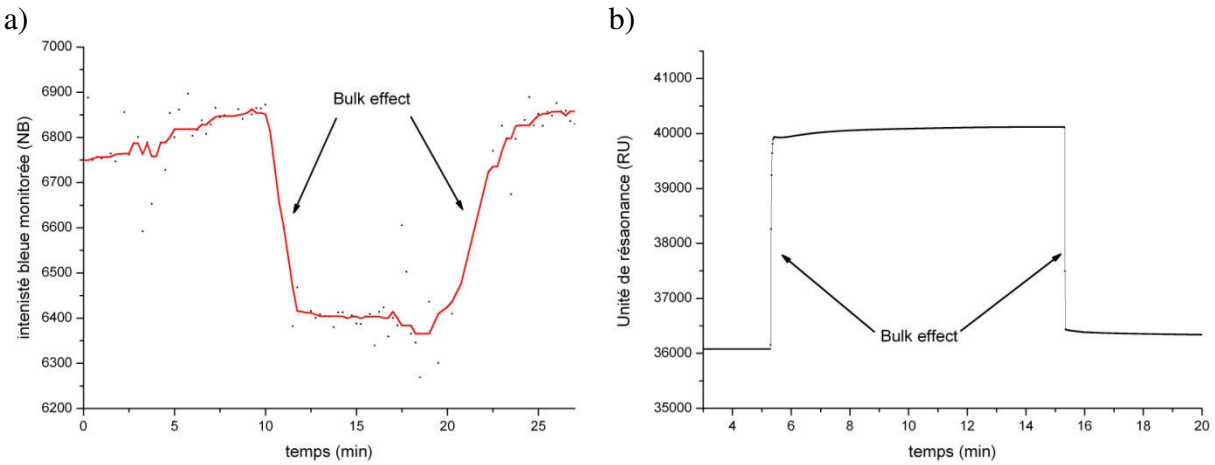


Figure IV.19 : zoom sur l'injection de la solution d'EDC/NHS a) en CONE et b) en SPR.

Dans le cas d'une expérience d'absorption (par opposition à l'immobilisation), l'injection d'EDC/NHS est remplacée par une injection plus longue du tampon de course.

- Inversion des Bulk effects entre CONE et SPR.
- Bulk effect plus important en SPR (10 % du signal) qu'en CONE (6 % du signal).
- Faible variation du signal après injection d'EDC/NHS pour les deux techniques (0,3 % en CONE et 0,1 % enSPR).

3.1.2.2 Injection de la solution de protéine

Lors de l'injection de la protéine, on observe une chute nette de l'intensité CONE. Cette chute d'intensité semble suivre une exponentielle décroissante. Deux autres phénomènes sont observables sur cette partie de la courbe. Le premier, présent comme en SPR à chaque injection, est le Bulk effect, avec une augmentation de l'intensité à 33 min suivie d'une chute de l'intensité à 45,5 min. Comme pour l'injection d'EDC/NHS, les Bulk effects sont inversés en CONE par rapport à la SPR et sont également beaucoup moins prononcés. Ces deux sauts d'intensité bornent l'injection de la BSA. Le second phénomène est la chute d'intensité vers 30 min qui n'est absolument pas présente en SPR. Cette chute n'est pas systématique, mais peut apparaître avant chaque injection de manière plus ou moins prononcée. Elle est liée à l'arrêt de la microfluidique lors du changement de tube ainsi qu'au changement de la pression d'air utilisée pour pousser les solutions de densité et de viscosité différentes. Ces variations de pression entraînent des déplacements verticaux de la lamelle d'or qui engendrent des variations de la mise au point.

Le fait que le Bulk effect de l'injection de la protéine soit moins important en CONE (78 ± 12 NB soit 1 % de l'intensité brute) qu'en SPR (1493 ± 386 RU soit 4 % du signal brut) nous permet de mieux voir la cinétique d'immobilisation de la protéine.

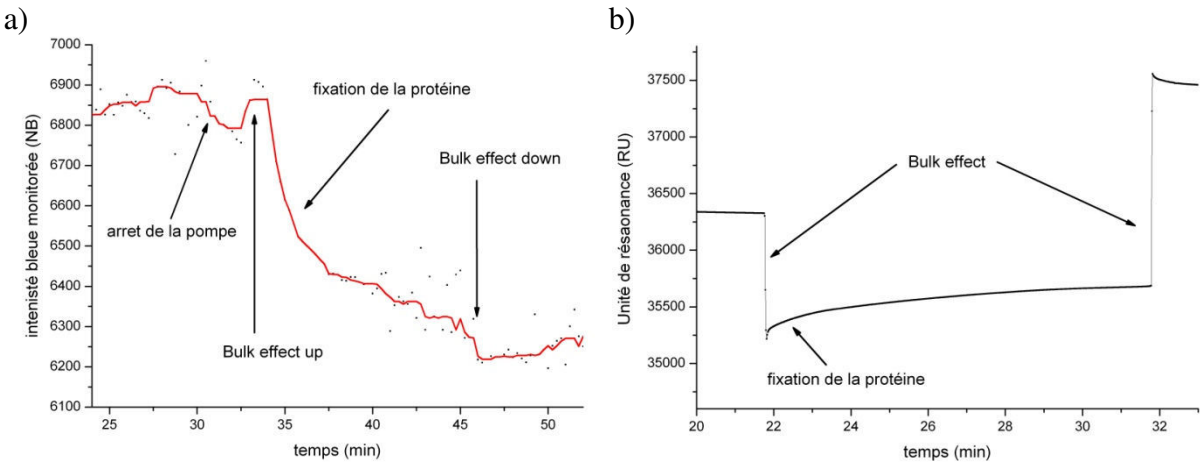


Figure IV.20 : zoom sur l'injection de la protéine a) en CONE et b) en SPR.

- En CONE, on est moins gêné par le Bulk effect qu'en SPR pour suivre la cinétique d'immobilisation des protéines.
- La cinétique CONE d'immobilisation est donc exploitable pour mesurer la fixation de la protéine en fonction du temps d'injection.
- Nos courbes CONE sont perturbées par les insuffisances du système fluidique.

3.1.2.3 Injection de la solution d'éthanolamine

Après l'immobilisation de la protéine, nous injectons une solution d'éthanolamine (1 mol/L, pH 8,5) afin de bloquer les fonctions –COOH n'ayant pas fixé de protéines. Cette solution permet également d'éliminer les protéines accrochées de manière non covalente sur la surface. On constate souvent des intensités CONE et SPR légèrement plus faibles après l'injection d'éthanolamine. Le Bulk effect de l'éthanolamine est le plus important de la cinétique avec, en CONE, 820 ± 27 NB (soit 13 % de l'intensité initiale), et, en SPR, 13154 ± 65 RU (soit 35 % du signal initial).

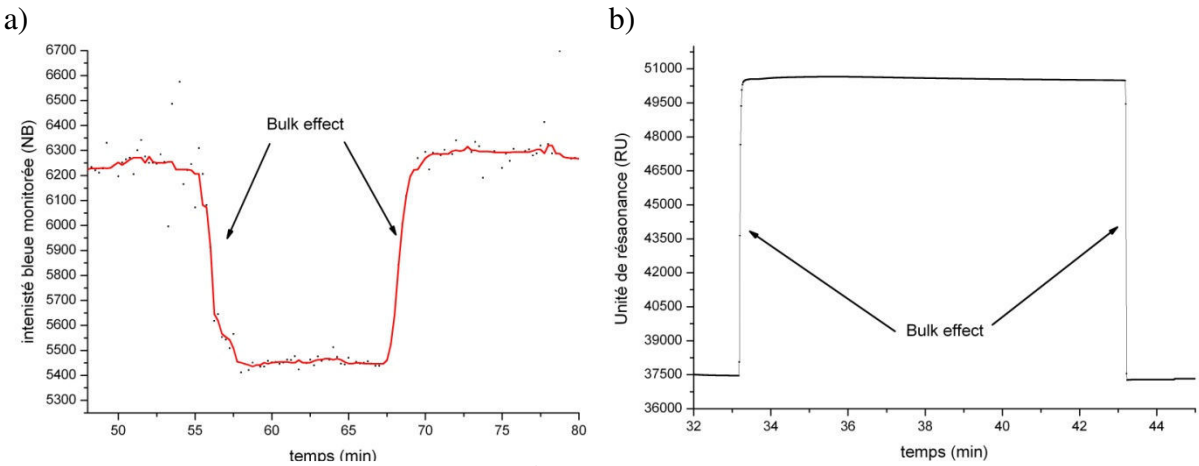


Figure IV.21 : zoom sur l'injection de la solution d'éthanolamine a) en CONE et b) en SPR.

- L'éthanolamine présente le Bulk effect le plus marqué de la cinétique d'immobilisation.
- Le Bulk effect est encore plus important en SPR (35 % du signal) qu'en CONE (13 % du signal).

3.1.3 Comparaison quantitative des Bulk effects CONE et SPR

La Figure IV.22 compare les Bulk effects mesurés en microscopie CONE et en SPR. On constate une proportionnalité entre les signaux mesurés par les deux techniques pour les trois Bulk effects. Ceci permet de comparer directement nos mesures SPR et CONE.

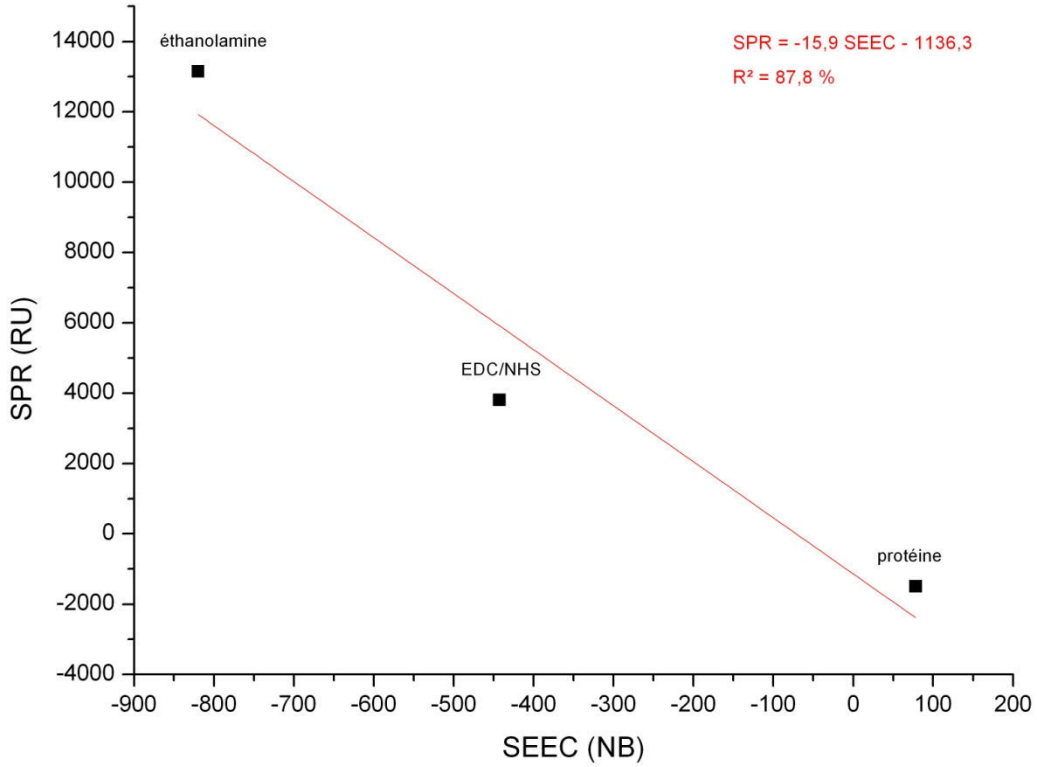


Figure IV.22 : comparaison des Bulk effects CONE et SPR pour cette immobilisation modèle.

Le Bulk effect mesuré lors de l'injection de la protéine (BSA dans le cas présent) est le plus faible de tous.

- Bulk effects SPR et CONE proportionnels.

3.1.4 Quantité de protéines immobilisées

Pour déterminer la quantité de protéine immobilisée, on s'intéresse aux niveaux des plateaux avant et après injection des solutions. La différence entre les plateaux nous informe de la quantité de matière fixée à chaque étape (Figure IV.23, Tableau IV.3). En SPR, la quantité de protéines immobilisées est donnée par la différence entre les niveaux des plateaux à la fin de l'injection d'EDC/NHS et à la fin de celle de l'éthanolamine. En CONE, cette différence sur le bleu vaut -571,3 NB dans le cas ci-dessous (Figure IV.23). Ceci représente une variation de -8,3 % par rapport à l'intensité initiale.

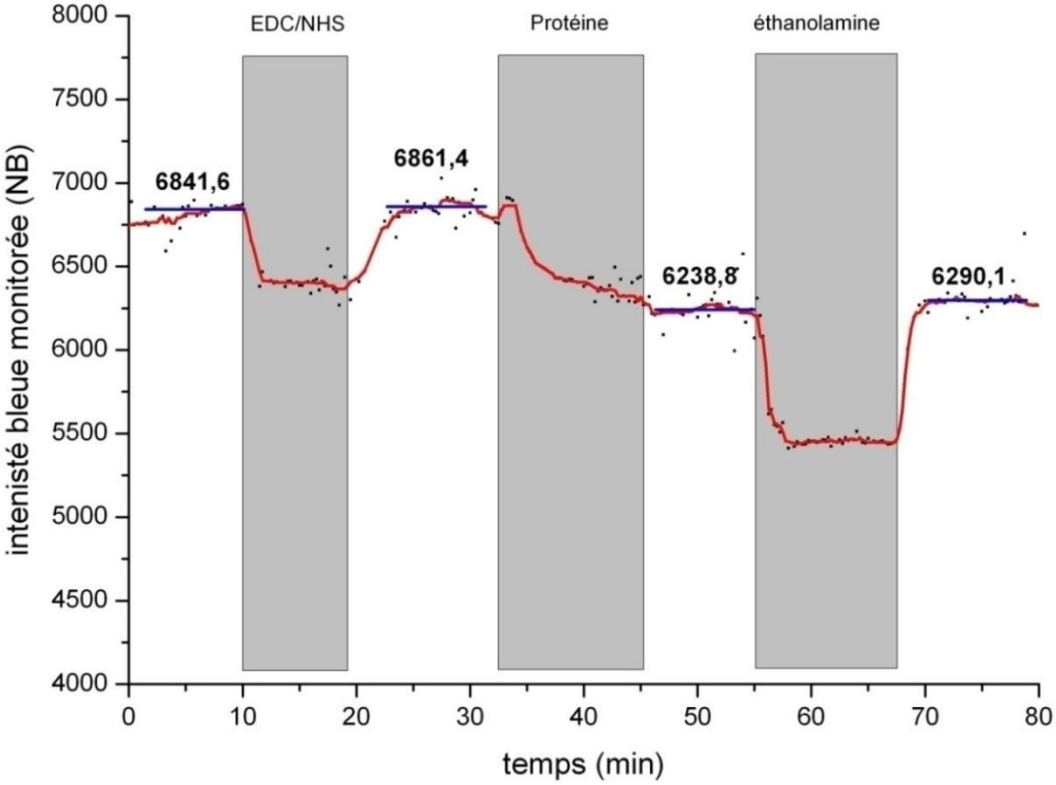


Figure IV.23 : lecture des niveaux d'intensité CONE des plots avant et après injection des solutions dans le cas de l'immobilisation de la BSA fluorescente (0,25 mg/mL).

	EDC/NHS	Protéine	Ethanolamine
Intensité CONE bleue brute (NB)	6861,4	6238,8	6290,1
dI (NB)	+ 19,8	- 622,6	+ 51,3
dI/I (%)	+ 0,3	- 9,1	+ 0,8

Tableau IV.3 : intensité CONE brute de la composante bleue après chaque injection, variation et variation relative de cette intensité après chaque injection.

3.1.5 Courbe de contraste CONE

En microscopie CONE, nous suivons simultanément l'immobilisation de la protéine et son adsorption sur l'or nu. Il nous est donc possible de réaliser des courbes de contraste entre ces deux situations. Un exemple est donné sur la Figure IV.24. Idéalement, il faudrait passiver le fond pour qu'il constitue une référence plus stable.

Sur ces courbes de contraste, les Bulk effects sont beaucoup moins prononcés que sur les courbes d'intensité, car ils affectent approximativement de la même façon les intensités des plots et du fond (Chapitre III). Ils ne restent décelables que pour l'injection de l'éthanolamine.

Les courbes de contraste sont très peu bruitées. Le lissage effectué de la même manière que pour la courbe d'intensité n'a que peu d'effet sur la courbe de contraste (p.193). On constate encore néanmoins la présence des effets de mise au point engendrés par les variations de pression dans la microfluidique avant et après les changements de tube. Ces variations sont très visibles pour l'injection de la protéine.

Au début de la cinétique, le contraste entre le fond et les plots est négatif (-3,4 %). Au cours de la cinétique d'immobilisation, le contraste ne cesse de diminuer en valeur algébrique. En valeur absolue, il augmente. Cela signifie que les plots sont de plus en plus visibles sur les images. Dans la suite du manuscrit, nous utiliserons le mot contraste pour parler des valeurs algébriques. Pour évoquer le contraste en valeurs absolues, qui rend mieux compte des captures, nous utiliserons la notation suivante : |contraste|.

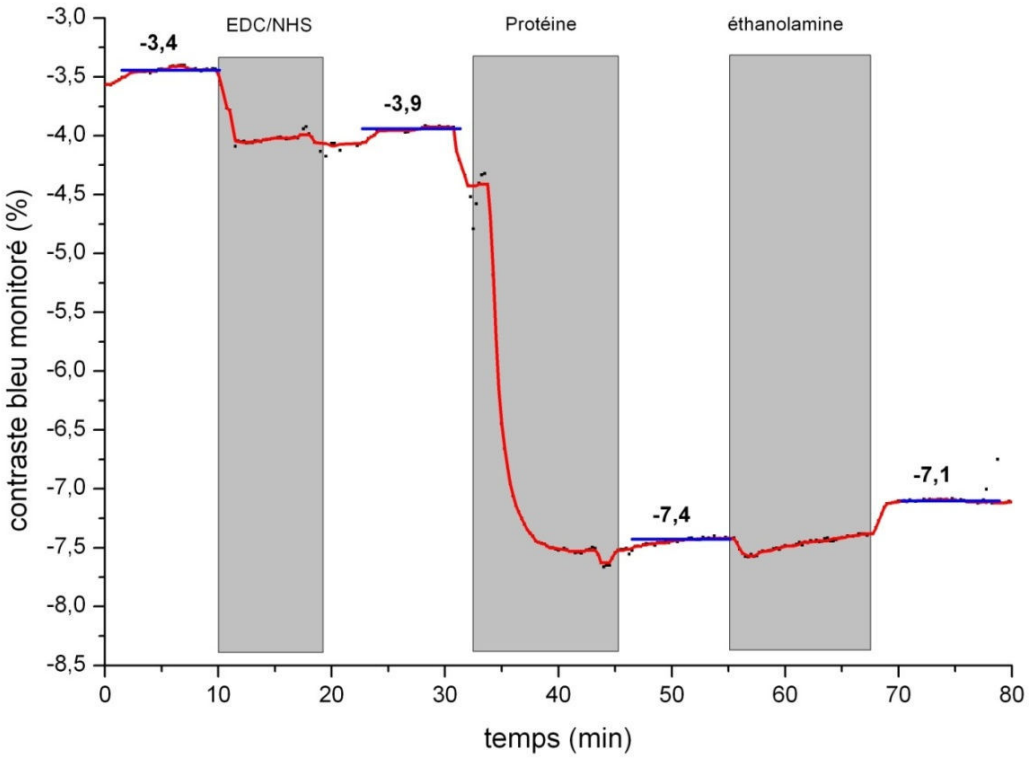


Figure IV.24 : lecture des niveaux de contraste CONE entre le fond et les plots de 16-MHDA avant et après injection des solutions dans le cas de l'immobilisation de la BSA fluorescente (0,25 mg/mL).

	EDC/NHS	Protéine	Ethanolamine
Contraste CONE bleue brute (%)	- 3,9	- 7,4	- 7,1
dC (%)	- 0,5	- 3,5	+ 0,3
dC/C (%)	+ 14,7	+ 89,7	- 4,1

Tableau IV.4 : contraste CONE de la composante bleue après chaque injection, variation et variation relative du contraste après chaque injection.

Comme pour l'intensité, la quantité de protéines fixée correspond à la différence entre les contrastes mesurés après injection de la solution d'EDC/NHS et après injection de la solution d'éthanolamine. Dans l'exemple choisi, cette variation de contraste est de -3,2 %, ce qui représente une variation relative de 82,1 %.

Contraste *vs* intensité :

- Quasi-disparition des Bulk effects sur les courbes de contraste.
- Courbes beaucoup moins bruitées.
- Augmentation importante du |contraste| à la suite de l'injection de la protéine.

3.2 Analyse quantitative des cinétiques d'adsorption et d'immobilisation de la BSA fluorescente

Dans la partie 2 de ce chapitre, nous avons présenté des éléments qualitatifs. Dans cette partie, abordons l'étude quantitative par microscopie CONE de l'immobilisation et de l'adsorption de la BSA fluorescente (0,25 mg/mL). Pour extraire la quantité de BSA fixée, nous allons procéder comme expliqué dans la partie 3.1.4 (p.199) pour les intensités et 3.1.5 (p.200) pour les contrastes.

3.2.1 Adsorption de la BSA fluorescente en CONE

Rappelons qu'en SPR nous avions mesuré sur des surfaces homogènes (sans plot), une adsorption préférentielle de la BSA sur l'or nu par rapport à l'or recouvert de 16-MHDA (Chapitre II [12]). Sur des surfaces à plots, l'adsorption moyenne mesurée était plus importante que la moyenne des mesures effectuées sur surfaces homogènes et pondérées par les aires d'or nu et de 16-MHDA (Chapitre III). L'hypothèse faite à ce moment-là était que les défauts des plots de 16-MHDA en étaient la cause. L'imagerie CONE peut nous permettre de la réexaminer.

3.2.1.1 Cinétiques CONE

Sur les courbes d'intensité bleue de la Figure IV.25, on remarque que l'intensité mesurée sur l'or nu décroit rapidement lors de l'injection de la BSA fluorescente jusqu'à rejoindre celle mesurée sur les plots (t = 42 min de cinétique soit au bout de 3 min d'injection de la BSA). Ceci se traduit par une perte du |contraste| bleu. Pendant le reste de l'injection, la

chute d'intensité du fond est plus lente que celle des plots. Il y a donc une remontée du |contraste| jusqu'à atteindre un plateau pour 51 min de cinétique soit 11 min d'injection. La chute du |contraste| après l'injection de la BSA est due au Bulk effect. Elle est compensée par une augmentation symétrique au début de l'injection de BSA, mais le premier Bulk effect n'est pas visible, car il est masqué par la forte adsorption de la BSA sur l'or nu.

Aucun de ces détails de la cinétique d'adsorption de la BSA fluorescente n'est visible sur les courbes d'intensité verte, car le Bulk effect qui est plus marqué sur cette composante (Chapitre III) masque les autres variations. La forte adsorption de la BSA sur l'or peut par contre être déduite de la courbe du contraste vert. On retrouve le même temps caractéristique que pour la composante bleue. Les autres variations de contraste identifiées pour la composante bleue ne sont pas visibles dans le vert en raison de rapports signal/bruit trop faibles.

Les rapports signal sur bruit des courbes d'intensité et de contraste de la composante rouge sont beaucoup trop faibles pour que ces courbes soient exploitables de manière quantitative.

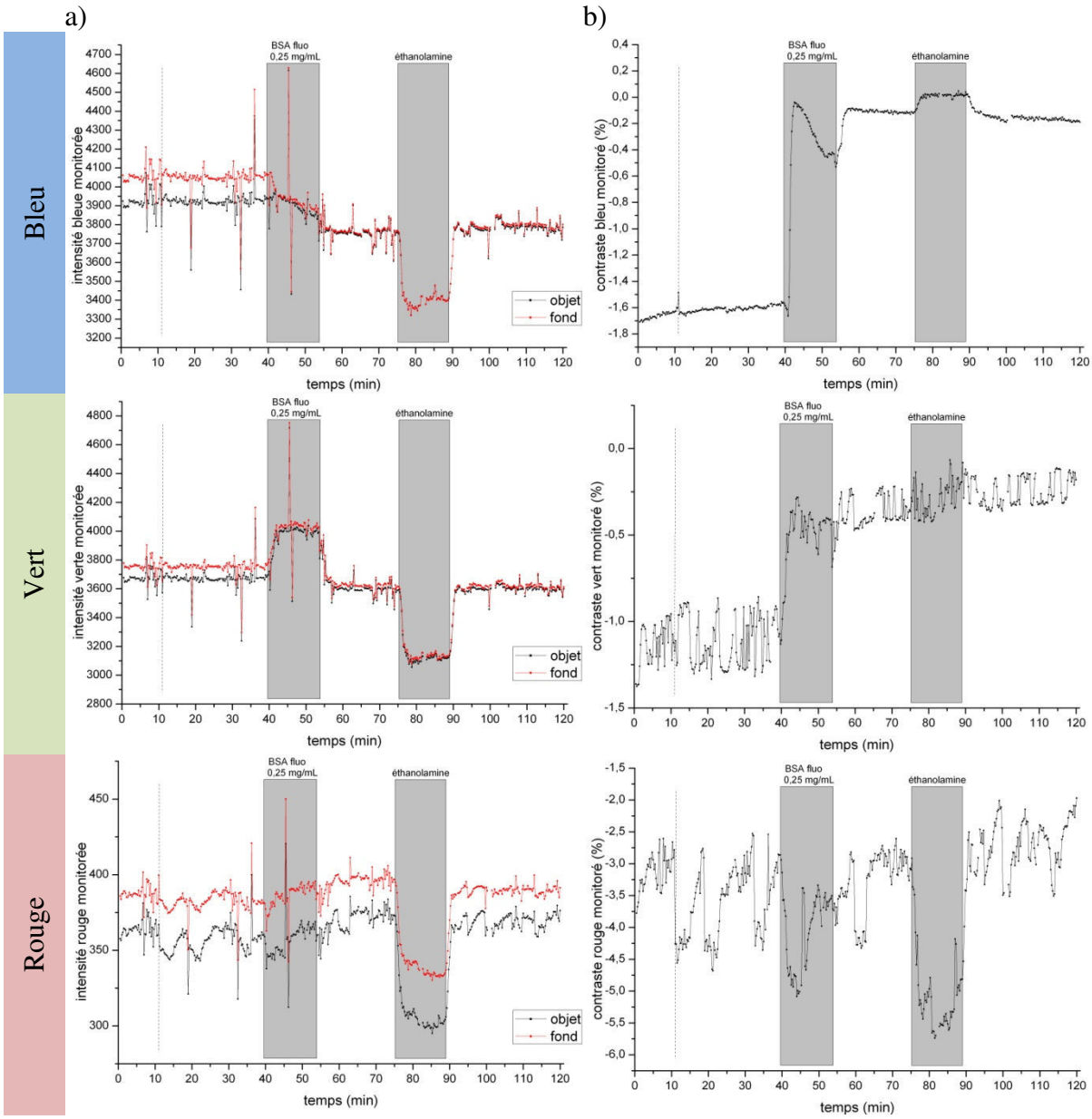


Figure IV.25 : variations a) de l'intensité du fond (en rouge) et des plots (en noir) des micrographies CONE pour l'adsorption de la BSA fluorescente à 0,25 mg/mL et b) le contraste associé pour les composantes RVB.

Adsorption de la BSA fluorescente	dI	dI/I (%)	dC (%)	dC/C (%)
Fond (bleu)	- 255,8 NB	- 6,3		
Plots (bleu)	- 140,9 NB	- 3,6	+ 1,4	- 87,5
Fond (vert)	- 137,0 NV	- 3,8		
Plots (vert)	- 68,5 NV	- 1,9	+ 0,9	- 71,4
Fond (rouge)	+ 5,2 NR	+ 1,4		
Plots (rouge)	+ 11,1 NR	+ 3,1	-	-

Tableau IV.5 : niveaux d'intensité et de contraste correspondant à l'adsorption de la BSA issus des courbes de la Figure IV.25. La variation d'intensité est mesurée entre la fin de l'injection d'EDC/NHS et la fin de l'injection d'éthanolamine.

Pour les composantes verte et bleue, les chiffres du Tableau IV.5 montrent la quantité de BSA fixée. Ils sont en accord avec les mesures SPR. On trouve que l'or fixe plus de BSA que les couches de 16-MHDA et que l'adsorption sur le 16-MHDA est plus importante sur une surface à plots que sur une monocouche auto-assemblée.

- Résultat CONE en accord avec les mesures SPR.
- Adsorption prépondérante de la BSA sur l'or entraînant un forte chute du |contraste|.
- Meilleur rapport signal sur bruit pour la composante bleue.
- Bulk effect important sur la composante verte lors de l'injection de la BSA.
- Très mauvais rapport signal/bruit pour la composante rouge.

3.2.1.2 Imagerie CONE et de fluorescence.

Si l'on s'intéresse à l'imagerie, on constate bien un contraste CONE presque nul à la fin de la cinétique d'adsorption (Figure IV.26-a). Notre étonnement vient plus des images de fluorescence (Figure IV.26-b) sur lesquelles les plots sont plus intenses que le fond contrairement à ce qu'indique la cinétique d'adsorption CONE. Nous attribuons cette anomalie à la compétition entre le blanchiment et le quenching du chromophore, c'est-à-dire à un artéfact de l'imagerie par fluorescence.

a) micrographie CONE b) micrographie de fluorescence.

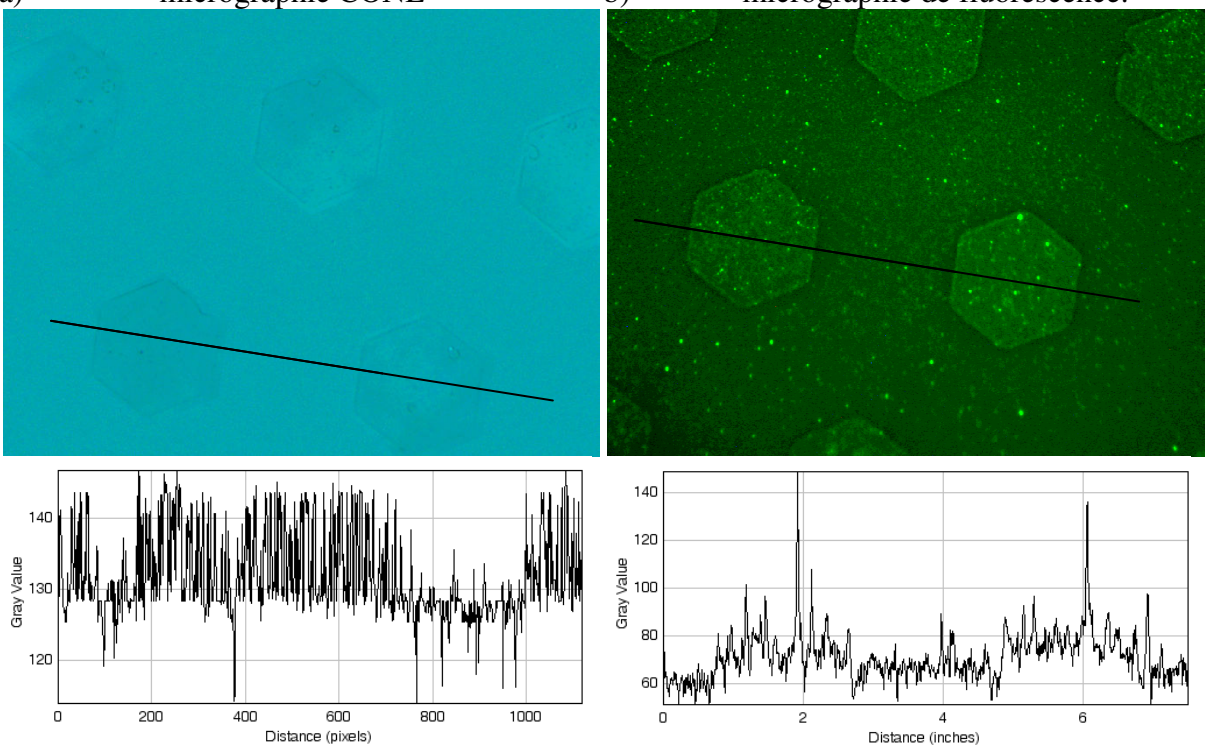


Figure IV.26 : a) micrographie CONE et b) micrographie de fluorescence de la zone à la fin de la cinétique d'adsorption de la BSA fluorescente (0,25 mg/mL) après avoir été rincé avec de l'HBSP+. Images obtenues sur des surfaces supportant 7 nm d'or.

Ces effets de compétition sont bien visibles à la limite des zones éclairées et non éclairées pendant l'expérience d'adsorption (Figure IV.27). Pour en discuter, nous allons utiliser les mêmes notations que celles du paragraphe 2.3 (p.190).

L'effet de compétition entre ces deux phénomènes n'est cependant pas exactement le même que celui observé précédemment (paragraphe 2.3 p.190). Dans le cas précédent, cette conjugaison du photoblanchiment et du quenching se traduisait par un lissage des hétérogénéités sur les plots. Cette fois, ces hétérogénéités sont toujours présentes comme on peut le voir sur la Figure IV.27.

Cette micrographie nous confirme d'ailleurs que la BSA s'est majoritairement fixée sur le fond comme on le constate sur la zone claire à droite de l'image. Cette zone correspond

à celle qui était protégée par le diaphragme de champ. La zone sombre à gauche est celle qui a été exposée à la lumière pendant toute la durée de la cinétique.

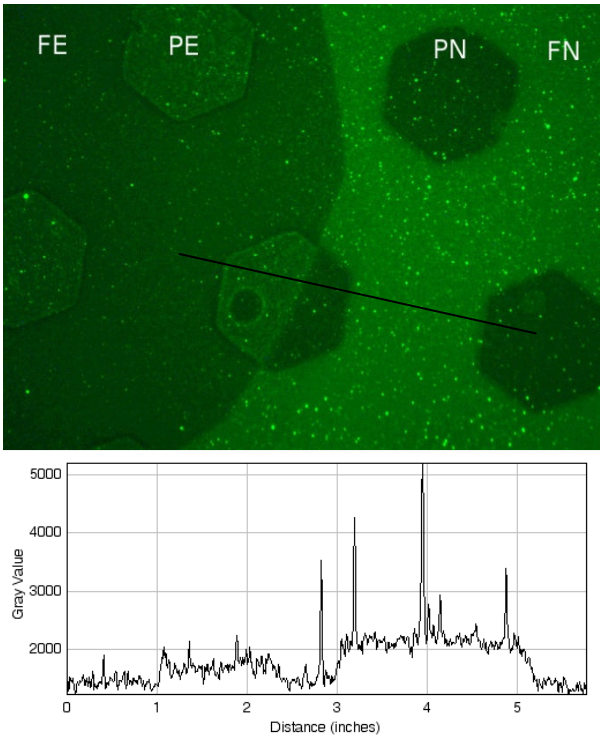


Figure IV.27 : différence de fluorescence entre la zone observée lors de la cinétique d'adsorption de la BSA (à gauche) et celle protégée par le diaphragme de champ (à droite).

Sur la micrographie, les niveaux d'intensité sont ordonnés ainsi : FN > PE > PN > FE. Comment peut-on expliquer ce que l'on observe sur la zone éclairée ? D'après les valeurs d'intensité CONE de la composante bleue du Tableau IV.5, la BSA s'est adsorbée 1,8 fois plus sur le fond que sur les plots soit : $I_F = 1{,}8\ I_P$. On devrait donc avoir PE = PN = 1,8 FE = 1,8 FN.

Les différences constatées s'expliquent bien en introduisant le blanchiment et le quenching des marqueurs fluorescents. Ces mécanismes sont *a priori* quantitativement différents sur les plots et sur l'or nu. Dans une première approche, nous montrons que les

différences d'intensité observées sur la Figure IV.27 peuvent déjà s'expliquer semi-quantitativement sans tenir compte de cette subtilité.

Zone sur la micrographie	BSA adsorbée	quenching	Blanchiment	Perte de quenching due au blanchiment
FN	α	Q+		
PE	α/1,8	Q+	B	Q-
PN	α/1,8	Q+		
FE	α	Q+	B	

Tableau IV.6 : éléments influents sur l'intensité de fluorescence émise par chaque zone de la Figure IV.27, où α est proportionnelle à la quantité de BSA adsorbée sur le fond, Q^+ l'effet du quenching, B l'effet du blanchiment et Q^- la perte de quenching à cause du blanchiment.

On a les équations suivantes :

$$\mathrm{FN} = \alpha - \alpha Q^+ = \alpha(1 - Q^+)$$ **Équation IV.5**

$$\mathrm{PE} = \frac{\alpha}{1{,}8} - \frac{\alpha}{1{,}8}(Q^+ + B + Q^-) = \frac{\alpha}{1{,}8}(1 - Q^+ - B - Q^-)$$ **Équation IV.6**

$$\mathrm{PN} = \frac{\alpha}{1{,}8} - \frac{\alpha}{1{,}8}Q^+ = \frac{\alpha}{1{,}8}(1 - Q^+)$$ **Équation IV.7**

$$\mathrm{FE} = \alpha - \alpha(Q^+ + B) = \alpha(1 - Q^+ - B)$$ **Équation IV.8**

Si on prend par exemple $Q^+ = 0{,}5$, $Q^- = -0{,}4$ et $B = 0{,}3$ (valeurs choisies arbitrairement), on obtient :

$$\mathrm{FN} = \alpha(1 - 0{,}5) = 0{,}5\alpha$$ **Équation IV.9**

$$\mathrm{PE} = \frac{\alpha}{1{,}8}(1 - 0{,}5 - 0{,}3 + 0{,}4) = 0{,}33\alpha$$ **Équation IV.10**

$$\mathrm{PN} = \frac{\alpha}{1{,}8}(1 - 0{,}5) = 0{,}27\alpha$$ **Équation IV.11**

$$\mathrm{FE} = \alpha(1 - 0{,}5 - 0{,}3) = 0{,}2\alpha$$ **Équation IV.12**

On retrouve bien FN > PE > PN > FE.

Pour savoir si notre hypothèse est valable, il faut comparer les valeurs obtenues et celles mesurées sur la micrographie. N'étant pas en mesure de connaître exactement la quantité de la BSA adsorbée sur le fond (α), nous allons donc raisonner de manière relative et

exprimer toutes les valeurs obtenues en fonction de l'intensité du fond non éclairé (Tableau IV.7).

Zone sur la micrographie	Intensité mesurée	Rapport mesuré	Intensité évaluée	Rapport évalué
FN	2295	1	0,50α	1
PE	1411	0,66	0,33α	0,60
PN	1323	0,55	0,27α	0,54
FE	1250	0,54	0,20α	0,40

Tableau IV.7 : comparaison entre les valeurs d'intensité mesurées et celles évaluées avec notre hypothèse de comportement pour les différentes zones.

Les valeurs théoriques et mesurées sont très proches. L'écart le plus important (14 %) est pour FE. Notre hypothèse de travail semble correcte pour expliquer les différences d'intensité observées entre partie éclairée et partie non éclairée.

Les images CONE et de fluorescence ne montrent pas d'effets spécifiques du bord des plots qui pourraient expliquer l'adsorption plus importante sur les surfaces à plots que sur les surfaces homogènes. On doit en déduire que les SAMs des plots n'ont pas la même réactivité que les SAMs homogènes.

- L'imagerie de fluorescence génère de nombreux artéfacts.
- L'effet de compétition entre le blanchiment et le quenching entraîne une intensité de fluorescence supérieure sur les plots de la zone éclairée.
- On n'observe pas d'effet du bord des plots pouvant expliquer la plus forte adsorption de ces derniers par rapport à une SAM de 16-MHDA.

3.2.2 Cinétique d'immobilisation de la BSA fluorescente par microscopie CONE

Le terme de fixation de la protéine sera utilisé à chaque fois qu'il y aura en même temps immobilisation sur les plots et adsorption sur le fond ou dans les tableaux où l'on compare les deux modes de fixation.

Rappelons qu'en SPR, nous avions mesuré sur des couches de 16-MHDA complètes et homogènes une immobilisation de la BSA deux fois plus importante que son adsorption sur l'or nu (Chapitre II, [12]). Sur les surfaces à plots, nous avons mesuré une quantité de BSA fixée conforme aux proportions des aires d'or nu et recouverte de 16-MHDA lors de l'expérience d'immobilisation (Chapitre III).

3.2.2.1 Cinétiques CONE

Le premier constat que l'on peut faire sur les courbes d'intensité et de contraste présentées à la Figure IV.28 est que les plots ont immobilisé beaucoup plus de BSA que l'or nu n'en a adsorbé. Ceci est précisé par les valeurs rapportées dans le Tableau IV.8.

Nous avons utilisé la composante bleue de la cinétique d'immobilisation de la BSA fluorescente sur les plots de 16-MHDA pour présenter les différentes étapes des cinétiques CONE. Nous ne détaillerons donc pas cette courbe à nouveau (se reporter au paragraphe 3, page 193 de ce chapitre).

Comme la composante bleue, la composante verte montre une forte chute de l'intensité des plots à la suite de l'injection de la BSA fluorescente. Cette chute est en partie masquée par le Bulk effect, toujours important pour cette longueur d'onde. La composante rouge montre quant à elle une évolution inverse de son intensité (l'intensité augmente). L'évolution du contraste rouge est elle aussi inversée par rapport à celles des contrastes vert et bleu. Le

|contraste| rouge diminue alors que les autres s'accroissent. D'après les éléments théoriques apportés au Chapitre III, cette inversion du contraste avec la longueur d'onde n'est possible que lorsque les molécules capturées sont optiquement absorbantes. Cette absorption est elle-même très dépendante de la longueur d'onde.

Sur la courbe de contraste vert, on constate une légère chute du |contraste| entre avant et après l'injection de la solution d'EDC/NHS. Cette chute est contraire à l'évolution ultérieure du |contraste| qui croît avec l'ajout de BSA. Une explication possible serait une légère non linéarité pour de faibles variations d'épaisseur sur la composante verte. Cette hypothèse est confortée par l'inversion de l'évolution du contraste entre les composantes bleue et rouge. Nous pourrions être dans une situation proche de celle décrite au Chapitre III sur la Figure III.24-b (p.97).

Il est d'ailleurs étonnant que la faible variation d'épaisseur occasionnée par l'injection d'EDC/NHS soit autant visible en CONE. Cette remarque peut également être étendue à la SPR. Cela peut tenir à une polarisation très particulière de la molécule NHS et à son fort indice de réfraction (n = 1,599, [17]). Les deux techniques seraient donc fortement sensibles à l'orientation du groupement NHS du NHS-ester.

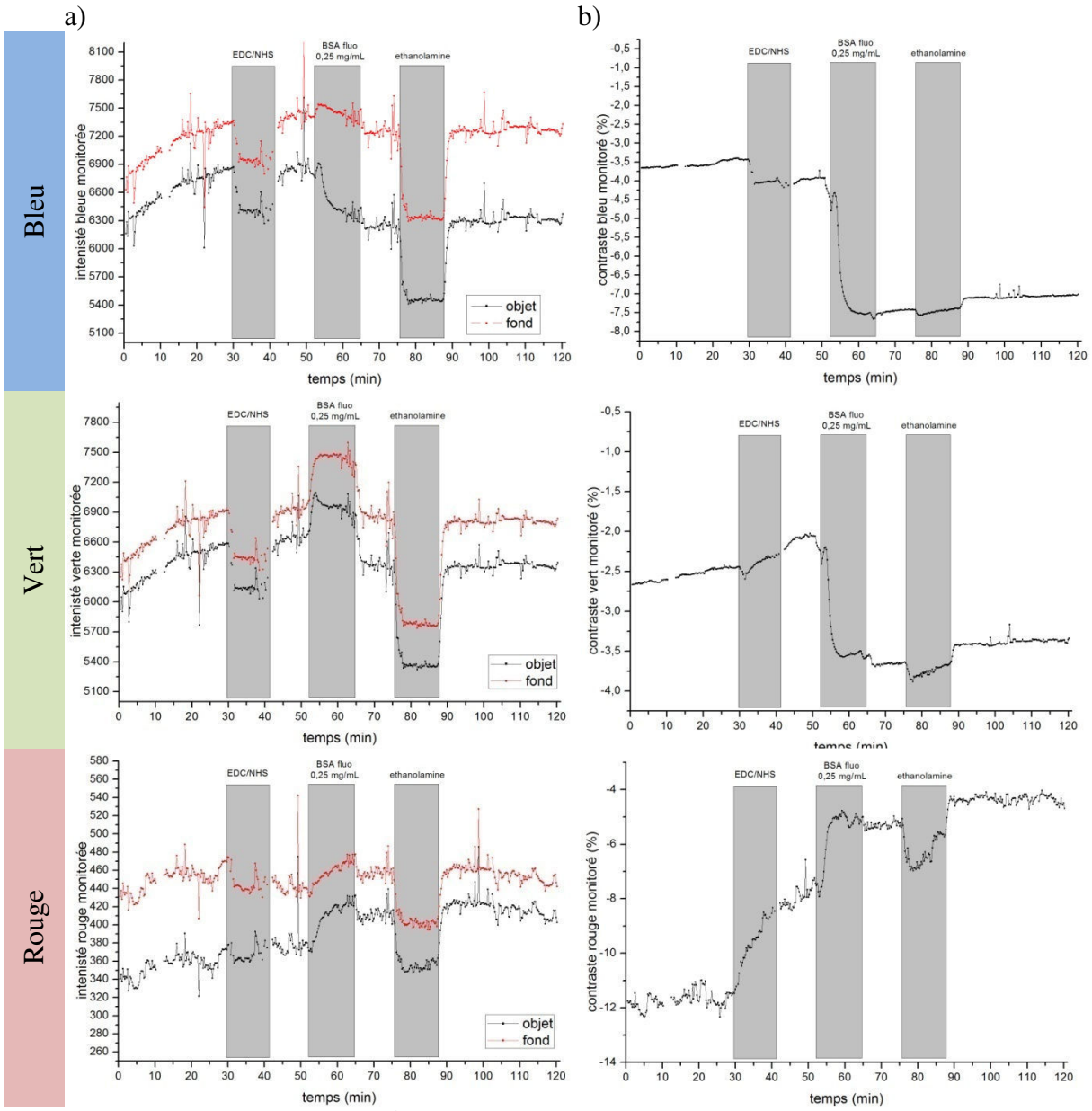


Figure IV.28 : variations a) de l'intensité du fond (en rouge) et des plots (en noir) des micrographies CONE pour l'immobilisation de la BSA fluorescente à 0,25 mg/mL et b) le contraste associé pour les composantes RVB.

Immobilisation de la BSA fluorescente	dI	dI/I (%)	dC (%)	dC/C (%)
Fond (bleu)	- 167,0 NB	- 2,2		
Plots (bleu)	- 553,1 NB	- 8,1	- 3,2	+ 82,1
Fond (vert)	- 137,0 NV	- 2,0		
Plots (vert)	- 283,9 NV	- 4,3	- 1,3	+ 61,9
Fond (rouge)	+ 21,1 NR	+ 4,8		
Plots (rouge)	+45,6 NR	+ 12,1	+ 3,6	- 45,6

Tableau IV.8 : niveau d'intensité et de contraste correspondant aux courbes de la Figure IV.28.

Les images issues de cette cinétique ont déjà été interprétées qualitativement au paragraphe 2.3 de ce chapitre (p. 187).

- Résultat qualitatif en accord avec les mesures SPR.
- Forte immobilisation de la BSA fluorescente sur les plots de 16-MHDA.
- Comportement du contraste rouge inverse par rapport aux contrastes vert et bleu.

3.2.2.2 Comparaison des signaux CONE et SPR

Comme nous l'avons fait pour les Bulk effects, nous allons directement comparer les intensités des trois composantes CONE et le signal SPR brut (Figure IV.29).

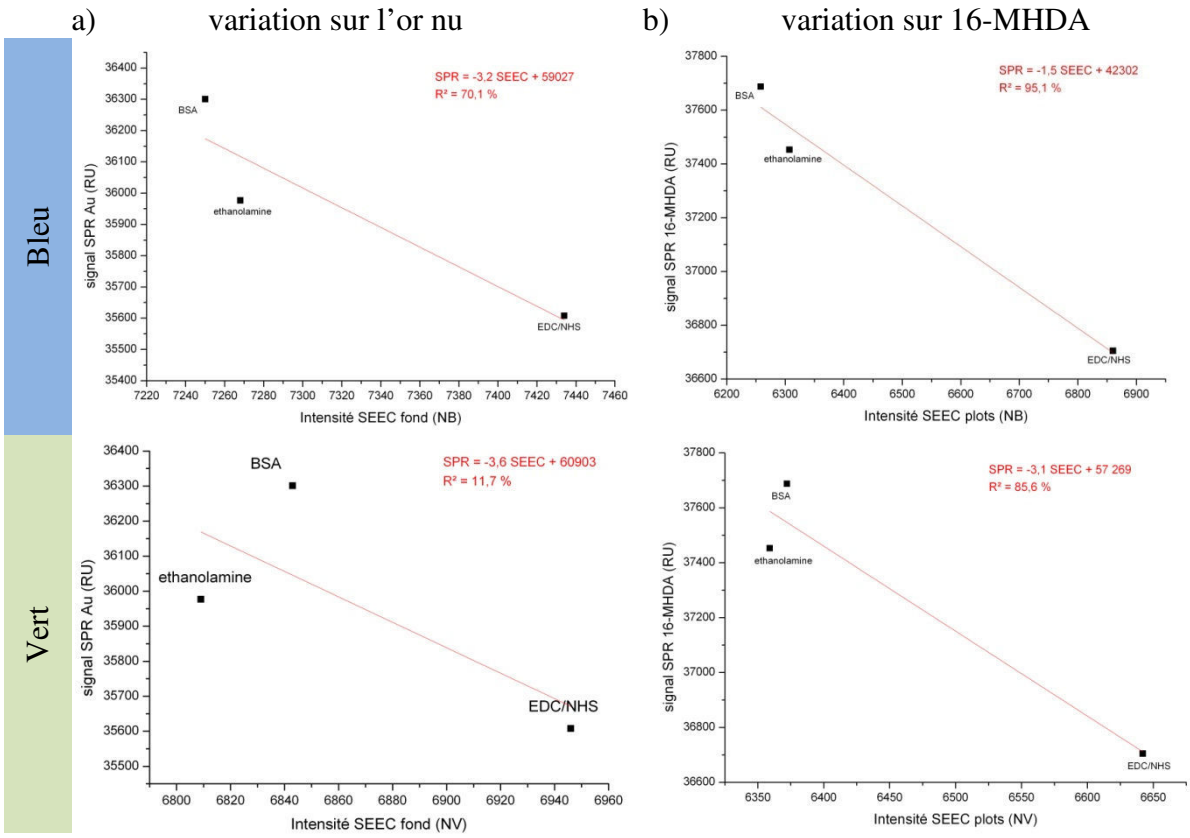


Figure IV.29 : variations du signal SPR en fonction des intensités CONE a) sur l'or nu et b) sur 16-MHDA.

On remarque une excellente correspondance entre la composante CONE bleue et le signal SPR pour l'immobilisation de la BSA. La corrélation entre la composante CONE verte et le signal SPR est également très bonne avec cependant une pente deux fois plus grande (-1,5 RU/NB contre -3,1 RU/NV). La composante bleue présente la meilleure sensibilité.

La correspondance pour l'adsorption sur l'or nu est plus mauvaise. Elle devient même extrêmement mauvaise pour la composante verte. Cependant la pente reste de l'ordre de -3 RU/NV.

- La composante bleue des micrographies CONE montre une très bonne correspondance avec les signaux bruts SPR.

3.3 Adsorption et immobilisation de la BSA non fluorescente

Ces expériences d'adsorption et d'immobilisation ont également été menées avec de la BSA non fluorescente.

3.3.1 Solution de BSA faiblement concentrée (0,25 mg/mL)

3.3.1.1 Adsorption de la BSA non fluorescente (0,25 mg/mL)

L'expérience d'adsorption de la BSA fluorescente suivie par microscopie CONE a montré une forte adsorption sur le fond de l'image (or nu) et une adsorption plus faible, mais non négligeable de la BSA sur les plots. On s'attend à voir la même chose avec la BSA non fluorescente. Les cinétiques de la Figure IV.30 et les données associées (Tableau IV.9)

montrent effectivement une quantité de BSA non fluorescente adsorbée plus importante sur le fond que sur les plots. La courbe de contraste vert est très bruitée et ne montre qu'un saut au début de l'injection de la BSA exactement comme celui obtenu pour l'adsorption de la BSA fluorescente. Le rapport signal sur bruit pour la courbe du contraste rouge est là encore trop faible pour que la courbe puisse être exploitée.

Sur la courbe du contraste bleu, on retrouve les trois phases caractéristiques déjà identifiées lors de l'adsorption de la BSA fluorescente :

i) La BSA s'adsorbe d'abord plus sur l'or nu entrainant une chute du |contraste| (temps d'injection de 0 à 3,75 min).

ii) La BSA s'adsorbe ensuite majoritairement sur les plots entrainant une augmentation du |contraste| (temps d'injection de 3,75 à 8,75 min).

iii) La vitesse d'adsorption est la même sur les plots et sur le fond. Cette dernière phase est remarquable par le plateau à -3,2 % sur la courbe de contraste.

Les durée de ces trois phases sont proches de celles observées pour l'adsorption de la BSA fluorescente (0–3 min, 3–11 min et à partir de 11 min d'injection, Figure IV.25, p.204). On observe néanmoins un écart significatif au niveau de la seconde phase (8,75 *vs* 11 min d'injection) que nous ne nous expliquons pas.

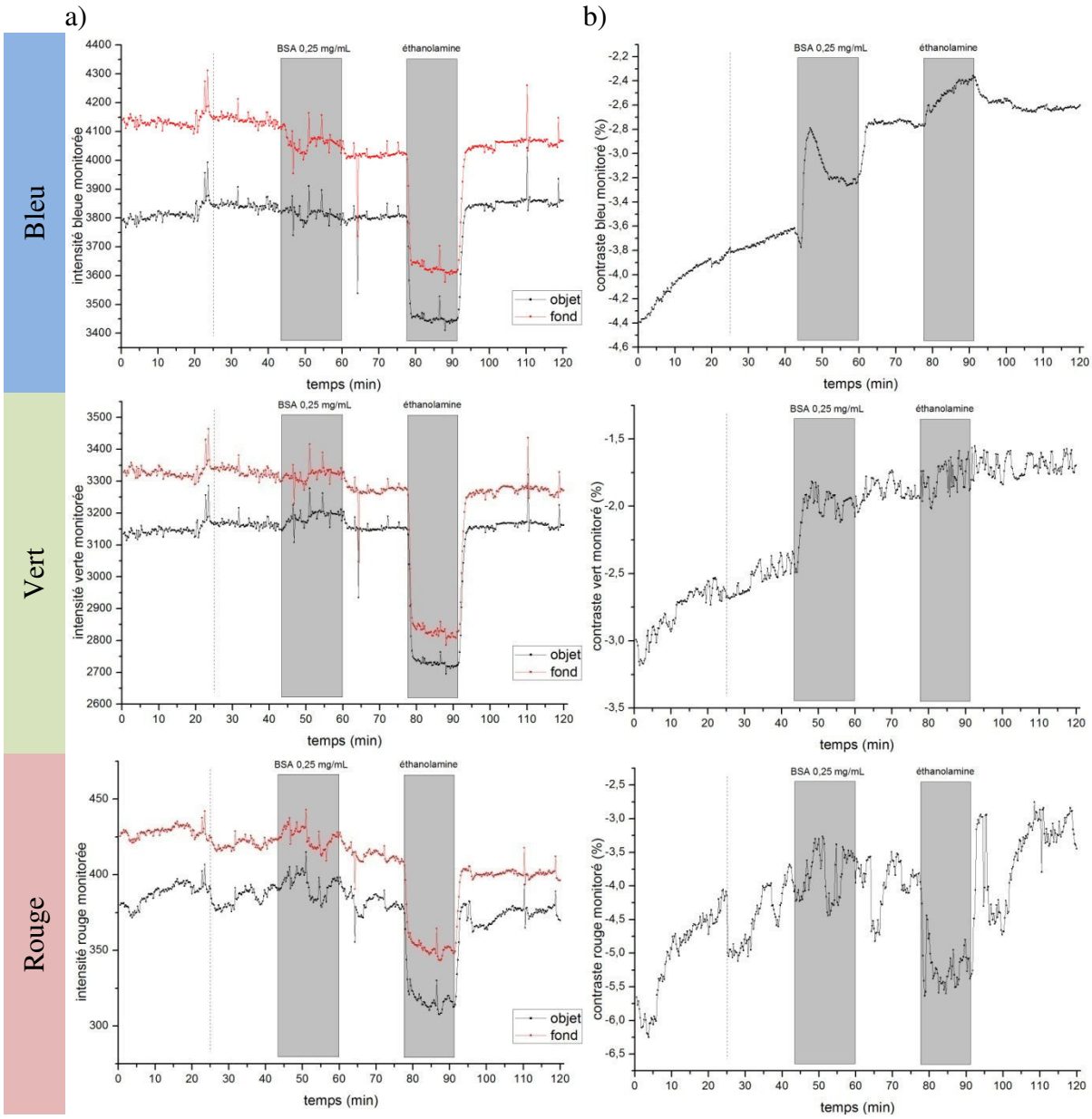


Figure IV.30 : variations a) de l'intensité du fond (en rouge) et des plots (en noir) des micrographies CONE pour l'immobilisation de la BSA non fluorescente à 0,25 mg/mL et b) le contraste associé pour les composantes RVB.

Adsorption de la BSA non fluorescente	dI	dI/I (%)	dC (%)	dC/C (%)
Fond	- 85,6 NB	- 2,1		
Plots	- 6,9 NB	- 0,2	+ 2,6	- 27,8
Fond	- 49,6 NV	- 1,5		
Plots	- 6,9 NV	- 0,2	+ 0,7	- 29,2
Fond	- 20,2 NR	- 4,8		
Plots	- 7,5 NR	-2,0	-	-

Tableau IV.9 : niveau d'intensité et de contraste correspondant aux courbes de la Figure IV.30.

Les courbes de contraste de la BSA fluorescente et non fluorescente sont très proches (Figure IV.31). Les sauts du contraste vert à la suite de l'injection de la BSA sont presque identiques : +0,9 % pour la BSA fluorescente et +0,7 % pour la BSA non fluorescente. Les contrastes bleus montrent des différences plus grandes. Le saut juste après injection de la BSA est 1,6 fois plus important pour la BSA fluorescente (+1,6 % pour la BSA fluorescente, +1,0 % pour la BSA non fluorescente).

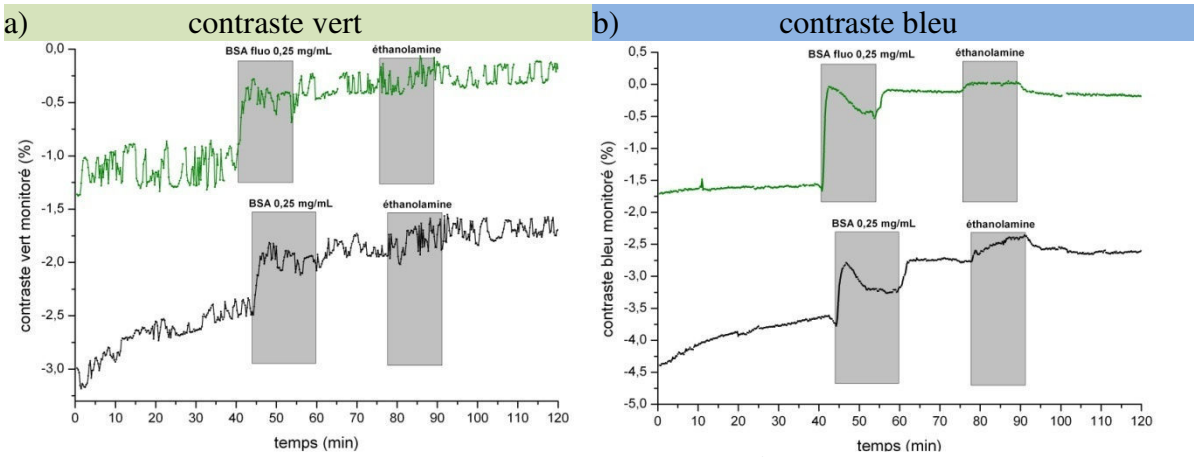


Figure IV.31 : comparaison des contrastes a) vert et b) bleu des cinétiques d'adsorption des solutions de BSA fluorescente et non fluorescente visualisé *in situ* par microscopie CONE.

- De grandes similitudes sont observées entre les courbes de contraste CONE pour l'adsorption de la BSA fluorescente et non fluorescente.
- L'adsorption de la BSA non fluorescente est plus importante sur l'or nu que sur les plots.
- Les quantités mesurées de BSA adsorbée sont plus faibles avec la BSA non fluorescente qu'avec la BSA fluorescente.

3.3.1.2 Immobilisation de la BSA non fluorescente (0,25 mg/mL)

La BSA fluorescente (0,25 mg/mL) s'immobilise fortement sur les plots. Les expériences d'adsorption de la BSA ayant donné des résultats similaires pour la BSA fluorescente et non fluorescente, on s'attend aussi à une forte immobilisation de la BSA non fluorescente (0,25 mg/mL).

Les cinétiques de la Figure IV.32 et les valeurs associées (Tableau IV.10) ne montrent pas de fixation plus importante de la BSA non fluorescente sur les plots que sur le fond. Au contraire, on observe même une chute des |contrastes| sur les trois composantes. Ceci suggère une fixation de la BSA non fluorescente plus importante sur l'or nu que sur les plots dans l'expérience d'immobilisation. Les variations d'intensités mesurées sur le fond et les plots dans les trois composantes (Tableau IV.10) le confirment. Pour les composantes bleue et verte, l'intensité des plots est même légèrement supérieure après qu'avant injection.

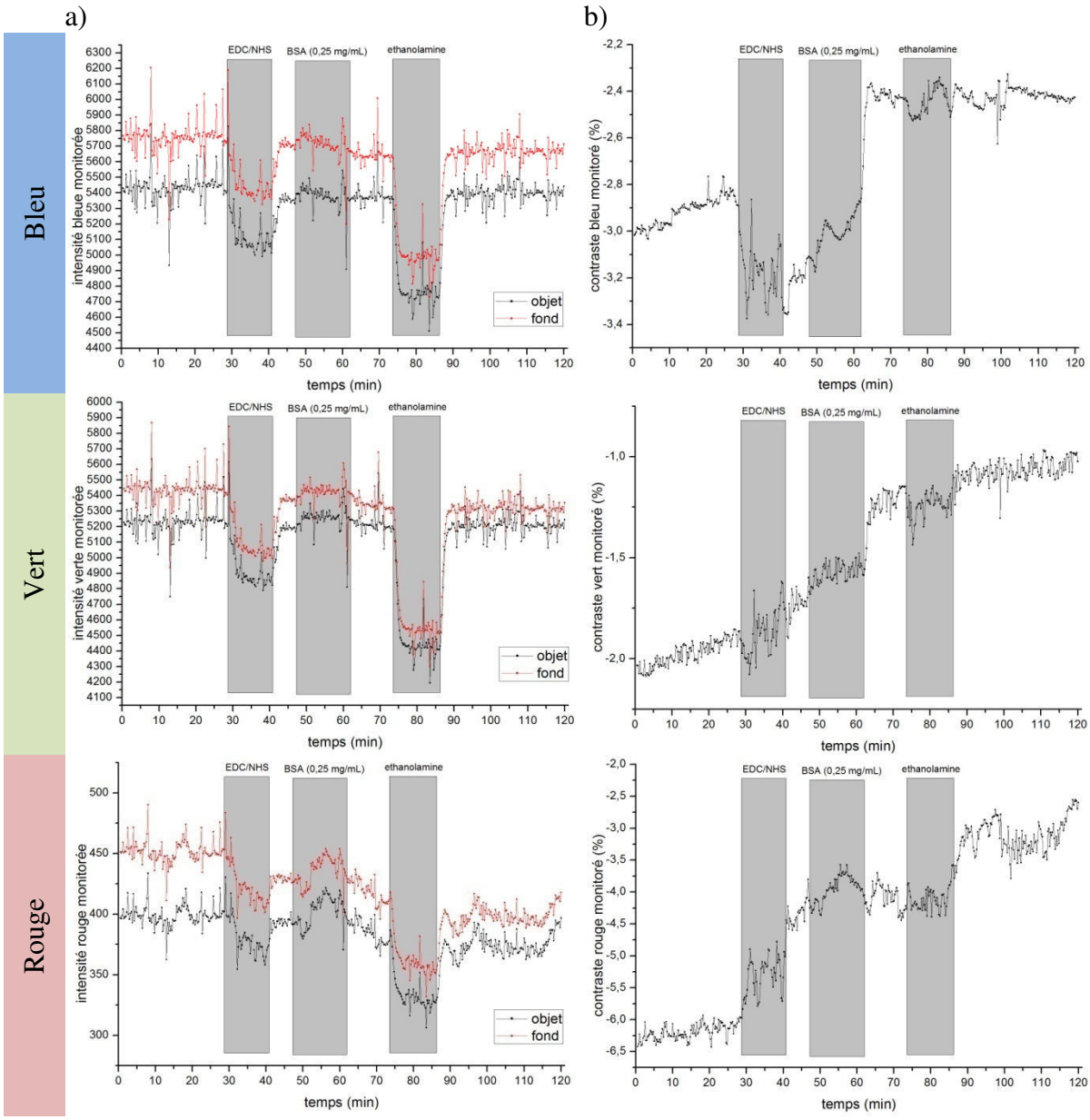


Figure IV.32 : variations a) de l'intensité du fond (en rouge) et des plots (en noir) des micrographies CONE pour l'immobilisation de la BSA à 0,25 mg/mL et b) le contraste associé pour les composantes RVB.

Immobilisation de la BSA non fluorescente	dI	dI/I (%)	dC (%)	dC/C (%)
Fond	- 38,1 NB	- 0,7		
Plots	+ 38,2 NB	+ 0,7	+ 0,8	- 25,0
Fond	- 50,9 NV	- 1,0		
Plots	+ 12,7 NV	+ 0,2	+ 0,6	- 35,3
Fond	- 33,5 NR	- 7,8		
Plots	- 20,4 NR	- 5,2	+ 1,2	- 27,9

Tableau IV.10 : niveau d'intensité et de contraste correspondant aux courbes de la Figure IV.32.

L'immobilisation de la BSA non fluorescente sur les plots n'est donc pas visualisée en microscopie CONE. Pourtant, les expériences SPR et de fluorescence ont prouvé l'efficacité de ces surfaces pour immobiliser ces molécules de BSA. La cause n'est donc pas physicochimique. La seule possibilité est qu'elle soit d'origine optique. Les plots agiraient comme des écrans pour la visualisation de la couche de BSA.

Le signal de la BSA adsorbée sur l'or est acceptable même si on mesure une quantité légèrement plus importante pour la BSA fluorescente.

Par ailleurs, nous avons montré au paragraphe 2.3, page 187 que le signal de fluorescence ne contribue pas au signal CONE. Les différences entre les expériences menées avec la BSA fluorescente et non fluorescente peuvent provenir de la présence d'une partie imaginaire dans l'indice de réfraction de la BSA fluorescente. Ceci confirmerait l'importance de l'absorbance optique des molécules dans la détection CONE (voir la partie théorie CONE au Chapitre III).

Pour résumer, la BSA non fluorescente se voit en SPR sur l'or ou sur les plots, se voit en CONE sur la surface d'or et ne se voit pas en CONE sur les plots. Les données de la littérature concernant l'indice optique de la BSA ne sont pas très cohérentes, mais deux études optiques menées par ellipsométrie ont conduit à estimer son indice à une valeur très proche de 1,33 [18-20]. Nous avons également mesuré une variation de signal très faible en CONE et en SPR due au Bulk effect (paragraphe 3.1.3 de ce chapitre, p. 198), ce qui tend à confirmer que l'indice de la BSA en solution est très proche de celui du tampon de course. Dans ces conditions, il serait logique que la présence de la BSA ne soit pas révélée par une méthode réfractive. Ainsi, le signal SPR pourrait être généré par un mécanisme un peu plus complexe qu'une simple variation d'indice. Le champ électrique associé au plasmon résonant a une orientation presque normale à la surface et on peut suspecter que le signal SPR soit très influencé par l'orientation des molécules en surface.

- Pas d'immobilisation détectable de la BSA non fluorescente sur les plots de 16-MHDA.
- L'adsorption de la BSA sur l'or reste conforme avec les autres mesures réalisées.
- Importance de la partie imaginaire dans l'indice de réfraction des molécules détectées.

3.3.2 Modélisation des courbes de contraste

Si la compétition entre la fixation de la BSA sur l'or et sur les plots par adsorption ou immobilisation a été observée à plusieurs reprises avec des temps caractéristiques proches, ce n'est pas fortuit. Nous avons donc essayé de modéliser ces courbes de contraste par la combinaison de plusieurs exponentielles de la manière suivante :

$$C(t) = \sum_{k=1}^{4} A_k \left(1 - \exp\left(\frac{-t}{\tau_k}\right)\right)$$ **Équation IV.13**

avec k = 1 pour le Bulk effect sur l'or nu, 2 pour le Bulk effect sur les plots, 3 pour la fixation de la BSA sur l'or nu et 4 pour la fixation de la BSA sur les plots.

Lors de l'étude du Bulk effect sur les surfaces à plots dans le Chapitre III, nous avons remarqué que les sauts d'intensité étaient très proches sur le fond et les plots (à la dérive près). Nous avons donc choisi d'utiliser les mêmes paramètres A et τ pour ces deux exponentielles. Nous avons ensuite procédé par tâtonnement afin de trouver des courbes proches de celles mesurées. Les paramètres ainsi obtenus sont résumés dans le tableau suivant :

	Bulk effect sur l'or nu		Bulk effect sur les plots		Fixation BSA sur l'or nu		Fixation de la BSA sur les plots	
	A_1	τ_1	A_2	τ_2	A_3	τ_3	A_4	τ_4
Adsorption BSA fluo	-10	1	-10	1	35	6	-20	15
Adsorption BSA	-10	1	-10	1	35	6	-15	30
Immobilisation BSA fluo	-8	1	-8	1	53	3	-45	4

Tableau IV.11 : paramètres utilisés pour modéliser les courbes de contrastes bleus pour la cinétique d'adsorption de la BSA fluorescente et non fluorescente et pour la cinétique d'immobilisation de la BSA fluorescente.

La première chose que l'on constate sur toutes les courbes de contraste est un pic vers négatif au début de l'injection de la BSA. Ce pic est associé aux Bulk effects. Nous avons donc décidé d'y associer une amplitude A_k négative et une constante de temps τ_k faible. Ensuite, pour traduire la chute de |contraste| associée à la fixation de la BSA sur l'or nu, nous avons utilisé une amplitude positive avec un temps légèrement supérieur à celui des Bulk effects. Enfin, pour rendre compte de l'accroissement du |contraste| associé à la fixation de la BSA sur les plots, nous avons utilisé une amplitude négative et un temps caractéristique supérieur aux précédents.

La seule différence entre les cinétiques d'adsorption de la BSA fluorescente et celle de la BSA non fluorescente est l'apparition plus rapide d'un plateau dans le second cas. Nous avons donc augmenté le temps caractéristique associé ($\tau_{4,\ BSA} > \tau_{4,\ BSA\ fluo}$). Il semblerait donc que l'on atteigne la saturation sur les plots plus rapidement avec la BSA non fluorescente. Pour simuler complètement cette cinétique, nous avons également dû diminuer l'amplitude (A_4) de la fixation de la BSA non fluorescente sur les plots. Il y a donc moins de BSA visible sur les plots (écrantage de la fixation par les plots).

Pour la cinétique d'immobilisation de la BSA fluorescente, nous avons été obligés d'augmenter fortement les amplitudes de fixation de la BSA et de réduire fortement les temps

caractéristiques. La fixation de la BSA après injection d'EDC/NHS serait par conséquent plus rapide et plus importante sur les plots, ce qui est normal, mais aussi sur le fond. Sur le fond, on constate une fixation deux fois plus rapide et moitié plus de BSA et sur les plots une fixation 5 à 10 fois plus rapide et trois fois plus de BSA fixée.

La Figure IV.33 ci-dessous montre les courbes expérimentales et les courbes simulées avec les paramètres du Tableau IV.11. Elles présentent une très bonne adéquation entre elles.

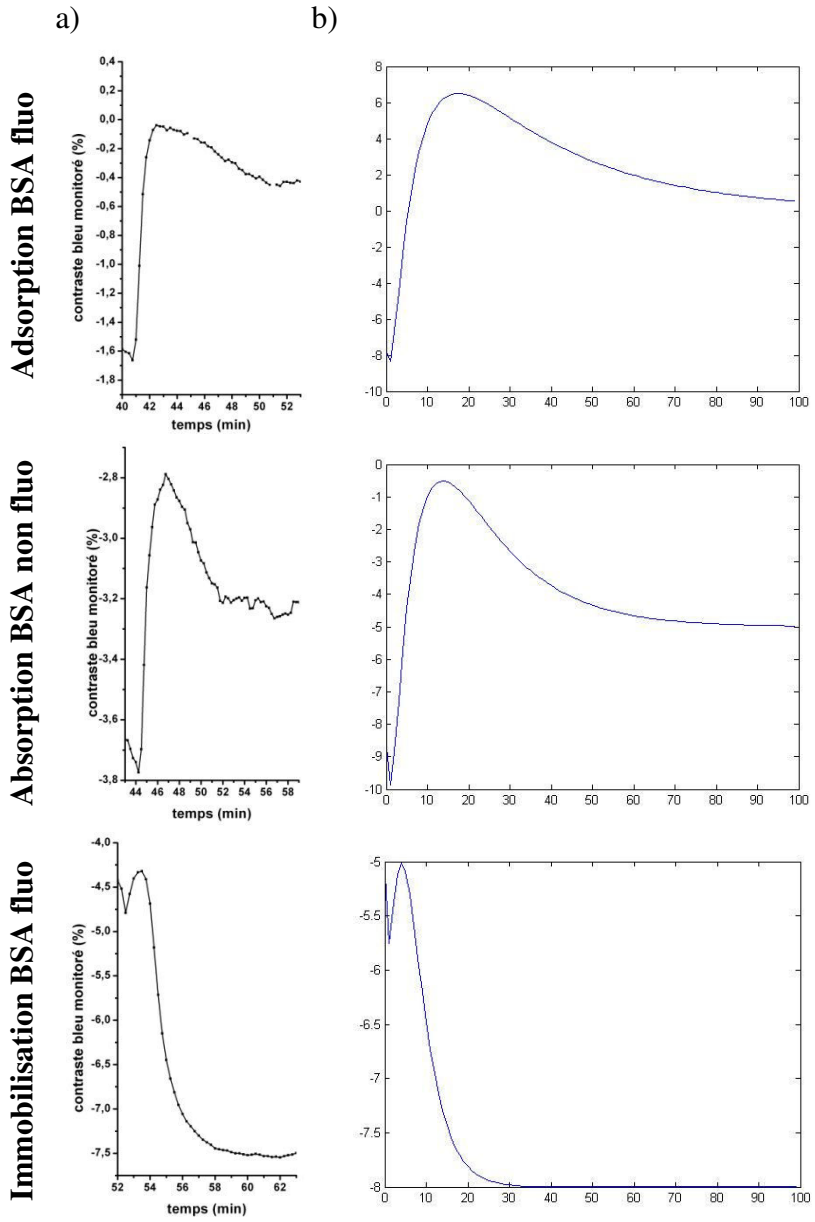


Figure IV.33 : a) courbes expérimentales du contraste bleu b) simulation de ces courbes de contraste par l'effet de quatre exponentielles avec les paramètres du Tableau IV.11.

La forte corrélation entre les courbes simulées et mesurées confirme l'hypothèse selon laquelle le Bulk effect sur le fond et les plots est identique (amplitudes et temps caractéristiques). Il est donc possible de simuler les courbes de contraste avec seulement trois exponentielles.

- Il est possible de simuler les courbes de contraste par la superposition de trois exponentielles.

3.3.3 Adsorption de la BSA non fluorescente observée en CONE à différentes concentrations

Dans ce paragraphe, nous étudions l'effet de la concentration de la BSA sur le signal CONE en effectuant des injections successives de solutions de concentration croissante. Cette expérience n'est possible qu'en adsorption, car la durée de vie des états activés par EDC/NHS est trop courte pour effectuer des expériences similaires en immobilisation.

Nous avions constaté lors d'une expérience précédente (non présentée) qu'à forte concentration, la variation de pH entre la solution de BSA et le tampon de course (eau Versol®) engendrait des désorptions et ré-adsorptions d'amas de BSA au cours du rinçage. Pour éviter ce phénomène, nous avons travaillé lors de cette expérience avec un tampon de course acétate (10 mmol/L, pH 4). Ce tampon est le même que celui dans lequel est dissout la BSA.

Dans cette expérience, nous avons essayé d'atteindre la saturation des plots et du fond en effectuant des injections longues de BSA (~ 30 min) à des concentrations croissantes. Comme pour les mesures précédentes, la composante bleue montre le meilleur contraste et la cinétique la moins bruitée (Figure IV.34, Tableau IV.12).

Pour l'injection de la BSA à 2,5 mg/mL on constate la présence de plusieurs temps caractéristiques dans les courbes de contraste. Dans un premier temps, le |contraste| bleu par exemple diminue, suggérant que le fond fixe plus de BSA que les plots. Dans une seconde phase, le |contraste| augmente montrant une fixation prédominante sur les plots.

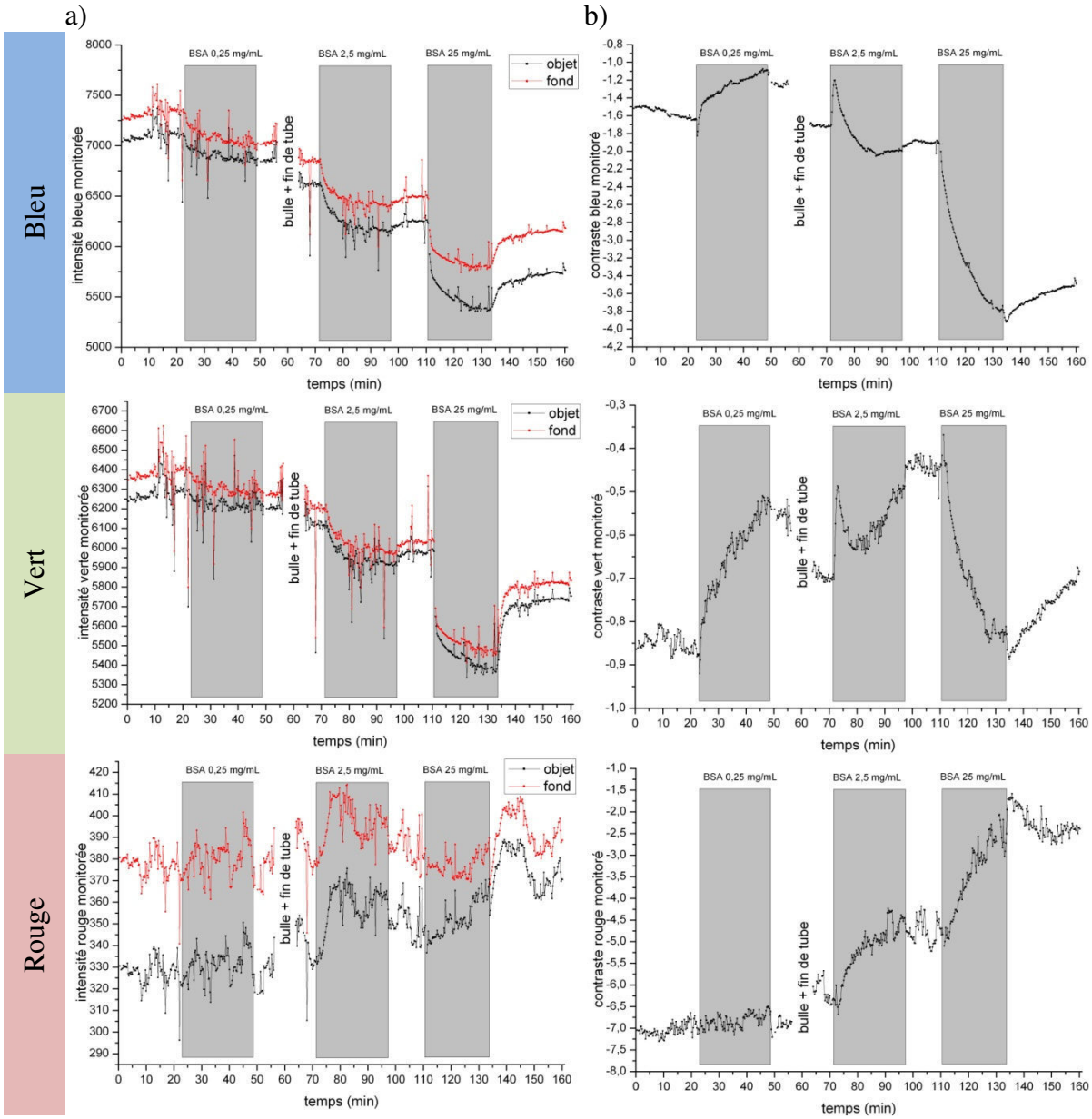


Figure IV.34 : a) évolution de l'intensité des plots (carrés noirs) et du fond (ronds rouges) en fonction du temps lors de l'adsorption successive de la BSA (0,25, 2,5 puis 25 mg/mL) et b) le contraste entre le fond et les plots associé. Une grosse bulle est apparue au cours de la cinétique (à 55 min), cet incident ne change pas le résultat de l'expérience.

Adsorption de la BSA	dI			dI/I (%)			dC (%)			dC/C (%)		
Concentration (mg/mL)	0,25	2,5	25	0,25	2,5	25	0,25	2,5	25	0,25	2,5	25
Fond (bleu, NB)	-323,7	-353,0	-339,6	-4,4	-5,2	-5,2						
Plots (bleu, NB)	-243,1	-362,9	-526,2	-3,4	-5,5	-8,4	+0,4	-0,2	-1,6	-25,0	+11,8	+84,2
Fond (vert, NV)	-131,1	-170,0	-216,3	-2,0	-2,7	-3,6						
Plots (vert, NV)	-88,2	-141,6	-246,6	-1,4	-2,3	-4,1	+0,3	+0,3	-0,3	-33,3	-42,9	+75,0
Fond (rouge, NR)	-	-	-	-	-	-						
Plots (rouge, NR)	-	-	-	-	-	-	-0,1	+1,6	+2,3	+1,4	-25,4	-48,9

Tableau IV.12 : niveau d'intensité et de contraste correspondant aux courbes de la Figure IV.34.

En ce qui concerne les courbes de contraste, la composante verte montre une chute de |contraste| à la première injection, une inversion du |contraste| (augmentation puis chute) pendant la seconde et une augmentation du |contraste| pendant la troisième.

La composante bleue présente une augmentation du |contraste| puis un plateau lors de la seconde injection. On ne distingue pas d'inversion sur cette composante. Les deux autres injections produisent des effets comparables à ceux de la composante verte.

La composante rouge est différentes des deux autres, car le |contraste| ne fait que diminuer.

L'inversion de contraste avec la concentration observée sur les composantes verte et bleue peut provenir d'une adsorption plus rapide sur le fond que sur les plots.

- Les effets de couleurs sont donc importants et complexes. Ils devront être maîtrisés pour une exploitation quantitative de la technique.

Les trois courbes d'intensité ne montrent pas exactement la même chose. L'intensité rouge est trop bruitée pour être exploitée quantitativement. Pour la composante bleue, les variations relatives d'intensité (dI/I) du fond sont relativement proches pour les trois

injections alors que celles des plots diminuent lorsque la concentration augmente. La variation d'intensité verte des plots diffère peu de celle du fond. La pente est cependant légèrement supérieure. Contrairement à la cinétique bleue montrant une adsorption de la BSA plus importante sur les plots dès la concentration de 2,5 mg/mL, la composante verte ne présente ce comportement que pour l'injection à 25 mg/mL.

La Figure IV.35 montre que cette évolution est linéaire avec le logarithme de la concentration. La composante verte montre une chute d'intensité du fond plus marquée que la composante bleue. Elle suit aussi une évolution linéaire avec le logarithme de la concentration, mais avec une pente beaucoup plus faible que pour les plots de la composante bleue.

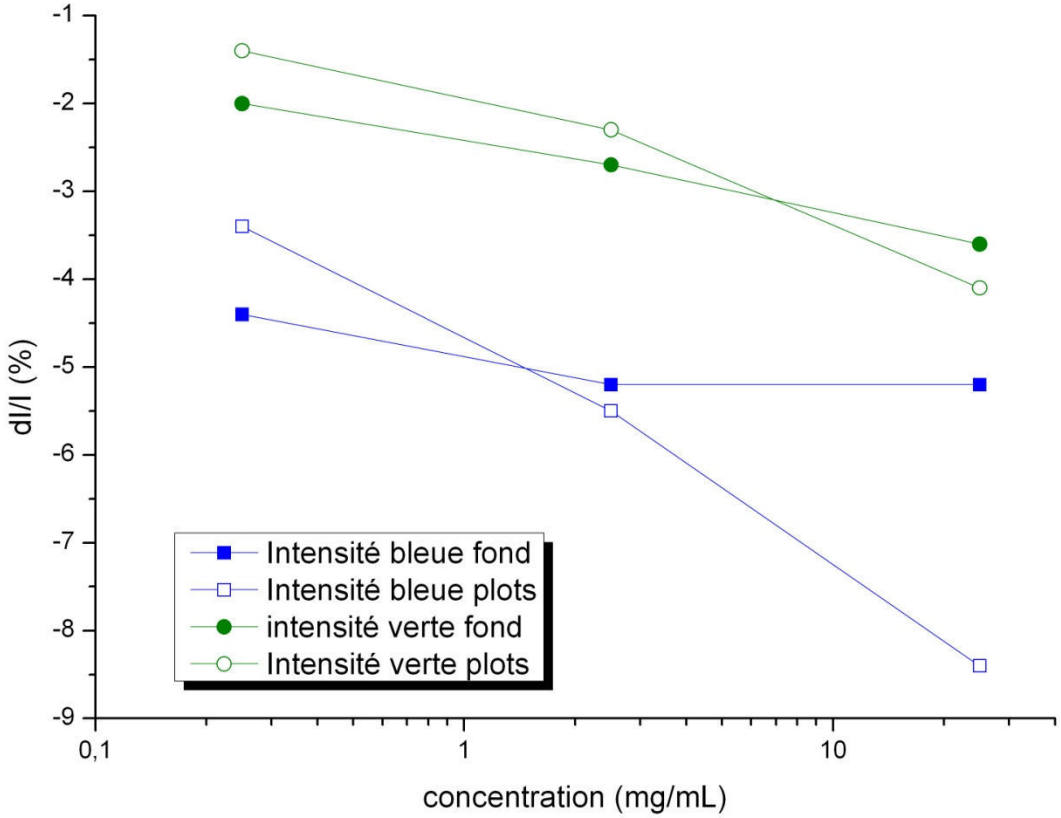


Figure IV.35 : quantité de BSA fixée sur le fond et sur les plots en fonction de la concentration de la BSA injectée pour les composantes vertes et bleues.

- Des observations contradictoires entre les trois composantes.
- Fixation non négligeable de la BSA non fluorescente sur les plots à partir d'une concentration de 2,5 mg/mL.
- Evolution logarithmique de la quantité de BSA fixée en fonction de la concentration de la solution injectée.

3.3.4 Immobilisation de la BSA 2,5 mg/mL

Forts de cette possibilité de voir l'adsorption de la BSA non fluorescente à 2,5 mg/mL sur les plots, nous avons mesuré l'immobilisation de la BSA non fluorescente à cette concentration.

Nous mesurons effectivement une immobilisation plus importante de la BSA sur les plots que sur le fond pour la composante bleue (Figure IV.36, Tableau IV.13). Pour les deux autres composantes, ce n'est pas le cas.

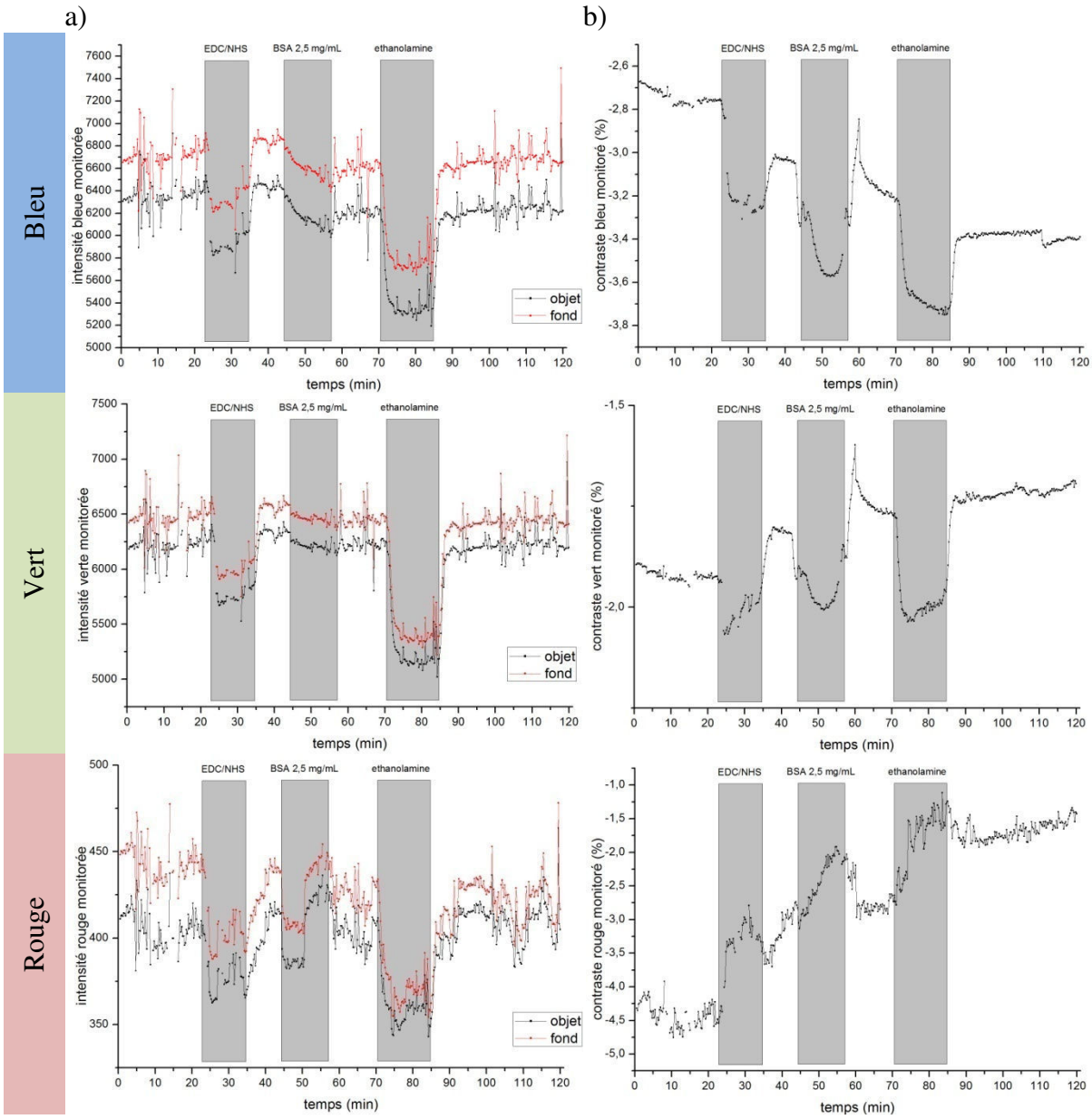


Figure IV.36 : variations a) de l'intensité du fond (en rouge) et des plots (en noir) des micrographies CONE pour l'immobilisation de la BSA à 2,5 mg/mL et b) du contraste associé pour les composantes RVB.

Immobilisation de la BSA non fluorescente	dI	dI/I (%)	dC (%)	dC/C (%)
Fond (bleu)	- 193,8 NB	- 2,8		
Plots (bleu)	- 211,4 NB	- 3,3	- 0,4	+ 13,3
Fond (vert)	- 161,5 NV	- 2,5		
Plots (vert)	- 125,6 NV	- 2,0	+ 0,1	- 5,6
Fond (rouge)	- 9,7 NR	- 2,2		
Plots (rouge)	- 0,0 NR	- 0,0	+ 1,1	- 37,9

Tableau IV.13 : niveau d'intensité et de contraste correspondant aux courbes de la Figure IV.36

Lors de l'immobilisation de la BSA fluorescente à 0,25 mg/mL (paragraphe 3.2.2, p.210), nous avions mesuré une variation de l'intensité bleue sur les plots de -8,1 %, correspondant à une augmentation du |contraste| de +82,1 %. Sur la même composante bleue, nous détectons maintenant une immobilisation de la BSA non fluorescente (2,5 mg/mL) beaucoup plus faible, seulement -3,3 % soit une augmentation du |contraste| de 13,3 %. Malgré la multiplication par 10 de la concentration utilisée, les variations de l'intensité et du contraste sur les plots restent beaucoup plus faibles que pour la BSA non fluorescente. Cela confirme le rôle de l'absorption optique dans la sensibilité de notre détection.

Les courbes de contraste sont également plus complexes à interpréter que celles obtenues pour l'immobilisation de la BSA fluorescente. Elles résultent de la composition de plusieurs exponentielles, mais trois ne semblent pas suffisantes pour modéliser la courbe de contraste bleu, en particulier l'inversion très brutale du |contraste| au milieu de l'injection.

- Pas ou peu de BSA détectée sur les plots malgré la multiplication par 10 de la concentration.
- Des observations contradictoires entre les trois composantes comme déjà constaté pour l'adsorption successive de BSA.
- Des courbes de contraste plus complexes que les précédentes.

3.3.5 Immobilisation de la BSA fluorescente suivie en microscopie CONE avec une lumière non polarisée

Nous avons vu dans le Chapitre III qu'il était possible d'observer des plots de différentes épaisseurs avec un bon contraste même sans polariseur/analyseur croisés.

L'avantage de ce mode est que l'intensité sur la caméra est beaucoup plus importante (d'un facteur environ 70).

3.3.5.1 Cinétique d'immobilisation en lumière non polarisée (CONE NP)

Pour évaluer les performances de ce mode non polarisé, nous avons réétudié l'immobilisation de la BSA fluorescente (0,25 mg/mL) dans ces conditions.

Les intensités rouges sont encore très bruitées malgré des niveaux élevés (Figure IV.37). Ceci est principalement dû au fait que la source utilisée est beaucoup plus instable dans le rouge que dans le bleu. Le contraste rouge est néanmoins très bon.

Comme nous l'avons déjà signalé dans le Chapitre III, il y a des inversions entre les Bulk effects des trois composantes qui sont bien visibles pour les injections d'EDC/NHS et d'éthanolamine. Les variations de contraste associées sont par contre identiques dans les trois composantes.

Contrairement au mode CONE P qui présente un meilleur contraste pour la composante bleue, l'observation en lumière non polarisée offre un meilleur contraste pour la composante verte (Figure IV.37, Tableau IV.14). Les variations de contraste de la composante verte sont d'ailleurs identiques :

- dC/C = 61,9 % en lumière polarisée
- dC/C = 60,0 % en lumière non polarisée.

Le rapport signal/bruit est par contre nettement meilleur en lumière non polarisée, d'un facteur presque 10, parce que les intensités mesurées diffèrent d'un facteur presque 100.

Il y a plus de différences entre les deux modes pour les composantes bleue et rouge. Pour le rouge, on remarque carrément une inversion de l'évolution du contraste entre les deux modes. En lumière polarisée, la variation du |contraste| était négative (dC/C = -45,6 %) et en lumière non polarisée elle est positive (dC/C = +16 %).

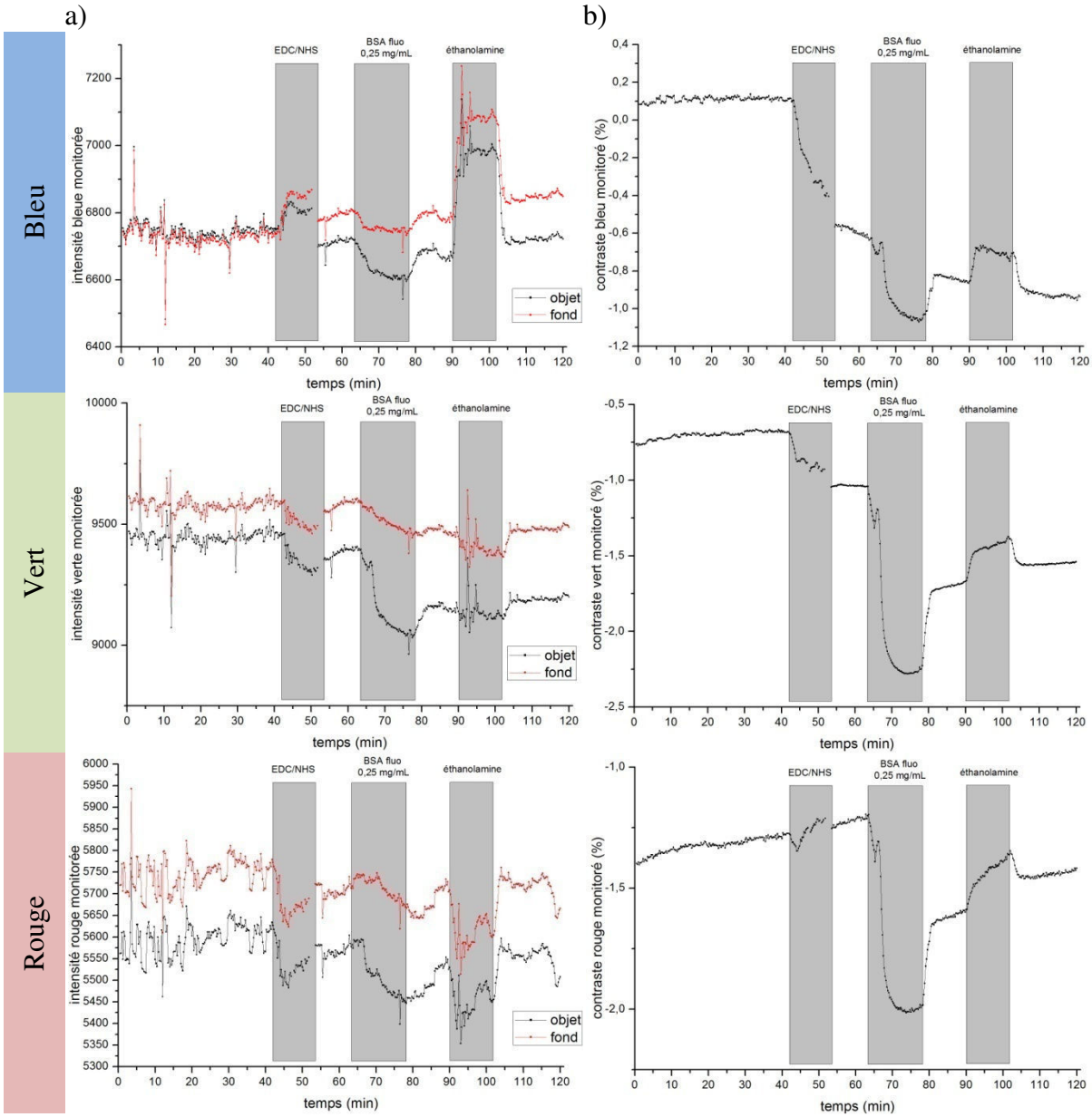


Figure IV.37 : variations a) de l'intensité du fond (en rouge) et des plots (en noir) des micrographies CONE sans polariseur/analyseur croisés pour l'immobilisation de la BSA fluorescente (0,25 mg/mL) et b) du contraste associé pour les composantes RVB.

Immobilisation de la BSA non fluorescente	dI	dI/I (%)	dC (%)	dC/C (%)
Fond	+52,8 NB	+0,8		
Plots	+5,9 NB	+0,1	-0,3	+50,0
Fond	-114,2 NV	-1,2		
Plots	-199,7 NV	-2,1	-0,6	+60,0
Fond	+22,9 NR	+0,4		
Plots	+1,0 NR	0,0	-0,2	+16,7

Tableau IV.14 : niveau d'intensité et de contraste correspondant aux courbes de la Figure IV.37.

- Avec des couches d'or de 7 nm, il est avantageux d'utiliser l'observation en lumière non polarisée pour l'étude d'immobilisation de protéines absorbantes.
- En lumière non polarisée, la composante verte est la plus intéressante.

3.3.5.2 Comparaison des signaux SPR et CONE NP

Comme nous l'avons fait pour les Bulk effects (paragraphe 3.1.3, p.198) et pour la cinétique d'immobilisation de la BSA fluorescente en lumière polarisée (paragraphe 3.2.2.2, p.213), nous allons comparer les signaux SPR et les intensités CONE NP brutes mesurés sur le plateau après injection de chaque solution (Figure IV.38).

La correspondance CONE NP/SPR est beaucoup moins bonne que la correspondance CONE P/SPR. Elle est cependant acceptable pour la composante verte avec une qualité de régression linéaire de 65,4 % pour l'or nu et 75,4 % pour la 16-MHDA. On est cependant très loin des 95,1 % obtenus pour la correspondance CONE P/SPR pour la composante bleue sur le 16-MHDA.

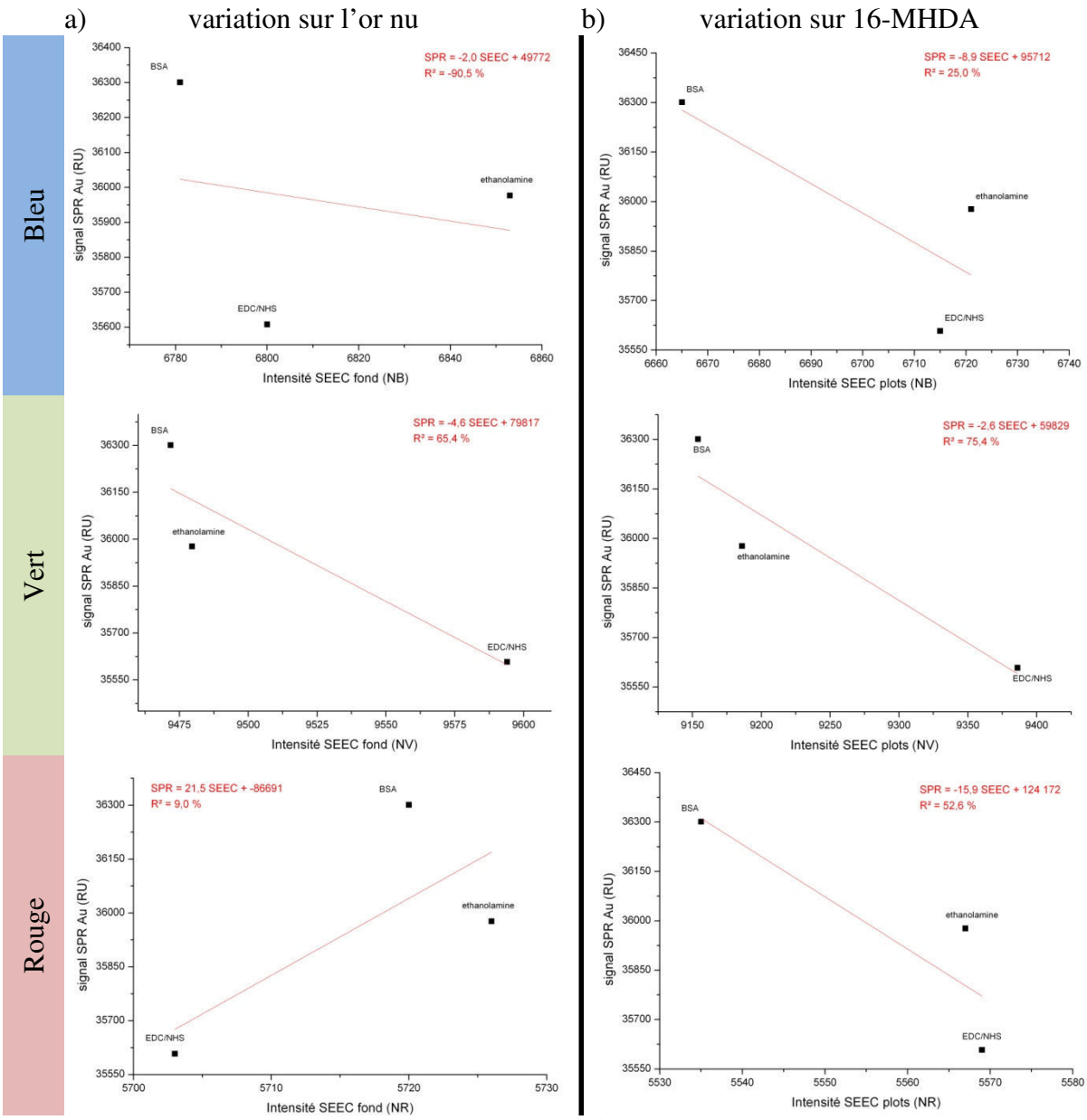


Figure IV.38 : variations du signal SPR en fonction des intensités CONE NP a) sur l'or nu et b) sur la 16-MHDA lors de l'immobilisation de la BSA.

La correspondance pour la composante bleue est extrêmement mauvaise tout comme pour la composante rouge sur le fond.

- La correspondance avec les expériences CONE et SPR est beaucoup moins bonne en lumière non polarisée qu'en lumière polarisé.
- La correspondance obtenue pour la composante verte NP reste relativement correcte.

Nous avons réalisé l'immobilisation de la BSA non fluorescente en mode non polarisé. La conclusion est la même qu'en lumière polarisée : nous ne détectons pas ou très peu la fixation des protéines non absorbantes sur les plots alors que la visualisation de l'adsorption sur l'or reste efficace. Le plot agit encore comme un « écran » pour la visualisation des molécules non absorbantes.

- Sans polariseur comme en lumière polarisée, les plots agissent comme un « écran » pour la détection de molécules non absorbantes.

3.4 Interaction entre IgG biotinylée et streptavidine immobilisée

Malgré les résultats peu concluants obtenus pour l'adsorption et l'immobilisation de la BSA non fluorescente, nous avons mené des expériences sur l'interaction de molécules d'IgG biotinylée avec des molécules de streptavidine immobilisées sur des surfaces à plots.

3.4.1 Rappel des résultats SPR (Chapitre II [12])

En SPR, nous avions mesuré l'immobilisation de streptavidine (200 µg/mL) sur des surfaces homogènes d'or nu et d'or recouvert d'une SAM de 16-MHDA. Nous avons ensuite mesuré sur ces surfaces l'interaction entre les molécules d'IgG biotinylées (1,2 µg/mL) et les molécules de streptavidine immobilisées. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau suivant :

Surfaces	Streptavidine immobilisée (RU)	IgG biotinylée fixée sur la streptavidine (RU)
or nu	157,0	162,2
SAM de 16-MHDA	486,5 ± 29,1	702,2 ± 19,0

Tableau IV.15 : interaction des molécules d'IgG biotinylée avec les molécules de streptavidine immobilisées en fonction de la nature de la surface mesuré en SPR.

3.4.2 Expérience CONE P d'interaction entre des molécules d'IgG biotinylée et des molécules de streptavidine immobilisées

Dans ce paragraphe, nous nous intéresserons uniquement à la composante bleue entre polariseur et analyseur croisés, car nous avons montré avec les expériences sur la BSA que ce sont les courbes présentant les variations d'intensité et de contraste les plus fortes.

Comme pour la BSA, le fond semble fixer plus de protéines que les plots, ce qui contredit les mesures SPR (Figure IV.39). Cela confirme l'écrantage apparent des protéines capturées par les plots de 16-MHDA dans la détection CONE P.

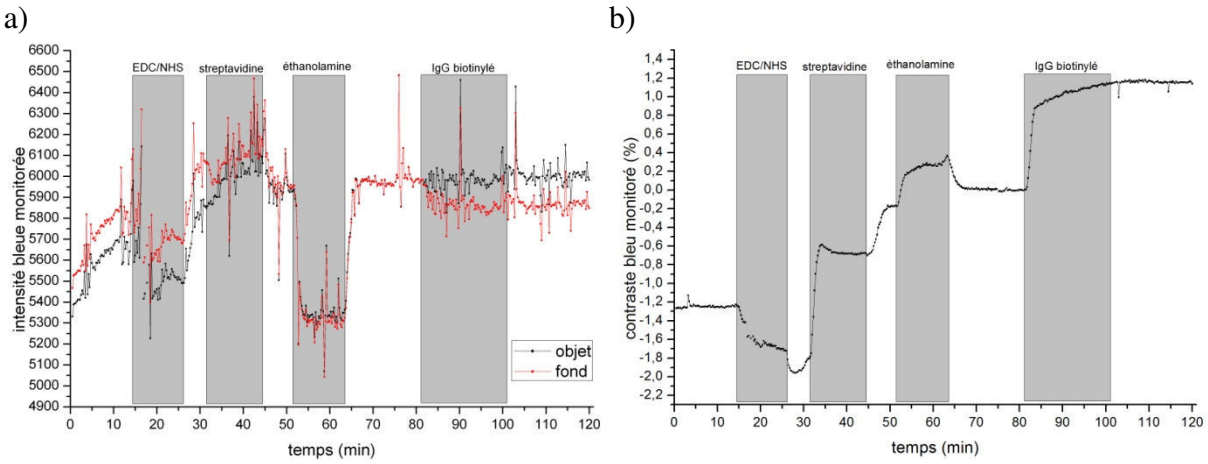


Figure IV.39 : évolution a) de l'intensité bleue des plots (carrés noirs) et du fond (ronds rouges) lors de l'immobilisation de la streptavidine suivie de l'interaction avec l'IgG biotinylée et b) du contraste associé entre le fond et les plots.

L'intensité du fond chute à tel point qu'au cours de la cinétique, on passe d'un contraste négatif à un contraste positif. La Figure IV.40 montre trois micrographies CONE P

prises au cours de la cinétique. Les profils associés montrent bien cette évolution et la valeur presque nulle du contraste juste après l'injection de la streptavidine.

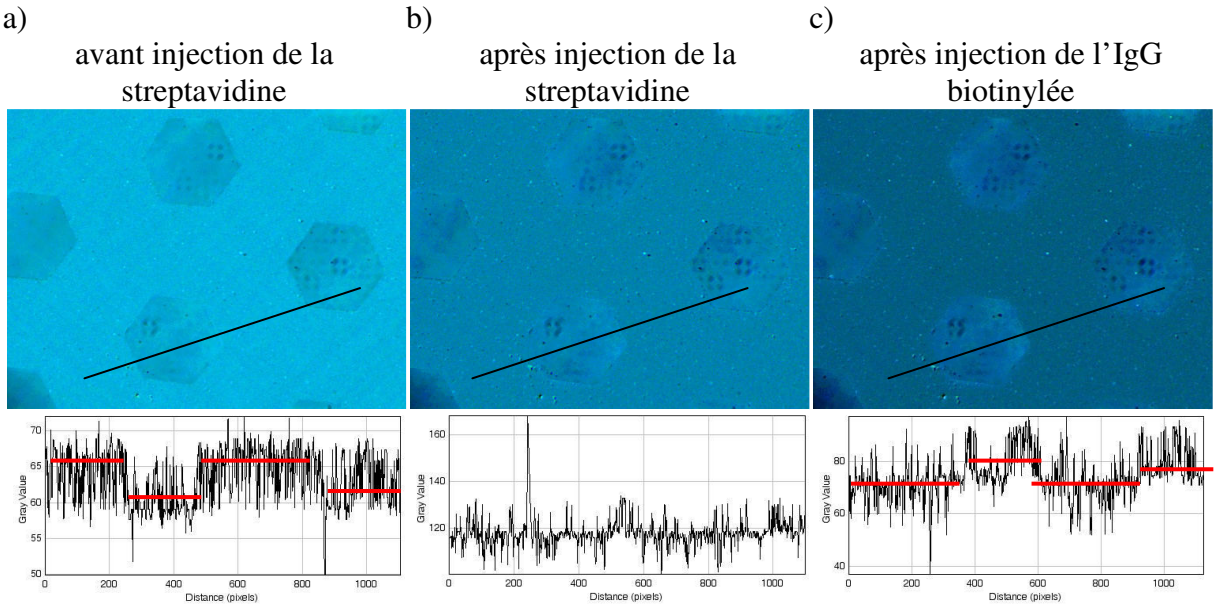


Figure IV.40 : évolution des micrographies CONE P à la suite de l'injection de la streptavidine (200 µg/mL) puis de l'IgG biotinylée (1,2 µg/mL).

Avec la streptavidine :

- Chute de l'intensité bleue plus importante sur le fond que sur les plots.
- Inversion du contraste au cours de la cinétique (C < 0 devient C > 0).
- Confirmation de l'effet d'écran par les plots sur la streptavidine en CONE P.

3.4.3 Comportements constatés sur différents plots de l'image

Le comportement de chaque plot peut être étudié séparément. Les courbes d'intensité des plots (Figure IV.41) sont très similaires. Seule l'intensité du plot numéro 2 (en accord avec la micrographie) est un peu inférieure aux autres, mais ce décalage se retrouve tout au

long de la cinétique. Le ΔI et le contraste s'en retrouvent par conséquent également affectés par un décalage présent dès le début de la cinétique. Les seules différences notables entre les plots se situent sur le ΔI et sur le contraste au moment de l'injection de l'éthanolamine. Le saut d'indice créé par le passage de l'HBSP+ à l'éthanolamine est inexistant sur le plot numéro 6, négatif sur les plots 1 et 2 et positif pour les autres plots. La différence de niveau avant et après injection n'est pas affectée par ce changement de comportement pendant l'injection de l'éthanolamine (Tableau IV.17 et Tableau IV.18). Nous ne comprenons pas cette inversion du de Bulk effect d'un plot à l'autre.

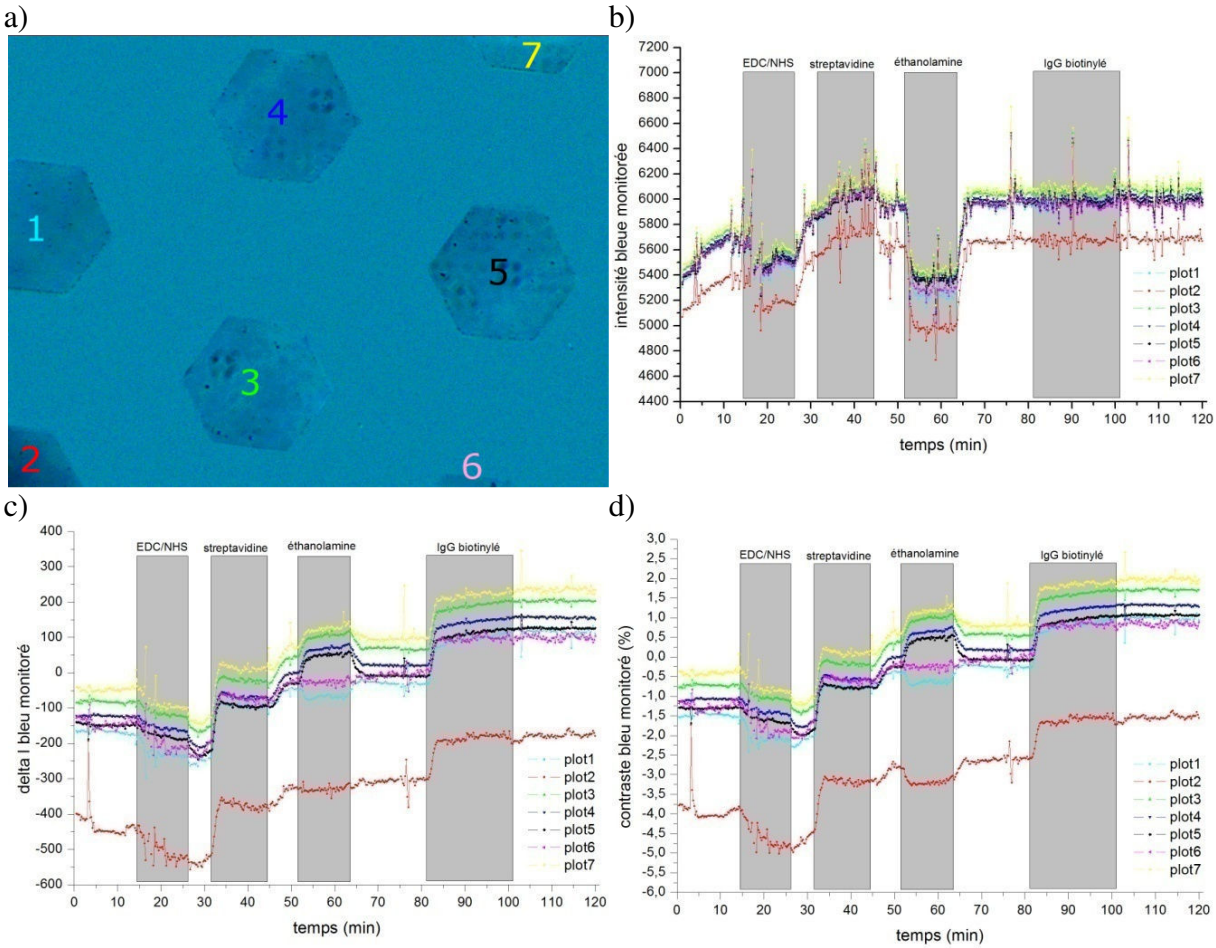


Figure IV.41 : comportements des différents plots de l'image lors de la cinétique d'immobilisation de la streptavidine suivie de l'interaction avec la l'IgG biotinylée a) micrographie CONE P au début de la cinétique avec la notation des plots et le code couleur associé, b) intensité des plots, c) ΔI entre le fond et chaque plot et d) le contraste entre le fond et chaque plot.

Intensité du fond	EDC/NHS	Streptavidine immobilisée	Ethanolamine	IgG biotinylée interagie
Plot 1	+139,8	+68,6	+48,8	29,0
Plot 2	+152,0	+73,5	+60,8	6,4
Plot 3	+183,1	+58,7	+48,8	27,6
Plot 4	+183,1	+58,7	+48,8	27,6
Plot 5	+165,5	+67,2	+48,8	27,6
Plot 6	+192,3	+49,5	+53,0	-12,0
Plot 7	+183,1	+67,9	+39,6	31,8
Moyenne	171,3 ± 19,4	63,4 ± 8,2	49,8 ± 6,3	19,7 ± 16,3

Tableau IV.16 : variation de l'intensité bleue de chaque plot à la suite de l'injection de la solution d'EDC/NHS, de la solution de streptavidine, de la solution de l'éthanolamine, puis de la solution d'IgG biotinylée.

Intensité des plots	EDC/NHS	Streptavidine immobilisée	Ethanolamine	IgG biotinylée interagie
Plot 1	-67,4	195,5	17,7	146,0
Plot 2	-80,3	189,9	18,7	133,6
Plot 3	-68,4	194,2	22,7	136,1
Plot 4	-71,5	197,2	19,4	136,1
Plot 5	-79,8	192,4	21,0	136,1
Plot 6	-51,8	171,1	19,4	106,6
Plot 7	-82,3	197,5	26,0	139,4
Moyenne	-71,6 ± 10,6	191,1 ± 9,3	20,7 ± 2,8	133,4 ± 12,5

Tableau IV.17 : variation du ΔI bleu de chaque plot à la suite de l'injection de la solution d'EDC/NHS, de la solution de streptavidine, de la solution de l'éthanolamine, puis de la solution d'IgG biotinylée.

Contraste	EDC/NHS	Streptavidine immobilisée	Ethanolamine	IgG biotinylée interagie
Plot 1	-0,5	1,6	0,2	1,3
Plot 2	-0,6	1,6	0,3	1,1
Plot 3	-0,5	1,6	0,2	1,1
Plot 4	-0,6	1,6	0,2	1,1
Plot 5	-0,6	1,6	0,2	1,2
Plot 6	-0,4	1,4	0,2	0,9
Plot 7	-0,7	1,7	0,2	1,2
Moyenne	-0,6 ± 0,1	1,6 ± 0,1	0,2 ± 0,1	1,1 ± 0,1

Tableau IV.18 : variation du contraste bleu de chaque plot à la suite de l'injection de la solution d'EDC/NHS, de la solution de streptavidine, de la solution de l'éthanolamine, puis de la solution d'IgG biotinylée.

- Les plots se comportent tous de la même manière au cours de la cinétique.
- Les seuls différences notables sont au niveau du ΔI et du contraste pour les Bulk effects des solutions d'EDC/NHS et d'éthanolamine. Ces variations de Bulk effects ne changent pas l'écart entre les niveaux avant et après l'injection.

3.4.4 Reproductibilité des mesures CONE P

Nous avons suivi par microscopie CONE P sur des surfaces de 10 nm d'or deux cinétiques d'immobilisation de la streptavidine suivies d'une interaction avec de l'IgG biotinylée. À l'époque de ces mesures, le monitoring de la source n'était pas fonctionnel. Le contraste entre le fond et les plots étant auto-monitoré, nous pouvons évaluer la reproductibilité de la microscopie CONE P. Les deux expériences ont été effectuées à plus d'un mois d'intervalle. Sur la Figure IV.42, nous avons mis un offset arbitraire sur le contraste afin que sa valeur devienne nulle au début des deux cinétiques. Ceci nous permet de comparer l'évolution des contrastes entre eux. À la fin de la cinétique, la courbe noire présente un contraste de 3,6 % et la courbe rouge un contraste de 3,5 %, soit un écart de seulement 0,1 % entre les deux mesures. Cet écart est le même que celui que nous avons mesuré entre les différents plots d'un même échantillon.

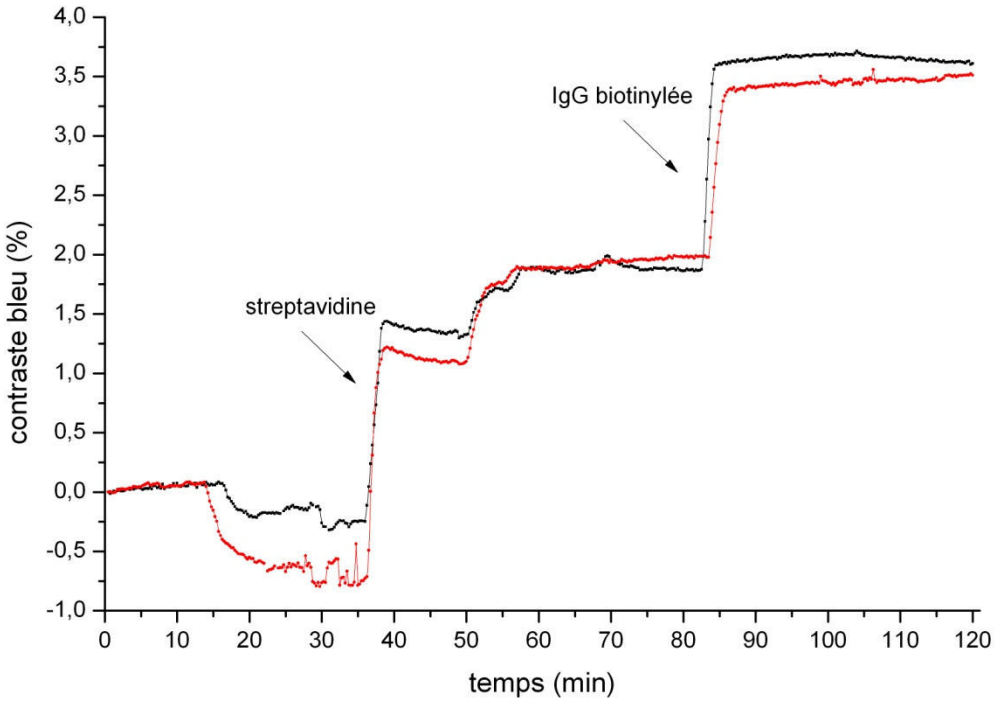


Figure IV.42 : évolution du contraste CONE P entre deux expériences d'immobilisation de streptavidine et d'interaction avec une solution d'IgG biotinylée.

- Les mesures CONE P montrent une bonne reproductibilité.

3.4.5 Comparaison des signaux CONE P et SPR

Etant donné que les mesures CONE P sur le fond montrent un comportement cohérent avec les mesures SPR menées sur l'or nu, nous avons voulu comparer les signaux bruts entre les deux techniques après chaque injection. La Figure IV.43 montre la valeur de l'intensité CONE P de chaque plateau après l'injection des solutions en fonction de la valeur du signal SPR correspondant. Les points se distribuent autour d'une droite de pente -1,05 RU/NB. Il nous semble donc possible de trouver une correspondance directe entre les signaux CONE P et SPR.

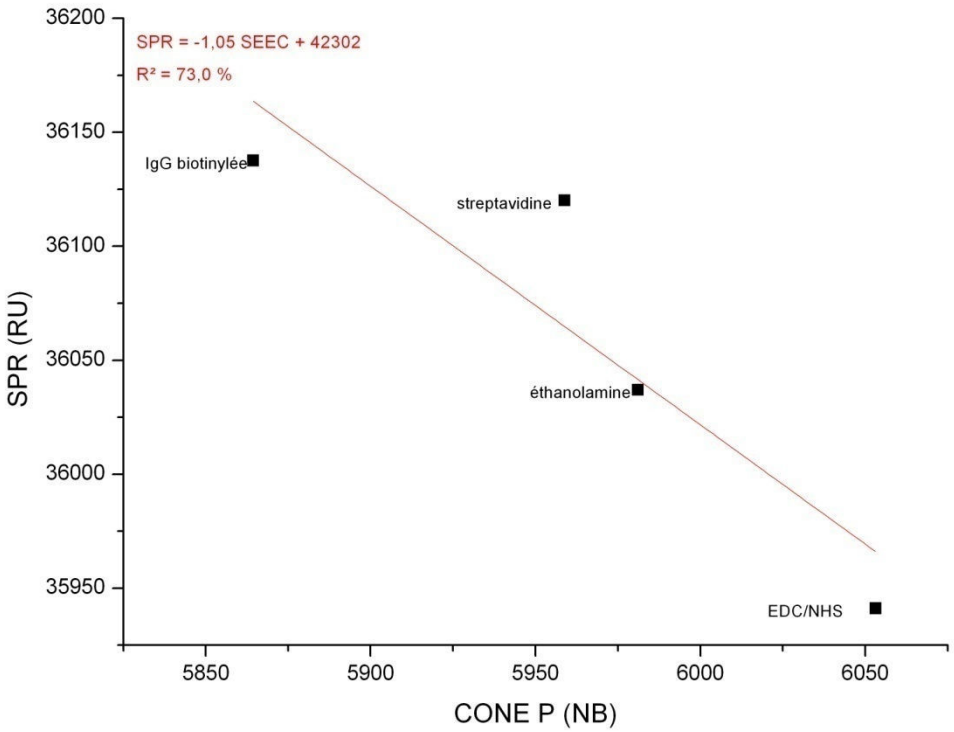


Figure IV.43 : comparaison des signaux bruts CONE P et SPR dans l'expérience d'interaction IgG biotinylée/streptavidine sur l'or nu.

- Possibilité d'établir une correspondance directe entre les Unités de Résonance (RU) et les Niveaux de Bleus (NB) pour une expérience d'interaction protéine/protéine.

Conclusion du chapitre IV

Pour conclure sur ce chapitre expérimental, nous avons été en mesure de suivre qualitativement et quantitativement l'adsorption et l'immobilisation de la BSA fluorescente (0,25 mg/mL) par la microscopie « SEEC » *ex situ* et *in situ*. Ces mesures ne sont pas liées aux phénomènes de fluorescence des molécules. Par contre, nous avons montré la forte sensibilité de la détection CONE (P et NP) en immersion à la partie imaginaire de l'indice de réfraction (soit à l'absorption optique) des protéines. Il existe un effet d'écrantage créé par les plots sur la visualisation de protéines non absorbantes. Des expériences menées avec des plots de 3-MPA et 11-MUA (non présentées) ont montré un comportement identique. L'épaisseur du plot n'est donc pas la cause de cet écrantage.

Les niveaux d'intensités CONE P bleues montrent une forte correspondance avec ceux mesurés lors des expériences SPR.

L'étude des interactions IgG biotinylée/streptavidine confirme les observations réalisées avec la BSA. Nous avons également montré lors de ces expériences que tous les plots de l'image évoluaient de la même manière. Enfin, nous avons démontré la bonne reproductibilité des mesures CONE en l'état.

Références.

1. Ausserre, D.; Valignat, M. P., Surface enhanced ellipsometric contrast (SEEC) basic theory and lambda/4 multilayered solutions. *Optics Express* **2007,** 15, (13), 8329-8339.

2. Ausserre, D.; Valignat, M. P., Wide-field optical imaging of surface nanostructures. *Nano Letters* **2006,** 6, (7), 1384-1388.

3. Yang, P.; Yao;, S.; Wei;, W.; Cai;, J., An Indirect Immunoassay for Detecting Antigen Based on Fluorescence Resonance Energy Transfer. *American Journal of Analytical Chemistry* **2011,** 2, (4), 484-490.

4. Togashi, D. M.; Ryder, A. G., Assessing protein-surface interactions with a series of multi-labeled BSA using fluorescence lifetime microscopy and Förster Energy Resonance Transfer. *Biophysical Chemistry* **2010,** 152, (1-3), 55-64.

5. Whitehead, K. A.; Smith, L. A.; Verran, J., The detection and influence of food soils on microorganisms on stainless steel using scanning electron microscopy and epifluorescence microscopy. *International Journal of Food Microbiology* **2010,** 141, Supplement, (0), S125-S133.

6. Wangoo, N.; Suri;, C. R.; Shekhawat;, G., Interaction of gold nanoparticles with protein: A spectroscopic study to monitor protein conformational changes. *Applied Physics Letters* **2008,** 92, (13), 133104.

7. Spring, k. R., *Fluorescence Microscopy*. Marcel Dekker, Inc.: 2003.

8. Ratinaud, M.-H.; Petit;, J.-M.; Christian, C., Les fluorochromes utilisés en cytométrie et leurs précautions d'emploi. In *Cytométrie par fluorescence - Apports comparatif des techniques flux, image et confocale*, INSERM, l. é., Ed. 1994; pp 35-80.

9. Herman, B., Fluorescence Microscopy. In *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, Inc.: 2002.

10. Perronet, K.; Bouyer, P.; Westbrook, N.; Soler, N.; Fourmy, D.; Yoshizawa, S., Single molecule fluorescence detection of BODIPY-FL molecules for monitoring protein synthesis. *Journal of Luminescence* **2007,** 127, (1), 264-268.

11. Reading University; Infrared Multilayer Laboratory Absorption and extinction coefficient theory. http://www.reading.ac.uk/infrared/library/substrateopticaltheory/ir-substrateopticaltheory-absorptionandextinctioncoefficienttheory.aspx

12. Roussille, L.; Brotons, G.; Ballut, L.; Louarn, G.; Ausserré, D.; Ricard-Blum, S., Surface characterization and efficiency of a matrix-free and flat carboxylated gold sensor chip for surface plasmon resonance (SPR). *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2011,** 401, (5), 1605-1621.

13. Guesdon, J.-L., Sondes froides - Utilisation des phénomènes de fluorescence en hybridation moléculaire. In *Cytométrie par fluorescence - Apports comparatif des techniques flux, image et confocale*, INSERM, l. é., Ed. 1994; pp 9-25.

14. Dai, X.; Zhou, F.; Khan, N.; Huck, W. T. S.; Kaminski, C. F., Direct Visualization of Reversible Switching of Micropatterned Polyelectrolyte Brushes on Gold Surfaces Using Laser Scanning Confocal Microscopy. *Langmuir* **2008,** 24, (22), 13182-13185.

15. Du, H.; Strohsahl, C. M.; Camera, J.; Miller, B. L.; Krauss, T. D., Sensitivity and Specificity of Metal Surface-Immobilized "Molecular Beacon" Biosensors. *Journal of the American Chemical Society* **2005,** 127, (21), 7932-7940.

16. Krasimir, V.; Fernando, D. S.; Volker, J.; Wolfgang, K.; Maximilian, K., Reduced photobleaching of chromophores close to a metal surface. *The Journal of Chemical Physics* **2004,** 120, (14), 6701-6704.

17. http://www.twfta.com/products_N-hydroxysuccinimide_286190.htm

18. Barer, R.; Tkaczyk, S., Refractive Index of Concentrated Protein Solutions. *Nature* **1954,** 173, (4409), 821-822.

19. De Feijter, J. A.; Benjamins, J.; Veer, F. A., Ellipsometry as a tool to study the adsorption behavior of synthetic and biopolymers at the air-water interface. *Biopolymers* **1978,** 17, (7), 1759-1772.

20. Jung, Y. W.; Yoon, J. J.; Kim, Y. D.; Woo, D., Study of the Interaction Between Biomolecule Mono layers Using Total Internal Reflection Ellipsometry. *Journal of the Korean Physical Society* **2010,** 58, (4), 1031-1034.

21. Chien, F. C.; Chen, S. J., Direct determination of the refractive index and thickness of a biolayer based on coupled waveguide-surface plasmon resonance mode. *Optics Letters* **2006,** 31, (2), 187-189.

22. Ricard-Blum, S.; Peel, L. L.; Ruggiero, F.; Freeman, N. J., Dual polarization interferometry characterization of carbohydrate-protein interactions. *Analytical Biochemistry* **2006,** 352, (2), 252-259.

23. Sano, Y., Optical anisotropy of bovine serum albumin. *Journal of Colloid and Interface Science* **1988,** 124, (2), 403-406.

24. Quinn, J. G.; O'Neill, S.; Doyle, A.; McAtamney, C.; Diamond, D.; MacCraith, B. D.; O'Kennedy, R., Development and Application of Surface Plasmon Resonance-Based Biosensors for the Detection of Cell-Ligand Interactions. *Analytical Biochemistry* **2000,** 281, (2), 135-143.

Annexe 1 : Indice de réfraction des solutions

Solution	Indice de réfraction	référence
16-MHDA	1,464	[21]
Streptavidine	1,40	[22]
BSA	1,335	[18]
	dn/dc = 0,00182 mL/%	[18]
	dn/dc = 0,1935 mL/g	[23]
	1,346	[24]
EDC	1,461	Sigma Aldrich
NHS	1,599	[17]
éthanolamine	1,454	Sigma Aldrich

Chapitre V :

Conclusion de ce manuscrit de thèse

Jusqu'au début de la thèse, la microscopie SEEC n'était utilisable qu'à l'air. Le but de cette thèse était d'adapter cette technique à l'étude d'interactions biomoléculaires *in situ* en milieu liquide et de comparer ses performances avec la Résonance Plasmonique de Surface (SPR) qui est la technique installée pour ces études. Cette technique de référence impose la présence d'une surface métallique (or, argent, cuivre, aluminium…). Pour ses propriétés chimiques de surface, dont la stabilité et la non dénaturation des protéines, les biologistes ont pris l'habitude de travailler surtout avec l'or et une large part de la littérature sur les interactions biomoléculaires utilise des films minces d'or. Nous nous sommes donc imposés de travailler avec une couche superficielle d'or afin d'une part, de pouvoir reproduire sur les surfaces SEEC la même chimie de surface qu'en SPR et d'autre part, de faciliter l'évaluation de nos résultats par des biologistes. Ce choix représente une contrainte très forte sur la conception des surfaces. Il est donc important de rappeler que la technique SEEC permet de travailler avec une grande variété d'autres matériaux et que sa présente mise en œuvre est en quelque sorte une figure imposée.

Pour assurer leur fonction biochimique, les surfaces d'or doivent être fonctionnalisées. Pour mener à bien notre comparaison entre les deux techniques, il nous fallait garantir que l'efficacité des fonctionnalisations serait la même dans les expériences SPR et SEEC. Or, la même surface ne peut pas convenir à la fois pour les deux. Nous avons donc entrepris d'effectuer nous-mêmes à l'identique les fonctionnalisations des deux séries de surfaces. Incidemment, la SPR nous montre que notre fonctionnalisation s'avère meilleure que celle des produits commerciaux (chapitre 2) comme la surface C1 portant une couche dense de 16-MHDA ou la surface CM5 portant une couche épaisse d'hydrogel de Dextran, vendues par la société GE Healthcare (anciennement BIAcore). Les surfaces que nous avons fonctionnalisées avec une SAM dense de 16-MHDA ont montré leur efficacité pour l'étude

par SPR de l'immobilisation de protéines (BSA, streptavidine et endostatine) et pour celle d'interactions modèles (streptavidine/IgG biotinylée et endostatine/IgG anti-endostatine), l'efficacité de la fonctionnalisation se mesurant par une forte interaction spécifique et une faible interaction non spécifique.

La microscopie SEEC exploite le contraste observé entre une surface et un objet déposé sur cette surface. Pour utiliser ce contraste, nous sommes passés d'une fonctionnalisation uniforme des surfaces à une fonctionnalisation locale, sous forme de plots analogues à ceux des biopuces, grâce à une technique d'impression par microcontact. Ces surfaces sont recouvertes pour un quart par des molécules organiques et pour trois quarts par de l'or nu. Elles ont été caractérisées sur un plan structurel par Microscopie à Force Atomique (AFM) et sur un plan fonctionnel par SPR. Les signaux SPR d'immobilisation recueillis sur les surfaces homogènes et sur les surfaces à plots reflètent ces proportions, ce qui montre une bonne efficacité des plots de monocouches.

Les systèmes biologiques que nous avons étudiés pour comparer les deux techniques sont deux systèmes modèles pour les biologistes : la BSA (en adsorption ou en immobilisation) et le couple streptavidine/IgG biotinylée. Compte tenu de la faible immobilisation de l'endostatine mesurée en SPR sur les surfaces homogènes, le couple endostatine/IgG n'a pas encore été étudié en microscopie.

Le point de fonctionnement SEEC sur des surfaces d'or en géométrie inversée correspond à une épaisseur d'or de 22 nm et un angle d'incidence unique de 65 deg. La mise en œuvre de ces conditions expérimentales s'est révélée extrêmement difficile. Elle nécessite des modifications instrumentales qui ne sont pas encore complètement achevées, mais de

nouveaux calculs ont permis de déterminer un nouveau point de fonctionnement optique qui permet de travailler avec un large cône de lumière au lieu d'un angle d'incidence unique (travail théorique de Dominique Ausserré). Ce point de fonctionnement, qui correspond à une épaisseur d'or de l'ordre de 5 nm, présente un contraste pratiquement insensible à l'ouverture du cône jusqu'à 40 deg. Le nouveau mode d'observation sort du cadre de la microscopie SEEC. Nous l'avons désigné par l'appellation « CONE » dans ce manuscrit. La microscopie CONE offre un très bon contraste, bien qu'un peu inférieur au contraste SEEC, et ne demande aucune intervention sur l'éclairage du microscope. La mise en œuvre de la technique est donc particulièrement facile. Une autre variante intéressante de la microscopie CONE a été découverte expérimentalement, puis confirmée par le calcul : il est possible de travailler aussi bien en lumière non polarisée (NP) qu'entre polariseur et analyseur croisés (P), ce qui simplifie encore la mise en œuvre de la technique CONE par rapport à celle de la technique SEEC. Le mode CONE NP permet d'avoir plus de lumière sur la caméra et d'utiliser alors une source moins puissante, ce qui abaisse le coût du matériel et permet également d'envisager l'enregistrement de cinétiques plus rapides. De plus, ce mode présente une profondeur de champ supérieure, ce qui facilite la mise au point. Après bien des essais pour atteindre le point de fonctionnement SEEC, la majeure partie des résultats de microscopie rapportés dans ce manuscrit a été réalisée en microscopie CONE P.

Le calcul prévoit que la microscopie CONE doit produire un contraste négatif entre les plots et la surface quel que soit le mode d'éclairage utilisé (P ou NP) et quelle que soit l'épaisseur du plot organique, et la variation du contraste attendue avec l'épaisseur des plots est à peu près linéaire pour les deux modes, P et NP. Selon ces éléments, on s'attend à ce que le contraste des plots évolue linéairement aussi bien avec la longueur des chaînes qui les constituent qu'avec la quantité de protéines capturées.

En pratique, nous avons observé un certain nombre d'évènements non conformes à ces prédictions : inversions possible de contraste entre les modes P et NP, entre différentes épaisseurs de plots, entre différentes composantes de l'image RVB et parfois non linéarité du contraste avec la quantité de matière organique déposée sur la couche d'or. Ces désaccords entre calculs et expériences peuvent avoir de multiples origines et sont loin d'être tous expliqués. Cependant, la microscopie CONE nous a permis de bien visualiser en immersion des plots d'acide 3-mercaptopropionique de 3 Å d'épaisseur, ce qui prouve sa sensibilité, elle n'est toutefois pas encore comparable à celle de la SPR qui est de 1 pg/mm². Par contre, la technique CONE est bien moins affectée par les variations d'indice dans le volume du canal de microfluidique (Bulk effects) que la SPR, ce qui représente un grand avantage.

Les comportements optiques imprévus se retrouvent dans les expériences menées sur les protéines modèles. L'adsorption des protéines (BSA et streptavidine) est fortement visible sur l'or nu en microscopie CONE (P et NP), mais leur fixation sur les plots est par contre peu visible, ce qui interdit les expériences d'immobilisation avec des concentrations très faibles. Tout se passe comme s'il y avait un effet d'écrantage optique de la protéine par le plot, non prévu par la théorie. En présentant les choses de cette manière, nous postulons que ces molécules devraient être vues en CONE parce qu'elles sont vues en SPR et donc que le signal SPR provient d'un indice optique moyen des molécules différent de l'eau. Rien pourtant n'est moins sûr, car la SPR est beaucoup plus sensible que notre microscopie à l'orientation des molécules sur la surface. La composante du champ électrique parallèle au plan d'incidence, et donc la composante normale à la surface, y jouent en effet un rôle beaucoup plus important. La SPR pourrait donc être plus sensible à l'indice extraordinaire normal à la surface de la couche orientée de molécules capturées qu'à l'indice de réfraction moyen de cette couche.

D'après des expériences sur la BSA menées par ellipsométrie et rapportées dans le Chapitre IV [1], cet indice moyen pourrait rester très proche de celui de l'eau, ce qui pourrait expliquer la quasi-invisibilité de ces molécules dans ce milieu avec notre microscopie optique qui mobilise toutes les orientations du champ électrique. La visibilité des mêmes molécules en contact direct avec la surface d'or devrait alors trouver une autre explication. Cette explication pourrait être la modification des propriétés optiques de l'or induites par la fixation des molécules. De tels effets ont été clairement démontrés dans le cas de nanoparticules d'un diamètre comparable à l'épaisseur de nos couches d'or. Au total, les phénomènes observés sont donc complexes et cette complexité est la contrepartie de la sensibilité des techniques utilisées. Le point important est qu'à ce stade, notre technique optique n'est pas (encore) en mesure de concurrencer la SPR sur ses applications courantes.

Par contre, l'écrantage des protéines capturées par les plots, évoqué dans le paragraphe ci-dessus, disparait lorsque les protéines deviennent absorbantes (indice de réfraction imaginaire non nul). Nous l'avons montré en détail au chapitre 4 en travaillant avec de la BSA fluorescente, sachant que l'émission de fluorescence ne participe pas efficacement à la visualisation CONE. Le calcul nous confirme cette propriété très particulière. L'intensité bleue en mode CONE et en lumière polarisée conduit pour la BSA fluorescente à des cinétiques d'adsorption et d'immobilisation très proches de celles mesurées en SPR. **La technique CONE semble donc en mesure de reproduire les résultats de la SPR, avec une sensibilité comparable et avec l'imagerie en plus, pourvu que les molécules capturées soient optiquement absorbantes**. Une caractéristique importante de la SPR étant d'être non spécifique, la technique CONE présente de ce point de vue un désavantage certain. Comme l'absorption optique peut être apportée de multiples manières (atomes métalliques, doubles liaisons, cycles aromatiques, marqueurs colorimétriques, nanoparticules (quantum dots),

marqueurs fluorescents), on peut véritablement parler d'une technique semi-spécifique et chercher à tourner cette faiblesse de la technique CONE en atout, c'est à dire chercher à positionner au mieux notre technique parmi toutes les techniques employées en biologie.

La microscopie CONE telle que nous l'avons mise en œuvre permet de mesurer trois grandeurs en une expérience : la variation d'intensité sur l'or nu, la variation d'intensité sur les plots et la variation de contraste entre les plots et l'or nu. Les intensités sont plus sensibles aux variations d'éclairage et demandent plus de précautions que le contraste. Pour favoriser l'usage de la technique dans les laboratoires de recherche, il convient d'améliorer le rapport signal/bruit des intensités pour suivre simultanément le comportement des deux états de surface. Ces états de surface peuvent facilement être modifiés par SAM ou µCP pour étudier ou comparer le comportement des protéines face à différents récepteurs. Le contraste présente quant à lui un très bon rapport signal/bruit, il peut donc être utilisé en l'état pour sonder la présence d'analytes dans une solution en contact avec une surface recouverte de différents récepteurs, c'est à dire avec une biopuce. La sensibilité sera très grande si les analytes sont optiquement absorbants, ce qui suggère et permet l'usage de marqueurs commerciaux, comme ceux utilisés dans les techniques ELISA. La mesure du contraste en mode CONE NP est particulièrement simple. Il y a donc là tous les ingrédients pour une application de la technique au diagnostic immunologique à haute densité de plots avec un équipement très simple. Le principal avantage de notre technique sur les techniques ELISA est celui du coût (équipement, quantité de produits, variété des réactifs, parallélisme).

En introduction de ce manuscrit nous définissions sept critères indispensables à une technique de biosenseur pour qu'elle soit utilisable de manière clinique. Le Tableau V.1 présente les caractéristiques de la technique de transduction CONE NP par rapport à ces

critères pour la détection d'objets absorbants. Rappelons qu'à ces caractéristiques s'ajoute son extraordinaire capacité d'imagerie.

Critères pour une utilisation clinique	correct	à améliorer
Précision	X	
Reproductibilité	X	
Sensibilité	X	
Spécificité		X
Stabilité temporelle		X
Faible coût	X	
Facilité d'utilisation		X

Tableau V.1 : caractéristiques actuelles de la microscopie CONE en lumière non polarisée pour une utilisation comme transducteur dans une application de diagnostic clinique.

Les deux conclusions de cette thèse sont donc les suivantes:

i) Il reste encore beaucoup de travail théorique, instrumental et expérimental à produire avant que les techniques de microscopie optique SEEC et/ou CONE puissent concurrencer la SPR.

ii) La technique CONE, en particulier dans le mode NP, semble posséder de solides atouts pour être utilisée comme transducteur dans les applications de diagnostic médical à faible coût. C'est donc dans cette direction que devrait logiquement se poursuivre ce travail.

Références

1. Jung, Y.W., et al., *Study of the Interaction Between Biomolecule Mono layers Using Total Internal Reflection Ellipsometry.* Journal of the Korean Physical Society, 2010. **58**(4): p. 1031-1034.