



HAL
open science

Fonctionnalisation optimisée de différentes surfaces par des paires de FRET pour des applications de biodétection en plasmonique et en microfluidique

Alexandra Petreto

► To cite this version:

Alexandra Petreto. Fonctionnalisation optimisée de différentes surfaces par des paires de FRET pour des applications de biodétection en plasmonique et en microfluidique. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Paris Saclay (COMUE), 2019. Français. NNT : 2019SACLS048 . tel-02165933

HAL Id: tel-02165933

<https://theses.hal.science/tel-02165933>

Submitted on 26 Jun 2019

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.

Fonctionnalisation optimisée de différentes surfaces par des paires de FRET pour des applications de biodétection en plasmonique et en microfluidique

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'Université Paris-Sud



École doctorale n°575:
electrical, optical, bio : physics and engineering (EOBE)

Spécialité de doctorat:
Electronique et Optoélectronique, Nano et Microtechnologies

Thèse présentée et soutenue à Orsay, le 18 février 2019, par

Alexandra Petreto

Composition du Jury :

Mme Anne Varenne	
Pr, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Paris (UTCBS)	Rapporteur
M. Thomas Pons	
CR, ESPCI Paris (LPEM)	Rapporteur
Mme Claire Smadja	
Pr, Université Paris-Sud (IGPS)	Présidente
M. Rodolphe Jaffiol	
MCF, Université de Technologie de Troyes (L2n)	Examineur
M. Niko Hildebrandt	
Pr, Université Paris-Sud (I2BC)	Directeur de thèse
M. Mehdi Ammar	
MCF, Université Paris-Sud (C2N)	Invité

Université Paris-Saclay

Espace Technologique / Immeuble Discovery

Route de l'Orme aux Merisiers RD 128 / 91190 Saint-Aubin, France



Titre : Fonctionnalisation optimisée de différentes surfaces par des paires de FRET pour des applications de biodétection en plasmonique et en microfluidique

Mots clés : FRET, Microscopie, Spectroscopie, Nanostructures, Microfabrication, Microfluidique

Résumé : La qualité de la prise en charge d'un patient repose sur la disponibilité d'outils diagnostiques performants. Le développement de biocapteurs s'appuyant sur le phénomène de transfert d'énergie par résonance de type Förster permet la détection de biomarqueurs spécifiques avec une grande précision et une bonne sensibilité. Le FRET (Förster Resonance Energy Transfer) est un processus de transfert d'énergie dépendant de la distance fréquemment utilisé dans les applications de biodétection, dans lesquelles les reconnaissances, fonctions et structures biologiques sont de l'ordre de 1 à 20 nm. Cette thèse de doctorat présente la mise en œuvre de procédés de fabrication et de fonctionnalisation pour la détection optique de molécules d'intérêt biologique par FRET, en particulier pour des applications en diagnostic clinique et en séquençage d'ADN.

Ce travail présente une étude du phénomène de FRET sur des surfaces d'aluminium fonctionnalisées,

première étape du développement d'une plateforme de séquençage par FRET exalté par effet plasmonique. La détection quantitative du phénomène de FRET sur des surfaces d'aluminium fonctionnalisées par silanisation est développée, et les résultats de caractérisation de la fonctionnalisation par différentes méthodes (angle de contact, spectroscopie FTIR, imagerie de fluorescence) sont discutés en détails.

Ce manuscrit expose également le développement d'un dispositif microfluidique fonctionnalisé pour la réalisation d'un immunodosage par FRET multiplexé. Dans l'optique de concevoir un tel biocapteur, j'ai développé une stratégie pour la collaboration d'un dispositif optique microfluidique par détection de FRET multiplexé. Les résultats préliminaires de FRET entre deux anticorps fluorescents dans un canal microfluidique démontrent la faisabilité d'une telle plateforme de biodétection.

Title : Optimized FRET functionalization of different surfaces for plasmonic and microfluidic biosensing applications

Keywords : FRET, Microscopy, Spectroscopy, Nanostructures, Microfabrication, Microfluidics

Abstract: Patient care quality relies on the availability of efficient diagnostics tools. Development of biosensors based on Förster resonance energy transfer (FRET) allows for the detection of specific biomarkers with high precision and sensitivity. FRET is a distance dependent energy transfer process that is frequently used in biosensing applications, in which biological recognition, functions or structures are within the 1 to 20 nm length scale. This PhD thesis presents the establishment of fabrication and functionalization processes for the optical FRET detection of molecules of biological interest, toward an application in clinical diagnostics and DNA sequencing.

This work presents a FRET study on functionalized aluminum surfaces, which is the first step towards the development of a sequencing platform using plasmonics enhanced FRET.

Quantitative FRET detection on silanized aluminum surfaces was extensively investigated and the results of different characterization methods (contact angle, FTIR spectroscopy, fluorescence imaging) are discussed in details.

This manuscript also describes the development of a functionalized microfluidic device for the realization of a multiplexed FRET immunoassay. With the aim of designing such a biosensor, I developed a strategy for the conception of a microfluidic optical multiplexed FRET biosensor. Preliminary FRET results between two labeled antibodies in a microfluidic channel demonstrate the feasibility of such a biosensing platform.



Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon jury de thèse, Anne Varenne et Thomas Pons en tant que rapporteurs, et Claire Smadja et Rodolphe Jaffiol en tant qu'examinateurs. Je vous remercie d'avoir accepté d'évaluer, avec votre excellence scientifique et votre bienveillance, ce travail dans lequel je me suis investie corps et âme.

Je me dois de remercier mon directeur de thèse, Niko Hildebrandt, qui m'a offert une thèse qui m'aura permis de me préparer à n'importe quelle situation professionnelle.

Je remercie également mon co-encadrant, Mehdi Ammar. Je te remercie de m'avoir accordé le temps pour toutes ces discussions scientifiques enrichissantes, et pour m'avoir permis de m'affirmer en tant que chercheur.

Je remercie tous les gens avec qui j'ai travaillé dans ce projet de thèse, à l'I2BC et au C2N, et notamment Xue Qiu pour tous ses conseils, Vjona Cifliku et Sylvie Bilent pour leur bonne humeur, Gabriel Ribeiro Dos Santos pour son enthousiasme, et Etienne Laborie pour nos heures de boulot en tandem (par 30°C en salle blanche). Un grand merci à Hortense Bartenlian, stagiaire de rêves et complice de nos délires. Un grand merci également à Thomas Plénat, mon co-bureau infernal, avec qui j'ai bien rigolé. Ton bazar et tes remarques désobligeantes ont rendu cette thèse bien plus marrante.

Je remercie ceux avec qui je me suis lancée dans ces projets passionnants que sont la conférence internationale IONS et le projet Petits. Merci donc avant tout à Amanda Trepagny de m'avoir entraînée dans ce pari fou d'enseigner la science aux tout-petits. J'ai une grande fierté d'avoir pris part à ce projet dont j'ai savouré chaque seconde. Pour la conférence, je remercie mes collègues de l'association SCOP et notamment Guillaume Fischer et Samuel Serna, avec qui j'ai réussi, de réunions intenses en échange de mails improbables, à organiser ce bel événement. Je remercie aussi Mathias Berciano, toujours partant pour un verre, un projet, un coup de main ou un week end au ski.

Dans cette thèse parfois difficile, je remercie Sophie Bouchoule et Laurence Stephen de l'ED EOBE pour m'avoir apporté le soutien et les conseils avisés dont j'avais besoin pour avancer dans ce doctorat.

Un grand merci à André Cardoso Dos Santos, roi du barbeuc, pour avoir orchestré nos barbecues de crise un soir sur deux pendant une bonne partie de ma thèse.

Je remercie également tous ceux avec qui j'ai partagé ces sourires, ces bonjours et ces discussions enflammées, scientifiques ou non, qui ont rythmé ma thèse de la plus belle façon.

Je remercie par-dessus tout Marcelina Cardoso Dos Santos pour son rôle primordial dans cette thèse. Tu m'as guidée dans mes travaux de recherche, tu as cherché les réponses avec moi, tu m'as appris tout ce qui te passait par la tête. Des douleurs aux

grands bonheurs de la vie, en passant par tous les « Vendredi c'est sexy » et autres fous rires, ces trois dernières années, nous les avons vécues ensemble. Merci.

Je remercie ma belle-famille, les Lefebvre, Patrice, Isabelle, Aurélie, Titouan, Stéphane et Blandine, pour avoir écarquillé des yeux horrifiés au récit de chacune de mes mésaventures, et pour m'avoir souhaité chaque fois tout le courage dont j'avais besoin pour réussir.

Je remercie de tout mon cœur ma famille, les Petreto, Papa, Maman, Andrea, Anna et Céline, pour m'avoir apporté le soutien sans faille qui m'a permis de réussir cette thèse. Merci Céline de te montrer toujours aussi à l'écoute et compréhensive. Merci Andrea pour tes éclairs de sagesse qui ont souvent permis de dédramatiser la situation. Merci Anna pour toutes les fois où tu es venue jusqu'à mon bureau apporter le goûter, tu sais à quel point j'en avais besoin. Andrea et Anna, vous êtes la meilleure fratrie dont on puisse rêver. Merci Papa pour le sale caractère, le goût des sciences et celui de la recherche. Tu m'as transmis cette détermination qui me pousse à me dépasser. Merci Maman pour ton investissement sans pareil dans cette thèse. Tu as partagé chacun de mes échecs, chacun de mes doutes, chacune de mes réussites. Papa, Maman, je vous remercie de toujours croire en moi.

Merci enfin à Olivier, mon amour, le héros de ma vie de tous les jours. Je sais que je t'en ai fait voir de toutes les couleurs durant cette thèse. Merci de me rendre toujours heureuse.

Table des matières

Introduction	5
I Biocapteurs reposant sur le principe de FRET pour la détection de molécules d'intérêt biologique	7
I.1 Principe de détection de biomarqueurs par FRET	7
I.1.1 Les biomarqueurs	7
I.1.2 Principe et techniques d'observation de la fluorescence	8
I.1.3 Théorie et paramètres d'observation du FRET	13
I.2 Méthodes de capture de biomarqueurs.....	18
I.2.1 Systèmes de détection par FRET	18
I.2.2 Détection sur laboratoire sur puce en conditions microfluidiques	21
I.2.3 Fonctionnalisation de surfaces.....	29
I.3 Application à la détection de molécules d'intérêt biologique	36
I.3.1 Séquençage d'ADN et de protéines.....	36
I.3.2 Immunodosages multiplexés par FRET	42
II Fonctionnalisation de surfaces d'aluminium.....	49
II.1 Elaboration de surfaces d'aluminium recouvertes de silice	49
II.1.1 Intérêts et contraintes des surfaces d'aluminium	49
II.1.2 Choix du revêtement de silice.....	50
II.1.3 Procédé de fabrication des échantillons	51
II.2 Silanisation.....	53
II.2.1 Préparation des échantillons	54
II.2.2 Aminosilanisation.....	55
II.3 Caractérisation des surfaces silanisées par angle de contact.....	56
II.3.1 Principe général.....	56
II.3.2 Mesure des angles de contact.....	57
II.4 Caractérisation par spectroscopie FTIR	59
II.4.1 Principe général.....	59
II.4.2 Mesure des spectres FTIR	61
II.5 Greffage des fluorophores.....	65
II.5.1 Conjugaison des colorants aux aminosilanes.....	66

II.5.2	Procédures d'acquisition et de traitement des images de fluorescence	67
II.5.3	Etude quantitative de la fluorescence des substrats Al-SiO ₂ fonctionnalisés	70
II.6	Conclusion	75
III	Etude du FRET dépendant de la concentration	77
III.1	Etude de la concentration en fluorophores.....	77
III.2	Etude du FRET sur les surfaces	81
III.2.1	Caractérisation photophysique de la paire de FRET	81
III.2.2	Imagerie de fluorescence	84
III.2.3	Quantification de l'intensité de fluorescence.....	90
III.2.4	Détermination des paramètres de FRET	93
III.3	Conclusion	97
IV	Développement d'un dispositif intégré pour la détection par FRET en conditions microfluidiques.....	99
IV.1	Fonctionnalisation des substrats de verre	99
IV.1.1	Substrats de verre	99
IV.1.2	Préparation du PDMS.....	100
IV.1.3	Dépôt de PDMS sur les substrats.....	103
IV.1.4	Greffage des aminosilanes.....	103
IV.1.5	Caractérisation par angle de contact	104
IV.1.6	Caractérisation par microanalyse X.....	106
IV.2	Fabrication du dispositif microfluidique	109
IV.2.1	Conception des masques pour la réalisation des moules des micro-canaux	110
IV.2.2	Réalisation du moule en résine	111
IV.2.3	Fabrication du capot de PDMS.....	115
IV.2.4	Collage du capot sur les substrats silanisés	116
IV.2.5	Validation de la présence de silanes par imagerie de fluorescence .	117
IV.3	Conclusion	120
V	Elaboration d'une stratégie pour la réalisation d'un biocapteur microfluidique par FRET multiplexé.....	121
V.1	Stratégie pour le développement d'un immunodosage multiplexé par FRET dans un canal microfluidique.....	122
V.1.1	Le complexe de terbium comme donneur pour divers accepteurs pour la détection résolue en temps.....	122

V.1.2	Le projet μ FRET	126
V.2	Résultats préliminaires	128
V.2.1	Modèle simple pour la réalisation d'un immunodosage	128
V.2.2	Tests d'écrantage par la protéine BSA	129
V.2.3	Bioconjugaison de l'anticorps primaire au complexe de terbium	132
V.2.4	Observation du FRET entre l'anticorps primaire marqué au terbium et l'anticorps secondaire fluorescent en microscopie résolue en temps	133
V.3	Conclusion	138
	Conclusion	141
	Références bibliographiques	145
	Annexes	155
	Liste des abréviations.....	165

Introduction

La qualité de la prise en charge d'un patient pour une pathologie donnée est étroitement liée à la disponibilité d'un outil diagnostique spécifique de la maladie. Ainsi, ces dernières décennies ont vu l'émergence de nombreux biocapteurs toujours plus performants visant à détecter des biomarqueurs de façon fiable et précoce. Parmi ces nombreux systèmes de détection, de type magnétique, électrochimique ou encore optique, on distingue les biocapteurs par FRET (pour Förster Resonance Energy Transfer), qui offrent une combinaison unique de simplicité de réalisation (systèmes de biodétection sans nécessité d'étapes de lavages), spécificité (reconnaissance biologique par deux biomolécules, par exemple deux anticorps) et de flexibilité (multiplexage et adaptation à différentes cibles biologiques). Le phénomène de FRET est un processus de transfert d'énergie non radiatif entre deux molécules selon une très forte dépendance en distance. Cette propriété en fait un système idéal pour la détection de molécules d'intérêt biologique.

L'élaboration d'outils diagnostiques, notamment au niveau des centres de prise en charge (point of care diagnostics), a bénéficié ces dernières années du développement de technologies telles que la microfabrication, la microfluidique et la détection optique. En effet, la réalisation de dispositifs miniaturisés intégrant toutes les étapes de dosage du biomarqueur, ainsi que l'utilisation de techniques optiques de pointe permettent l'obtention d'un outil diagnostique portable, nécessitant peu de volume d'échantillon, et présentant une grande sensibilité.

C'est dans ce contexte que s'inscrit cette thèse de doctorat, qui présente d'une part une étude du phénomène de FRET sur des surfaces d'aluminium fonctionnalisées, et d'autre part le développement d'un dispositif microfluidique fonctionnalisé. L'étude du FRET sur les surfaces d'aluminium constitue le point de départ pour le développement d'une plateforme de séquençage par FRET exalté par effet plasmonique, tandis que le dispositif microfluidique doit servir à réaliser un immunodosage par FRET multiplexé. Cette thèse visait donc à développer des

procédés de fonctionnalisation et à étudier le phénomène de FRET sur des systèmes ayant pour finalité la détection optique de molécules d'intérêt biologique.

Ce manuscrit s'organise en cinq chapitres. Le premier chapitre introduit l'état de l'art des biocapteurs pour la détection par FRET et leurs applications en termes de séquençage de l'ADN et des protéines ainsi qu'en immunodosages multiplexés. Les chapitres II et III constituent une étude fondamentale de détection quantitative du phénomène de FRET sur des surfaces d'aluminium fonctionnalisées. Le deuxième chapitre détaille le protocole de fonctionnalisation des surfaces d'aluminium ainsi que les caractérisations associées à chaque étape du procédé. Le troisième chapitre présente l'étude par microscopie de fluorescence du FRET dépendant de la concentration sur les surfaces d'aluminium. Les chapitres IV et V portent sur le projet de réalisation d'un biocapteur en phase solide en conditions microfluidiques pour l'immunodosage de molécules d'intérêt biologique à l'aide de la détection multiplexée par FRET en imagerie. Le quatrième chapitre décrit la fabrication d'un dispositif intégré fonctionnalisé pour la détection par FRET en conditions microfluidiques. Le cinquième chapitre expose l'élaboration d'une stratégie pour la réalisation d'un biocapteur optique microfluidique par FRET multiplexé et les résultats préliminaires obtenus pour ce projet.

I Biocapteurs reposant sur le principe de FRET pour la détection de molécules d'intérêt biologique

I.1 Principe de détection de biomarqueurs par FRET

I.1.1 Les biomarqueurs

Les biomarqueurs, ou marqueurs biologiques, sont des entités mesurables et analysables dans le cas notamment de la recherche clinique. Un certain nombre de définitions se recoupant ont été données pour le terme biomarqueur [1], et celle établie par le National Institutes of Health Biomarkers Definitions Working Group (USA) en 1998 [2] semble faire consensus. Un biomarqueur est donc communément défini comme « une caractéristique objectivement mesurée et évaluée comme un indicateur de processus biologiques normaux ou pathogènes, ou de réponses pharmacologiques à une intervention thérapeutique ». La détection de biomarqueurs permet donc la compréhension et le suivi de nombreux mécanismes physiologiques ou pathologiques, et trouve notamment tout son sens dans le diagnostic d'affections comme par exemple la maladie d'Alzheimer [3] ou le cancer – cancer de l'ovaire [4], cancer du côlon [5], cancer du sein [6], cancer de la prostate [7].

Dans le cadre de la recherche clinique et du diagnostic, les nombreux biomarqueurs existant peuvent être répartis selon différents systèmes de classification. Ainsi, on considère souvent une répartition selon le domaine d'application du biomarqueur : diagnostic, pronostic – suivi, prédictif – évaluation de la réponse à un médicament avant traitement, indication de réponse à un traitement – cas par exemple de l'absence de détection du Prostate Specific Antigen (PSA) après une prostatectomie [8], [9].

D'un point de vue plus pragmatique, les biomarqueurs peuvent également être répartis en différentes catégories selon le type d'entité biochimique détectée. On distingue alors entre autres les biomarqueurs de type acides nucléiques, protéines,

sucres, lipides, ou encore cellules [10]. Le travail de thèse décrit dans ce manuscrit se concentre sur des applications impliquant des biomarqueurs de type protéique, qui est le type le plus communément utilisé en diagnostic médical [11].

Les biomarqueurs protéiques peuvent être détectés de nombreuses façons, parmi lesquelles on peut citer le dosage enzymatique par immuno-absorption (ELISA pour Enzyme-linked immunosorbent assay), l'électrophorèse sur gel, la spectroscopie Raman exaltée de surface (SERS pour Surface enhanced Raman spectroscopy), ou encore la fluorescence [11]. Chaque technique de détection des biomarqueurs protéiques présente des avantages et des inconvénients en termes de temps, coût, volume, sensibilité, limite de détection et spécificité. Pour un biomarqueur donné, plusieurs méthodes peuvent être utilisées sans forcément que l'une d'elles apparaisse comme incontestablement plus performante. Dans le cadre de ce travail de thèse visant à apporter une méthode de détection optimale pour les biomarqueurs protéiques, nous nous focalisons sur la détection par fluorescence, et plus précisément par FRET.

I.1.2 Principe et techniques d'observation de la fluorescence

a. Principe de la fluorescence

La fluorescence est un phénomène d'émission de lumière rapide que certaines substances (molécules, cristaux) présentent lorsqu'elles sont soumises à une excitation par un rayonnement lumineux.

Les molécules qui ont la capacité d'émettre de la lumière suite à une excitation lumineuse sont appelés fluorophores (cette appellation désigne généralement les molécules organiques ; pour les cristaux, comme les boîtes quantiques, on parle plutôt de luminophores). Parmi ces molécules fluorescentes, on distingue les colorants organiques, les protéines fluorescentes, les nanocristaux semi-conducteurs (quantum dots), ou encore certains lanthanides.

Un modèle simple de la représentation des niveaux énergétiques d'une molécule fluorescente a été élaboré par Alexander Jablonski en 1933 [12]. Ce modèle décrit trois niveaux d'énergie électroniques : l'état fondamental singulet S_0 , l'état excité

singulet S_1 , et l'état excité triplet T_1 . Ces notations font référence à la notion de multiplicité de spin $M_s = 2s+1$ en mécanique quantique, avec s la résultante des spins électroniques ($s = \sum s_z$, $s_z = \pm 1/2$). Dans le cas simple d'une molécule à deux électrons tel que représenté en Figure I.1, on définit alors l'état singulet ($s=0$, $M_s=1$) où les électrons sont de spin opposé ($\uparrow\downarrow$), et l'état triplet ($s=1$, $M_s=3$) où les spins sont parallèles ($\uparrow\uparrow$).

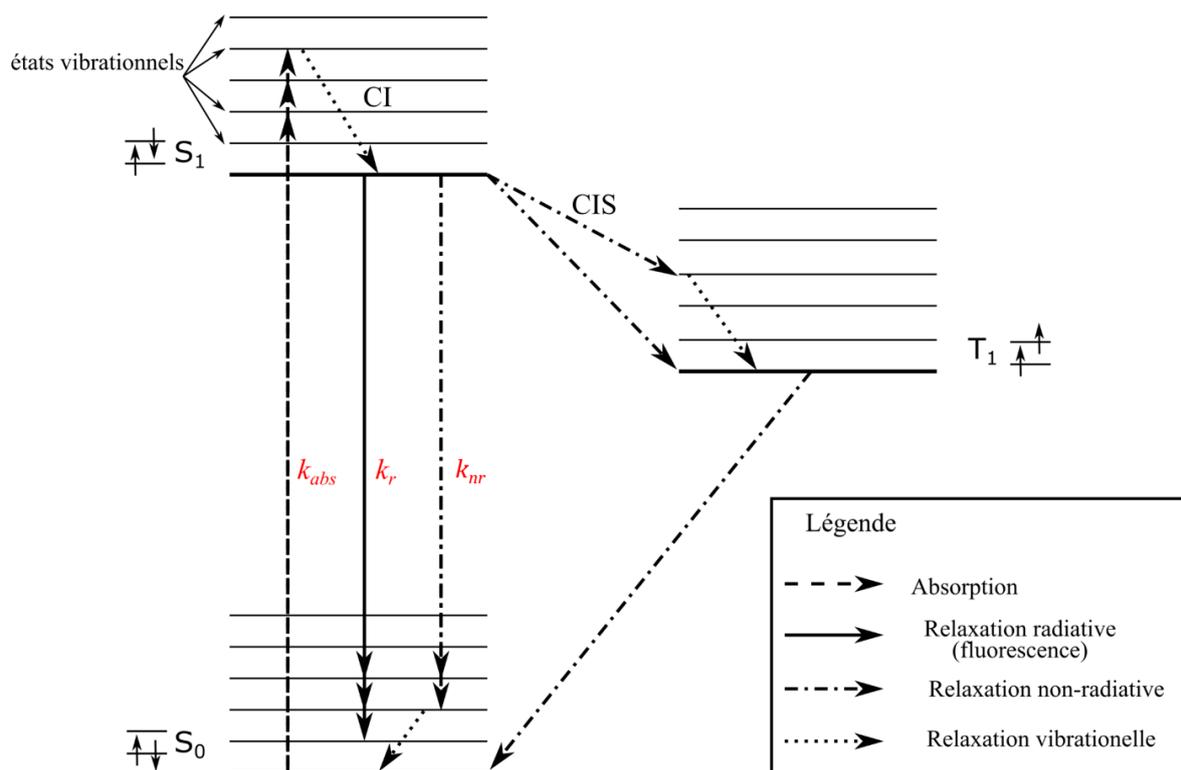


Figure I.1. Diagramme de Jablonski d'un système à trois états électroniques S_0 , S_1 et T_1 . Les lettres S et T représentent les états singulet (S) et triplet (T). Les indices 0 et 1 désignent les états fondamental (0) et excité (1). Chaque état électronique possède des sous-niveaux d'énergie vibrationnelle (représentés par des traits horizontaux). CI et CIS signifient conversion interne (CI) et couplage intersystème (CIS). k_{abs} , k_r et k_{nr} sont respectivement les taux d'absorption, de désexcitation radiative et de désexcitation non radiative.

Dans le cas d'un fluorophore, l'absorption de photons suivant la transition $S_0 \rightarrow S_1$ est suivie de l'émission spontanée de photons par désexcitation vers l'état fondamental S_0 . Au cours du processus, une partie de l'énergie est perdue via des relaxations vibrationnelles, ce qui implique que l'énergie des photons émis est toujours plus faible que celle des photons absorbés. Considérant que l'énergie est liée à la longueur d'onde par la relation $E = \frac{hc}{\lambda}$, il s'ensuit un décalage du spectre d'émission

vers les longueurs d'onde plus élevées (rouge) par rapport au spectre d'absorption (Figure I.2). On parle de déplacement de Stokes (Stokes shift) [13].

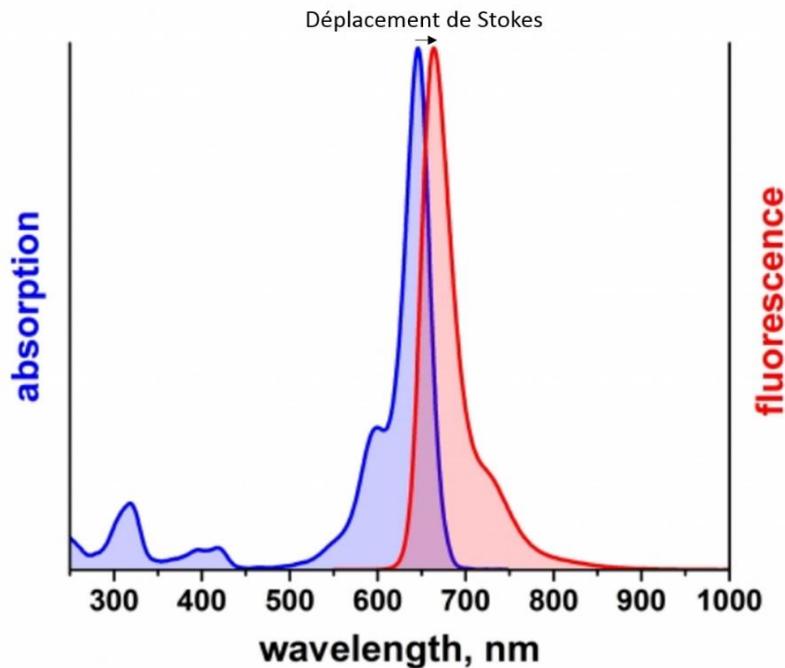


Figure I.2. Exemple d'illustration du déplacement de Stokes pour l'ATTO 647N. Les maxima d'absorption (en bleu) et d'émission (en rouge) se situent respectivement à 646 nm et 664 nm. Le déplacement de Stokes indiqué par la flèche horizontale est de l'ordre de 19 nm. Image adaptée du site d' ATTO-TEC (atto-tec.com).

Dans le cadre d'expériences de fluorescence, on considère principalement trois grandeurs caractéristiques des fluorophores : le rendement quantique, la durée de vie de fluorescence et le coefficient d'extinction.

Le rendement quantique Φ est défini comme le rapport entre le nombre de photons de fluorescence émis par une molécule et le nombre de photons absorbés. La durée de vie τ (ou temps de déclin) correspond à la durée de vie de l'état excité. Suite à l'absorption d'un photon, le retour d'une molécule excitée vers son état fondamental s'effectue par des processus radiatifs (fluorescence), caractérisés par le taux Γ (ou k_r), et non radiatifs, caractérisés par le taux k_{nr} . La Figure I.3 présente un diagramme de Jablonski simplifié permettant d'illustrer ces notions de rendement quantique et de durée de vie de fluorescence.

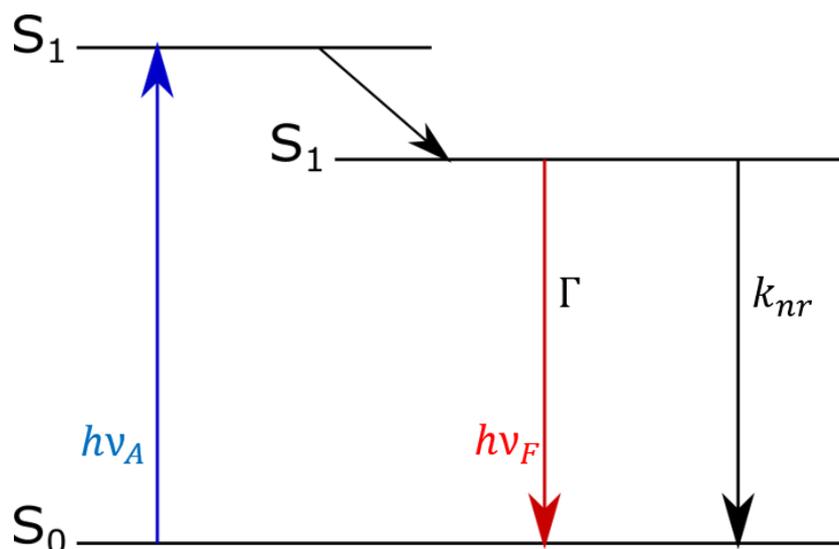


Figure I.3. Diagramme de Jablonski simplifié pour l'illustration des notions de rendement quantique et de durée de vie de fluorescence. Γ (ou k_r) représente le taux d'émission du fluorophore, et k_{nr} son taux de désexcitation non radiative. $h\nu_A$ correspond à l'absorption des photons, et $h\nu_F$ à la fluorescence émise.

Le rendement quantique Φ s'exprime alors selon l'équation I.1 :

$$\Phi = \frac{\Gamma}{\Gamma + k_{nr}} \quad (I.1)$$

Et la durée de vie τ selon l'équation I.2 :

$$\tau = \frac{1}{\Gamma + k_{nr}} \quad (I.2)$$

Avec Γ le taux d'émission du fluorophore et k_{nr} son taux de désexcitation non radiative.

Le coefficient d'extinction ε , exprimé en $M^{-1}cm^{-1}$, représente la probabilité d'absorption de photons d'une molécule. Il se détermine en spectroscopie pour une solution dans une cuve par l'utilisation de la loi de Beer-Lambert reliant l'absorbance A à l'intensité lumineuse I selon l'équation I.3 :

$$A = \log \frac{I_0}{I_t} = \varepsilon(\lambda).c.l \quad (I.3)$$

Avec A l'absorbance, I_0 l'intensité initiale, I_t l'intensité transmise, $\varepsilon(\lambda)$ le coefficient d'extinction molaire à une longueur d'onde donnée en $M^{-1}cm^{-1}$, c la concentration de la solution en M (mol L^{-1}) et l la longueur de la cuve en cm.

b. Techniques d'observation de la fluorescence

De nombreuses techniques spécifiques (lecteurs de microplaques, cytomètres de flux) dérivent des deux principales méthodes permettant d'observer et de quantifier la fluorescence : il s'agit de la spectroscopie et de la microscopie de fluorescence. Alors que la spectroscopie est particulièrement performante pour analyser les caractéristiques photophysiques uniques des fluorophores en solution (absorption, émission, durée de vie), la microscopie apparaît comme un outil de choix pour l'observation d'une grande variété d'échantillons bidimensionnels (surfaces) ou tridimensionnels (cellules, tissus). La microscopie optique de fluorescence conventionnelle permet l'observation de structures et de processus dynamiques au sein d'échantillons, notamment biologiques. Les changements dans l'intensité ou la localisation des fluorophores considérés vont permettre l'analyse et la quantification des phénomènes observés. De nombreuses techniques se sont développées ces dernières années pour s'affranchir des contraintes intrinsèques liées à certains échantillons, avec des montages permettant une meilleure résolution et une plus grande sensibilité. Ainsi, on trouve parmi les nombreuses techniques actuelles la microscopie confocale, qui permet d'améliorer la résolution spatiale grâce à l'utilisation d'un trou de filtrage (pin hole), la microscopie par réflexion totale interne de fluorescence (TIRF pour Total Internal Reflection Fluorescence) qui repose sur l'utilisation d'une onde évanescente pour observer les phénomènes au voisinage de la surface, ou encore la microscopie de molécules uniques avec l'utilisation d'un détecteur ultra-sensible (caméra EMCCD par exemple) [14].

Dans ce travail de thèse, un microscope de fluorescence inversé est utilisé pour l'imagerie conventionnelle (steady state) et résolue en temps, ainsi qu'un second adapté à l'observation de molécules uniques. Ces montages permettent l'analyse du phénomène de transfert d'énergie par résonance de type Förster (FRET pour Förster Resonance Energy Transfer) sur des surfaces fonctionnalisées.

I.1.3 Théorie et paramètres d'observation du FRET

a. Théorie du FRET

Le phénomène de FRET (Förster Resonance Energy Transfer) est un processus de transfert d'énergie non radiatif d'un fluorophore donneur vers un accepteur situé à une distance de l'ordre de 1 à 20 nm.

Quand Theodor Förster commence à travailler sur le transfert d'énergie dans les années 1940, le phénomène de sensibilisation de la fluorescence est bien établi [15] et des modèles de transfert d'énergie par résonance ont été proposés. Ainsi, Kallmann et London ont avancé un modèle présentant une approche correcte de la dépendance en distance de l'efficacité du transfert, mais avec des spectres d'une étroitesse irréaliste [16]. J. Perrin et F. Perrin ont développé une théorie modélisant les fluorophores comme des dipôles électriques oscillants à une fréquence unique avec un taux de transfert proportionnel à l'inverse de la distance au cube, et donc une distance à laquelle se ferait le transfert d'énergie bien trop grande [15]. Förster incorpore à ces travaux des paramètres obtenus expérimentalement tels que les spectres, rendements quantiques et durées de vie [17], [18], et formalise ainsi sa théorie du transfert d'énergie par résonance.

Le FRET est un processus de transfert d'énergie entre une molécule ou une particule luminescente, appelée Donneur (D), et une molécule ou une particule absorbant la lumière, appelée Accepteur (A). Le phénomène de FRET se produit à la résonance, c'est-à-dire que l'énergie de luminescence (usuellement exprimée en longueur d'onde, parfois en nombre d'onde) du donneur D est égale à l'énergie d'absorption de l'accepteur A. La Figure I.4 présente un diagramme de Jablonski simplifié schématisant le phénomène de FRET entre deux molécules (paire de FRET).

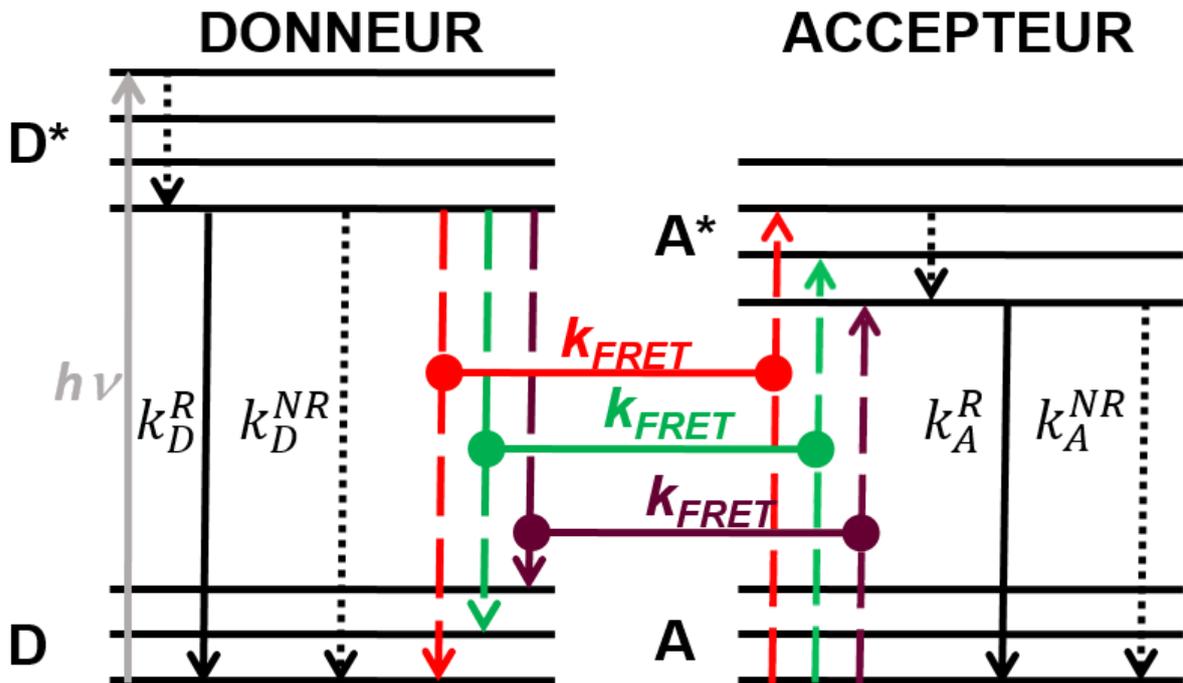


Figure I.4. Diagramme de Jablonski simplifié illustrant le principe du phénomène de FRET entre un donneur et un accepteur. L'excitation $h\nu$ du donneur de l'état électronique fondamental D vers un état excité D* est suivie par des relaxations internes (en pointillés) vers le sous-niveau fondamental d'un état excité, puis par des désexcitations radiatives k^R et non-radiatives k^{NR} ou par FRET k_{FRET} . Pour que le processus de FRET ait lieu de D* vers A*, la différence entre les niveaux d'énergie respectifs doit être égale, c'est la condition de résonance ($E(D^*) - E(D) = E(A^*) - E(A)$); transitions couplées représentées par les lignes horizontales en couleurs). Après le transfert par FRET, l'accepteur dans un état excité A* se désexcite vers son état fondamental par des transitions radiatives et non radiatives. Image adaptée de la référence [19].

Une première condition pour l'obtention du phénomène de FRET porte sur le choix de la paire de FRET. L'accepteur A doit en effet pouvoir absorber de la lumière dans la même gamme spectrale que celle de l'émission du donneur D : on parle de recouvrement spectral. La Figure I.5 illustre ce recouvrement spectral entre les spectres d'émission du donneur et d'absorption de l'accepteur.

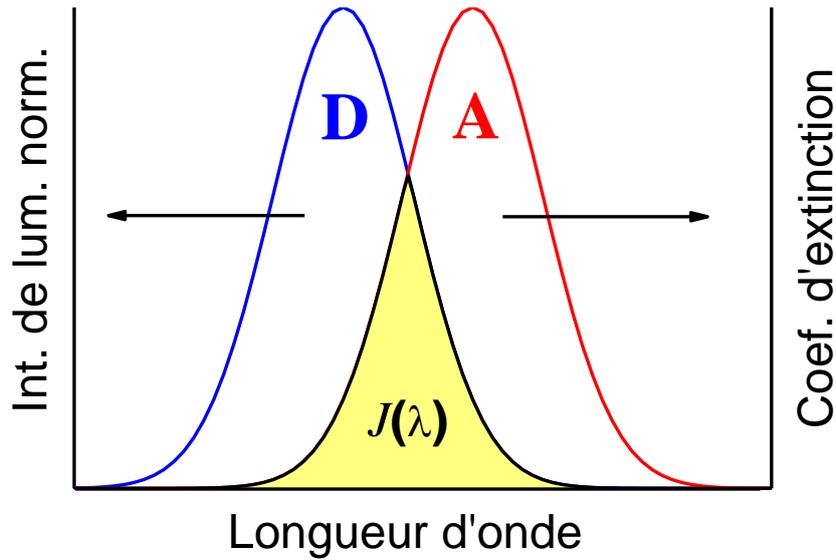


Figure I.5. Recouvrement spectral $J(\lambda)$ (zone jaune) du spectre d'émission normalisé du donneur D et du spectre du coefficient d'extinction de l'accepteur A ε_A . Image adaptée de la référence [19].

On définit ainsi l'intégrale de recouvrement spectral $J(\lambda)$ en $M^{-1}cm^{-1}nm^4$ selon l'équation I.4 :

$$J(\lambda) = \int \bar{I}_D(\lambda)\varepsilon_A(\lambda)\lambda^4 d\lambda \quad (I.4)$$

Avec λ la longueur d'onde en nm, $\varepsilon_A(\lambda)$ le coefficient d'extinction de l'accepteur A en $M^{-1}cm^{-1}$ et $\bar{I}_D(\lambda)$ le spectre d'émission du donneur D normalisé à l'unité ($\int \bar{I}_D(\lambda)d\lambda = 1$).

L'établissement de cette notion de recouvrement spectral permet de définir le taux de FRET k_{FRET} représenté en Figure I.4 selon l'équation I.5 :

$$k_{FRET} = \frac{9(\ln 10)\kappa^2\Phi_D}{128\pi^5 N_A n^4 \tau_D r^6} J \quad (I.5)$$

Avec κ le facteur d'orientation des dipôles de FRET, Φ_D le rendement quantique de luminescence du donneur D, N_A le nombre d'Avogadro, n l'indice de réfraction du milieu, τ_D la durée de vie de luminescence du donneur D en l'absence de FRET, r la distance entre D et A, et J l'intégrale de recouvrement spectral.

Une deuxième condition pour l'obtention du phénomène de FRET concerne la distance entre le donneur et l'accepteur. Les deux entités de la paire de FRET doivent en effet être relativement proches, à une distance de l'ordre de 1 à 20 nm. Dans ces conditions, on considère un état d'équilibre des taux de désexcitation ($k_{FRET} = k_D^R +$

$k_D^{NR} = \tau_D^{-1}$) pour lequel l'efficacité de FRET E_{FRET} (ou η_{FRET}) est de 50%. Cet état d'équilibre a lieu pour une distance R_0 définie comme étant le rayon de Förster (ou distance de Förster). La Figure I.6 illustre cette notion d'efficacité de FRET dépendante de la distance entre le donneur et l'accepteur.

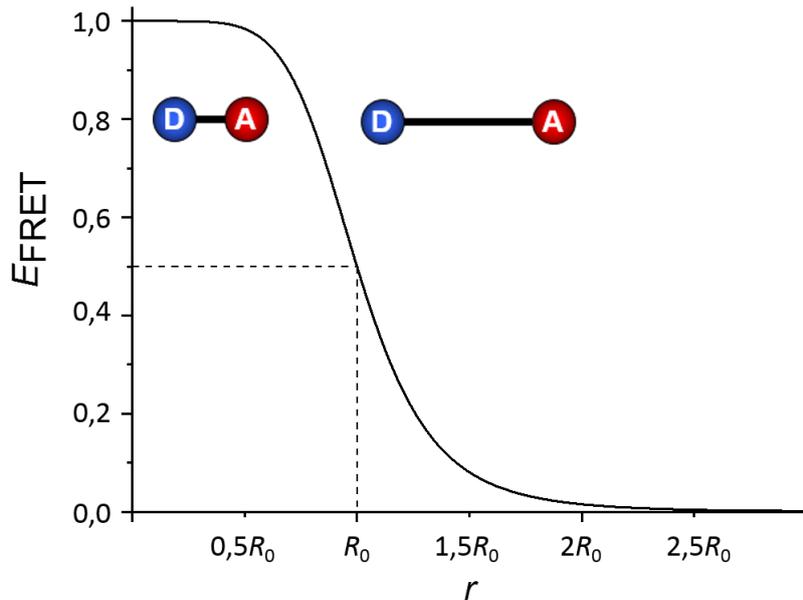


Figure I.6. Efficacité de FRET E_{FRET} en fonction de la distance donneur – accepteur r .

On définit le rayon de Förster R_0 et l'efficacité de FRET E_{FRET} par les équations I.6 et I.7 suivantes :

$$R_0 = \left(\frac{9(\ln 10)\kappa^2\Phi_D}{128\pi^5 N_A n^4} J \right)^{1/6} \quad (I.6)$$

$$E_{\text{FRET}} = \frac{k_{\text{FRET}}}{k_{\text{FRET}} + \tau_D^{-1}} = \frac{1}{1 + (r/R_0)^6} \quad (I.7)$$

Les équations caractéristiques du phénomène de FRET présentées ci-dessus font appel au facteur d'orientation des dipôles de FRET, dont le calcul prend en compte les angles entre les moments dipolaires de transition de D et A ($\vec{\mu}_D$ et $\vec{\mu}_A$) et le vecteur reliant D et A (\vec{r}). La Figure I.7 explicite ces vecteurs et les angles associés.

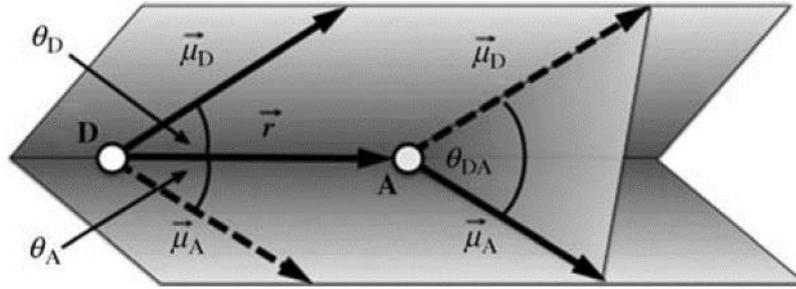


Figure I.7. Illustration des vecteurs et des angles liant le donneur D et l'accepteur A permettant l'établissement du facteur d'orientation κ . Image extraite de la référence [19].

On définit alors le facteur d'orientation κ selon l'équation I.8 :

$$\kappa = \hat{\mu}_D \cdot \hat{\mu}_A - 3(\hat{\mu}_D \cdot \hat{r})(\hat{\mu}_A \cdot \hat{r}) = \cos\theta_{DA} - 3\cos\theta_D \cdot \cos\theta_A \quad (I.8)$$

Avec $\hat{\mu}_D$, $\hat{\mu}_A$ et \hat{r} les vecteurs unitaires respectifs de $\vec{\mu}_D$, $\vec{\mu}_A$ et \vec{r} et θ_{DA} , θ_D , et θ_A , les angles tels que définis dans la Figure I.7.

Les valeurs de κ^2 peuvent varier de 0 à 4, mais quand les orientations des dipôles donneur et accepteur sont aléatoires sur la durée de vie de l'état excité, c'est-à-dire quand toutes les molécules D et A peuvent prendre n'importe quelle orientation pendant le temps du processus de FRET ($\frac{1}{k_{\text{FRET}}}$) et que le taux moyen de rotation est bien supérieur au taux moyen de FRET ($k_{\text{rot}} \gg k_{\text{FRET}}$), alors le système est dans un régime dynamique moyen et la valeur de κ^2 est 2/3.

b. Paramètres d'observation du FRET

L'étude de l'extinction (quenching) du donneur associée à la sensibilisation (sensitization) de l'accepteur permet la détermination du phénomène de FRET pour un système. Pour ce faire, les paramètres de FRET que sont l'efficacité de FRET E_{FRET} et la distance donneur – accepteur r sont caractérisés. Les équations I.9 et I.10 proposent une écriture tenant compte de grandeurs déterminées expérimentalement, par spectroscopie ou microscopie. On considère donc le rendement quantique de luminescence Φ , la durée de vie τ et l'intensité I du donneur D en l'absence (indice D) et en présence de l'accepteur A (indice DA).

$$E_{\text{FRET}} = \frac{k_{\text{FRET}}}{k_{\text{FRET}} + \tau_D^{-1}} = \frac{1}{1 + (r/R_0)^6} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} = 1 - \frac{\Phi_{\text{DA}}}{\Phi_D} = 1 - \frac{\tau_{\text{DA}}}{\tau_D} = 1 - \frac{I_{\text{DA}}}{I_D} \quad (1.9)$$

$$r = R_0 \left(\frac{\Phi_{\text{DA}}}{\Phi_D - \Phi_{\text{DA}}} \right)^{1/6} = R_0 \left(\frac{\tau_{\text{DA}}}{\tau_D - \tau_{\text{DA}}} \right)^{1/6} = R_0 \left(\frac{I_{\text{DA}}}{I_D - I_{\text{DA}}} \right)^{1/6} \quad (1.10)$$

Comme la plupart des applications de biodétection par FRET visent à quantifier les concentrations en paires de FRET, il est intéressant de considérer le paramètre de rapport de FRET $Rapport_{\text{FRET}}$. En effet, des augmentations ou diminutions des quantités (concentrations) de paires de FRET impliquent des variations dans l'extinction (quenching) du donneur et l'exaltation (sensitization) de l'accepteur. Le rapport de FRET permet d'évaluer ce phénomène en considérant les intensités de photoluminescence de l'accepteur A et du donneur D excités à la longueur d'onde d'excitation du donneur D. Le rapport de FRET $Rapport_{\text{FRET}}$ est défini selon l'équation 1.11.

$$Rapport_{\text{FRET}} = \frac{I_{\text{AD}}}{I_{\text{DA}}} \quad (1.11)$$

où I_{AD} (paire de FRET dans le Canal – FRET) est l'intensité de l'accepteur excité à la longueur d'onde d'excitation du donneur.

Dans le cadre de ce travail de thèse, les intensités lumineuses issues de surfaces fonctionnalisées observées en microscopie sont exploitées dans l'établissement des paramètres de FRET.

1.2 Méthodes de capture de biomarqueurs

1.2.1 Systèmes de détection par FRET

Quelques décennies après la formalisation de sa théorie, un regain d'intérêt est apparu pour la technique de FRET [20]. En effet, le développement de nouvelles sondes fluorescentes (protéines fluorescentes, colorants organiques, lanthanides) combiné à celui de nouvelles méthodes instrumentales en optique (caméras ultra-sensibles, super-résolution) a permis de positionner le FRET comme technique de

choix aussi bien dans la détection de molécules d'intérêt biologique que dans l'analyse de processus (modifications structurales, interactions intermoléculaires) dans les systèmes biologiques.

On peut distinguer différentes catégories d'applications pour la technique de FRET, comme la détection et le diagnostic *in vitro* dédié à la médecine personnalisée [21], l'étude des changements de conformation dans les structures biologiques [22], ou encore l'étude des processus cellulaires [23]. Ainsi, on peut citer Mattera *et al.*, qui ont réussi à détecter un taux de PSA (Prostate Specific Antigen) en-dessous du seuil clinique grâce au phénomène de FRET entre des anticorps marqués au terbium et des quantum dots conjugués à des morceaux d'anticorps fragmentés (Fab) [24] (Figure I.8.a.). De leur côté, Schuler et Eaton ont proposé une étude du mécanisme de repliement des protéines par FRET de molécules uniques [25] (Figure I.8.b.). Boeneman *et al.* ont eux pu démontrer le phénomène de FRET intracellulaire entre des protéines fluorescentes exprimées dans le cytoplasme (mCherry) et des quantum dots micro-injectés dans les cellules [26] (Figure I.8.c.).

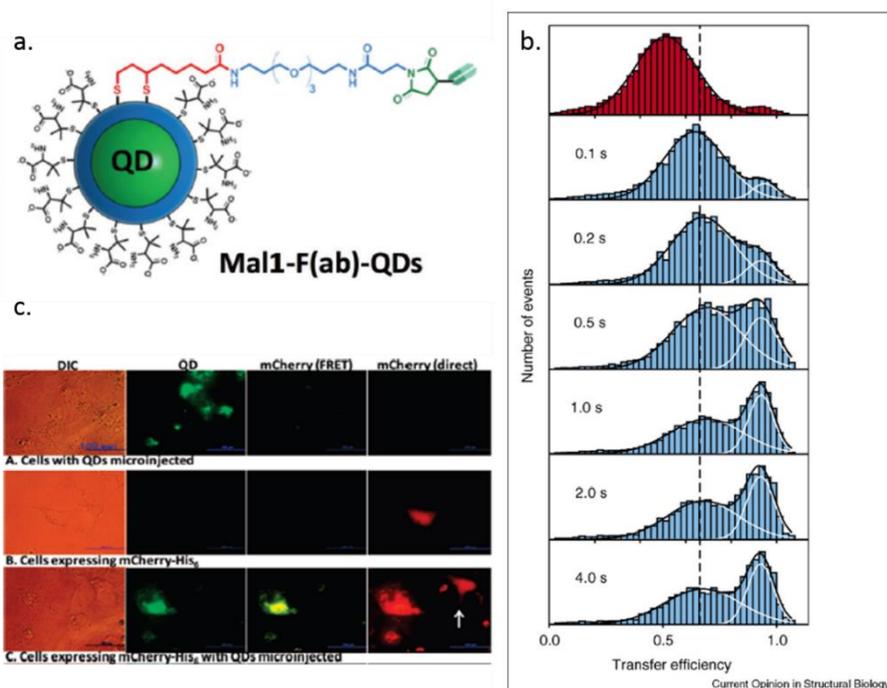


Figure I.8. Exemples d'applications du phénomène de FRET. En a, exemple de conjugaison des Fab aux QD via des ligands acides lipoiques pour la détection de PSA (Mattera *et al.*) ; en b, histogrammes d'efficacité de transfert à différentes positions dans un canal microfluidique en fonction de la dilution d'un agent dénaturant pour l'étude du repliement de protéines (Schuler *et al.*) ; en c, FRET entre des protéines cytoplasmiques fluorescentes et des QDs microinjectés dans des cellules (Boeneman *et al.*).

Il est important de souligner que de nombreuses expériences de FRET se font par détection de molécules uniques. On parle alors de technique de smFRET pour Single Molecule FRET. Les techniques conventionnelles utilisées en biophysique donnent accès à des données moyennées, et ont permis d'acquérir les nombreuses informations qui ont donné la connaissance actuelle de la biologie. Cependant, ces techniques ne permettent pas d'explorer l'hétérogénéité statique – c'est-à-dire l'existence de différentes populations, ou l'hétérogénéité dynamique – c'est-à-dire la dynamique de molécules non synchronisées, d'un ensemble de molécules dans un système biologique. Ces observations vont pouvoir se faire grâce à l'utilisation de techniques de détection de molécules uniques [27]. Pour ce faire, on va chercher à augmenter le signal avec l'utilisation de fluorophores brillants et photostables et un montage optique disposant d'un objectif à grande ouverture numérique ON ($ON > 1,2$) et d'un détecteur ultrasensible (de photon unique), comme par exemple une caméra EMCCD ou une photodiode à avalanche (APD), qui vont amplifier les photons reçus. On va également chercher à minimiser le bruit de fond par réduction du volume d'observation, détection confocale, fluorescence par réflexion totale interne (TIRF), microfluidique, ou encore utilisation de nanostructures [28]. L'intérêt supplémentaire du FRET dans ces expériences de détection de molécules uniques réside dans la possibilité de mesurer les changements dans la distance entre le donneur et l'accepteur. En effet, la mesure des différents paramètres de FRET permet d'étudier des processus et mécanismes aussi variés que la transcription de l'ADN, le repliement des protéines, le comportement des moteurs protéiques, ou encore le phénomène de fusion des membranes protéiques [29], [30]. La Figure I.9 présente un schéma d'un montage d'observation de molécules uniques par FRET par microscopie TIRF.

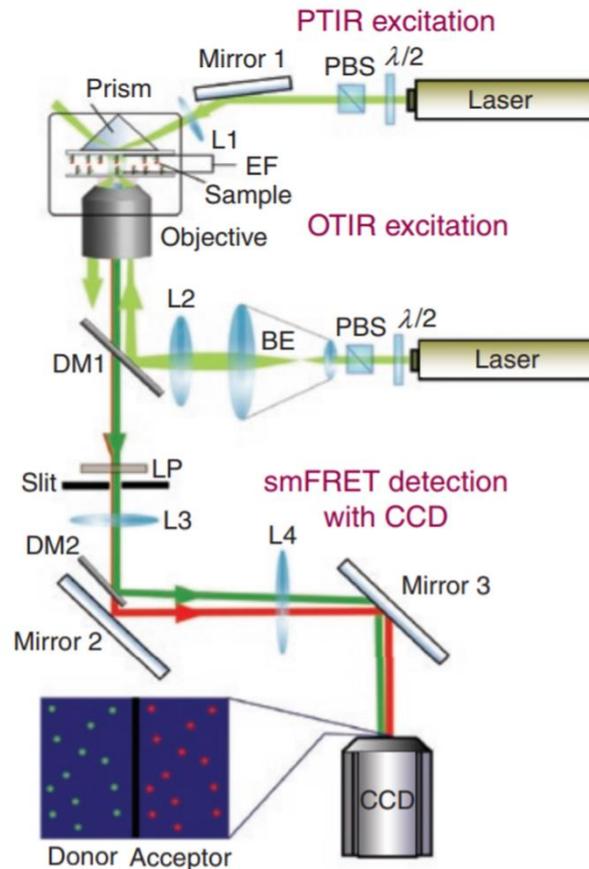


Figure I.9. Schéma du montage de smFRET par microscopie TIRF. Les deux types de TIRF, par prisme (PTIR) et par objectif (OTIR) sont représentés. Image extraite de la référence [30].

I.2.2 Détection sur laboratoire sur puce en conditions microfluidiques

Dans le cadre de la détection de molécules d'intérêt biologique et de l'étude de mécanismes et de processus biophysiques par FRET, le choix du système se porte souvent sur des dosages en phase liquide et de type homogène, c'est-à-dire ne nécessitant pas d'étape de séparation des marqueurs non liés. Le dosage homogène tire en effet sa popularité de la simplicité de sa réalisation (mélange des réactifs suivi d'un temps d'incubation puis observation) et de temps de réaction courts [31]. Ainsi, Wegner *et al.* étudient le système de FRET de complexes de terbium vers des quantum dots dans un immunodosage homogène résolu en temps pour la détection de PSA (Prostate Specific Antigen) pour une concentration de 1,6 ng/mL, soit en-dessous du seuil clinique [32] (Figure I.10.a). On peut également citer Wu *et al.*, qui montrent que l'utilisation de protéines d'affinité (ADAPTs) assemblées avec des

quantum dots permet la détection du récepteur de facteur épidermique de croissance humain (HER2) par FRET entre des anticorps marqués au terbium et les protéines d'affinité liées aux QDs [33] (Figure I.10.b).

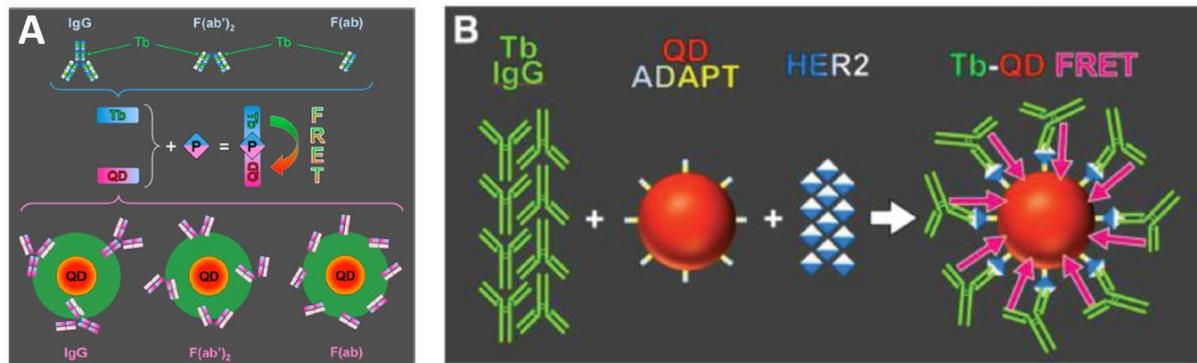


Figure I.10. Exemples d'applications de dosages homogènes par FRET. En A, schéma de la détection de PSA par FRET entre des anticorps ou fragments d'anticorps marqués avec du terbium pour le donneur et des QDs pour l'accepteur (Wegner et al.) ; en B, schéma de la détection du récepteur HER2 par FRET entre des anticorps (IgG) marqués avec du terbium pour le donneur et des protéines d'affinité liées à des QDs comme accepteur (Wu et al.).

Par opposition aux dosages de type homogène ne nécessitant pas d'étape de séparation des marqueurs non liés, on définit les dosages de type hétérogène. Ceux-ci, bien que nécessitant une ou plusieurs étapes supplémentaires de rinçage, présentent un certain nombre d'avantages. En effet, l'étape de rinçage, qui certes implique un temps d'expérience plus long, permet également l'augmentation de la sensibilité par élimination des molécules non spécifiques qui pourraient prendre la place des entités à détecter et donc venir fausser le signal analysé. Le dosage de type hétérogène permet également de limiter la présence de molécules présentes en excès, et potentiellement d'ouvrir de nouvelles voies de transfert d'énergie. En outre, le format de dosage hétérogène facilite l'utilisation de méthodes visant à augmenter la sensibilité, comme les techniques de TIRF ou d'exaltation de la fluorescence par effet plasmonique [34]. Parmi les dosages de type hétérogène, qui se font en phase solide, on peut citer l'article de Kim *et al.*, qui propose un système d'analyse de la glycosylation des protéines sur puce par transfert d'énergie entre des QDs fonctionnalisés comme donneurs et des nanoparticules d'or comme accepteurs [35] (Figure I.11). On peut également s'intéresser à l'étude de Saraheimo *et al.*, dans laquelle le FRET résolu en temps est utilisé pour la détection d'anticorps, pas seulement en phase liquide, mais également en phase solide en une et deux étapes

de réaction [36] (Figure I.12). Les auteurs tendent à privilégier le dosage homogène pour une détection rapide, robuste et flexible en termes de temps d'incubation et de température de réaction. Cependant, cette étude compare un dosage homogène en phase liquide avec un dosage hétérogène en phase solide réalisé sur une microplaque pour un volume d'au moins 40 μL . Il existe peu d'analyses comparatives de deux méthodologies, et cette étude présentée par Saraheimo *et al.* ne permettrait de conclure sur l'avantage du dosage homogène par rapport au dosage hétérogène qu'avec une comparaison supplémentaire avec une détection dans un système miniaturisé en conditions microfluidiques.

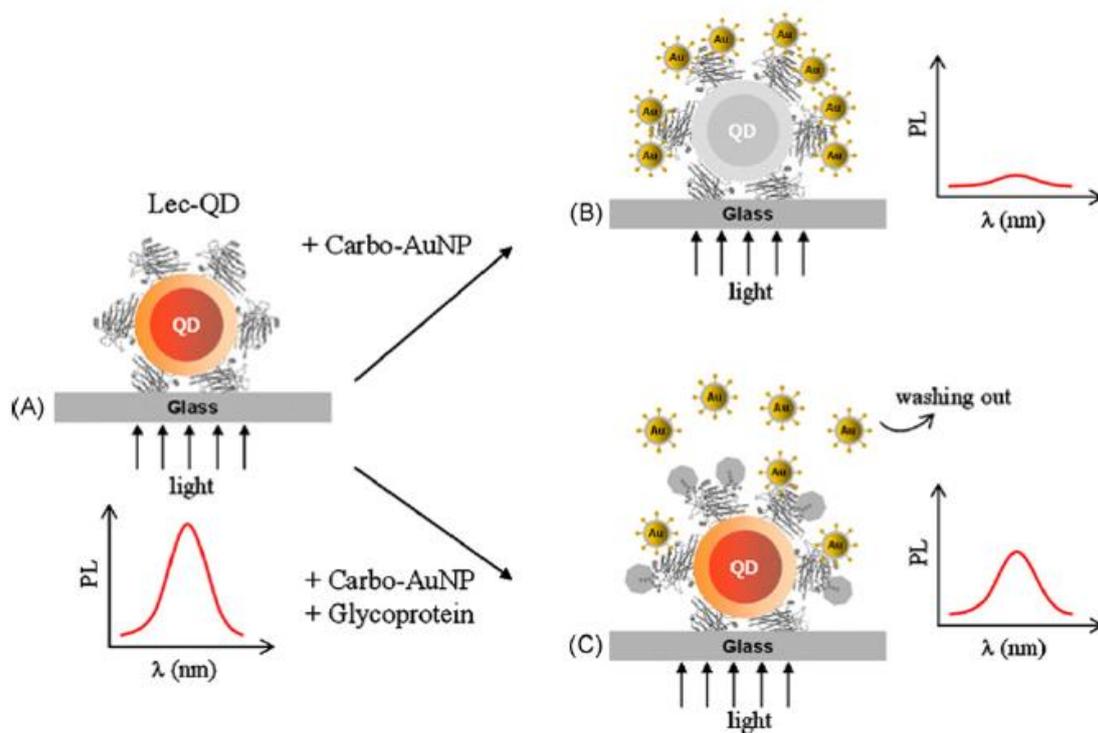


Figure I.11. Schéma du système d'analyse de la glycosylation des protéines sur puce par transfert d'énergie entre des QDs fonctionnalisés comme donneurs et des nanoparticules d'or comme accepteurs, proposé par Kim *et al.* (Kim et al. 2009).

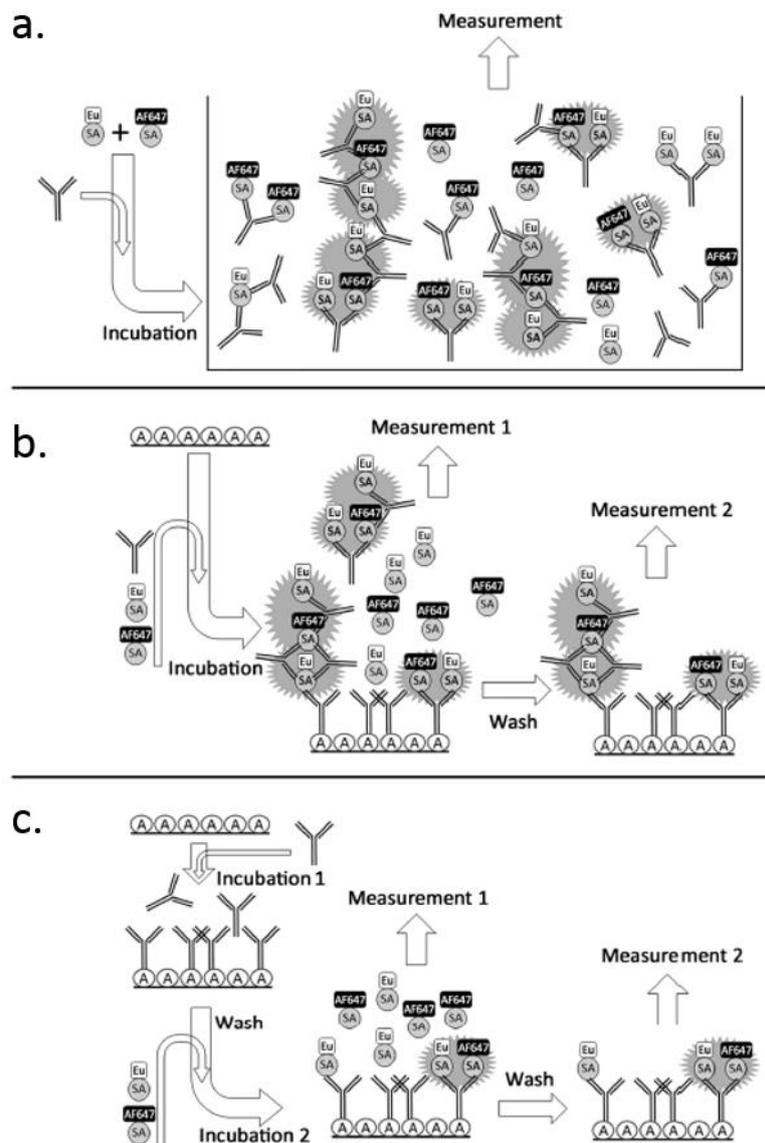


Figure I.12. Schéma du principe de détection d'anticorps par différents types de dosages, proposé par Saraheimo *et al.* En a, dosage homogène, en b, dosage hétérogène en une étape et en c, dosage hétérogène en deux étapes.

La miniaturisation des systèmes de détection par dosage hétérogène en phase solide présente de nombreux avantages par rapport aux dosages traditionnels, comme par exemple ceux de type ELISA. En effet, ces dosages doivent permettre une réduction des coûts, un impact moindre sur l'environnement, une simplification d'utilisation par l'intégration de toutes les étapes du procédé de dosage, une mobilité autorisant une utilisation sur le terrain, une vitesse d'exécution élevée, et une capacité de détection simultanée de différentes substances [37]. Bien sûr, ces dispositifs miniaturisés présentent également des inconvénients par rapport aux systèmes

conventionnels, comme une difficulté d'industrialisation ou la nécessité parfois d'ajouter des équipements externes augmentant la taille globale du dispositif de détection ainsi que son coût. Par conséquent, l'optimisation de la détection d'une biomolécule donnée doit se faire en prenant en compte la possibilité d'une analyse dans un biocapteur miniaturisé, appelé laboratoire sur puce (lab-on-chip).

Un laboratoire sur puce est un dispositif miniaturisé intégrant sur une puce une ou plusieurs analyses, avec pour exemples d'application le séquençage d'ADN ou la détection d'entités biochimiques. La technologie des laboratoires sur puce repose sur les techniques de microfabrication et généralement sur le principe de la microfluidique. La microfabrication est née dans les années 1950 de la nécessité de miniaturisation des systèmes de calcul à envoyer dans l'espace. Ces avancées ont permis l'apparition, dans les années 1960, de microsystèmes électromécaniques (MEMS pour *Microelectromechanical systems*). Le premier laboratoire sur puce est un analyseur d'air par chromatographie en phase gazeuse élaboré en 1979 par Terry *et al.* [38]. Le développement de la microfluidique et l'adaptation des procédés de microfabrication à la fin des années 1980 marque le réel commencement de la recherche sur les laboratoires sur puce.

La microfluidique est à la fois la science et la technologie des systèmes qui traitent des volumes de fluides très petits (inférieur au microlitre et jusqu'à l'attolitre) dans des canaux de dimensions de l'ordre de la dizaine à la centaine de micromètres de large [39]. La microfluidique exploite les caractéristiques de faibles tailles et volumes, ainsi que les flux laminaires et les phénomènes électrocinétiques – permettant le transport des fluides et la séparation des molécules, et trouve aujourd'hui de nombreuses applications, comme par exemple les micropompes, qui permettent l'injection d'insuline chez les sujets diabétiques, les tests de grossesse, ou encore les puces pour le génotypage, qui permettent entre autres l'identification de virus à partir de séquences caractéristiques de gènes.

La mise en œuvre du phénomène de FRET dans un dispositif miniaturisé en conditions microfluidiques permet la réalisation de systèmes de détection de biomolécules et d'observation de processus biophysiques. Ainsi, Crivat *et al.* font croître des multicouches de polyelectrolytes pour faciliter des dosages enzymatiques par FRET pour des échantillons de faible volume [40] (Figure I.13.a.), Benz *et al.*

réalisent une analyse de durée de vie de fluorescence pour l'étude des interactions inter-protéines par FRET dans des gouttelettes microfluidiques [41] (Figure I.13.b.), et Chen *et al.* développent une plateforme microfluidique permettant l'initiation et l'observation simultanée de centaines de réactions de l'activité enzymatique de protéases dans de faibles volumes, et appliquent leur méthode à l'étude de l'endométrieose [42].

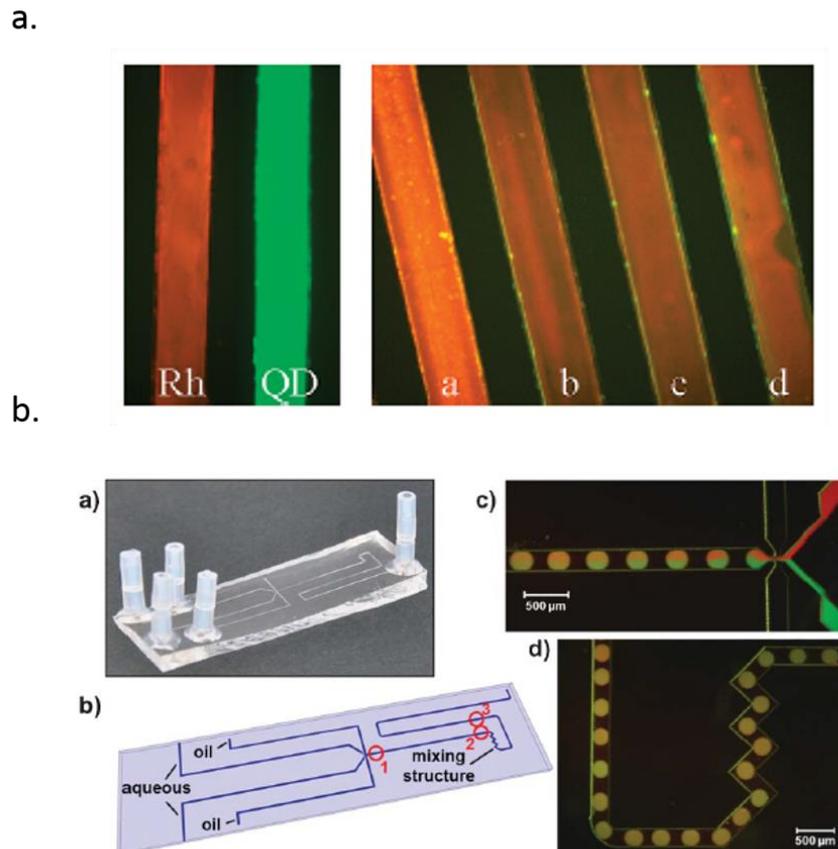


Figure I.13. Exemples d'application du FRET dans un dispositif miniaturisé en conditions microfluidiques. En a, images de fluorescence dans des canaux microfluidiques contenant des films multicouches de polyelectrolytes, présentant la diminution de l'intensité de fluorescence caractéristique du FRET avec l'augmentation du nombre de couches de polyelectrolytes séparant les QDs donneurs des rhodamines (Rh) accepteurs. Images extraites de la référence [40]. En b, dispositif microfluidique permettant le mélange de gouttelettes contenant différents colorants pour l'observation des interactions inter-protéines ; a) = puce microfluidique, b) = représentation schématique indiquant les positions de détection en rouge, c) = image de la génération de gouttelettes contenant de la fluorescéine et de la sulforhodamine B, d) = image du mélange des gouttelettes. Images extraites de la référence [41].

Certains de ces systèmes de détection reposant sur le FRET en conditions microfluidiques se font en phase solide, et nécessitent donc un greffage à la surface

du dispositif miniaturisé. C'est le cas du travail de l'équipe d'Ulrich Krull, avec les publications de Chen *et al.* en 2010 [43], Tavares *et al.* en 2012 [44] et Noor *et al.* [45] en 2013. Chen *et al.* développent un dosage d'acides nucléiques en phase solide dans un dispositif microfluidique utilisant des QDs immobilisés. Dans ce travail, les QDs sont conjugués à deux séquences différentes d'oligonucléotides, et leur hybridation à la séquence complémentaire est étudiée par FRET. Cette dernière est greffée de façon covalente à la surface du canal microfluidique, qui est une surface de verre traitée pour présenter des groupements époxy, et modifiée avec des oligonucléotides qui s'accrochent à la surface via des groupements amines terminaux (Figure I.14.a.). Tavares *et al.* proposent un dosage par FRET de l'hybridation des acides nucléiques dans un canal de verre/PDMS en conditions microfluidiques. Des QDs de CdSe/ZnS conjugués à de la streptavidine sont immobilisés sur une surface de verre modifiée avec de la biotine, et sont conjugués à des sondes biotinylées d'oligonucléotides. L'hybridation avec une cible marquée au colorant Cy3 à l'extrémité distale 5' ou proximale 3' fournit la distance nécessaire au transfert d'énergie et à la détection par FRET (Figure I.14.b.). Ce système est ensuite exploité par Noor *et al.* pour le dosage d'hybridation par deux couleurs, établissant ainsi la preuve de principe de la détection multiplexée par FRET dans un dispositif microfluidique (Figure I.14.c.).

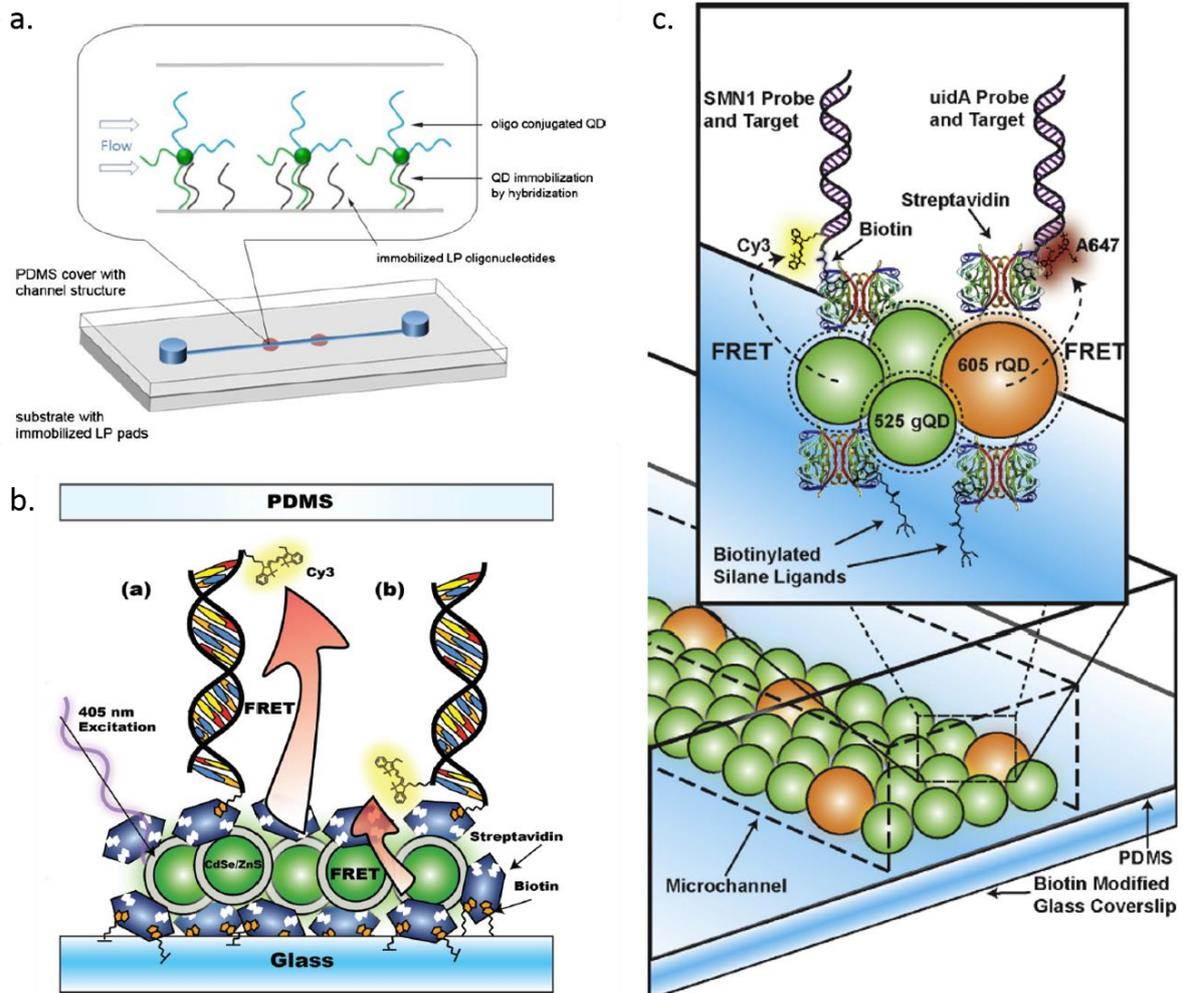


Figure I.14. Exemples d'application du FRET dans un dispositif miniaturisé en conditions microfluidiques pour la réalisation d'un dosage en phase solide. En a, schéma du système permettant le dosage d'acides nucléiques en phase solide dans un dispositif microfluidique utilisant des QDs immobilisés. Schéma extrait de la référence [43]. En b, schéma du dosage par FRET de l'hybridation des acides nucléiques dans un canal de verre/PDMS en conditions microfluidiques. Schéma extrait de la référence [44]. En c, schéma du dosage d'hybridation par deux couleurs établissant la preuve de principe de la détection multiplexée par FRET dans un dispositif microfluidique. Schéma extrait de la référence [45].

Les travaux réalisés dans l'équipe d'Ulrich Krull reposent sur une première fonctionnalisation des surfaces de verre par des silanes. La deuxième fonctionnalisation utilise une interaction biologique très forte entre la biotine et la streptavidine. Les surfaces de verre sont d'abord modifiées chimiquement pour présenter des groupements silanols SiOH, sur lesquels des silanes APTMS présentant une terminaison amine NH₂ sont greffés. Des biotines sont ajoutées aux surfaces ainsi préparées, à l'aide d'une chimie carbodiimide permettant la formation d'une liaison amide.

Différents types de fonctionnalisation existent pour le greffage de molécules sur des surfaces, en fonction de la nature des substrats considérés et de la terminaison chimique voulue. Un aperçu de ces techniques est présenté dans la sous-partie 1.2.3.

I.2.3 Fonctionnalisation de surfaces

Cette sous-partie vise à présenter les principales techniques permettant la fonctionnalisation de biocapteurs reposant sur l'exaltation plasmonique d'une part (la plasmonique est une branche de la nanophotonique qui traite des interactions sublongueur d'onde d'une onde électromagnétique avec les électrons de conduction d'une interface métal / diélectrique ; les considérations relatives aux biocapteurs de type plasmonique seront explicitées dans la section 1.3.1), et de dispositifs microfluidiques d'autre part.

a. Biocapteurs plasmoniques

Les biocapteurs reposant sur la plasmonique nécessitent souvent la fonctionnalisation de leur surface avec des éléments de reconnaissance biomoléculaire, afin de pouvoir réaliser la capture de molécules cibles. Le choix de l'immobilisation de ces récepteurs à la surface de la structure plasmonique est d'une importance capitale pour le bon fonctionnement du biocapteur, et définit ses performances en termes de sensibilité, spécificité et limite de détection [46].

Adsorption passive

La méthode de fonctionnalisation la plus simple pour l'obtention de récepteurs à la surface de biocapteurs plasmoniques métalliques est l'adsorption passive. Cependant, cette méthode par adsorption ne permet pas de contrôle sur le nombre de récepteurs et leur orientation, et peut entraîner une forte adsorption non spécifique sur la surface. En effet, dans le cas de l'analyse de milieux biologiques complexes (sérum, salive, urine), la possibilité d'adsorption non spécifique et de détection d'une large variété de molécules peut empêcher la détection de la molécule cible [47]. En outre,

le champ plasmonique décroît rapidement en s'éloignant de la surface de la structure, ce qui rend très délicate la détection de molécules en solution à de très faibles concentrations. Il est donc souvent plus judicieux de fonctionnaliser la surface de façon spécifique afin de garantir le contrôle du greffage.

Formation de SAMs

La procédure la plus commune pour fonctionnaliser des substrats métalliques est la formation de monocouches auto-assemblées (SAMs pour Self-assembled monolayers) de molécules disposant du groupement chimique fonctionnel nécessaire à la réalisation du biocapteur. Les SAMs constituent des couches de liaison, permettant une surface stable diminuant l'adsorption non spécifique et introduisant des groupements réactifs pour l'immobilisation spécifique et contrôlée de récepteurs. Les SAMs sont compatibles avec une fonctionnalisation globale du substrat, ainsi qu'avec une fonctionnalisation sélective, permettant d'exploiter la géométrie spécifique de nanostructures pour s'intéresser à l'exaltation plasmonique importante ayant lieu au niveau des parties les plus réactives (hot spots). Il est important de noter que la formation d'une bonne SAM dépend à la fois de la technique de fonctionnalisation, mais également de la méthode de préparation du substrat (influence sur la rugosité de la surface du métal).

Dans leur article de revue de 2005, Love *et al.* se focalisent sur la préparation, la formation, la structure et les applications de SAMs formées à partir d'alkanethiols et de leurs dérivés sur l'or, l'argent, le cuivre, le palladium, le platine, le mercure et des alliages de ces métaux [48]. Les alkanethiols sont des composés de formule chimique $(HS(CH_2)_nX)$ avec n le nombre de groupements méthylène CH_2 et X le groupement terminal de la chaîne alkyle ($-CH_3$, $-OH$, $-COOH$). La Figure I.15 présente le schéma d'une SAM d'alkanethiolates supportée par une surface d'or.

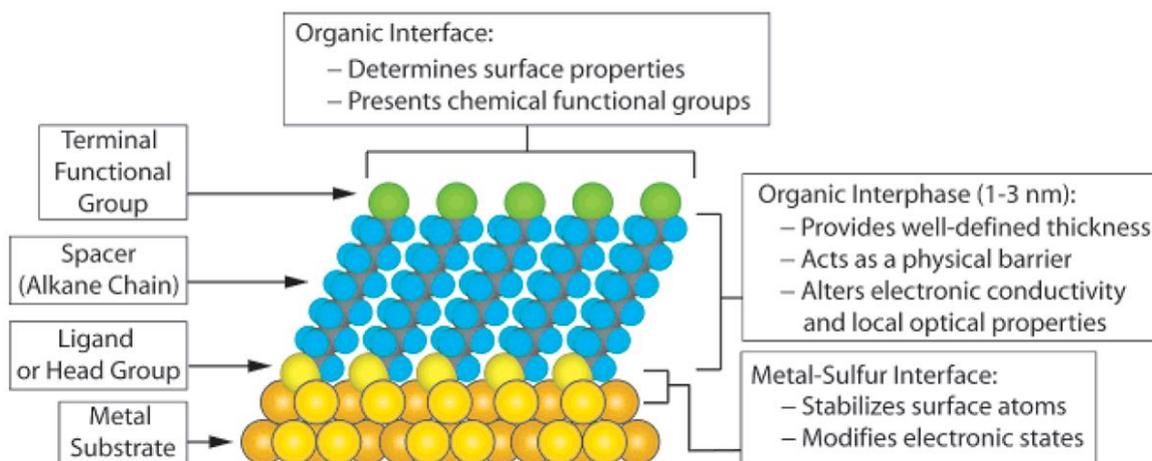


Figure I.15. Schéma d'une SAM d'alkanethiolates supportée par une surface d'or. Schéma extrait de la référence [48].

Outre les SAMs constituées d'alkanethiolates, on trouve les monocouches de dérivés organiques du silicium sur des surfaces présentant des groupements hydroxyles [49]. Ces SAMs d'alkylchlorosilanes, alkylalkoxysilanes et alkylaminosilanes sont créées par la liaison de groupements siloxanes R_2SiO aux groupements silanols $SiOH$ de la surface par des liaisons $Si-O-Si$ [50]. Cette fonctionnalisation est adaptée entre autres aux surfaces de silice SiO_2 , d'alumine Al_2O_3 , de verre, de séléniure de zinc $ZnSe$ ou encore d'or Au .

On constate que certains métaux utilisés pour la réalisation de biocapteurs plasmoniques, comme l'argent Ag ou l'aluminium Al n'apparaissent pas comme des surfaces sur lesquelles des SAMs de silanes pourraient être greffées directement. Une solution consiste à déposer sur le métal une couche d'un matériau pouvant présenter, suite à une activation, des groupements hydroxyles OH , comme l'alumine Al_2O_3 , le dioxyde de titane TiO_2 ou la silice SiO_2 [51].

La Figure I.16 résume ces deux types de fonctionnalisation (greffage par groupements thiols et silanisation) dans le cas de l'or (matériau actuellement le plus utilisé dans la biodétection par effet plasmonique), et présente la possibilité d'une fonctionnalisation sélective des zones à forte exaltation plasmonique (hot spots) [52].

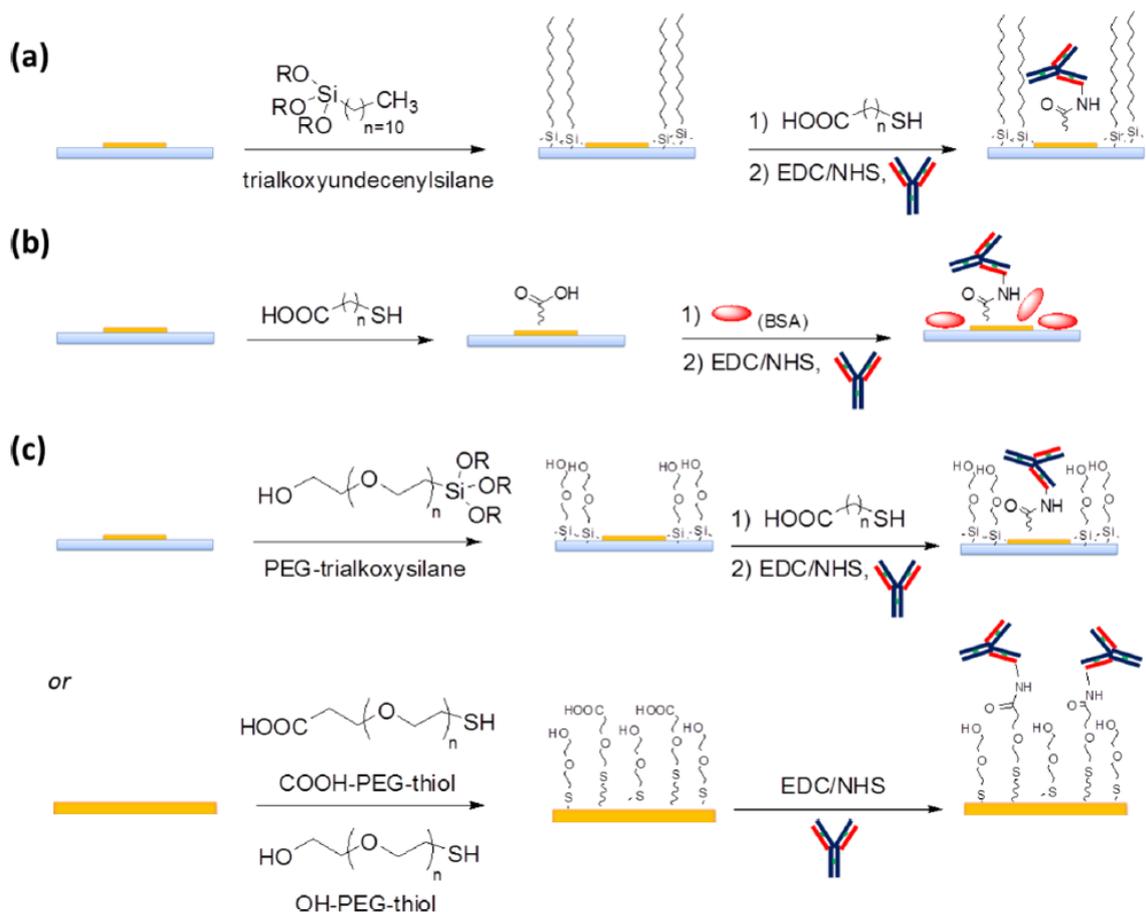


Figure I.16. Schéma de différents types de greffage pour la fonctionnalisation sélective de surfaces d'or. En a, l'or (en jaune) est inerte aux silanes utilisés pour fonctionnaliser la couche de silice (en bleu) ; l'or est fonctionnalisé par greffage par des groupements thiols. En b, la protéine BSA forme une couche auto-assemblée sur la zone inerte en se liant aux surfaces hydrophiles et hydrophobes de manière irréversible et prévient l'adhésion des anticorps, limitant ainsi l'adsorption non spécifique. En c, l'utilisation de polyéthylène glycol (PEG) prévient l'adsorption non spécifique par la formation de fortes liaisons hydrogène avec l'eau, résultant en l'inhibition de l'adhésion sur la couche de PEG des autres molécules solubles dans l'eau, comme par exemple les anticorps. Schéma extrait de la référence [47].

b. Dispositifs microfluidiques

Dans leur chapitre intitulé « Surface Functionalization of Microfluidic Devices » issu du livre *Microsystems for Pharmatechnology*, Eichler *et al.* détaillent différents procédés de revêtement ou de modifications de surfaces pour la fonctionnalisation de dispositifs microfluidiques. De même que pour les biocapteurs plasmoniques, cette fonctionnalisation peut être nécessaire pour prévenir l'adhésion de molécules autres que les molécules cibles, ou pour obtenir les groupements chimiques indispensables à la réalisation d'un biocapteur [53]. Les auteurs distinguent deux catégories de

méthodes de fonctionnalisation : les méthodes de chimie par voie humide et les méthodes en phase gazeuse.

Parmi les méthodes de chimie par voie humide, on peut lister l'adsorption de surfactants, polymères et polyélectrolytes, le revêtement par procédé sol-gel, la silanisation, le greffage de polymères, les hydrogels et l'électrochimie. Parmi les méthodes en phase gazeuse, on trouve le revêtement par dépôt chimique en phase vapeur (CVD pour Chemical vapor deposition) et par dépôt de couches atomiques (ALD pour Atomic layer deposition), les technologies reposant sur l'utilisation de photons et le traitement par plasma. Certaines de ces techniques sont détaillées ci-après.

Procédé ALD

Comme établi précédemment dans le cas des biocapteurs plasmoniques, il peut y avoir nécessité de déposer sur la surface d'intérêt une couche d'un matériau pouvant présenter, suite à une activation, des groupements hydroxyles chimiques particuliers. Une méthode permettant cette opération est le dépôt de couches atomiques ALD. L'ALD est un procédé qui consiste en la répétition de cycles constitués de quatre étapes : exposition du substrat aux vapeurs d'un premier précurseur, purge par un gaz inerte, exposition du substrat aux vapeurs d'un deuxième précurseur et purge par un gaz inerte. La Figure I.17 montre le schéma de principe du procédé ALD pour l'exemple de l'alumine Al_2O_3 .

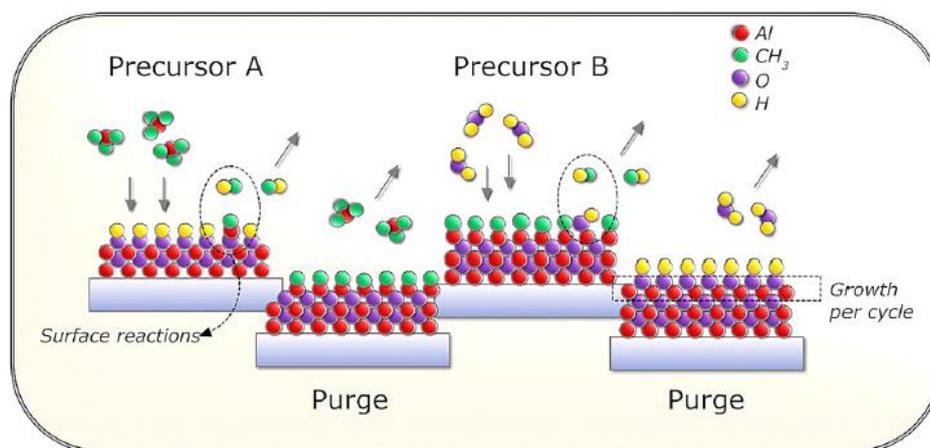


Figure I.17. Schéma de principe du procédé ALD pour l'exemple de l'alumine Al_2O_3 . Schéma extrait de la référence [54].

Plasmas

L'utilisation de plasmas pour la fonctionnalisation de surfaces est particulièrement répandue [55]. Ce procédé repose sur l'utilisation d'un gaz ionisé, et présente des temps de traitement courts ainsi qu'une facilité de réalisation, ce qui en fait notamment une des techniques les plus efficaces pour la modification des surfaces de PDMS, matériau très utilisé dans la réalisation de biocapteurs microfluidiques [56]. Un substrat exposé à un plasma va réagir avec les entités réactives en présence (protons, espèces chargées, atomes, radicaux libres). Dans le cas d'un plasma oxygène (plasma O₂), le traitement va pouvoir induire des groupements tels que les groupes fonctionnels hydroxyles OH, carbonyles C=O ou carboxyles COOH à la surface du substrat. Dans le cas de matériaux inorganiques oxydés, comme la silice ou le verre, le traitement par plasma oxygène peut résulter en l'élimination de fins films de contaminants organiques. Le plasma oxygène est donc une méthode permettant à la fois le nettoyage et l'activation de surfaces pour leur fonctionnalisation ultérieure.

Silanisation

La silanisation consiste en la formation de monocouches d'organosilanes sur des substrats. Ces monocouches peuvent ensuite être modifiées pour présenter un groupement fonctionnel spécifique. La silanisation est une méthode particulièrement utilisée, dans des protocoles impliquant une grande variété de substrats (silice, verre, PDMS), organosilanes (APTES, MPTS, OTS), procédés d'activation (piranha, plasma O₂, irradiation UV/Ozone), solvants (toluène, éthanol, acétone), concentrations et temps de réaction [57]. La Figure I.18 présente le schéma du procédé de silanisation avec des organosilanes après prétraitement de la surface permettant d'introduire des groupements hydroxyles OH.

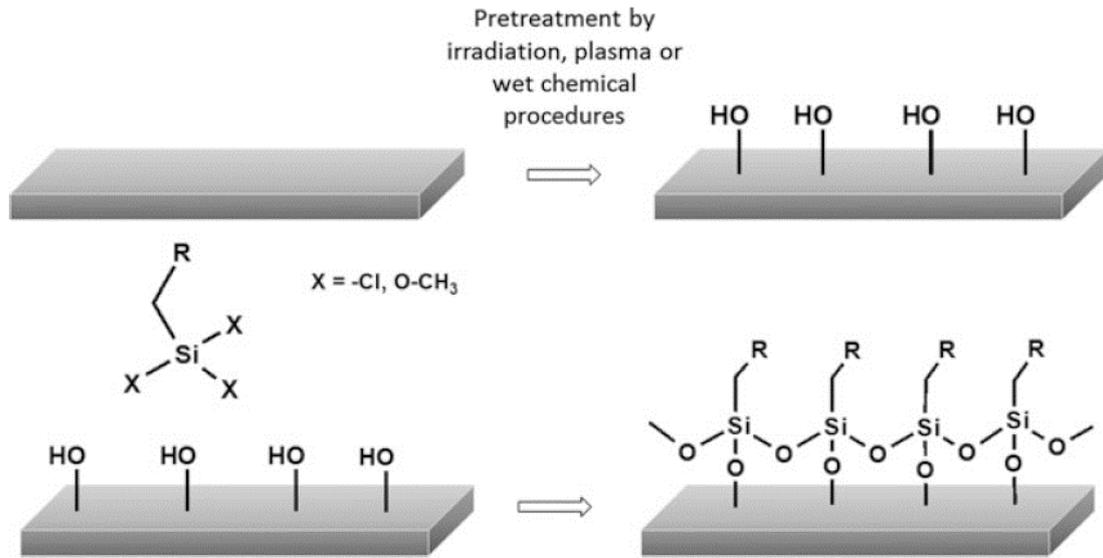


Figure I.18. Schéma du procédé de silanisation avec des organosilanes (SiX_3R) après prétraitement de la surface permettant d'introduire des groupements hydroxyles OH. Schéma extrait de la référence [53].

Les méthodes exposées ci-dessus sont souvent combinées pour obtenir le dispositif microfluidique fonctionnalisé qui permettra la réalisation d'un biocapteur. Ainsi, Séguin *et al.* montrent que la silanisation d'échantillons oxydés par plasma permet l'obtention de motifs présentant des fonctions amines et thiols sur un substrat de PDMS [58]. Les groupements chimiques ainsi acquis sont disponibles pour des modifications chimiques supplémentaires destinées à la capture de biomolécules au sein d'une zone bien définie (Figure I.19).

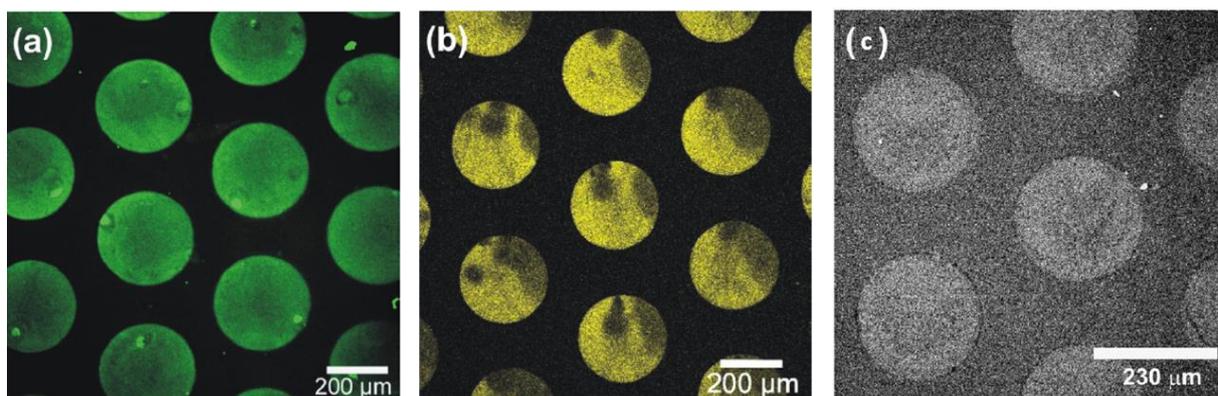


Figure I.19. Images en microscopie de fluorescence de motifs fonctionnalisés de façon sélective. En a, FITC greffée sur les groupements amines des silanes 3-APTMS. En b, 5-IAF greffée sur les fonctions thiols des silanes 3-MPTMS. En c, capture d'anticorps marqués au TRITC par la protéine A sur un réseau à motifs fonctionnalisé avec du 3-APTMS. Image issue de la référence [58].

Sui *et al.* présentent également un exemple de modification de surface dans un canal microfluidique de PDMS [59]. Ils développent en effet une approche dont la première étape est une réaction d'oxydation en solution de substrats de PDMS. Les surfaces sont ensuite fonctionnalisées avec des aminosilanes, dont les groupements amines servent au greffage de biomolécules. Ceci assure la capture subséquente des anticorps. Cette expérience leur permet notamment de réaliser un immunodosage pour la détection et la quantification d'un biomarqueur du cancer de la prostate, l'anticorps anti-PSCA, avec une sensibilité de 1,0 nM (Figure I.20).

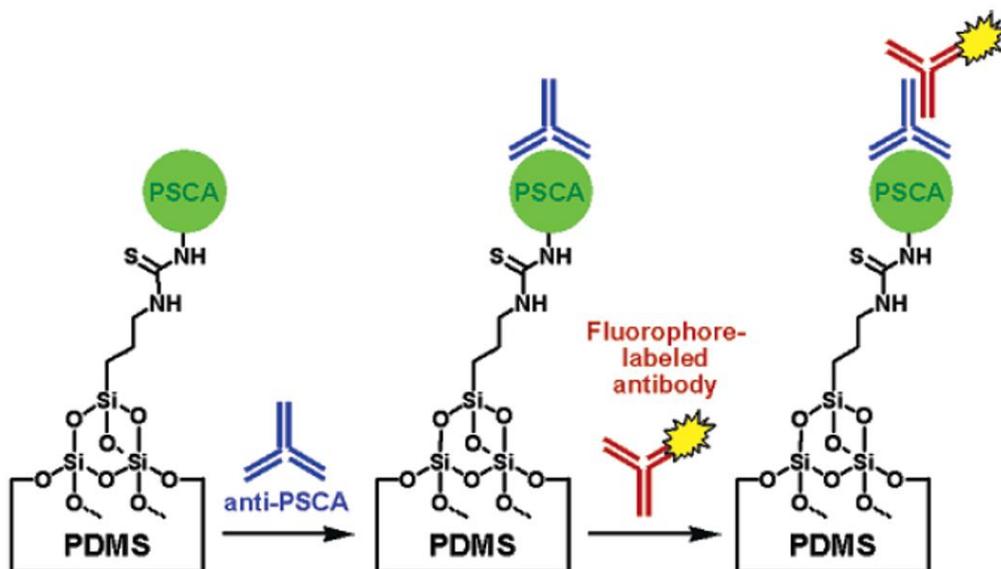


Figure I.20. Schéma du principe d'un immunodosage d'anticorps anti-PSCA dans un canal microfluidique de PDMS fonctionnalisé par silanisation. La première étape du procédé consiste en la silanisation et le greffage des biomolécules PSCA par les amines. Les anticorps spécifiques anti-PSCA viennent ensuite reconnaître les molécules PSCA, puis la détection optique du conjugué se fait par l'observation d'un anticorps secondaire fluorescent. Schéma issu de la référence [59].

I.3 Application à la détection de molécules d'intérêt biologique

I.3.1 Séquençage d'ADN et de protéines

Depuis l'achèvement en 2003 du Projet Génome Humain, dont l'objectif était d'établir le séquençage complet de l'ADN du génome humain, de nombreux progrès

ont été réalisés afin de réduire le coût d'une opération de séquençage, et d'augmenter la diversité des génomes séquencés [60]. Dans ce contexte, les séquenceurs proposés par l'entreprise Illumina font figure de référence, avec des caractéristiques permettant un bon compromis entre vitesse de lecture des paires de base, cadence, taux d'erreur (0,1%) et coût. Le séquenceur Minlon, commercialisé en 2014 par l'entreprise Oxford Nanopore Technologies, apporte une véritable révolution dans le domaine du séquençage d'ADN. Bien que présentant un taux d'erreur relativement élevé par rapport aux systèmes existants (environ 12%), le Minlon offre en effet la possibilité de réalisation de séquençage de longues séquences à l'aide d'un dispositif de la taille d'un téléphone portable, et pour un coût dérisoire comparé aux technologies actuelles (Figure I.21).

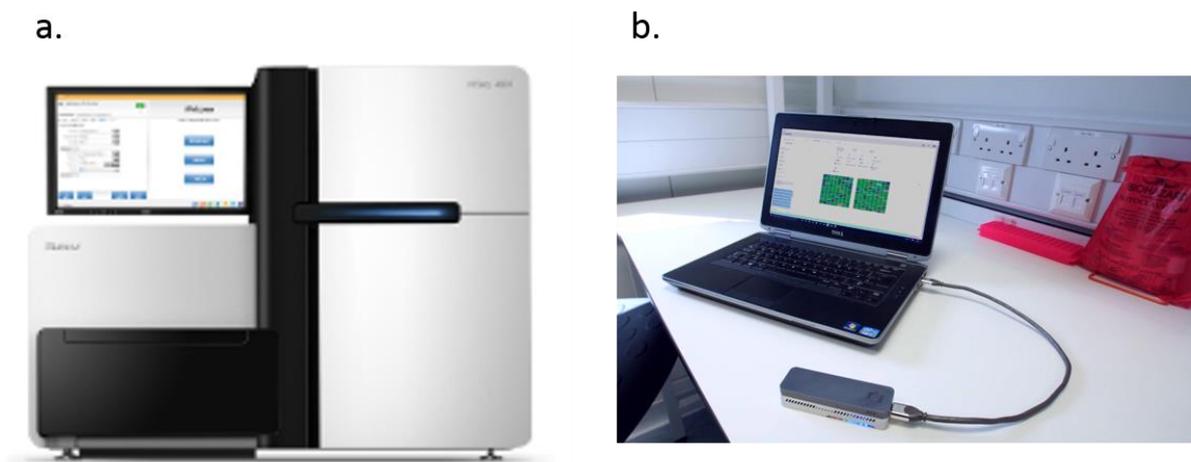


Figure I.21. Exemples de séquenceurs d'ADN actuellement commercialisés. En a, le séquenceur HiSeq d'Illumina, et en b, le séquenceur Minlon d'Oxford Nanopore Technologies.

Le Minlon est le premier séquenceur commercialisé reposant sur l'utilisation de nanopores biologiques. Les nanopores sont apparus comme une plateforme prometteuse pour le séquençage d'ADN [61] et trouvent des avantages en termes de coût et de quantités de réactifs par rapport aux méthodes de séquençage d'ensembles comme la méthode de Sanger (qui repose sur le marquage des bases de l'ADN et leur amplification par PCR) [62]. Ainsi, des années de recherche conduites par Hagan Bayley portant sur les nanopores biologiques, et notamment l'alpha-hémolysine, un

pore protéique heptamérique transmembranaire [63], [64], ont permis l'élaboration du séquenceur Minlon, qui lui repose sur l'utilisation du pore lipoprotéique nonamérique CsgG (Curli specific gene G).

Les techniques actuelles de séquençage par nanopore reposent sur le passage, grâce à l'application d'un courant, de molécules au travers d'une ouverture de taille nanométrique incorporée dans une fine membrane (biologique ou synthétique). La mesure du courant, typiquement à l'échelle du pico-Ampère, permet l'identification des molécules passées au travers du nanopore. Ceci se fait par analyse des modulations de courant enregistrées, caractéristiques des phénomènes de translocation au travers du nanopore [65].

Parmi les nanopores candidats au séquençage d'ADN, on distingue les nanopores biologiques intégrés dans une bicouche lipidique, les nanopores synthétiques fabriqués dans des substrats solides et les nanopores hybrides, combinaison des deux types précédents. Alors que les nanopores biologiques ont clairement fait leurs preuves [66], [67], les nanopores synthétiques apparaissent comme une alternative offrant le contrôle sur la géométrie et les dimensions, une robustesse mécanique, des facilités de modifications et une compatibilité avec de nombreuses techniques de mesures électroniques ou optiques. La Figure 1.22 présente des exemples de nanopores biologiques (a. et b.) et synthétiques (c. et d.).

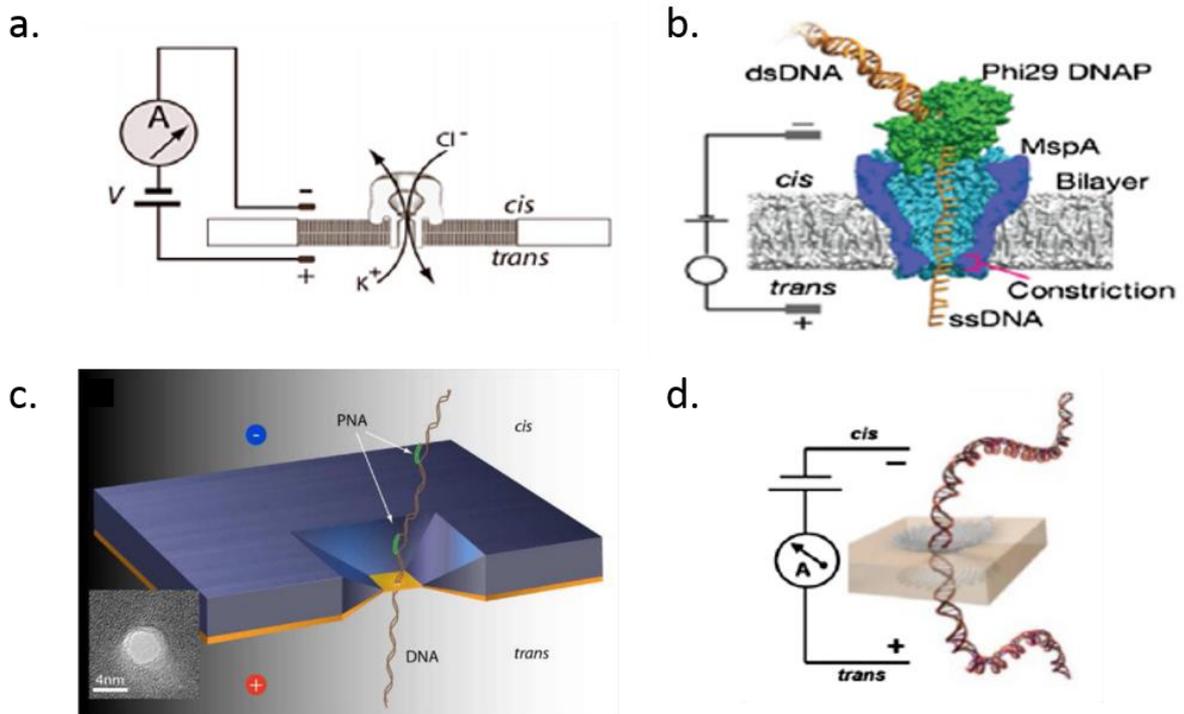


Figure I.22. Exemples de nanopores biologiques (a. et b.) et synthétiques (c. et d.). En a, nanopore protéique alpha-hémolyse inséré dans une bicouche lipidique. En b, nanopore protéique MspA conjugué avec la polymérase Phi29 et inséré dans une bicouche lipidique. En c, nanopore à base de silicium. En d, nanopore à base d'alumine Al₂O₃. Tous ces pores permettent la translocation d'un ADN simple ou double brin. Image adaptée de la référence [68].

L'utilisation de nanopores synthétiques autorise également à considérer des effets plasmoniques à la surface des structures, permettant d'envisager une exaltation du signal détecté. La plasmonique est une branche de la nanophotonique qui traite des interactions sublongueur d'onde d'une onde électromagnétique avec les électrons de conduction d'une interface métal / diélectrique. L'illumination d'une nanostructure métallique permet donc l'obtention de zones pour lesquelles le champ électromagnétique est exalté, on parle de hot spots. Le couplage de la plasmonique aux nanopores synthétiques doit donc permettre la réalisation d'un système de séquençage de l'ADN. Ainsi, Nicoli *et al.* présentent une investigation systématique des effets plasmoniques sur les translocations de l'ADN au travers de nanopores synthétiques plasmoniques [69], et Belkin *et al.* réalisent des simulations montrant la possibilité de séquençage d'ADN au travers de structures similaires [61] (Figure I.23).

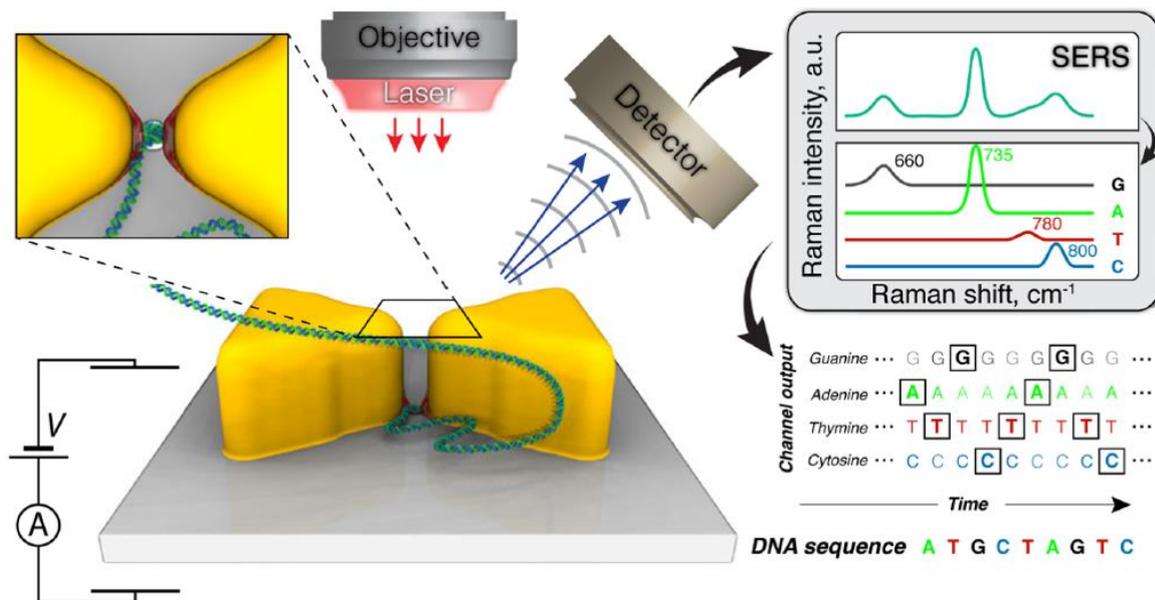


Figure I.23. Principe théorique du système de séquençage d'ADN par nanopore plasmonique proposé par Belkin *et al.* Des structures de géométrie similaire ont été utilisées par Nicoli *et al.* pour la démonstration expérimentale du système. La signature spectroscopique vibrationnelle par Raman est exaltée du fait de la géométrie des nanostructures.

Si les progrès effectués pour le séquençage des quatre bases de l'ADN apportent des solutions toujours plus performantes, il en est autrement pour les vingt acides aminés des protéines. Pourtant, les protéines sont des acteurs majeurs de tous les procédés cellulaires, et la connaissance du protéome trouve des applications tant en recherche fondamentale en biologie qu'en diagnostic. En 2014, deux équipes internationales ont fourni la première version du protéome humain [70], [71], ouvrant ainsi la voie à la compréhension de processus cellulaires complexes. Mais cette première version du protéome humain a été permise par spectrométrie de masse, une technique qui requiert une grande quantité d'échantillon et qui souvent ne permet pas de reconnaître des espèces mineures intégrées au sein d'espèces dominantes. En 2015, l'équipe de Chirlmin Joo apporte une alternative à la méthode de spectrométrie de masse pour le séquençage de protéines, en démontrant par le calcul qu'il suffit de quantifier seulement deux types d'acides aminés pour identifier une protéine [72]. Cette démonstration repose sur le fait que dans le cadre du séquençage, une protéine peut être identifiée à l'aide d'une information incomplète sur sa structure, en s'appuyant sur les bases de données protéomiques existantes. En 2018, cette même équipe réalise la preuve de concept expérimentale du séquençage partiel

(fingerprinting) de protéines par détection par FRET de molécules uniques [73]. Les auteurs utilisent une sonde moléculaire capable d'opérer la translocation des peptides (la protéase ClpXP issue d'*Escherichia Coli*), accrochée à une surface de quartz recouverte de PEG par conjugaison biotine – streptavidine pour permettre l'observation de molécules uniques par TIRF combinée à l'imagerie par excitation laser alternée (ALEX). La sonde est marquée à l'aide du fluorophore Alexa 488 (donneur), et les terminaisons amines et les résidus cystéine des acides aminés des peptides transloqués sont marqués avec les colorants Cy3 et Cy5 (accepteurs) respectivement. Les signatures de FRET sont ainsi analysées pour déterminer la séquence de la protéine (Figure I.24).

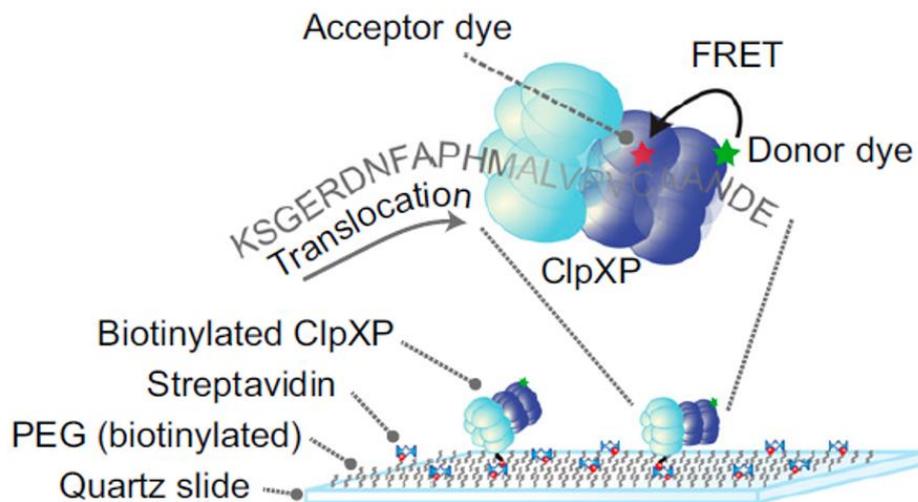


Figure I.24. Schéma du dispositif de séquençage partiel de protéines par détection de FRET de molécules uniques proposé par Ginkel *et al.* La protéase ClpXP immobilisée sur la surface est marquée avec le fluorophore Alexa 488 comme donneur. La translocation du peptide marqué avec les colorants Cy3 et Cy5 comme accepteurs est observée par détection du FRET.

C'est dans ce contexte de développement d'outils pour le séquençage de protéines que s'inscrit le projet européen PROSEQO (Protein Sequencing using Optical single molecule real time detection), qui vise à démontrer la preuve de principe d'une nouvelle technologie de séquençage par utilisation de nanostructures plasmoniques et détection de FRET (Figure I.25).

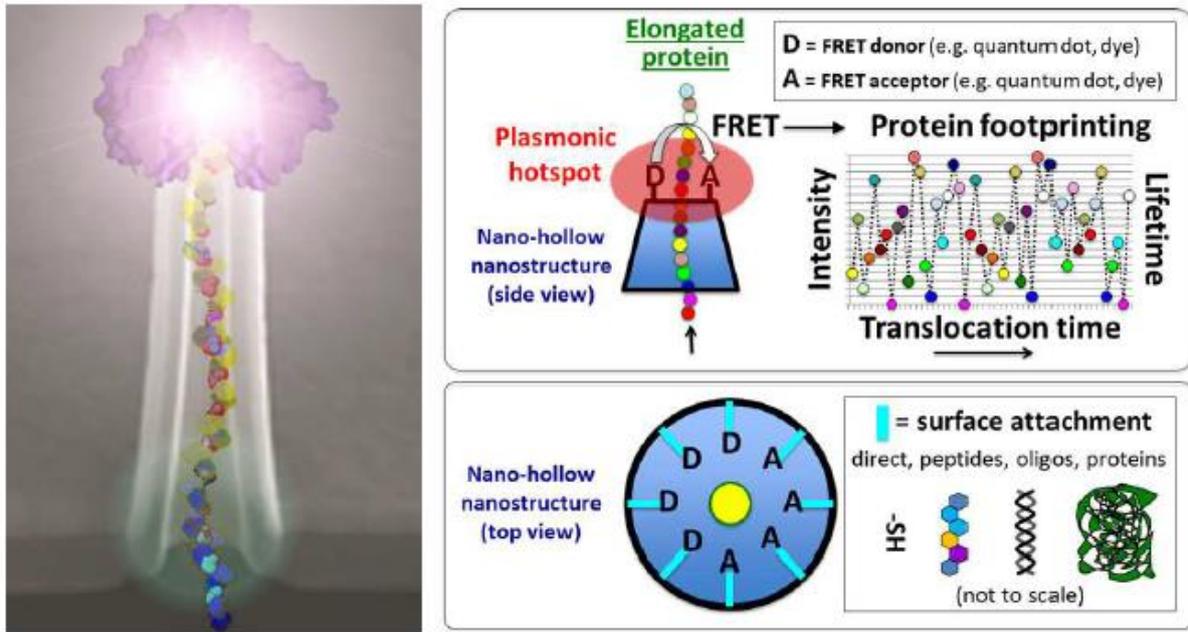


Figure I.25. Illustration du projet PROSEQO de séquençage de protéines en molécules uniques par détection optique du phénomène de FRET. Les fluorophores donneurs et accepteurs sont greffés au niveau des hot spots de nanoantennes. Le signal de FRET exalté est analysé pour reconstituer la séquence de la protéine d'intérêt.

Le travail présenté dans les chapitres II et III de ce manuscrit de thèse s'inscrit dans le cadre du projet PROSEQO. Une étude fondamentale de détection quantitative du phénomène de FRET sur des surfaces d'aluminium fonctionnalisées y est présentée.

I.3.2 Immunodosages multiplexés par FRET

Parmi les différentes méthodes de détection de biomolécules, la technique d'immunodosage est particulièrement répandue. Il s'agit de tests reposant sur la capacité d'un anticorps à reconnaître et à se lier de façon spécifique à une molécule cible, souvent un antigène. Depuis la réalisation du premier dosage immunologique de l'insuline humaine dans le plasma par Yalow et Berson en 1959 [74], les techniques d'immunodosages ont considérablement évolué, et se présentent aujourd'hui sous de nombreux formats en fonction de l'application recherchée [75].

Parmi ces différents types d'immunodosages, on peut s'intéresser en particulier aux dosages multiplexés par FRET, qui permettent la détection simultanée de plusieurs molécules d'intérêt. Ainsi, Geissler *et al.* présentent en 2012 un biocapteur optique basé sur le FRET pour la détection multiplexée de cinq colorants organiques accepteurs combinés à un complexe de terbium donneur [76]. La détection par spectroscopie résolue en temps, le choix des filtres optiques et la correction des interférences spectrales (spectral crosstalk) permet une réduction efficace du bruit, et donne la possibilité d'application du biocapteur à la détection simultanée de cinq marqueurs tumoraux dans un échantillon de sérum humain (Figure I.26).

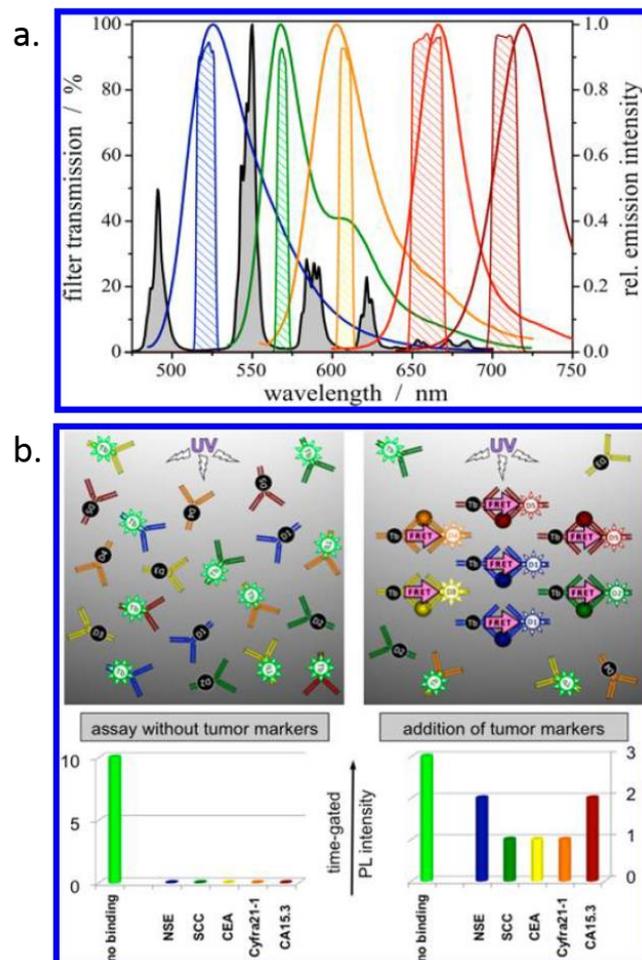


Figure I.26. Détection multiplexée par spectroscopie résolue en temps par FRET. En a, spectres de luminescence du terbium donneur (en noir) et des colorants accepteurs, et spectres de transmission des filtres optiques passe-bande utilisés pour la détection multiplexée (rayures). En b, immunodosage pour la détection de cinq marqueurs tumoraux du cancer du poumon. Images extraites de la référence [76].

En utilisant ce même principe de détection multiplexée, Qiu *et al.* réalisent le dosage simultané des récepteurs de facteurs de croissance épidermique EGFR et HER2, par FRET depuis des complexes de terbium donneurs vers des quantum dots accepteurs [77]. La dérégulation de ces deux récepteurs étant observée dans de nombreux cancers, notamment du poumon et du sein, leur détection duplexée pourrait constituer un outil diagnostique important dans le cadre de la thérapie personnalisée du cancer. La Figure I.27 présente le schéma de l'étude systématique réalisée pour la détection duplexée des récepteurs EGFR et HER2.

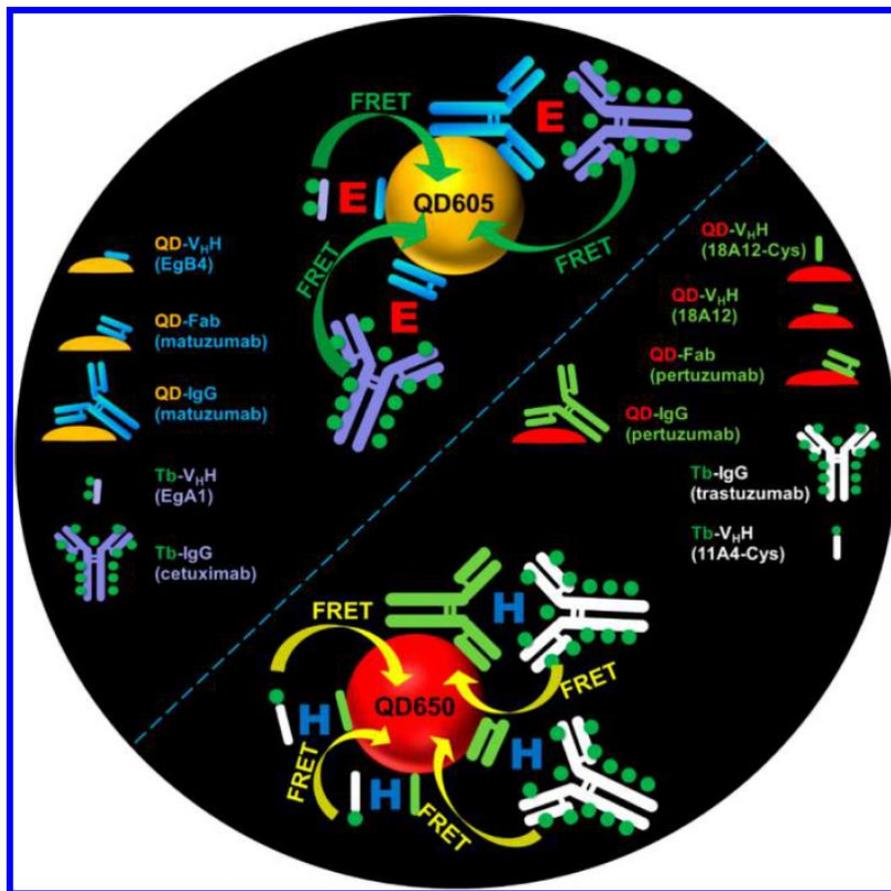


Figure I.27. Schéma du principe de détection duplexée par FRET des récepteurs EGFR et HER2. Différentes formes d'anticorps (IgG, Fab, V_HH) marquées avec du terbium ou des quantum dots permettent la réalisation de plusieurs combinaisons d'immunodosages. Images extraites de la référence [77].

Il est important de noter qu'outre ces immunodosages en solution, des dosages multiplexés par FRET existent aussi en phase solide. Les biocapteurs développés par

Kim *et al.* ou bien Algar *et al.* (qui ne sont donc pas des immunodosages à proprement parler, puisqu'ils ne reposent pas sur l'utilisation d'anticorps) en sont des exemples importants. Ainsi, Kim *et al.* réalisent un dosage multiplexé de protéases et de leur inhibition par transfert d'énergie avec comme donneurs différents quantum dots et comme accepteurs des nanoparticules d'or immobilisées sur une surface de verre [78] (Figure I.28). Les nanoparticules d'or décorées d'un peptide, substrat de la protéase, sont conjuguées à la surface des quantum dots à l'aide de liaisons biotine – streptavidine. Dans cette configuration, la luminescence des quantum dots est diminuée (quenching) par les nanoparticules d'or. La mise en présence du nanoconjugué avec la protéase provoque la coupure du peptide et la restauration de la luminescence des quantum dots.

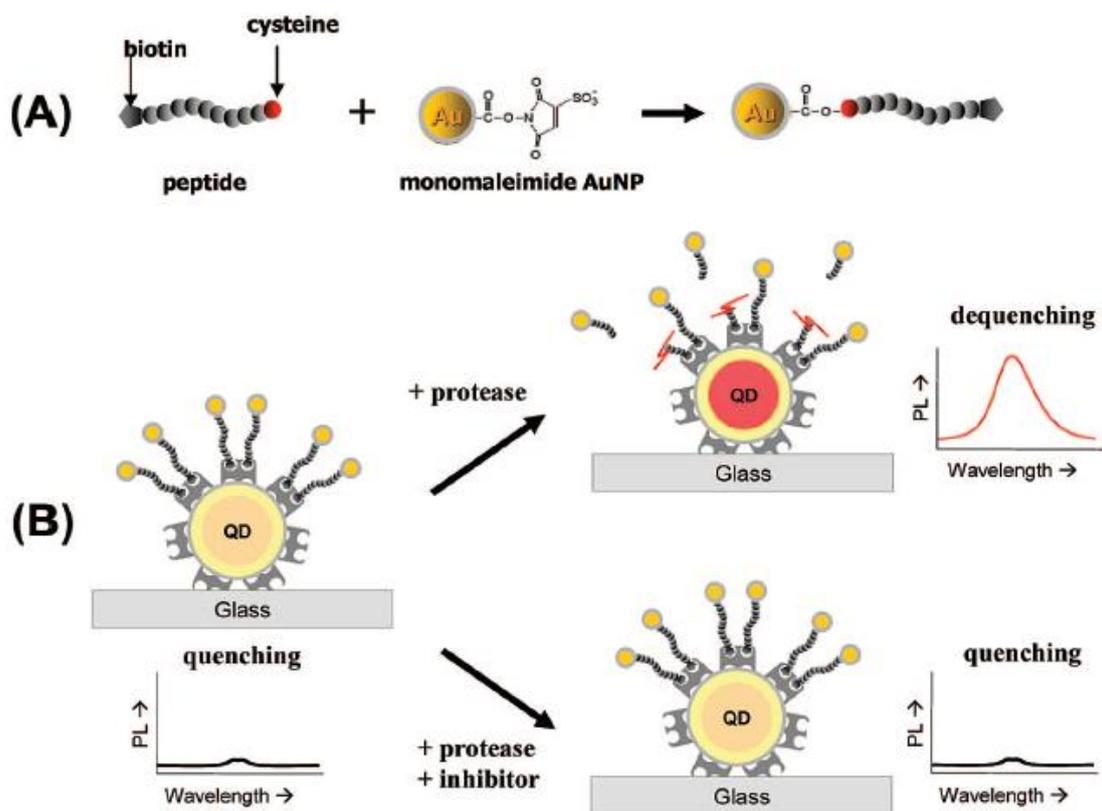


Figure I.28. Schéma du principe de dosage des protéases par détection de transfert d'énergie entre des quantum dots (QD) donneurs et des nanoparticules d'or (AuNP) comme accepteurs, greffées sur une surface de verre. Les quantum dots et les nanoparticules d'or sont liés par une courte séquence peptidique, substrat de la protéase. Leur mise en présence avec la protéase provoque la capture du peptide et la luminescence des QDs. Inversement, la protéase et son inhibiteur ne permettent pas de couper le peptide et l'extinction (quenching) entre les nanoparticules d'or et les QDs est maintenue. Image extraite de la référence [78].

De leur côté, Algar *et al.* développent un dosage multiplexé en phase solide de l'hybridation d'acides nucléiques [79]. Ils utilisent pour ce faire le phénomène de FRET entre des quantum dots de CdSe/ZnS donneurs et des colorants organiques accepteurs. Les quantum dots de CdSe/ZnS verts ($\lambda_{PL} = 530$ nm) et rouges ($\lambda_{PL} = 622$ nm) sont immobilisés à la surface de fibres optiques de silice par utilisation de silanes, et des oligonucléotides biotinylés simple brin sont ajoutés à la surface par reconnaissance de neutravidine (NA). Les oligonucléotides complémentaires sont marqués avec des colorants organiques Cy3 ou Alexa Fluor 647. L'hybridation de ces oligonucléotides marqués avec les sondes en présence implique la proximité nécessaire au phénomène de FRET (Figure I.29).

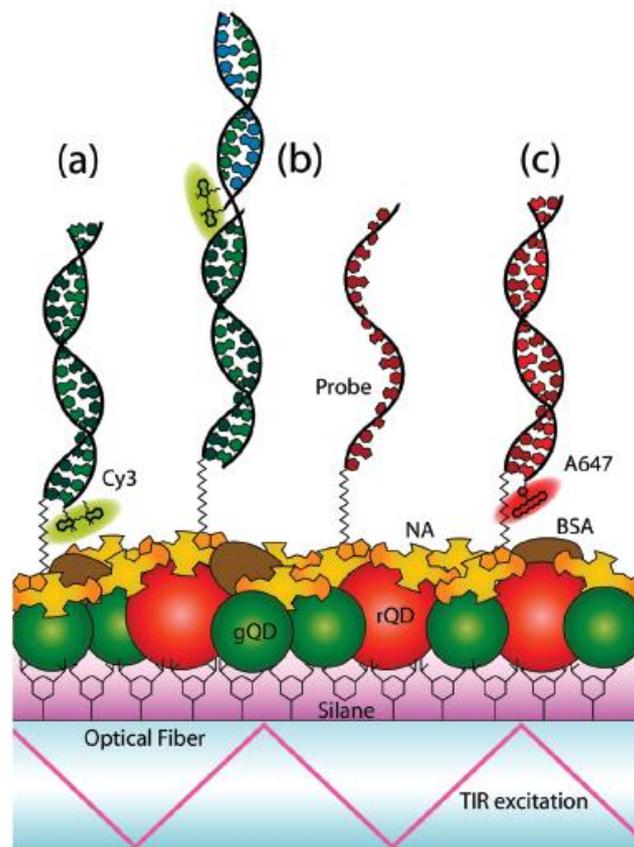


Figure I.29. Schéma du principe de dosage en phase solide pour l'observation du phénomène d'hybridation. En a, dosage direct par FRET d'un QD vert (gQD) vers le colorant Cy3. En b, le marquage de la cible est empêché à l'aide d'un dosage de type sandwich. En c, dosage direct par FRET d'un QD rouge (rQD) vers le colorant Alexa Fluor 647 (A647). Les oligonucléotides biotinylés reconnaissent les neutravidines (NA) accrochées à la surface. L'utilisation combinée de QDs verts et rouges et de deux sondes d'oligonucléotides permet la réalisation d'un dosage multiplexé. Image extraite de la référence [79].

Les études présentées dans ce chapitre d'état de l'art montrent l'importance d'un système de détection adapté aux caractéristiques de la molécule ou du processus d'intérêt. Dans ces conditions, il n'est pas raisonnable d'affirmer qu'un biocapteur sera toujours plus performant qu'un autre. C'est dans ce contexte que s'inscrit le projet μ FRET, qui vise à réaliser un biocapteur en phase solide en conditions microfluidiques pour l'immunodosage multiplexé par FRET de molécules d'intérêt biologique. L'idée de ce projet est de réaliser une étude comparative approfondie de différents types d'immunodosages (en solution ou en phase solide, homogène ou hétérogène, pleine plaque ou en conditions microfluidiques) en termes de sensibilité, spécificité, volume, ou encore coût. Le travail présenté dans les chapitres IV et V de ce manuscrit de thèse s'inscrit dans le cadre du projet μ FRET. Le développement et la caractérisation du dispositif fonctionnalisé devant servir à cette étude y sont présentés, puis le projet et les résultats préliminaires de l'étude sont explicités.

II Fonctionnalisation de surfaces d'aluminium

II.1 Elaboration de surfaces d'aluminium recouvertes de silice

II.1.1 Intérêts et contraintes des surfaces d'aluminium

Ces dernières années ont vu émerger l'aluminium comme matériau de prédilection en plasmonique pour des applications de biodétection [80], [81], [82]. Alors que l'or et l'argent sont les principaux métaux utilisés dans ces applications, notamment du fait de leurs faibles pertes optiques dans les gammes de longueurs d'ondes du visible et du proche infra-rouge, leurs coûts élevés limitent une commercialisation à grande échelle [83]. L'aluminium, qui présente de fortes résonances plasmons dans le domaine du visible [84] et dans l'ultra-violet [85], ainsi qu'un coût faible, une grande abondance naturelle et une facilité de fabrication et de traitement, s'impose comme un matériau prometteur pour la commercialisation d'outils de biodétection [86].

Les principaux métaux utilisés en plasmonique sont l'or, l'argent et l'aluminium [47]. L'or et l'argent sont habituellement fonctionnalisés grâce à leur forte réactivité avec les groupements thiols sans modification de surface préalable [87], tandis que l'aluminium nécessite une fonctionnalisation bien plus sophistiquée [88], [89]. En outre, tout comme l'argent, l'aluminium présente une importante réactivité, nécessitant une protection vis-à-vis des pollutions chimiques présentes dans l'air environnant et pouvant induire des modifications de surfaces. Un autre aspect important pour la fonctionnalisation de surfaces plasmoniques réside dans l'épaisseur du revêtement, tant est mince la frontière entre augmentation et diminution de l'intensité de fluorescence. De très courtes distances entre les fluorophores et la surface peuvent en effet provoquer de fortes diminutions de l'intensité, tandis qu'une distance de quelques nanomètres pourra impliquer une augmentation significative [90], [91], [92].

En effet, le processus d'émission spontanée d'un fluorophore n'est pas totalement intrinsèque et peut être modifié par couplage résonant avec l'environnement électromagnétique extérieur. Ainsi, une première étape préliminaire à la fonctionnalisation a consisté à trouver le revêtement adapté à la protection des échantillons permettant de garder les propriétés plasmoniques du matériau dans le cadre des expériences de fluorescence.

II.1.2 Choix du revêtement de silice

Pour être silanisée, une surface doit présenter des groupements hydroxyles qui vont réagir avec l'atome de silicium du silane. Les composés permettant d'obtenir ces groupements sont principalement l'alumine Al_2O_3 , le dioxyde de titane TiO_2 et la silice SiO_2 . En effet, la surface de ces matériaux présente une couche superficielle comportant notamment des groupements méthyles CH_3 et des molécules d'eau H_2O (issus de la contamination de l'environnement ambiant), et le traitement des surfaces, par plasma oxygène par exemple, permet l'obtention des groupements hydroxyles OH nécessaires à la silanisation. La silice est le composé qui présente le plus grand nombre de groupements hydroxyles, et donc le plus grand nombre de sites de greffage [51], [93], ce qui en fait un revêtement adapté à la fonctionnalisation par silanisation. C'est pour cette raison que la silice a été choisie dans le cadre de la fonctionnalisation des substrats d'aluminium.

Afin de s'affranchir des effets d'extinction (quenching) de la fluorescence issue des fluorophores greffés à proximité du métal, il est indispensable de considérer une épaisseur contrôlée pour la couche de revêtement de l'aluminium [94], [95], [96]. Cette nécessité a justifié l'utilisation de la technique de dépôt de couche atomique (ALD pour « Atomic Layer Deposition »). L'ALD est un procédé qui consiste à exposer une surface à des flux successifs d'éléments gazeux, permettant l'obtention d'une couche mince d'une épaisseur de 1 à 100 nm. Cette méthode permet le contrôle précis de l'épaisseur et de l'homogénéité de la couche déposée, ainsi qu'un excellent recouvrement de surface, y compris sur des substrats structurés, autorisant ainsi un revêtement homogène sur des structures présentant des géométries choisies pour

leurs caractéristiques plasmoniques. Dans le cas de la technique de dépôt de couche atomique assistée par plasma (PEALD pour Plasma Enhanced Atomic Layer Deposition), la troisième des quatre étapes d'un cycle de dépôt consiste en l'exposition du substrat, non pas à des molécules d'eau comme dans l'ALD, mais à un plasma oxygène [97]. La réactivité des radicaux libres $O\cdot$ avec les précurseurs en présence permet notamment l'augmentation de la vitesse de croissance par cycle du matériau.

II.1.3 Procédé de fabrication des échantillons

Durant ma thèse, j'ai eu l'opportunité d'effectuer un séjour à l'Institut Italien de Technologie (IIT) de Gênes, ce qui m'a permis de me familiariser avec le procédé de fabrication des échantillons que j'ai ensuite fonctionnalisés.

Des substrats commerciaux de silicium de 1 cm^2 et de $500\ \mu\text{m}$ d'épaisseur supportant une membrane de nitrure de silicium Si_3N_4 de 100 nm d'épaisseur et d'aire centrale $500 \times 500\ \mu\text{m}^2$ (Figure II.1) sont rincés à l'éthanol avant dépôt de la couche d'aluminium.

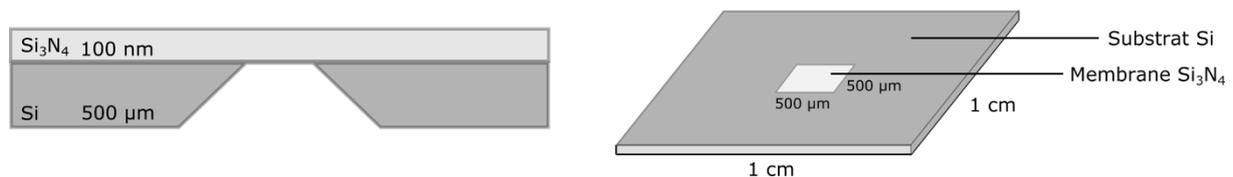


Figure II.1. Représentation schématique du substrat de silicium Si supportant la membrane de nitrure de silicium Si_3N_4 . L'épaisseur du substrat de Si est de $500\ \mu\text{m}$, celle de la membrane est de 100 nm . Les dimensions sont $1\text{ cm} \times 1\text{ cm}$ pour le substrat, et $500\ \mu\text{m} \times 500\ \mu\text{m}$ pour la membrane. L'image n'est pas à l'échelle.

Une couche d'aluminium de 100 nm d'épaisseur est ensuite ajoutée par dépôt physique en phase vapeur assisté par un faisceau d'électrons (EB-PVD pour « Electron beam physical vapor deposition ») dans un bâti sous vide poussé (1×10^{-6} mbar) à un taux standard de dépôt de $0,3\ \text{\AA}/\text{s}$. Après le dépôt de la couche d'aluminium, les échantillons sont immédiatement transférés dans un dispositif de PEALD (FlexAL – Oxford Instruments), comportant un système de plasma à couplage

inductif permettant de mesurer quantitativement la teneur en éléments d'un matériau. Le précurseur bis (tert-butylamino) silane (BTBAS), chauffé à 35°C pour fournir une pression de vapeur d'environ 3 torr, est délivré dans la chambre de réaction. La température du substrat est de 80°C. L'oxydant est un plasma oxygène généré à 300 W à un débit de 60 sccm. La dose du précurseur est de 1,0 s et celle du plasma de 5,0 s. Ce procédé a été développé par Oxford Instruments (<https://www.oxinst.com/>). Au total, 28 cycles de dépôt de SiO₂ (0,145 nm/cycle, 80°C) permettent l'obtention d'une couche de 4 nm. Cette épaisseur est caractérisée par ellipsométrie (WVASE – J.A. Woollam). Le procédé est résumé dans la Figure II.2.

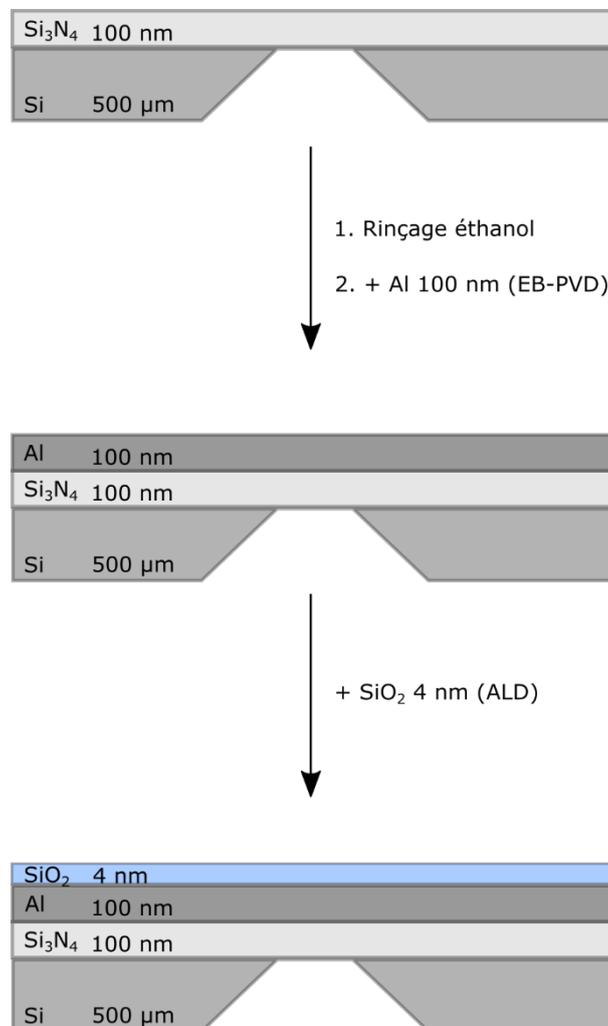


Figure II.2. Schéma du procédé de fabrication des échantillons d'aluminium recouverts de silice. Les substrats commerciaux de Si supportant la membrane de Si₃N₄ sont tout d'abord nettoyés à l'éthanol, avant le dépôt d'une couche de 100 nm d'Al par EB-PVD. Une couche de 4 nm de SiO₂ est ensuite rajoutée par ALD.

Les échantillons ainsi fabriqués sont ensuite observés au microscope optique en transmission afin de vérifier la propreté et l'homogénéité du revêtement déposé (Figure II.3.a.), ainsi qu'au microscope électronique à balayage (MEB) pour vérifier la rugosité du dépôt (Figure II.3.b.).

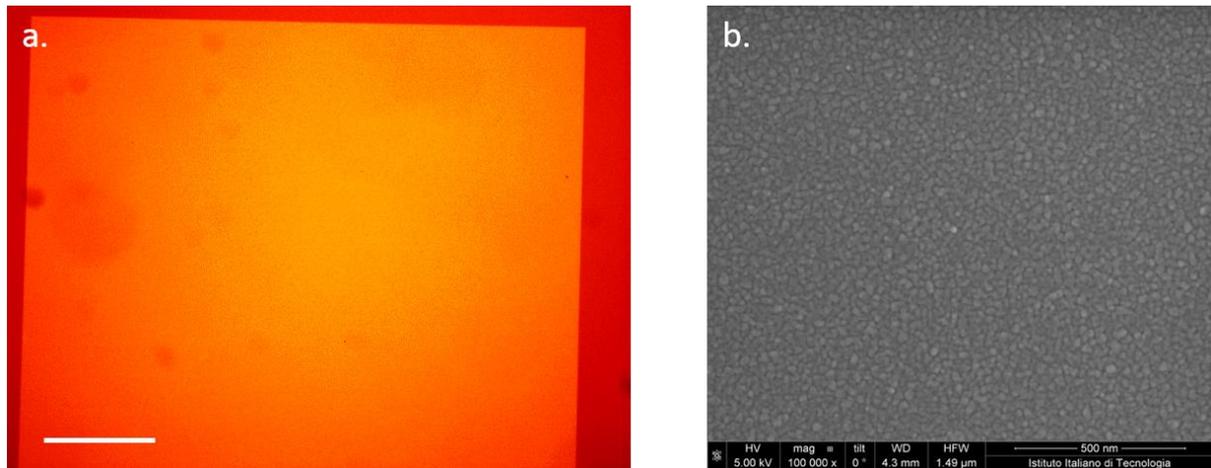


Figure II.3. Images en microscopie optique (a.) et en microscopie électronique à balayage (b.) de la membrane de Si_3N_4 recouverte d'une couche d'aluminium de 100 nm et d'une couche de silice de 4 nm. L'échelle en a. représente 100 μm . Images obtenues par l'équipe Plasmon Technology de l'IIT.

Une fois caractérisés par microscopie optique et électronique, les substrats d'aluminium recouverts de silice peuvent être fonctionnalisés par silanisation.

II.2 Silanisation

Une fois recouvert de silice, n'importe quel matériau, choisi par exemple pour ses propriétés plasmoniques, doit pouvoir être fonctionnalisé avec des fluorophores. Dans cette optique, le choix de la méthode de fonctionnalisation s'est porté sur la silanisation de la surface de silice recouvrant le matériau. La silanisation est une méthode bien établie et robuste permettant d'obtenir des fonctionnalisations stables sur le long terme de surfaces de silicium, de silice, de polydiméthylsiloxane (PDMS) et

de verre [53], [98], [99]. Les substrats silanisés trouvent des applications notamment en plasmonique [100], fluorescence [101], [102], FRET [103], ainsi que dans d'autres applications de biodétection [104]. Le choix de la silanisation se justifie par la possibilité d'adapter cette méthode de fonctionnalisation à de nombreux types de substrats, et de modifier ensuite la surface silanisée avec des fonctionnalités spécifiques variées [57].

II.2.1 Préparation des échantillons

Préalablement au greffage des silanes, les substrats d'aluminium recouverts de silice Al-SiO₂ sont nettoyés à l'acétone et à l'isopropanol et sont séchés à l'azote dans un environnement salle blanche. Afin de présenter les groupements hydroxyles nécessaires à la silanisation, les échantillons sont placés dans un délaqueur (Pico, Diener), où ils sont soumis à un traitement par plasma oxygène (plasma O₂) à une pression de 0,4 mbar et une puissance de 160 W pendant 1 minute. Ce plasma O₂ va permettre à la fois le nettoyage de la surface de silice par détachement des pollutions organiques, ainsi que son activation. En effet, le plasma est un gaz partiellement ionisé créé par un champ électromagnétique oscillant, capable de produire des espèces réactives (radicaux libres, ions, électrons, particules excitées, radiations UV) qui réagissent avec les molécules à la surface du substrat. Dans le cas du plasma O₂, ces espèces réactives vont donc interagir avec les molécules de la couche superficielle de silice comportant notamment des groupements méthyles CH₃ et des molécules d'eau H₂O, ce qui va permettre l'obtention au niveau de la surface de silice des groupements hydroxyles OH nécessaires à la silanisation (Figure II.4).

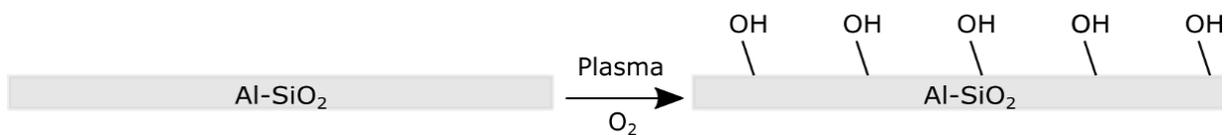


Figure II.4. Schéma de principe de l'effet de l'application d'un plasma oxygène sur un substrat d'aluminium recouvert de silice. Le traitement permet l'obtention de groupements hydroxyles nécessaires au greffage des silanes.

II.2.2 Aminosilanisation

Une fois les surfaces activées par plasma O_2 , les substrats sont fonctionnalisés par des aminosilanes. Les aminosilanes sont des composés chimiques constitués d'un groupement terminal fonctionnel amine (NH_2), qui permettent le greffage ultérieur de différents types de molécules. Les aminosilanes utilisés dans ce procédé sont les 3-aminopropyltriéthoxysilanes (APTES, MM = 221 g/mol, pureté $\geq 98,5\%$, 440140, Sigma), dont l'atome de silicium va réagir avec les groupements hydroxyles des substrats activés. Le schéma du procédé de cette silanisation est représenté en Figure II.5.

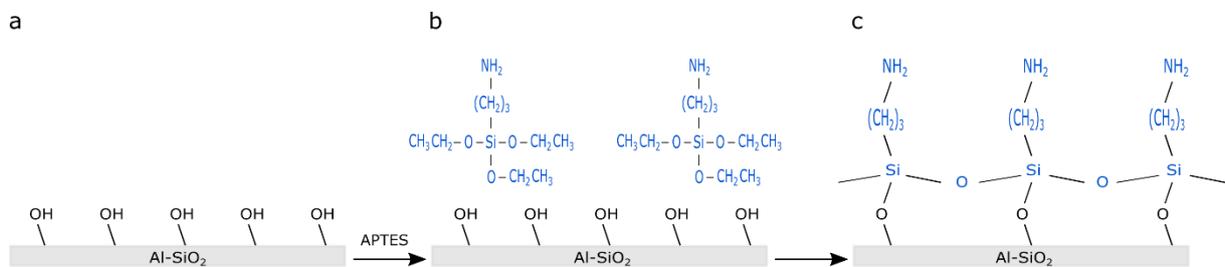


Figure II.5. Fonctionnalisation des surfaces avec les aminosilanes : (a) Surface activée par plasma oxygène, (b) Incubation de la surface avec les aminosilanes, (c) Formation des liaisons Si-O-Si entre la surface et les aminosilanes.

Le protocole suivi pour l'obtention de ces substrats silanisés est décrit ci-après. Une solution d'APTES à 4% est préparée dans l'acétone (4% d'APTES dans 96% d'acétone). Cette solution est d'abord plongée dans un bain à ultra-sons pendant 1 minute, puis chauffée à 60°C pendant 15 secondes. Les substrats Al-SiO₂ activés par plasma oxygène sont ensuite immergés dans cette solution et maintenus sous agitation modérée constante dans une boîte à gants sous azote pendant 10h. L'environnement contrôlé de la boîte à gants permet de garder un taux d'humidité de 2% ainsi qu'une température de 21±1°C tout au long de la réaction. Le pH de la solution est contrôlé au début et à la fin de l'expérience et présente une valeur de 5 à 6, donc légèrement acide (du fait de la recombinaison des groupements OCH₂CH₃ des silanes avec les molécules du solvant acétone au début de la réaction). A la fin de

l'expérience, les échantillons sont rincés deux fois dans l'acétone (2 x 5 min) et une fois dans l'eau désionisée (5 min), puis sont séchés à l'air comprimé.

II.3 Caractérisation des surfaces silanisées par angle de contact

Afin de valider le greffage des aminosilanes à la surface des échantillons Al-SiO₂, nous avons choisi de les caractériser par mesure des angles de contact. Cette méthode semi-quantitative permet en effet de mettre en évidence le greffage des silanes sur les substrats par mesure de l'hydrophobicité de la surface.

II.3.1 Principe général

La mesure d'angle de contact est une technique qui permet d'évaluer simplement la mouillabilité d'une surface, c'est-à-dire son aptitude à se laisser mouiller par une goutte de liquide. Une goutte déposée sur une surface est en effet caractérisée par trois tensions interfaciales solide-liquide (γ_{SL}), solide-vapeur (γ_{SV}) et liquide-vapeur (γ_{LV}), qui permettent de définir un angle de contact θ (Figure II.6). Plus cet angle θ est grand, plus la surface est hydrophobe.

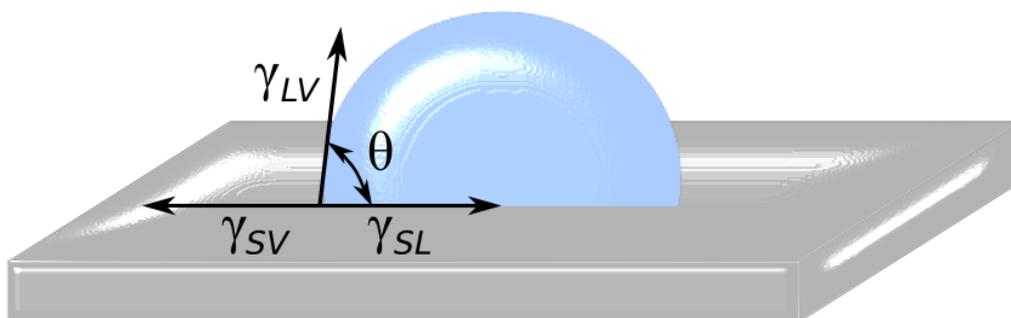


Figure II.6. Schéma du profil d'une goutte étalée sur une surface solide. γ_{SL} , γ_{SV} , γ_{LV} représentent respectivement la tension interfaciale solide-liquide, solide-vapeur et liquide-vapeur et θ l'angle de contact de la goutte avec la surface. Image extraite de la thèse de Marcelina Cardoso Dos Santos [105].

L'angle de contact θ est donné par la relation de Young, qui décrit l'équilibre des forces pour une goutte déposée sur un substrat solide selon l'équation suivante :

$$\cos\theta_E = \frac{\gamma_{SV} - \gamma_{SL}}{\gamma_{LV}} \quad (II.1)$$

où θ_E est l'angle de contact à l'équilibre.

Cette technique va donc permettre la caractérisation de la fonctionnalisation des substrats Al-SiO₂ par mesure de l'angle de contact à chaque étape du procédé.

II.3.2 Mesure des angles de contact

Les mesures d'angle de contact sont réalisées à température ambiante en environnement salle blanche sur un système OCA20 (Dataphysics). Le substrat est d'abord placé à l'horizontal sur un porte-échantillon, puis une goutte d'eau ultra-pure de 1 μ L y est déposée à l'aide d'une seringue à une vitesse lente de 0,5 μ L/s (Figure II.7). Une caméra permet ensuite l'observation du profil de la goutte.

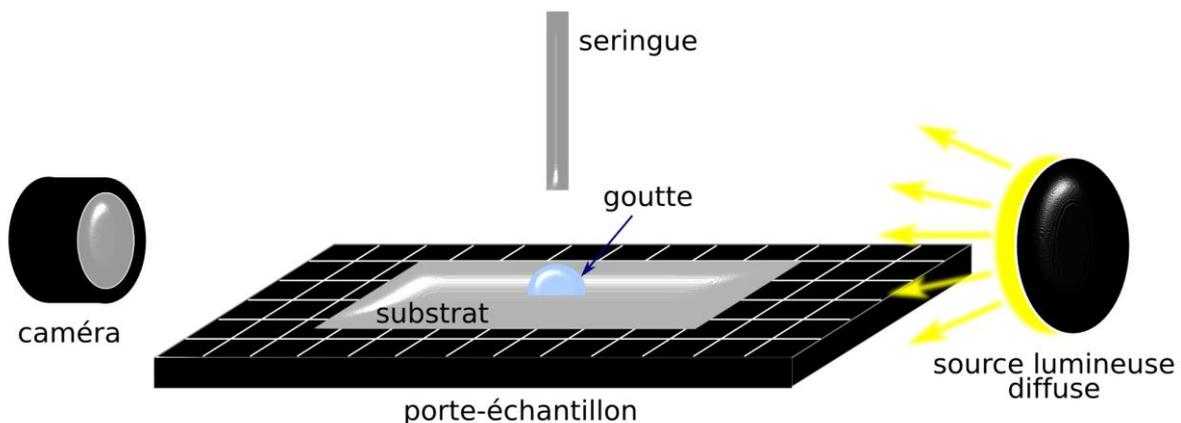


Figure II.7. Schéma de l'instrument optique de mesure d'angles de contact, équipé d'un pousse-seringue qui dépose de petites gouttes sur la surface. Une source de lumière éclaire l'échantillon par l'arrière et une caméra équipée d'un objectif permet d'observer le profil de la goutte. Image extraite de la thèse de Marcelina Cardoso Dos Santos [105].

Le logiciel SCA20 permet de tracer une ligne de base au niveau de l'interface eau/substrat, ainsi que le contour de la goutte par la méthode de Young-Laplace (qui décrit la différence de pression entre l'intérieur et l'extérieur de la goutte) et la tangente associée. L'angle de contact ainsi mesuré est relevé en différents points de l'échantillon afin de s'assurer de l'homogénéité de la surface. Le Tableau II.1 donne les valeurs moyennes des angles de contact pour les différentes étapes du procédé de greffage des aminosilanes.

Tableau II.1. Mesure d'angles de contact sur les surfaces Si/Si₃N₄-Al-SiO₂ à chaque étape du procédé de greffage des aminosilanes

Etape du procédé	Angle de contact (°) ^[a]
Sans traitement	87 ± 1
Après plasma O ₂	5 ± 1
Après silanisation par l'APTES	78 ± 9

^[a] Valeurs moyennes de 6 mesures par échantillon, pour 2 échantillons. Les surfaces relativement hydrophobes deviennent fortement hydrophiles après traitement par plasma oxygène, puis redeviennent hydrophobes après silanisation.

Les résultats présentés dans ce tableau montrent que les échantillons non traités sont relativement hydrophobes (87° ± 1°). Ils deviennent fortement hydrophiles (5° ± 1°) après un traitement par plasma oxygène, ce qui est cohérent avec une densité de surface élevée en groupements silanols (SiOH). Après aminosilanisation, les échantillons présentent à nouveau un angle de contact relativement hydrophobe (78° ± 9°) du fait de la présence du squelette de carbones et des groupements amines de l'APTES, qui présentent une tendance plus hydrophobe que les groupements silanols [106].

Ces mesures d'angle de contact permettent donc une première validation de la présence d'aminosilanes à la surface des substrats Al-SiO₂.

II.4 Caractérisation par spectroscopie FTIR

Une deuxième caractérisation de la fonctionnalisation des substrats Al-SiO₂ a été effectuée par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (spectroscopie FTIR). La spectroscopie FTIR consiste à exciter un échantillon à l'état solide, liquide ou gazeux par un rayonnement infrarouge afin de caractériser la présence de fonctions chimiques.

II.4.1 Principe général

La spectroscopie FTIR permet de mettre en évidence la présence de fonctions chimiques par la détermination de l'absorption de vibrations caractéristiques de liaisons chimiques. Le principe du FTIR repose sur l'absorption du rayonnement infrarouge lorsque la longueur d'onde (c'est-à-dire l'énergie) du faisceau est égale à l'énergie de vibration de la liaison. Le domaine infrarouge moyen, compris entre 4000 cm⁻¹ et 400 cm⁻¹ (2,5 – 25 μm), correspond au domaine d'énergie de vibration de la plupart des liaisons chimiques.

La spectroscopie FTIR est basée sur l'interaction de la lumière avec les molécules et consiste à convertir une information spectrale en une information sur la structure de la molécule étudiée. Une molécule absorbe en effet un rayonnement infrarouge à des fréquences ν bien définies, qui dépendent de la masse μ des atomes impliqués, de la force k de la liaison et de l'environnement de la molécule, selon la relation II.2 suivante :

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (\text{II.2})$$

Une liaison chimique, lorsqu'elle vibre, subit un changement de son moment dipolaire impliquant l'absorption d'une radiation infrarouge (les molécules présentant un moment dipolaire nul, comme N₂ par exemple, ne donnent donc pas lieu à une

absorption infrarouge). Il existe deux principaux types de vibration d'une molécule : les élongations (stretching), c'est-à-dire les mouvements relatifs des atomes suivant leur axe de liaison, et les déformations (bending), c'est-à-dire des mouvements impliquant une modification de l'angle entre deux liaisons adjacentes, dans le plan ou hors du plan. Ces élongations ou déformations peuvent être symétriques ou asymétriques.

Un spectromètre FTIR repose sur le principe d'un interféromètre de Michelson selon la Figure II.8. Un faisceau infrarouge est envoyé sur une lame séparatrice de faisceau pour être orienté vers un miroir fixe et un miroir mobile. Le faisceau réfléchi par le miroir fixe et le faisceau retardé issu du miroir mobile se recombinent pour exciter l'échantillon, qui produit un signal récupéré ensuite sur un détecteur.

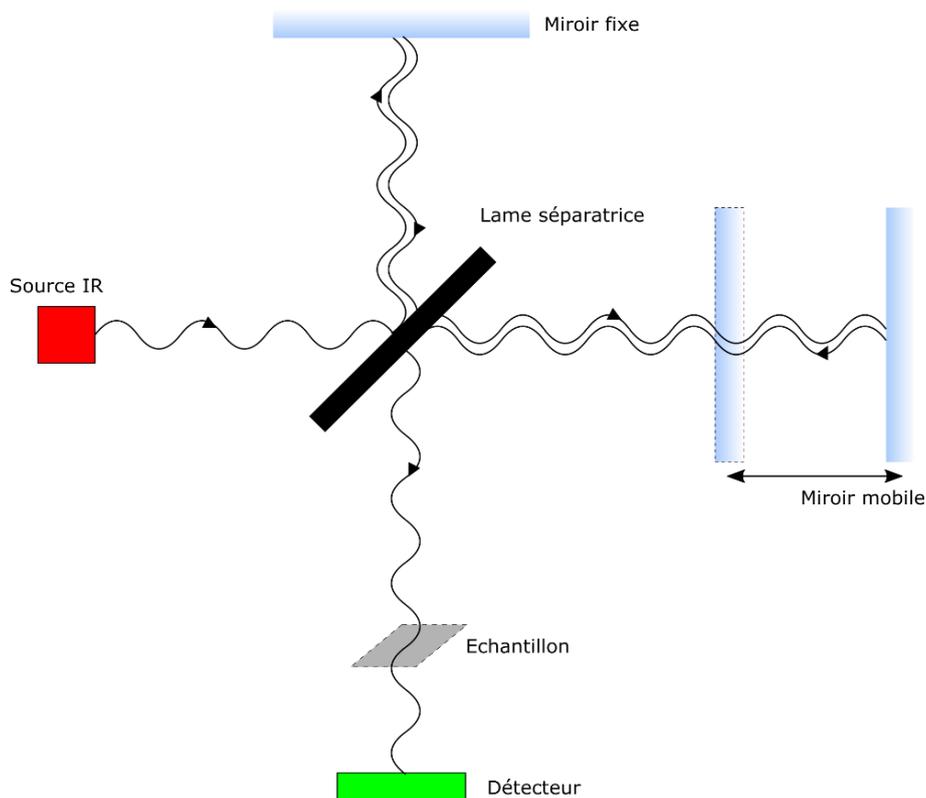


Figure II.8. Schéma de principe d'un interféromètre de Michelson configuré pour le FTIR. Le faisceau IR est envoyé sur une lame séparatrice afin d'être orienté vers un miroir fixe et un miroir mobile. Les deux faisceaux réfléchis se recombinaisonnent pour exciter l'échantillon, qui produit un signal récupéré ensuite sur un détecteur.

Une transformée de Fourier est appliquée à l'interférogramme obtenu afin d'extraire la réponse de l'échantillon en fonction du nombre d'onde. Une soustraction du bruit (comprenant la réponse instrumentale) permet d'obtenir le spectre caractéristique de l'échantillon.

II.4.2 Mesure des spectres FTIR

Les mesures de FTIR effectuées sur les échantillons Al-SiO₂ afin de valider le greffage des silanes sont réalisées sur un montage composé d'un spectromètre (Varian 670-IR, Agilent) couplé à un microscope (Varian 610-IR, Agilent) équipé de deux objectifs (15x IR, 40x visible). Les mesures sont acquises avec le mode Single Point Reflection, qui permet d'obtenir le spectre d'une zone de l'échantillon par réflexion. Les spectres sont récupérés sur un détecteur MCT (Tellurure de Mercure Cadmium) refroidi à l'azote liquide à une température de 77K. La vitesse de balayage du miroir mobile est de 25 kHz (1,58 cm/sec). La lame séparatrice, transparente à l'infrarouge moyen, est en KBr (bromure de potassium).

Les conditions de mesures sont les suivantes :

- la résolution du nombre d'onde est fixée à 8 cm⁻¹,
- le nombre de balayages est de 64 pour l'acquisition du signal de l'échantillon, et de 96 pour celle du bruit (considéré sur une surface non traitée),
- la gamme de nombres d'onde est établie de 500 cm⁻¹ à 4000 cm⁻¹ pour chaque balayage,
- toutes les zones d'intérêt sont définies sous le microscope (en lumière blanche) avant le démarrage des mesures de FTIR avec l'objectif IR,
- l'analyse du spectre est réalisée avec le logiciel Varian Pro afin de mettre en évidence les pics caractéristiques des silanes et d'optimiser les courbes d'ajustement pour l'évaluation semi-quantitative des vibrations des groupements amines des aminosilanes.

Le spectre FTIR d'un échantillon d'aluminium recouvert de silice et silanisé avec de l'APTES est présenté en Figure II.9. On peut y observer deux pics caractéristiques

des liaisons N-H, qui permettent de mettre en évidence la présence des aminosilanes à la surface de l'échantillon. Le premier pic est une large bande à 3240 cm^{-1} , caractéristique de l'élongation asymétrique de la liaison N-H, et représentatif d'une interaction d'un groupement amine NH_2 avec la surface de silice [107]. Le deuxième pic est un léger épaulement à 1440 cm^{-1} , attribué à une déformation de la liaison N-H, et indicatif de la présence de groupements amines libres [107]. On note que l'élongation demande plus d'énergie que la rotation, car il s'agit d'un processus dans lequel la molécule gagne plus en volume. Sur les trois spectres FTIR ci-dessous (Figures II.9, II.10 et II.11), on distingue des zones plus ou moins étendues qui ne sont pas à prendre en compte dans l'analyse de la silanisation. Il s'agit des vibrations des groupes carbonés ($\text{C}=\text{O}$, CH) au-delà de 5000 cm^{-1} , des liaisons OH dues à l'humidité de l'air ambiant entre 3500 cm^{-1} et 4000 cm^{-1} et des groupes Si-O-Si présentant plusieurs pics sur une région étendue de 1050 cm^{-1} à 1600 cm^{-1} .

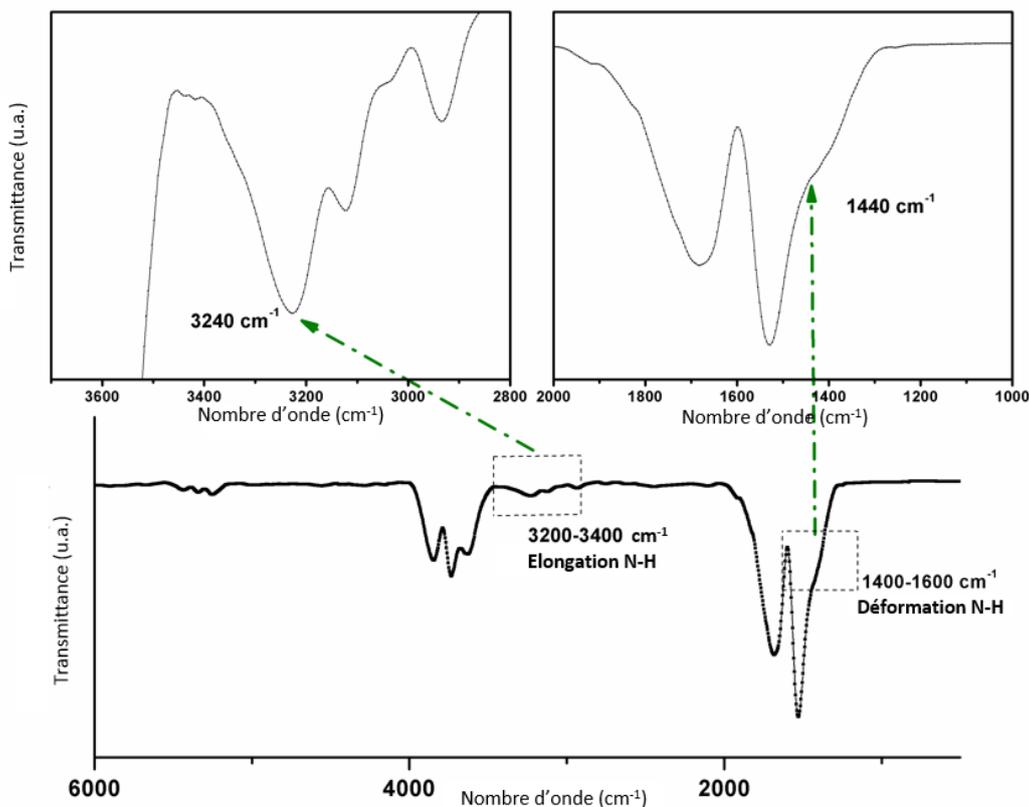


Figure II.9. Spectre FTIR (en bas) et agrandissement des régions spectrales spécifiques (en haut) des surfaces Al-SiO_2 silanisées. Les pics à 3240 cm^{-1} et 1440 cm^{-1} sont caractéristiques respectivement de l'élongation et de la déformation de la liaison N-H.

La Figure II.10 montre qu'un échantillon d'aluminium non recouvert de silice qui a subi un protocole de silanisation ne présente pas de pic caractéristique des liaisons N-H, soulignant ainsi l'importance du revêtement de silice pour une silanisation contrôlée.

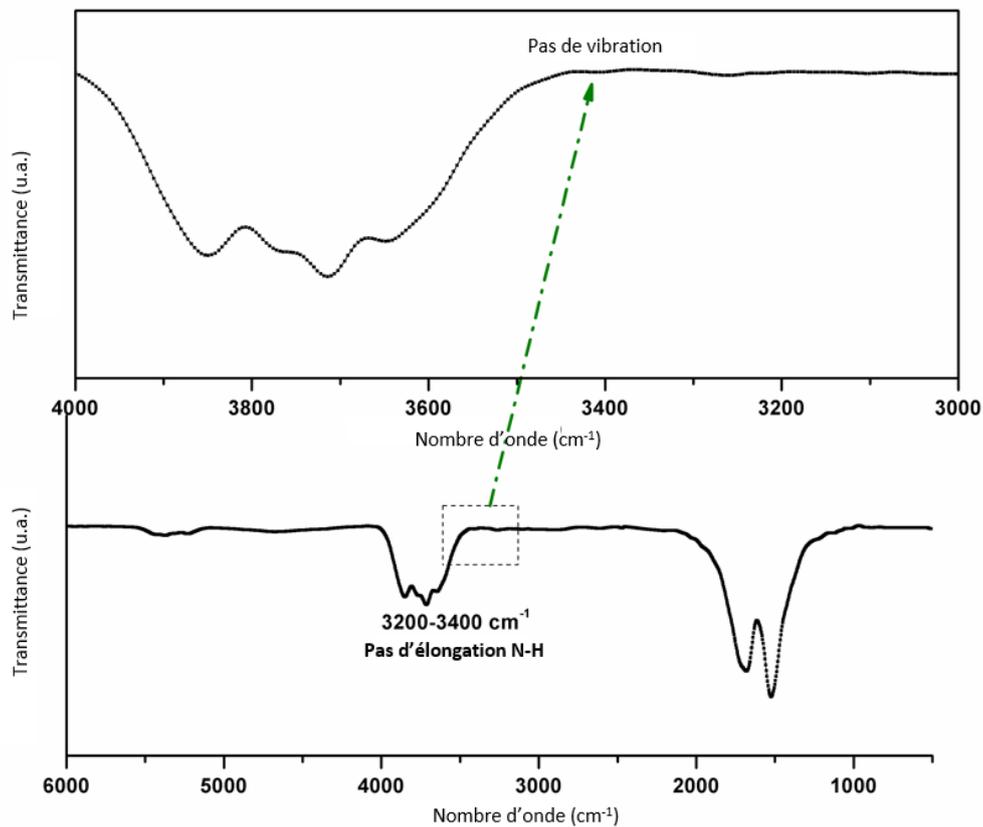


Figure II.10. Spectre FTIR pour une surface d'aluminium non recouverte de silice, et silanisée avec l'APTES. Comme attendu, il n'y a pas de marque de silanisation sur ces échantillons.

Le spectre FTIR d'une surface de silice seule, sans aluminium, et silanisée, est présenté en Figure II.11. On y retrouve comme attendu les pics caractéristiques des élongations (3240 cm^{-1}) et déformations (1440 cm^{-1}) de la liaison N-H, ce qui valide le greffage des aminosilanes sur ces structures.

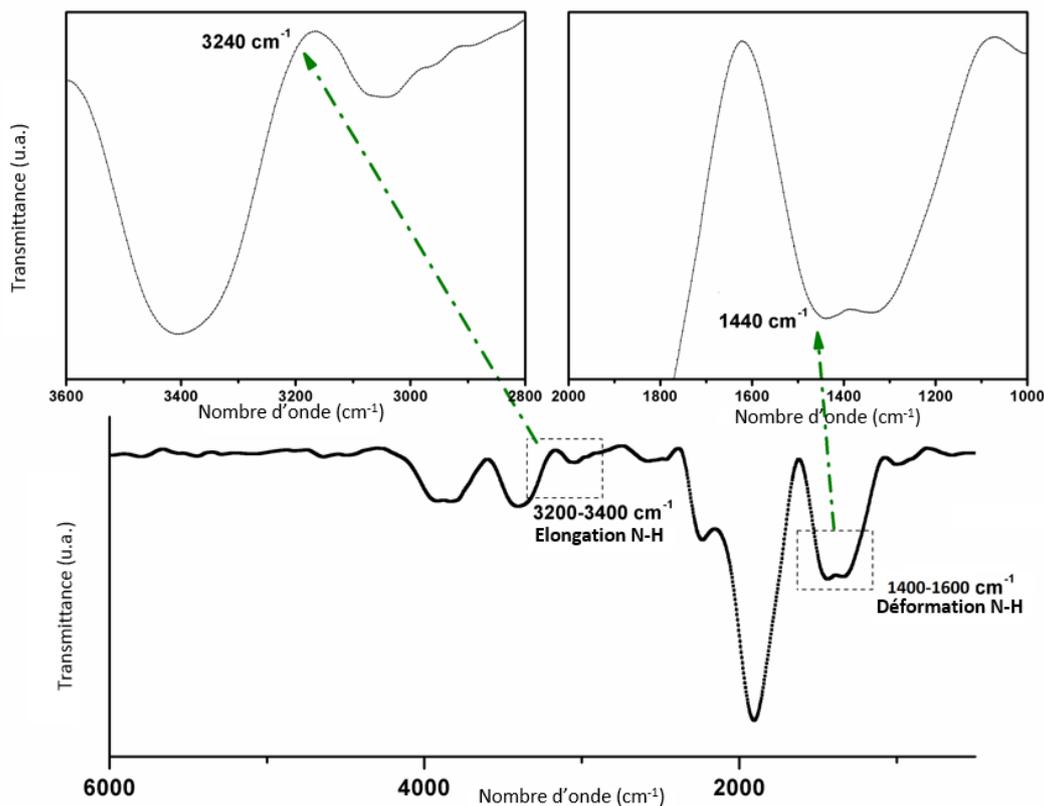


Figure II.11. Spectre FTIR d'une surface de silice silanisée. Les pics à 3240 cm^{-1} et 1440 cm^{-1} , caractéristiques respectivement de l'élongation et de la déformation de la liaison N-H, mettent en évidence la silanisation.

La Figure II.12 montre le spectre FTIR d'un échantillon de référence d'aluminium recouvert de silice non silanisé. Comme attendu après plasma oxygène, le spectre présente les pics caractéristiques des élongations des liaisons OH libres ($3400 - 4000\text{ cm}^{-1}$) et des déformations des liaisons Si-O-Si ($500 - 1150\text{ cm}^{-1}$). Il est à noter que la bande de vibration des liaisons Si-O-Si est décalée vers les basses énergies par rapport à une surface silanisée, ce qui s'explique par une excitation beaucoup plus aisée de la couche de silice en l'absence d'une couche de silanes (présentant des agrégats après fonctionnalisation). Ceci permet d'établir que le traitement de surface est réussi.

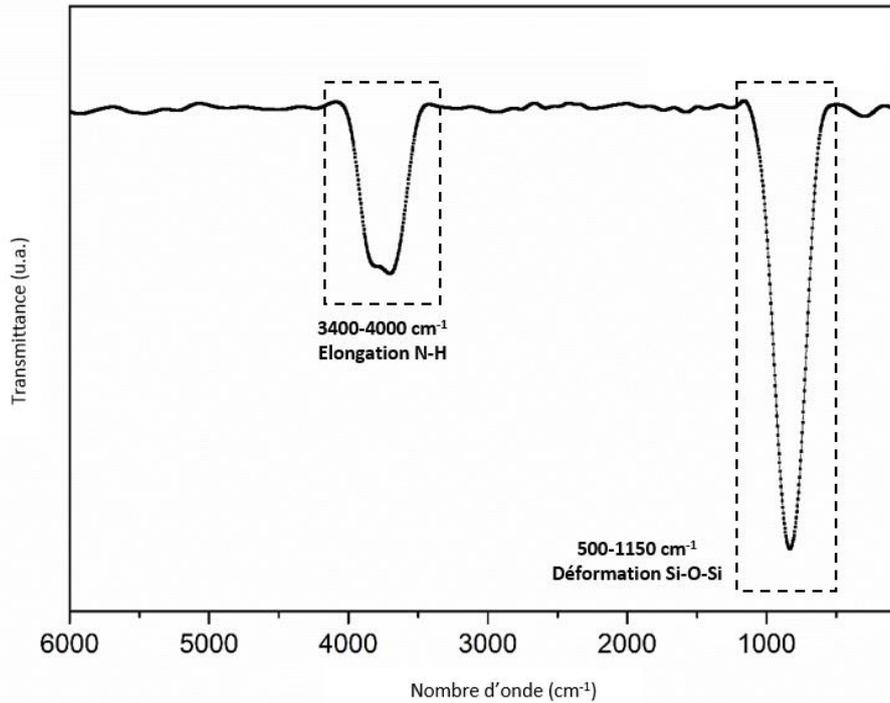


Figure II.12. Spectre FTIR d'une surface référence Al-SiO₂ non silanisée. La zone de 3400 cm⁻¹ à 4000 cm⁻¹ est caractéristique des élongations des liaisons OH libres après traitement par plasma oxygène de la surface ; la zone de 500 cm⁻¹ à 1150 cm⁻¹ est caractéristique de la déformation des liaisons Si-O-Si sur la surface Al-SiO₂ non silanisée.

Ainsi, les mesures réalisées par spectroscopie FTIR montrent une deuxième validation de la présence d'aminosilanes à la surface des échantillons Al-SiO₂.

II.5 Greffage des fluorophores

Afin de démontrer la faisabilité sur les échantillons Al-SiO₂ d'un dispositif de biodétection reposant sur la technique de FRET, j'ai d'abord effectué un greffage de colorants sur les aminosilanes pour en étudier la fluorescence.

II.5.1 Conjugaison des colorants aux aminosilanes

Les échantillons Al-SiO₂ silanisés sont dans un premier temps fonctionnalisés avec des colorants organiques comportant un groupement N-hydroxysuccinimide (NHS) selon la Figure II.13. Une goutte de 20 µL du colorant ATTO 647N NHS (MM = 843 g/mol, $\epsilon_{\text{max}} = 1,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\eta_{\text{fl}} = 65\%$, $\tau_{\text{fl}} = 3,5 \text{ ns}$, AD 647N, ATTO-TEC) dilué dans un tampon carbonate à pH 9 est déposée pendant 1h sur chaque surface investiguée. Les échantillons sont ensuite rincés trois fois pendant 5 minutes dans l'eau désionisée puis séchés à l'air comprimé avant d'être stockés dans des boîtes Fluoroware 1" (VWR).

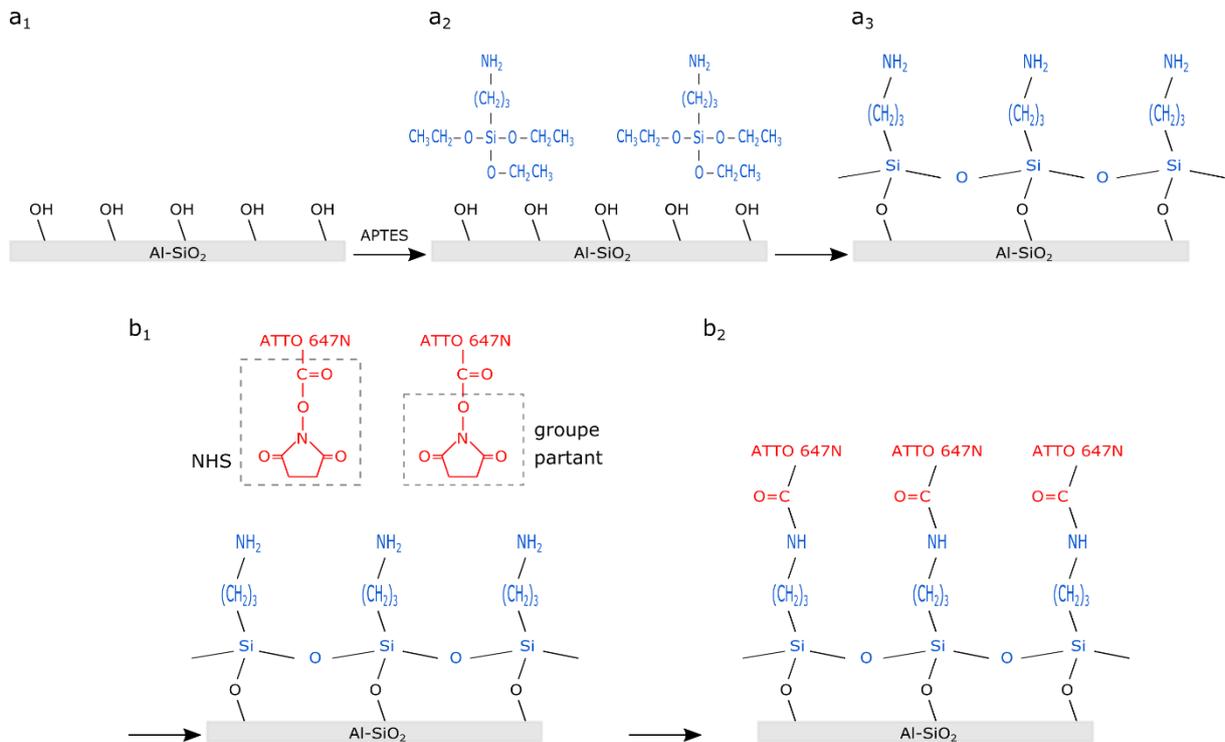


Figure II.13. Fonctionnalisation des surfaces avec les colorants organiques : (a₁) Surface activée par plasma oxygène, (a₂) Incubation de la surface avec les aminosilanes, (a₃) Formation des liaisons Si-O-Si entre la surface et les aminosilanes, (b₁) Incubation des surfaces silanisées avec les colorants organiques ATTO 647N NHS, (b₂) Formation des liaisons amides entre les silanes et les ATTO 647N.

Il est à noter que des mesures d'angle de contact ont été effectuées après l'étape de greffage des colorants. On rappelle que les résultats présentés dans la troisième sous-partie de ce chapitre pour des substrats Al-SiO₂ silanisés par l'APTES donnent une valeur moyenne de 78° ± 9°. Après l'étape de greffage des colorants, on trouve une valeur moyenne d'angle de contact de 63° ± 8°. Ceci constitue une première validation de la fonctionnalisation des substrats par les fluorophores, car l'ATTO 647N NHS est légèrement hydrophile, d'où la diminution de la valeur de l'angle de contact.

Une dernière caractérisation des substrats Al-SiO₂, celle-ci quantitative, a été réalisée par imagerie de fluorescence.

II.5.2 Procédures d'acquisition et de traitement des images de fluorescence

Les paramètres d'acquisition par microscopie optique sont tout d'abord optimisés afin d'observer l'intensité de fluorescence émise par les échantillons Al-SiO₂ fonctionnalisés.

Les images des structures sont acquises à l'aide d'un microscope de luminescence en champ large inversé (IX71, Olympus) et d'un objectif à immersion à eau de grandissement 40x et d'ouverture numérique 1,15 (UAPON340, Olympus). Une source de lumière excitatrice en champ large pour la fluorescence (X-Cite 120Q) produit un faisceau d'une puissance de 14,4W. Pour l'observation des ATTO 647N NHS, une sélection spectrale de la lumière excitatrice est effectuée sur ce faisceau à l'aide d'un filtre d'excitation passe-bande 620/14 nm – c'est-à-dire 620 ± 7 nm, cette notation est valable pour tous les filtres mentionnés dans ce manuscrit – (FF01-620/14-25, BrightLine, Semrock). Le faisceau entrant dans le microscope est renvoyé vers l'objectif à l'aide d'un miroir dichroïque (F38-649 Beamsplitter HC BS 649 FF649-Di01-25x36, BrightLine, Semrock) positionné à 45°. Les longueurs d'onde inférieures à 649 nm sont réfléchies par le miroir dichroïque afin d'exciter l'échantillon. Le signal de fluorescence de l'échantillon est collecté par l'objectif, puis traverse le miroir dichroïque, qui transmet les longueurs d'onde supérieures à 649 nm, puis un filtre d'émission passe-bande 660/13 nm (FF01-660/13-25, BrightLine, Semrock). Le signal

de fluorescence est ensuite détecté par une caméra sCMOS 2560 x 2160 pixels dont les pixels mesurent $6,5 \mu\text{m} \times 6,5 \mu\text{m}$ (PCO edge). Le temps d'acquisition est établi à 300 ms. Le schéma de principe de l'observation par microscopie de fluorescence est résumé en Figure II.14.

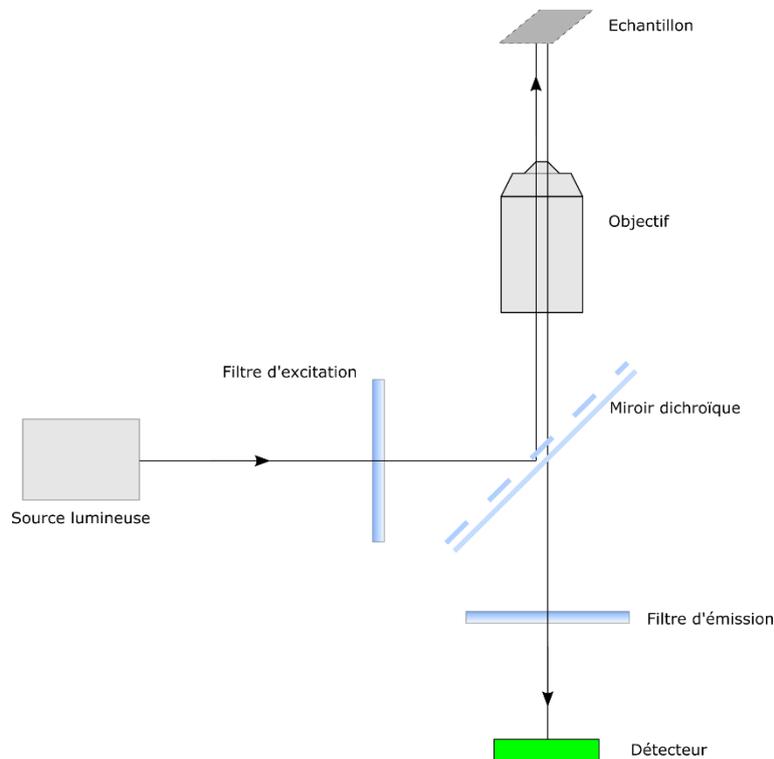


Figure II.14. Schéma de principe de l'imagerie de fluorescence.

Les images ainsi acquises sont traitées à l'aide d'un programme développé dans l'équipe en utilisant le logiciel Matlab ainsi que le logiciel Icy [108]. Le code de la procédure de traitement des images de fluorescence développée ci-après est donné dans l'Annexe A.

Pour chaque image, une correction du bruit est appliquée en soustrayant la valeur moyenne d'une surface non traitée, c'est-à-dire simplement nettoyée à l'acétone et à l'isopropanol à réception des échantillons, et n'ayant subi ni plasma O_2 , ni silanisation, ni greffage de colorants. Les échantillons étudiés étant Al-SiO₂, ainsi que l'aluminium seul (Al) et la silice seule (SiO₂) comme contrôles, chaque bruit est considéré sur le type d'échantillon correspondant (respectivement Al-SiO₂, Al et SiO₂).

Après cette première étape de correction du bruit, un masque est appliqué sur chaque image. Ce masque est caractérisé par un seuil d'intensité au-delà duquel les pixels ne sont plus considérés pour la détermination de l'intensité moyenne de fluorescence, et par une distance de sécurité de 16 pixels autour de ces pixels. Ceci permet de s'affranchir des agrégats, et ainsi de ne considérer que la fluorescence réellement issue de la fonctionnalisation. En effet, une hétérogénéité de la fluorescence peut être due à un rinçage imparfait, à la présence d'agrégats de silanes, ou à celle d'agrégats de colorants potentiellement non greffés de façon covalente. La procédure de traitement des images est représentée en Figure II.15.



Figure II.15. Représentation de la procédure de traitement d'images par application du masque après soustraction du bruit. Les images de fluorescence sont représentées en fausses couleurs de 0 à 200 coups du bleu vers le rouge (échelle de couleur JET sur Icy). L'échelle représente 50 μm , et l'image mesure 1400 x 1400 pixels. Exemple pour un échantillon Al-SiO₂ fonctionnalisé avec l'ATTO 647N à la concentration de 1 mg/mL.

Après ce traitement, une fonction Kernel est appliquée aux données obtenues. Les méthodes Kernel constituent une classe d'algorithmes linéaires dédiés à la reconnaissance de modèles non linéaires. 50 fenêtres (bins) sont considérées afin de déterminer pour chaque image la valeur moyenne μ de l'intensité de fluorescence ainsi que l'écart-type σ associé. Les histogrammes et leurs courbes d'ajustement sont tracés, et les images corrigées sont affichées sur Icy. En outre, afin de s'assurer de la fiabilité de la méthode, le nombre de pixels utilisé après correction pour calculer l'intensité moyenne de fluorescence de l'échantillon est également déterminé pour chaque région d'intérêt (ROI pour Region of interest). Ces ROI sont choisis d'abord au centre de la membrane de Si₃N₄, puis au niveau des frontières entre cette membrane

et le substrat de Si/Si₃N₄. Les informations associées à la Figure II.15 qui sont données par le programme sont présentées en Figure II.16 comme exemple.

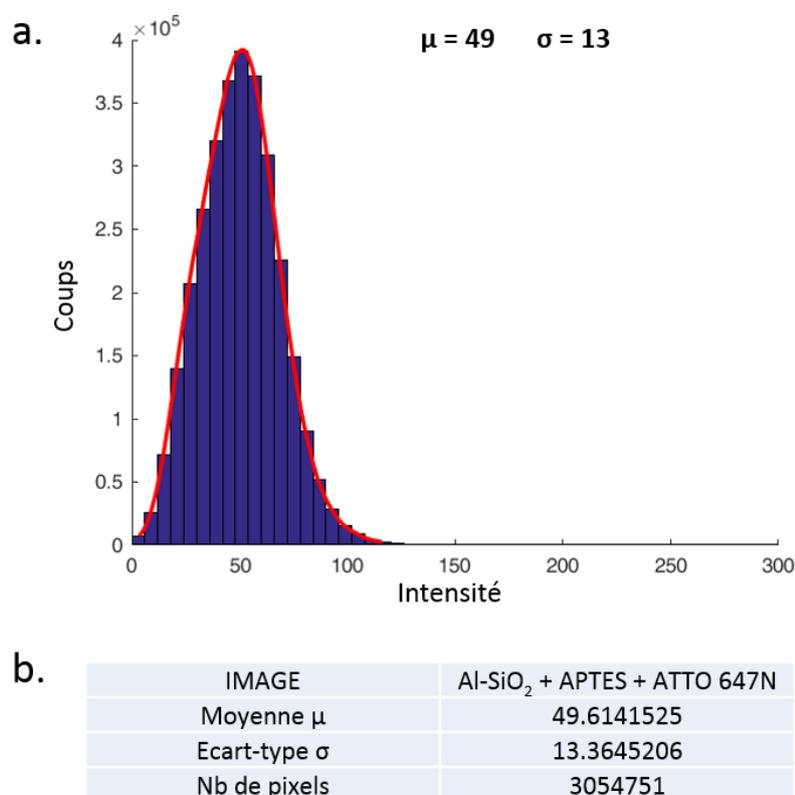


Figure II.16. Exemple de données extraites de la procédure de traitement d'images. En a, histogramme et courbe d'ajustement associée donnée directement par le programme. En b, tableau extrait du fichier donnant la moyenne μ , l'écart-type σ , ainsi que le nombre de pixels considérés pour le calcul. Données correspondant à un ROI d'un échantillon d'Al-SiO₂ fonctionnalisé avec l'ATTO 647N à la concentration de 1 mg/mL.

Cette opération est effectuée pour chaque ROI pour chaque échantillon étudié. La moyenne est déterminée pour chaque type d'échantillon.

II.5.3 Etude quantitative de la fluorescence des substrats Al-SiO₂ fonctionnalisés

Dans l'optique d'extraire les informations nécessaires à l'établissement d'un biocapteur reposant sur la technique de FRET sur les échantillons d'aluminium recouverts de silice, j'ai réalisé une étude approfondie de l'intensité de fluorescence sur les structures.

Les images obtenues en microscopie optique présentées en Figure II.17 montrent les substrats Al-SiO₂ fonctionnalisés (Al-SiO₂ + APTES + ATTO 647N, image a.) ainsi que les contrôles associés : Al-SiO₂ non silanisé (Al-SiO₂ + ATTO 647N, image b.), SiO₂ fonctionnalisée (SiO₂ + APTES + ATTO 647N, image c.) et Al fonctionnalisé (Al + ATTO 647N, image d.).

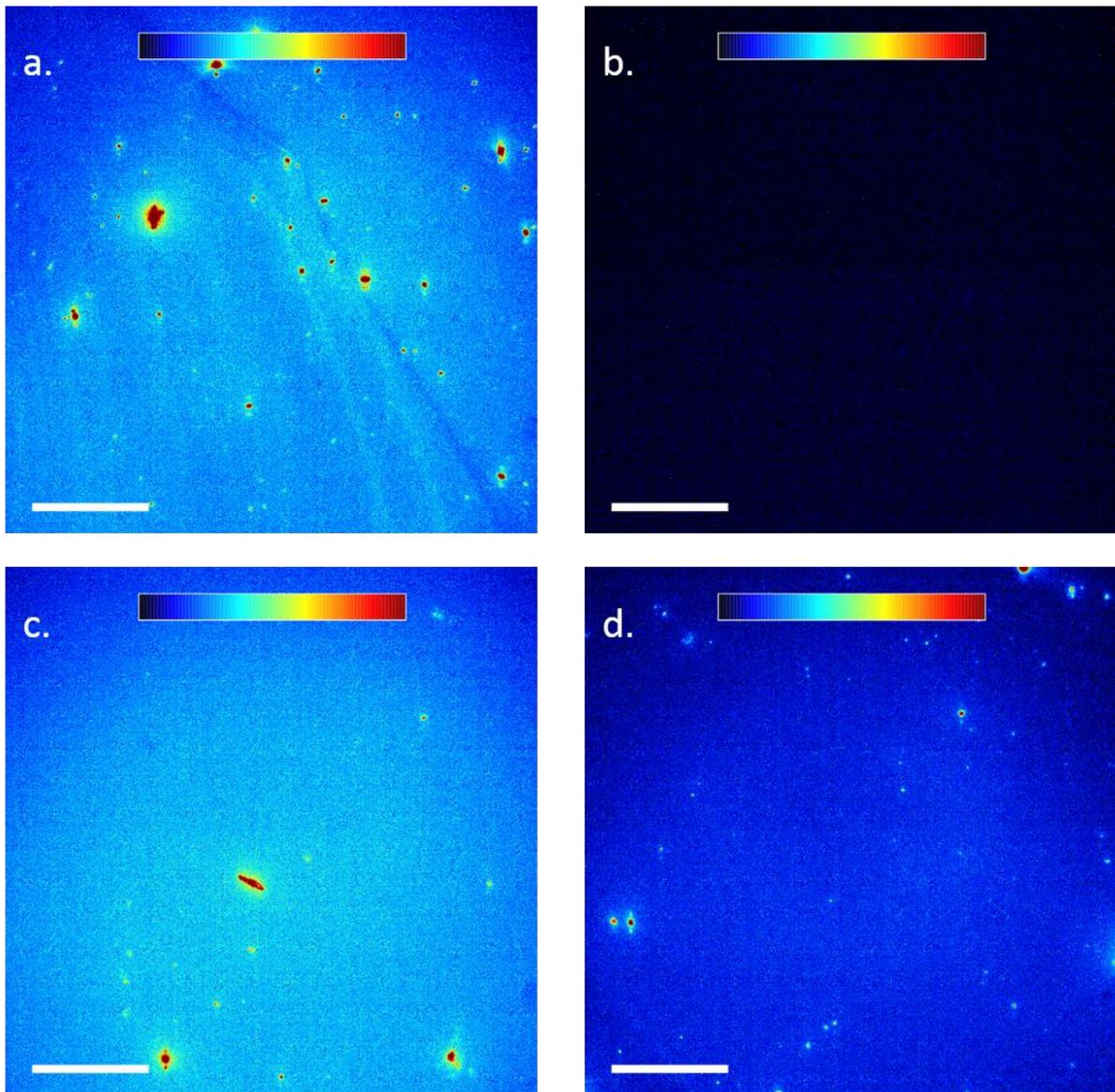


Figure II.17. Images de fluorescence (après soustraction du bruit) des substrats Al-SiO₂ + APTES + ATTO 647N (a), Al-SiO₂ + ATTO 647N (b), SiO₂ + APTES + ATTO 647N (c) et Al + APTES + ATTO 647N (d). Les images sont représentées en fausses couleurs de 0 à 200 coups du bleu vers le rouge (échelle de couleur JET sur Icy). L'échelle représente 50 μ m, et l'image mesure 1400 x 1400 pixels.

Ces images, qui représentent une zone d'une seule structure, permettent déjà de valider la fonctionnalisation réussie des substrats Al-SiO₂ par la silanisation à l'APTES et le greffage consécutif des colorants ATTO 647N NHS (image a.). On peut également voir qu'un substrat non silanisé qui a subi un protocole de greffage des colorants ne présente pas de fluorescence (image b.), ce qui confirme d'une part la nécessité de l'étape de silanisation dans le protocole de fonctionnalisation, et d'autre part l'absence d'adsorption non spécifique pour un échantillon nettoyé par plasma O₂. L'intensité de fluorescence d'un substrat de silice (sans couche d'aluminium sous-jacente) fonctionnalisé (image c.) apparaît similaire à celle d'un substrat Al-SiO₂ fonctionnalisé, laissant supposer une absence d'extinction (quenching) de la fluorescence qui pourrait être due à l'aluminium. Finalement, un substrat d'aluminium seul (sans couche de silice) fonctionnalisé (image d.) semble présenter une intensité de fluorescence inférieure à celle d'un substrat Al-SiO₂ fonctionnalisé, indiquant l'importance de la couche de silice pour une silanisation contrôlée et optimale.

Afin de corroborer ces premières conclusions, j'ai réalisé une étude quantitative de l'intensité de fluorescence en considérant plusieurs zones d'intérêt sur plusieurs échantillons du même type. J'ai pour cela utilisé la procédure de traitement d'images décrite précédemment.

J'ai tout d'abord cherché à justifier l'importance du traitement par plasma oxygène dans le protocole de fonctionnalisation. Pour cela, j'ai considéré chaque type d'échantillon, Al-SiO₂, Al et SiO₂. Chaque substrat a été nettoyé à l'acétone et à l'isopropanol, puis séché à l'azote. Il a ensuite subi ou non un traitement par plasma oxygène, puis une goutte de 20 µL du colorant ATTO 647N NHS à 2 mg/mL y a été déposée pendant 1 heure. L'échantillon a finalement été rincé à l'eau déminéralisée et séché à l'air. Les intensités de fluorescence obtenues pour ces échantillons contrôles sont présentées dans le Tableau II.2.

Tableau II.2. Intensité de fluorescence pour chaque type d'échantillon non silanisé après protocole de conjugaison avec l'ATTO 647N

Type d'échantillon ^[a]	Traitement par plasma O ₂	Intensité moyenne (coups) ^[b]
Al-SiO ₂	oui	9 ± 7
Al-SiO ₂	non	57 ± 16
Al	oui	4 ± 5
Al	non	11 ± 8
SiO ₂	oui	13 ± 8
SiO ₂	non	118 ± 27

^[a] Tous les échantillons sont incubés avec une goutte de 20 µL d'ATTO 647N NHS à 2 mg/mL. Le bruit soustrait est mesuré sur un échantillon du même type sans plasma O₂ ni silanisation ni conjugaison avec le colorant. ^[b] Intensité moyenne de fluorescence après traitement (soustraction du bruit, application du masque visant à s'affranchir des agrégats) pour environ $3 \times 10^6 \pm 1 \times 10^4$ pixels par ROI. Les erreurs ont été calculées sur les intensités des différents ROIs. Pour ces échantillons contrôles, trois à cinq ROIs ont été considérés par échantillon (pour 1 échantillon pour Al-SiO₂ et deux échantillons pour Al et SiO₂). Ces mesures ont également été réalisées sur des échantillons Al-SiO₂ pour 0,5 mg/mL d'ATTO 647N NHS, ce qui correspond au maximum d'intensité de la Figure III.1 (chapitre III) ; ces mesures ont donné des résultats similaires, à savoir 8 ± 7 avec traitement par plasma O₂ et 77 ± 18 sans traitement.

Ces mesures permettent de constater que sans traitement par plasma oxygène, les valeurs d'intensité de fluorescence sont élevées et assez aléatoires, ce qui est certainement dû à l'adsorption non spécifique et non contrôlée du colorant sur les différentes surfaces. Les substrats traités par plasma O₂ présentent eux des valeurs d'intensité de fluorescence basses et peu variables, comme attendu pour ces échantillons de contrôle. Le traitement par plasma oxygène est donc une étape de nettoyage nécessaire dans le protocole de fonctionnalisation.

J'ai également réalisé l'étude de l'intensité de fluorescence sur les trois types d'échantillons – Al-SiO₂, Al et SiO₂ – fonctionnalisés. Chaque substrat a été nettoyé à

l'acétone et à l'isopropanol, puis séché à l'azote. Il a ensuite été traité par plasma oxygène, silanisé par l'APTES, puis une goutte de 20 μL du colorant ATTO 647N NHS à 1 mg/mL y a été déposée pendant 1 heure. L'échantillon a finalement été rincé à l'eau déminéralisée et séché à l'air comprimé. Les intensités de fluorescence obtenues pour ces échantillons fonctionnalisés sont présentées dans le Tableau II.3.

Tableau II.3. Intensité moyenne de fluorescence pour chaque type d'échantillon fonctionnalisé

Type d'échantillon ^[a]	Traitement par plasma O ₂	Intensité moyenne (coups) ^[b]
Al-SiO ₂ -APTES	oui	54 \pm 17
Al-APTES	oui	30 \pm 15
SiO ₂ -APTES	oui	49 \pm 14

^[a] Tous les échantillons sont incubés avec une goutte de 20 μL d'ATTO 647N NHS à 1 mg/mL. Le bruit soustrait est mesuré sur un échantillon du même type sans plasma O₂ ni silanisation ni conjugaison avec le colorant. ^[b] Intensité moyenne de fluorescence après traitement (soustraction du bruit, application du masque visant à s'affranchir des agrégats) pour environ $3 \times 10^6 \pm 1 \times 10^4$ pixels par ROI. Les erreurs ont été calculées sur les intensités des différents ROIs. Pour ces échantillons fonctionnalisés, 3 ROIs ont été considérés.

La première ligne de ce tableau permet de valider la fonctionnalisation des substrats Al-SiO₂ par l'APTES et l'ATTO 647N NHS. En effet, l'intensité moyenne est de 54 \pm 17 coups, ce qui est à comparer à l'intensité d'un échantillon contrôle de 9 \pm 7 coups (Tableau II.2, première ligne).

En outre, les substrats d'aluminium seul présentent une intensité de fluorescence inférieure (30 \pm 15) à ceux recouverts d'une couche de silice (54 \pm 17), ce qui confirme l'importance de la couche de silice pour une fonctionnalisation contrôlée et optimale.

On constate également que les échantillons de silice seule SiO₂ présentent une intensité de fluorescence similaire à celle des échantillons d'aluminium recouverts de silice Al-SiO₂ : 49 \pm 14 coups pour SiO₂ contre 54 \pm 17 coups pour Al-SiO₂. Ceci

indique que la couche d'aluminium sous-jacente n'implique pas d'extinction (quenching) de la fluorescence des ATTO 647N.

Finalement, nous avons pu valider le greffage des colorants organiques ATTO 647N NHS aux aminosilanes par une étude quantitative de l'intensité de fluorescence. Ceci a nécessité la mise en place d'une procédure de traitement d'images permettant de s'affranchir de la fluorescence des agrégats. Nous avons également pu montrer l'importance du traitement par plasma oxygène dans le nettoyage des surfaces, ainsi que la nécessité du revêtement de silice pour une fonctionnalisation contrôlée et optimale. En outre, nous avons pu observer que la couche d'aluminium n'implique pas d'extinction de la fluorescence des ATTO 647N.

II.6 Conclusion

J'ai développé un protocole de fonctionnalisation de substrats d'aluminium recouverts de silice s'appuyant sur l'aminosilanisation et le greffage de colorants organiques par conjugaison NHS. Le procédé a été caractérisé par mesure d'angles de contact, par spectroscopie FTIR, ainsi que par imagerie de fluorescence, et chaque étape a pu être validée de façon semi-quantitative ou quantitative. Une étude approfondie de l'intensité de fluorescence utilisant une procédure de traitement d'images permettant de s'affranchir de la fluorescence des agrégats a permis de démontrer la faisabilité sur les échantillons Al-SiO₂ d'un dispositif de biodétection.

Il est important de noter que ce procédé a été développé dans le but de pouvoir être adapté à n'importe quel métal choisi pour des raisons liées notamment à la plasmonique. D'autres métaux comme l'or ou l'argent pourraient être considérés à la place de l'aluminium, d'autres aminosilanes, voire d'autres types de silanes (alkylsilanes par exemple) pourraient être utilisés au lieu de l'APTES, et différents types de fluorophores (colorants organiques, quantum dots, lanthanides), dans différentes gammes de longueur d'onde, pourraient remplacer les ATTO 647N.

J'ai donc développé un procédé de fonctionnalisation adaptable pour des applications en plasmonique et en biodétection. La suite de l'étude, présentée dans le chapitre III, porte sur le FRET dépendant de la concentration. Ceci est réalisé dans l'optique de poser les bases d'un biocapteur reposant sur la technique de FRET sur les substrats Al-SiO₂.

III Etude du FRET dépendant de la concentration

III.1 Etude de la concentration en fluorophores

Dans l'optique de développer un biocapteur pleine plaque basé sur la technique de FRET, j'ai réalisé l'étude du FRET sur les surfaces Al-SiO₂ en fonction de la concentration en fluorophores. J'ai tout d'abord considéré le colorant organique ATTO 647N précédemment investigué afin d'étudier l'influence de la concentration en fluorophores sur l'intensité de fluorescence des substrats silanisés, puis j'ai couplé l'ATTO 647N à l'ATTO 550 afin d'étudier le phénomène de FRET sur les surfaces.

Les substrats Al-SiO₂ sont fonctionnalisés selon le protocole décrit précédemment (II.2. et II.5.), avec des concentrations d'ATTO 647N NHS de 0,01 mg/mL à 2,0 mg/mL. Trois à quatre échantillons sont considérés pour chaque concentration afin de s'assurer de la reproductibilité de l'expérience. La procédure de traitement est celle détaillée en II.5.2. La courbe représentant l'intensité de fluorescence des substrats Al-SiO₂ fonctionnalisés en fonction de la concentration en colorant organique ATTO 647N est représentée en Figure III.1.

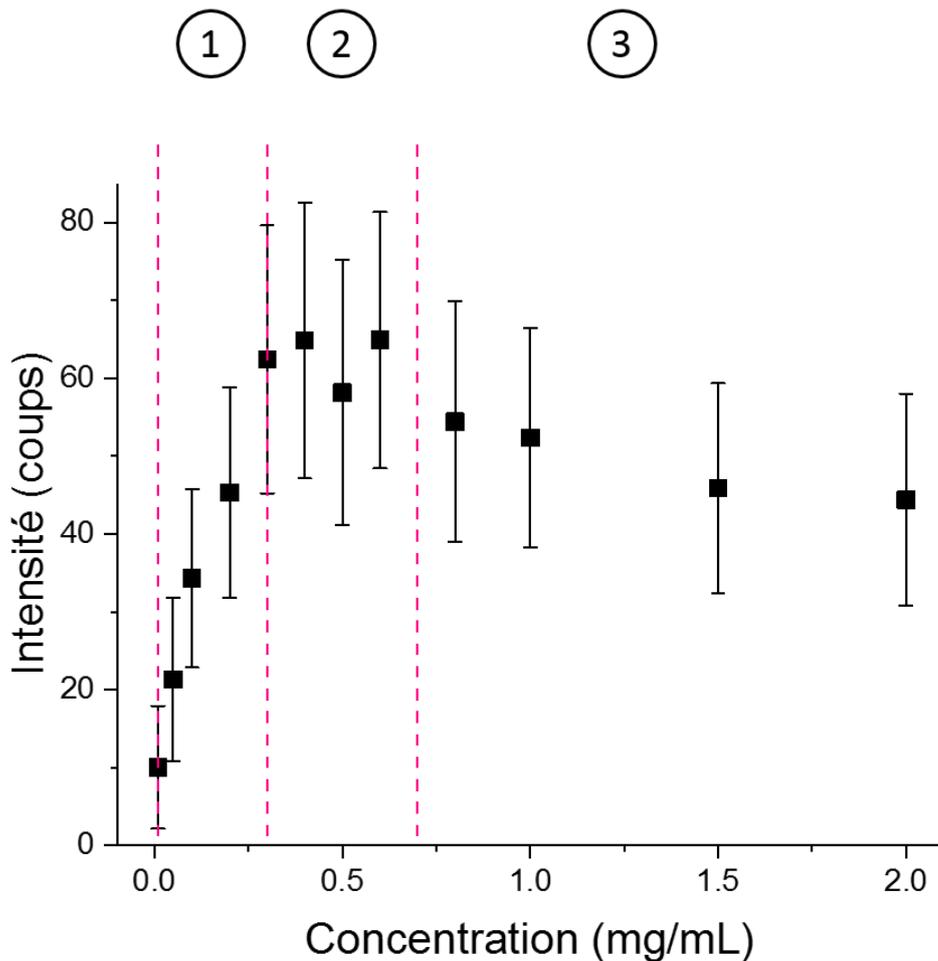


Figure III.1. Intensité de fluorescence après traitement (soustraction du bruit, application du masque visant à s'affranchir des agrégats) des substrats Al-SiO₂ fonctionnalisés, en fonction de la concentration en ATTO 647N. Les intensités moyennes sont déterminées pour 3 à 4 échantillons (9 à 12 ROI, environ $3 \times 10^6 \pm 1 \times 10^4$ pixels par ROI) par concentration.

La Figure III.1 montre une dépendance de la fluorescence en fonction de la concentration en fluorophores selon trois régimes. Dans le premier régime, de 0,01 mg/mL à 0,3 mg/mL, l'intensité de fluorescence augmente de façon quasiment linéaire de 10 à 60 coups en moyenne. Le choix d'une concentration dans ce premier régime offre la possibilité d'ajuster l'intensité de fluorescence ainsi que la densité de fluorophores sur les surfaces Al-SiO₂ silanisées.

Le deuxième régime, de 0,3 mg/mL à 0,7 mg/mL, constitue un plateau d'une intensité moyenne d'environ 60 coups. Ce plateau présente le meilleur rapport colorants/silanes, et permet une gamme de concentrations relativement importante

pour des conjugaisons reproductibles. La surface est saturée en fluorophores, et ce régime ne permet donc pas d'ajustement en termes de densité de fluorophores.

Le troisième régime, au-delà de 0,7 mg/mL, présente une légère décroissance de l'intensité de fluorescence. Ceci peut s'expliquer par différents phénomènes : transfert de charge, transfert d'énergie [34], ou encore effet de filtre interne local (local inner filter effect) [109].

Le mécanisme de transfert de charge nécessite le recouvrement des orbitales des molécules de fluorophores, qui diminue de façon exponentielle avec l'augmentation de la distance entre le donneur et l'accepteur. Il s'agit donc d'un phénomène ayant lieu pour des distances intermoléculaires très courtes, ce qui peut être le cas pour les concentrations élevées de ce troisième régime. A ces distances, le formalisme du FRET ne s'applique pas.

Le phénomène de transfert d'énergie peut avoir lieu selon deux mécanismes : transfert de Dexter, possible si les colorants sont en contact, et FRET, qui nécessitent tous deux le recouvrement des spectres d'émission du donneur et d'absorption de l'accepteur. Dans ce cas, il s'agira d'homo-FRET, puisque le donneur et l'accepteur sont tous deux des molécules d'ATTO 647N.

Ces deux mécanismes de transfert de charge et de transfert d'énergie sont détaillés dans la Figure III.2, qui donne une représentation schématique des différents mécanismes de transferts de charge et d'énergie. L'excitation d'un donneur dans l'état fondamental (a) implique un transfert d'énergie ou d'électron pour la paire donneur – accepteur vers une configuration où le donneur est dans un état excité et l'accepteur dans l'état fondamental ($b_1 - b_4$). Les configurations au centre (b_2, b_3) montrent le transfert d'énergie par transitions électroniques simultanées (FRET, b_2) et par échanges simultanés d'électrons (Dexter, b_3), ce qui donne le donneur dans l'état fondamental et l'accepteur dans un état excité (c_2). Les configurations présentées à gauche (b_1 et c_1) et à droite (b_4 et c_3) montrent le transfert d'électrons photoinduit qui mène à la formation de paires d'ions radicaux. Ces paires d'ions radicaux subissent un nouveau transfert de charge vers une forme où le donneur est dans l'état fondamental et l'accepteur dans un état excité (c_2).

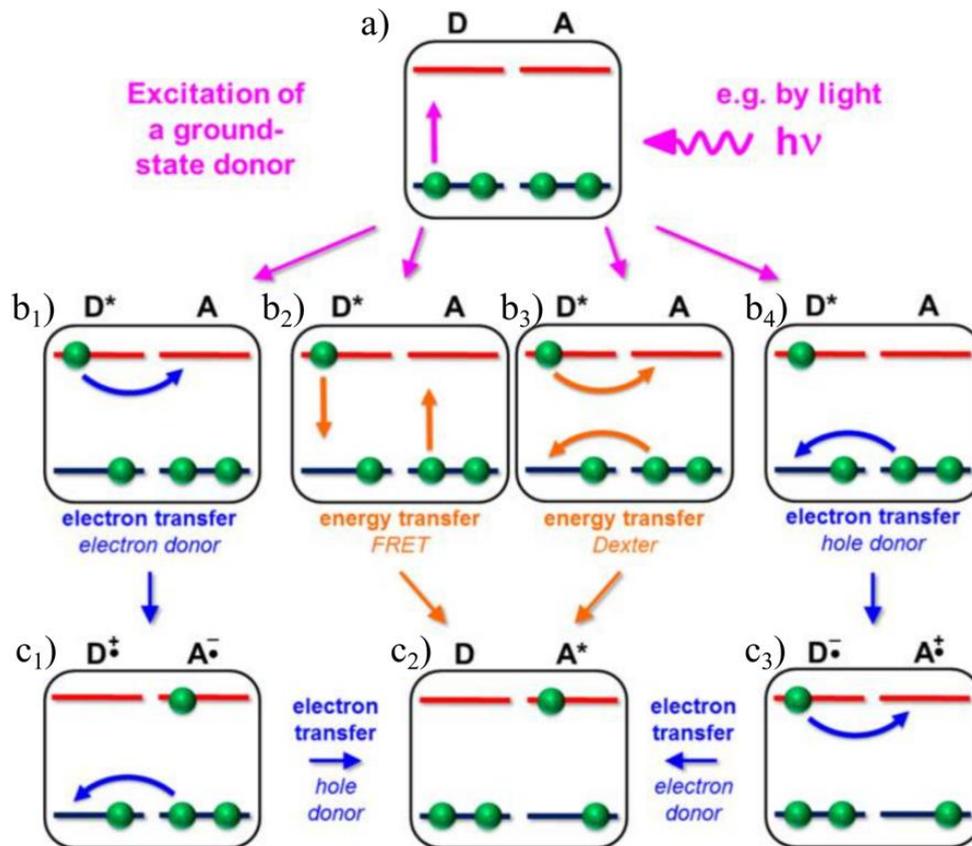


Figure III.2. Représentation schématique des différents mécanismes de transferts de charge et d'énergie. L'excitation d'un donneur dans l'état fondamental (a) implique un transfert d'énergie ou d'électron pour la paire donneur – accepteur vers une configuration où le donneur est dans un état excité et l'accepteur dans l'état fondamental (b₁ – b₄). Les transferts d'énergie par FRET (b₂) ou Dexter (b₃) et les transferts de charge (b₁ et b₄) amènent à une forme où le donneur est dans l'état fondamental et l'accepteur dans un état excité (c₂). Représentation schématique : points verts = électrons, lignes rouges = états énergétiques hauts (LUMO = Lowest Unoccupied Molecular Orbital), lignes bleues = états énergétiques bas (HOMO = Highest Occupied Molecular Orbital), * = état excité, •+ = ion radical positif, •- = ion radical négatif. Image adaptée de la référence [34].

Outre ces phénomènes de transferts de charge et d'énergie, l'effet de filtre interne peut également apparaître à des concentrations élevées [109]. Dans ce cas, le faisceau d'excitation est atténué par l'échantillon de sorte que seule la surface en regard du faisceau fluoresce fortement. Au-delà, la faible émission de fluorescence affecte le signal détecté. Ceci correspond à l'effet de filtre interne primaire. En outre, dans le cas d'un recouvrement significatif des spectres d'excitation et d'émission, la lumière émise peut être réabsorbée au sein de l'échantillon par les molécules avoisinantes (self quenching). Ce phénomène est l'effet de filtre interne secondaire.

Bien que cet effet d'extinction du fluorophore ne soit pas idéal dans les expériences de bioconjugaison, il apporte dans notre cas la preuve que les molécules d'APTES sont greffées de façon efficace à la surface des substrats.

La connaissance de ces régimes de concentration en fluorophores m'a permis d'adapter la concentration en colorants afin d'avoir un recouvrement de la surface le plus homogène possible. J'ai pu ensuite réaliser une étude rigoureuse du phénomène de FRET sur les substrats Al-SiO₂ fonctionnalisés. Cette étude fait l'objet de la deuxième partie de ce chapitre.

III.2 Etude du FRET sur les surfaces

Afin de démontrer la faisabilité d'un biocapteur par FRET sur les substrats Al-SiO₂, j'ai réalisé l'étude de ce transfert d'énergie entre deux colorants organiques à la surface des échantillons fonctionnalisés. J'ai considéré trois concentrations, une pour chacun des régimes définis précédemment, pour lesquelles j'ai déterminé les intensités de fluorescence. J'ai ensuite calculé différents paramètres de FRET : l'efficacité de FRET, le rapport de FRET, ainsi que la distance Donneur – Accepteur.

III.2.1 Caractérisation photophysique de la paire de FRET

Le choix de la paire de fluorophores pour l'étude du FRET s'est porté sur l'ATTO 647N (MM = 843 g/mol, $\epsilon_{\max} = 1,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\eta_{\text{fl}} = 65\%$, $\tau_{\text{fl}} = 3,5 \text{ ns}$, AD 647N, ATTO-TEC) précédemment investigué comme accepteur, associé à l'ATTO 550 (MM = 791 g/mol, $\epsilon_{\max} = 1,2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\eta_{\text{fl}} = 80\%$, $\tau_{\text{fl}} = 3,6 \text{ ns}$, AD550, ATTO-TEC) comme donneur. Cette paire FRET convient en effet à la large résonance plasmon de l'aluminium [86], et a déjà été utilisée pour des expériences de FRET couplé à la plasmonique sur des nanoantennes d'aluminium [84].

Les spectres d'absorption et d'émission de fluorescence sont déterminés afin de caractériser les propriétés photophysiques de la paire de FRET ATTO 550 – ATTO 647N, et ainsi calculer le recouvrement spectral nécessaire à l'établissement des

paramètres de FRET. Les spectres d'absorption sont réalisés en utilisant un spectrophotomètre Lambda 35 UV / Vis (Perkin Elmer), et les spectres d'émission de fluorescence sont enregistrés sur un spectrofluoromètre Xenius (SAFAS). Les spectres d'absorption (en pointillés) et de fluorescence (en traits pleins) des deux colorants organiques ATTO 550 (en bleu) et ATTO 647N (en rouge) sont représentés en Figure III.3. Pour les spectres d'absorption, l'absorbance A est mesurée, et les spectres sont ensuite normalisés selon le coefficient d'extinction ϵ_{\max} de chaque fluorophore. Pour les spectres d'émission de fluorescence, on considère l'intensité de photoluminescence normalisée. Tous ces spectres sont représentés en fonction de la longueur d'onde λ . Les bandes passantes des filtres d'excitation et d'émission utilisés ensuite pour l'imagerie de fluorescence sont également représentés (en gris) selon le pourcentage de leur transmission.

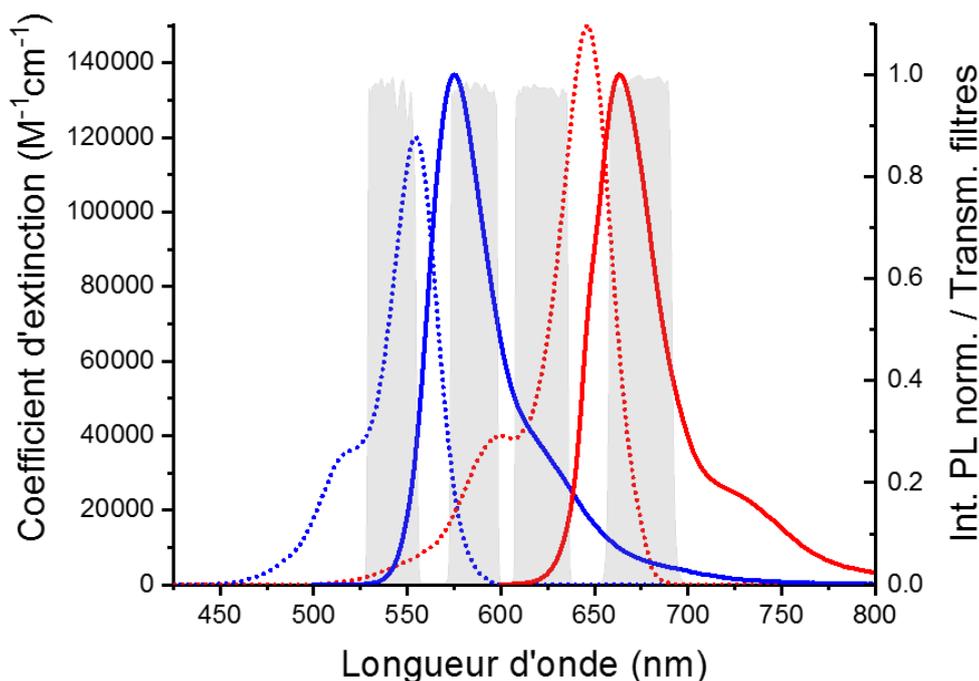


Figure III.3. Spectres normalisés d'absorption (pointillés) et d'émission (traits pleins) des colorants ATTO 550 (en bleu) et ATTO 647N (en rouge). Les transmissions des filtres de détection sont représentées en gris. Les miroirs dichroïques (non montrés ici) sont des filtres passe-haut à 562 nm pour l'observation du donneur et de la paire FRET, et à 649 nm pour l'observation de l'accepteur.

L'obtention de ces spectres d'absorption et d'émission des colorants ATTO 550 et 647N permet de déterminer la distance de Förster R_0 , nécessaire au calcul des paramètres de FRET. R_0 constitue en effet une donnée importante dans le formalisme du FRET, puisqu'elle permet de prédire l'aptitude d'une paire donneur – accepteur donnée à subir un transfert d'énergie par FRET. Cette distance de Förster, qui est la distance pour laquelle le FRET a 50% d'efficacité, est calculée pour le couple ATTO 550 – ATTO 647N selon l'équation III.1.

$$R_0^6 = \frac{9 \ln(10) \kappa^2 \Phi_D}{128 \pi^5 n^4 N_A} J(\lambda) \quad (\text{III.1})$$

où κ^2 est le facteur d'orientation dipôle – dipôle qui peut être approximé à 2/3 (moyenne dynamique due à la rotation libre des colorants sur les molécules d'APTES ; l'approximation de κ^2 à une valeur de 2/3 est valable à condition de se trouver dans un système isotrope, or dans notre cas, les colorants ne sont pas immobilisés et peuvent effectuer des rotations à l'extrémité des molécules de silanes sur lesquelles ils sont greffés), Φ_D est le rendement quantique de fluorescence du donneur ATTO 550 ($\Phi_D = 80\%$), n est l'indice de réfraction du milieu entourant l'échantillon ($n = 1,35$ pour une solution tampon de milieu aqueux, ici le tampon carbonate), $N_A = 6,02 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ est la constante d'Avogadro, et $J(\lambda)$ en ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{nm}^4$) est l'intégrale de recouvrement spectral calculé par l'équation III.2 :

$$J(\lambda) = \int F_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (\text{III.2})$$

où $F_D(\lambda)$ est l'intensité de fluorescence normalisée du donneur en nm^{-1} , $\varepsilon_A(\lambda)$ est le coefficient d'extinction de l'accepteur en $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, et λ est la longueur d'onde en nm. Pour la paire ATTO 550 – ATTO 647N, on trouve une valeur de recouvrement spectral J de $4,9 \cdot 10^{15} \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{nm}^4$.

Finalement, l'utilisation de ces équations III.1 et III.2 pour les données spectrales obtenues pour la paire ATTO 550 – ATTO 647N (dont les spectres

d'absorption et d'émission sont représentés en Figure III.3) donne une valeur de distance de Förster $R_0 = 6,4$ nm.

III.2.2 Imagerie de fluorescence

L'objectif de ce travail étant de développer un protocole permettant la réalisation ultérieure d'un biocapteur pour le séquençage de molécules uniques, nous avons mis en place un montage simple pour la détection de molécules individuelles. Le montage optique doit pouvoir permettre, à terme, le séquençage de protéines selon la Figure III.4. Cette figure présente le concept du séquençage de protéines élaboré dans le projet PROSEQO. Le séquençage doit se faire par acquisition de la signature de FRET de chaque acide aminé d'une protéine passant au travers d'une nanoantenne. Les fluorophores donneurs et accepteurs de FRET sont greffés à la surface de la nanoantenne. Cette nanoantenne implique l'exaltation de la fluorescence au niveau de hot spots, permettant ainsi la discrimination de chaque acide aminé. La vitesse de translocation de la protéine doit bien sûr être ralentie (à l'aide de pinces optiques par exemple), mais il s'agit quand même d'analyser un phénomène dynamique, ce qui nécessite donc l'utilisation d'un montage de détection de molécules uniques.

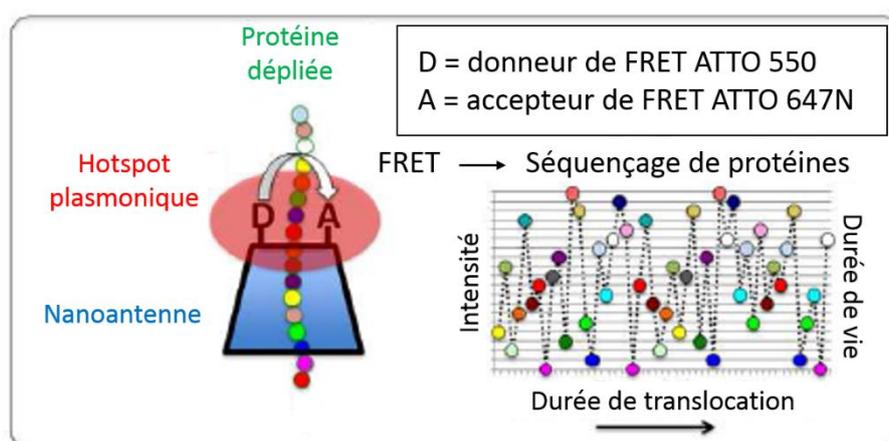


Figure III.4. Schéma de principe du séquençage de protéines en molécules uniques par détection résolue en temps. L'idée consiste à déplier la protéine par l'utilisation de pinces optiques, et à contrôler la vitesse de translocation au travers d'un nanopore métallique (antenne d'aluminium). Les colorants, donneur et accepteur, greffés à la surface de la nanoantenne vont permettre d'obtenir une signature de FRET exaltée par l'effet plasmonique engendré notamment par la géométrie de la nanostructure, et ce pour chaque acide aminé. Image adaptée de la proposition du projet PROSEQO.

Outre l'utilisation d'un objectif à immersion à huile (Olympus UAPON 40x O 340-2) de grandissement 40x, et de grande ouverture numérique 1,35 permettant une observation optimisée de la fluorescence, le montage optique dédié notamment à l'observation de molécules uniques repose surtout sur le choix du détecteur. Le détecteur choisi dans le cadre de ces expériences est une caméra EMCCD (Electron Multiplying Charge Coupled Device) iXon 888 Ultra de chez Andor. Les caméras CCD sont des dispositifs de transfert de charges qui convertissent les photons en signal électrique mesurable à partir d'un semiconducteur de silicium. Les caméras EMCCD sont des CCD à multiplication d'électrons qui possèdent un registre supplémentaire où les photoélectrons sont amplifiés par effet d'avalanche. Ce type de dispositif offre donc une grande sensibilité pour la détection de phénomènes dynamiques. L'optimisation des paramètres suivants est impérative pour l'observation d'une monocouche de molécules fluorescentes sur une surface :

- gain EM : coefficient associé à l'amplification des photoélectrons par le registre EM
- vitesse de déplacement vertical : temps pris pour le transfert de charge d'un rang au suivant sur le capteur CCD, détermine la rapidité d'acquisition
- amplitude verticale de la fréquence d'horloge : permet de contrôler les déplacements d'un rang à l'autre sur le capteur CCD
- vitesse de lecture horizontale des pixels : définit le taux auquel les pixels sont lus sur le registre à décalage
- pré-amplification du gain : augmente la valeur finale d'intensité sur l'image

Les paramètres ont été optimisés pour l'observation des échantillons en adaptant le mode « Dynamic Range and Speed » défini par Andor. Ce mode est configuré pour délivrer une gamme dynamique optimale à des taux de transfert élevés, avec application d'un gain EM modéré ; il permet d'enregistrer simultanément des signaux très faibles et relativement intenses. Les paramètres d'acquisition sont résumés dans le Tableau III.1.

Tableau III.1. Paramètres d'acquisition de la caméra EMCCD pour l'observation du FRET sur les substrats Al-SiO₂ fonctionnalisés

Amplification	Gain EM	Vitesse de lecture (MHz)	Vitesse de déplacement vertical (μs)	Amplitude verticale de la fréquence d'horloge	Pré - amplification
EM	x 200	20 à 16 bits	2,2	Normal	x 1

Les images des structures sont donc acquises à l'aide d'un microscope de luminescence inversé en champ large (IX83, Olympus) et d'un objectif à immersion à huile de grandissement 40x. Une source de lumière excitatrice en champ large pour la fluorescence (X-Cite exacte) produit un faisceau d'une puissance de 20 W. Pour l'observation des ATTO 647N, on considère les éléments optiques suivants : un filtre d'excitation passe-bande 623/24 nm – on rappelle que cette notation signifie 623 ± 12 nm, et qu'elle est valable pour tous les filtres mentionnés dans ce manuscrit – (FF01-623/24-25, BrightLine, Semrock), un miroir dichroïque à 649 nm (F38-649 Beamsplitter HC BS 649 FF649-Di01-25x36, BrightLine, Semrock) et un filtre d'émission passe-bande 676/29 nm (FF01-676/29-25, BrightLine, Semrock). Pour l'observation des ATTO 550, on dispose d'un filtre d'excitation passe-bande 543/22 nm (FF01-543/22-25, BrightLine, Semrock), d'un miroir dichroïque à 562 nm (F38-562 Beamsplitter HC BS 562 FF562-Di03-25x36, BrightLine, Semrock) et un filtre d'émission passe-bande 586/20 nm (FF01-586/20-25, BrightLine, Semrock). Le signal de fluorescence émis par les échantillons est ensuite détecté par une caméra EMCCD 1024 x 1024 pixels (iXon 888 Ultra, Andor). Afin de récolter un maximum de photons tout en limitant le temps d'exposition pour diminuer la probabilité de photoblanchiment, le temps d'acquisition est établi à 5 ms, et le gain EM à 200.

Trois types de substrats Al-SiO₂ fonctionnalisés sont considérés dans cette expérience, selon les fluorophores greffés :

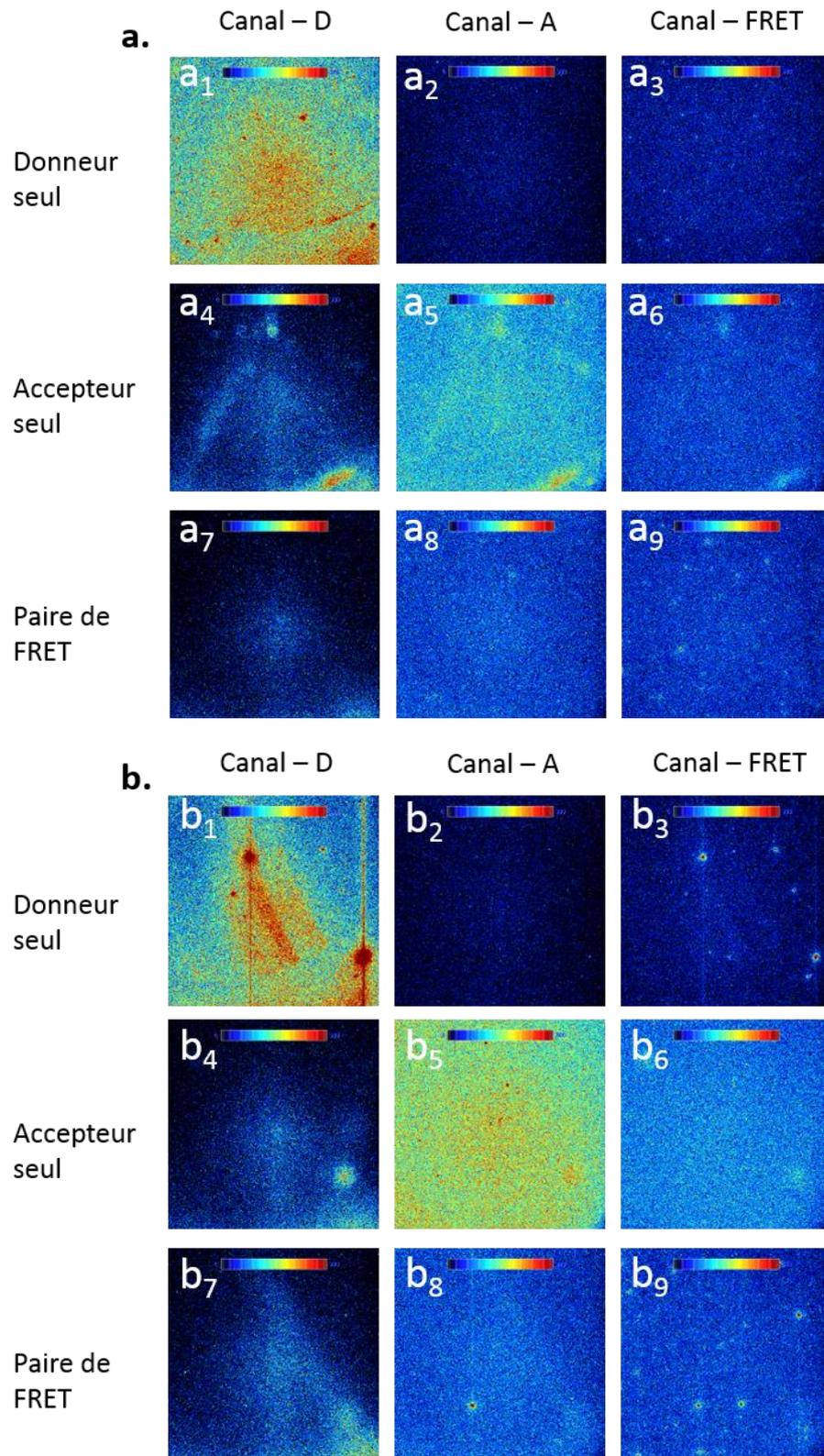
- L'ATTO 550 seul : contrôle ne considérant que le donneur ;
- L'ATTO 647N seul : contrôle ne considérant que l'accepteur ;
- La paire FRET ATTO 550 – ATTO 647N, en mélange 1/1 : expérience de FRET.

L'ATTO 550 seul est observé dans le Canal – D (excitation donneur, miroir dichroïque donneur, émission donneur), l'ATTO 647N dans le Canal – A (excitation accepteur, miroir dichroïque accepteur, émission accepteur) et la paire FRET dans le Canal – FRET (excitation donneur, miroir dichroïque donneur, émission accepteur). Ces paramètres sont résumés dans le Tableau III.2 ci-dessous.

Tableau III.2. Paramètres d'acquisition pour l'observation des différents échantillons

Echantillon	Colorant	Canal d'observation	Excitation (nm)	Miroir dichroïque (nm)	Emission (nm)
Donneur seul	ATTO 550	Canal – D	543/22	562	586/20
Accepteur seul	ATTO 647N	Canal – A	623/24	649	676/29
Paire FRET	ATTO 550 – ATTO 647N	Canal – FRET	543/22	562	676/29

Trois concentrations en colorants sont considérées dans cette expérience de FRET, afin de caractériser chacun des trois régimes déterminés précédemment (III.1 Figure III.1 ; régime 1 de 0,01 mg/mL à 0,3 mg/mL : augmentation de l'intensité de fluorescence en fonction de la concentration en fluorophores ; régime 2 de 0,3 mg/mL à 0,7 mg/mL : plateau ; régime 3 au-delà de 0,7 mg/mL : légère décroissance de l'intensité de fluorescence). Les conjugaisons sont donc réalisées pour des concentrations finales en colorants de 0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL et 1,0 mg/mL. Des images de fluorescence représentatives des substrats Al-SiO₂ fonctionnalisés sont présentées en Figure III.5 (il est important de noter que ces images constituent une représentation visuelle, et que le traitement quantitatif des données se fait de façon rigoureuse avec les valeurs données ci-après dans le Tableau III.3 dans la partie III.2.3.).



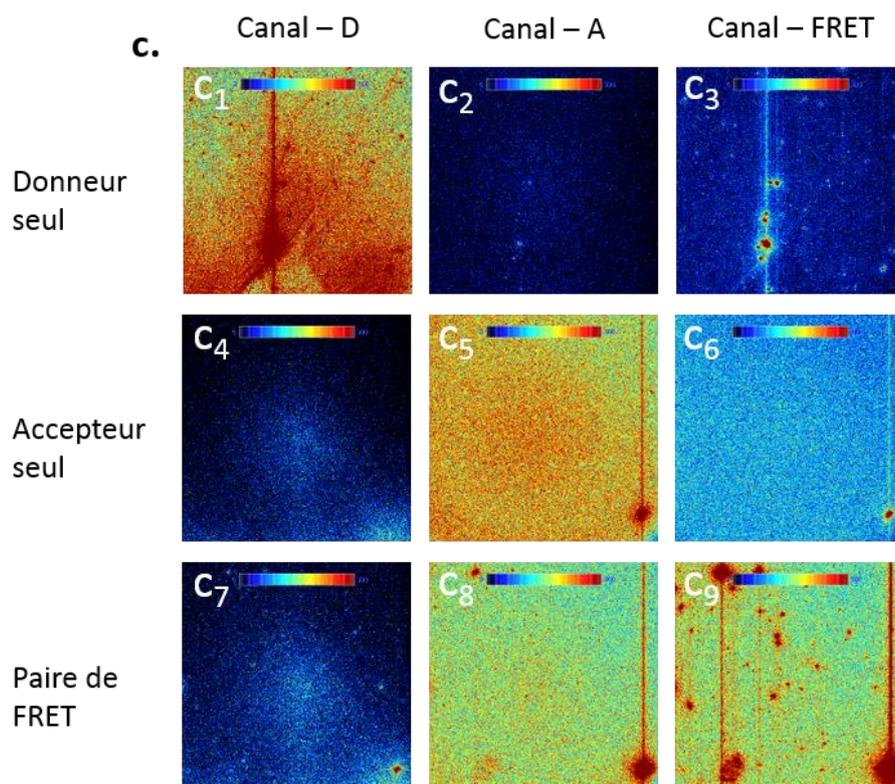


Figure III.5. Images de fluorescence (après soustraction du bruit) des substrats Al-SiO₂ fonctionnalisés. Images représentatives (pour un ROI d'un seul échantillon) pour le donneur seul = ATTO 550, l'accepteur seul = ATTO 647N et la paire de FRET = ATTO 550 – ATTO 647N (mélange 1/1) pour des concentrations de a = 0,25 mg/mL, b = 0,5 mg/mL et c = 1,0 mg/mL. La colonne de gauche présente le canal d'observation du donneur (Canal – D), celle du milieu celui de l'accepteur (Canal – A) et celle de droite celui de la paire de FRET (Canal – FRET). Les images sont représentées en fausses couleurs de 0 à 300 coups du bleu vers le rouge (échelle de couleur JET sur Icy). La taille de chaque image est de 332,8 µm x 332,8 µm.

L'analyse des images de la Figure III.5 permet d'extraire différentes informations mettant en évidence le phénomène de FRET sur les substrats Al-SiO₂ (on ne détaille ici que la Figure III.5.a présentant les images de fluorescence pour une concentration en colorants de 0,25 mg/mL, mais les interprétations sont également valables pour les concentrations de 0,5 mg/mL et 1,0 mg/mL présentées).

- Les images a₁ et a₇ montrent l'extinction (quenching) de l'intensité de fluorescence du donneur (l'intensité moyenne pour 9 ROI diminue de 116 ± 46 coups à 42 ± 42 coups selon le Tableau III.3 présenté en III.2.3).

- Les images a_3 et a_9 montrent la sensibilisation (sensitization) de l'accepteur, c'est-à-dire l'activation par FRET (l'intensité moyenne augmente de 0 ± 23 coups à 54 ± 33 coups selon le Tableau III.3 en III.2.3).
- Les images des contrôles constitués par le donneur seul observé dans le canal de l'accepteur (a_2), ainsi que par l'accepteur seul dans le canal du donneur (a_4) montrent comme attendu une très faible intensité de fluorescence.
- L'analyse des images a_1 et a_3 permet d'établir que les interférences spectrales (spectral crosstalk) caractérisées par l'observation de l'émission du donneur dans les conditions d'observations de l'émission de l'accepteur sont négligeables. En outre, les images a_5 et a_6 montrent que l'excitation de l'accepteur à la longueur d'onde d'excitation du donneur est également très faible.

La seule extinction du donneur ne suffit pas pour démontrer la présence du phénomène de FRET. En effet, celle-ci peut être due à d'autres mécanismes que le FRET, comme décrit dans la première partie de ce chapitre (III.1). Mais cette extinction couplée au phénomène de sensibilisation de l'accepteur, l'analyse des différents contrôles permettant de s'assurer de l'origine de la fluorescence émise (pas d'erreur dans la sélection des filtres optiques par exemple), ainsi que le choix d'une paire donneur – accepteur aux propriétés photophysiques adaptées au phénomène de FRET permettent d'établir la présence de FRET sur les substrats Al-SiO₂.

III.2.3 Quantification de l'intensité de fluorescence

Afin de réaliser une étude quantitative du FRET sur les substrats Al-SiO₂, j'ai considéré trois régions d'intérêt sur trois substrats différents (9 ROI au total) pour chaque type d'échantillon et pour chacune des trois concentrations. La procédure de traitement d'images décrite précédemment (Chapitre II.5.2) a été appliquée à chaque ROI, afin de s'affranchir de l'intensité de fluorescence des agrégats. Le principe de cette procédure est rappelé en Figure III.6, avec pour exemple la paire de FRET

observée dans le Canal – FRET pour 0,5 mg/mL. Il est à noter que cette procédure permet également de s'affranchir de l'effet de traînées (smear effect) à la verticale des agrégats, que l'on peut notamment observer en Figure III.5 (par exemple en b₁ ou en c₉), et qui est dû au choix d'un temps d'exposition court permettant d'éviter le photoblanchiment des échantillons.

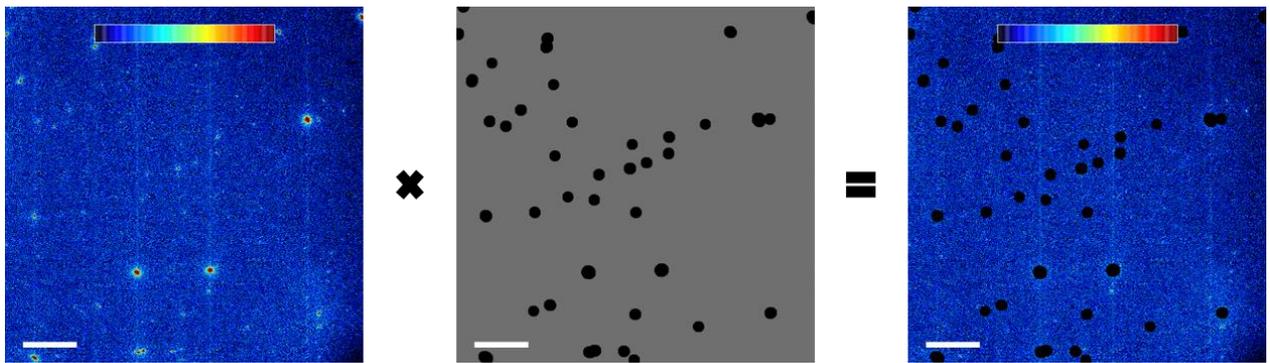


Figure III.6. Représentation de la procédure de traitement d'images par application du masque après soustraction du bruit. Les images de fluorescence sont représentées en fausses couleurs de 0 à 300 coups du bleu vers le rouge (échelle de couleur JET sur l'cy). Ces images permettent l'obtention des histogrammes d'intensité donnant la moyenne μ et l'écart-type σ . Exemple pour la paire de FRET dans le Canal – FRET pour 0,5 mg/mL. L'échelle correspond à 50 μ m.

La procédure de traitement d'images permet d'extraire l'intensité moyenne μ , son écart-type σ , ainsi que le nombre de pixels considérés pour le calcul de ces données. La Figure III.7 montre des exemples représentatifs d'histogrammes obtenus pour chaque ROI dans chaque configuration, pour la concentration 0,5 mg/mL. Des exemples d'histogrammes pour les concentrations 0,25 mg/mL et 1,0 mg/mL sont donnés en Annexe B.

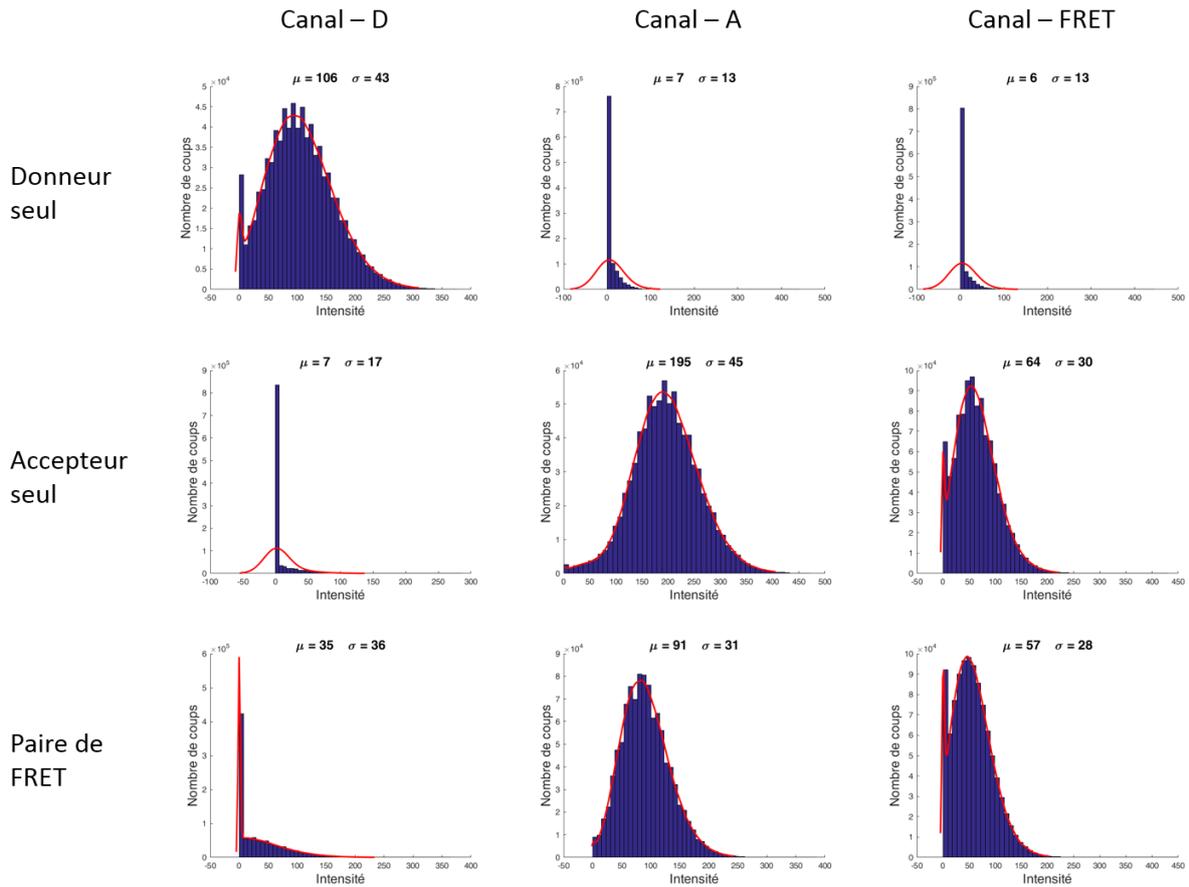


Figure III.7. Histogrammes, après soustraction du bruit et application du masque, pour un ROI représentatif et pour chaque cas pour 0,5 mg/mL.

Le traitement des images permet d'obtenir les intensités moyennes de fluorescence pour chaque ROI. Ces valeurs sont ensuite moyennées pour les 9 ROI d'un même type d'échantillon. Les échantillons Donneur seul dans le Canal - A, Accepteur seul dans le Canal - D et Donneur seul dans le Canal - FRET donnent des valeurs d'intensité de fluorescence correspondant à du bruit et sont donc ramenées à zéro. La soustraction effectuée pour obtenir ces valeurs nulles est appliquée de la même façon pour chaque échantillon. Les valeurs d'intensité de fluorescence ainsi obtenues sont présentées dans le Tableau III.3.

Tableau III.3. Intensité moyenne de fluorescence pour le donneur seul (ATTO 550), l'accepteur seul (ATTO 647N) et la paire FRET (ATTO 550 – ATTO 647N en mélange 1/1) dans chaque canal de détection

Echantillon	Concentration en colorant	Canal – D	Canal – A	Canal – FRET
Donneur seul	0,25 mg/mL	116 ± 46	0 ± 20	0 ± 23
Accepteur seul	0,25 mg/mL	0 ± 39	143 ± 40	33 ± 28
Paire FRET	0,25 mg/mL	42 ± 42	69 ± 31	54 ± 33
Donneur seul	0,5 mg/mL	105 ± 45	0 ± 18	0 ± 22
Accepteur seul	0,5 mg/mL	0 ± 37	198 ± 44	63 ± 31
Paire FRET	0,5 mg/mL	36 ± 42	91 ± 33	57 ± 32
Donneur seul	1,0 mg/mL	145 ± 49	0 ± 20	0 ± 25
Accepteur seul	1,0 mg/mL	0 ± 35	167 ± 55	81 ± 34
Paire FRET	1,0 mg/mL	27 ± 40	195 ± 45	150 ± 43

Environ $1 \times 10^6 \pm 1 \times 10^4$ pixels sont considérés pour chaque ROI.

Ces valeurs d'intensité de fluorescence sont utilisées afin de déterminer les différents paramètres de FRET que sont l'efficacité de FRET, le rapport de FRET et la distance entre le donneur et l'accepteur.

III.2.4 Détermination des paramètres de FRET

Les valeurs moyennes d'intensité de fluorescence déterminées pour chaque type d'échantillon sont utilisées afin d'établir les différents paramètres de FRET que

sont l'efficacité de FRET, le rapport de FRET et la distance entre le donneur et l'accepteur (définis en I.1.3). L'efficacité de FRET permet de quantifier le FRET par la détermination de l'efficacité du transfert non radiatif entre le donneur et l'accepteur ; le rapport de FRET permet l'évaluation de la population des biomolécules interagissant les unes avec les autres au travers de la détection de la sensibilisation de l'accepteur I_{AD} en fonction de l'extinction du donneur I_{DA} ; la distance donneur – accepteur r est la distance entre les deux molécules de la paire de FRET.

L'efficacité de FRET E_{FRET} est définie selon l'équation III.3.

$$E_{\text{FRET}} = 1 - \frac{I_{DA}}{I_D} \quad (\text{III.3})$$

où I_{DA} (paire de FRET dans le Canal – D) et I_D (donneur seul dans le Canal – D) sont les intensités de fluorescence du donneur en présence et en absence de l'accepteur, respectivement.

Le rapport de FRET $R_{\text{rapport FRET}}$ est défini selon l'équation III.4.

$$R_{\text{rapport FRET}} = \frac{I_{AD}}{I_{DA}} \quad (\text{III.4})$$

où I_{AD} (paire de FRET dans le Canal – FRET) est l'intensité de l'accepteur excité à la longueur d'onde d'excitation du donneur.

Finalement, la distance de FRET r entre le donneur et l'accepteur est définie selon l'équation III.5.

$$r = R_0 \left(\frac{I_{DA}}{I_D - I_{DA}} \right)^{\frac{1}{6}} \quad (\text{III.5})$$

Ces différents paramètres de FRET sont présentés dans le Tableau III.4 pour chaque concentration étudiée.

Tableau III.4. Paramètres de FRET pour la paire ATTO 550 – ATTO 647N pour différentes concentrations.

Concentration (mg/mL)	Efficacité de FRET ^[a]	Rapport de FRET ^[b]	Distance D – A (nm) ^[c]
0,25	0,64 ± 0,03	1,29 ± 0,11	5,82 ± 0,12
0,50	0,66 ± 0,02	1,58 ± 0,07	5,74 ± 0,06
1,0	0,81 ± 0,02	5,56 ± 0,39	5,01 ± 0,09

^[a] Calculé avec l'équation III.3. ^[b] Calculé avec l'équation III.4. ^[c] Calculé avec l'équation III.5. Note : Les erreurs sont calculées pour n = 9 en utilisant les écart-types des intensités moyennes de fluorescence corrigées de 9 ROI différents.

Avec l'augmentation de la concentration, on constate une augmentation de l'efficacité de FRET et du rapport de FRET, ainsi qu'une diminution de la distance de FRET. Puisqu'on double la concentration, on aurait pu s'attendre à un changement important des paramètres de FRET entre 0,25 mg/mL et 0,5 mg/mL. Au lieu de cela, on observe de faibles modifications qui viennent confirmer les résultats relatifs à la fonctionnalisation dépendante de la concentration, détaillés plus haut dans ce chapitre (III.1). En effet, la concentration de 0,25 mg/mL est déjà très proche du deuxième régime établi entre 0,3 mg/mL et 0,7 mg/mL, et qui correspond au régime de saturation de l'intensité de fluorescence. Comme les paramètres de FRET dépendent principalement de la distance entre le donneur et l'accepteur, il est cohérent d'obtenir de faibles variations dans les paramètres de FRET pour des concentrations dans cette gamme de valeurs.

En doublant une nouvelle fois la concentration, pour passer de 0,5 mg/mL à 1,0 mg/mL, on constate cette fois-ci d'importants changements dans les paramètres de FRET : l'efficacité de FRET et le rapport de FRET augmentent, tandis que la distance entre le donneur et l'accepteur diminue. Cette concentration de 1,0 mg/mL appartenant

au troisième régime (au-delà de 0,7 mg/mL) caractérisé par une diminution de l'intensité de fluorescence (III.1 Figure III.1), elle a pu conduire à une agglomération des colorants et donc à des phénomènes concomitants de transfert de charge, de transfert d'énergie, ou encore d'effet de filtre interne (inner filter effect). Ceci implique probablement une forte extinction du donneur associée à une sensibilisation efficace des molécules d'accepteur, entraînant une importante modification des paramètres de FRET.

Les incertitudes inhérentes au choix d'une concentration appartenant au troisième régime (au-delà de 0,7 mg/mL) justifient donc de favoriser une concentration plus faible, située dans le premier régime ou éventuellement le deuxième, dans le cadre d'expériences de FRET sur des substrats fonctionnalisés. En effet, les valeurs d'efficacité de FRET de $0,64 \pm 0,03$ pour 0,25 mg/mL et $0,66 \pm 0,02$ pour 0,5 mg/mL appartiennent à la gamme dynamique montrée dans la Figure III.8 présentant la courbe d'efficacité de FRET en fonction de la distance donneur – accepteur. Ceci constitue une information essentielle dans le cadre de la réalisation d'un biocapteur, puisqu'un changement de la distance donneur – accepteur r sera bien visible au travers de l'analyse de l'efficacité de FRET E_{FRET} .

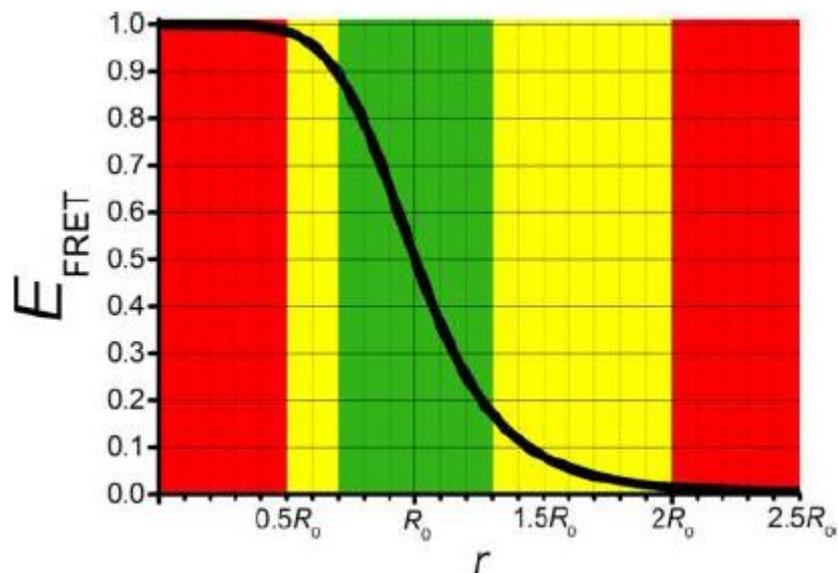


Figure III.8. Efficacité de FRET E_{FRET} en fonction de la distance donneur – accepteur $r(R_0)$. La dépendance en r^{-6} implique une large gamme dynamique de E_{FRET} dans la zone verte ($0,7 - 1,3 R_0$), une dynamique limitée dans la zone jaune ($0,5 - 0,7 R_0$ et $1,3 - 2,0 R_0$) et une efficacité de FRET quasiment statique dans la zone rouge ($0 - 0,5 R_0$ et $2,0 - 2,5 R_0$). Image extraite de la référence [34].

III.3 Conclusion

Dans l'optique de développer un biocapteur pleine plaque basé sur la technique de FRET, j'ai réalisé une étude approfondie du phénomène de FRET sur des substrats d'aluminium recouverts de silice. J'ai d'abord étudié la dépendance de l'intensité de fluorescence en fonction de la concentration en colorant organique ATTO 647N, puis j'ai investigué le phénomène de FRET à la surface des échantillons.

Cette étude s'inscrit dans le cadre du développement d'une procédure de fonctionnalisation générique permettant le greffage de fluorophores ou de biomolécules à la surface de substrats métalliques. L'étude du transfert d'énergie par résonance de type Förster dépendant de la concentration en fluorophores a ensuite été réalisée pour les colorants organiques ATTO 550 comme donneur et ATTO 647N comme accepteur.

Les expériences menées ont donc permis de réaliser le greffage contrôlé, homogène et reproductible de fluorophores à la surface de substrats d'aluminium recouverts de silice silanisés avec l'APTES. Le protocole optimisé a été appliqué au greffage d'une paire FRET, et a permis de démontrer le phénomène par observation de l'extinction du donneur ainsi que de la sensibilisation de l'accepteur. Le système étudié présente en effet des valeurs d'efficacité de FRET de l'ordre de 60% à 80% selon la concentration considérée, ainsi que des distances de FRET de l'ordre de 5 nm à 6 nm, validant le greffage homogène des silanes à la surface des substrats.

Une telle étude pose de solides bases pour le développement d'un biocapteur basé sur l'exaltation du FRET par effet plasmonique. L'application du procédé sur des nano-antennes d'aluminium doit permettre la détection de molécules d'intérêt biologique, notamment dans le cadre du séquençage de protéines. Nos collaborateurs de l'équipe Plasmon Technology de l'IIT n'ont malheureusement pas été en mesure de nous fournir ces antennes d'aluminium durant la période de ma thèse, mais nous savons que ce procédé est en principe possible et réalisé dans d'autres équipes [84] et nous espérons la réalisation à moyen terme d'un dispositif de séquençage de protéines reposant sur l'exaltation du FRET par effet plasmonique à la surface de substrats d'aluminium recouverts de silice.

La réalisation de ce prototype de biocapteur pleine plaque m'a permis de mettre en œuvre un certain nombre de techniques, notamment la silanisation, la caractérisation par angle de contact et spectroscopie ou encore l'imagerie de fluorescence, et m'a également donné l'opportunité d'étudier le phénomène de FRET en conditions pleine plaque. J'ai donc pu mettre en application cette étude dans le cadre du développement d'un biocapteur intégré, décrit dans le chapitre IV. Finalement, le projet de séquençage de protéines, loin d'être abandonné, a été mis de côté avec la possibilité de combiner ultérieurement l'étude réalisée sur les substrats Al-SiO₂ avec le développement d'un biocapteur par FRET en conditions microfluidiques, ouvrant la voie vers un dispositif intégré de séquençage de protéines.

IV Développement d'un dispositif intégré pour la détection par FRET en conditions microfluidiques

Ce chapitre IV s'inscrit dans le cadre du projet μ FRET. Ce projet, qui vise à développer un immunodosage par FRET en conditions microfluidiques, est détaillé dans le chapitre V. La réalisation d'un tel système nécessite le développement d'un biocapteur intégré, dont les étapes de fabrication et de caractérisation sont présentées ici.

IV.1 Fonctionnalisation des substrats de verre

IV.1.1 Substrats de verre

La fabrication de micro-canaux de PDMS se fait usuellement sur des substrats d'accueil de silicium ou de verre [58], [110], [111], [112], [113]. La contrainte d'observation des canaux microfluidiques en microscopie inversée a imposé le choix du verre comme substrat d'accueil pour nos expériences. J'ai donc tout d'abord travaillé avec des lamelles couvre-objet rectangulaires (22 mm x 50 mm, épaisseur #1 (0,13 – 0,16 mm), Menzel-Gläser) usuellement utilisées en microscopie optique. Le problème de l'inhomogénéité du dépôt de PDMS par enduction centrifuge (spin coating) sur ces lames rectangulaires – ne permettant pas de contrôle sur la planéité – a nécessité de revoir le choix du substrat d'accueil. J'ai donc opté pour des substrats circulaires de diamètre 50 mm en borosilicate et d'épaisseur #1 soit 0,13 mm, qui est l'épaisseur conventionnellement utilisée en microscopie inversée (631-0178, VWR). Ces substrats d'accueil concilient en effet la géométrie circulaire nécessaire à un dépôt homogène de PDMS par enduction centrifuge ainsi que l'épaisseur appropriée à l'observation en microscopie inversée.

IV.1.2 Préparation du PDMS

Le polydiméthylsiloxane, ou PDMS, est un polymère largement utilisé dans la fabrication de dispositifs microfluidiques [114]. Il présente une combinaison unique de propriétés résultant de la présence d'un squelette de siloxane et de groupements méthyles attachés aux atomes de silicium. Sa formule chimique est $\text{CH}_3[\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{O}]_n\text{Si}(\text{CH}_3)_3$, et sa structure est celle présentée en Figure IV.1.

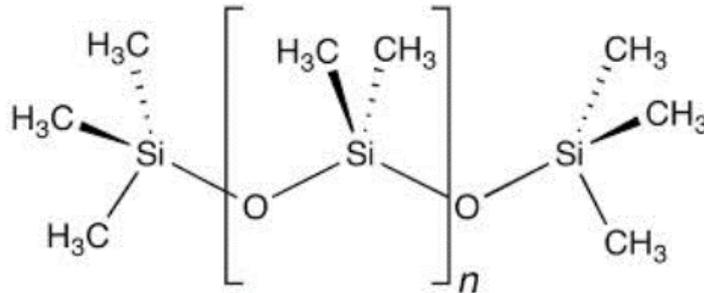


Figure IV.1. Formule chimique semi-développée du PDMS. n correspond au nombre de répétitions du monomère. Image extraite du site d'Elveflow (elveflow.com).

Le PDMS s'est imposé comme matériau de prédilection dans la fabrication de dispositifs microfluidiques pour les raisons suivantes :

- Il est transparent dans le visible (240 nm – 1100 nm) ;
- Il présente une faible autofluorescence [115] ;
- Il est biocompatible (avec certaines restrictions) [116] ;
- Il se lie fermement au verre ou à une autre couche de PDMS par un simple traitement par plasma ;
- Une couche de PDMS d'épaisseur contrôlée peut être déposée par simple enduction centrifuge (spin coating) sur un substrat ;
- Le PDMS est déformable, ce qui permet l'intégration d'éléments (capteurs, connecteurs etc.) ;
- Son coût est faible (comparé aux matériaux utilisés précédemment comme le silicium) ;
- Le PDMS est facile à fabriquer et à façonner ;

- Il est perméable aux gaz non polaires comme l'oxygène (ce qui autorise le travail sur des échantillons vivants – cellules, explants tissulaires, poissons-zèbres).

Quelques inconvénients accompagnent ces nombreux avantages. Toutefois, dans le cadre de ce travail, seuls les deux derniers points listés ci-dessous sont à prendre en considération.

- Il est pratiquement impossible de réaliser un dépôt de métal ou de matériau diélectrique sur du PDMS, ce qui limite fortement l'intégration d'électrodes et de résistances. Ceci dit, ce problème est minimisé par le fait que le PDMS se lie facilement au verre, permettant le dépôt de minces couches métalliques et de matériaux diélectriques sur les lames de verre ;
- Le PDMS vieillit, et ses propriétés mécaniques peuvent changer au bout de quelques années ;
- Le PDMS est perméable à la vapeur d'eau, l'évaporation dans les dispositifs de PDMS est donc difficile à contrôler ;
- Le PDMS est sensible à l'exposition à certains produits chimiques ;
- Le PDMS adsorbe les molécules hydrophobes et peut rejeter des molécules dans le liquide contenu dans le dispositif, ce qui constitue un problème pour certaines études biologiques.

Le PDMS utilisé dans cette étude est un kit commercial Sylgard 184 (Dow Corning) constitué de deux composés : le pré-polymère, qui est un oligomère de siloxanes (groupements R_2SiO), et l'agent réticulant. Ces deux éléments sont mélangés pour obtenir le PDMS selon la réaction présentée en Figure IV.2.

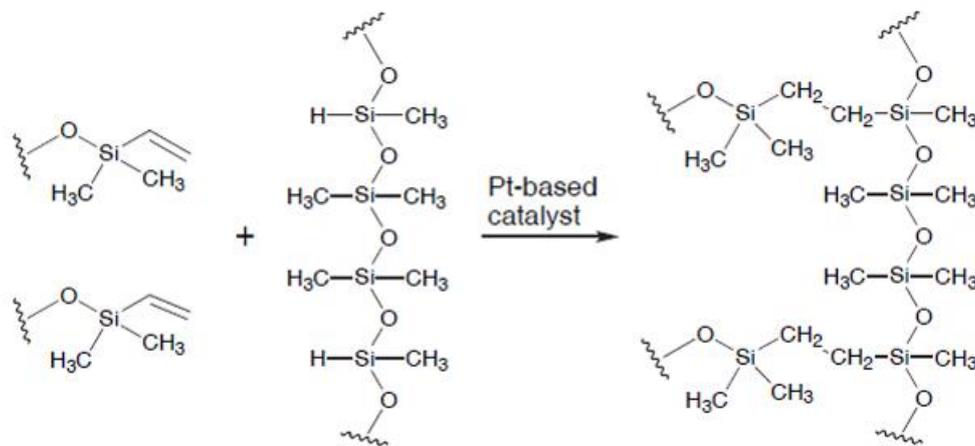


Figure IV.2. Réaction de polymérisation entre le l'agent réticulant (à gauche) et le pré-polymère (à droite) pour la formation du PDMS. Image extraite de la référence [117].

Le pré-polymère et l'agent réticulant sont mélangés selon un rapport dépendant du module d'Young souhaité pour le PDMS. Le module d'Young, ou constante d'élasticité, caractérise en effet la raideur d'un matériau (quand le rapport pré-polymère/agent réticulant augmente, le module d'Young diminue, le PDMS est donc plus déformable). La polymérisation se constitue d'une réaction d'hydrosilylation où les groupements vinyls ($\text{CH}_2=\text{CH}$) des oligomères de siloxanes forment des liaisons covalentes avec les groupements hydrosilanes (SiH) de l'agent réticulant. La réaction de réticulation est catalysée par le platine contenu dans le réticulant. La réaction peut avoir lieu à température ambiante, mais peut être accélérée par augmentation de la température.

Le rapport pré-polymère/réticulant de nos expériences est de 10:1. Il s'agit en effet des recommandations du fournisseur, ce qui permet d'extraire des informations de la littérature et de comparer les données obtenues [118], [119]. Le pré-polymère et l'agent réticulant sont pesés et mélangés manuellement dans un bécher à l'aide d'une tige en aluminium. Un dégazage sous vide est ensuite réalisé pendant une heure afin d'éliminer les bulles d'air créées lors du mélange.

IV.1.3 Dépôt de PDMS sur les substrats

Les substrats de verre sont d'abord nettoyés à l'acétone et à l'isopropanol puis séchés à l'azote avant d'être disposés sur une tournette d'enrésinement. Le PDMS est versé sur le substrat, puis une couche de 20 μm est déposée en considérant les paramètres suivants : une accélération de 300 tours/min/sec pendant 10 secondes permet d'atteindre la vitesse de 3000 tours/min, appliquée pendant 90 secondes. Finalement, les substrats de verre recouverts de 20 μm de PDMS sont placés dans un four à la température de 75°C pendant une heure. L'épaisseur est contrôlée par profilométrie mécanique (Dektak 8, Veeco).

IV.1.4 Greffage des aminosilanes

La technique de silanisation déjà utilisée pour les substrats d'aluminium recouverts de silice (II.2) est appliquée aux substrats de borosilicate recouverts de PDMS. Plusieurs modifications sont apportées au protocole d'aminosilanisation précédemment décrit dans le chapitre II.

Les substrats de borosilicate recouverts de 20 μm de PDMS sont placés dans un délaqueur, où ils sont soumis à un traitement par plasma oxygène à une pression de 0,4 mbar et une puissance de 160 W pendant 1 minute. Ce plasma O_2 vient remplacer les liaisons Si-CH_3 de la surface du PDMS par des liaisons Si-OH , comme présenté en Figure IV.3.

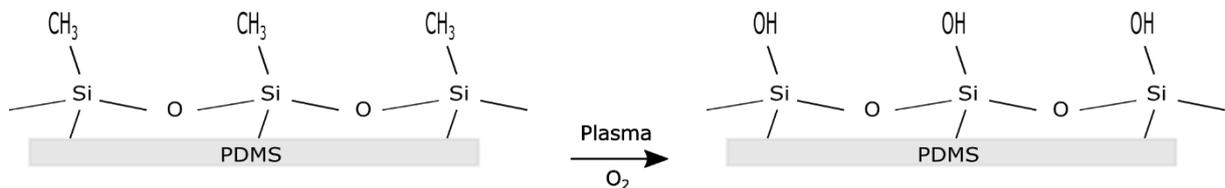


Figure IV.3. Schéma de principe de l'effet de l'application d'un plasma oxygène à la surface d'un substrat de PDMS. Le traitement permet l'obtention de groupements hydroxyles nécessaires au greffage des silanes.

Une fois les surfaces activées par plasma O₂, les substrats sont fonctionnalisés avec l'APTES. Le schéma du procédé de cette silanisation est représenté en Figure IV.4.

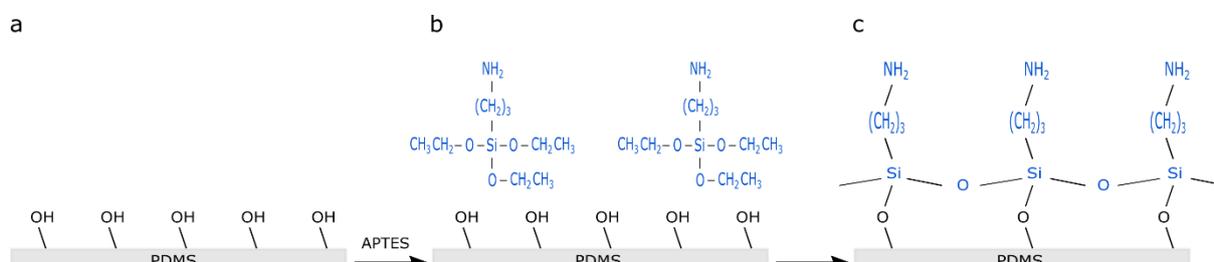


Figure IV.4. Fonctionnalisation des surfaces de PDMS oxydées avec les aminosilanes : (a) Surface activée par plasma oxygène, (b) Incubation de la surface avec les aminosilanes, (c) Formation des liaisons Si-O-Si entre la surface et les aminosilanes.

Le protocole suivi pour l'obtention de ces substrats silanisés est décrit ci-après. Une solution d'APTES à 10% est préparée dans l'éthanol, puis elle est plongée dans un bain à ultra-sons pendant 1 minute. Les substrats de borosilicate recouverts de PDMS activés par plasma O₂ sont ensuite immergés dans cette solution et maintenus sous agitation modérée constante dans une boîte à gants sous azote pendant 30 minutes. L'environnement contrôlé de la boîte à gants permet de garder un taux d'humidité de 2% ainsi qu'une température de 21°C durant la réaction. Le pH de la solution est contrôlé au début et à la fin de l'expérience et présente une valeur de 8 à 9, donc légèrement basique. A la fin de l'expérience, les substrats sont rincés deux fois dans l'éthanol (2 x 5 min) et une fois dans l'eau désionisée (5 min), puis sont séchés à l'air comprimé.

IV.1.5 Caractérisation par angle de contact

Afin de valider le greffage des aminosilanes à la surface des substrats de borosilicate recouverts de PDMS, des mesures d'angle de contact sont effectuées à chaque étape du procédé. Les paramètres utilisés sont les mêmes que pour les échantillons d'aluminium recouverts de silice (II.3.2) : une goutte d'eau ultra-pure de 1

μL est déposée à la vitesse de $0,5 \mu\text{L/s}$ sur le substrat, et l'angle de contact est relevé en différents points de l'échantillon. La Figure IV.5 donne l'évolution du profil de la goutte à chaque étape du procédé de greffage des aminosilanes, et le Tableau IV.1 donne les valeurs moyennes des angles de contact pour ces différentes étapes.

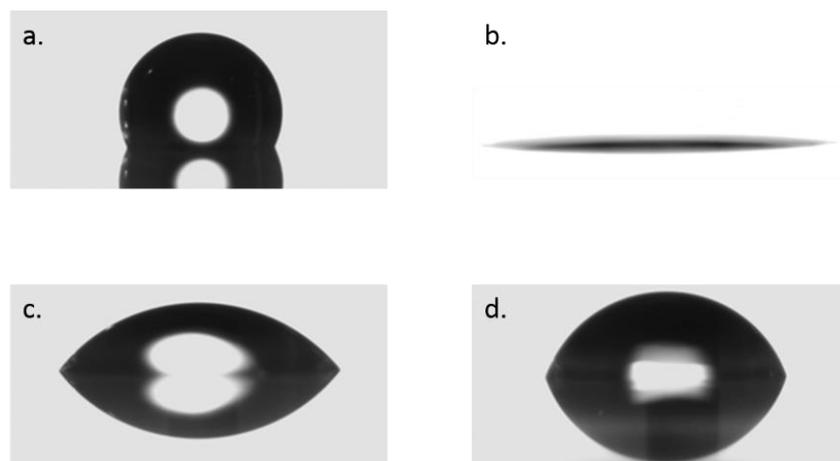


Figure IV.5. Evolution du profil de la goutte à chaque étape du procédé de greffage des aminosilanes. La surface non traitée hydrophobe (a.) présente un profil fortement hydrophile après traitement par plasma oxygène (b.). L'hydrophobicité de la surface réapparaît juste après silanisation (c.) et augmente encore au bout de 24h (d.).

Tableau IV.1. Mesure d'angles de contact à chaque étape du procédé de greffage des aminosilanes

Etape du procédé	Angle de contact ($^{\circ}$) ^[a]	
	Face PDMS	Face verre
Sans traitement	114 ± 1	74 ± 3
Après plasma O_2	≤ 5	≤ 5
Après silanisation par l'APTES t_0	63 ± 8	54 ± 1
Après silanisation par l'APTES t_{+24h}	91 ± 2	68 ± 6

^[a] Valeurs moyennes d'au moins 4 mesures pour différents échantillons. Les surfaces relativement hydrophobes deviennent fortement hydrophiles après traitement par plasma oxygène, puis redeviennent hydrophobes après silanisation. On constate une augmentation de l'angle de contact 24h après la silanisation.

Les résultats présentés dans ce tableau montrent que les surfaces de PDMS non traitées sont relativement hydrophobes ($114^\circ \pm 1^\circ$). Elles deviennent fortement hydrophiles ($\leq 5^\circ$) après un traitement par plasma oxygène, ce qui est cohérent avec une densité de surface élevée en groupements silanols (SiOH). Après aminosilanisation, les substrats présentent à nouveau un angle de contact relativement hydrophobe ($63^\circ \pm 8^\circ$ immédiatement après la silanisation et $91^\circ \pm 2^\circ$ au bout de 24h) du fait de la présence des groupements amines et du squelette de carbones de l'APTES, qui sont plus hydrophobes que les groupements silanols [106].

Ces mesures d'angle de contact permettent donc une première validation de la présence d'aminosilanes à la surface des substrats de verre recouverts de PDMS.

IV.1.6 Caractérisation par microanalyse X

Une deuxième caractérisation de la fonctionnalisation des substrats de verre recouverts de PDMS a été effectuée par microanalyse X. La microanalyse X par spectrométrie à dispersion d'énergie (EDX ou EDS) couplée à un microscope électronique à balayage (MEB) permet la détermination de la composition chimique d'une surface. Elle consiste à analyser les rayons X générés par un échantillon placé sous le faisceau d'électrons du microscope électronique à balayage (MEB). Le rayonnement émis lors de l'interaction entre les électrons X et la matière de l'échantillon est retranscrit sous forme de spectre, où apparaissent des pics d'intensité variable, caractéristiques des éléments métalliques ou minéraux en présence.

Le principe de la microanalyse X par EDX est le suivant : un faisceau d'électrons primaires (générés au sein du canon du microscope) interagit avec les atomes de l'échantillon par des chocs de type inélastique. Ces atomes sont alors ionisés, et passent de l'état fondamental à l'état excité par l'éjection d'un électron, en général de valence. Cet électron libéré est dit « secondaire ». Les atomes excités retournent à leur état d'équilibre en réaménageant leur cortège électronique. Ce mécanisme génère l'émission de rayons X. Le rayonnement est détecté et enregistré par un détecteur placé dans la chambre du microscope.

L'appareil utilisé pour ces mesures est un microscope électronique à balayage Hitachi S-3600N équipé d'un système de microanalyse X. La mise au point sur la surface de l'échantillon est d'abord réalisée par MEB, puis une tension de 3 kV est appliquée. Les pourcentages des différents atomes présents à la surface de l'échantillon sont affichés sur le logiciel Noran System Six. La Figure IV.6 montre des exemples de spectres EDX réalisés pour le PDMS silanisé (en a) et non silanisé (en b). Le Tableau IV.2 présente les valeurs moyennes des proportions des atomes de carbone, oxygène et silicium pour des substrats de PDMS silanisés et non silanisés.

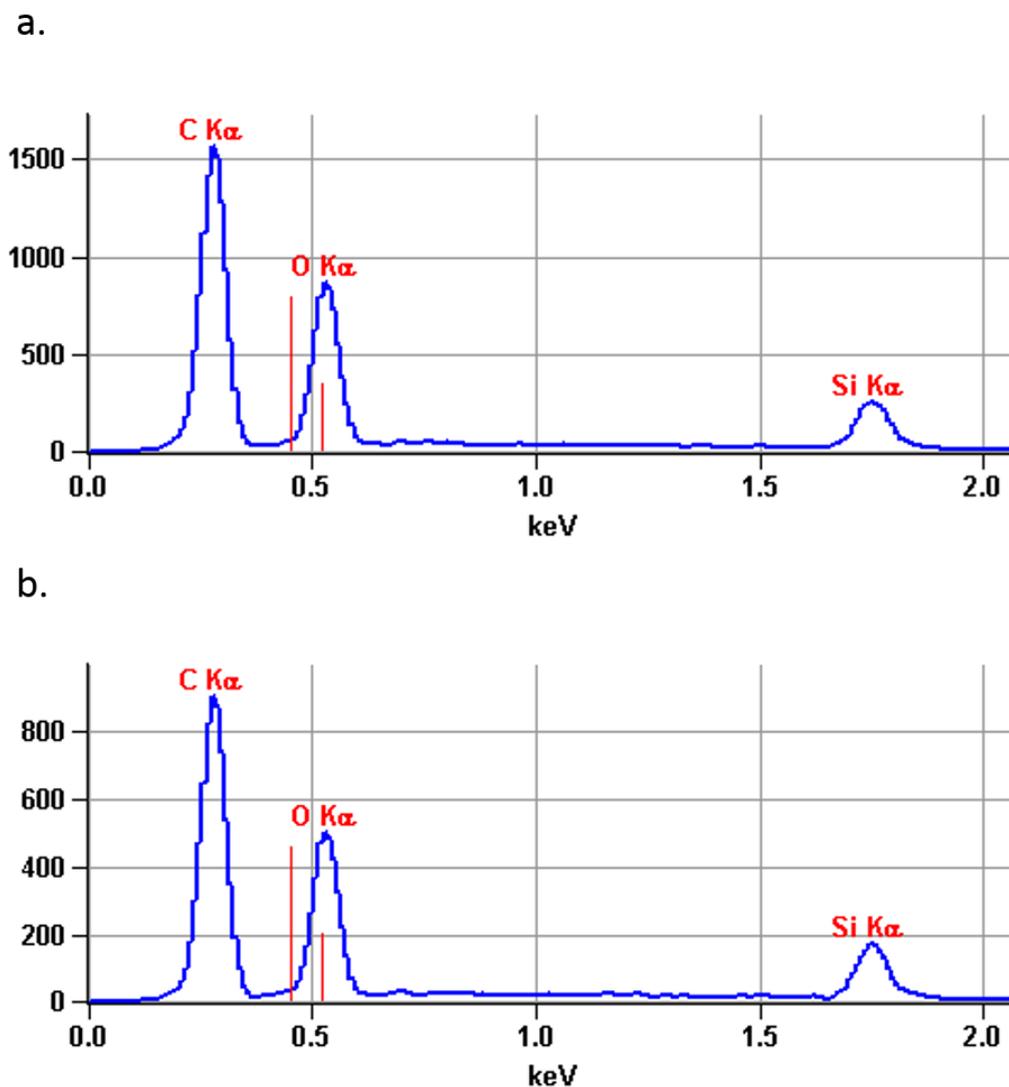


Figure IV.6. Spectres EDX présentant les pics caractéristiques du carbone C, de l'oxygène O et du silicium Si. En a, spectre du PDMS silanisé. En b, spectre du PDMS non silanisé comme contrôle.

Tableau IV.2. Proportion des atomes de carbone, oxygène et silicium à la surface des échantillons de PDMS silanisés et non silanisés

Echantillon	Proportion atomique(%) ^[a]	
PDMS silanisé	% C	49,2 ± 0,4
	% O	31,5 ± 0,6
	% Si	19,3 ± 0,7
PDMS non silanisé	% C	48,5 ± 1,0
	% O	31,0 ± 1,1
	% Si	20,6 ± 1,9

^[a] Valeurs moyennes de 8 mesures pour deux échantillons pour le PDMS silanisé et de 5 mesures pour un échantillon contrôle de PDMS non silanisé après plasma O₂. La silanisation est mise en évidence par l'augmentation du rapport $\frac{\%C}{\%Si}$.

L'analyse du rapport $\frac{\%C}{\%Si}$ permet de mettre en évidence la présence de silanes à la surface de l'échantillon de PDMS. En effet, le PDMS présente un nombre significatif d'atomes de silicium Si. La silanisation par l'APTES provoque la formation de liaisons Si – C et l'écrantage des atomes de silicium du PDMS par les atomes de carbone des silanes. On voit donc une augmentation du pourcentage d'atomes de carbone %C, et une diminution du pourcentage d'atomes de silicium %Si. Ainsi, la silanisation implique une augmentation du rapport $\frac{\%C}{\%Si}$. C'est ce qui est observé dans notre cas, puisque le rapport $\frac{\%C}{\%Si}$ vaut $2,38 \pm 0,54$ pour le PDMS non silanisé, et augmente à une valeur de $2,56 \pm 0,12$ pour le PDMS silanisé. Bien que cette augmentation ne soit pas significative, elle est cohérente avec les mesures réalisées dans l'équipe sur des substrats de silicium recouverts de PDMS. Ces résultats seuls ne permettent pas de valider la silanisation du PDMS, mais ils s'inscrivent dans une démarche de caractérisation des échantillons selon plusieurs méthodes (angle de contact, microanalyse X, imagerie de fluorescence). La caractérisation par

microanalyse X permet donc une deuxième validation de la présence d'aminosilanes à la surface des substrats de verre recouverts de PDMS.

Une dernière validation, celle-ci par fluorescence est effectuée une fois le canal réalisé. Elle est présentée en IV.2.5.

IV.2 Fabrication du dispositif microfluidique

Cette deuxième partie décrit d'abord les étapes de fabrication du capot de PDMS puis de collage de celui-ci sur les substrats silanisés pour la réalisation du dispositif final schématisé en Figure IV.7. Dans cette configuration, le capot de PDMS n'est pas silanisé, ce qui doit permettre d'envisager une fonctionnalisation différente du capot par rapport au substrat de PDMS. La dernière sous-partie présente une validation par imagerie de fluorescence de la présence de silanes dans le canal microfluidique.

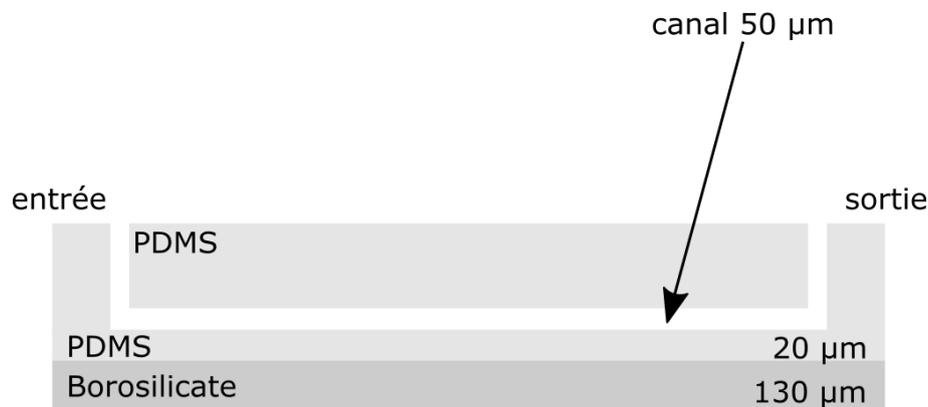


Figure IV.7. Schéma du dispositif microfluidique. 20 µm de PDMS sont déposés par spin coating sur un substrat de borosilicate d'épaisseur 130 µm. Le PDMS est ensuite fonctionnalisé par silanisation. Le capot de PDMS structuré est collé à la surface du substrat afin de former un canal d'une épaisseur de 50 µm.

IV.2.1 Conception des masques pour la réalisation des moules des micro-canaux

La réalisation des micro-canaux requiert l'élaboration d'un moule en résine comportant le motif du canal à fabriquer. Dans un premier temps, les masques nécessaires à la conception de ces moules sont réalisés.

Il existe deux types de masques pour la photolithographie. Le premier consiste en un substrat de verre ou de quartz recouvert d'une fine couche de chrome et de résine. Cette résine est attaquée par un laser pour former un motif. Les parties où le chrome a été attaqué vont laisser passer les UV au travers du substrat de verre ou de quartz. Ce type de masque, qui est le plus utilisé en microélectronique, présente une bonne résolution (environ 2 μm), une résistance au solvant et une facilité de nettoyage, mais coûte cher et nécessite un temps certain (plus d'une semaine) en termes de réalisation. Une alternative nettement moins coûteuse et bien plus rapide consiste à imprimer le motif voulu sur une feuille plastique. Ceci implique une résolution moins bonne et quelques irrégularités, mais les dimensions souhaitées pour nos canaux justifient l'utilisation de ce procédé de fabrication des masques.

Les masques utilisés dans ce projet, dessinés avec le logiciel Inkscape et imprimés par l'imprimerie IDM, sont présentés en Figure IV.8.

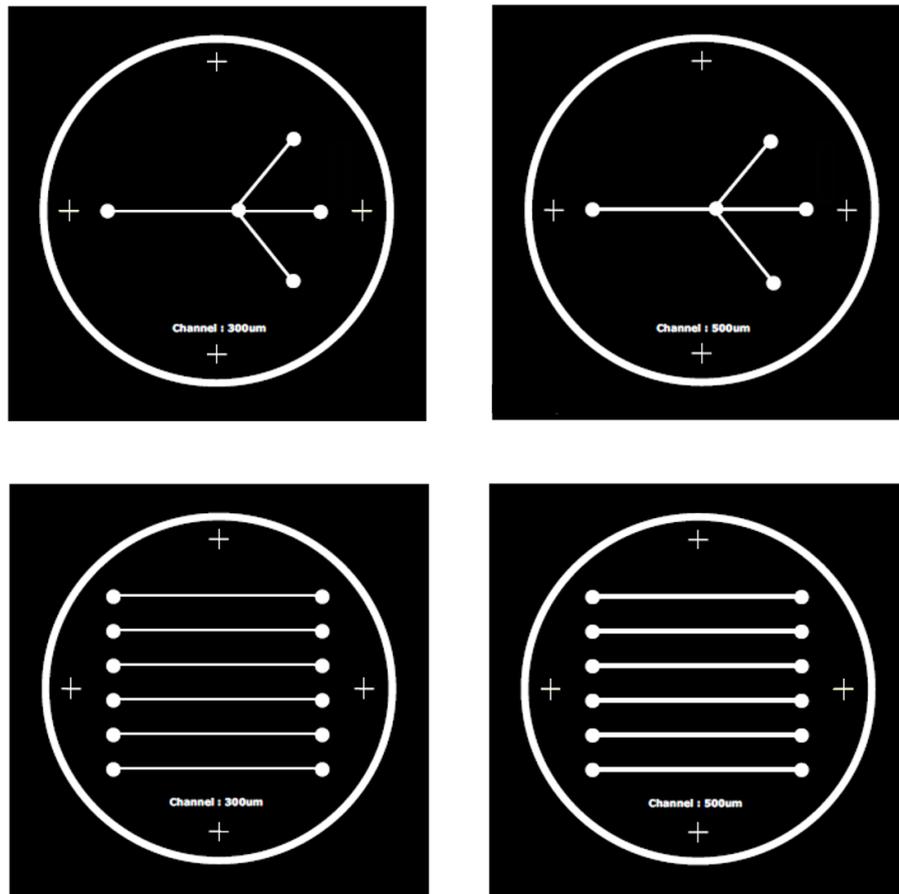


Figure IV.8. Dessins des masques pour la fabrication des dispositifs microfluidiques.

IV.2.2 Réalisation du moule en résine

Un moule en résine est réalisé afin de fabriquer les capots de PDMS contenant les motifs des micro-canaux. Pour ce faire, la résine est déposée sur un substrat de silicium, puis le motif est créé par photolithographie. Une étape de développement permet ensuite l'obtention du moule.

La résine choisie pour la fabrication des moules est la résine SU-8 de chez MicroChem. La SU-8 est une résine époxy photosensible négative très visqueuse pouvant être déposée sur des substrats à des épaisseurs de 0,5 μm à plus de 200 μm .

Le motif est révélé sur le substrat enrésiné par photolithographie. La photolithographie est basée sur l'exposition d'une résine photosensible aux UV. La

réalisation du motif peut se faire au travers d'un masque, ou par impression directe par laser. L'exposition aux UV (insolation) implique une modification chimique de la résine photosensible, les zones exposées vont donc devenir soit solubles (cas d'une résine positive), soit insolubles (cas d'une résine négative) lors de l'étape ultérieure de développement.

Le protocole de fabrication des moules en résine est représenté en Figure IV.9 et détaillé ci-après.

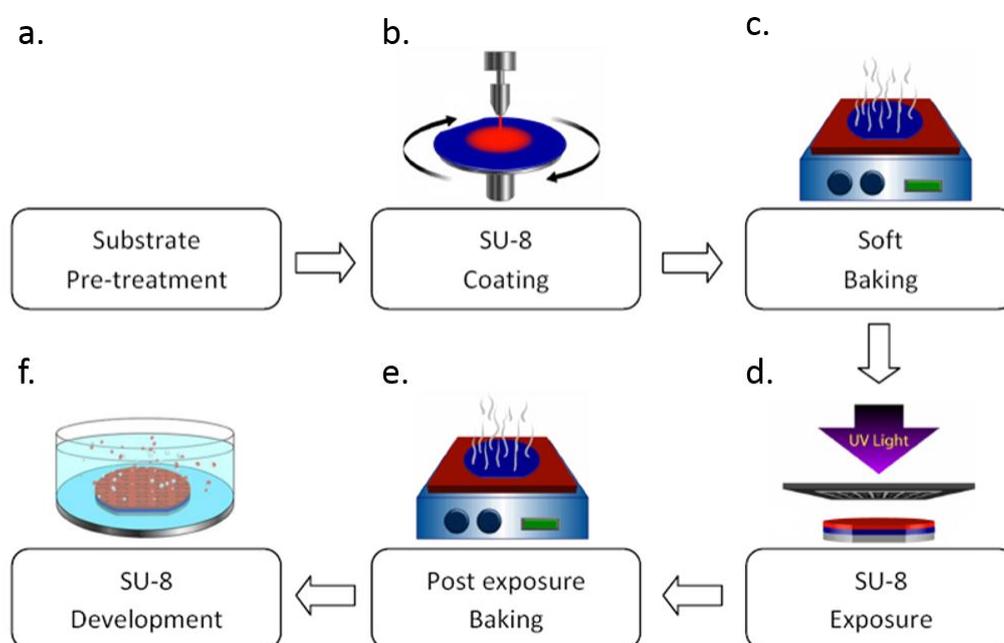


Figure IV.9. Schéma des étapes de fabrication du moule en résine pour la fabrication des capots de PDMS contenant les motifs des micro-canaux. Image extraite du site d'Elveflow (elveflow.com).

Le substrat d'accueil de silicium 2 pouces (5 cm de diamètre) de 500 μm d'épaisseur est tout d'abord nettoyé avec une solution piranha. Ce mélange hautement réactif, préparé à partir d'acide sulfurique (H_2SO_4) et d'eau oxygénée (H_2O_2) en proportions 4 pour 1, permet d'éliminer les contaminants organiques des surfaces. Un nettoyage à l'acétone peut également être réalisé. Le substrat est ensuite séché à l'azote.

Le volume souhaité de résine SU-8 2025 est transféré dans une petite bouteille en verre la veille de l'enrésinement afin de limiter la présence de bulles d'air dans la résine. Le substrat (wafer) est tout d'abord déshydraté sur une plaque chauffante à

95°C pendant 5 minutes (ou 65°C pendant 10 minutes) (Figure IV.9.a), puis il est placé sur une tournette d'enrésinement. La résine SU-8 2025 est déposée lentement (afin d'éviter les bulles) en escargot au centre du wafer, sur environ deux tiers de la surface (Figure IV.9.b). L'enrésinement se fait ensuite avec les paramètres suivants :

- Phase 1 :
 1. Accélération 100 tours/min/sec (= 500 tours/min pendant 5 secondes)
 2. Vitesse 500 tours/min pendant 10 secondes
- Phase 2 :
 1. Accélération 300 tours/min/sec (= 1800 tours/min pendant 6 secondes)
 2. Vitesse 1800 tours/min pendant 30 secondes.

Il est à noter que l'utilisation de certaines autres résines SU-8 avec d'autres paramètres d'enrésinement peuvent également permettre le dépôt d'une couche de 50 µm d'épaisseur.

Une fois l'enrésinement terminé, le wafer est directement placé sur une plaque chauffante à 65°C afin de limiter la formation de crevasses et de bulles. Une étape de recuit (Figure IV.9.c) est ensuite effectuée : 65°C pendant 1 minute puis 95°C pendant 8 minutes sur une deuxième plaque chauffante (dans le cas de l'utilisation d'une unique plaque chauffante, le protocole est le suivant : 65°C (1min) puis 75°C (3min) puis 85°C (7min) puis 95°C (11min) puis 75°C (25min) ; la durée totale est de 25 minutes, il faut changer la température pour la suivante au temps indiqué entre parenthèses).

L'enduction centrifuge peut entraîner l'apparition d'une surépaisseur au niveau des bords du substrat. Celle-ci est supprimée à l'aide d'un coton-tige imbibé d'acétone. Ceci est nécessaire afin de mettre le substrat au contact du masque lors de l'étape d'insolation, permettant ainsi de limiter les effets de diffraction impliquant une perte de résolution sur les motifs créés.

L'étape de photolithographie (Figure IV.9.d) est effectuée idéalement le lendemain afin de s'assurer que le wafer soit réhydraté et qu'il ne colle pas au masque. L'insolation est réalisée avec l'aligneur double-face EVG 620. Le masque plastique (défini en IV.2.1) est collé à un substrat de verre préalablement nettoyé à l'acétone et à l'isopropanol. Le substrat de silicium enrésiné est aligné avec le masque, puis

exposé aux rayonnements UV. Pour insoler 50 μm de résine SU-8 2025, le mode « Proximité » est choisi (le masque n'est pas en contact avec le substrat, mais à une distance très faible de l'ordre de quelques microns), et une dose d'insolation de 250 mJ/cm^2 est appliquée.

Une étape de recuit (Figure IV.9.e) vient ensuite assurer l'élimination rapide d'une partie des solvants et la polymérisation de la matrice : 65°C pendant 1 minute puis 95°C pendant 7 minutes sur une deuxième plaque chauffante (dans le cas de l'utilisation d'une unique plaque chauffante, le processus est celui décrit précédemment pour le premier recuit).

L'étape de développement (Figure IV.9.f) vient finaliser le procédé de fabrication des moules en résine en permettant la dissolution de la résine non insolée (dans le cas d'une résine négative). Le substrat enrésiné et insolé est plongé dans un cristalliseur de SU-8 developer et agité manuellement pendant environ 6 minutes. Cette étape révèle les motifs que l'on devinait déjà lors du recuit post-insolation. Le wafer est ensuite plongé dans l'isopropanol. Si le développement n'est pas terminé, des traces blanches apparaissent sur le substrat. L'opération est alors répétée jusqu'au développement complet. Un séchage par azote achève le procédé de fabrication du moule en résine. L'épaisseur est contrôlée par profilométrie mécanique (Dektak 8, Veeco). Deux exemples de moules en résine sont présentés en Figure IV.10.



Figure IV.10. Photos des moules en résine SU-8 réalisés sur des substrats 2 pouces pour la fabrication des dispositifs microfluidiques. A gauche, modèle patte d'oie : largeur 500 μm , épaisseur 50 μm , longueur 3 cm ; à droite, modèle canaux parallèles : largeur 300 μm , épaisseur 50 μm , longueur 3 cm.

IV.2.3 Fabrication du capot de PDMS

Une fois le moule en résine réalisé, il est possible de fabriquer les capots de PDMS contenant les motifs des canaux microfluidiques. Un moule en résine est réutilisable jusqu'à dégradation, et permet donc de fabriquer plusieurs capots.

Le PDMS est préparé de la même façon que pour le dépôt sur le substrat de borosilicate (IV.1.2), avec un rapport pré-polymère/réticulant de 10:1 et un dégazage sous vide d'une heure.

Le couvercle d'une boîte de Petri (de préférence en verre) de taille adaptée au masque (2 pouces dans notre cas) est tapissé d'aluminium. L'aluminium est aplani, en appliquant par exemple une pression sur la boîte de Petri à l'intérieur du couvercle tapissé d'aluminium (Figure IV.11.a). Le PDMS est ensuite coulé sur le moule positionné dans la boîte de Petri. On pèse environ 10 g de PDMS pour obtenir un capot d'à peu près 5 mm d'épaisseur. En effet, le capot ne doit pas être trop épais afin de s'affranchir de toute considération de diffusion de la lumière dans le PDMS, mais il doit l'être suffisamment pour permettre d'y insérer les capillaires pour la microfluidique. Si des bulles apparaissent dans le PDMS, un dégazage de 20 à 30 minutes peut être effectué. L'ensemble est ensuite mis à chauffer dans une étuve à 75°C pendant 2 heures (Figure IV.11.b et IV.11.c). A la fin du recuit, le moule en résine est séparé de la boîte de Petri, l'aluminium et la couche de PDMS sous le wafer sont enlevés à l'aide d'un scalpel, et le capot de PDMS est décollé du substrat. Les extrémités du canal (au niveau des réservoirs) sont perforées afin de créer les entrées et les sorties du canal. Le PDMS est ensuite découpé au scalpel selon le motif du capot. Il est important de bien enlever les bords pour éviter les surépaisseurs afin d'optimiser l'adhérence lors du collage du capot sur le substrat.



Figure IV.11. Photos illustrant deux étapes du procédé de fabrication des capots de PDMS contenant les motifs des canaux microfluidiques. En a, boîte de Petri tapissée d'aluminium pour le coulage du PDMS. En b et c, PDMS coulé sur les moules en résine.

IV.2.4 Collage du capot sur les substrats silanisés

Le capot ainsi fabriqué peut être collé sur le substrat de borosilicate recouvert de PDMS et silanisé avec l'APTES. La technique usuelle de collage irréversible consiste à activer par un plasma oxygène les surfaces du substrat et du capot qui vont se retrouver en contact. Un plasma oxygène est donc appliqué avec une pression de 0,4 mbar et une puissance de 160 W pendant une minute. Le capot de PDMS est ensuite collé sur le substrat le plus rapidement possible (dans les 15 secondes suivant la réalisation du plasma O_2). Les dispositifs ainsi formés sont finalement placés dans une étuve à 75°C pendant une heure. Un poids est positionné sur chaque capot pendant le recuit afin d'optimiser le collage. Des exemples de dispositifs ainsi obtenus sont présentés en Figure IV.12.

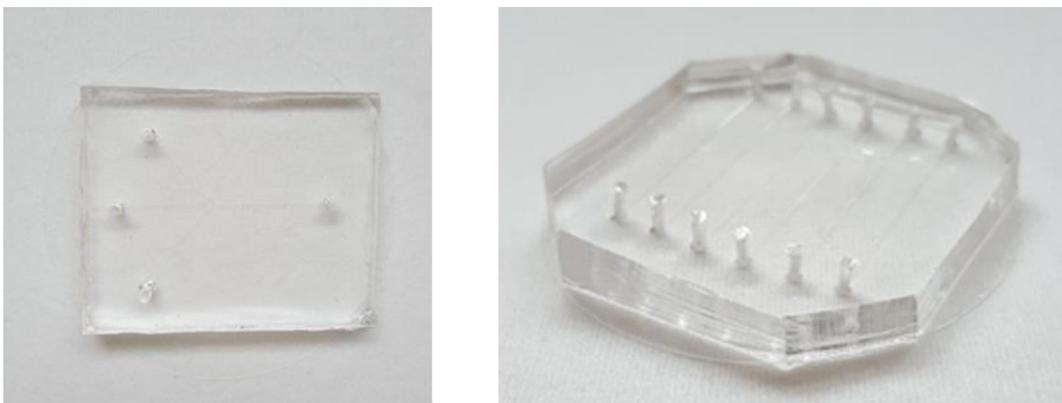


Figure IV.12. Photos des dispositifs microfluidiques. A gauche, un modèle patte d'oie ; à droite, un modèle canaux parallèles.

IV.2.5 Validation de la présence de silanes par imagerie de fluorescence

Le collage irréversible du capot de PDMS sur le substrat silanisé a posé la question de la résistance des silanes lors du procédé. L'utilisation de la fluorescamine a permis de valider la présence des silanes au sein du canal microfluidique.

La fluorescamine est une molécule non fluorescente qui réagit avec les amines primaires pour former des composés fluorescents selon la réaction présentée en Figure IV.13. Son pic d'excitation se situe à 390 nm, son pic d'émission à 475 nm et son utilisation permet entre autres de caractériser la présence d'aminosilanes [120], [121].

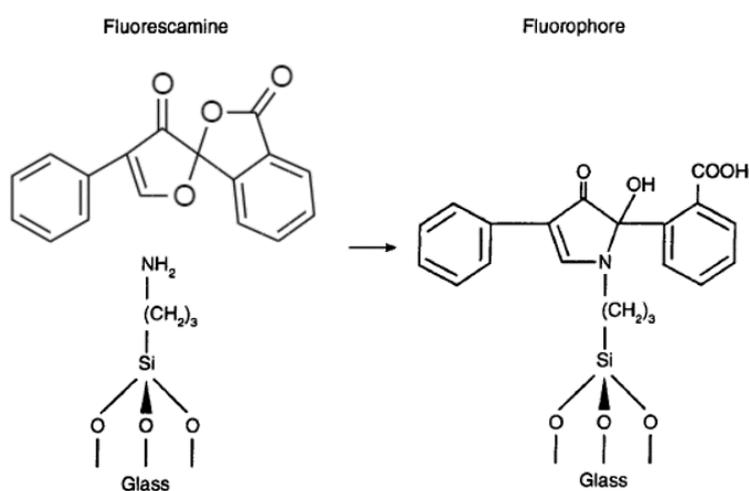


Figure IV.13. Réaction entre la fluorescamine et l'amine primaire du silane donnant lieu au composé fluorescent pour le cas de verre fonctionnalisé avec de l'APTMS. Schéma adapté de la référence [120].

Afin de valider, grâce à la fluorescamine, la présence de silanes à la surface des substrats de verre recouverts de PDMS, une première expérience est tout d'abord menée en pleine plaque sur des substrats clivés sans capot de PDMS.

Dans un premier temps, une validation de la silanisation par mesure d'angle de contact est effectuée sur des substrats silanisés et non silanisés (échantillons contrôles), et une solution de fluorescamine à 2 mg/mL est préparée dans l'acétone. Les substrats silanisés et non silanisés sont ensuite incubés avec une solution de fluorescamine à 200 $\mu\text{g/mL}$ dans le PBS 1X (préparée juste avant l'expérience) pendant quelques minutes et sous agitation manuelle. Les substrats sont ensuite rincés trois fois cinq minutes au PBS 1X, puis observés au microscope (Figure IV.14).

Les images, réalisées à l'aide d'une loupe binoculaire droite (Série B+, Euromex), montrent la présence de fluorescence pour les échantillons silanisés après greffage de la fluorescamine.

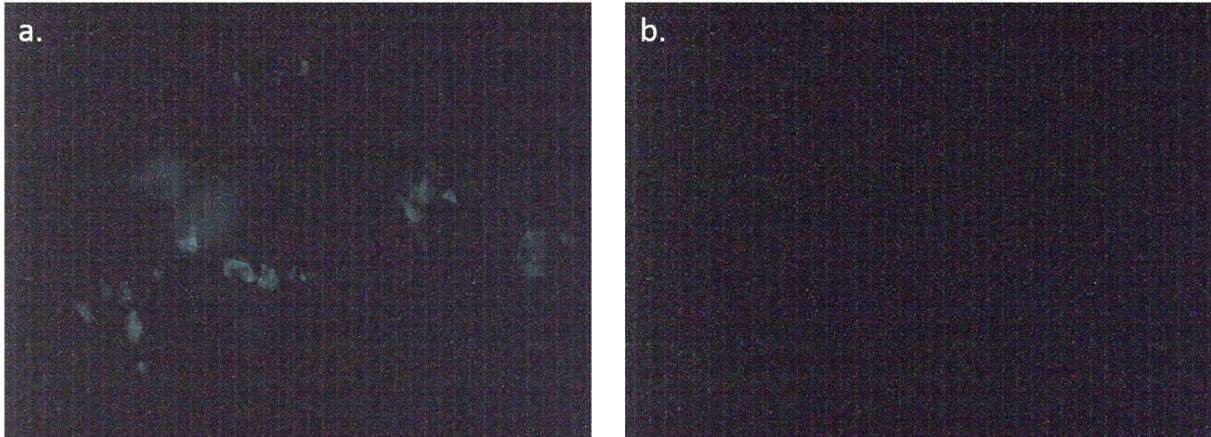


Figure IV.14. Images de fluorescence des substrats après greffage de la fluorescamine. En a, substrat silanisé, et en b, substrat contrôle non silanisé. Le filtre Violet (excitation 330 – 400 nm, émission 425 nm) est utilisé pour l'observation de la fluorescence de la fluorescamine.

Afin de valider la présence des silanes dans les canaux après collage du capot de PDMS, l'expérience est ensuite réalisée dans des dispositifs microfluidiques. Une solution de fluorescamine à 2,65 mg/mL est introduite dans un canal silanisé et dans un canal contrôle non silanisé. Les canaux sont ensuite rincés au PBS 1X, puis observés au microscope (Figure IV.15). Les images sont réalisées à l'aide d'un microscope de fluorescence inversé en champ large (IX71, Olympus), avec un objectif à air de grandissement 20x et d'ouverture numérique 0,75 (UPlanSApo, Olympus). Une source de lumière excitatrice en champ large pour la fluorescence (X-Cite 120Q) produit un faisceau d'une puissance de 14,4 W. Pour l'observation de la fluorescamine, une sélection spectrale de la lumière excitatrice est effectuée à l'aide d'un filtre d'excitation passe-bande 360/23 nm (FF01-360/23-25, BrightLine, Semrock). Un miroir dichroïque permet la transmission au-delà de 458 nm (F38-458 Beamsplitter HC BS 458 FF458-Di02-25x36, BrightLine, Semrock). La sélection spectrale sur le signal de fluorescence de l'échantillon se fait à l'aide d'un filtre d'émission passe-bande 470/22 nm (FF01-470/22-25, BrightLine, Semrock). Le temps d'acquisition est de 300 ms. Les images, acquises avec une caméra sCMOS (PCO edge) montrent la présence

de fluorescence pour les échantillons silanisés après greffage de la fluorescamine. Après soustraction du bruit, le canal silanisé présente une intensité de fluorescence d'environ 3000 coups contre environ 80 coups pour le canal contrôle non silanisé.

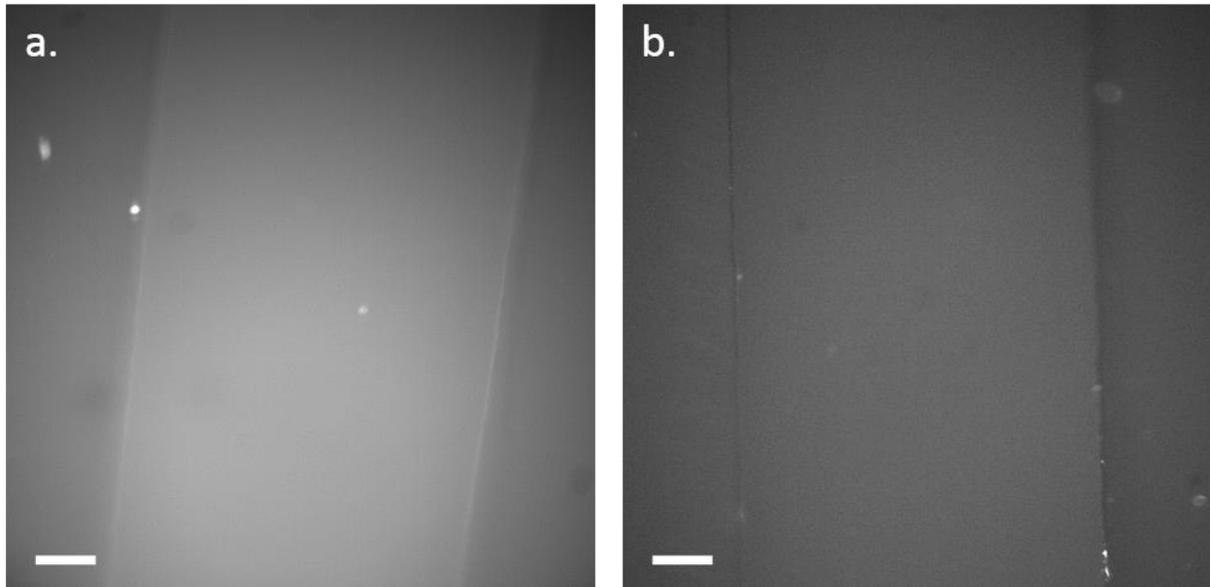


Figure IV.15. Images de fluorescence des canaux après greffage de la fluorescamine. En a, canal silanisé (environ 3000 coups), et en b, canal contrôle non silanisé (environ 80 coups). L'échelle représente 50 μm . Les filtres utilisés pour l'observation de la fluorescence de la fluorescamine sont : excitation = 360/23 nm, dichroïque = 458 nm, émission 470/22. Le temps d'acquisition est de 300 ms.

Il est important de noter que ces expériences de greffage de la fluorescamine, tant pleine plaque que dans les canaux microfluidiques, sont les premières que nous avons réalisées, et sont à optimiser, notamment en termes de concentrations, débits, temps de rinçage et conditions d'observation (des tests effectués avec de la BSA – présentant des amines – montrent que l'utilisation d'un filtre d'émission 494/20 au lieu de 470/22 nm permet une meilleure observation de la fluorescamine). Le déménagement du laboratoire C2N a impliqué l'impossibilité de pratiquer les expériences décrites dans ce chapitre et donc de fabriquer les dispositifs microfluidiques. Néanmoins, ces expériences de greffage de la fluorescamine constituent une validation de la présence de silanes dans le canal microfluidique fonctionnalisé.

IV.3 Conclusion

En m'appuyant sur l'expertise du département Microsystèmes et NanoBioFluidique du laboratoire C2N, j'ai pu développer un procédé simple pour la réalisation de dispositifs microfluidiques et leur observation en microscopie inversée. Chaque étape de fabrication du canal microfluidique a été caractérisée par profilométrie mécanique, de façon à estimer les épaisseurs de PDMS sur les substrats de verre ainsi que les hauteurs des moules en résine pour la fabrication des capots. La fonctionnalisation des dispositifs par silanisation a également été caractérisée par différentes méthodes. Ainsi, des mesures d'angle de contact, la détermination de la composition des surfaces par microanalyse X et l'acquisition d'images de fluorescence de la fluorescamine ont permis de valider la présence d'aminosilanes greffés à la surface des canaux de PDMS.

Comme évoqué dans la conclusion du chapitre III, la possibilité de combiner l'étude réalisée sur les substrats Al-SiO₂ (présentée dans les chapitres II et III) avec le développement d'un biocapteur par FRET en conditions microfluidiques ouvre la voie vers un dispositif intégré de séquençage de protéines. Mais le dispositif microfluidique fonctionnalisé présenté dans ce chapitre IV constitue avant tout le point de départ pour la réalisation d'immunodosages par FRET en conditions microfluidiques. Le concept de ce projet, intitulé μ FRET, est détaillé dans le chapitre V.

V Elaboration d'une stratégie pour la réalisation d'un biocapteur microfluidique par FRET multiplexé

La première étude réalisée dans le cadre de ma thèse (présentée dans les chapitres II et III) m'a permis d'acquérir la maîtrise de différentes techniques, notamment en termes de fonctionnalisation et de détection de FRET par microscopie de fluorescence. J'ai eu l'idée de combiner ces techniques issues des savoir-faire des laboratoires I2BC et C2N, et j'ai donc pensé un projet visant à développer un dispositif miniaturisé permettant une détection sensible de biomarqueurs, par un immunodosage s'appuyant sur la mesure de FRET réalisée en conditions microfluidiques. Le projet a reçu un financement du Labex NanoSaclay pour une période de 18 mois de mai 2018 à octobre 2019.

Bien que le déménagement du laboratoire C2N ait impliqué l'impossibilité de fabriquer des dispositifs sur la fin de ma thèse, il a été démontré au chapitre IV qu'il était possible d'obtenir des canaux microfluidiques fonctionnalisés. Ces dispositifs constituent le point de départ du projet μ FRET présenté dans ce chapitre V. La première partie de ce chapitre présente le concept que j'ai développé pour la réalisation d'un biocapteur par FRET en conditions microfluidiques. La deuxième partie expose les résultats de quelques expériences préliminaires précédant la réalisation du système de détection.

V.1 Stratégie pour le développement d'un immunodosage multiplexé par FRET dans un canal microfluidique

V.1.1 Le complexe de terbium comme donneur pour divers accepteurs pour la détection résolue en temps

Le terbium (Tb), élément 65 de la classification périodique, appartient au groupe des lanthanides (et à celui des terres rares). Libres, les ions terbium en milieu aqueux possèdent un coefficient d'extinction molaire très faible (de l'ordre de $1 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, bien inférieur aux fluorophores organiques conventionnels), ce qui rend leur observation difficile. L'utilisation d'un ligand complexé à l'ion Tb^{3+} permet en revanche l'obtention d'un donneur de FRET aux propriétés optiques particulièrement favorables (Figure V.1.a). Ainsi, les complexes de terbium tels que ceux commercialisés par l'entreprise Lumiphore sous le nom de Lumi4-Tb possèdent un ion Tb^{3+} central et un ligand complexé. L'ion Tb^{3+} central présente des bandes d'émission étroites et distinctes ainsi qu'une durée de vie extrêmement longue (jusqu'à la ms), et le ligand complexé sert à la fois d'antenne de collecte de la lumière permettant un bon coefficient d'absorption, et de protection de l'ion central vis-à-vis des effets d'extinction par l'eau et les milieux biologiques environnants [122]. Le complexe de terbium Lumi4-Tb utilisé dans ce projet présente un coefficient d'extinction maximal de $26000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ à 340 nm, ainsi que les quatre bandes d'émission caractéristiques du terbium, à 490, 545, 585 et 620 nm (Figure V.1.b).

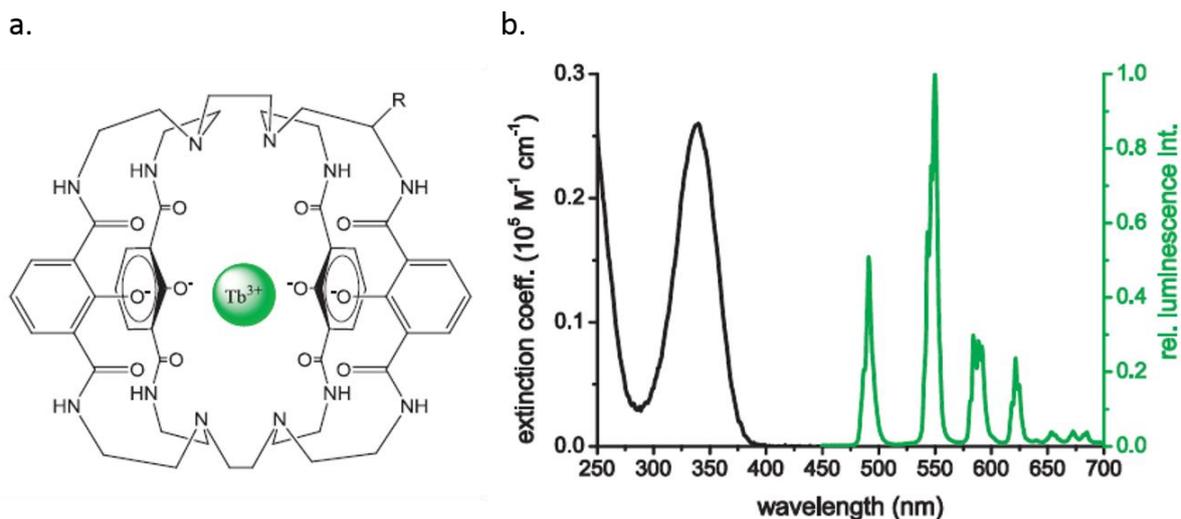


Figure V.1. Caractéristiques du complexe de terbium Lumi4-Tb. En a, représentation schématique de la structure du complexe ; le groupement R est un groupe fonctionnel permettant le greffage du complexe à des biomolécules, il s'agit dans cette étude d'un groupement NHS. En b, spectres d'absorption (en noir) et d'émission (en vert) rendant compte de l'important décalage entre l'absorption (250-400 nm) et l'émission (475-700 nm) permettant une très bonne discrimination spectrale. Images extraites de la référence [123].

La longue durée de vie de luminescence de ce complexe de terbium (de l'ordre de 2,3 ms) offre la possibilité d'une détection résolue en temps du phénomène de FRET, ce qui implique une réduction significative du bruit. Cette augmentation de la sensibilité permet la réalisation d'immunodosages présentant des limites de détection relativement basses [124]. La Figure V.2 présente le principe de la détection résolue en temps de FRET. L'extinction (quenching) du complexe de terbium donneur résulte en la diminution du temps de décroissance (pointillés verts) tandis que la sensibilisation (sensitization) de l'accepteur résulte en l'augmentation du temps de décroissance (pointillés rouges). La détection résolue en temps permet la mesure des deux signaux de photoluminescence (donneur et accepteur) dans une fenêtre temporelle (entre 10 μ s et environ 2 ms) afin de s'affranchir d'une grande partie du signal d'autofluorescence (aire bleue) ainsi que de la photoluminescence de l'accepteur issue de l'excitation lumineuse directe.

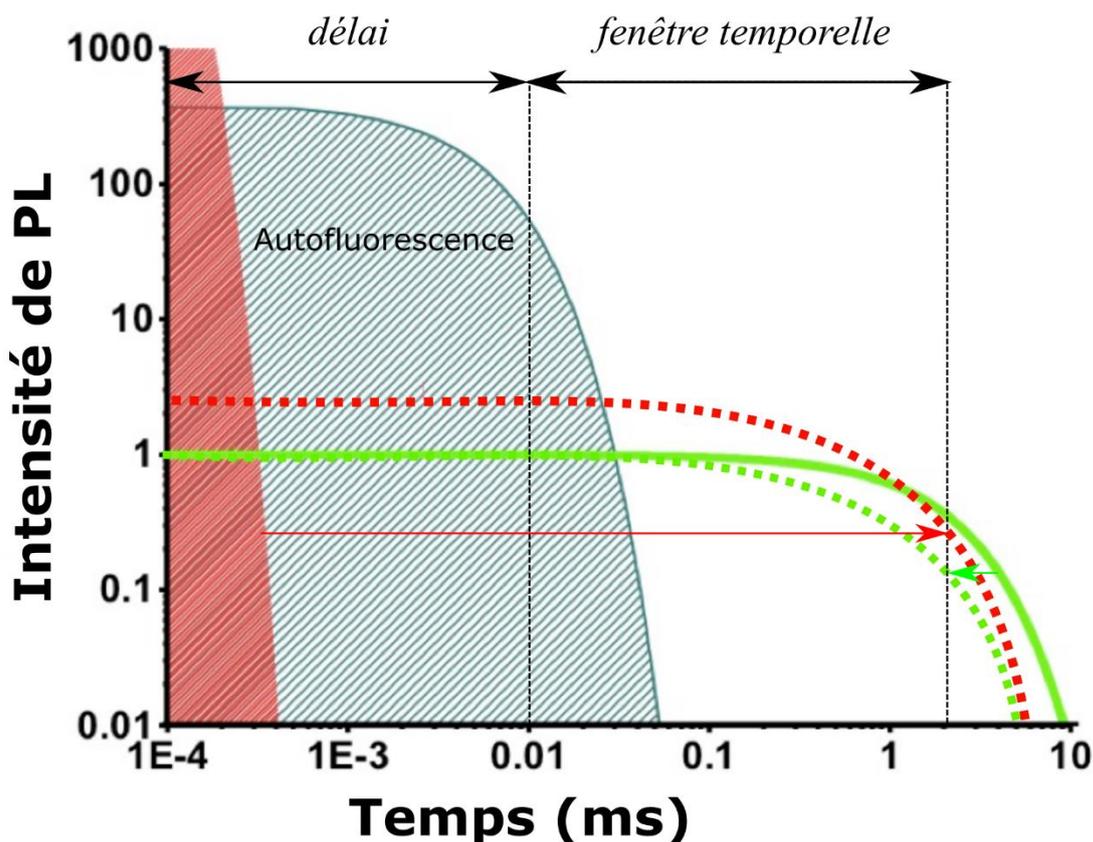


Figure V.2. Principe de la détection résolue en temps de FRET. L'intensité de photoluminescence (PL) après excitation pulsée (à $t = 0$) est représentée en fonction du temps en échelles logarithmiques. L'extinction (quenching ; flèche verte) du complexe de terbium donneur résulte en la diminution du temps de décroissance (pointillés verts) ; la sensibilisation (sensitization ; flèche rouge) de l'accepteur résulte en l'augmentation du temps de décroissance (pointillés rouges). La détection résolue en temps permet la mesure des deux signaux de PL (donneur et accepteur) dans la fenêtre temporelle afin de s'affranchir d'une grande partie du signal d'autofluorescence ainsi que de la PL de l'accepteur issue de l'excitation lumineuse directe. Image adaptée de la référence [125].

La longue durée de vie de luminescence de ce complexe de terbium permettant une très bonne discrimination temporelle, et ses quatre bandes d'émission parfaitement distinctes font de ce donneur de FRET un candidat idéal pour le multiplexage. Le multiplexage, par l'imagerie de différentes couleurs, permet la détection de plusieurs biomarqueurs dans un même échantillon, chacun caractérisé par une couleur distincte, favorisant ainsi le développement d'outils diagnostiques performants. La Figure V.3 présente les spectres de photoluminescence illustrant le phénomène de FRET multiplexé avec comme donneur un complexe de terbium et comme accepteurs des colorants (en a) ou des quantum dots (QDs) (en b). Les bandes d'émission du complexe de terbium étant étroites et parfaitement distinctes, le système

permet de placer différents filtres d'émission correspondant aux multiples accepteurs, en dehors du spectre d'émission du terbium. En outre, les pics d'émission du terbium se situent dans une gamme spectrale où de nombreux fluorophores s'avèrent être d'excellents absorbeurs, ce qui signifie que de bons recouvrements spectraux peuvent être obtenus.

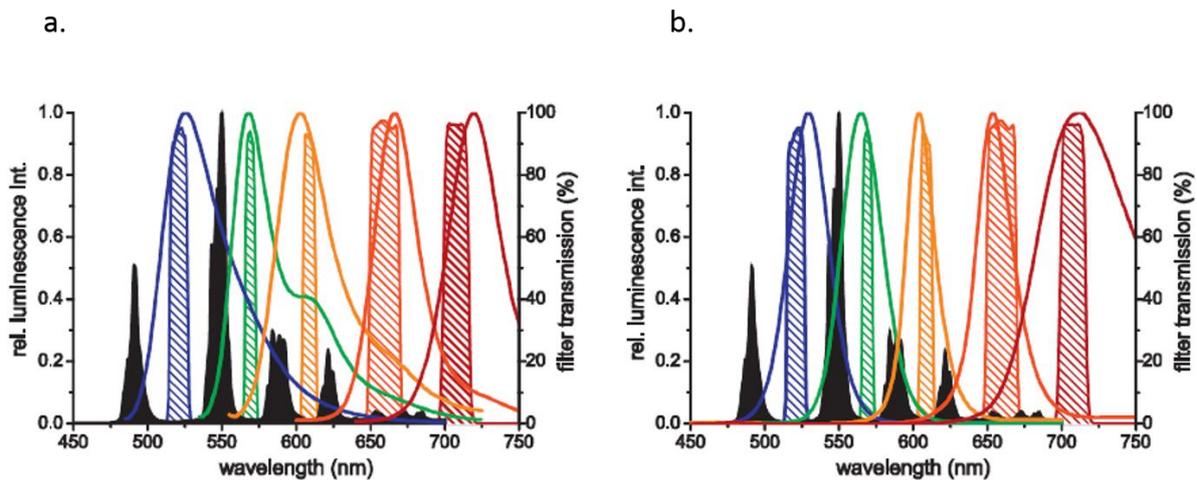


Figure V.3. Spectres de luminescence illustrant le phénomène de FRET multiplexé pour des systèmes constitués d'un complexe de terbium comme donneur (spectre de photoluminescence en noir). En a., colorants organiques comme accepteurs – OregonGreen (bleu), AlexaFluor555 (vert), AlexaFluor568 (jaune), Cy5 (orange) et AlexaFluor700 (rouge); en b., QDs comme accepteurs – Qdot525 (bleu), Qdot565 (vert), Qdot605 (jaune), Qdot655 (orange), and QDot705 (rouge). Les transmissions des filtres d'émission passe-bande associés sont représentées sous forme de hachures. Images extraites de la référence [123].

Les QDs possèdent des propriétés photophysiques uniques qui les rendent particulièrement adaptés comme accepteurs de FRET multiplexé. Les QDs peuvent en effet avoir des coefficients d'extinction très élevés sur une large gamme de longueurs d'onde et présentent des émissions ajustables en fonction de la taille des QDs, avec des bandes étroites et symétriques. L'utilisation des QDs comme accepteurs permet de s'affranchir du problème d'interférences spectrales (spectral crosstalk), fréquent dans les expériences de multiplexage. En outre, les QDs peuvent être très photostables comparés aux fluorophores organiques communément utilisés, et offrent souvent des rendements quantiques élevés.

V.1.2 Le projet μ FRET

Le projet μ FRET vise à développer un immunodosage multiplexé reposant sur le FRET entre un complexe de terbium et des fluorophores organiques dans un premier temps, puis des quantum dots dans un deuxième temps, dans un dispositif miniaturisé en conditions microfluidiques. Comme évoqué dans le premier chapitre (I.2.2. et I.3.2.), un tel système doit permettre l'utilisation d'un faible volume de réaction ainsi qu'une grande sensibilité et une bonne spécificité. A terme, le dispositif doit également pouvoir être automatisé pour le diagnostic médical dans les centres de prise en charge (point of care). Il s'agit donc ici de mettre en place une stratégie pour le développement d'un outil diagnostic performant pour la détection fiable et précoce de marqueurs de maladies.

La technologie de ce dispositif repose sur les savoir-faire combinés des laboratoires I2BC et C2N. Les expériences réalisées dans l'équipe Microsystèmes et NanoBioFluidique au C2N ont d'ores et déjà permis la réalisation d'un dispositif microfluidique fonctionnalisés (présenté dans le chapitre IV). L'expertise de l'équipe NanoBioPhotonique de l'I2BC en termes d'immunodosages homogènes en solution doit permettre la réalisation à court terme du système de détection. La Figure V.4 présente le schéma de principe du système proposé. Deux types d'anticorps sont greffés à la surface des canaux microfluidiques silanisés, chacun spécifique d'un type de biomarqueur. Ces anticorps sont marqués avec un complexe de terbium. Un échantillon contenant les biomarqueurs (sérum) est acheminé dans le canal, puis les seconds anticorps viennent permettre la réalisation des systèmes d'immunodosage de type sandwich. La détection se fait par observation du phénomène de FRET entre les premiers anticorps marqués au complexe de terbium donneur et les seconds marqués avec des fluorophores accepteurs (colorants organiques ou quantum dots).

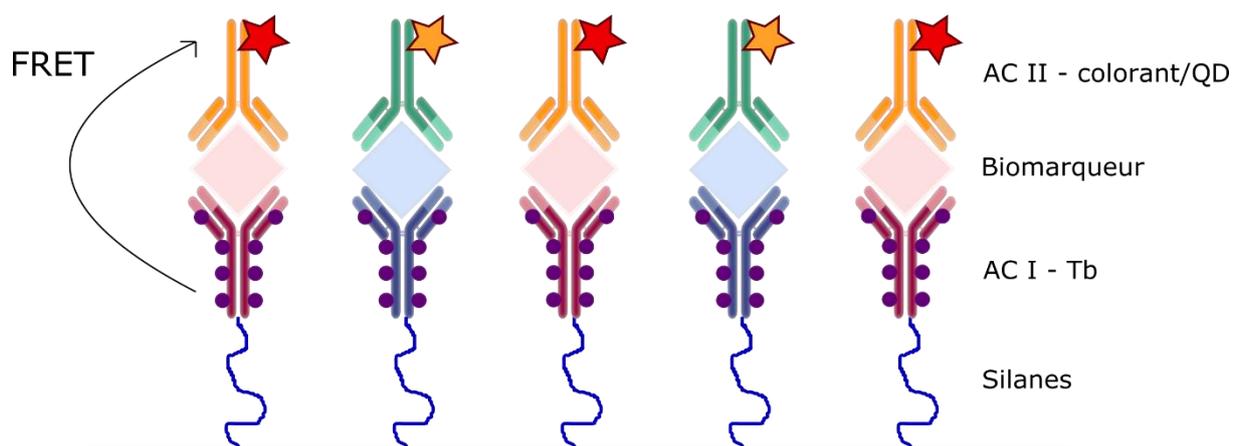


Figure V.4. Schéma de principe de la détection multiplexée. Exemple pour deux types de biomarqueurs détectés à l'aide de deux couples d'anticorps spécifiques. Les anticorps greffés aux silanes (AC I) sont marqués avec un complexe de terbium, et les seconds anticorps (AC II) avec des fluorophores différents en fonction du biomarqueur. Ce système de détection est réalisé à la surface des canaux microfluidiques de PDMS. Il est à noter que cette représentation schématique n'est pas tout à fait réaliste, mais présente bien le système proposé ; les anticorps sont conjugués et greffés aux silanes via les lysines.

Le multiplexage augmentant la complexité du dispositif de détection, il a été décidé de ne considérer dans un premier temps qu'un seul type de biomarqueur. Nous avons donc choisi la TPSA (Total Prostate Specific Antigen), biomarqueur spécifique du cancer de la prostate. Ce choix est motivé par la possibilité de détection de récurrence post-prostatectomie à un stade précoce par la quantification de la TPSA. La détection de la TPSA avec un système de FRET d'un complexe de terbium vers un quantum dot ayant été étudiée dans le cadre d'un immunodosage homogène en solution [126], ce modèle offre également la possibilité d'une analyse comparative de différents types de biocapteurs. Les paramètres de sensibilité, limite de détection, volume de réaction, temps de réaction et coût pourront être analysés.

La Figure V.5 présente le schéma de principe de la détection du marqueur TPSA par FRET d'un anticorps greffé à la surface silanisée d'un canal de PDMS et marqué avec un complexe de terbium donneur vers un anticorps marqué avec un fluorophore accepteur.

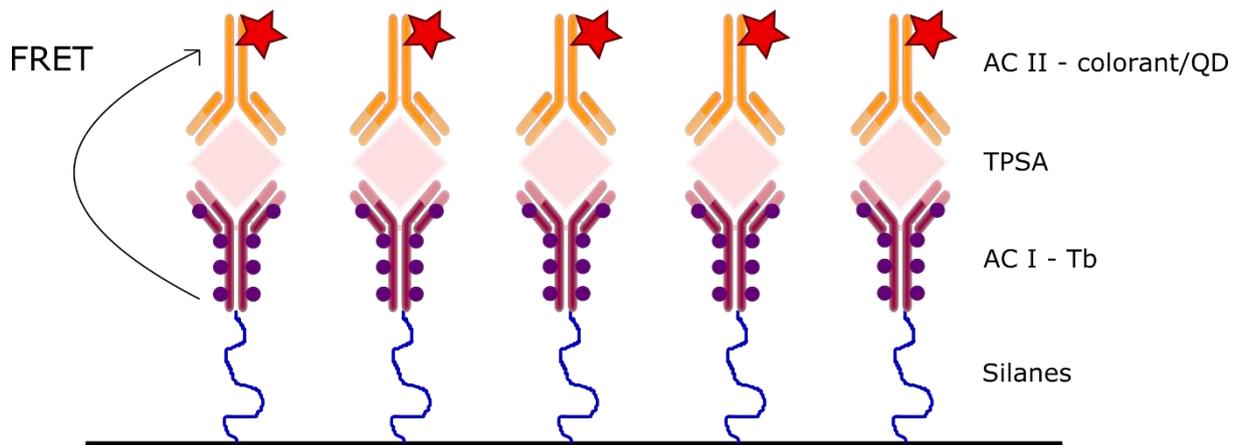


Figure V.5. Schéma de principe de la détection du marqueur TPSA par FRET d'un anticorps marqué avec un complexe de terbium donneur vers un anticorps marqué avec un fluorophore accepteur. Le premier anticorps est greffé à la surface silanisée d'un canal de PDMS.

Le projet décrit dans cette sous-partie a été mis en suspens sur la fin de ma thèse du fait du déménagement du laboratoire C2N, qui a impliqué l'impossibilité de fabriquer les dispositifs microfluidiques présentés au chapitre IV, et donc de réaliser le greffage des anticorps marqués sur les surfaces fonctionnalisées des canaux de PDMS. Néanmoins, le projet dispose d'un financement jusqu'au mois d'octobre 2019, ce qui doit permettre la réalisation de la preuve de concept de notre dispositif. Les résultats préliminaires obtenus sont présentés dans la seconde partie de ce chapitre.

V.2 Résultats préliminaires

V.2.1 Modèle simple pour la réalisation d'un immunodosage

Afin de démontrer la preuve de principe de la réalisation d'un immunodosage dans un canal microfluidique par FRET, j'ai choisi de travailler avec un modèle simple de reconnaissance d'anticorps primaires par des anticorps secondaires, sans biomarqueur de type antigène. La Figure V.6 présente le schéma de principe de cette détection. Des anticorps primaires de souris (I5381, Sigma) marqués avec des

complexes de terbium (Lumi4-Tb, Lumiphore) sont greffés à la surface de canaux de PDMS silanisés. Des anticorps secondaires anti-souris marqués avec un colorant (A11029, Invitrogen) viennent reconnaître les anticorps primaires. Un tel système doit pouvoir être détecté et quantifié par la signature de FRET du complexe de terbium vers le fluorophore.

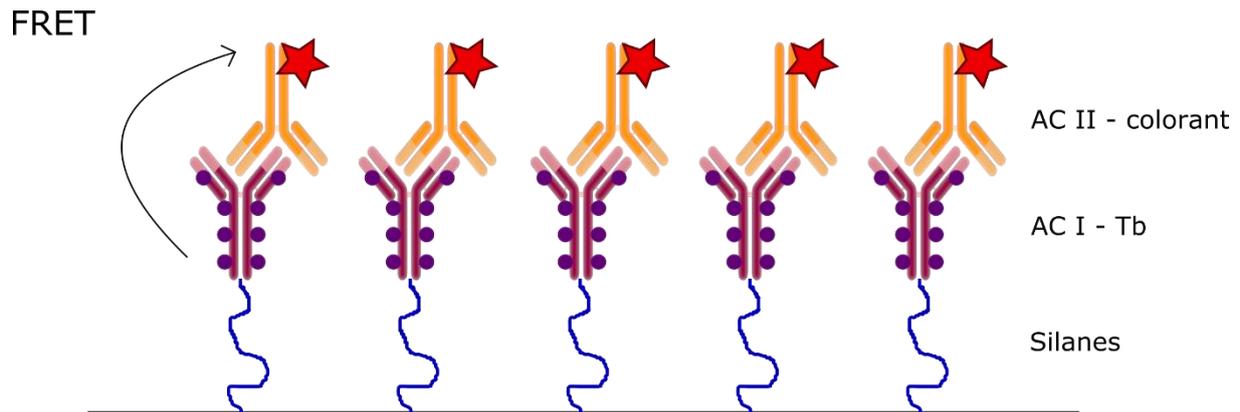


Figure V.6. Schéma de principe de la détection par FRET d'un système constitué d'un anticorps primaire marqué avec un complexe de terbium donneur et d'un anticorps secondaire marqué avec un fluorophore accepteur. Les anticorps primaires sont greffés à la surface des canaux de PDMS silanisés. Dans les expériences préliminaires présentées dans les sous-parties suivantes, les anticorps du système AC I – Tb / AC II – colorant ne sont pas greffés sur des silanes, mais adsorbés à la surface d'un canal commercial.

Les sous-parties suivantes présentent les résultats des expériences préliminaires réalisées pour ce système de détection.

V.2.2 Tests d'écrantage par la protéine BSA

Le PDMS présente un taux très élevé d'adsorption non spécifique des protéines, ce qui peut considérablement diminuer l'efficacité d'un flux continu dans un canal, ou impliquer un niveau de bruit important dans le cadre d'un dosage hétérogène. Alors que de nombreux efforts sont fournis pour s'affranchir de cet effet par traitement des surfaces de PDMS [127], [128], [129], nous avons cherché dans un premier temps à utiliser une méthode simple pour réaliser cet écrantage. Le choix s'est donc porté sur l'utilisation de la protéine BSA (Bovine Serum Albumine), fréquemment utilisée à

cet effet. La BSA est une petite protéine (MM = 66,4 kDa), disponible facilement, en grandes quantités et à faible coût, et qui normalement n'interfère pas significativement avec les autres protéines en présence.

Des tests d'écrantage par la BSA ont donc été réalisés afin de s'affranchir de l'adsorption non spécifique des protéines à la surface des canaux de PDMS. Les protéines considérées sont des anticorps secondaires anti – souris marqués avec le colorant Alexa Fluor 488 (Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG (H+L) ; highly cross-adsorbed ; 2 mg/mL, A11029, Invitrogen). La BSA (Sigma) est préparée à 3% dans le PBS 1X.

Des canaux microfluidiques de PDMS non silanisés sont remplis avec une solution de BSA 3% pendant 30 minutes. Après rinçage des canaux au PBS 1X, les anticorps marqués sont injectés dans des canaux traités ou non avec la BSA. Une observation des canaux est effectuée toutes les cinq minutes pendant une heure de rinçage au PBS 1X. Les images sont réalisées sur un microscope de fluorescence inversé en champ large (IX71, Olympus) avec un objectif à air de grandissement 20x et d'ouverture numérique 0,75 (UplanSApo, Olympus). Une source de lumière excitatrice en champ large pour la fluorescence (X-Cite 120Q) produit un faisceau d'une puissance de 14,4W. Le signal de fluorescence est détecté par une caméra sCMOS (PCO edge). Le temps d'acquisition est établi à 300 ms. Pour la détection des anticorps marqués avec l'Alexa Fluor 488, les filtres suivants sont choisis : excitation 494/20 nm (FF01-494/20-25, Brightline, Semrock), miroir dichroïque 495 nm (FF495-Di03-25x36, Brightline, Semrock), émission 542/20 nm (FF01-542/20-25, Brightline, Semrock). La Figure V.7 montre les images optiques des canaux microfluidiques traités ou non avec la BSA, sur lesquelles on peut voir qu'un traitement à l'albumine permet de diminuer considérablement l'adsorption non spécifique des protéines à la surface des canaux de PDMS.

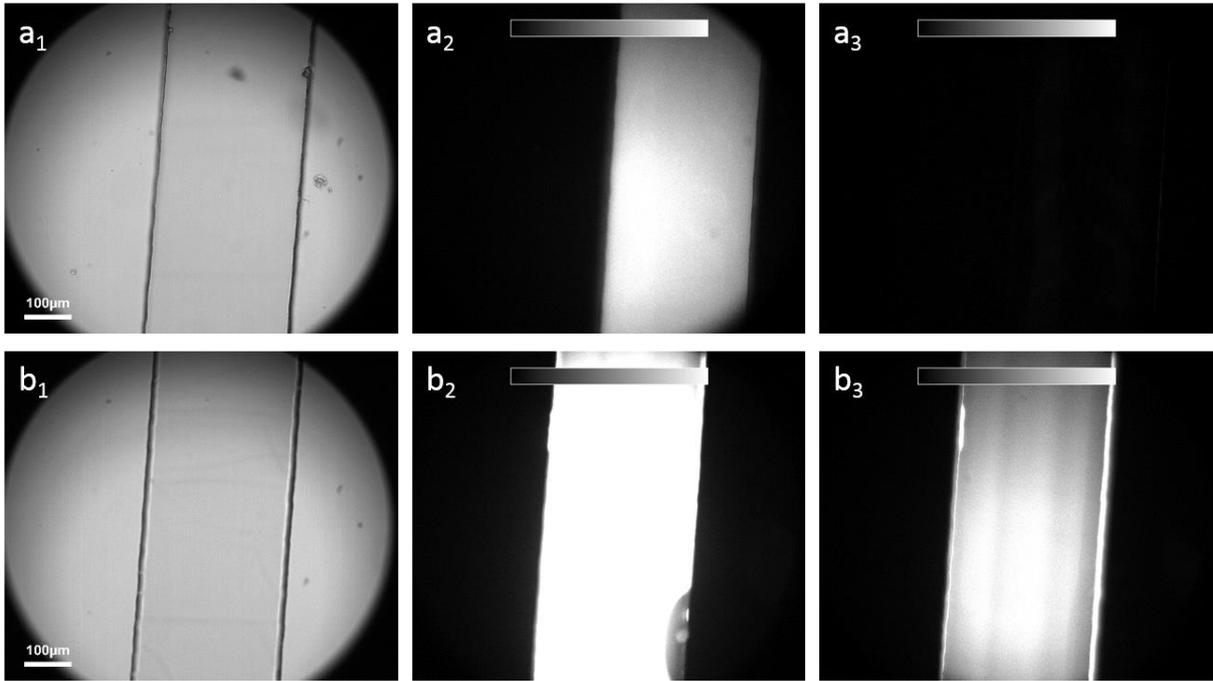


Figure V.7. Images optiques illustrant l'effet de la BSA pour s'affranchir de l'adsorption non spécifique dans les canaux microfluidiques de PDMS. En a, canal traité avec la BSA ; en b, canal contrôle non traité. En 1, images en champ clair ; en 2 et 3, images de fluorescence à t_0 (a₂ et b₂) et t_{1h} (a₃ et b₃). Echelle d'intensité de 0 à 1000 coups.

La Figure V.8 présente les courbes d'intensité de fluorescence en fonction du temps de rinçage. Ces courbes montrent bien la décroissance du signal d'intensité de fluorescence avec le rinçage des canaux au PBS 1X.

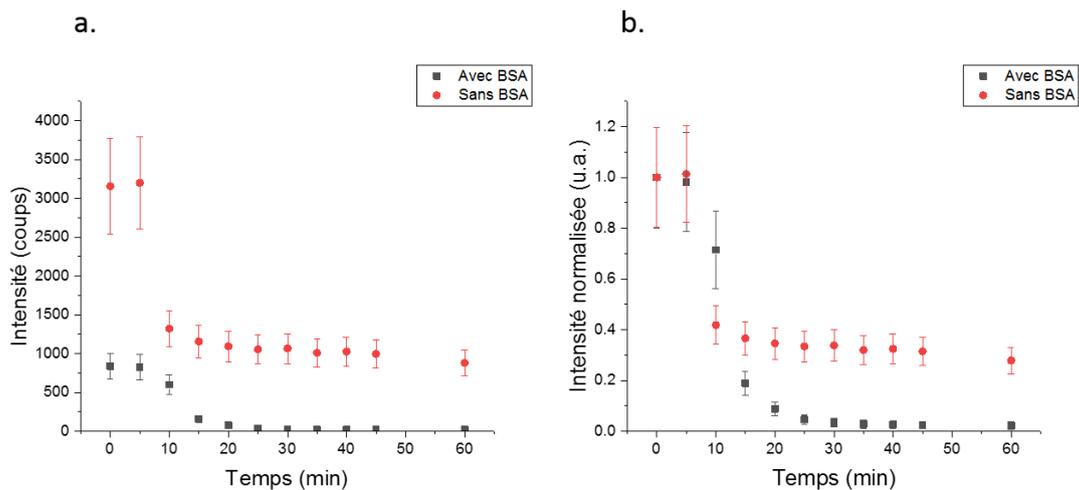


Figure V.8. Courbes d'intensité de fluorescence des anticorps marqués en fonction du temps de rinçage des canaux microfluidiques de PDMS avec le PBS 1X. En a, intensité absolue ; en b, intensité relative.

Cette expérience montre l'efficacité du traitement des canaux avec la protéine BSA pour s'affranchir de l'adsorption non spécifique des anticorps dans les canaux non fonctionnalisés. Ces résultats doivent servir de référence pour les immunodosages qui seront réalisés dans les dispositifs silanisés.

V.2.3 Bioconjugaison de l'anticorps primaire au complexe de terbium

Alors que les anticorps secondaires choisis pour la démonstration de la preuve de concept de notre immunodosage sont des anticorps marqués commerciaux, les anticorps primaires nécessitent le greffage des complexes de terbium. Les complexes de terbium Lumi4-Tb NHS (MM = 1483,7 g/mol) sont donc greffés à des anticorps primaires de souris (IgG from mouse serum, I5381, Sigma) par un procédé de bioconjugaison bien maîtrisé dans l'équipe NanoBioPhotonique [130], [131], [132].

Les anticorps primaires (AC I) sont préparés dans un tampon carbonate à pH 9,0 à la concentration finale de 1 mg/mL dans 200 μ L de volume total. Les complexes de terbium NHS sont ensuite ajoutés afin d'obtenir un rapport Tb/AC I de 10/1, de façon à laisser des groupements amines de lysines accessibles pour le greffage ultérieur, par EDC/Sulfo-NHS (N-(3-Diméthylaminopropyl)-N'-éthylcarbodiimide hydrochloride / N-Hydroxysulfosuccinimide sodium salt), des anticorps marqués sur les silanes (des expériences avec le rapport 30/1, c'est-à-dire en excès, ont également été réalisées à titre comparatif). Le mélange ainsi préparé est agité brièvement par vortex, puis incubé sur un agitateur rotatif (Intelli Mixer, Elmi) à 25 tours/min pendant deux heures. Après conjugaison, la solution est centrifugée à 5000 g, à 20°C pendant 3 minutes, puis elle est purifiée dans des colonnes de filtration (Amicon 4 30K) par centrifugation à 4000 g, à 4°C pendant 5 minutes. L'opération est répétée trois fois, permettant l'obtention d'un volume final d'environ 500 μ L de bioconjugué AC I – Tb, et de quatre filtrats de purification. Les détails expérimentaux de cette bioconjugaison sont donnés en Annexe C. Ce protocole de marquage des protéines peut être adapté pour d'autres anticorps et d'autres fluorophores.

La caractérisation de ce bioconjugué AC I – Tb est ensuite réalisée par spectroscopie d'absorption (spectrophotomètre Lambda 35 UV / Vis, Perkin Elmer).

Les spectres sont enregistrés de 800 à 200 nm, avec une résolution de 1,0 nm et une vitesse d'acquisition de 120 nm/min. La Figure V.9 présente le spectre d'absorption du bioconjugué AC I – Tb, sur lequel on peut voir le pic d'absorption caractéristique des protéines à 280 nm, ainsi que celui du terbium à 340 nm.

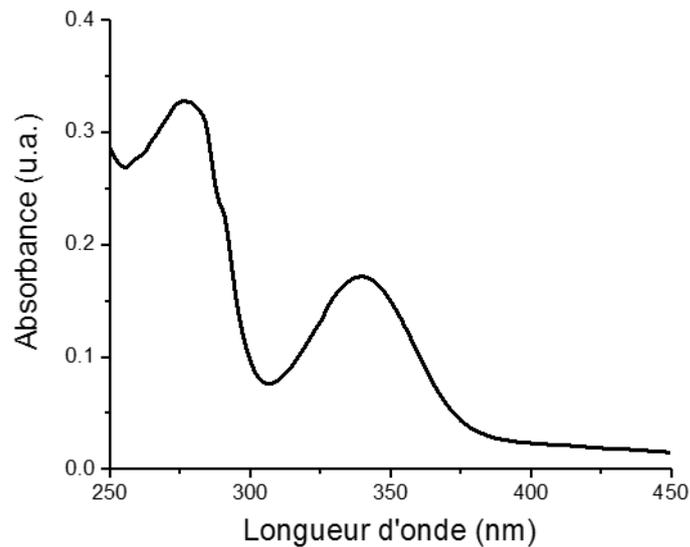


Figure V.9. Spectre d'absorption du bioconjugué AC I – Tb. Le spectre présente les pics d'absorption caractéristiques des protéines et du terbium, à 280 nm et 340 nm respectivement.

Le bioconjugué d'anticorps primaires marqués avec des complexes de terbium ainsi obtenu est ensuite observé en microscopie de fluorescence résolue en temps, dans le cadre d'une première expérience de FRET.

V.2.4 Observation du FRET entre l'anticorps primaire marqué au terbium et l'anticorps secondaire fluorescent en microscopie résolue en temps

Nous avons cherché à réaliser une première observation en microscopie de fluorescence du phénomène de FRET pour le système constitué du bioconjugué AC I – Tb comme donneur et de l'anticorps secondaire fluorescent AC II – AF488 comme accepteur dans des canaux microfluidiques. Pour ce faire, nous avons considéré les

dispositifs commerciaux de la marque Ibidi (μ -Slide VI 0.1 Uncoated, 80661, Clinisciences). En effet, du fait de l'impossibilité de fabriquer les dispositifs à ce stade de nos expériences, nous avons choisi de travailler avec des systèmes commerciaux, afin d'obtenir des premiers résultats concernant l'adsorption non spécifique des anticorps marqués dans les canaux. Il s'agit bien ici d'observer des anticorps adsorbés à la surface des canaux commerciaux, donc sans traitement avec la BSA. L'investigation de différents paramètres (concentration initiale, débit et temps de rinçage, conditions d'observation en microscopie) doit permettre d'adapter le protocole à l'étude du greffage des bioconjugués aux silanes dans les dispositifs fonctionnalisés.

Le montage de microscopie de fluorescence résolue en temps est constitué d'un microscope de fluorescence inversé en champ large (IX71, Olympus) et d'un laser UV à 349 nm (Nd:YLF (neodymium-doped yttrium lithium fluoride), Triton, Spectra-Physics) permettant une excitation pulsée à 200 Hz. Le faisceau laser est dirigé vers l'échantillon à l'aide d'un miroir dichroïque à 405 nm (Di02-R405, Semrock) et d'un objectif à immersion à eau de grandissement 40x et d'ouverture numérique 1,15 (UAPON340, Olympus). Le signal de fluorescence du bioconjugué AC I – Tb est collecté par le même objectif, et sélectionné spectralement grâce à un filtre d'émission passe-bande 494/20 nm (FF01-494/20-25, Brightline, Semrock) pour l'observation du terbium. Pour la détection du FRET du terbium vers l'Alexa Fluor 488, on considère le filtre d'émission passe-bande 522/12 (BP 522/12, LF101724, Delta). Une caméra CCD intensifiée (ICCD ; PI-MAX3, Princeton Instruments) permet l'acquisition des images de fluorescence résolue en temps dans les canaux du donneur (Canal – D) et du FRET (Canal – FRET).

Les conditions d'observation du bioconjugué AC I – Tb sont optimisées sur le logiciel Winview contrôlant la caméra ICCD pour les paramètres suivants : gain, largeur de la fenêtre temporelle (gate width), délai, et nombre d'accumulations (gates per exposure). Le gain est fixé à 100. La largeur de la fenêtre temporelle est établie à 2 ms, en rapport avec la durée de vie du terbium de l'ordre de 2,3 ms. Le délai de 10,88 μ s prend en compte le temps de déclenchement électronique (0,88 μ s) et permet de s'affranchir de l'autofluorescence des échantillons biologiques. En effet, la caméra asservie au laser se déclenche au bout de ce délai suite à l'impulsion laser. Ceci permet de s'affranchir de l'autofluorescence issue majoritairement des éléments tels

que les tryptophanes, les flavines et les cycles aromatiques, dont la durée de vie de fluorescence est courte (de l'ordre de la ns). 800 accumulations sont réalisées par exposition, ce qui permet d'amplifier le signal de fluorescence obtenu.

Le bioconjugué AC I – Tb en rapport 10/1 est préparé à la concentration de 0,1 µg/mL (67 nmol/L) dans du tampon Tris/Cl à pH 7,4 (pour un volume de 400 µL) puis injecté dans le canal microfluidique Ibidi grâce à un pousse-seringue (R99, Razel) et via des capillaires Ibidi (Silicone Tubing 0.8 mm, 10841, Clinisciences).

Un volume de 400 µL de la paire de FRET AC I – Tb / AC II – AF488 en mélange 1/25 (en concentration massique) est préparé. Ce mélange est incubé sur un agitateur rotatif (Intelli Mixer, Elmi) à 25 tours/min pendant une heure, puis injecté dans un deuxième canal microfluidique. Avec le choix d'un rapport donneur/accepteur de 1/25, on considère une paire de FRET dans laquelle les anticorps secondaires sont en excès, ce qui permet d'augmenter la probabilité de liaison des anticorps secondaires aux anticorps primaires. La détection résolue en temps permet de s'affranchir du signal venant de l'excès de fluorophores. Par la suite, l'étude de différents rapports donneur/accepteur devra être réalisée pour l'optimisation du protocole.

Le canal est ensuite rincé au PBS 1X à un débit d'environ 2,5 mL/heure. Une image est d'abord acquise toutes les cinq minutes pendant une heure de rinçage pour le bioconjugué AC I – Tb afin de s'assurer qu'il reste bien un signal de fluorescence après rinçage. Dans l'expérience de FRET, une image est acquise toutes les quinze minutes pendant une heure de rinçage. La Figure V.10 présente les images de fluorescence au bout d'une heure de rinçage pour le donneur seul AC I – Tb et pour la paire de FRET AC I – Tb / AC II – AF488 dans le canal du donneur (Canal – D) et dans le canal de la paire de FRET (Canal – FRET).

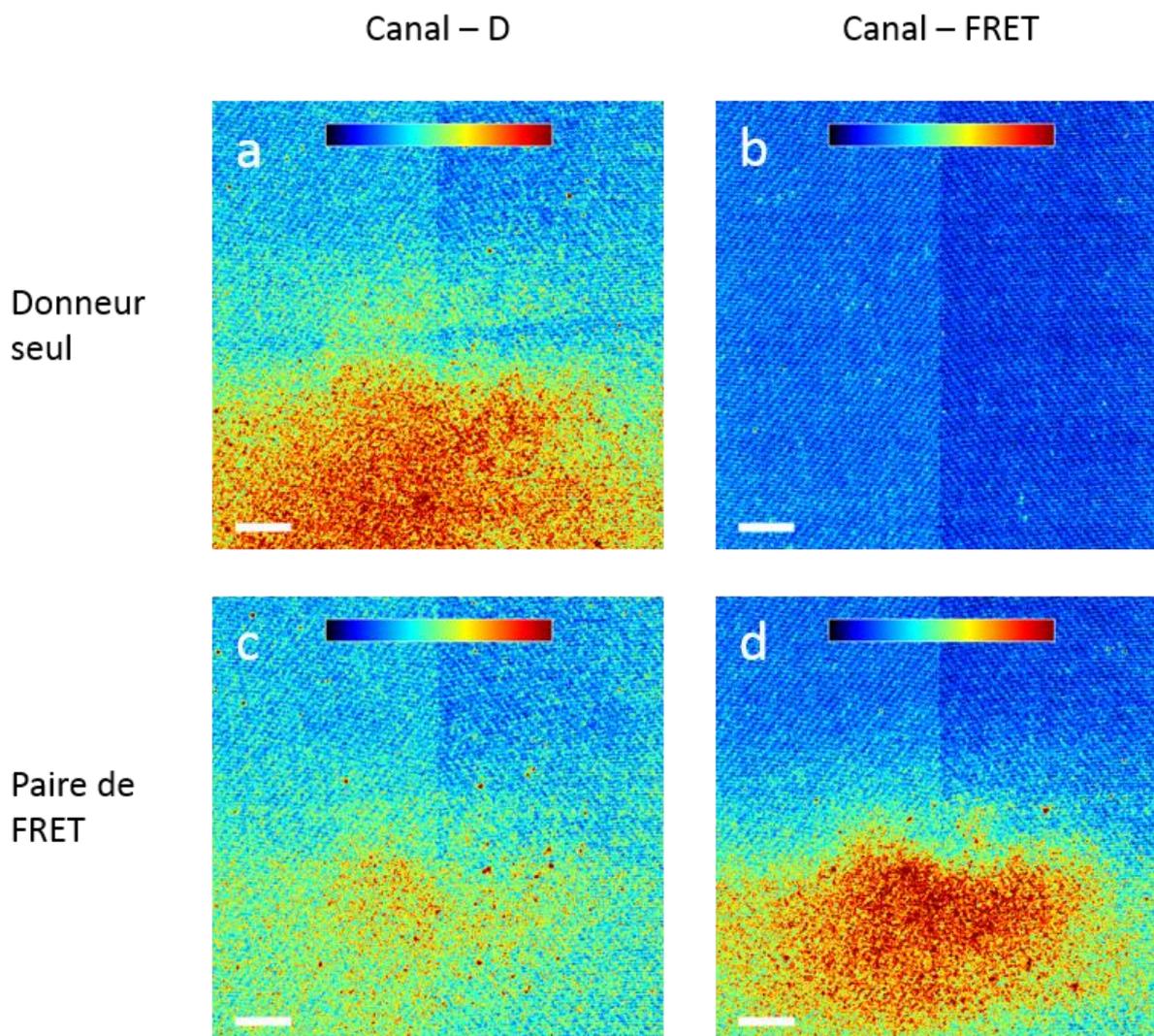


Figure V.10. Images de fluorescence résolue en temps des anticorps marqués adsorbés dans les canaux commerciaux Ibidi. Chaque image présente l'intérieur (moitié basse de l'image) et l'extérieur (moitié haute de l'image) du canal. Donneur seul = AC I – Tb, Paire de FRET = AC I – Tb et AC II – AF488 en mélange 1/25. Les intensités sur les images sont représentées en fausses couleurs de 500 à 1500 coups du bleu vers le rouge (échelle de couleur JET sur Icy). L'échelle représente 20 μm . La colonne de gauche présente le canal d'observation du donneur (Canal – D), et celle de droite celui de la paire de FRET (Canal – FRET).

Le Tableau V.1 donne les valeurs moyennes de l'intensité de fluorescence associées à chaque image de la Figure V.10 après soustraction du bruit. Ces valeurs sont utilisées afin de déterminer les différents paramètres de FRET.

Tableau V.1. Intensité moyenne de fluorescence pour le donneur seul (AC I – Tb) et la paire FRET (AC I – Tb / AC II – AF488 en mélange 1/25) dans chaque canal de détection

Echantillon	Canal – D	Canal – FRET
Donneur seul	402 ± 62	0 ± 0
Paire FRET	143 ± 20	264 ± 79

Cette expérience préliminaire visant à démontrer le FRET pour le système AC I – Tb / AC II – AF488 n'ayant été réalisée que pour un seul échantillon, les valeurs d'erreur sont celles des pixels d'une image (reflétant l'homogénéité de l'intensité dans un canal donné) et non celles d'une moyenne sur plusieurs échantillons (ce qui doit refléter la reproductibilité de l'expérience).

Les paramètres de FRET E_{FRET} et $\text{Rapport}_{\text{FRET}}$, présentés dans le chapitre I (I.1.3.) et calculés pour la paire ATTO 550 – ATTO647N sur les surfaces d'aluminium recouvertes de silice (III.2.4.) sont également déterminés pour la paire AC I – Tb / AC II – AF488 adsorbés dans les canaux commerciaux Ibidi, en utilisant les valeurs moyennes d'intensité de fluorescence présentées dans le Tableau V.1. On rappelle que l'efficacité de FRET permet de quantifier le FRET par la détermination de l'efficacité du transfert non radiatif entre le donneur et l'accepteur ($E_{\text{FRET}} = 1 - \frac{I_{\text{DA}}}{I_{\text{D}}}$), et que le rapport de FRET permet l'évaluation de la population des biomolécules interagissant les unes avec les autres au travers de la détection de la sensibilisation de l'accepteur I_{AD} en fonction de l'extinction du donneur I_{DA} ($\text{Rapport}_{\text{FRET}} = \frac{I_{\text{AD}}}{I_{\text{DA}}}$).

Ainsi, on détermine l'efficacité de FRET $E_{\text{FRET}} = 0,63 \pm 0,11$. Cette valeur d'efficacité de FRET obtenue pour le système AC I – Tb / AC II – AF488 adsorbés dans les canaux commerciaux Ibidi appartient à la gamme dynamique de la courbe $E_{\text{FRET}} = f(r)$ (Chapitre III, Figure III.8), validant l'existence d'un transfert d'énergie non radiatif efficace entre le donneur AC I – Tb et l'accepteur AC II – AF488. Le rapport de FRET $\text{Rapport}_{\text{FRET}} = 1,96 \pm 0,83$ est à comparer avec la valeur nulle du rapport des intensités du donneur seul dans le canal de FRET (Donneur seul ; Canal – FRET) sur le canal du donneur (Donneur seul ; Canal – D). Cette augmentation du rapport de FRET normalisé pour la paire de FRET par rapport au donneur seul permet une

deuxième démonstration du phénomène de FRET pour le système AC I – Tb / AC II – AF488 adsorbés dans les canaux commerciaux Ibidi.

Finalement, cette première observation en microscopie de fluorescence du système constitué du bioconjugué AC I – Tb comme donneur et de l'anticorps secondaire fluorescent AC II – AF488 comme accepteur permet de valider le phénomène de FRET dans des canaux microfluidiques commerciaux. Ce système pourra donc être adapté et optimisé dans les dispositifs de PDMS silanisés, pour la réalisation de la preuve de principe d'un immunodosage en phase solide.

V.3 Conclusion

L'étude réalisée lors de la première partie de ma thèse, développée dans les chapitres II et III, m'a permis d'acquérir des connaissances et compétences sur des techniques de fonctionnalisation de surfaces, des méthodes de caractérisation, ainsi que d'observation du phénomène de FRET par imagerie de fluorescence. J'ai ainsi pu développer un nouveau projet reposant sur la combinaison de ces savoir-faire issus des équipes NanoBioPhotonique de l'I2BC et Microsystèmes et NanoBioFluidique du C2N.

Après avoir appris les techniques de base de la microfabrication, j'ai pu mettre en œuvre un dispositif microfluidique simple dédié à la réalisation d'un immunodosage multiplexé par détection de FRET. Une fois cette première étape effectuée, j'ai cherché à valider le système proposé par des expériences préliminaires. J'ai donc réalisé la bioconjugaison d'anticorps primaires à des complexes de terbium afin de les utiliser comme donneur dans un système de FRET, et j'ai montré la possibilité de combiner ce donneur à un anticorps secondaire fluorescent pour la réalisation de la preuve de principe de la détection résolue en temps du FRET dans des canaux microfluidiques.

Ces premières expériences ne constituent pas encore la preuve de principe du dispositif microfluidique fonctionnalisé permettant la réalisation d'un immunodosage multiplexé par FRET. Cependant, plusieurs étapes clés du procédé ont été réalisées, notamment la fabrication du dispositif, sa fonctionnalisation, sa passivation par la

protéine BSA, ainsi qu'une première optimisation des conditions d'observation du phénomène de FRET pour le système des anticorps primaires conjugués au complexe de terbium comme donneurs et des anticorps secondaires fluorescents comme accepteurs. Nous pensons donc qu'à la réouverture du laboratoire C2N, lorsque nous pourrons recommencer la fabrication des dispositifs microfluidiques silanisés, nous serons à même de faire avancer le projet rapidement, avec dans un premier temps le greffage des bioconjugués AC I – Tb à la surface des canaux silanisés et l'observation du phénomène de FRET dans les dispositifs microfluidiques.

Conclusion

La qualité de la prise en charge d'un patient et le développement de la médecine personnalisée sont conditionnés par les progrès réalisés en termes d'élaboration de nouveaux outils diagnostiques toujours plus performants. Dans ce cadre, l'objectif de mon travail de thèse était de mettre en œuvre des procédés de fabrication et de fonctionnalisation pour la détection optique de molécules d'intérêt biologique par transfert d'énergie par résonance de type Förster.

La première partie de mon travail a consisté à fonctionnaliser des surfaces d'aluminium pour des applications de biodétection par effet plasmonique. Il a d'abord fallu développer un procédé de fonctionnalisation pouvant être adapté à différents métaux choisis pour leurs propriétés plasmoniques. Dans cette optique, j'ai choisi de mettre en œuvre un protocole de silanisation sur des surfaces d'aluminium recouvertes de silice. La liaison des silanes APTES sur les substrats a été rigoureusement validée par des étapes de caractérisation par mesures d'angle de contact et de spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR). J'ai ensuite réalisé le greffage de colorants ATTO 647N dotés d'un groupement chimique NHS sur les aminosilanes. Le développement d'un programme de traitement des images optiques acquises m'a permis de quantifier l'intensité de fluorescence issue des surfaces ainsi fonctionnalisées pour différentes concentrations en fluorophores. J'ai pu distinguer trois régimes de concentration : un premier présentant une augmentation quasiment linéaire de l'intensité de fluorescence en fonction de la concentration, un deuxième correspondant à un plateau, et un troisième caractérisé par une légère décroissance de l'intensité de fluorescence. Dans l'optique de réaliser un biocapteur pleine plaque reposant sur la détection du FRET, j'ai ensuite considéré un deuxième colorant, l'ATTO 550, afin d'obtenir une paire de FRET constituée de l'ATTO 550 comme donneur et de l'ATTO 647N comme accepteur. Après avoir effectué la caractérisation photophysique de cette paire de FRET, j'ai pu observer et quantifier le phénomène de FRET par imagerie de fluorescence, et déterminer les paramètres de FRET (efficacité de FRET, rapport de FRET et distance donneur – accepteur) pour différentes

concentrations en fluorophores. Finalement, le système proposé présente des valeurs d'efficacité de FRET de l'ordre de 0,6 à 0,8 selon la concentration considérée, ainsi que des distances de FRET d'environ 5 nm, ce qui est cohérent avec le greffage homogène des aminosilanes à la surface des substrats.

Cette première étude s'inscrit dans le cadre du projet européen PROSEQO, qui visait à réaliser le séquençage de protéines par détection optique de molécules uniques au travers de nanostructures plasmoniques. Le consortium n'a pas été en mesure d'atteindre cet objectif ambitieux sur une durée de trois ans. Cependant, les progrès récemment réalisés dans l'équipe Plasmon Technology de l'IIT de Gênes en termes de fabrication de nanoantennes d'or recouvertes de silice laissent entrevoir la possibilité d'adapter, à moyen terme, l'étude présentée dans cette thèse. Ainsi, le procédé établi dans ce travail pourra être transposé à des nanostructures présentant un effet d'exaltation plasmonique de la fluorescence, permettant ainsi la démonstration de la preuve de concept de la détection de protéines par le système. Combinée aux travaux du Small Biosystems Lab de l'Université de Barcelone sur l'utilisation de pinces optiques pour le dépliage des protéines, et à l'expertise de l'entreprise Alacris pour le traitement et l'exploitation de données complexes en biologie, la preuve de principe de la détection de biomolécules pourra donner lieu à la réalisation du séquençage de protéines.

La deuxième partie de mon travail a porté sur la réalisation d'un dispositif intégré pour la détection de biomolécules par FRET en conditions microfluidiques. J'ai d'abord mis en œuvre un procédé de fabrication simple pour la réalisation de canaux microfluidiques à base de PDMS et fonctionnalisés par l'APTES. Les dimensions du dispositif ont été caractérisées par profilométrie mécanique et la silanisation par mesures d'angle de contact et microanalyse X (EDX). J'ai pu établir une validation de la présence d'aminosilanes sur le substrat après collage du capot de PDMS par détection optique de la fluorescamine liée spécifiquement aux groupements amines des silanes. J'ai ensuite montré l'écrantage des anticorps fluorescents par passivation du canal non silanisé avec la protéine BSA. Afin de considérer un système de FRET simple, j'ai réalisé la bioconjugaison d'anticorps primaires à des complexes de terbium pour l'obtention d'un donneur de FRET. J'ai ensuite pu observer le phénomène de

FRET entre ces anticorps primaires marqués au terbium et des anticorps secondaires fluorescents en microscopie de fluorescence résolue en temps.

Cette seconde étude constitue la première étape du projet μ FRET, qui vise à développer un immunodosage multiplexé par FRET dans un canal microfluidique. La fabrication de nouveaux dispositifs doit permettre la démonstration à court terme d'un immunodosage par FRET dans des canaux silanisés avec comme donneurs les anticorps primaires conjugués au terbium et greffés aux aminosilanes et comme accepteurs des anticorps secondaires fluorescents. Cette preuve de concept de laboratoire sur puce pourra être adaptée à la détection de la protéine TPSA, biomarqueur spécifique du cancer de la prostate, puis à la détection duplexée des récepteurs EGFR et HER2 dans le cadre du diagnostic de nombreux types de cancers, notamment du sein ou du poumon. Ces expériences ouvriront la voie vers le développement d'un nouvel outil diagnostique miniaturisé pour son utilisation dans les centres de prise en charge.

Références bibliographiques

- [1] K. Strimbu and J. A. Tavel, "What are Biomarkers?," *Curr Opin HIV AIDS*, vol. 5, no. 6, pp. 463–466, 2011.
- [2] Biomarkers Definitions Working Group, "Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework," *Clin Pharmacol Ther*, vol. 69, no. 3, pp. 89–95, 2001.
- [3] M. Ammar *et al.*, "Chemical Engineering of Self-Assembled Alzheimer ' s Peptide on a Silanized Silicon Surface," *Langmuir*, vol. 30, no. 20, pp. 5863–5872, 2014.
- [4] M. K. Pal, S. P. Jaiswar, V. N. Dwivedi, A. K. Tripathi, A. Dwivedi, and P. Sankhwar, "MicroRNA : a new and promising potential biomarker for diagnosis and prognosis of ovarian cancer," *Cancer Biol Med*, vol. 12, no. 4, pp. 328–341, 2015.
- [5] P. Kuppusamy, N. Govindan, M. M. Yusoff, and S. J. A. Ichwan, "Proteins are potent biomarkers to detect colon cancer progression," *Saudi J. Biol. Sci.*, vol. 24, no. 6, pp. 1212–1221, 2017.
- [6] M. J. Duffy, N. Harbeck, M. Nap, R. Molina, and A. Nicolini, "Clinical use of biomarkers in breast cancer : Updated guidelines from the European Group on Tumor Markers," *Eur. J. Cancer*, vol. 75, pp. 284–298, 2017.
- [7] M. Adhyam and A. K. Gupta, "A Review on the Clinical Utility of PSA in Cancer Prostate," *Indian J Surg Oncol*, vol. 3, no. June, pp. 120–129, 2012.
- [8] V. Kulasingam and E. P. Diamandis, "Strategies for discovering novel cancer biomarkers through utilization of emerging technologies," *Nat Clin Pr. Oncol*, vol. 5, no. 10, pp. 588–599, 2008.
- [9] J. W. Davis, "Biomarker classification, validation, and what to look for in 2017 and beyond," *BJU Int*, vol. 119, no. 5, pp. 812–814, 2017.
- [10] A. N. Bhatt, R. Mathur, A. Farooque, A. Verma, and B. S. Dwarakanath, "Cancer biomarkers - Current perspectives," *Rev. Artic. Indian J Med Res*, vol. 132, no. August, pp. 129–149, 2010.
- [11] S. B. Nimse, M. D. Sonawane, K.-S. Song, and K. Taisun, "Biomarker detection technologies and future directions," *Analyst*, vol. 141, no. 3, pp. 740–755, 2016.
- [12] A. Jablonski, "Efficiency of Anti-Stokes Fluorescence in Dyes," *Nature*, vol. 131, pp. 839–840, 1933.
- [13] D. E. Wolf, "Fundamentals of Fluorescence and Fluorescence Microscopy," in *Methods in Cell Biology*, 4th ed., vol. 114, Elsevier Inc., 2007, pp. 69–97.

- [14] M. J. Sanderson, I. Smith, I. Parker, and M. D. Bootman, "Fluorescence Microscopy," *Cold Spring Harb Protoc.*, vol. 2014, no. 10, pp. 1042–1065, 2016.
- [15] B. W. Van Der Meer, "Förster Theory," in *FRET - Förster Resonance Energy Transfer From Theory to Applications*, I. L. Medintz and N. Hildebrandt, Eds. Wiley-VCH, 2014, pp. 23–62.
- [16] U. Kallmann and F. London, "Über quantenmechanische Energieübertragung zwischen atomaren Systemen.," *Zeitschrift für Phys. Chemie*, pp. 207–243, 1928.
- [17] T. Förster, "Transfer Mechanisms of Electronic Excitation," in *Discussions of the Faraday Society*, 1959, no. 10, pp. 7–17.
- [18] T. Förster, "Energy migration and fluorescence," *Naturwissenschaften*, vol. 33(6), pp. 166–175, 1946.
- [19] N. Hildebrandt, "How to Apply FRET : From Experimental Design to Data Analysis," in *FRET - Förster Resonance Energy Transfer From Theory to Applications*, I. L. Medintz and N. Hildebrandt, Eds. Wiley-VCH, 2014, pp. 105–163.
- [20] P. R. Selvin, "The renaissance of fluorescence resonance energy transfer," *Nat Struct Biol.*, vol. 7, no. 9, pp. 730–734, 2000.
- [21] S. Spindel, J. Granek, and K. E. Sapsford, "In Vitro FRET Sensing, Diagnostics, and Personalized Medicine," in *FRET - Förster Resonance Energy Transfer From Theory to Applications*, I. L. Medintz and N. Hildebrandt, Eds. Wiley-VCH, 2014, pp. 271–322.
- [22] P. J. Robinson and C. A. Woolhead, "Implementation of FRET Technologies for Studying the Folding and Conformational Changes in Biological Structures," in *FRET - Förster Resonance Energy Transfer From Theory to Applications*, I. L. Medintz and N. Hildebrandt, Eds. Wiley-VCH, 2014, pp. 357–396.
- [23] J. C. Claussen, N. Hildebrandt, and I. Medintz, "FRET-Based Cellular Sensing with Genetically Encoded Fluorescent Indicators," in *FRET - Förster Resonance Energy Transfer From Theory to Applications*, I. L. Medintz and N. Hildebrandt, Eds. Wiley-VCH, 2014, pp. 397–429.
- [24] L. Mattera *et al.*, "Compact quantum dot-antibody conjugates for FRET immunoassays with subnanomolar detection limits," *Nanoscale*, vol. 8, no. 21, pp. 11275–11283, 2016.
- [25] B. Schuler and W. A. Eaton, "Protein folding studied by single-molecule FRET," *Curr Opin Struct Biol.*, vol. 18, no. 1, pp. 16–26, 2008.
- [26] K. Boeneman, J. B. Delehanty, K. Susumu, M. H. Stewart, and I. L. Medintz, "Intracellular bioconjugation of targeted proteins with semiconductor quantum dots," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 132, no. 17, pp. 5975–5977, 2010.
- [27] H. Miller, Z. Zhou, J. Shepherd, and A. J. M. Wollman, "Single-molecule techniques in biophysics : a review of the progress in methods and applications," *Rep. Prog. Phys.*, vol. 81, no. 2, 2018.

- [28] E. Margeat, “A Dance with Two Dragons : fluorophores photophysics in the context of FRET,” 2017. .
- [29] T. Pons, “Single-Molecule Applications,” in *FRET - Förster Resonance Energy Transfer From Theory to Applications*, I. L. Medintz and N. Hildebrandt, Eds. Wiley-VCH, 2014, pp. 323–356.
- [30] R. Roy, S. Hohng, and T. Ha, “A Practical Guide to Single Molecule FRET,” *Nat. Methods*, vol. 5, no. 6, pp. 507–516, 2008.
- [31] E. Ullman, “Chapter 2.3 - Homogeneous Immunoassays,” in *The Immunoassay Handbook*, Elsevier, 2013, pp. 67–87.
- [32] K. D. Wegner, Z. Jin, S. Linden, T. L. Jennings, and N. Hildebrandt, “Quantum-dot-based Förster resonance energy transfer immunoassay for sensitive clinical diagnostics of low-volume serum samples,” *ACS Nano*, vol. 7, no. 8, pp. 7411–7419, 2013.
- [33] Y. Wu *et al.*, “Quantum Dot – Based FRET Immunoassay for HER2 Using Ultrasmall Affinity Proteins,” *Small*, vol. 14, no. 35, pp. 1–5, 2018.
- [34] N. Hildebrandt *et al.*, “Energy Transfer with Semiconductor Quantum Dot Bioconjugates : A Versatile Platform for Biosensing , Energy Harvesting , and Other Developing Applications,” *Chem. Rev.*, vol. 117, no. 2, pp. 536–711, 2017.
- [35] Y. Kim, S. Park, E. Oh, Y. Oh, and H. Kim, “On-chip detection of protein glycosylation based on energy transfer between nanoparticles,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 24, no. 5, pp. 1189–1194, 2009.
- [36] S. Saraheimo, J. Hepojoki, A. Lahtinen, I. Hemmilä, A. Vaheri, and K. Hedman, “Time-Resolved FRET -Based Approach for Antibody Detection – A New Serodiagnostic Concept,” *PLoS One*, vol. 8, no. 5, 2013.
- [37] S. Rattle, O. Hofmann, C. P. Price, L. J. Kricka, and D. Wild, “Chapter 2.10 - Lab-on-a-Chip, Micro- and Nanoscale Immunoassay Systems, and Microarrays,” in *The Immunoassay Handbook*, 2013, pp. 175–202.
- [38] S. C. Terry, J. H. Jerman, and J. B. Angell, “A Gas Chromatographic Air Analyzer Fabricated,” *IEEE*, vol. 26, no. 12, pp. 1880–1886, 1979.
- [39] G. M. Whitesides, “The origins and the future of microfluidics,” *Nature*, vol. 442, no. July, pp. 368–373, 2006.
- [40] G. Crivat, S. Maria, D. Silva, D. R. Reyes, and L. E. Locascio, “Quantum Dot FRET-Based Probes in Thin Films Grown in Microfluidic Channels,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 132, no. 5, pp. 1460–1461, 2010.
- [41] C. Benz, H. Retzbach, S. Nagl, and D. Belder, “Protein – protein interaction analysis in single microfluidic droplets using FRET and fluorescence,” *Lab Chip*, vol. 13, no. 14, pp. 2808–14, 2013.
- [42] C. Chen *et al.*, “Multiplexed Protease Activity Assay for Low-Volume Clinical Samples Using Droplet-Based Microfluidics and Its Application to Endometriosis,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 135, no. 5, pp. 1645–1648, 2013.

- [43] L. Chen, W. R. Algar, A. J. Tavares, and U. J. Krull, "Toward a solid-phase nucleic acid hybridization assay within microfluidic channels using immobilized quantum dots as donors in fluorescence resonance energy transfer," *Anal Bioanal Chem.*, vol. 399, no. 1, pp. 133–141, 2011.
- [44] A. J. Tavares, M. O. Noor, C. H. Vannoy, W. R. Algar, and U. J. Krull, "On-Chip Transduction of Nucleic Acid Hybridization Using Spatial Profiles of Immobilized Quantum Dots and Fluorescence Resonance Energy Transfer," *Anal Chem.*, vol. 84, no. 1, pp. 312–9, 2012.
- [45] M. O. Noor, A. J. Tavares, and U. J. Krull, "On-Chip Multiplexed Solid-Phase Nucleic Acid Hybridization Assay Using Spatial Profiles of Immobilized Quantum Dots and Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)," *Anal. Chim. Acta*, vol. 788, pp. 148–57, 2013.
- [46] B. Spackova, P. Wrobel, M. Bockova, and J. Homola, "Optical Biosensors Based on Plasmonic Nanostructures : A Review," *Proc. IEEE*, vol. 104, no. 12, pp. 2380–2408, 2016.
- [47] M. Oliverio, S. Perotto, G. C. Messina, L. Lovato, and F. De Angelis, "Chemical Functionalization of Plasmonic Surface Biosensors: A Tutorial Review on Issues, Strategies, and Costs," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 9, no. 35, pp. 29394–29411, 2017.
- [48] J. C. Love, L. A. Estroff, J. K. Kriebel, R. G. Nuzzo, and G. M. Whitesides, "Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology," *Chem. Rev.*, vol. 105, no. 4, pp. 1103–1169, 2005.
- [49] S. Casalini, C. A. Bortolotti, F. Leonardi, and F. Biscarini, "Self-assembled monolayers in organic electronics," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 46, no. 1, pp. 40–71, 2017.
- [50] A. Ulman, "Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers," *Chem. Rev.*, vol. 96, no. 4, pp. 1533–1554, 1996.
- [51] S. a. Skoog, J. W. Elam, and R. J. Narayan, "Atomic layer deposition: medical and biological applications," *Int. Mater. Rev.*, vol. 58, no. 2, pp. 113–129, 2013.
- [52] E. Reimhult and F. Höök, "Design of Surface Modifications for Nanoscale Sensor Applications," *Sensors*, vol. 15, no. 1, pp. 1635–1675, 2015.
- [53] M. Eichler, C. Klages, and K. Lachmann, "Surface Functionalization of Microfluidic Devices," in *Microsystems for Pharmatechnology Manipulation of Fluids, Particles, Droplets, and Cells*, A. Dietzel, Ed. Springer, 2016, pp. 59–97.
- [54] G. Dingemans and W. M. M. Kessels, "Status and prospects of Al₂O₃-based surface passivation schemes for silicon solar cells," *J. Vac. Sci. Technol. A Vacuum, Surfaces, Film.*, vol. 30, no. 4, p. 040802–1/27, 2012.
- [55] C. Chan and T. Ko, "Polymer surface modification by plasmas and photons," *Surf. Sci. Rep.*, vol. 24, no. 1–2, pp. 1–54, 1996.
- [56] J. Zhou, D. V. Khodakov, A. V Ellis, and N. H. Voelcker, "Surface modification for PDMS-based microfluidic devices," *Electrophoresis*, vol. 33, no. 1, pp. 89–104, 2012.

- [57] N. R. Glass, R. Tjeung, P. Chan, L. Y. Yeo, and J. R. Friend, "Organosilane deposition for microfluidic applications," *Biomicrofluidics*, vol. 5, no. 3, pp. 36501–7, 2011.
- [58] C. Séguin, J. M. McLachlan, P. R. Norton, and F. Lagugné-Labarthe, "Surface modification of poly (dimethylsiloxane) for microfluidic assay applications," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 256, no. 8, pp. 2524–2531, 2010.
- [59] G. Sui *et al.*, "Solution-Phase Surface Modification in Intact Poly (dimethylsiloxane) Microfluidic Channels," *Anal. Chem.*, vol. 78, no. 15, pp. 5543–5551, 2006.
- [60] S. Goodwin, J. D. McPherson, and W. R. McCombie, "Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies," *Nat Rev Genet*, vol. 17, no. 6, pp. 333–351, 2016.
- [61] M. Belkin, S. H. Chao, M. P. Jonsson, C. Dekker, and A. Aksimentiev, "Plasmonic Nanopores for Trapping, Controlling Displacement, and Sequencing of DNA," *ACS Nano*, vol. 9, no. 11, pp. 10598–10611, 2015.
- [62] D. Branton *et al.*, "The potential and challenges of nanopore sequencing," *Nat. Biotechnol.*, vol. 26, no. 10, pp. 1146–1153, 2008.
- [63] L. Song, M. R. Hobaugh, C. Shustak, S. Cheley, H. Bayley, and J. E. Gouaux, "Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore," *Science*, vol. 274, no. 5294, pp. 1859–66, 1996.
- [64] J. Nivala, D. B. Marks, and M. Akeson, "Unfoldase-mediated protein translocation through an α -hemolysin nanopore.," *Nat. Biotechnol.*, vol. 31, no. 3, pp. 247–50, 2013.
- [65] F. Haque, J. Li, H. C. Wu, X. J. Liang, and P. Guo, "Solid-state and biological nanopore for real-time sensing of single chemical and sequencing of DNA," *Nano Today*, vol. 8, no. 1, pp. 56–74, 2013.
- [66] I. M. Derrington *et al.*, "Nanopore DNA sequencing with MspA.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 107, no. 37, pp. 16060–5, 2010.
- [67] J. Clarke, H. Wu, L. Jayasinghe, A. Patel, S. Reid, and H. Bayley, "Continuous base identification for single-molecule nanopore DNA sequencing.," *Nat. Nanotechnol.*, vol. 4, no. 4, pp. 265–270, 2009.
- [68] Y. Feng, Y. Zhang, C. Ying, D. Wang, and C. Du, "Nanopore-based fourth-generation DNA sequencing technology," *Genomics, Proteomics Bioinforma.*, vol. 13, no. 1, pp. 4–16, 2015.
- [69] F. Nicoli, D. Verschueren, M. Klein, C. Dekker, and M. P. Jonsson, "DNA Translocations through Solid-State Plasmonic Nanopores," *Nano Lett.*, vol. 14, no. 12, pp. 6917–6925, 2014.
- [70] M. Kim *et al.*, "A draft map of the human proteome," *Nature*, vol. 509, no. 7502, pp. 575–581, 2014.
- [71] M. Wilhelm *et al.*, "Mass-spectrometry-based draft of the human proteome," *Nature*, vol. 509, no. 7502, pp. 582–587, 2014.

- [72] Y. Yao, M. Docter, J. Van Ginkel, D. De Ridder, and C. Joo, "Single-molecule protein sequencing through fingerprinting: computational assessment," *Phys. Biol.*, vol. 12, no. 5, p. 55003, 2015.
- [73] J. Van Ginkel, M. Filius, M. Szczepaniak, P. Tulinski, A. S. Meyer, and C. Joo, "Single-molecule peptide fingerprinting," *PNAS*, vol. 115, no. 13, pp. 3338–3343, 2018.
- [74] R. S. Yalow and S. A. Berson, "Assay of Plasma Insulin in Human Subjects by Immunological Methods," *Nature*, vol. 184, no. 4699, pp. 1648–1649, 1959.
- [75] D. Wild, Ed., *The Immunoassay Handbook*. Elsevier, 2013.
- [76] D. Geißler, S. Stufler, H. Löhmannsröben, and N. Hildebrandt, "Six-Color Time-Resolved Förster Resonance Energy Transfer for Ultrasensitive Multiplexed Biosensing," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 135, no. 3, pp. 1102–1109, 2013.
- [77] X. Qiu, K. D. Wegner, Y. T. Wu, P. M. P. Van Bergen En Henegouwen, T. L. Jennings, and N. Hildebrandt, "Nanobodies and antibodies for duplexed EGFR/HER2 immunoassays using terbium-to-quantum dot FRET," *Chem. Mater.*, vol. 28, no. 22, pp. 8256–8267, 2016.
- [78] Y. Kim, Y. Oh, E. Oh, S. Ko, M. Han, and H. Kim, "Energy Transfer-Based Multiplexed Assay of Proteases by Using Gold Nanoparticle and Quantum Dot Conjugates on a Surface," *Anal. Chem.*, vol. 80, no. 12, pp. 4634–4641, 2008.
- [79] W. R. Algar and U. J. Krull, "Toward A Multiplexed Solid-Phase Nucleic Acid Hybridization Assay Using Quantum Dots as Donors in Fluorescence Resonance Energy Transfer," *Anal. Chem.*, vol. 81, no. 15, pp. 4113–4120, 2009.
- [80] K. Lee, H. Hsu, M. You, C. Chang, and M. Pan, "Highly Sensitive Aluminum-Based Biosensors using Tailorable Fano Resonances in Capped Nanostructures," *Nat. Sci. reports*, vol. 7, no. 44104, pp. 1–14, 2017.
- [81] W. Li, K. Ren, and J. Zhou, "Trends in Analytical Chemistry Aluminum-based localized surface plasmon resonance for biosensing," *Trends Anal. Chem.*, vol. 80, no. June, pp. 486–494, 2016.
- [82] D. Gérard and S. K. Gray, "Aluminium plasmonics," *J. Phys. D. Appl. Phys.*, vol. 48, no. 18, p. 184001, 2015.
- [83] C. A. Barrios *et al.*, "Aluminum Nanoholes for Optical Biosensing," *Biosensors*, vol. 5, no. 3, pp. 417–431, 2015.
- [84] P. Ghenuche *et al.*, "Matching Nanoantenna Field Confinement to FRET Distances Enhances Förster Energy Transfer Rates," *Nano Lett.*, vol. 15, no. 9, pp. 6193–6201, 2015.
- [85] J. Martin and J. Plain, "Fabrication of aluminium nanostructures for plasmonics," *J. Phys. D. Appl. Phys.*, vol. 48, no. 18, p. 184002, 2015.
- [86] M. W. Knight, N. S. King, L. Liu, H. O. Everitt, P. Nordlander, and N. J. Halas, "Aluminum for Plasmonics," *ACS Nano*, vol. 8, no. 1, pp. 834–840, 2014.
- [87] M. Neouze and U. Schubert, "Review Surface Modification and

- Functionalization of Metal and Metal Oxide Nanoparticles by Organic Ligands," *Monatshefte für Chemie - Chem. Mon.*, vol. 139, no. 3, pp. 183–195, 2008.
- [88] Y. A. Atmane *et al.*, "Functionalization of aluminum nanoparticles using a combination of aryl diazonium salt chemistry and iniferter method," *J. Phys. Chem. C*, vol. 117, no. 49, pp. 26000–26006, 2013.
- [89] M. Fogliazza, L. Sicard, P. Decorse, A. Chevillot-Biraud, C. Mangeney, and J. Pinson, "Powerful Surface Chemistry Approach for the Grafting of Alkyl Multilayers on Aluminum Nanoparticles," *Langmuir*, vol. 31, no. 22, pp. 6092–6098, 2015.
- [90] W. L. Barnes, "Fluorescence near interfaces : The role of photonic mode density," *J. Mod. Opt.*, vol. 45, no. 4, pp. 661–699, 1998.
- [91] J. R. Lakowicz, "Radiative Decay Engineering: Biophysical and Biomedical Applications," *Anal Biochem.*, vol. 298, no. 1, pp. 1–24, 2001.
- [92] F. Tam, G. P. Goodrich, B. R. Johnson, and N. J. Halas, "Plasmonic Enhancement of Molecular Fluorescence," *Nano Lett.*, vol. 7, no. 2, pp. 496–501, 2007.
- [93] D. J. Guo *et al.*, "GaN Nanowire Functionalized with Atomic Layer Deposition Techniques for Enhanced Immobilization of Biomolecules," *Langmuir*, vol. 26, no. 23, pp. 18382–18391, 2010.
- [94] N. Akbay, J. R. Lakowicz, and K. Ray, "Distance-Dependent Metal-Enhanced Intrinsic Fluorescence of Proteins Using Polyelectrolyte Layer-by-Layer Assembly and Aluminum Nanoparticles," *J. Phys. Chem. C*, vol. 116, no. 19, pp. 10766–10773, 2012.
- [95] P. Anger, P. Bharadwaj, and L. Novotny, "Enhancement and Quenching of Single-Molecule Fluorescence," *Phys Rev Lett.*, vol. 96, no. 11, p. 113002, 2006.
- [96] S. Bidault, A. Devilez, P. Ghenuche, B. Stout, N. Bonod, and J. Wenger, "Competition between Förster resonance energy transfer and donor photodynamics in plasmonic dimer nanoantennas," *ACS Photonics*, vol. 3, no. 5, pp. 895–903, 2016.
- [97] T. Usui, C. A. Donnelly, M. Logar, R. Sinclair, J. Schoonman, and F. B. Prinz, "Approaching the limits of dielectric breakdown for SiO₂ films deposited by plasma-enhanced atomic layer deposition," *Acta Mater.*, vol. 61, no. 20, pp. 7660–7670, 2013.
- [98] J. A. Howarter, J. P. Youngblood, R. V May, I. Final, and F. September, "Optimization of Silica Silanization by 3-Aminopropyltriethoxysilane," *Langmuir*, vol. 22, no. 26, pp. 11142–11147, 2006.
- [99] E. T. Vandenberg *et al.*, "Structure of 3-Aminopropyltriethoxy silane on silicon oxide," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 147, no. 1, pp. 103–118, 1991.
- [100] I. Arghir, D. Spasic, B. E. Verlinden, F. Delport, and J. Lammertyn, "Chemical Improved surface plasmon resonance biosensing using silanized optical fibers," *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 216, pp. 518–526, 2015.

- [101] M. Ammar *et al.*, “A new controlled concept of immune-sensing platform for specific detection of Alzheimer’s biomarkers,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 40, no. 1, pp. 329–335, 2013.
- [102] E. Briand *et al.*, “Chemical Modifications of Au/ SiO₂ Template Substrates for Patterned Biofunctional Surfaces,” *Langmuir*, vol. 27, no. 2, pp. 678–685, 2011.
- [103] S. Ko and S. A. Grant, “A novel FRET-based optical fiber biosensor for rapid detection of *Salmonella typhimurium*,” *Biosens Bioelectron.*, vol. 21, no. 7, pp. 1283–1290, 2006.
- [104] S. K. Vashist, E. Lam, S. Hrapovic, K. B. Male, and J. H. T. Luong, “Immobilization of Antibodies and Enzymes on Platforms for Biosensors and Diagnostics,” *Chem. Rev.*, vol. 114, no. 21, pp. 11083–11130, 2014.
- [105] M. Cardoso Dos Santos, “Etude de l’adhésion de vésicules géantes et de cellules vivantes par nanoscopie de fluorescence,” 2015.
- [106] J. Diao, D. Ren, J. R. Engstrom, and K. H. Lee, “A surface modification strategy on silicon nitride for developing biosensors,” *Anal. Biochem.*, vol. 343, no. 2, pp. 322–328, 2005.
- [107] L. D. White and C. P. Tripp, “Reaction of (3-Aminopropyl) dimethylethoxysilane with Amine Catalysts on Silica Surfaces,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 232, no. 2, pp. 400–407, 2000.
- [108] F. De Chaumont *et al.*, “Icy : an open bioimage informatics platform for extended reproducible research,” *Nat Methods*, vol. 9, no. 7, pp. 690–6, 2012.
- [109] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer, 2010.
- [110] O. Lefebvre, C. Smadja, E. Martincic, M. Woytasik, and M. Ammar, “Integration of microcoils for on-chip immunosensors based on magnetic nanoparticles capture,” *Sens. Bio-Sensing Res.*, vol. 13, pp. 115–121, 2017.
- [111] K. Shirai, K. Mawatari, and T. Kitamori, “Extended Nanofluidic Immunochemical Reaction with Femtoliter Sample Volumes,” *Small*, vol. 10, no. 8, pp. 1514–1522, 2014.
- [112] B. Song *et al.*, “Time-resolved lanthanide luminescence for lab-on-a-chip detection of biomarkers on cancerous tissues,” *Analyst*, vol. 134, no. 10, pp. 1191–1193, 2009.
- [113] X. Ren, M. Bachman, C. Sims, and G. P. Li, “Electroosmotic properties of microfluidic channels composed of poly (dimethylsiloxane),” *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, vol. 762, no. 2, pp. 117–125, 2001.
- [114] M. Leester-Schädel, T. Lorenz, F. Jürgens, and C. Richter, “Fabrication of Microfluidic Devices,” in *Microsystems for Pharmatechnology Manipulation of Fluids, Particles, Droplets, and Cells*, A. Dietzel, Ed. Springer, 2016, pp. 23–57.
- [115] A. Piruska *et al.*, “The autofluorescence of plastic materials and chips measured under laser irradiation,” *Lab Chip.*, vol. 5, no. 12, pp. 1348–1354, 2005.
- [116] M.-C. Bélanger and Y. Marois, “Hemocompatibility, Biocompatibility,

- Inflammatory and in Vivo Studies of Primary Reference Materials Low-Density Polyethylene and Polydimethylsiloxane: A Review," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 58, no. 5, pp. 467–477, 2001.
- [117] D. J. Campbell *et al.*, "Replication and Compression of Bulk and Surface Structures with Polydimethylsiloxane Elastomer," *J. Chem. Educ.*, vol. 75, no. 4, pp. 537–541, 1999.
- [118] A. Mata and A. J. Fleischman, "Characterization of Polydimethylsiloxane (PDMS) Properties for Biomedical Micro/Nanosystems," *Biomed Microdevices.*, vol. 7, no. 4, pp. 281–293, 2005.
- [119] I. D. Johnston, "Mechanical characterization of bulk Sylgard 184 for microfluidics and microengineering," *J. Micromechanics Microengineering*, vol. 24, no. 3, p. 35017, 2014.
- [120] R. Wilson and D. J. Schiffrin, "Use of Fluorescamine for the Spectrofluorimetric Investigation of Primary Amines on Silanized Glass and Indium Tin Oxide-coated Glass," *Analyst*, vol. 120, no. 1, pp. 175–178, 1995.
- [121] L. Locascio-Brown, A. L. Plant, R. A. Durst, and M. V Brizgys, "Radiometric and fluorimetric determination of aminosilanes and protein covalently bound to thermally pretreated glass substrates," *Anal. Chim. Acta*, vol. 228, pp. 107–116, 1990.
- [122] D. Geißler *et al.*, "Multiplexed diagnostics and spectroscopic ruler applications with terbium to quantum dots FRET," in *Clinical and Biomedical Spectroscopy*, 2009, vol. 7368, pp. 1–8.
- [123] N. Hildebrandt, K. D. Wegner, and W. R. Algar, "Luminescent terbium complexes : Superior Förster resonance energy transfer donors for flexible and sensitive multiplexed biosensing," *Coord. Chem. Rev.*, vol. 273–274, pp. 125–138, 2014.
- [124] K. D. Wegner *et al.*, "Influence of Luminescence Quantum Yield, Surface Coating, and Functionalization of Quantum Dots on the Sensitivity of Time-Resolved FRET Bioassays," *Appl. Mater. Interfaces*, vol. 5, no. 8, pp. 2881–2892, 2013.
- [125] M. Cardoso Dos Santos and N. Hildebrandt, "Recent developments in lanthanide-to-quantum dot FRET using time-gated fluorescence detection and photon upconversion," *Trends Anal. Chem.*, vol. 84, no. A, pp. 60–71, 2016.
- [126] S. Bhuckory, O. Lefebvre, X. Qiu, K. D. Wegner, and N. Hildebrandt, "Evaluating quantum dot performance in homogeneous FRET immunoassays for prostate specific antigen," *Sensors (Switzerland)*, vol. 16, no. 2, p. 197, 2016.
- [127] I. Nikcevic *et al.*, "Adsorption of Fluorescently Labeled Microbeads on PDMS Surfaces," in *SPIE Proceedings*, 2005, vol. 5718, pp. 159–167.
- [128] X. Yu, J. Xiao, and F. Dang, "Surface Modification of Poly(dimethylsiloxane) Using Ionic Complementary Peptides to Minimize Nonspecific Protein Adsorption," *Langmuir*, vol. 31, no. 21, pp. 5891–5898, 2015.

- [129] Y. Liu, L. Zhang, W. Wu, and M. Zhao, "Restraining non-specific adsorption of protein using Parylene C-caulked polydimethylsiloxane," *Biomicrofluidics*, vol. 10, no. 2, pp. 24126–11, 2016.
- [130] D. K. Wegner, "Förster Resonance Energy Transfer from Terbium Complexes to Quantum Dots for Multiplexed Homogeneous Immunoassays and Molecular Rulers," 2016.
- [131] X. Qiu, "Time-Gated Förster Resonance Energy Transfer Biosensors for Multiplexed Diagnostics of Epidermal Growth Factor Receptors and MicroRNAs," 2017.
- [132] S. Bhuckory, "Quantum dots and upconverting nanoparticles : Bioconjugation and time-resolved multiplexed FRET spectroscopy for cancer diagnostics," 2017.

Annexes

Annexe A : Programme pour la procédure de traitement des images de fluorescence

Annexe B : Exemples d'histogrammes d'intensité de fluorescence pour les différentes concentrations étudiées au chapitre III (0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL et 1,0 mg/mL)

Annexe C : Protocole de bioconjugaison des anticorps primaires de souris aux complexes de terbium NHS

Annexe A

Programme pour la procédure de traitement des données

Le code présenté dans cette annexe est celui employé pour la procédure de traitement des images de fluorescence obtenues avec la caméra sCMOS 2560 x 2160 pixels PCO edge sur le microscope Olympus IX71. Il utilise les logiciels Matlab et Icy. Il est composé d'un code principal « Main » faisant appel à un second code appelé « Protocole_Alexandra_stats » ainsi qu'à une matrice nommée « masque_centre_microscope ».

La procédure préalable au traitement d'images est décrite ci-dessous :

1. Installation des Plug-Ins
 - Matlab IO
 - Matlab Communicator
 - Matlab blocks
 - Matlab X Server
2. Exportation des fichiers .tiff en .mat
 - Lancer le Plug-In *Protocols* sur Icy
 - Ouvrir (*Load*) le fichier « *Exportation Tif vers Mat.protocol* »
 - Paramétrer les blocs en entrée de schéma
 - Lancer le protocole (*Run*)
3. Traitement des images sur MatLab
 - Copier-Coller les fichiers *Main.m* , *Protocole_Alexandra_compact.m* et *masque_centre_microscope.mat* dans le dossier contenant les fichiers .mat créés lors de l'Etape 1.
 - Ouvrir le fichier *Main.m* dans Matlab
 - Paramétrer le code (Section Paramètres en début de code)
 - Lancer le programme (*Run*)
 - Récupérer le fichier *resultats.xls* dans le dossier contenant les fichiers .mat

Les codes sont donnés ci-dessous :

- Main.m

```

%-----PARAMETRES-----%
Seuil = 10000;           % Affichage_Icy = true nécessite
Distance_securite = 16; % de lancer une instance d'Icy
affichage_icy = false;  % avant de lancer le programme.
%-----%

%Initialisation des plugins Icy
if affichage_icy
    addpath('C:\Program Files\icy\plugins\ylemontag\matlabxserver');
    addpath('C:\Program Files\icy\plugins\ylemontag\matlabcommunicator');
    icy_init()
    icy_closeall();
end

%Initialisation variables
files = dir('*.mat');
Tab = cell(6, length(files));
Tab(:,1) = {'IMAGE', 'Moyenne', 'Sigma', 'Moyenne-Fit', 'Sigma-Fit', 'Pixels-
trait'};
%load('masque_centre_microscope_1024_1024.mat');
load('masque_centre_microscope.mat'); %selon l'image (microscope) utilisée

%Traitement des données
for i=1:length(files)-1
    file = load(files(i).name);
    name = fieldnames(file);
    name = name{1};
    file_in = getfield(file, name);
    [moyenne, masque, ecart_type, param_fit, pixel_trait] =
Protocole_Alexandra_stats(file_in, name, i, zone_centre_microscope, Seuil,
Distance_securite);
    if affichage_icy
        icy_imshow(file_in, name);
        icy_imshow(masque, name);
    end

    Tab{1, i+1} = name;
    Tab{2, i+1} = moyenne;
end

```

```

    Tab{3, i+1} = ecart_type;
    Tab{4, i+1} = param_fit.mu;
    Tab{5, i+1} = param_fit.sigma;
    Tab{6, i+1} = pixel_trait(1,1);
end
%Exportation vers Excel
xlswrite('resultats.xlsx', Tab)

```

- Protocole_Alexandra_stats.m

```

function [moyenne, masque, ecart_type, param_fit, pixel_trait] =
Protocole_Alexandra_stats(file_in, name, i, zone_centre_microscope, seuil,
distance_securite)

zone_securite = strel('disk', distance_securite, 8);

file_in_correc=file_in-100;% correction
%file_in_correc=file_in;% pas de correction

masque_securite = imdilate(file_in_correc> seuil, zone_securite);

masque_securite = masque_securite == 0;

masque = masque_securite .* zone_centre_microscope;
masque = masque > 0;

pixel_trait= size(file_in_correc(masque));
moyenne = mean(file_in_correc(masque));
ecart_type = std (double(file_in_correc(masque)));
figure(i)
hold on
name1 = strrep(name, '_', '-');
%title(["Histogram Image " name1]);
title('Histogram Image');
xlabel('Intensity');
ylabel('Counts');
fitted_hist=histfit(file_in_correc(masque), 50, 'kernel');
param_fit=fitdist(file_in_correc(masque), 'normal');

```

```
title(['mu = ' num2str(floor(param_fit.mu)), ' Sigma = '  
num2str(floor(param_fit.sigma))]); % val entière  
  
end
```

- masque_centre_microscope.mat

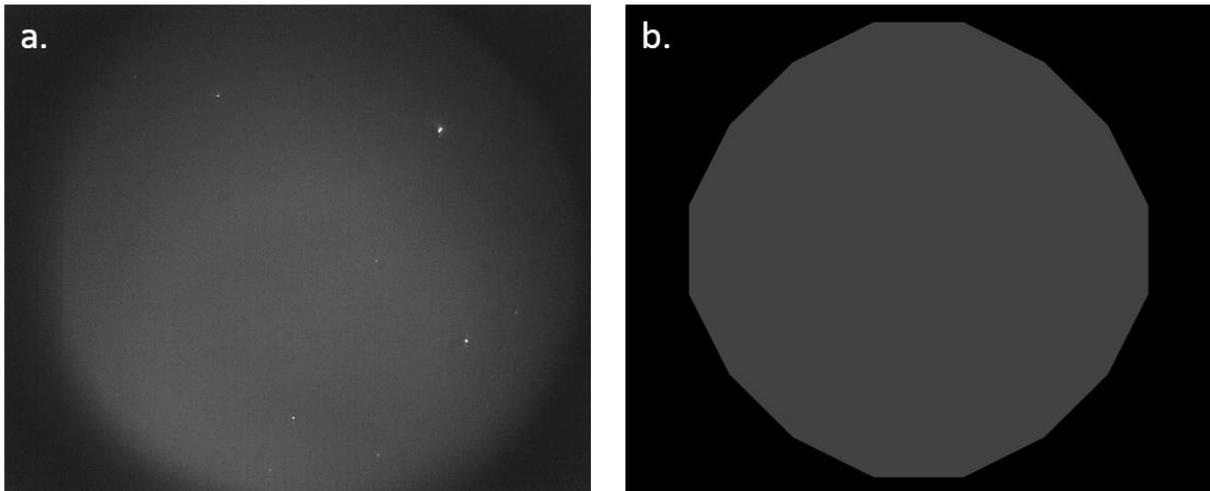


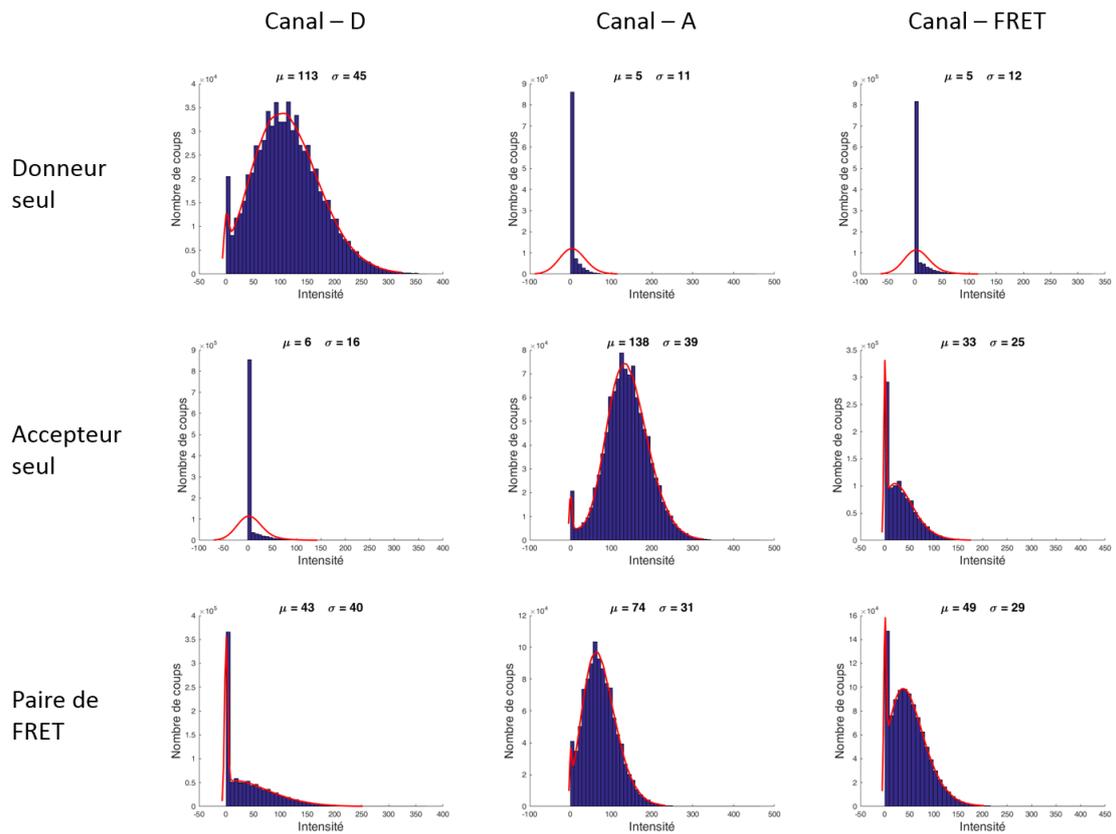
Figure A.1. Représentation visuelle sur Icy de l'effet de la matrice masque_centre_microscope sur une image. En a, image de fluorescence brute. En b, matrice appliquée sur l'image de fluorescence pour le traitement.

Le code utilisé pour la procédure de traitement des images de fluorescence obtenues avec la caméra EMCCD 1024 x 1024 pixels iXon 888 Ultra (Andor) sur le microscope Olympus IX83 est adapté du code présenté ci-dessus.

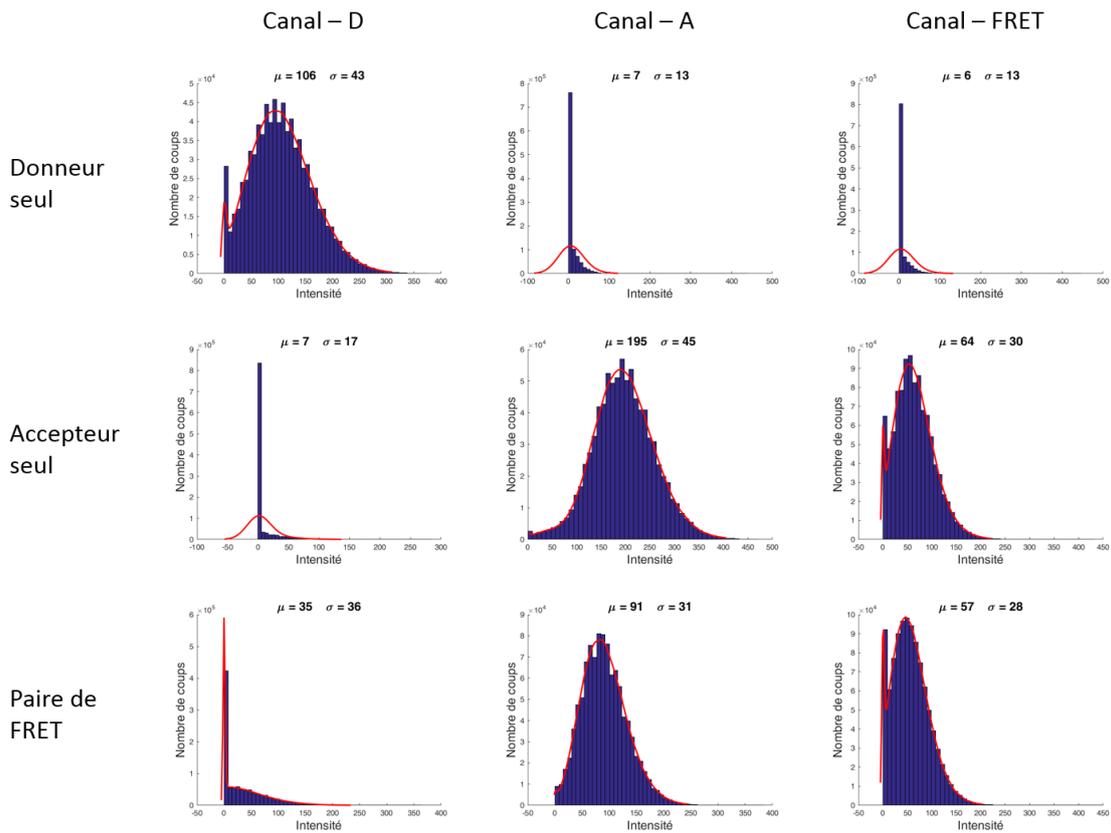
Annexe B

Exemples d'histogrammes d'intensité de fluorescence pour les différentes concentrations étudiées au chapitre III (0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL et 1,0 mg/mL)

a.



b.



C.

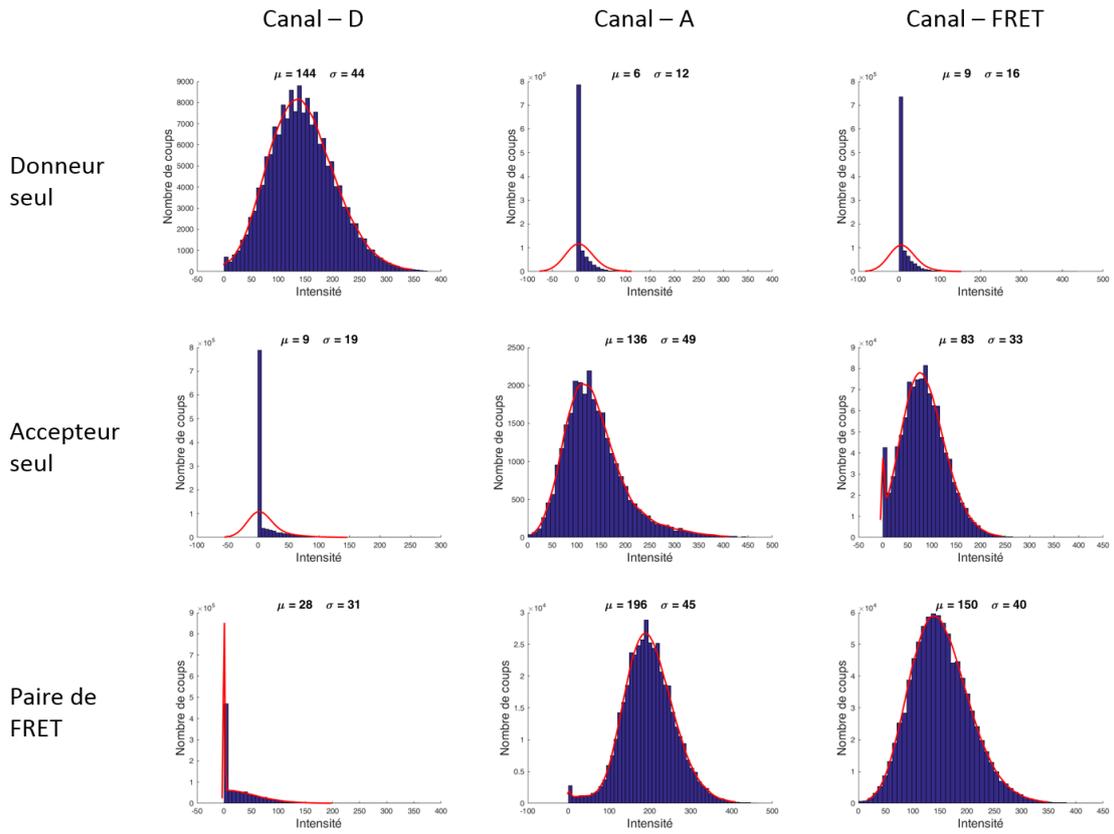


Figure B.1. Histogrammes, après soustraction du bruit et application du masque, pour un ROI représentatif et pour chaque configuration pour les différentes concentrations considérées au chapitre III. En a, 0,25 mg/mL, en b, 0,5 mg/mL et en c, 1,0 mg/mL.

Annexe C

Protocole de bioconjugaison des anticorps primaires de souris aux complexes de terbium NHS

Mesure de la concentration en anticorps primaires AC I :

- Spectrophotomètre Lambda 35 UV / Vis PerkinElmer
- Paramètres d'acquisition : balayage 800 - 200 nm ; résolution 1,0 nm ; vitesse 120 nm/min ; changement de lampe à 326 nm
- Blanc = tampon PBS x3, puis échantillon AC I
- Absorbance à 280 nm = 0,4229
 $0,4229/1,4 = 0,302 \text{ mg/mL}$
Dilution initiale = 15x
 $c_{\text{stock}}(\text{AC I}) = 0,302 \times 15 = 4,53 \text{ mg/mL}$

Conjugaison :

- Le greffage des complexes de terbium sur les anticorps primaires se fait dans le tampon carbonate à pH 9,0.
- 155,8 μL tampon carbonate pH 9,0 + 44,2 μL AC I + 1,675 μL L4Tb-NHS ($c_{\text{stock}} = 8 \text{ mM}$ dans le DMF)
Concentration finale en AC I = 1 mg/mL ; rapport Tb/AC I = 10/1
- Agitation brève par vortex
- Incubation sur un agitateur rotatif (Intelli Mixer, Elmi) : programme F1, 25 tours/min, 2h, T_{amb} ; le tube eppendorf est recouvert d'aluminium afin de protéger le bioconjugué de la lumière

Purification :

- Centrifugeuse Eppendorf (5424 R)
- Paramètres d'acquisition : 5000 g ; T = 20°C ; 3 min

Vérifier qu'il n'y a pas de pelote au fond du tube

- Centrifugeuse Thermo Scientific (Heraeus MegaFuge 40 R)
- Paramètres d'acquisition : 4000 g ; T = 4°C; 5 min ; rotor libre (swing bucket) ; acc/dcc max
- Colonnes de filtration Amicon 4 30 K :
- Humidifier avec 1 mL de tampon Tris/Cl pH 7,4 à 100 mM
- Retirer le tampon de la colonne
- Remplir la colonne avec 200 µL d'AC I – Tb + 3,8 mL de tampon Tris/Cl
- Préparer le contrepoids pour la centrifugeuse
- Procéder à la centrifugation (5 min)
- Remplir à nouveau avec le tampon Tris/Cl (compléter à 4 mL) et répéter l'opération de centrifugation (x3)
- Echantillons obtenus : AC I – Tb (environ 500 µL) et 4 précipités de purification

Caractérisation :

- Spectrophotomètre Lambda 35 UV / Vis PerkinElmer
- Paramètres d'acquisition : balayage 800 - 200 nm ; résolution 1,0 nm ; vitesse 120 nm/min ; changement de lampe à 326 nm
- Blanc = tampon PBS x3 ; même cuvette pour les filtrats de purification 1 à 4 et pour le bioconjugué AC I – Tb

Liste des abréviations

ADN Acide désoxyribonucléique

AF Alexa Fluor

ALD Atomic Layer Deposition

APD photodiode à avalanche

APTES 3-aminopropyltriéthoxysilane

APTMS 3-aminopropyltriméthoxysilane

BSA Bovine Serum Albumine

BTBAS bis (tert-butylamino) silane

CCD Charge Coupled Device

CI Conversion Interne

CIS Couplage Intersystème

CsgG Curli specific gene G

CVD Chemical vapor deposition

Cy Cyanine

EB-PVD Electron beam physical vapor deposition

EDC N-(3-Diméthylaminopropyl)-N'-éthylcarbodiimide

EDS/EDX microanalyse X par spectrométrie à dispersion d'énergie

EGFR Epidermal growth factor receptor

ELISA Enzyme-linked immunosorbent assay

EMCCD Electron Multiplying Charge Coupled Device

Fab fragmented antigen-binding

FITC Fluorescein isothiocyanate

FRET Förster Resonance Energy Transfer

FTIR Fourier Transform Infrared

HER2 human epidermal growth factor receptor 2

HOMO Highest Occupied Molecular Orbital

5-IAF 5-Iodoacetamidofluorescein

ICCD Intensified CCD

LUMO Lowest Unoccupied Molecular Orbital

MCT Tellure de Mercure Cadmium

MEB microscope électronique à balayage

MEMS Microelectromechanical systems

MPTS 3 mercaptopropyl trimethoxy silane

NHS N-Hydroxysulfosuccinimide

ON ouverture numérique

OTS octadécyltrichlorosilane

PBS Phosphate Buffered Saline

PCR polymerase chain reaction

PDMS polydimethylsiloxane

PEALD Plasma Enhanced Atomic Layer Deposition

PEG polyéthylène glycol

PL photoluminescence

PSA Prostate Specific Antigen

PSCA prostate stem cell antigen

QD Quantum Dot

ROI Region of interest

SAM Self-assembled monolayer

sCMOS scientific complementary metal-oxide semiconductor

SERS Surface enhanced Raman spectroscopy

smFRET Single Molecule FRET

TIRF Total Internal Reflection Fluorescence

TPSA Total Prostate Specific Antigen

TRITC colorant

UV ultra-violet

