



HAL
open science

Nouvelles biopuces pour le couplage de la Résonance Plasmonique de Surface par imagerie et de la spectrométrie de masse (SPRi-MS)

Anastasiia Halushkina

► **To cite this version:**

Anastasiia Halushkina. Nouvelles biopuces pour le couplage de la Résonance Plasmonique de Surface par imagerie et de la spectrométrie de masse (SPRi-MS). Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Paris-Saclay, 2021. Français. NNT : 2021UPASL005 . tel-04413276

HAL Id: tel-04413276

<https://theses.hal.science/tel-04413276v1>

Submitted on 23 Jan 2024

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.

Nouvelles biopuces pour le couplage de la
Résonance Plasmonique de Surface par
imagerie et de la spectrométrie de masse
(SPRi-MS)

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°577 : Structure et Dynamique des Systèmes Vivants - SDSV

Spécialité de doctorat : sciences de la vie et de la santé

Unité de recherche : Université Paris-Saclay, Univ Evry, CNRS, LAMBE, 91025,
Evry-Courcouronnes, France.

Réfèrent : Université d'Évry Val d'Essonne

**Thèse présentée et soutenue à Evry,
le 12 février 2021, par**

Anastasiia HALUSHKINA

Composition du Jury

Christine ENJALBAL-GOUBET

Professeure, Université de Montpellier

Présidente & Rapporteur & Examinatrice

Souhir BOUJDAY

Professeur, Sorbonne Université

Rapporteur & Examinatrice

Pierre LAFAYE

Chargé de recherche HDR, Institut
Pasteur

Examineur

Claude NOGUES

Chargée de recherche CNRS, ENS Paris-
Saclay

Examinatrice

Régis DANIEL

Directeur de recherche CNRS, UEVE

Directeur de thèse

William BUCHMANN

Maître de Conférences HDR, UEVE

Co-Directeur de thèse

Acknowledgment

First of all, I would like to thank my supervisors, Régis Daniel and William Buchmann, for giving me an opportunity to work on this challenging and exciting project, for their guidance, support and motivation. During my PhD project I have learned a great deal about a variety of powerful approaches used to solve problems that emerge in modern biotech research. I would like also to thank Nathalie Jarroux and Florence Gonnet for their guidance during the project.

I would like to thank Jean-Yves Salpin, the director of the Laboratoire Analyse, Modélisation, Matériaux pour la Biologie et l'Environnement of the Université d'Evry Val d'Essonne, for having welcomed me at LAMBE. I thank Prof. Christine Enjalbal-Goubet and Prof. Souhir Boujday for having accepted to review the manuscript and to participate in the jury of this thesis; Dr. Pierre Lafaye and Dr Claude Nogues for having accepted to be members of the jury of this thesis. Their feedback on my thesis and our insightful discussions were invaluable.

I am very grateful to our collaborator Dr. Diane Lebeau and to equip of Den-Service d'Etude du Comportement des Radionucléides, CEA Saclay for access to the MALDI TOF/TOF MS instrument, for hospitality at CEA, for plenty of interesting scientific discussions and help with implementation of new features in the SPRi-MSi project.

I'm also deeply greatfull to Claude Nougues and Malcolm Buckle for their support since my Master at ENS Cachan.

I would like to thank all current and former members of the group "Structure-Réactivité de Biomolécules: Complexes Organométalliques et Macromoléculaires" including Véronique, Cédric, Matthieu, Murielle, Ketty, Emmanuelle, Isabelle...

In particular I am very thankful to my friends and colleagues from lab: Maud, Mélanie, Ilham, Ines, Charlotte, and of course to all Italian guys and other members of group 2 for interesting discussions, their help and support throughout my time in LAMBE.

I would very much like to thank my family for their unending support and love throughout my PhD and my whole life. I am also grateful to my friends Hanna and Sergei, as well as to and my friends in Ukraine, France and all over the world.

I would like to separately thank my beloved boyfriend, Oleksandr, for his endless love, support and enormous patience during all these years. Without you it would hardly happen!

Contenu

Liste des figures	5
Liste des tableaux	16
Abréviations	17
Introduction générale.....	20
Chapter I. Interactions biomoléculaires et leurs méthodes de caractérisation	24
I-1 Interactions biomoléculaires	25
I-1.1 Différents types de liaisons impliquées dans les interactions biomoléculaires.....	26
I-1.2 Paramètres cinétiques et thermodynamiques des interactions	28
I-2 Techniques analytiques pour l'étude des interactions biomoléculaires	30
I-2.1 Les méthodes de microarray.....	30
I-2.1.1 Puces à acide nucléique	30
I-2.1.2 Les puces à protéines	31
I-2.2 Méthodes de détection avec ou sans marquage.....	35
I-2.2.1 Spectroscopie de fluorescence - FRET	35
I-2.2.2 Dichroïsme circulaire (CD)	36
I-2.2.3 Spectroscopie vibrationnelle (infrarouge (IR) et Raman)	37
I-2.2.4 RMN Résonance magnétique nucléaire	39
I-2.2.5 Calorimétrie	40
I-2.2.6 Électrophorèse capillaire (CE) et électrophorèse capillaire d'affinité (ACE).....	41
I-2.3 La spectrométrie de masse (MS) dans le contexte de l'analyse des interactions biomoléculaires	42
I-2.3.1 Intérêt de la spectrométrie de masse pour l'étude des complexes non covalents...43	
I-2.3.2 Techniques de caractérisation directe des complexes non covalents	43
I-2.3.3 Sources d'ions.....	44
I-2.3.4 Autres techniques MS.....	50
I-2.4 Le besoin d'une nouvelle plateforme d'analyse multidimensionnelle.....	54
Chapter II. Développement des plateformes de biodétection de complexes.....	56
II-1 Résonance plasmonique de surface (SPR)	57
II-1.1 Théorie et dispositifs.....	58
II-1.2 Imagerie par résonance plasmonique de surface (SPRi).....	61

II-2 Le couplage de la résonance plasmonique de surface avec la spectrométrie de masse (SPR-MS) pour la quantification des interactions et l'identification de ligands.....	65
II-2.1 Rôle de la chimie de surface dans le couplage SPR-MS	66
II-2.2 Les différentes configurations des systèmes SPR-MS.....	70
II-2.2.1 Elution de l'échantillon avant l'analyse	71
II-2.2.2 SPR-MS détection directement à partir de la surface d'une biopuce.....	74
II-2.3 Utilisation du couplage SPR-MS pour la détection d'analytes multiples.....	75
II-2.4 Autres types de biocapteur couplé à la spectrométrie de masse	77
II-3 Types d'éléments de détection pour les biocapteurs	82
II-3.1 Anticorps - comme élément de détection pour biocapteur	83
II-3.1.1 Que sont les anticorps ?.....	83
II-3.1.2 Les anticorps comme élément de détection.....	84
II-3.2 Anticorps à domaine unique et fragments d'anticorps - nouvel élément de détection pour biocapteur	85
II-3.2.1 Que sont les anticorps à domaine unique (nanobodies®)	86
II-3.2.2 Les nanocorps comme élément de détection.....	87
II-3.3 Aptamère - élément de détection pour le biocapteur	89
II-3.3.1 Que sont les aptamères ?	89
II-3.3.2 Processus de sélection des aptamères.....	90
II-3.3.3 Les caractéristiques de l'aptamère comme élément de détection.....	92
Objectifs de la thèse	95
Chapter III. Matériels et méthodes	96
III-1 Réactifs et produits chimiques	97
III-1.1 Produits chimiques	97
III-1.2 Molécules cibles (protéines et peptides).....	99
III-1.3 Récepteurs biomoléculaires	100
III-1.3.1 Anticorps et nanocorps	100
III-1.3.2 ADN à simple brin (ADNsb, aptamères).....	101
III-1.4 Tampons	102
III-2 Méthodes et approches analytiques.....	103
III-2.1 Fonctionnalisation de la surface des capteurs.....	104
III-2.2 Analyse SPR par imagerie (SPRi)	105
III-2.3 Analyse par MS	107

III-3 XPS.....	109
Chapter IV. Microarrays à anticorps pour le couplage SPRi-MS. Développement de l'imagerie par spectrométrie de masse (MSi).....	111
IV-1 Microarrays à anticorps pour le couplage SPRi-MS.....	113
IV-2 L'imagerie MS: une nouvelle étape dans l'analyse SPRi-MS.....	115
IV-2.1 MALDI MS sur biopuce: analyse par imagerie MS après expérience SPRi (biopuce à anticorps).....	116
IV-2.2 Effet du dépôt de matrice par nébulisation sur l'analyse des biopuces SPRi par imagerie MS.....	117
Chapter V. Microarrays à aptamères pour le couplage SPRi-MS.....	123
V-1 Aptamères anti β -lactoglobuline	124
V-1.1 Recherche de conditions expérimentales appropriées pour l'aptasenseur de β -lactoglobuline.....	126
V-1.2 Contrôle des aptamères anti β -lactoglobuline par électrophorèse d'affinité, et analyse MALDI-MS des surfaces microarrays.....	128
V-2 Aptamères anti thrombine	129
V-2.1 Structure et spécificité des aptamères anti thrombine HD1 et HD22.....	130
V-2.2 Recherche de conditions expérimentales SPRi pour les aptamères HD1 et HD22 anti thrombine	132
V-2.2.1 Influence du tampon d'immobilisation HD1 et HD22.....	133
V-2.2.2 Influence de la concentration des aptamères HD1 et HD22 lors de leur immobilisation dans le tampon TE.....	135
.....	136
V-2.2.3 Influence de la renaturation des aptamères HD1 et HD22 avant l'immobilisation sur la surface du biocapteur.....	136
V-2.2.4 Influence du greffage orienté 5' ou 3' de l'aptamère de thrombine avec linker T10	139
V-2.2.5 Influence de la longueur du linker T5, T10, T15	140
V-2.2.6 Conclusions sur les conditions expérimentales SPRi pour les aptamères de la thrombine HD1 et HD22	141
V-2.3 Évaluation de l'aptadimer HD1-22.....	143
V-2.4 Couplage avec la détection par MALDI MS et imagerie MS des biopuces à aptamères	147
V-2.4.1 Analyse des biopuces à aptamères HD1 et HD22 par imagerie MALDI-TOF... 147	
V-2.4.2 Analyse des biopuces à aptadimère HD1-22 par imagerie MALDI-TOF	150

V-2.4.3 Conclusion sur la détection par MSi en fonction du type d'aptamère et de ses modifications	151
Chapter VI. Les microarrays mixtes anticorps/aptamères pour le couplage SPRi-MS	153
VI-1 Les microarrays mixtes anti β -lactoglobuline pour la détection SPRi.....	154
VI-2 Analyse par MALDI-TOF MS et MSi des microarrays mixtes anti β -lactoglobuline.....	155
VI-3 Les microarrays mixtes anti thrombine pour la détection SPRi.....	162
VI-3.1 Détection de la thrombine en utilisant des microarrays mixtes.....	162
VI-3.2 Détection de la prothrombine en utilisant des microarrays mixtes	164
VI-3.3 Influence du tampon de course sur la détection par SPRi en utilisant des microarrays mixtes: rôle des ions divalents dans la réponse des aptamères	166
VI-3.3.1 Rôle des ions divalents dans la détection de la thrombine en utilisant des microarrays mixtes	166
VI-3.3.2 Rôle des ions divalents dans la détection de la prothrombine en utilisant des microarrays mixtes	171
VI-3.4 Performance de microarrays mixtes dans des solutions biologiques complexes (conditions réelles): effet de l'albumine	173
VI-3.4.1 Effet de la BSA purifiée sur les microarrays mixtes	173
VI-3.4.2 Effet de la BSA purifiée sur la détection de la thrombine en utilisant des microarrays mixtes	174
VI-4 Analyse MALDI-MS des microarrays pour la détection de la thrombine	177
Chapter VII. Nanocorps pour le couplage SPRi-MS	182
VII-1 Nanocorps pour le couplage SPRi-MS	183
VII-1.1 Détection SPRi-MS avec des nanocorps immobilisés directement sur l'or.....	183
VII-1.2 Détection SPRi-MS en utilisant des microarrays pour la détection de d'amyloïde sur PEO-NHS SAM.....	187
Conclusions et perspectives	192
Annexe I	197
Annexe II.....	199
RÉFÉRENCES.....	212

Liste des figures

- Figure I-1: L'interactome humain contient plus de 100 000 interactions protéiques, dont seules des fractions sont connues. Des réseaux d'interactions protéine-protéine devraient permettre de trouver des partenaires d'interaction pour une protéine (qui peuvent révéler sa fonction). Adopté de [2].25
- Figure I-2: Interactions qui déterminent la structure tertiaire des protéines. Adopté de [7].27
- Figure I-3: Représentation de la spectroscopie STD RMN. Après la saturation de la protéine par l'impulsion de saturation sélective, les ligands qui sont en échange entre l'état lié et l'état libre deviennent saturés lorsqu'ils sont fixés à la protéine. Par échange, cette saturation est transportée dans une solution où elle peut être détectée. En soustrayant le spectre résultant d'un spectre sans irradiation de la protéine, on obtient un spectre RMN de la seule molécule de ligand liée. Les signaux de résonance des "non-liants" ne participent pas au spectre de différence. Adopté de [66].40
- Figure I-4: Représentation schématique du spectromètre de masse.44
- Figure I-5: Exactitude et précision de la mesure de la MS des protéines et de leurs complexes. Une comparaison entre la masse calculée et celle mesurée par nanoESI-MS. Un petit écart entre les données expérimentales (points rouges) et une corrélation 1:1 entre la masse attendue et la masse mesurée (ligne bleue) résulte de la liaison résiduelle du solvant et du tampon, et est inférieur à 1,5% pour tous les assemblages indiqués (points bleus). Adopté de [83]...45
- Figure I-6: Complexes de protéines membranaires étudiés par ESI-MS natif au cours des années 2008-2013. Adopté de [104].47
- Figure I-7: Principe de la désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI). Le laser pulsé irradie le mélange échantillon/matrice, déclenchant la désorption de l'échantillon en présence de matrice. Les molécules analytes sont ionisées et les ions sont ensuite extraits sous l'effet d'un champ électrique. Ces ions traversent les lentilles de focalisation, puis sont dirigés vers l'analyseur de masse.48
- Figure I-8: Principe de la spectrométrie de masse MALDI-TOF. Les ions désorbés sont accélérés par un champ électrique, ainsi les ions acquiert tous la même énergie cinétique pour un état de charge donné. Par conséquent, les ions plus lourds atteignent des vitesses plus faibles et arrivent plus tard. La détection est basée sur la mesure du temps d'arrivée des ions, ce qui permet de déterminer le rapport m/z.48
- Figure I-9: Éléments d'une biopuce SELDI. La matrice est constituée d'une bande d'aluminium recouverte de verre avec des sites d'affinité et une barrière hydrophobe qui entoure ces emplacements et empêche le mouvement de l'échantillon entre les sites. Chaque site comprend un hydrogel fonctionnalisé avec des ligands chromatographiques classiques. Adopté de [116].50
- Figure I-10: Informations de structure et de dynamique accessibles aux approches basées sur la spectrométrie de masse. Adopté de [83].51

Figure II-1: Graphique représentant le nombre de publications citant « SPR » comme mot-clé. La courbe bleue représente le nombre total d'articles, cumulés depuis 1982 sur PubMed. Les barres bleues représentent le nombre d'articles référencés par an.	57
Figure II-2: Présentation schématique de l'installation expérimentale SPR.	58
Figure II-3: Montages expérimentaux avec configurations de Kretschmann : goniomètre à balayage d'angle (A), faisceau focalisé (B) et angle fixe (C).....	59
Figure II-4: Sensorgramme typique montrant le processus d'association/dissociation (A) et les changements d'angle SPR résultants (B). L'interaction ligand-récepteurs à la surface de la biopuce entraîne une accumulation de masse à la surface et affecte les conditions SPR (A). Les adsorptions des biomolécules à la surface entraînent des modifications de l'indice de réfraction et un déplacement de l'angle de résonance de la position θ_1 à la position θ_2 (B). Ce processus cinétique peut être suivi en temps réel et la quantité de ligand capturé peut être déterminée [311].....	60
Figure II-5: Configuration du SPRi. L'analyte (ligand) en solution passe dans la cellule fluïdique et peut réagir avec la surface du biocapteur. En raison de l'interaction par affinité, il est reconnu, et spécifiquement capturé par les molécules de récepteurs immobilisées sur la surface du capteur (A). Les données sont enregistrées par le système comme des variations de l'intensité de la lumière réfléchiée pour chaque ROI, puis affichées sur le sensorgramme et sur l'image différentielle en temps réel (B).	62
Figure II-6: Microarray à protéines avec 1020 sites imagés par le système de microscope SPR (Lumera Corp.). Les protéines utilisées pour ce microarray sont les suivantes: IgG1 humaine, IgG2 humaine, IgG3 humaine, IgG4 humaine, IgG ovine, IgG anti-mouton, IgG humaine, BSA, anti-BSA polyclonale, biotine-BSA, lysozyme, HSA, HSA monoclonale, IgM humaine, IgG de chat, protéine A, protéine L, anticorps anti-DNP et anti-ovalbumine monoclonale. Adopté de [148].	63
Figure II-7: Principe de l'expérience SPRi avec des performances améliorées par les nanoparticules. (A) La fonctionnalisation des anticorps avec différentes formes de nanoparticules d'or. (B) L'essai en sandwich sur la surface pour la thrombine (Th) en utilisant la puce SPR modifiée par des aptamères en conjonction avec différentes nanoparticules d'or recouvertes d'anti-Th. (C) Une comparaison de trois mesures SPR exaltée par des nanoparticules différentes (en anglais « nanoparticle-enhanced SPR ») à une concentration fixe de thrombine de 1 fM. Adopté de [151].	64
Figure II-8: Une immobilisation instable et la dénaturation partielle du ligand (rouge) et de l'analyte (bleu) à partir d'une surface incompatible (A) entraîne une régénération incomplète, ce qui se traduit par une augmentation de la ligne de base et une diminution de la capacité de liaison d'un cycle d'analyse à l'autre (B). Adopté de [158].	67
Figure II-9: Représentation schématique de la formation d'une SAM sur la surface du capteur. Les molécules possédant un groupe thiol sont chimisorbées rapidement à la surface du capteur, mais la formation d'une couche dense prend plusieurs heures.	68
Figure II-10: Méthodes d'immobilisation utilisant divers liens chimiques. Une SAM est créée à partir d'alcanethiols. Après la formation de la couche thiolée, de nombreux procédés chimiques d'immobilisation peuvent être réalisés. Adopté de [146].	69

- Figure II-11: Résonance plasmonique de surface (SPR) - Spectrométrie de masse (MS). Les molécules de récepteurs sont greffées de manière covalente sur la surface du capteur SPR. Une solution complexe contenant le ligand est injectée sur la surface du capteur et les interactions récepteur-ligand sont suivies en temps réel par SPR. Le ligand capturé par affinité peut ensuite être analysé soit (A) en retirant de la biopuce de l'instrument SPR puis après application de matrice par analyse MALDI-MS; soit (B) par microéluion, suivie de la récupération du matériel retenu par les récepteurs, puis d'une analyse ESI-MS ou MALDI-MS. 71
- Figure II-12: (A) Représentation schématique de la méthode d'injection microfluidique. Spectres de masse d'un échantillon de 5 μ L avec 70 nM de lysozyme en présence d'un mélange complexe: (B) échantillon préparé avec de l'eau et repéré directement sur la plaque MALDI et (C) échantillon préparé dans du HBS-EP et récupéré après capture sur la biopuce. 72
- Figure II-13: Spectre BIA/MS de la myotoxine a retenu dans chaque cellule fluide individuelle. La cible est observée dans toutes les cellules (ou canaux) sauf dans le canal 4 (blanc). Des protéines marqueurs, l'angiotensine II (cellules fluidiques 1 et 3) et la sécrétine (cellules fluidiques 2 et 4) ont été ajoutées à la matrice MALDI pour démontrer la résolution spatiale (les cellules fluidiques ont été ciblées individuellement avec le laser) et pour être utilisées comme calibrants de masse internes. Adapté de [157]. 74
- Figure II-14: Représentation schématique de la configuration du système SPR-BIA/MS à base de puces. Le SPR est utilisé pour suivre les interactions biospécifiques en fonction du temps, à partir duquel les paramètres d'association et de dissociation de l'interaction peuvent être déterminés. L'analyse MALDI-TOF des cellules fluidiques directement à partir de la surface de la biopuce est utilisée pour évaluer les analytes retenus pendant l'expérience SPR. Adopté de [156]. 75
- Figure II-15: Vue microscopique des dépôts d'anticorps (récepteurs) formant un « microarray ». (A) Agrandissement 60 \times ; (B) Agrandissement 200 \times . La distance entre les dépôts est de 200 μ m; diamètre du site = 135 μ m. (C) Puce présentant une disposition au format matriciel (format array) d'anticorps après injection de plasma et retrait du biocapteur. Le tampon cristallisé indique les limites des cellules fluidiques actives. (D) L'empreinte des cellules fluidiques vides à côté des deux cellules fluidiques actives suggère qu'il y a 50 plots d'anticorps dans les limites de chaque cellule fluide (la surface est ~ 1 mm²). Adopté de [184]. 76
- Figure II-16: Analyse par spectrométrie de masse couplée à la résonance plasmonique de surface localisée (LSPR-MS). La figure montre en (A) un protocole expérimental schématique pour la liaison des ADDLs et le dépôt une couche d'acide sinapinique comme matrice pour l'analyse MALDI MS; et en (B) la détection en temps réel des ADDL se liant aux nanoprismes fonctionnalisés octanethiol/11-MUA par LSPR et le résultat de la MS montrant les monomères des ADDLs oxydés et normales isolés liés aux nanoprismes (adopté de [192]). 78
- Figure II-17: Photographies annotées de l'appareil SAWN. L'encadré montre le plumeau généré par la nébulisation SAWN pendant la chromatographie liquide. Adopté de [197]. 80
- Figure II-18: Présentation schématique de l'analyse de complexes protéiques assemblés et isolés sur un biocapteur par interférométrie de biocouche (biolayer interferometry) en utilisant microscopie électronique et MS. Adopté de [200]. 80

Figure II-19: Présentation schématique du dispositif expérimental de l'interface CE-UV/MALDI-MS comprenant la détection UV déportée et le système de distribution de la matrice intégré. Adopté de [213].	81
Figure II-20: Configuration schématique d'un biocapteur montrant les éléments de biorecognition, d'interface et de transduction. Adopté de [219].	82
Figure II-21: Structure typique d'une molécule d'IgG. La molécule d'anticorps (~150 kDa) est constituée de quatre chaînes peptidiques contenant deux chaînes lourdes de classe identique d'environ 50 kDa et deux chaînes légères identiques d'environ 25 kDa. Le tétramère résultant a deux moitiés identiques, chacune contenant un site identique reconnaissant l'antigène.	84
Figure II-22: Représentation schématique des anticorps conventionnels (humains) et de camélidés, ainsi que de leurs fragments disponibles.	86
Figure II-23: Représentation schématique du processus de sélection in vitro des aptamères par SELEX. Adopté de [248].	91
Figure II-24: Représentation schématique du processus de sélection non-SELEX des aptamères par NECEEM - partitionnement. Adopté de [248].	92
Figure III-1: Illustration des différentes étapes de l'expérience de couplage SPRi-MS	103
Figure III-2: Photo de la biopuce montée sur le prisme en verre avec la matrice MALDI déposée après l'expérience SPRi sur les sites où les récepteurs ont été immobilisés.	104
Figure III-3: Représentation schématique de l'expérience SPRi (A). Sensorgrams typique pendant l'expérience SPRi (B).	106
Figure III-4: Photo de la plaque cible MALDI avec les biopuces montées.	107
Figure IV-1: Les différentes protéines testées.	112
Figure IV-2: (A) sensorgrammes SPRi obtenus suite à différentes injections de solutions commerciales de β -lactoglobuline et d'ovalbumine à des concentrations croissantes dans le tampon courant d'acétate d'ammonium 10 mM pH 7,5. (B) Image de différence observée avec le logiciel SPRi pendant l'injection des protéines.	114
Figure IV-3: Résultats de l'imagerie MALDI-TOF MS obtenus après l'expérience SPRi dans un tampon d'acétate de 10 mM, directement à partir de la surface de la biopuce au format microarray d'anticorps anti β -lactoglobuline immobilisée sur la chimie PEO-NHS. Spectres de masse typiques obtenus à partir (A) des ROIs d'anticorps anti β -lactoglobuline et (B) des ROIs de contrôle négatif et positif, en mode linéaire positif en utilisant la matrice HABA. Chaque spectre de masse est la moyenne des spectres de masse obtenus à partir du ROI. (C) Photo de la surface de la biopuce avec superposition des résultats MS. Filtre de masse de couleur rouge appliqué afin de montrer la distribution des ions sur les ROIs analysés (numérotés et délimités par une ligne pointillée).	117
Figure IV-4: P Photo du processus de nébulisation d'une solution de matrice MALDI réalisée avec une source DESI convertie en sprayeur (tension désactivée). La distance appropriée entre la sortie du capillaire et la biopuce est choisie au début de la nébulisation (~2 mm) et reste constante tout au long du processus. La biopuce est fixée sur un support qui est déplacé manuellement selon des axes x-y pour obtenir une couverture homogène de matrice; le	

- processus est contrôlé en observant l'image produite par une caméra. L'objectif de la caméra est centré pour visualiser simultanément le capillaire de spray et la surface de la biopuce afin de contrôler le dépôt de la matrice en temps réel. 118
- Figure IV-5: Résultats de l'imagerie MALDI-TOF MS obtenus après nébulisation de la matrice sur les sites contenant un mélange de calibrants (mélange BSA/myoglobine) déposés sur la biopuce fonctionnalisée avec la chimie PEO-NHS. (A) Spectres de masse moyennés obtenus à partir des ROIs indiqués. (B) La photo de la surface de la biopuce avec les filtres de masse de couleur rouge et magenta montre la distribution des ions issus de la myoglobine sur les ROIs analysés (numérotés et délimités par une ligne pointillée). ROI #3 présente une certaine coloration sur le côté gauche, malgré l'absence de dépôt et de détection de protéines. Cet effet est causé par une couverture de matrice hétérogène, qui se traduit par un niveau de bruit élevé générant un résultat "faux-positif". Une photo miniature de la biopuce après l'application de la matrice avant l'analyse MALDI-TOF est également représentée en bas à droite entourée d'un cadre blanc. 120
- Figure IV-6: Sensorgrammes SPRi obtenus lors de l'injection de 150 μ L de β - lactoglobuline à 10 μ g/mL dans le tampon de course (A) à partir de la biopuce ordinaire et (B) à partir de la biopuce avec des ROIs délimités par ablation laser. L'image de la cellule SPRi et l'image de différence correspondante sont représentées sous les sensorgrammes, ces images ont été obtenues par SPRi lors de l'étape de dissociation. (C) Photo de la biopuce avec localisation des sites (ROIs) délimités et image zoomée de la partie de la puce SPRi obtenue par la caméra de cellule SPRi. (D) Deux géométries de spots sont représentées (photo après ablation laser, grossissement $\times 12,5$). La photo miniature de la biopuce après dépôt manuel de la matrice se trouve en bas à droite. 122
- Figure V-1: Sensorgrammes SPRi obtenus suite à différentes injections de solutions commerciales purifiées de β -lactoglobuline et d'ovalbumine de concentrations croissantes dans un tampon de course d'acétate d'ammonium 10 mM, pH 7,5, sans soustraction du signal obtenu à partir de la surface passivée (courbe solide bleu foncé). 126
- Figure V-2: Structures moléculaires de (A) la prothrombine humaine (4NZQ) et (B) l' α -thrombine humaine (1HAI). (C) Structure de la thrombine superposée à une représentation de la surface électrostatique, où l'emplacement de liaison du sodium et deux sites de surface, appelées exosite I et exosite II, sont surlignés en jaune. 130
- Figure V-3: Représentation schématique des aptamères anti thrombine (A) HD22 et (B) HD1. Structures moléculaires de la (C) thrombine (3U69) et des complexes thrombine-aptamère avec (D) HD22 (4I7Y) et (E) HD1 (4DIH). Les aptamères ADN sont mis en évidence en bleu, la molécule de thrombine est grise. 131
- Figure V-4: Sensorgrammes SPRi obtenus à partir de microarray d'aptamère HD1 5'-T5 suite à des injections de solutions commerciales de prothrombine et de thrombine à des concentrations de 1 μ g/mL dans un tampon de course PBS (sans sels divalents). HD1 5'-T5 immobilisé dans les tampons de course TE et PBS correspondent respectivement aux courbes bleu foncé et bleu claire, le contrôle négatif et la surface passivée correspondent respectivement aux courbes rouge et noire. 134
- Figure V-5: Sensorgrammes SPRi obtenus à partir de microarray d'aptamère HD22 5'-T15 suite à des injections de solutions commerciales purifiées de prothrombine et de thrombine à des concentrations de 1 μ g/mL dans le tampon de course PBS (sans sels divalents). HD22 5'-

- T15 immobilisé à partir de solutions dans les tampons de course TE et PBS correspondent respectivement aux courbes de couleur vert foncé et vert claire, le contrôle négatif et la surface passivée sont respectivement de couleur rouge et noire. 135
- Figure V-6: Histogramme montrant la densité de surface moyenne des protéines retenues sur les sites d'aptamère anti thrombine (diluées dans du tampon TE) lors de l'injection de thrombine et de prothrombine dans du tampon de course PBS sans MgCl₂ et CaCl₂. Les barres bleues correspondent à l'injection de thrombine 1 µg/mL et les barres orange à l'injection de prothrombine 10 µg/mL. L'encadré montre un zoom sur la quantité moyenne de protéines retenues pour toutes les concentrations d'immobilisation des récepteurs HD1 5'-T5 et HD22 5'-T15. 136
- Figure V-7: Sensorgrammes SPRi obtenus à partir de microarray d'aptamère HD1 5'-T5 suite à des injections de solutions de prothrombine (A) et de thrombine (B) à des concentrations respectives de 1 µg/mL et 0,5 µg/mL dans un tampon de course PBS (sans sels divalents). La réponse de HD1 5'-T5 immobilisée en TE sans aucun traitement est illustrée en bleu foncé, la réponse de HD1 5'-T5 immobilisée après dénaturation et repliement en TE est illustrée en bleu clair, le contrôle négatif et la surface passivée correspondent respectivement aux courbes rouge et noire. L'image de différence de la cellule SPRi pendant chaque injection est présentée en haut de chaque sensorgramme. (C) L'encadré montre l'histogramme de la quantité moyenne de thrombine capturée par affinité sur les sites d'aptamères HD1 5'-T5 après une injection de 0,5 µg/mL de thrombine..... 137
- Figure V-8: Sensorgrammes SPRi obtenus à partir de microarray d'aptamère HD22 5'-T15 suite à des injections de prothrombine (A) et de thrombine (B) à des concentrations respectives de 1 µg/mL et 0,5 µg/mL dans le tampon de course PBS (sans sels divalents). La réponse de HD22 5'-T15 immobilisé en TE sans aucun traitement est illustrée en vert foncé, HD22 5'-T15 immobilisé après dénaturation et repliement en TE est illustré en vert clair, le contrôle négatif et la surface passivée correspondent respectivement aux courbes rouge et noire. L'image de différence de la cellule SPRi pendant chaque injection est présentée en haut de chaque sensorgramme. (C) L'encadré montre l'histogramme de la quantité moyenne de thrombine capturée par affinité sur les sites d'aptamères HD22 5'-T15 après une injection de 0,5 µg/mL de thrombine..... 138
- Figure V-9: Sensorgrammes SPRi obtenus à partir de microarray d'aptamères anti thrombine suite à des injections de solutions de thrombine à une concentration de 1 µg/mL dans le tampon de course PBS (sans CaCl₂ et MgCl₂). La figure contient deux parties correspondant à 2 injections consécutives de thrombine, sans régénération de surface entre les deux. L'impact de l'orientation de l'immobilisation des aptamères a été étudié: HD1 5'-T10 est représenté en bleu foncé et HD1 3'-T10 en bleu clair, le contrôle négatif et la surface passivée sont respectivement des courbes marron et noire. 139
- Figure V-10: Histogramme de la quantité moyenne de ligand capturé par affinité sur les sites des aptamères HD1 5'-T5 et HD1 5'-T10 après l'injection de 1 µg/mL de thrombine (barres bleues) et de prothrombine (barres orange) dans le tampon de course PBS sans CaCl₂ et MgCl₂. 140
- Figure V-11: (A) Sensorgrammes SPRi obtenus à partir de microarray d'aptamères anti thrombine suite à des injections de solutions de thrombine à une concentration de 1 µg/mL dans le tampon de course PBS (sans CaCl₂ et MgCl₂). L'impact de la longueur du T-linker des

- aptamères HD22 a été étudié: HD22 5'-T10 est représenté en vert foncé et HD22 5'-T15 en vert clair. (B) Histogramme de la quantité moyenne du ligand capturé par affinité sur les sites des aptamères HD22 5'-T15 et HD22 5'-T10 après 1 injection de 1 µg/mL de thrombine (barres bleues) et de prothrombine (barres orange) dans le tampon de course PBS sans CaCl₂ et MgCl₂. Les expériences ont été réalisées sur différentes biopuces..... 141
- Figure V-12: Représentation schématique de HD1-22, l'aptadimère bivalent de fusion anti thrombine. (A) Structure moléculaire du complexe aptamère-thrombine-aptamère avec HD1 en rouge, HD22 en jaune (5EW2). (B) Aptamère HD1-22 avec le linker interne T15 représenté autour de la molécule de thrombine (3U69). 144
- Figure V-13: (A) Sensorgrammes SPRi obtenus à partir d'un microarray d'aptamères anti thrombine suite à des injections de thrombine en solution à différentes concentrations dans un tampon de course PBS sans sels divalents. HD22 5'-T10 est représenté en vert, HD1 3'-T10 en bleu et HD1-22 5'-T10 aptamère bivalent fusionné immobilisé à 10 et 20 µM concentration en couleurs magenta et violette respectivement. (B) Images différence de la cellule SPRi obtenues lors de chaque injection de thrombine..... 145
- Figure V-14: Sensorgrammes SPRi obtenus à partir d'un microarray d'aptamères anti thrombine suite à des injections de solution de prothrombine commerciale purifiée à différentes concentrations dans un tampon de course PBS sans sels divalents. HD22 5'-T10 est représenté en vert, HD1 3'-T10 en bleu et HD122 5'-T10 aptamère bivalent fusionné immobilisé à 10 et 20 µM concentration en couleurs magenta et violette respectivement. 146
- Figure V-15: Résultats MSi MALDI-TOF obtenus après l'expérience SPRi (tampon de course PBS, sans sels divalents) directement à partir de la surface de microarray d'aptamères anti thrombine immobilisés sur la chimie PEO-NHS. (A) Spectre de masse typique obtenu à partir de sites HD1 5'-T5 et (B) spectre de masse typique obtenu à partir de sites HD1 3'-T10. Chaque spectre de masse représenté est la moyenne des spectres de masse obtenus à partir de la ROI. 148
- Figure V-16: Résultats MSi MALDI-TOF obtenus après l'expérience SPRi (tampon de course PBS, sans sels divalents) directement à partir de la surface de microarray des aptamères anti thrombine immobilisés sur une SAM PEO-NHS. (A) Spectre de masse typique obtenu à partir de sites HD1 5'-T10 et (B) spectre de masse typique obtenu à partir de sites TC (contrôle négatif). Chaque spectre de masse représenté est la moyenne des spectres de masse obtenus à partir de la ROI..... 148
- Figure V-17: Résultats MSi MALDI-TOF obtenus après l'expérience SPRi (tampon de course PBS, sans sels divalents) directement à partir de la surface de la biopuce à microarray d'aptamères anti thrombine immobilisés sur une SAM PEO-NHS. (A) Spectre de masse typique obtenu à partir de sites d'aptamère HD1 5'-T5. Spectres de masse typiques obtenu à partir de sites d'aptamère HD22 5'-T10 (B) et HD22 5'-T15 (C). Chaque spectre de masse représenté est la moyenne des spectres de masse obtenus à partir de la ROI. 149
- Figure V-18: Résultats MSi MALDI-TOF obtenus après l'expérience SPRi dans un tampon de course PBS (sans sels divalents) directement à partir de la surface de microarray d'aptamères anti thrombine immobilisés sur une SAM PEO-NHS. (A) Photo typique de la surface de microarray avec un filtre de masse de couleur magenta appliqué afin de montrer la distribution des ions sur les ROIs analysés (numérotés et délimités par une ligne

- pointillée). (B) Représentation schématique de la position des sites des récepteurs sur la surface de microarray. HD1 5'-T5 et HD1 3'-T10 en bleu foncé et bleu clair respectivement. HD1 22'-T10 et HD1 22'-T15 en vert foncé et vert clair respectivement. Les cercles blancs non nommés correspondent à différentes régions de contrôle. 150
- Figure V-19: Résultats MSi MALDI-TOF obtenus après l'expérience SPRi (tampon de course PBS sans sels divalents) directement à la surface de microarray des aptamères anti thrombine immobilisés sur la SAM PEO-NHS. Spectres de masse typiques obtenus à partir de sites HD1-22 5'-T10 immobilisés et à une concentration de 10 μ M (A) et 20 μ M (B) respectivement. Chaque spectre de masse représenté est la moyenne des spectres de masse obtenus à partir de la ROI. 151
- Figure VI-1: Histogramme montrant la densité de surface moyenne de protéines retenues sur les sites d'anticorps anti β -lactoglobuline lors de l'injection de 100 μ g/mL de β -lactoglobuline dans différents tampons de course. Les barres bleues correspondent à l'immobilisation des récepteurs pendant 16 heures et les barres orange - pendant 2 heures. 155
- Figure VI-2: Résultats de MALDI-TOF MSi obtenus après l'expérience SPRi menée avec un tampon de course PBS (sans sels divalents) directement à partir de la surface de microarray mixte anticorps/aptamères anti β -lactoglobuline immobilisés sur la chimie PEO-NHS. (A) Photo de la surface entière de la biopuce avec délimitation des ROIs. (B) Photo de la surface du microarray avec les résultats MSi superposés. Filtre de masse de couleur magenta appliqué afin de montrer la distribution des ions sur les ROIs analysés. Spectres de masse typiques obtenus à partir de sites d'anticorps contre β -lactoglobuline (C et D) en mode linéaire positif en utilisant la matrice HABA. Chaque spectre de masse représenté est la moyenne des spectres de masse obtenus à partir de la ROI. 157
- Figure VI-3: Résultats MALDI-TOF MSi obtenus directement à partir de la surface de microarray mixte anticorps/ aptamères anti β -lactoglobuline immobilisés sur la chimie PEO-NHS après l'expérience SPRi menée avec un tampon de course PBS (sans sels divalents). (A) et (B) Spectres de masse typiques obtenus à partir des sites d'anticorps anti β -lactoglobuline. Le spectre de masse obtenu à partir d'un site anticorps anti β -lactoglobuline (en noir) est superposé avec un spectre de masse typique obtenu à partir (C) d'un site aptamère BLG-14 (en bleu) et (D) d'un site aptamère BLG-G (en vert). Chaque spectre de masse représenté est la moyenne de spectres de masse obtenus à partir d'une ROI. 158
- Figure VI-4: Résultats MALDI-TOF obtenus par MSi (A) et par interrogation manuelle de la surface (B) après l'expérience SPRi dans un tampon de course PBS (contenant 1 mM $MgCl_2$ et $CaCl_2$) directement à partir la surface de microarray mixte anticorps/aptamères anti β -lactoglobuline immobilisés sur la chimie PEO-NHS. Spectre de masse obtenu à partir des sites d'anticorps anti β -lactoglobuline, représenté en bleu foncé et des sites de la surface passivée représenté en vert. (C) Spectre de masse obtenu à partir de « hot-spots » de matrice (site d'anticorps anti β -lactoglobuline), montrant de multiples ions de la molécule cible. 160
- Figure VI-5: Sensorgrammes SPRi des interactions des d'anticorps contre la thrombine (A) et des aptamères HD22 5'-T10 (B), HD1 3'-T10' (C), HD1 5'-T5 (D) avec des concentrations croissantes de thrombine injectée dans le tampon de course PBS sans $MgCl_2$ et $CaCl_2$. La légende colorée sur le côté droit de chaque ensemble de courbes indique la concentration de la protéine injectée. 163

- Figure VI-6: Histogramme montrant la densité de surface moyenne de la thrombine retenue par affinité sur les sites de différents récepteurs lors d'injections de thrombine de concentrations croissantes pendant l'expérience SPRi dans le tampon de course PBS sans MgCl₂ et CaCl₂. 164
- Figure VI-7: Sensorgrammes SPRi des interactions des aptamère HD1 3'-T10' (A) et HD1 5'-T5 (B) avec des concentrations croissantes de prothrombine injectée dans le tampon de course PBS sans MgCl₂ et CaCl₂. Une légende colorée sur le côté droit de chaque sensorgramme indique la concentration de la protéine injectée. 165
- Figure VI-8: Histogramme montrant la densité de surface moyenne de la prothrombine retenue par affinité sur les sites de différents récepteurs, lors d'injections de prothrombine de concentrations croissantes pendant l'expérience SPRi dans le tampon de course PBS sans MgCl₂ et CaCl₂. 166
- Figure VI-9: Sensorgrammes SPRi obtenus à partir (A) d'anticorps et à partir des aptamères (B) HD22 5'-T10, (C) HD1 3'-T10, (D) HD1 5'-T10 (courbes solides) vs HD1 5'-T5 (courbes pointillés) dirigés contre la thrombine lors d'injections de thrombine à des concentrations croissantes dans le tampon de course PBS avec (courbes solides) et sans (courbes pointillés) 1 mM MgCl₂ et CaCl₂. Des expériences dans différents tampons de course ont été réalisées sur des biopuces séparées. 167
- Figure VI-10: Histogramme montrant la densité de surface moyenne de la thrombine retenue par affinité sur les sites de différents récepteurs après des injections de thrombine de concentrations croissantes pendant l'expérience SPRi avec le tampon de course PBS en présence de 1 mM MgCl₂ et CaCl₂ (barres dans les tons oranges) et avec un tampon de course PBS sans MgCl₂ et CaCl₂ (barres dans les tons bleus). En général, plus la couleur des barres est claire, plus la concentration du ligand injecté est faible. L'encadré en haut à droite est une image zoomée de l'histogramme montrant les interactions non spécifiques entre la thrombine et l'aptamère TC (contrôle négatif). 170
- Figure VI-11: Sensorgrammes SPRi des interactions des aptamères HD1 3'-T10 (A), HD1 5'-T10 (B, courbes pleines) et HD1 5'-T5 (B, courbes en pointillés) avec des concentrations croissantes de prothrombine injectée dans du PBS contenant 1 mM de MgCl₂ et CaCl₂ (courbes pleines) et dans le tampon de course PBS sans MgCl₂ et CaCl₂ (courbes en pointillés). La comparaison de l'interaction entre HD1 5' et la prothrombine a été réalisée en utilisant des aptamères avec des longueurs de linker différentes (T10 et T5), car ni l'aptamère avec T5, ni celui avec T10 n'étaient fonctionnels dans les deux tampons PBS. Les expériences dans différents tampons de course ont été réalisées sur des biopuces séparées. 172
- Figure VI-12: Histogramme montrant la densité de surface moyenne de prothrombine retenue par affinité sur les sites des aptamères HD1 3'-T10 (barres bleu claire) et HD1 5'-T10 (barres bleu foncé) lors des injections de concentrations croissantes de la prothrombine pendant l'expérience SPRi dans le tampon de course PBS avec 1 mM MgCl₂ et CaCl₂. 172
- Figure VI-13 Sensorgrammes SPRi des interactions entre les aptamères HD1 3'-T10, HD1 5'-T10, HD22 5'-T10, l'anticorps anti thrombine et la BSA purifiée injectée à 100 nM (A) et 1 µM (B) dans du tampon de course PBS contenant 1 mM de MgCl₂ et de CaCl₂. (C) Injection de BSA dans le tampon de course utilisé pour passiver la surface au tout début de l'expérience SPRi. 174

- Figure VI-14: Sensorgrammes SPRi obtenus à partir d'anticorps anti thrombine (A, courbes rouges) et des aptamères HD22 5'-T10 (B, courbes verts), HD1 3'-T10' (C, courbes bleu claire), HD1 5'-T10 (D, bleu foncé) après des injections de concentrations croissantes de 100 nM à 1 µM de BSA dopées avec de la thrombine (Thr) de 2,7 nM et 13,5 nM dans le tampon de course PBS en présence de 1 mM MgCl₂ et CaCl₂. Des ensembles de courbes expérimentales pour chaque concentration de thrombine co-injectée avec la BSA sont séparés par des accolades; la thrombine pure injectée sans BSA est représentée en magenta (courbes solides). Les interactions des aptamères HD1 avec la thrombine 13,5 nM en présence de BSA ont démontré une augmentation significative du niveau de variation de la réflectivité, ainsi la position des ensembles de sensorgrammes par rapport à l'injection de même concentration de thrombine pure est indiquée par des flèches. 175
- Figure VI-15: Histogramme montrant la densité de surface moyenne de ligand retenu par affinité sur les différents récepteurs de la thrombine après des injections de concentrations croissantes de BSA de 100 nM à 1 µM, dopées avec de la thrombine (Thr) de 2,7 nM et 13,5 nM, dans le tampon de course PBS en présence de MgCl₂ et CaCl₂ (1 mM). Les résultats pour les solutions de BSA dopées avec 2,7 nM Thr (barres dans les tons de bleu) et pour les solutions dopées avec 13,5 nM Thr (barres dans les tons d'orange) sont représentés à côté des résultats pour l'injection de 2,7 nM Thr pure (barres rouges) et de 13,5 nM Thr pure (barres magenta). En général, plus la couleur des barres est foncée, plus la concentration de BSA injectée est importante. 177
- Figure VI-16: Résultats de l'imagerie MALDI-TOF MS obtenus directement à partir de la surface des microarrays conçus pour la détection de la thrombine (chimie PEO-NHS) après une expérience SPRi réalisée avec comme tampon de course PBS sans MgCl₂ et CaCl₂. Un filtre de masse de couleur magenta a été appliqué afin de montrer la distribution des ions sur les ROI analysées (numérotées et délimitées par une ligne pointillée). Les spectres de masse (A) et (B) correspondant aux sites d'anticorps de thrombine #13 et #06 respectivement. Chaque spectre de masse représenté est la moyenne des spectres de masse obtenus à partir de ROI indiqué. 178
- Figure VI-17: Résultats de l'analyse par MALDI-TOF MS obtenus après l'expérience SPRi dans un tampon de course PBS avec 1 mM MgCl₂ et CaCl₂ directement à partir de la surface des microarrays pour la détection de thrombine (chimie PEO-NHS). (A) Spectre de masse typique obtenu à partir des sites d'aptamère HD22 5'-T10 après injection de thrombine 13,5 nM pure dans le tampon de course. (B) Spectre de masse typique obtenu à partir des sites d'aptamère HD1 3'-T10 suite à l'injection de thrombine 13,5 nM co-injectée avec 1000 nM de BSA. 179
- Figure VII-1: (A) Immobilisation d'anticorps de camélidés à domaine unique (R3VQ-SH) sur toute la surface de la biopuce, les flèches rouges indiquant les bords de la zone couverte de liquide et la différence entre la surface d'or fonctionnalisée par R3VQ-SH et la zone non fonctionnalisée. (B) sensorgrammes SPRi obtenus après injection de 150 µl de peptide β - amyloïde commercial purifié à 100 µg/ml (Aβ 1-40). Les courbes ont été obtenues à partir de sites de même taille et de même type, seul l'emplacement des sites était différent. ... 184
- Figure VII-2: Résultats de MALDI-TOF MSi obtenus suite à une expérience SPRi menée avec un tampon d'acétate d'ammonium directement à partir de la surface de la biopuce uniformément fonctionnalisée avec des nanocorps R3VQ-SH dirigés contre le peptide

amyloïde (sans la chimie PEO-NHS). (A) Photo de la surface de la biopuce superposée avec la répartition des ions sur les ROIs analysés (numérotés et délimités par une ligne pointillée). (B) Spectre de masse correspondant à la moyenne des spectres de masse obtenus à partir du ROI #03 indiqué. C'est un spectre de masse typique obtenu pour chaque ROI de couleur magenta. Tous les autres ROI (A, sites jeune-marrons aux coins de la photo de la biopuce) correspondent à des sites de contrôle à partir desquels aucun ion n'a été détecté (spectres de masse correspondants non présentés)..... 185

Figure VII-3: A gauche (A), photo de la surface de la biopuce superposée à la carte des ROIs sélectionnés (cercles verts – sites des récepteurs nanocorps R3VQ-SH greffés sur la surface de la biopuce et cercles rouges - sites contrôle). Les sites plus lumineux sur la photo de la surface correspondent à des nanocorps immobilisés dans une solution mère et les sites plus foncés - à des sites contenant en plus 5 % de glycérol. (B) Sensorgrammes SPRi obtenus après injection de 150 μ L d'une solution de L-Cystéine (1 mM) dans le tampon de course, suivie d'une régénération avec 0,1 M de glycine-HCl pH 2,0. (C) Deux images de différence sont représentées, l'une après injection de L-Cystéine et l'autre après régénération par de la glycine. Ces images ont été obtenues par le système SPRi lors de l'étape de dissociation après chaque injection, reflétant ainsi l'accumulation de masse (zones et ROIs lumineux) ou l'élimination de masse à partir de la surface du capteur. 186

Figure VII-4: (A) SPRi sensorgrammes obtenus lors de l'injection de 150 μ L 1 μ g/mL de peptide amyloïde- β ($A\beta$ 1-40) dans le tampon de course suivie d'une régénération par 0,1 M glycine-HCl, pH 2,0. (B) Les images de la cellule de flux et les images de différence sont représentées sous les injection correspondantes. Ces images ont été obtenues par le système SPRi lors de l'étape de dissociation de chaque injection, les images de différence reflètent donc l'accumulation de masse (zones lumineux) à la surface du biopuce. Les bandes lumineuses apparaissant après la régénération sont probablement dues à une liaison non spécifique d'amyloïde à la surface. 187

Figure VII-5: (A) sensorgrammes SPRi obtenus avec l'injection de 150 μ L de peptide amyloïde- β ($A\beta$ 1-40) à 10 μ g/mL dans un tampon de course d'acétate d'ammonium, suivie d'une régénération par 0,1 M de glycine-HCl, pH 2,0. (B) sensorgrammes SPRi obtenus lors de l'injection de 150 μ L de $A\beta$ 1-40 à 1 μ g/mL et 10 μ g/mL dans le tampon de course. (C) L'image de la cellule de flux et l'image de différence obtenues par le système SPRi lors de l'étape de dissociation avec l'injection de 0,1 M glycine-HCl, pH 2,0. L'image de différence reflètent donc l'accumulation de masse (zones lumineux) à la surface du biopuce. Les bandes lumineuses apparaissant après la régénération sont probablement dues à une liaison non spécifique de la protéine amyloïde avec la surface. 188

Figure VII-6: À gauche (A), la photo de la surface de la biopuce superposée à la carte des ROIs sélectionnés. (B) SPRi sensorgrammes obtenus lors de l'injection 150 μ L 10 μ g/mL de peptide amyloïde- β ($A\beta$ 1-40) dans le tampon de course PBS sans $MgCl_2$ et $CaCl_2$, suivie d'une régénération par 0,1 M glycine-HCl, pH 2,0. (C) Les images de la cellule de flux et de la différence sont représentées sous l'injection correspondante. Ces images ont été obtenues par le système SPRi lors de l'étape de dissociation de chaque injection, reflétant ainsi l'accumulation de masse (zones lumineux) ou l'élimination de masse de la surface du capteur. Les bandes lumineuses apparaissant après la régénération sont probablement dues à une liaison non spécifique d'amyloïde à la surface. 190

Liste des tableaux

Tableau I-1: Définitions des constantes d'association et de taux de dissociation [10].	29
Tableau I-2: Définition de l'association d'équilibre et des constantes de dissociation [10].	29
Tableau II-1: Anticorps vs Aptamères	93
Tableau III-1: Liste des produits chimiques utilisés.	97
Tableau III-2: Liste des protéines et peptides utilisés.	99
Tableau III-3: Liste des anticorps et nanocorps utilisés.	100
Tableau III-4: Liste des récepteurs de l'ADNs (aptamères) utilisés.	101

Abréviations

ACE	Électrophorèse capillaire d'affinité
ADDL	Amyloïde- β -dérivé, ligand diffusible
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
BSA	Albumine de sérum bovin
CCD	Dispositif à couplage de charge
CD	Dichroïsme circulaire
CE	Electrophorèse capillaire
CH	Région constante de chaîne lourde d'anticorps
CID	Dissociation induite par la collision
CL	Région constante de chaîne légère d'anticorps
CM	Dextran carboxyméthylé
DCC	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide
DESI	Source d'ionisation par électrospray de désorption
DMPC	Dimyristoylphosphatidylcholine
DMSO	Sulphoxyde de diméthyle
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholine
ELISA	Essai immunologique lié à une enzyme
EOF	Flux électroosmotique
ESI	Ionisation par électrospray
Fab	Domaine de liaison à l'antigène, fragment d'anticorps monovalent
Fc	Domaine constant d'anticorps
FDA	Administration américaine des denrées alimentaires et des médicaments
FP	Protéines fluorescentes
FPOP	Oxydation photochimique rapide des protéines
FRET	Transfert d'énergie par résonance de Förster
GFP	Protéine fluorescente verte
H	Boucle très variable d'anticorps à domaine unique
HABA	Acide 2-(4-hydroxyphénylazo)-benzoïque
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
HSA	Sérum albumine humaine
IgG	Immunoglobulines G
IM	Mobilité des ions
IMAC	Capture d'affinité métallique immobilisée
IR	Infrarouge
IRRAS	Spectroscopie infrarouge de réflexion-absorption
IS	Source d'ions

ITC	Calorimétrie par titrage isotherme
kDa	Kilo Dalton
LC	Chromatographie liquide
LED	Diode électroluminescente
LOD	Limite de détection
LSPR	Résonance plasmonique de surface localisée
MAcs	Anticorps monoclonaux
MALDI	Désorption/ionisation laser assistée par matrice
MS	Spectrométrie de masse
MUA	Acide mercaptoundécanoïque
MW	Poids moléculaire
NECEEM	Electrophorèse capillaire en non-équilibre de mélanges en équilibre
NMR	Résonance magnétique nucléaire
NSET	Transfert d'énergie de surface des nanomatériaux
OEG	Oligo(éthylène glycol)
PBS	Solution saline tamponnée au phosphate
PCR	Réaction en chaîne de la polymérase
PEG	Poly(éthylène glycol)
PEI	Poly(éthylénimine)
PEO	Poly(oxyde d'éthylène) / poly(oxyéthylène)
POPC	Palmitoyl-oleoylphosphatidylcholine
PPC	Calorimétrie des perturbations de pression
R3VQ-SH	Anticorps de camélidé contre β -amyloïde (nanobodies / nanocorps)
RET	Transfert d'énergie de résonance
RIU	Indice de réfraction
ROI	Région d'intérêt
RT	Transcriptase inverse
SA	Acide sinapique
SAM	Monocouche auto-assemblée
SAW	Onde acoustique de surface
SAWN	Nébulisation des ondes acoustiques de surface
scFv	Fragment variable à chaîne unique d'anticorps
sdAbs	Anticorps à domaine unique, nanobodies / nanocorps
SELDI	Désorption/ionisation laser à surface améliorée
SELEX	Évolution systémique des ligands
SERS	Spectroscopie Raman améliorée en surface
SOMAmers	Aptamères modifiés à faible vitesse
SP	Plasmon de surface
SPR	Résonance plasmonique de surface
SPRi	Imagerie par résonance plasmonique de surface

STD	Saturation-transfert de différence
TBA	Aptamère liant la thrombine
TC	Aptamère de contrôle pour la thrombine
TCEP	Tris (2-carboxyéthyl) phosphine
TE	Tris-EDTA
TFA	Acide trifluoroacétique
TIR	Réflexion interne totale
TOF	Temps de vol
UV	Ultraviolet
VCD	Dichroïsme circulaire vibratoire
VH	Région variable de chaîne lourde d'anticorps
VHH	Anticorps à domaine unique, homologue au domaine VH de l'anticorps
VL	Région variable de chaîne légère d'anticorps
XPS	Spectroscopie photoélectronique à rayons X

Introduction générale

Les interactions biomoléculaires sont au cœur du fonctionnement de tous les systèmes vivants. Ces interactions interviennent entre des molécules de nature identique ou différente: des protéines, des glycanes, des lipides, ou encore des acides nucléiques sont impliquées dans des processus de reconnaissance moléculaire. Elles sont responsables de la formation et de l'organisation d'assemblages complexes, qui jouent un rôle essentiel dans de nombreux de processus, tels que la défense immunitaire avec les complexes anticorps-antigène (protéine-protéine), la biosynthèse des protéines avec les ribosomes (protéine-acide nucléique)... L'étude et la compréhension des interactions biomoléculaires revêtent donc une grande importance, tant sur le plan fondamental, qu'appliqué.

Parmi les différentes méthodes d'analyse des interactions moléculaires, figure la résonance plasmonique de surface, la spectrométrie de masse et leur couplage SPR-MS. La technique SPR permet l'analyse cinétique et thermodynamique en temps réel d'interactions biomoléculaires, mais ne permet pas l'identification précise des partenaires d'interactions, ce qui devient possible en couplant la technique SPR et la MS. En effet, la MS est une technique puissante, développée pour la caractérisation et l'identification structurale de différentes molécules et, éventuellement, de complexes moléculaires. Le couplage SPR-MS offre les avantages d'une analyse multidimensionnelle, qui intéresse à la fois le domaine de la recherche fondamentale (sciences omiques: métabolomique, génomique, protéomique, etc.) et celui plus appliqué du secteur biomédical (découverte de biomarqueurs, cible pharmaceutique, etc.). Les couplages SPR-MS reposent généralement sur l'élution/récupération des ligands capturés par SPR, ce qui nécessite des étapes supplémentaires, coûteuses en temps et en main-d'œuvre, et source de perte de matériels. Pour surmonter ces limitations, la détection MS du ligand peut être pratiquée directement à partir de la surface du capteur. C'est cette configuration qui a été retenue pour les études du couplage SPR menées au cours de cette thèse.

Le couplage SPR par imagerie avec la spectrométrie de masse (SPRi-MS) que nous avons cherché mieux comprendre et à développer offre la possibilité d'une analyse multiplexée grâce à la conception de biopuces au format array et interfaçables avec les deux analyseurs SPRi et MS. Cependant l'essor de ce couplage est actuellement freiné par le manque de sensibilité lors de la détection MS. Cette sensibilité est conditionnée, entre autres, par la fonctionnalisation chimique de la surface de la biopuce, par la nature des récepteurs et leur topologie de greffage sur la surface fonctionnalisée.

L'objectif de cette thèse a été d'une part d'exploiter de nouveaux récepteurs greffés, autres que les anticorps utilisés jusqu'ici, et d'autre part d'en évaluer l'impact sur la sensibilité de détection. La spécificité et l'affinité des biopuces utilisées pour le couplage SPR-MS sont habituellement conférées par le greffage d'anticorps dont la taille importante et l'orientation aléatoire représentent également des facteurs limitants. Les limites de sensibilité pouvant trouver une origine dans la grande taille des anticorps actuellement utilisés, l'un des objectifs de la thèse a été d'exploiter le potentiel de récepteurs alternatifs de moindre taille. C'est pourquoi les travaux

de thèse consisteront à immobiliser sur les biopuces fonctionnalisées (i) des aptamères considérés comme une alternative aux anticorps, (ii) des aptamères et des anticorps sur une même biopuce, (iii) de nouvelles constructions d'anticorps de taille réduite et monovalent issus de la découverte récente de gammaglobulines de camélidés aux propriétés inédites (nanobodies ou nanocorps). Cette démarche expérimentale sera complétée par la mise en œuvre d'un procédé d'imagerie par MS (MSi), pour un couplage SPRi-MSi, d'une tentative d'optimisation de l'organisation de la surface par micro-gravure laser en collaboration avec le Laboratoire d'Ingénierie des Surfaces et Lasers, du Service d'Études Analytiques et de Réactivité des Surfaces du CEA-Saclay.

Ce manuscrit se compose de sept chapitres.

Les deux premiers chapitres (**Chapitre I et Chapitre II**) décrivent les interactions biomoléculaires ainsi que les différentes techniques expérimentales utilisées pour leur caractérisation, et présentent l'état de l'art des plateformes de biodétection. Les récents progrès réalisés en SPR-MS, et la comparaison de ce couplage avec d'autres techniques de couplage, pour la quantification des interactions et l'identification des ligands sont également abordés.

Le **Chapitre III** rassemble les méthodes et techniques expérimentales qui ont été utilisées tout au long du projet de thèse. Ce chapitre comprend une liste exhaustive des produits chimiques, des réactifs, des protéines et des oligonucléotides utilisés durant ce travail. Une étude du vieillissement des surfaces des biopuces est également présentée.

Le **Chapitre IV** traite du protocole expérimental lié à la mise en œuvre du couplage SPRi-MS à partir de l'exemple de puces à anticorps. Dans le contexte de la création de plateformes à haut débit, un procédé d'imagerie par MS (MSi) en couplage SPRi-MSi permettant une semi-automatisation est également introduit. Enfin dans ce chapitre, de nouvelles géométries de surface de biopuces, afin de faciliter davantage l'analyse SPRi-MSi, et un système de nébulisation de matrice « fait maison » sont présentés.

Le **Chapitre V** présente pour la première fois, l'utilisation d'aptamères comme molécule réceptrice pour le couplage SPRi-MS. Le développement d'une plateforme « aptasensor » a été basé sur un couple modèle à base d'aptamères anti thrombine/thrombine. L'impact de divers paramètres expérimentaux, comme la nature de l'aptamère (séquence), l'orientation de l'immobilisation, le contenu du tampon SPRi, l'effet de la renaturation sur les performances des aptamères ont été étudiés. La possibilité de discriminer la thrombine de la prothrombine a été abordée.

Dans le **Chapitre VI**, une comparaison entre des anticorps et des aptamères pour le couplage SPRi-MS a été réalisée en exploitant des biopuces mixtes sur lesquelles sont greffés des récepteurs des deux types anticorps et aptamères. Les propriétés de spécificité, de sélectivité et les limites de détection ont été évaluées. L'influence des conditions expérimentales et la possibilité de capturer des ligands spécifiques dans des conditions réelles, modélisées par la co-injection d'un ligand non spécifique en excès (albumine), ont été évalués. La détection du ligand retenu par

MALDI-MS et la nécessité d'une procédure de prétraitement de la surface avant l'analyse de la MS ont été décrites.

Dans le dernier **Chapitre VII**, un nouveau type de récepteur est employé pour le couplage SPRi-MS: le nanocorps. La faisabilité des puces à nanocorps et les difficultés liées à son développement sont décrites dans cette partie.

Enfin, en conclusion générale, un bref examen des résultats et des difficultés rencontrées est présenté. Cette partie est complétée par un ensemble de solutions et de perspectives.

Chapter I. Interactions biomoléculaires et leurs méthodes de caractérisation

I-1 Interactions biomoléculaires

Le développement considérable des sciences « omique », comme la génomique, la transcriptomique, la protéomique ou la métabolomique, a entraîné d'énormes progrès dans les techniques utilisées dans ces domaines de recherche. L'objectif des sciences omiques est d'identifier, de caractériser et de quantifier toutes les molécules biologiques qui sont impliquées dans la structure, la fonction et la dynamique d'une cellule, d'un tissu ou d'un organisme [1]. Les interactions biomoléculaires, qui peuvent être généralement définies comme des contacts entre des macromolécules biologiques (protéine-protéine, protéine-acides nucléiques, etc.) et des interactions protéine-ligand, sont au cœur des sciences omiques. Elles sont responsables de processus fondamentaux concernant, par exemple, la réplication et le métabolisme cellulaire, la transduction de signaux et autres. L'étude des interactions macromoléculaires (comme les complexes protéine-protéine, ADN-ADN et protéine-ADN, etc.) est essentielle pour comprendre l'organisation globale et les interconnexions de la machinerie moléculaire d'un système aussi complexe que la cellule [2]. C'est pourquoi l'élucidation des interactions biomoléculaires est devenue le principal objectif de l'ère post-génomique.

Parmi les interactions citées ci-dessus, les interactions protéine-protéine sont probablement l'une des plus étudiées grâce à l'analyse protéomique. Les chercheurs construisent actuellement des réseaux entiers d'interactions protéine-protéine (Figure I-1). Elle fournit l'inventaire protéique d'une cellule ou d'un tissu à un moment donné, facilitant la découverte de nouveaux biomarqueurs, l'identification et la localisation des modifications post-traductionnelles et l'étude de diverses interactions [1].

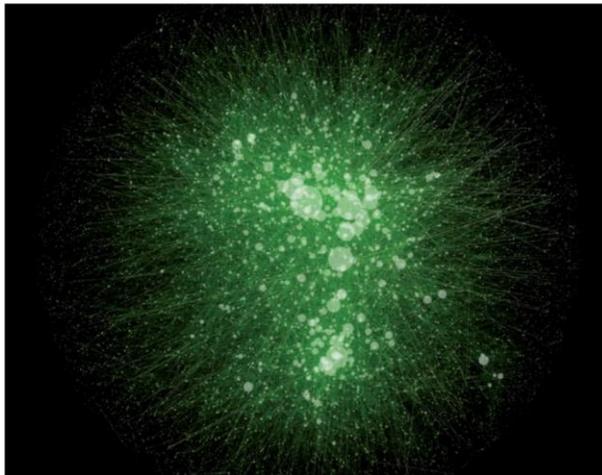


Figure I-1: L'interactome humain contient plus de 100 000 interactions protéiques, dont seules des fractions sont connues. Des réseaux d'interactions protéine-protéine devraient permettre de trouver des partenaires d'interaction pour une protéine (qui peuvent révéler sa fonction). Adopté de [2].

Les interactions ADN-ADN, ADN-protéines et ARN-protéines présentent également un grand intérêt pour les scientifiques en raison de leur rôle dans les processus de reproduction et de réplication, tels que le séquençage du génome, la régulation de l'expression des gènes, la coordination et la stabilisation des complexes protéiques, etc. [3].

L'analyse des interactions biomoléculaires est au centre de l'attention dans un large éventail de disciplines, de la biochimie/biotechnologie à la médecine. Étant donné qu'elles sont axées à la fois sur les sciences fondamentales et sur la recherche et le développement appliqué, l'ambition globale des études d'interaction va de l'acquisition d'une connaissance et d'une compréhension plus approfondie des systèmes et des fonctions biologiques à l'application et à l'utilisation des connaissances acquises dans la conception de produits pharmaceutiques, de biocapteurs et de technologies bio-inspirés dans le but de progresser dans divers domaines de la science et de la médecine, tels que la découverte de schémas de maladies, le développement de médicaments et la biotechnologie. Par exemple, grâce aux technologies de séquençage les plus récentes, l'acquisition de données à l'échelle du génome n'a jamais été aussi facile, ce qui élargit notre capacité à analyser et à comprendre des génomes entiers et réduit l'écart existant entre le génotype et le phénotype [1]. Cependant, le séquençage et les manipulations du génome ne sont pas les seuls objectifs visés. Les interactions ADN-ADN et ADN-protéines ont également été exploitées avec succès pour la recherche de biomarqueurs, les résultats les plus récents ont été obtenus avec des aptamères de l'ADN utilisés pour la découverte de biomarqueurs du cancer, la détection de diverses maladies, etc. [4]–[6].

I-1.1 Différents types de liaisons impliquées dans les interactions biomoléculaires

Les liaisons les plus fortes au sein des biomolécules sont les liaisons *covalentes*, qui maintiennent les atomes ensemble. Une liaison covalente carbone-carbone (C-C) typique a une longueur de liaison de 1,54 Å et une énergie de liaison de 85 kcal mol⁻¹ (356 kJ mol⁻¹). Les liaisons covalentes à composants multiples, comme la double liaison carbone-oxygène (C=O), sont encore plus fortes que les liaisons simples C-C, avec des énergies proches de 175 kcal mol⁻¹ (732 kJ mol⁻¹). Habituellement, les liaisons covalentes sont rompues et formées au cours de réactions chimiques. À la différence de ces liaisons fortes, les *liaisons non covalentes* (faibles et facilement cassables) jouent un rôle clé dans le fonctionnement des organismes vivants.

Diverses liaisons réversibles non covalentes sont essentielles pour maintenir la structure des protéines, le processus de réplication de l'ADN, la transduction et la détection des signaux moléculaires, ainsi que pour la reconnaissance précise des ligands-récepteurs. En général, des interactions non covalentes sont toujours présentes lorsque deux ou plusieurs molécules de propriétés chimiques et physiques différentes se reconnaissent mutuellement par interaction à courte distance. En effet, ces faibles liaisons non covalentes sont la principale force motrice de nombreux processus biologiques dynamiques.

Les interactions moléculaires non covalentes sont généralement caractérisées par des énergies moyennes de 1 - 5 kcal mol⁻¹ (4-21 kJ mol⁻¹), c'est-à-dire très inférieures à l'énergie d'une simple liaison covalente. Bien que faibles et n'ayant qu'une existence temporaire à des températures physiologiques (25-37 °C), les multiples liaisons non covalentes agissent souvent ensemble pour créer des associations spécifiques et très stables entre différentes parties d'une même macromolécule (Figure I-2) ou entre des complexes composés de deux ou plusieurs molécules différentes.

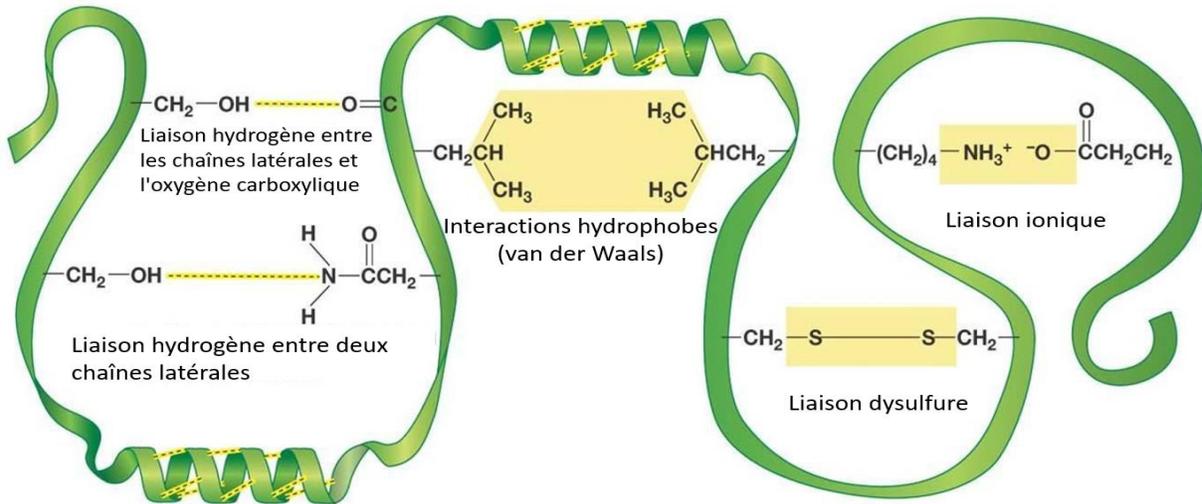


Figure I-2: Interactions qui déterminent la structure tertiaire des protéines. Adopté de [7].

Les liaisons non covalentes peuvent être classées en divers groupes qui diffèrent par leur géométrie, leur résistance et leur spécificité. Les trois principaux types sont les interactions électrostatiques, les liaisons hydrogène et les interactions de van der Waals.

Les interactions électrostatiques (également appelées liaisons ioniques) dépendent des charges électriques des atomes. Les liaisons ioniques résultent de l'attraction entre un ion chargé positivement (cation) et un ion chargé négativement (anion). Les atomes liés électrostatiquement sont si différents en termes d'électronégativité que les électrons de liaison ne sont jamais partagés: ces électrons se trouvent toujours autour de l'atome le plus électronégatif. Les interactions électrostatiques entre deux atomes chargés individuellement (avec des charges opposées) dans l'eau ont une énergie caractéristique de 1,4 kcal mol⁻¹ (5,9 kJ mol⁻¹), mais n'ont pas d'orientations géométriques caractéristiques car le champ électrostatique autour d'un ion est uniforme dans toutes les directions.

Les liaisons hydrogène appartiennent au type d'interactions non covalentes qui ont pour caractéristique la directionnalité. Ces interactions relativement faibles sont néanmoins extrêmement importantes pour les macromolécules biologiques telles que les protéines et les acides nucléiques. Les liaisons hydrogène entre les molécules d'eau sont également responsables d'un grand nombre des propriétés de l'eau en tant que solvant. Dans les liaisons hydrogène les plus fortes, l'atome donneur, l'atome d'hydrogène et l'atome accepteur se trouvent tous en ligne droite.

Les multiples liaisons hydrogène non linéaires, même si elles sont plus faibles que les liaisons linéaires, aident à stabiliser les structures tridimensionnelles de nombreuses protéines et de l'ADN. La force des liaisons hydrogène dans les macromolécules n'est que de 1 à 2 kcal mol⁻¹ (4-8 kJ mol⁻¹), considérablement plus faible que les liaisons hydrogène entre les molécules d'eau (≈5 kcal mol⁻¹ ou ≈21 kJ mol⁻¹), mais la force cumulée des multiples liaisons hydrogène joue un rôle central dans l'architecture des grandes molécules biologiques en solution aqueuse.

L'interaction de Van der Waals intervient lorsque deux atomes (ou groupes d'atomes) quelconques se rapprochent suffisamment l'un de l'autre pour créer une force d'attraction faible et non spécifique associée à des énergies de 0,5 à 1,0 kcal mol⁻¹ (de 2 à 4 kJ mol⁻¹) par paire d'atomes. Cependant, l'interaction de van der Waals ne peut être négligée. Lorsque les surfaces de deux grandes molécules se rejoignent – ce qui est le cas au moment de la reconnaissance et de la liaison de nombreuses enzymes à leurs substrats correspondants ou, plus généralement, dans le cas des interactions ligand-récepteur – un grand nombre d'atomes sont en contact de van der Waals, et l'effet net, additionné sur de nombreuses paires d'atomes, peut être très important.

Toutes ces interactions faibles sont cruciales pour les interactions entre les biomolécules – les enzymes avec leurs substrats, les anticorps avec leurs antigènes, les hormones avec leurs récepteurs, etc. Ces processus d'interaction sont caractérisés par l'affinité d'une molécule pour une autre et sont tous soumis aux lois thermodynamiques [8], [9].

I-1.2 Paramètres cinétiques et thermodynamiques des interactions

La caractérisation cinétique et thermodynamique des interactions (bio)moléculaires repose sur la détermination de constantes de vitesse (constantes de vitesse d'association et de dissociation) et de constantes d'équilibre (constantes d'association et de dissociation à l'équilibre).

Le taux de réaction et les constantes d'équilibre des interactions pour le cas le plus simple de réaction à deux partenaires $A + B \rightarrow AB$ (où A et B sont des partenaires différents) peuvent être déterminés avec différentes techniques d'analyse et, pour certaines d'entre elles, même suivis en temps réel. La constante k_a est la vitesse de formation du complexe (AB), exprimée comme le nombre de complexes formés par unité de temps à la concentration unitaire de A et B. Dès que le complexe AB est formé, sa dissociation peut avoir lieu. La constante de vitesse de dissociation k_d décrivant ce processus donne le nombre de complexes AB qui se dissocient par unité de temps (Tableau I-1).

Tableau I-1: Définitions des constantes d'association et de taux de dissociation [10].

	Constante k_a	Constante de vitesse de dissociation, k_d
Définition	$A + B \rightarrow AB$	$AB \rightarrow A + B$
Description	Taux de formation de AB: nombre de complexes AB formés par unité de temps à la concentration unitaire de A et B	Taux de dissociation des AB: nombre de complexes AB se dissociant par unité de temps
Unités	$\text{l mol}^{-1} \text{s}^{-1}$	s^{-1}
Gamme typique	10^3-10^7	$10^{-1}-5 \times 10^{-6}$

Il est important de garder à l'esprit que la plage des constantes k_a et k_d présente de grandes variations et dépend, entre autres, de la température.

Au début de la réaction, aucun produit n'est encore présent, donc le taux de la réaction d'association est le plus élevé et celui de la réaction de dissociation est le plus faible. Au fur et à mesure que la réaction progresse, une quantité croissante du complexe AB est produite, ce qui augmente le taux de dissociation. Avec l'épuisement de A et B, le taux d'association diminue. Dès que les taux des deux réactions d'association et de dissociation deviennent égaux, l'équilibre est atteint. Cet équilibre est défini par les constantes d'association K_A et de dissociation K_D (Tableau I-2).

Tableau I-2: Définition de l'association d'équilibre et des constantes de dissociation [10].

	Constantes d'association K_A	Constante de dissociation K_D
Définition	$[AB]/[A][B] = k_a/k_d$	$[A][B]/[AB] = k_d/k_a$
Description	Affinité pour l'association: K_A élevé, grande affinité pour l'association	Stabilité de AB: K_D élevé, stabilité faible de AB
Unités	l mol^{-1}	mol l^{-1}
Gamme typique	10^5-10^{12}	$10^{-5}-10^{-12}$

Les constantes de vitesse (Tableau I-1) et d'équilibre (Tableau I-2) des interactions (bio)moléculaires fournissent des informations sur la vitesse de formation des complexes, la force de ces interactions et la stabilité des complexes formés.

D'autres types d'informations sur les interactions biomoléculaires sont également nécessaires, en particulier si l'un des partenaires en interaction n'est pas identifié ou n'est pas caractérisé. Les informations les plus couramment recherchées sont la distance entre les espèces en interaction, l'orientation et la conformation des partenaires d'interaction, la stœchiométrie des interactions biomoléculaires et l'identification du site d'interaction.

I-2 Techniques analytiques pour l'étude des interactions biomoléculaires

Un large éventail de méthodes biophysiques et biochimiques sont utilisées pour détecter et quantifier les interactions biomoléculaires. Certaines des techniques bien connues et répandues, comme les microarrays, la résonance magnétique nucléaire (RMN), la spectroscopie de fluorescence (en particulier, le transfert d'énergie par résonance de fluorescence - FRET), la calorimétrie et quelques autres qui sont actuellement développées seront brièvement décrites. Néanmoins, les deux principales techniques utilisées dans ce travail - la résonance plasmonique de surface (SPR) et la spectrométrie de masse (MS) - seront présentées en détail dans les parties suivantes.

I-2.1 Les méthodes de microarray

La technologie des microarrays, appelée aussi en anglais « chip/array library technology », a été développée au milieu des années 1990 [11]. Le processus de création des microarrays est basé sur l'immobilisation, généralement à haute densité, de molécules en réseau sur un support solide souvent appelé « puce ». Selon la nature de la molécule immobilisée, les puces peuvent être divisées en biopuces (biomicroarray) et puces chimiques. Les biopuces sont généralement greffées par des composés biochimiques ou biologiques, tels que des acides nucléiques, des protéines (y compris des enzymes et des anticorps), des cellules ou même des tissus [12] tandis que les microarrays chimiques sont constitués de réseaux de composés organiques comprenant de petites molécules organiques, des peptides, des oligomères et des sucres. La chimie de surface de ces puces est limitée, en particulier lorsque la synthèse des puces nécessite une réaction photochimique, ce qui entraîne une restriction de l'utilisation des seules molécules oligomériques telles que les oligonucléotides ou les peptides. Les biopuces, au contraire, sont souvent créées par dépôt de composés qui sont présynthétisés ailleurs et directement transférés et immobilisés sur un support solide. Cette approche est plus polyvalente et adaptable, elle peut donc être appliquée pour générer des biopuces de presque toutes les molécules dans diverses combinaisons [13]. La puissance de l'approche de microarrays pour la détection et l'analyse des interactions biomoléculaires réside dans leur capacité sans précédent à interroger simultanément jusqu'à des centaines de milliers de sondes immobilisées [14].

I-2.1.1 Puces à acide nucléique

Les puces à acides nucléiques, plus souvent appelées "DNA-microarrays" ou "DNA-chips", représentent une technologie dans laquelle des séquences d'ADN spécifiques sont soit présynthétisées et déposées, soit synthétisées en 2-D (plus récemment 3-D) directement sur un support solide. La technologie des microarrays d'ADN a évolué à partir de l'analyse par Southern-blot, qui était utilisée pour la détection de séquences spécifiques parmi les fragments d'ADN séparés par électrophorèse sur gel. Les avancées historiques suivantes ont porté sur la création d'un criblage par filtre de bibliothèques de clones et, plus tard, de bibliothèques organisées en réseau stockées dans des plaques de microtitration et immobilisées sur des membranes de filtre. Enfin, deux étapes ont conduit à une explosion de l'intérêt pour la technologie des microarrays à ADN.

La première innovation clé a été l'apparition pour la première fois en 1995 [11] de microarrays à la surface de matériaux solides non poreux tels que des lames de verre. P. Brown et ses collègues ont fabriqué le premier microarray en utilisant des ADN complémentaires (ADNc) dérivés de produits de réaction en chaîne par polymérase. Le microarray décrit a été effectué à l'aide d'un robot sur une surface activée et a ensuite été utilisé pour la mesure parallèle des modèles d'expression de 48 gènes d'*Arabidopsis thaliana*. Le deuxième point clé concernait de nouvelles méthodes pour une synthèse *in situ* à haute densité d'oligonucléotides sur support solide. L'utilisation de la synthèse chimique parallèle, dirigée par la lumière et adressable dans l'espace, a permis de construire d'immenses arrays sur des surfaces limitées [15]. Les progrès réalisés dans la technologie des microarrays et dans le séquençage du génome ont permis de mesurer simultanément le niveau d'expression de dizaines de milliers de transcrits d'ARNm de procaryotes et d'eucaryotes [16]. Les microarrays à ADN modernes offrent une capacité de production élevée et un bon rapport coût/efficacité, ce qui est crucial pour l'analyse à grande échelle des données génomiques et l'élucidation des modèles d'expression des gènes qui peuvent refléter un type de cellule, un traitement, une maladie ou un stade de développement donné.

En général, les microarrays à ADN sont utilisées pour sonder un mélange d'acides nucléiques marqués et pour mesurer leurs concentrations relatives en solution complexe [17]. L'intégration des données obtenues avec des ensembles de données provenant d'autres techniques peut améliorer l'identification de biomarqueurs importants et de protéines en liaison avec l'ADN. Ces dernières comprennent des facteurs de transcription qui se lient préférentiellement à certaines séquences d'ADN et des protéines histones qui forment le noyau des nucléosomes, l'unité de base de la chromatine. Les tests fonctionnels représentés, par exemple, par l'immunoprécipitation de la chromatine couplée à des microarrays à ADN (ChIP-chip) ou le séquençage à court terme (ChIP-seq) sont devenus des techniques standard pour identifier les emplacements et les modifications biochimiques des protéines liées à l'ADN à l'échelle du génome. Les progrès récents dans ce domaine ont permis de surmonter certaines des limites de l'expérience ChIP "standard", tandis que le développement de tests et d'analyses complémentaires a permis d'augmenter le nombre, les types et la résolution des interactions protéine-ADN découvertes [18]. De plus, l'intégration des données de transcriptomique et de lipidomique avec les données d'interaction microARN-ARNm peut permettre la découverte de nouvelles informations sur les processus cellulaires sous-jacents, qui ne peuvent être directement étudiés par aucun des ensembles de données individuels [19].

I-2.1.2 Les puces à protéines

Les microarrays de peptides synthétiques constitués de courts peptides linéaires ont été décrits pour la première fois presque au moment de l'apparition des premières microarrays à ADN [20], tandis que les microarrays de protéines sont arrivés plus tard dans le domaine des interactions biomoléculaires en raison de certains facteurs critiques tels que la stabilité ou la fonctionnalité du repliement natif. Bien que les informations fournies par les microarrays à ADN visent à prédire l'abondance (ou activités) des protéines, leurs valeurs réelles ne sont pas toujours en corrélation. En outre, l'utilisation de puces à ADN, même en combinaison avec d'autres

méthodes, ne fournit pas d'informations sur les modifications post-traductionnelles (par exemple, protéolyse, phosphorylation, glycosylation, etc.) des protéines cibles. Il a donc fallu mettre au point des méthodes alternatives pour l'étude approfondie des protéomes. Les microarrays à peptides ont été les premiers types de puces utilisées pour des études de reconnaissance telles que la révélation de la spécificité de liaison, le criblage des partenaires d'interaction cellulaire et le développement d'inhibiteurs sélectifs [21]. La transition des microarrays à ADN/peptides aux microarrays à protéines a nécessité d'immenses efforts de développement. L'une des étapes importantes a été la création de méthodes d'immobilisation des protéines spécialement adaptées, qui permettent de préserver la structure et la fonction biologique des protéines après l'étape d'immobilisation. Ces microarrays à protéines ont également nécessité, pour leur utilisation optimale, le développement de systèmes de détection appropriés pour détecter et mesurer les interactions entre les protéines, dont les plus couramment utilisées sont l'imagerie par fluorescence, MS et SPR. L'utilisation de microarrays à protéines présente des avantages par rapport aux méthodes plus traditionnelles d'étude des interactions biomoléculaires: une faible consommation d'échantillons et peuvent être miniaturisées. Elles permettent une analyse des protéines à haut débit, de la même manière que les microarrays à ADN, en affichant simultanément plusieurs protéines biologiquement actives, ce qui est extrêmement important pour l'analyse des interactions protéiques à l'échelle du protéome [22].

L'intérêt croissant pour le développement de microarrays miniaturisées et parallélisées pour l'analyse des interactions protéine-protéine et le profilage des protéines, appelés en anglais « protein-detecting microarrays », a entraîné une confusion dans la terminologie des microarrays à protéines. Les derniers peuvent être classés en deux groupes: les microarrays de protéines fonctionnelles connus sous le nom anglais « functional protein microarrays » et les microarrays de détection de protéines connus sous le nom anglais « protein-detecting microarrays ». Le trait caractéristique du premier type est leur création par l'immobilisation de différentes protéines purifiées, de domaines protéiques ou de peptides fonctionnels. Les microarrays à protéines fonctionnelles sont utilisées, en général, pour l'étude des interactions biomoléculaires et le dépistage de partenaires potentiels en interaction. En même temps les microarrays de détection de protéines sont créés par l'immobilisation de récepteurs d'interaction de nature différente, pas nécessairement des protéines, qui peuvent reconnaître et capturer spécifiquement des protéines particulières à partir de mélanges complexes. Ces microarrays sont couramment utilisées pour le profilage des protéines, c'est-à-dire la quantification de l'abondance des protéines et l'évaluation des modifications post-traductionnelles dans les mélanges complexes [22].

Les microarrays à protéines fonctionnelles

L'une des tâches les plus importantes de la protéomique fonctionnelle est l'étude du réseau d'interactions moléculaires et la compréhension des mécanismes sous-jacents qui définissent un protéome particulier. Les microarrays à protéines fonctionnelles représentent un outil extrêmement puissant pour atteindre cet objectif, en particulier lorsqu'elles sont produites pour analyser les familles entières de protéines apparentées. L'histoire de ces microarrays a commencé en 2000 lorsque, pour la première fois, des protéines recombinantes purifiées ont été placées sur des lames de verre dérivées chimiquement tout en préservant leur intégrité moléculaire et fonctionnelle [23]. Un an plus tard, un autre groupe a rapporté un microarray avec $\approx 5\ 800$ protéines

de *Sacharomyces cerevisiae* immobilisées sur des lames de verre de microscope [24]. Ce microarray de protéines fonctionnelles a ensuite été criblé avec différents phospholipides pour identifier les protéines avec liaison aux lipides, ce qui a permis de découvrir de nombreuses nouvelles protéines interagissant avec la calmoduline et les phospholipides. Les mêmes auteurs, en coopération avec un grand groupe de chercheurs, ont montré que les biopuces d'un protéome eucaryote entier peuvent être préparées et examinées pour diverses activités biochimiques, c'est-à-dire l'identification de substrats pour 87 protéines kinases différentes, qui révèlent plusieurs nouveaux modules de régulation dans la levure [25]. En utilisant une approche similaire, un microarray protéique contenant 2 158 protéines uniques d'*Arabidopsis thaliana* a été construit pour l'identification des substrats de phosphorylation des protéines kinases, qui comprennent plusieurs facteurs de transcription impliqués dans la régulation du développement, la défense immunitaire de l'hôte et les réponses au stress [26]. La quantification des interactions protéiques est également accessible par des microarrays à protéines fonctionnelles. Par exemple, l'étude et la quantification des préférences de liaison à l'ADN du facteur de transcription p53 a fourni en 2004 des constantes de dissociation à l'équilibre pour chaque variante de p53 [27]. Les microarrays à protéines fonctionnelles ont également été utilisées pour l'analyse quantitative du réseau d'interaction des protéines pour le récepteur du facteur de croissance épidermique [28]. De plus, elles peuvent générer des données quantitatives qui pourraient être utilisées pour former des modèles prédictifs de reconnaissance moléculaire [22].

Les microarrays à détection de protéines

Les microarrays à protéines fonctionnelles fournissent des informations sur la connectivité des différents réseaux d'interaction protéine-protéine. Cependant, pour établir les caractéristiques particulières de ces protéines, il faut mesurer l'abondance des protéines cibles et les modifications post-traductionnelles de diverses protéines et protéoformes dans le mélange biologique complexe. Les microarrays à détection de protéines sont des candidats idéaux pour ce type d'analyse, car elles fournissent des informations sur les fonctions des protéines cibles par le biais des interactions protéine-protéine ou plus généralement récepteur-ligand, des activités enzymatiques et de quelques autres méthodes. Les microarrays à détection de protéines se caractérisent par la grande variété d'agents de capture (récepteurs, c'est-à-dire anticorps, protéines de fusion, aptamères ADN / ARN, glucides, peptides synthétiques et autres petites molécules) immobilisés sur un support solide. Chaque cible dans un mélange complexe se lie sélectivement et spécifiquement à son récepteur, ce qui permet ensuite la détection, l'identification et la quantification des molécules sélectionnées à haut débit avec une consommation minimale d'échantillon. Le nombre de publications concernant la technologie des microarrays à protéines augmente rapidement, ce qui montre qu'elle est devenue l'outil de recherche indispensable pour l'étude et la détection des protéines, l'étude des interactions biomoléculaires et de nombreuses autres applications dans les domaines de la biologie et de la médecine [29].

Historiquement, l'une des stratégies les plus fréquemment utilisées pour préparer des microarrays à détection de protéines implique l'utilisation d'anticorps monoclonaux comme récepteurs spécifiques. À l'origine, les anticorps ont été utilisés pour précipiter des antigènes à

partir de mélanges complexes en vue d'une quantification ultérieure par diverses technologies, c'est-à-dire le test immuno-enzymatique (ELISA) et les techniques Western Blot [30]. ELISA était probablement la méthode la plus couramment utilisée pour l'analyse des interactions biomoléculaires en raison de sa détection rapide, spécifique et facile à utiliser en milieu clinique, qui était également utilisée pour les tests microbiens dans diverses industries. Différentes versions d'ELISA ont été développées afin de mieux répondre aux demandes particulières et ils ont été utilisées pour la mesure d'innombrables antigènes et anticorps. La méthode ELISA d'inhibition, un type particulier d'ELISA, a été utile pour le sérotypage pour les études épidémiologiques, l'évaluation de la virulence et la sélection des souches pour la production de vaccins[31]. Son potentiel à sonder les changements subtils de conformation des protéines en solution a été démontré avec l'exemple de la protéine virale recombinante en 2015 [32]. L'auteur cite que le test ELISA-inhibition peut être réalisée de manière quantitative avec un analyte dilué en série pour évaluer l'antigénicité ou l'activité de liaison. Cette technique analytique peut être utilisée pour sonder un site de liaison à la fois pour trouver des partenaires de liaison en solution avec une conformation non limitée.

Les microarrays à anticorps utilisent très souvent un second anticorps dirigé vers un épitope différent de la protéine, ce qui facilite la détection et la quantification de l'analyte correspondant. Cette idée a été utilisée pour surveiller les changements dans la phosphorylation de la tyrosine de la protéine [33] et pour le profilage des protéines sériques afin d'identifier de nouveaux biomarqueurs du cancer de la prostate [34]. L'utilisation de cette approche est toutefois limitée par la disponibilité d'anticorps appropriés. De plus, l'exigence d'utiliser simultanément plusieurs anticorps marqués par fluorescence peut augmenter le signal de fond ainsi que le risque de réactivité croisée en raison de l'augmentation du nombre d'anticorps. Afin de surmonter ces inconvénients, le marquage des protéines dans l'échantillon biologique par un ou plusieurs colorants fluorescents peut être effectué, mais le marquage chimique non spécifique des protéines introduit des modifications chimiques à leur surface et peut entraver la reconnaissance des anticorps [35]. En plus, cette approche suppose un marquage homogène des protéines, qui ne peut être garanti par aucune des méthodes actuellement disponibles. Une autre façon de surmonter ces restrictions et limitations est l'utilisation de méthodes de détection sans marquage, mais la sensibilité de ces méthodes reste encore insuffisante [22]. Les problèmes potentiels liés à l'utilisation d'anticorps ont conduit à l'exploration de molécules de récepteurs alternatives [36], néanmoins, ces microarrays à base d'anticorps demeurent très utilisées avec succès. Les arrays à base d'anticorps les plus utilisées sont probablement les arrays à cytokines de différents formats. L'analyse des cytokines est devenue un outil de routine sensible pour cibler des échantillons complexes comme les fluides biologiques pour la recherche en immunologie, c'est-à-dire les biomarqueurs des maladies immunitaires. L'application de ces arrays à anticorps s'est récemment étendue à l'étude des résistances aux médicaments anticancéreux, qui peuvent être induites par les cytokines [37].

Pour résumer les applications des différents types de microarrays protéiques:

1. les microarrays protéiques fonctionnels peuvent être utilisés pour étudier la plupart des principaux types d'interactions et d'activités enzymatiques qui ont lieu dans les voies biochimiques et ont été utilisés pour l'analyse de multiples interactions biomoléculaires simultanées impliquant des interactions protéine-protéine, protéine-lipide, protéine-ADN et protéine-petite molécule [22].

2. les microarrays de détection des protéines sont bien adaptés à la détection des changements dans l'abondance des protéines dans des échantillons biologiques ayant une gamme dynamique relativement large, au profilage des protéines sériques afin d'identifier des biomarqueurs et tout partenaire d'interaction potentiel. Ils peuvent également être utilisés pour identifier et caractériser l'espèce concurrente d'interaction biomoléculaire dans les fluides complexes, qui peut interférer avec le récepteur utilisé [22].

I-2.2 Méthodes de détection avec ou sans marquage

Afin d'analyser, d'identifier et de caractériser diverses interactions biomoléculaires, il est nécessaire de disposer de méthodes de détection qui peuvent fournir une analyse à haut débit, un rapport signal/bruit élevé, une bonne résolution, une gamme dynamique élevée et des résultats reproductibles, avec des coûts d'instrumentation relativement faibles. La plupart des méthodes disponibles pour cette tâche peuvent être classées comme des méthodes de détection avec ou sans marquage [38], [39]. Les techniques avec marquage nécessitent le marquage des molécules en interaction avec des colorants fluorescents, des radioisotopes, des tags, etc. Alors que les techniques sans marquage mesurent une propriété inhérente des molécules elles-mêmes (par exemple, la masse et la propriété diélectrique), évitant ainsi de modifier les interacteurs.

I-2.2.1 Spectroscopie de fluorescence - FRET

La méthode la plus couramment utilisée pour surveiller les interactions biomoléculaires *in vitro* et *in vivo* est probablement la spectroscopie de fluorescence. Elle est l'une des méthodes classiques nécessitant un marquage. Afin de caractériser les interactions complexes avec une haute résolution spatio-temporelle, deux méthodes différentes reposant sur le transfert d'énergie par fluorescence ou bioluminescence ont été développées: le transfert d'énergie de résonance de Förster (FRET) et le transfert d'énergie de résonance de bioluminescence (BRET) [40], [41].

BRET se produit lorsque le donneur bioluminescent fusionne avec une protéine d'intérêt et qu'un récepteur fluorescent fusionne avec son partenaire de liaison, ce qui permet de surveiller les interactions biomoléculaires en temps réel. BRET dépend de la distance entre le donneur et l'accepteur - le donneur doit se trouver à moins de 100 Å (10 nm) du récepteur et dans la bonne orientation. Il doit également y avoir un chevauchement spectral approprié entre le couple donneur-accepteur pour produire un signal significatif [42]. En théorie, toute interaction protéine-protéine peut être étudiée à l'aide de BRET, à condition que les protéines puissent être marquées de manière appropriée et exprimées d'une manière fonctionnellement pertinente, mais les récentes expériences BRET ont été menées principalement sur des peptides relativement petits [43], [44].

Le FRET repose également sur le transfert d'énergie en fonction de la distance, mais dans cette méthode, il se fait d'un fluorophore donneur à un fluorophore accepteur et est largement utilisé en biologie comme méthode sensible pour mesurer les distances entre deux parties d'une molécule complexe ou entre deux partenaires en interaction. La méthode FRET nécessite également le chevauchement spectral de l'émission du donneur avec l'absorption d'accepteur [45]. L'efficacité du FRET diminue fortement avec l'augmentation de la distance donneur-accepteur au-dessus de 100 Å (10 nm). Afin d'étendre cette distance, des approches innovantes ont été conçues; elles exploitent l'utilisation de nanostructures d'argent (ou d'or) à proximité du fluorophore. La présence de nanoparticules métalliques module la fluorescence du fluorophore et modifie le champ électromagnétique au voisinage des molécules excitées - ce processus est appelé transfert d'énergie de surface des nanomatériaux (nanomaterial surface energy transfer, NSET). Malheureusement, l'utilisation de nanoparticules d'argent a un effet mortel sur la cellule, ce qui limite fortement l'utilisation de protéines de fluorescence marquées par l'argent [46].

L'avènement des protéines fluorescentes est devenu une étape importante dans l'application de la microscopie à fluorescence basée sur le FRET. La popularisation de cette méthode a commencé avec le développement de plusieurs constructions de protéines fluorescentes vertes-FRET (GFP-FRET) qui sont utilisées pour surveiller l'environnement biochimique à l'intérieur des cellules vivantes par Tsien *et al.* [47]. L'un des inconvénients de ces constructions est leur taille relativement importante, ce qui limite la sensibilité et la résolution spatiale. C'est pourquoi l'invention suivante du marquage avec plusieurs protéines fluorescentes a permis de surmonter certains inconvénients et a totalement révolutionné les expériences d'imagerie des cellules vivantes [48], [49].

Les approches FRET les plus avancées sont aujourd'hui basées sur des biomolécules et des structures de graphène conçues de manière ad hoc. Les tendances récentes sont axées sur les sondes de fluorescence dans le proche infrarouge liés de manière covalente pour marquer les anticorps, l'application potentielle de nouvelles protéines infrarouges comme biomarqueurs cellulaires pour l'imagerie du corps entier et de nouveaux concepts photoniques d'analyses de transfert d'énergie de résonance à longue distance [45].

Les méthodes décrites basées sur la spectroscopie de fluorescence permettent de suivre les interactions biomoléculaires et d'évaluer semi-quantitativement la distance moyenne entre deux sondes au sein d'un complexe.

I-2.2.2 Dichroïsme circulaire (CD)

Le dichroïsme circulaire (CD) est une technique quantitative et sans marquage qui permet de suivre les changements de conformation qui peuvent se produire au cours des interactions biomoléculaires, c'est-à-dire ADN-protéine ou protéine-protéine, en mesurant la différence d'absorption de la lumière polarisée circulaire droite et gauche (dans la gamme de 170-700 nm) des molécules avec des chromophores chiraux. Des informations structurales peuvent également être obtenues au sein d'une même molécule. Par exemple, les protéines natives ont un spectre CD caractéristique, avec de petites modifications propres à chaque protéine particulière.

Par conséquent, le dépliage des biomolécules (telles que les protéines, les acides nucléiques, les glycosides, etc.) peut être mesuré comme un changement dans les spectres CD [48], [49]. Potentiellement, tout changement conformationnel dans la structure des macromolécules pourrait être évalué par CD. Néanmoins, les précisions qui ont été rapportées pour la CD sont respectivement de 97% pour les hélices, 75% pour la feuille β , 50% pour les tours, et 89% pour les autres structures secondaires [50].

L'approche relativement nouvelle de la CD - le dichroïsme circulaire vibrationnel (VCD), qui est capable de déterminer une configuration absolue de molécules chirales de taille petite à moyenne, ainsi que de la structure de grandes macromolécules.

L'une des intéressantes contributions récentes du VCD porte sur les informations structurales pendant les interactions biomoléculaires dans les domaines suivants: interaction de l'ADN avec les biomolécules et les métaux biogènes, tétramères et quadruplexes de la guanine, biointeractions des pigments biliaires, ainsi qu'interactions des polypeptides et des protéines avec d'autres biomolécules [51]. Ainsi, la VCD pourrait être utilisée pour explorer une grande variété d'interactions molécule-molécule, démontrant la sensibilité unique de la VCD à l'organisation supramoléculaire. En outre, la VCD pourrait être utilisée pour déterminer la configuration absolue de composés synthétisés *de novo* ou extraits, ce qui rend cette approche extrêmement importante pour les applications pharmaceutiques [52], [53].

Pour résumer, les diverses applications de la spectroscopie CD pourraient être classées dans plusieurs domaines d'études biologiques tels que:

- I. les évaluations conformationnelles des protéines et des acides nucléiques;
- II. la détermination de la thermodynamique des changements de conformation des biomolécules;
- III. études des interactions asymétriques entre biomolécules (par exemple, interactions entre protéines, interactions entre protéines et ADN, interactions entre protéines et ligands, et interactions entre ADN et ligands);
- IV. l'analyse cinétique des changements de conformation des macromolécules [53], [54].

Néanmoins, la résolution relativement médiocre des CD et VCD constitue un inconvénient majeur.

I-2.2.3 Spectroscopie vibrationnelle (infrarouge (IR) et Raman)

Le potentiel de la spectroscopie vibrationnelle, tant l'absorption infrarouge (IR) que la diffusion Raman, pour les applications biomédicales, l'analyse qualitative et quantitative de mélanges complexes a été bien établi au cours des dernières décennies. La spectroscopie vibrationnelle est une méthode sensible basée sur les changements périodiques du moment dipolaire (IR) ou des polarisabilités (Raman) dans une molécule lorsqu'elle vibre ou tourne. En raison de sa capacité unique à relever les empreintes chimiques au niveau moléculaire, la spectroscopie vibrationnelle peut jouer un rôle important dans les applications analytiques et biomédicales [55].

Contrairement à l'absorption IR, la spectroscopie Raman peut être utilisée avec des solvants aqueux car l'eau absorbe très fortement dans la région de l'infrarouge moyen du spectre électromagnétique, mais ne diffuse que faiblement la lumière. Par conséquent, la spectroscopie Raman est souvent la spectroscopie vibrationnelle de choix pour l'étude des biomolécules dans un environnement aqueux natif. De plus, toutes les molécules d'intérêt biologique ont des spectres vibratoires, qui sont souvent sensibles à la conformation, à la structure secondaire et aux faibles interactions intermoléculaires [56].

L'une des applications créatives de la spectroscopie Raman est la caractérisation des assemblages bicouches. La spectroscopie Raman à réflexion interne totale (total internal reflection, TIR), dépendant de la température et de la polarisation, a été utilisée pour évaluer les propriétés des bicouches lipidiques simples de dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC), dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) et palmitoyloleoylphosphatidylcholine (POPC) sur du verre [56]. Spectroscopie Raman TIR de la formation de bicouches à partir de mélanges DPPC-détergent a démontré que les bicouches forment une structure de type gel identique à celle obtenue par la fusion de petites vésicules unilamellaires [57].

Progrès de la spectroscopie Raman - les mesures par spectroscopie Raman amplifiée de surface (SERS) ont permis de mesurer la cinétique de l'échange lipidique à partir de vésicules DMPC avec des membranes bicouches hybrides DMPC perdeutérées sur des nanoshells d'or [58]. De plus, les substrats présentant une morphologie de nanostructure, qui permet les expériences SERS, peuvent également être soumis aux techniques de spectroscopie infrarouge de réflexion-absorption (IRRAS) pour la caractérisation des assemblages de membranes sur les surfaces [59].

Les applications de la spectroscopie Raman ne sont pas limitées aux modèles ou aux parties des organelles. Le potentiel de la spectroscopie Raman pour les applications d'analyse biomédicale et biochimique réside dans la capacité à identifier à l'aide des « empreintes » le contenu biochimique et la cinétique sans marquage [55]. Bonnier *et al.* ont démontré l'imagerie de cellules vivantes cultivées sur une matrice de collagène tridimensionnelle par spectroscopie Raman [60]. Les travaux ont été menés sur l'adénocarcinome pulmonaire humain et une lignée de cellules kératinocytaires épithéliales humaines spontanément immortalisées a été utilisée dans ce travail. Récemment, Kalanoor *et al.* ont utilisé la spectroscopie Raman pour l'étude à haut débit des modes vibratoires à basse fréquence de biomolécules [61]. Ces modes des biomolécules reflètent les fluctuations intramoléculaires et intermoléculaires spécifiques induites thermiquement par des perturbations externes, telles que la liaison des ligands, l'interaction des protéines, le transfert d'électrons et l'activité enzymatique, qui ont servi à l'étude des protéines et de leurs éléments constitutifs, des acides aminés et des peptides, et des oligonucléotides courts d'ADN synthétique.

La spectroscopie infrarouge et la spectroscopie Raman sont des techniques analytiques complémentaires qui ont des applications analytiques importantes, en particulier pour l'identification des fonctions chimiques, des conformations (arrangement planaire, hélice α , feuillet β) et des configurations (cis, trans) des biomolécules. Dans le cas de la caractérisation des

complexes biomoléculaires, ces techniques sont principalement utilisées pour l'étude des liaisons intra et intermoléculaires, et l'étude de l'orientation des molécules (polarisation) [62], [63].

I-2.2.4 RMN Résonance magnétique nucléaire

La spectroscopie RMN est un outil puissant pour élucider la structure, la dynamique et les interactions de biomolécules complexes. En chimie analytique, RMN est utilisée pour le contrôle de la qualité et la détermination de la pureté des échantillons. Elle fournit également des informations précieuses sur l'interaction ligand-récepteur et facilite la découverte de futurs biomarqueurs et de médicaments thérapeutiques [64], [65].

Les techniques de spectroscopie RMN pour le criblage et les interactions de complexes non covalents ont été bien étudiées par Meyer *et al.* [66]. Les approches expérimentales ont été séparées en deux groupes principaux: le premier se concentre sur les signaux RMN du ligand et utilise généralement l'effet Overhauser nucléaire transféré entre la protéine et le ligand pour la détection et la caractérisation de la liaison, la seconde approche se concentre sur les modifications du décalage chimique de la protéine cible lors de la liaison du ligand. D'autres approches RMN décrites étaient basées sur les changements de relaxation ou de diffusion du ligand lors de la liaison à une protéine.

La spectroscopie RMN à saturation-transfert de différence (de l'anglais « Saturation-Transfer-Difference », STD) appartient au premier groupe. Elle a été utilisée pour la caractérisation des liaisons dans les complexes ligand-récepteur étroitement liés. Il est possible d'utiliser la STD RMN si elle est caractérisée par deux signaux différents en raison d'un échange lent entre l'état lié et l'état libre, ce qui permet un transfert de saturation entre l'état libre et l'état lié. Ainsi, en utilisant l'irradiation du ligand libre, il est possible d'identifier le signal du ligand capturé. En plus de l'attribution de signaux de résonance du ligand lié, la méthode de transfert de saturation a été utilisée pour l'analyse de la cinétique de liaison de la formation de complexes protéiques [67] et pour la liaison des glucides aux protéines [68].

Meyer *et al.* ont décrit le potentiel de la STD RMN pour le criblage des composés du mélange. Les auteurs ont développé une méthode basée sur le transfert de la saturation de la protéine aux ligands liés, qui est ensuite déplacée, par échange, dans la solution où elle est détectée (comme illustré sur la Figure I-3) [66].

La RMN permet d'identifier des ligands, d'identifier des épitopes (des milliers de structures de protéines ont été déterminées par RMN et déposées dans la PDB (Protein Data Bank)) et de calculer des affinités des interactions biomoléculaires.

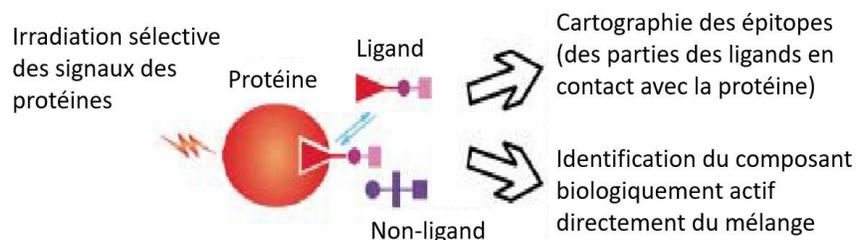


Figure I-3: Représentation de la spectroscopie STD RMN. Après la saturation de la protéine par l'impulsion de saturation sélective, les ligands qui sont en échange entre l'état lié et l'état libre deviennent saturés lorsqu'ils sont fixés à la protéine. Par échange, cette saturation est transportée dans une solution où elle peut être détectée. En soustrayant le spectre résultant d'un spectre sans irradiation de la protéine, on obtient un spectre RMN de la seule molécule de ligand liée. Les signaux de résonance des "non-liants" ne participent pas au spectre de différence. Adopté de [66].

I-2.2.5 Calorimétrie

La calorimétrie est la méthode d'analyse des interactions biomoléculaires basée sur la mesure de la quantité de chaleur libérée ou absorbée lors un événement de liaison entre biomolécules. La calorimétrie par titrage isotherme (de l'anglais « isothermal titration calorimetry », ITC) fournit une mesure directe de la chaleur liée à la formation ou à la rupture de liaisons non covalentes lorsque les molécules forment un complexe. Elle ne nécessite aucune modification des partenaires des interactions biomoléculaires, que ce soit par marquage fluorescent ou par immobilisation. L'expérience calorimétrique permet également de mesurer la chaleur associée à d'autres événements potentiels d'accompagnement (c'est-à-dire le réarrangement des solvants, les changements de conformation des partenaires d'interaction, la protonation/déprotonation). La gamme des constantes de dissociation habituellement couverte par l'ITC se situe entre 100 μM et 10 nM; cependant, les expériences de compétition permettent d'étendre cette gamme de manière significative pour couvrir des affinités plus ou moins fortes. Un avantage supplémentaire de cette méthode est la possibilité d'étudier les interactions dans la solution, car ITC ne nécessite pas l'immobilisation des molécules en interaction ou leur modification chimique. Traditionnellement, l'ITC a été utilisé pour mesurer quantitativement l'affinité de liaison des protéines à leurs ligands [69]. Des travaux intéressants sur la comparaison des titrages ITC et MS pour l'étude des interactions non covalentes ont été réalisés par Boeri Erba *et al.* [70]. À pH 6,8 et pH 8,4, les valeurs du K_a mesurées par MS et par ITC étaient en accord, tandis qu'à pH 3,4, les auteurs n'ont pu mesurer le K_a que par MS, mais pas par ITC en raison de la sensibilité limitée de la calorimétrie. Les principaux avantages de la MS par rapport à l'ITC sont sa sensibilité (c'est-à-dire que la quantité d'échantillon requise est >100 fois inférieure à celle nécessaire pour l'ITC), et la possibilité d'obtenir des informations précises sur la composition des complexes protéiques, leur stoechiométrie, leurs interactions avec les sous-unités et leur voie d'assemblage. Les titrages ITC et ESI-MS ont tous deux été utilisés pour étudier l'association d'un complexe homo-oligomère non covalent de la concanavine A, une lectine du haricot sabre (*Canavalia ensiformis*).

La calorimétrie par perturbation de pression (de l'anglais « pressure perturbation calorimetry », PPC) permet de distinguer les effets de la solvation d'autres effets moins perceptibles, tels que la flexibilité conformationnelle et la dynamique macromoléculaire, pendant les assemblages moléculaires. La PPC permet de mesurer les effets thermiques différentiels qui se produisent lorsque de petites impulsions de pression (5 atm) sont appliquées à un échantillon. Pour les molécules en solution, ces effets thermiques différentiels sont directement liés à la différence de dilatation thermique des molécules du soluté par rapport au volume de solvant qu'elles ont déplacé. Cette capacité de la PPC est particulièrement pertinente pour les interactions biomoléculaires en solution, où des effets de solvation peuvent également se produire, de sorte qu'il peut être difficile de les déterminer par d'autres techniques. Grâce à cette technique, des mesures ont été effectuées sur une série de complexes cyclodextrine-adamantane, protéine-ligand (lysozyme-(GlcNac)₃ et ribonucléase-2' CMP) et protéine-protéine (cytochrome c peroxydase-pseudoazurine) en solution aqueuse, qui ont montré des réductions constantes des expansibilités thermiques par rapport aux molécules "libres" [71].

La calorimétrie, et l'ITC en particulier, est une méthode de choix pour la caractérisation thermodynamique complète d'une interaction biomoléculaire. Elle est la seule technique capable de déterminer simultanément tous les paramètres de liaison de partenaires dans leur état natif en une seule expérience.

I-2.2.6 Électrophorèse capillaire (CE) et électrophorèse capillaire d'affinité (ACE)

L'électrophorèse capillaire (CE) est une technique de séparation par électrophorèse à haute résolution qui utilise des capillaires étroits ($d = 20 - 200 \mu\text{m}$) pour la séparation des biomolécules en fonction de leur mobilité électrophorétique dans un champ électrique (rapport e/m). Deux mécanismes de transport fondamentaux de CE sont le flux électroosmotique (EOF) et la mobilité électrophorétique. Ce dernier dépend de divers paramètres du système (c'est-à-dire le pH et la viscosité du tampon de séparation) et des caractéristiques moléculaires innées (c'est-à-dire la charge et le rayon hydrodynamique de la molécule) [72]. La deuxième force motrice - EOF - est le flux de masse du tampon de séparation, appelé électrolyte de fond. Dans le cas du capillaire de silice fondue nu couramment utilisé, l'EOF se déplace d'anode en cathode en raison de la charge de surface négative du capillaire et du champ électrique appliqué [73]. En fonction de la charge, les particules de l'analyte sont attirées vers l'anode ou la cathode avec une vitesse de déplacement déterminée par la taille de la molécule. La vitesse de transport des molécules est directement proportionnelle au champ électrique appliqué - la mobilité augmente avec l'augmentation de l'intensité du champ électrique.

L'électrophorèse capillaire d'affinité (de l'anglais « affinity capillary electrophoresis », ACE) est basée sur les mêmes mécanismes de transport qu'une EC commune, mais elle permet de mesurer les temps de migration des espèces en interaction. ACE a été développée comme un outil pour l'identification et la quantification des interactions biomoléculaires et pour l'analyse sélective de biomolécules complexes interagissant spécifiquement avec le partenaire d'affinité présent dans le tampon de séparation à l'intérieur d'un capillaire. La technique ACE permet de déterminer les

stœchiométries des complexes biomoléculaires formés à l'intérieur du capillaire ainsi que les deux constantes de liaison (stabilité, association), car les partenaires libres et en complexe ont des vitesses de migration différentes [65].

Depuis les premiers travaux utilisant la CE pour l'étude des ligands-récepteurs [74], ACE a été développée et appliquée avec succès pour l'analyse d'un large éventail d'interactions biomoléculaires. Le nombre d'articles sur le sujet est en augmentation [75], ce qui reflète l'intérêt pour cette méthode d'investigation, d'analyse des interactions d'affinité dans divers domaines, y compris les applications pharmaceutiques avec la conception et la découverte de médicaments, différents sujets de bioanalyse et la découverte de biomarqueurs. Cela a conduit au développement d'une nouvelle méthode d'électrophorèse, appelée électrophorèse capillaire en non-équilibre de mélanges en équilibre (de l'anglais « nonequilibrium CE of equilibrium mixtures », NECEEM) par Berezovski *et al.* [76]. NECEEM a considérablement augmenté l'arsenal de méthodes disponibles pour l'étude des interactions entre l'ADN et les protéines. Il est très sensible et pourrait être utilisé pour la détermination des paramètres cinétiques. Ces analyses de protéines basées sur les aptamères (sondes d'affinité synthétiques) ne nécessitent qu'une quantité infime d'échantillon. Plus tard, un autre travail de recherche basé sur les interactions entre les aptamères ADN et les protéines a permis d'identifier des aptamères à haute affinité de liaison en quelques cycles de SELEX (de l'anglais « Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment ») en utilisant la CE. Il a marqué le point de départ d'une nouvelle méthode – CE-SELEX [77].

I-2.3 La spectrométrie de masse (MS) dans le contexte de l'analyse des interactions biomoléculaires

Au milieu du XX^e siècle, la spectrométrie de masse (MS) est considérée comme un outil essentiel par les scientifiques, dont les études portent sur l'analyse de petites molécules ou de composés volatils. Son application aux questions biologiques a réellement débuté à la fin des années 1980, avec l'introduction et le développement des méthodes d'ionisation douces qui ont considérablement élargi l'utilisation de la MS. Les tout premiers articles de MS consacrés aux complexes non covalents sont apparus dans la littérature au début des années 1990. Ces études étaient principalement axées sur les complexes protéines-ligands, mais elles ont rapidement été accompagnées de celles qui démontraient que des interactions protéine-protéine étaient maintenues en phase gazeuse [78], [79]. Depuis lors, des améliorations considérables dans les domaines de la technologie instrumentale et de la méthodologie expérimentale, ont permis d'augmenter la gamme des assemblages biomoléculaires pouvant être analysés par MS [80], [81]. Grâce à ces progrès, 20 ans après les premiers articles publiés, des assemblages macromoléculaires, comme des virus intacts, des ribosomes comprenant de nombreux composants, des assemblages complexes de protéines membranaires hydrophobes, des oligomères amyloïdogènes hétérogènes, difficiles à analyser et des chaperons moléculaires dynamiques ont tous été interrogés avec succès [85] - [89]. En bref, en plusieurs décennies, la MS est passée de l'outil du physicien et du chimiste axé sur les ions métastables et l'analyse de leurs voies de fragmentation, à une technologie largement

répandue ayant des applications dans divers domaines, notamment la biologie structurale et l'interactomique, intéressant directement la caractérisation des interactions biomoléculaires [87].

I-2.3.1 Intérêt de la spectrométrie de masse pour l'étude des complexes non covalents

L'étude des interactions non covalentes par MS est un domaine de recherche actif. Elle est devenue possible parce que l'instrumentation et la méthodologie, permettant le maintien et l'étude des complexes non covalents en phase gazeuse, ont été développées rapidement depuis les premières expériences d'électronébulisation de macromolécules biologiques. Aujourd'hui, la MS peut fournir des informations sur tous les niveaux d'organisation des protéines. Les instruments, les méthodes les plus récentes permettent l'étude topologique de complexes protéiques intacts avec une grande sensibilité et une gamme de masse théoriquement illimitée [84]. Les principaux avantages de la MS pour l'étude des interactions non covalentes sont sa sensibilité, sa capacité de séparation à haute résolution et sa large applicabilité. La MS permet l'interrogation d'assemblages biomoléculaires transitoires dans le contexte de mélanges complexes [83].

La capacité de la MS à permettre l'étude d'assemblages hétérogènes et polydispersés, en plus de sa capacité à déterminer sans ambiguïté, la stœchiométrie d'assemblages biomoléculaires, a dans un premier temps fait de la MS, un outil complémentaire des analyses aux rayons X, ou de la microscopie électronique [88], [89]. Puis, les succès indéniables de la MS pour la caractérisation des complexes non covalents ont fait passer cette technique d'une approche complémentaire à un outil de biologie structurale autonome [85].

I-2.3.2 Techniques de caractérisation directe des complexes non covalents

Les spectromètres de masse sont des instruments polyvalents qui sont utilisés pour l'analyse, tant qualitative que quantitative, d'une large gamme de composés allant des gaz simples aux biopolymères complexes. Pour analyser un échantillon, le spectromètre de masse nécessite de transformer l'analyte en ions en phase gazeuse. Les ions résultant sont triés en fonction de leur rapport masse/charge (m/z) en utilisant des champs électriques ou magnétiques (ou une combinaison des deux), ce qui fournit des signaux (représentés sous forme de pics sur le spectre de masse) correspondant au rapport m/z et à l'intensité relative (abondance) de chaque espèce ionique détectée [90]. Ainsi, les trois principaux composants communs à tous les spectromètres de masse sont la source d'ions (où les molécules analytes sont transférées en phase gazeuse et ionisées), l'analyseur de masse (au sein duquel les ions générés sont séparés selon leur rapport m/z) et le détecteur d'ions (où le courant ionique est converti en courant électrique et les intensités des signaux sont déterminées). Un spectromètre de masse typique est schématiquement représenté, Figure I-4. Une partie électronique et informatique est nécessaire pour contrôler l'instrument, enregistrer et traiter les données générées.

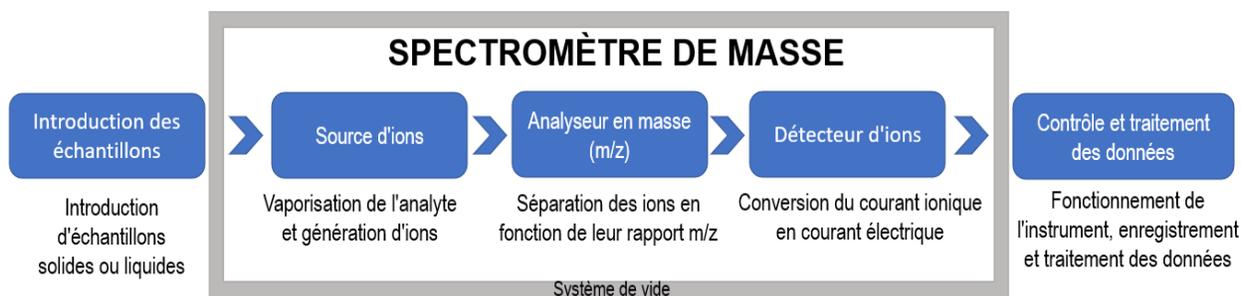


Figure I-4: Représentation schématique du spectromètre de masse.

Aujourd'hui, les complexes non covalents peuvent être analysés par MS "native" dans le but de définir les relations structure-fonction des assemblages biomoléculaires. Ces assemblages à caractère non covalent doivent être conservés avec leur structure quaternaire native dans le spectromètre de masse [91]. La spectrométrie de masse native (MS native) est définie comme le processus par lequel de grandes biomolécules et leurs complexes peuvent être transférés d'une existence fonctionnelle tridimensionnelle en phase liquide à la phase gazeuse par le biais d'un processus d'ionisation douce. Les conditions expérimentales de la MS native sont capables de préserver largement les interactions non covalentes, l'état natif et l'action biologique et la fonctionnalité associées de la molécule et des complexes moléculaires.

L'une des méthodes les plus couramment utilisées en « MS native » est la spectrométrie de masse en tandem (également appelée MS/MS ou MSⁿ). Dans ce cas, des ions précurseurs peuvent être sélectionnés et activés par collision pour induire des fragmentations. Cette approche, également appelée dissociation induite par collision, a été exploitée lors de la séparation du chevauchement de stœchiométries multiples d'un complexe ribosomique [92]. Elle a été utilisée avec succès pour la mesure précise de la masse de la capsid du virus de l'hépatite B dans la gamme des 3-4 MDa [93], et pour la mise en évidence de la stœchiométrie de petites molécules se liant à des complexes protéiques membranaires [94].

I-2.3.3 Sources d'ions

Les molécules sont globalement neutres électriquement, il est donc impossible de les manipuler par des champs électriques ou magnétiques. La source d'ions sert à transformer l'échantillon en ions en phase gazeuse, et ce processus s'accompagne d'un transfert d'énergie aux ions. Les critères d'ionisation des molécules dépendent des propriétés intrinsèques des molécules composant l'échantillon (c'est-à-dire la stabilité thermique et chimique, la volatilité, la taille, etc.) De nombreuses sources d'ionisation existent aujourd'hui, permettant la formation d'ions, soit *in situ*, directement à l'intérieur de l'analyseur, ou dans une zone sous vide en amont de l'analyseur, soit à l'extérieur (source externe à pression atmosphérique). Jusqu'aux années 1990, des sources d'ions situées dans une chambre sous vide du spectromètre de masse étaient principalement utilisées. La percée technologique bien-connue, qui a initié l'implication de la MS dans le domaine de la biologie, a été l'introduction de deux techniques d'ionisation douce: l'ionisation par électrobulbion (de l'anglais « electrospray ionization », ESI) [95] et la désorption/ionisation laser assistée par matrice (de l'anglais « matrix-assisted laser desorption/ionization »,

MALDI) [96], [97]. Le développement de ces méthodes a été le point de départ d'une augmentation significative de la diversité des applications en MS.

Ionisation par électronébulisation (ESI)

L'introduction de la technique ESI a constitué une première étape essentielle au développement de la MS pour la biologie, car elle a permis le transfert de protéines, des macromolécules en solution, en ions en phase gazeuse. Cette ionisation "douce" était bien plus avancée que les approches précédentes qui entraînaient des décompositions importantes, et dont l'efficacité s'avérait limitée pour des analytes de poids moléculaires élevés (la taille maximale était d'environ 10 kDa avant l'utilisation de la source ESI) [98]. Un autre point clé a été atteint plus tard: il a été démontré que les assemblages de protéines (complexes non covalents) pouvaient être transférés dans le vide du spectromètre de masse sans leur dissociation [78], ce qui a permis par la suite de mesurer leur masse avec précision et exactitude (Figure I-5).

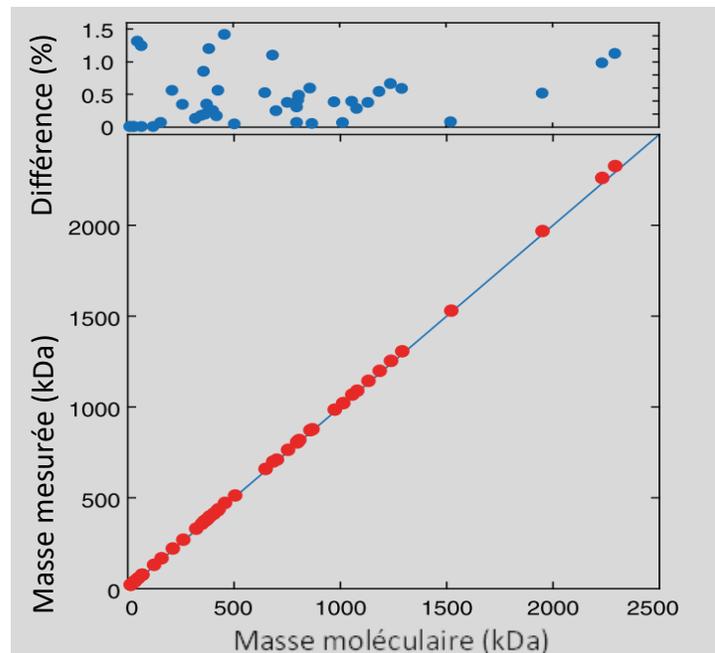


Figure I-5: Exactitude et précision de la mesure de la MS des protéines et de leurs complexes. Une comparaison entre la masse calculée et celle mesurée par nanoESI-MS. Un petit écart entre les données expérimentales (points rouges) et une corrélation 1:1 entre la masse attendue et la masse mesurée (ligne bleue) résulte de la liaison résiduelle du solvant et du tampon, et est inférieur à 1,5% pour tous les assemblages indiqués (points bleus). Adopté de [83].

Le principe de la technique ESI consiste à générer, à la pression atmosphérique, des gouttelettes d'un solvant conducteur contenant un analyte dissous, en nébulisant une solution acheminée par capillaire métallique, au niveau duquel est appliqué une haute tension (~2-5 kV). Grâce à un champ électrique intense, accompagné ou non d'une assistance pneumatique, la solution contenant l'échantillon est nébulisée en un fin brouillard de gouttelettes qui s'évaporent continuellement pendant leur vol, d'abord à la pression atmosphérique puis à basse pression dans

une série de chambres progressivement séparées, reliant la source d'ions à l'analyseur en masse. La densité de charge des minuscules gouttelettes augmente au fur et à mesure de leur évaporation, ce qui entraîne la désintégration des gouttelettes et leur transformation en ions en phase gazeuse. Le champ électrique appliqué dirige également les ions formés vers des cônes d'échantillonnage servant de barrières pour maintenir le vide de l'analyseur. La source ESI présente l'avantage de fonctionner à température relativement basse et à la pression atmosphérique, ce qui permet d'éviter la rupture de liaisons (non) covalentes et a permis l'expansion de cette technique pour des analyses biologiques où la plupart des composés sont polaires et solubles dans l'eau.

Une autre caractéristique unique et très importante de la source ESI est qu'elle produit souvent des ions à charges multiples, surtout avec l'augmentation de la masse moléculaire de l'analyte. Cela a facilité l'utilisation de spectromètres de masse limités en gamme de masse (m/z), pour l'analyse des biopolymères intacts et a également permis des analyses MS/MS très sensibles, permettant la détection de biomarqueurs dans des milieux complexes [99]. La source ESI (ou nanoESI, une source miniaturisée pouvant traiter des volumes de liquide considérablement plus faibles de l'ordre du nL), pouvant générer des espèces à charges multiples, peut entraîner un chevauchement des signaux sur l'axe (m/z) lorsque plusieurs espèces sont présentes. Il existe plusieurs approches pour surmonter cet inconvénient, comme l'utilisation de microarrays et d'autres techniques de séparation et de purification des échantillons, la séparation préalable par voie chromatographique, des méthodes de préparation des échantillons de sérum (par exemple, élimination des protéines en grande quantité, fractionnement du sérum) [99]. Une étape importante vers l'analyse par MS entièrement automatisée avec déconvolution des spectres de masse de protéines et des assemblages de protéines a été franchie avec la création d'un logiciel dédié [99]-[101].

Aujourd'hui, la spectrométrie ESI-MS est devenue l'un des piliers de la spectrométrie de masse biomoléculaire, avec de très nombreuses applications en biologie structurale (protéomique, glycomique, métabolomique...). Les progrès des technologies et des protocoles de préparation des échantillons ont permis d'extraire beaucoup plus d'informations à partir des échantillons biologiques, que la simple mesure de masse moléculaire (ou valeur m/z) [80]. L'application de l'ESI-MS, notamment en condition native, a été décrite dans les travaux de Chen *et al.* [103] pour étudier des complexes biomoléculaires non covalents, tels que les complexes protéiques membranaires (Figure I-6, [104]). Bien que s'y prêtant moins, la technique MALDI-MS a également été employée pour l'étude de diverses interactions non covalentes.

Une revue récente sur les progrès et la compréhension des principes de l'ESI-MS pour l'étude des interactions non covalentes a été publiée par Chingin *et al.* [105]. Ce travail aborde l'accélération des réactions chimiques dans les microgouttelettes chargées, ainsi que l'association et la dissociation des complexes protéines-ligands dans les microgouttelettes, qui fournissent des preuves que la chimie des protéines confinées dans un micro-environnement se déroule de manière différente de celle en solution.

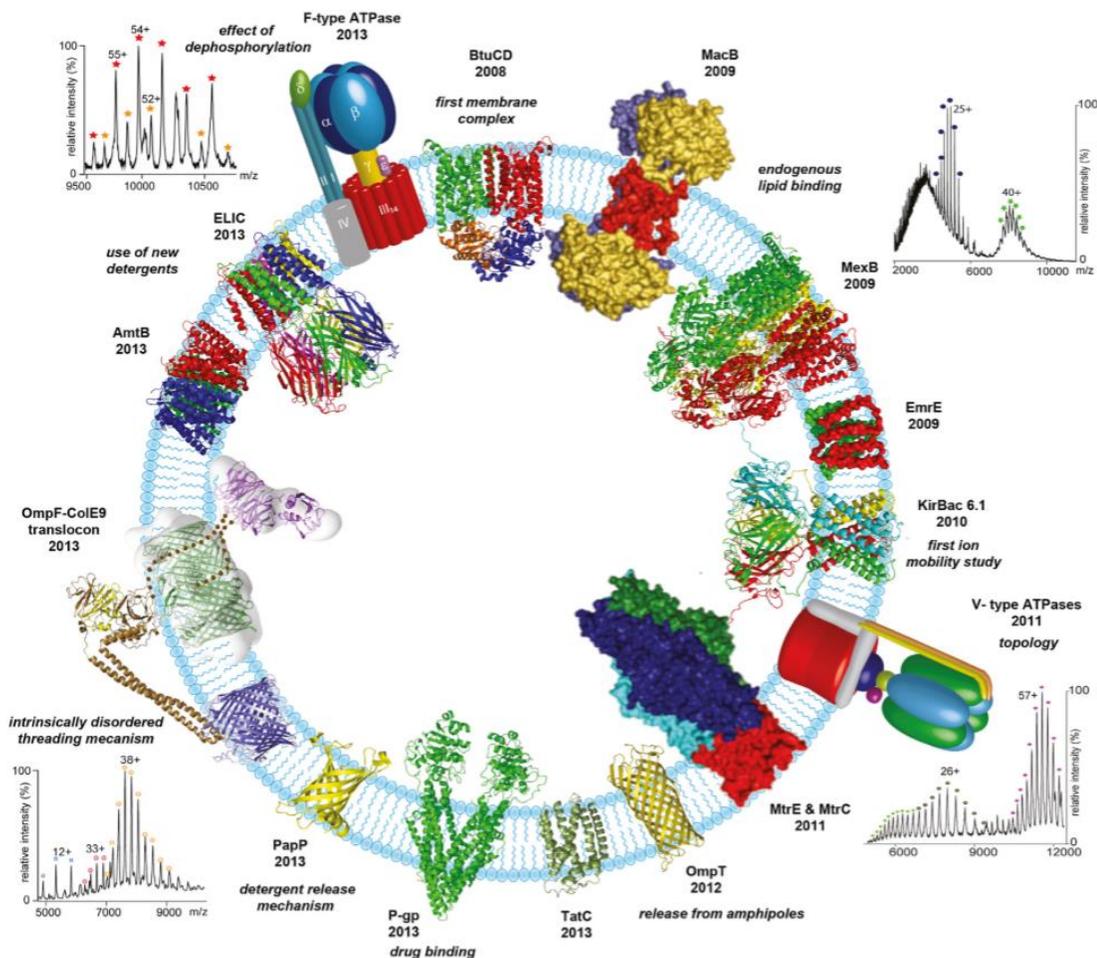


Figure I-6: Complexes de protéines membranaires étudiés par ESI-MS natif au cours des années 2008-2013. Adopté de [104].

Désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI)

La technique MALDI-MS est une autre méthode d'ionisation, alternative à l'ESI, qui permet l'analyse de molécules de grandes tailles, telles que les protéines, les acides nucléiques et certains polymères synthétiques. Comme son nom l'indique, l'analyte est ionisé à l'aide d'un petit composé organique, qu'on nomme « matrice », par exemple de l'acide sinapinique ou de l'acide dihydroxybenzoïque, qui possède un groupe aromatique capable d'absorber l'énergie des photons émis par un laser UV. La technique MALDI est classée parmi les méthodes d'ionisation "douce" car cette méthode limite la décomposition des molécules « échantillon » sous irradiation laser en les dispersant dans la matrice (généralement, les rapports analyte/matrice sont compris entre 1:100 et 1:10000). D'abord, l'analyte est co-cristallisé avec un excès de matrice, et, après évaporation du solvant, le mélange est exposé (à l'intérieur de la chambre à vide) aux tirs laser. Cela provoque l'évaporation instantanée de la matrice, entraînant avec elle les molécules de l'analyte. Au cours de ce processus, la matrice forme des ions réactifs qui protonent ou déprotonent les molécules de l'analyte en les transformant en ions d'analyte (Figure I-7). Le choix de la matrice dépend du composé à analyser, car ces paramètres sont essentiels pour l'efficacité de l'ionisation.

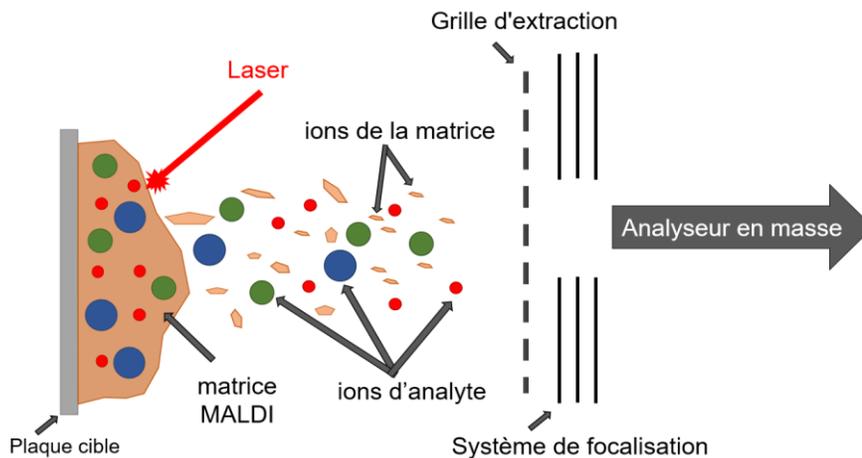


Figure I-7: Principe de la désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI). Le laser pulsé irradie le mélange échantillon/matrice, déclenchant la désorption de l'échantillon en présence de matrice. Les molécules analytes sont ionisées et les ions sont ensuite extraits sous l'effet d'un champ électrique. Ces ions traversent les lentilles de focalisation, puis sont dirigés vers l'analyseur de masse.

Contrairement à l'ESI, la majorité des ions générés en MALDI portent une seule charge, par conséquent, la plage en m/z de l'analyseur de masse doit être suffisante pour traiter les ions avec $z = 1$. L'analyseur le plus adapté et donc le type d'analyseur le plus communément associé au MALDI est l'analyseur par temps de vol (de l'anglais « time-of-flight », TOF). Ce dernier permet d'analyser des macromolécules biologiques dont la masse moléculaire peut atteindre plusieurs centaines de kDa. Les ions monochargés des spectres MALDI permettent une interprétation plus facile et plus rapide des résultats que les spectres ESI (Figure I-8).

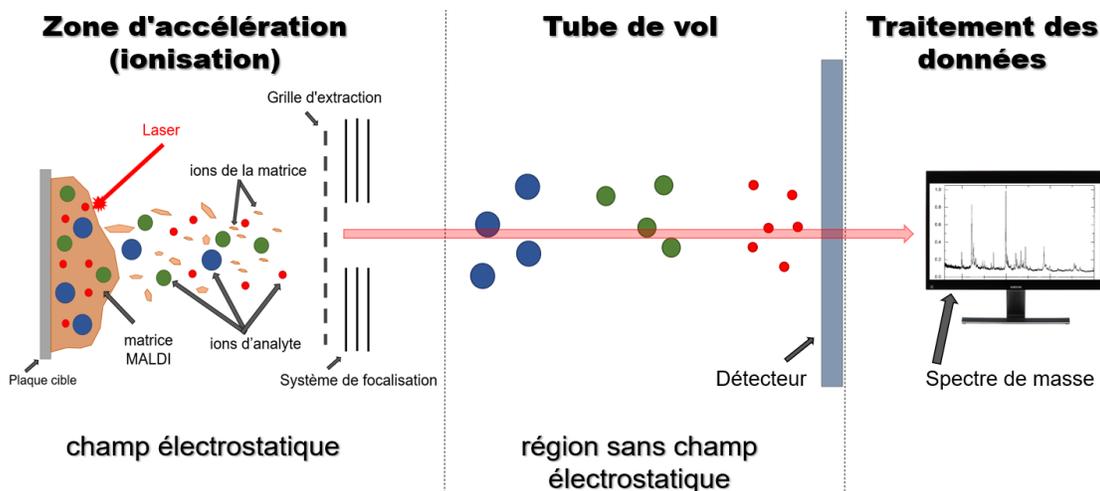


Figure I-8: Principe de la spectrométrie de masse MALDI-TOF. Les ions désorbés sont accélérés par un champ électrique, ainsi les ions acquiert tous la même énergie cinétique pour un état de charge donné. Par conséquent, les ions plus lourds atteignent des vitesses plus faibles et arrivent plus tard. La détection est basée sur la mesure du temps d'arrivée des ions, ce qui permet de déterminer le rapport m/z .

Par rapport au MALDI, la technique ESI est beaucoup plus exploitée pour l'étude des complexes non covalents, en particulier ceux des protéines. Cela peut s'expliquer par les exigences spécifiques de la préparation d'échantillons, notamment l'évaporation du solvant et l'utilisation de matrices, souvent acides, pour les expériences MALDI [105], [106]. Ces conditions sont loin d'être "idéales", surtout si les recherches sont axées sur la préservation de l'état physiologique du complexe étudié. De plus, l'utilisation de sels, qui sont l'ingrédient le plus courant des tampons biologiques, entrave souvent la cristallisation de la matrice, ce qui rend impossible l'expérience MALDI. Cet inconvénient peut être surmonté par l'utilisation de sels volatils et de matrices non acides. En outre, la facilité d'utilisation, le rendement élevé, la compatibilité avec différents systèmes (c'est-à-dire les polymères naturels et synthétiques [108], les bactéries [109] et les champignons [110]), ainsi que la faible consommation de temps, leurs coûts raisonnables ont rendu les instruments de type MALDI-TOF MS très attrayants pour la recherche et la pratique clinique.

Désorption/ionisation laser depuis une surface améliorée (« Surface Enhanced Laser Desorption Ionisation », SELDI)

L'un des avantages qu'apporte la source MALDI réside dans la possibilité d'utiliser d'autres plaques cibles que la plaque en acier, généralement fournie avec l'instrument, à condition que la surface soit conductrice. Ces plaques cibles peuvent servir à la fois pour la purification de l'échantillon et pour son ionisation. Cette idée a été exploitée dans le domaine des biopuces dont l'analyse est couplée avec la MS [111], [112] ou, par exemple, en désorption/ionisation laser à partir de surface améliorée (SELDI) [113] une technique appliquée en analyse protéomique. Grâce à cette méthode, les ligands ciblés dans un échantillon se lient spécifiquement à une surface avant l'analyse par MS.

Le concept de SELDI-MS a été présenté pour la première fois au début des années 1990 par Hutchens et Yip [114]. Dans leurs travaux, les auteurs ont démontré que les sondes d'affinité chromatographiques utilisées pour enrichir spécifiquement des fragments de lactoferrine pouvaient ensuite être directement utilisées sur la plaque MALDI pour la détection par spectrométrie de masse par désorption/ionisation laser.

La SELDI-MS a été étudiée et développée par Ciphergen et est maintenant commercialisée sous le nom de ProteinChip™. Cette technologie est basée sur l'utilisation de surfaces chimiques particulières qui peuvent être utilisées pour la rétention spécifique de molécules en fonction de leur affinité ou de certaines propriétés physiques et chimiques telles que la charge, l'hydrophobie, etc. [115], [116]. Les surfaces chimiques permettent une séparation chromatographique classique tels que par échange d'ions, par partage en phase inverse ou en phase normale, ainsi que par capture d'affinité avec un métal immobilisé (de l'anglais « immobilized metal affinity capture », IMAC) (Figure I-9) [116].

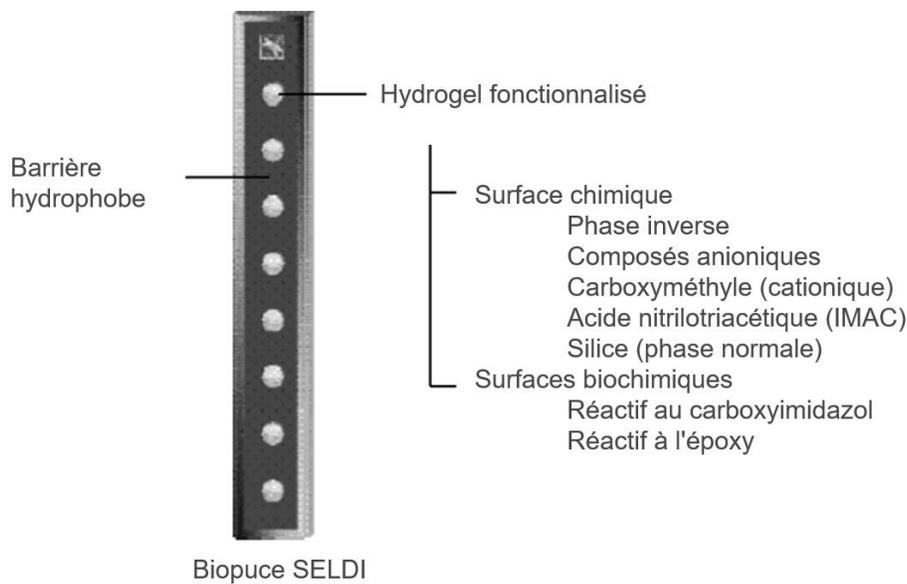


Figure I-9: Éléments d'une biopuce SELDI. La matrice est constituée d'une bande d'aluminium recouverte de verre avec des sites d'affinité et une barrière hydrophobe qui entoure ces emplacements et empêche le mouvement de l'échantillon entre les sites. Chaque site comprend un hydrogel fonctionnalisé avec des ligands chromatographiques classiques. Adopté de [116].

L'avantage du couplage direct de la rétention chromatographique avec la spectrométrie de masse a fait du SELDI-MS une méthode populaire pour le profilage général des protéines, et la découverte de biomarqueurs *de novo*, en particulier pour la comparaison de grandes populations de protéines (par exemple, des échantillons provenant de malades vs des échantillons sains) dans le but d'élucider les éléments différemment exprimés. SELDI-MS permet de capturer et d'identifier les partenaires des interactions biomoléculaires à la condition que l'un des partenaires soit immobilisé en surface. Cette technologie permet aussi de détecter et mesurer la masse des protéines ou sous-populations de protéines présentes dans un mélange complexe (sérum, plasma, extraits cellulaires etc.). Cependant, la technique SELDI-MS ne permettait pas la caractérisation cinétique des interactions biomoléculaires car la rétention de l'analyte était basée sur la chromatographie.

I-2.3.4 Autres techniques MS

Le couplage de la spectrométrie de masse avec la spectrométrie de mobilité ionique (de l'anglais « ion mobility mass spectrometry », IM-MS) est une autre technique qui a été récemment mise en œuvre en condition native. L'IM-MS a été introduite à l'origine comme un nouvel outil pour l'analyse des complexes protéiques intacts par Ruotolo *et al.* [117]. En IM-MS, les ions sont séparés non seulement sur la base de leur rapport m/z mais aussi, à l'intérieur d'une chambre de mobilité ionique remplie de gaz, en fonction de leur temps de dérive (drift time), qui dépend de leur section efficace de collision. En général, les molécules ayant une section efficace de collision plus importante (cas correspondant aux structures étendues par opposition aux conformations compactes) présentent des temps de dérive plus longs. En utilisant les temps de dérive en IM-MS, la mobilité des ions peut être convertie en section efficace de collision (ou surface moyenne

projetée de l'analyte) en phase gazeuse [84]. Bien que l'IM-MS appliquée aux complexes biomoléculaires nécessite encore une maturation, les premiers résultats ont révélé que les structures en solution peuvent être partiellement conservées en phase gazeuse [118], [120]. En combinaison avec la modélisation informatique, l'IM-MS-peut être utilisée pour générer des modèles structuraux d'assemblages biomoléculaires [118], [119]. Il existe différentes façons d'appliquer les approches basées sur la MS native pour obtenir des informations au niveau moléculaire, ainsi que la structure et la dynamique des assemblages de protéines. Elles peuvent être combinées dans des études hybrides avec d'autres approches de biologie structurale, pour fournir des informations à tous les niveaux d'organisation des protéines, de l'échelle de la submilliseconde à l'échelle de l'heure (Figure I-10). Plusieurs méthodes hybrides intéressantes seront brièvement décrites ci-dessous.

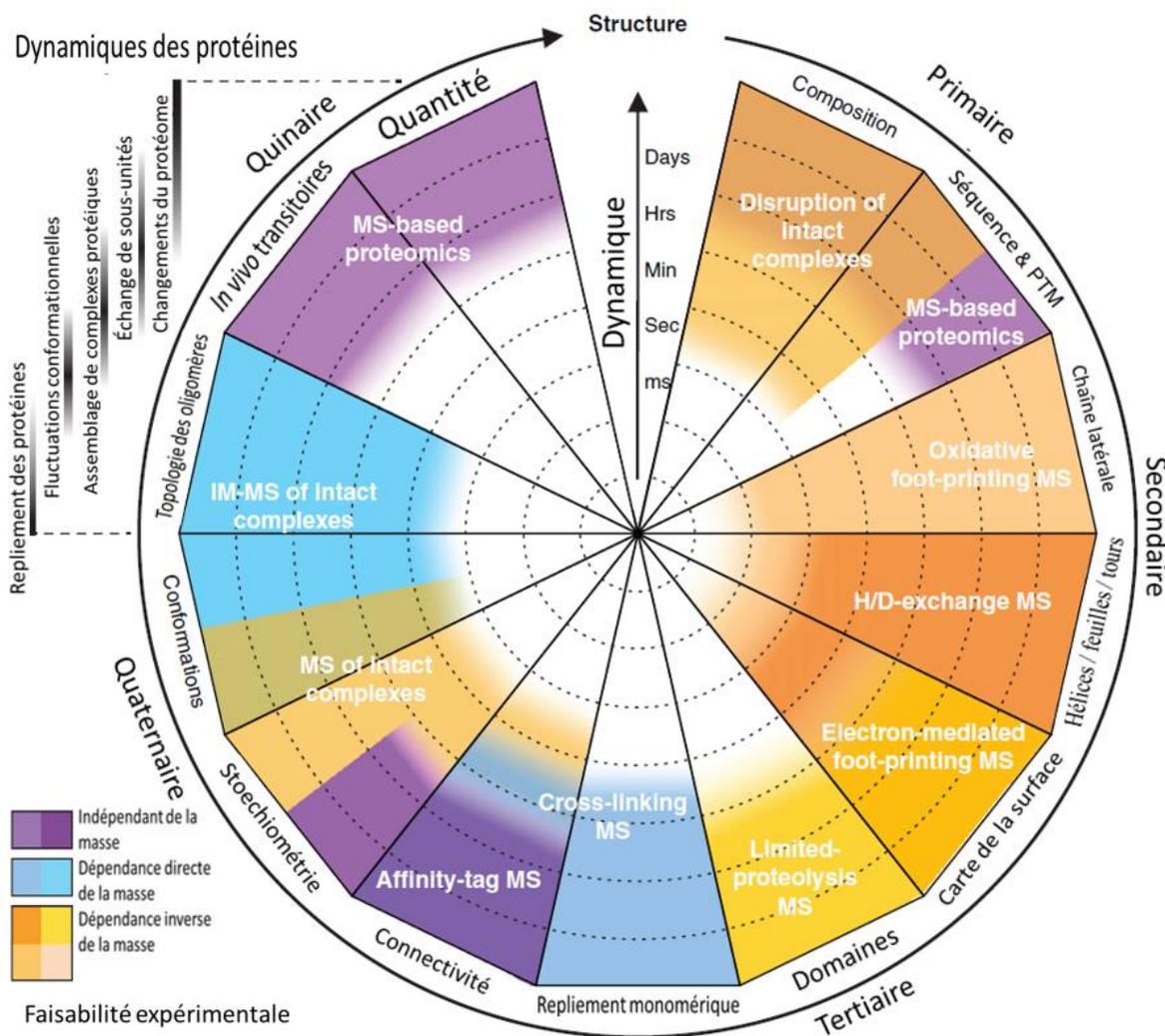


Figure I-10: Informations de structure et de dynamique accessibles aux approches basées sur la spectrométrie de masse. Adopté de [83].

MS combinée avec la protéolyse limitée (en anglais « Limited Proteolysis MS »)

La technologie de protéolyse limitée (de l'anglais « Limited Proteolysis, LiP ») est une méthode utilisée pour suivre des changements de conformation de protéines résultant de diverses causes (par exemple, modifications post-traductionnelles, interactions protéine-protéine, liaison de composés, etc.). La technique LiP est particulièrement adaptée à l'identification de ces changements car ils affectent la cinétique du clivage protéolytique au cours de la réaction LiP, qui est effectuée sur des protéines natives en utilisant la protéinase K non spécifique dans des conditions définies. Cette protéinase clive les régions accessibles dépliées, ce qui entraîne une protéolyse limitée. Après la réaction LiP, les protéines résultantes sont dénaturées et digérées avec de la trypsine, les produits de la digestion sont ensuite analysés et les peptides sont quantifiés par MS.

Le couplage de la LiP avec le mode d'acquisition SRM (de l'anglais « selected reaction monitoring ») a permis de sonder les transitions structurales des protéines dans des environnements biologiques complexes à grande échelle. Elle a permis de sonder des modifications structurales subtiles, ou prononcées de protéines provenant de cultures de levure soumises à une transition métabolique [120].

MS combinée avec de l'échange H/D (en anglais « Hydrogen exchange MS »)

La spectrométrie de masse d'échange H/D exploite la réactivité propre aux hydrogènes présents dans les protéines. Certains hydrogènes des protéines sont en échange continu avec les hydrogènes présents en solution. Si les atomes d'hydrogènes des molécules d'eau, qui sert de solvant, sont remplacés par un isotope lourd de l'hydrogène (le deutérium ^2H), le suivi du processus d'échange de l'hydrogène ^1H par ^2H devient possible en suivant les incréments de masse qui se produisent après échange H/D. Ces échanges se produisent uniquement dans les régions exposées au solvant.

Cette méthode fournit des informations très utiles, notamment sur les changements de conformation des partenaires du complexe, les voies de repliement et de dépliement des protéines et donne des informations sur l'intérieur des structures protéiques qui ne se cristalliseront pas ou ne se prêteront pas à la RMN. Elle permet également de déduire les régions d'une protéine qui sont exposées aux solvants, ainsi que leurs dynamiques, leur emplacement et les propriétés des sites et des surfaces de liaison, les constantes de dissociation et la stabilité des protéines dans diverses conditions [121].

MS combinée avec empreinte oxydative (en anglais « oxidative footprint MS »)

L'expérience de spectrométrie de masse combinée à une oxydation sélective permet de générer de l'information avec une résolution moyenne élevée (c'est-à-dire une information au niveau des résidus) en mettant en œuvre des méthodes protéomiques éprouvées, permettant l'étude de la structure primaire avant/après l'oxydation. La MS à empreinte oxydative a été développée au cours des dernières décennies. Elle est devenue une méthode puissante pour l'analyse de la structure et de la dynamique des protéines. Le principe de cette méthode consiste à marquer les résidus d'acides aminés réactifs et exposés aux solvants avec des marqueurs chimiques, puis à

utiliser le schéma des modifications révélées à partir de l'analyse protéomique « bottom-up » pour définir les structures protéiques d'ordre supérieur. Elle est souvent appliquée à la cartographie des interfaces protéine-ligand, et à la cartographie des changements conformationnels résultant de la liaison avec un ligand ou d'une mutation.

L'empreinte oxydative générée par des radicaux hydroxyles est particulièrement étudiée dans le contexte de l'analyse de la structure des protéines, du repliement des protéines, de la dynamique des protéines et des interactions protéine-protéine et protéine-ADN. Les modifications conformationnelles des protéines ou des complexes protéiques, utilisant la radiolyse synchrotron pour apporter des modifications oxydatives, ont été examinées en utilisant une approche à résolution temporelle, une méthode précieuse pour l'étude de la dynamique macromoléculaire. L'empreinte protéique résolue dans le temps a été appliquée à l'étude de la dynamique des protéines qui se produit sur des périodes allant de quelques millisecondes à quelques secondes [122].

Plus récemment, l'oxydation photochimique rapide des protéines (de l'anglais « fast photochemical oxidation of protein », FPOP) – type d'empreinte protéique basée sur les radicaux hydroxyles, qui utilise un laser KrF pulsé (248 nm) permettant de déclencher l'hydrolyse du peroxyde d'hydrogène – a été étudié par Li *et al.* Cette approche produit des radicaux hydroxyles en solution, qui modifient ensuite la protéine *in situ*, mais elle s'étend à d'autres espèces réactives, dont les carbènes. Ces travaux décrivent l'application du FPOP pour suivre la formation d'amyloïdes et l'accessibilité au solvant du peptide amyloïde [123].

MS combinée à la purification par affinité

La purification par affinité associée à la spectrométrie de masse (AP-MS) est devenue l'une des méthodes standards pour l'étude des interactions protéine-protéine. AP-MS utilise des tags d'épitopes sur des protéines cibles comme sondes de capture par affinité pour l'identification de protéines en cours d'assemblage. Cela permet d'éviter le développement et l'utilisation d'anticorps spécifiques pour chaque nouvelle protéine cible. C'est particulièrement important dans le cas où les anticorps produits contre les protéines d'intérêt peuvent perturber le complexe protéine-protéine (si l'épitope reconnu par l'anticorps est positionné sur l'interface protéique nécessaire à une interaction). Le marquage d'affinité a été appliqué le plus largement dans la levure, où plus de 70 % des protéines exprimées ont été cartographiées en interactions protéine-protéine, ce qui a donné lieu à environ 500 complexes majeurs par analyse et regroupement de réseau [124]. Une analyse à grande échelle a été réalisée en utilisant une approche particulière - la purification d'affinité en tandem. Le principe de cette méthode est similaire à la stratégie de marquage des épitopes, mais l'utilisation séquentielle de deux tags au lieu d'un seul a simplifié la stratégie analytique choisie pour l'identification des protéines par MS et a réduit la nécessité de valider les protéines identifiées en tant que véritables partenaires d'interaction [125]. Grâce à l'AP-MS, divers complexes protéiques de protéines humaines, de la *Drosophila* et de l'*Arabidopsis* ont également été étudiés [124].

MS combinée à la réticulation (cross-linking)

La réticulation chimique ou « cross-linking » permet de convertir les interactions non covalentes entre les protéines ou simplement leur proximité, en liaisons covalentes par une "connection" artificielle entre les partenaires d'interaction. Les molécules fusionnées peuvent résister à des conditions dénaturantes et peuvent être analysées par des méthodes qui dissocient habituellement les complexes protéiques. Le cross-linking chimique avec la MS permet l'identification des résidus d'acides aminés à proximité les uns des autres au sein des protéines et des complexes protéiques. Cette méthode a été principalement utilisée pour fournir des informations structurales à partir de complexes protéiques isolés [126].

Les récents développements en « cross-linking MS » ont fourni des données interactomiques à grande échelle, ou pour des systèmes biologiques d'une extrême complexité: organelles isolées, lysats cellulaires, particules de virus, cellules intactes de bactéries et de mammifères en culture et échantillons de tissus. Une revue décrivant ce nouvel outil pour sonder les conformations et les interactions des protéines directement au sein des systèmes vivants mentionnés ci-dessus a été récemment publiée par Chavez *et al.* [127].

I-2.4 Le besoin d'une nouvelle plateforme d'analyse multidimensionnelle

La MS présente des avantages considérables par rapport à d'autres techniques expérimentales, dont trois sont particulièrement importants en biologie structurale. Tout d'abord, la MS s'applique largement, permettant ainsi l'étude de complexes qui varient en termes de masse et de taille, de solubilité et de stabilité, ainsi que de compositions oligomériques (partenaires liés ou dispersés). Deuxièmement, comme il a été mentionné précédemment, la MS est une technologie de séparation à haute résolution qui permet l'analyse, l'identification et la quantification des différents constituants d'un mélange complexe. Et enfin, les faibles limites de détection et de quantification sont l'un des avantages les plus importants de la MS. Ainsi, cette dernière permet d'étudier des quantités assez faibles d'échantillons dilués, ce qui correspond à une situation courante dans le cas de la détection de biomarqueurs [83]. Néanmoins, la MS ne peut pas fournir directement d'informations sur la cinétique ou la thermodynamique des interactions biomoléculaires, et il faut donc la combiner à une autre technique pour étudier des processus dynamiques.

Les techniques d'analyse par simple quantification de l'analyte capturé, ont des limites liées à la capture non spécifique, qui sont incompatibles avec l'étude des biomarqueurs dans un milieu complexe. Les limites intrinsèques des molécules couramment utilisées comme récepteurs, les anticorps par exemple, peuvent conduire à des réponses ambiguës lorsqu'elles sont utilisées dans des tests biologiques, car elles sont incapables de discriminer les isoformes d'une protéine cible qui serait un marqueur d'une pathologie [128]. C'est principalement le cas lorsque la structure de la protéine est modifiée (délétion de séquence par exemple autour du site de l'épitope), ou lorsque la protéine a été altérée par des modifications post-traductionnelles. En outre, les anticorps peuvent être une source d'adsorption non spécifique en présence de pools protéiques très complexes, tels que le plasma ou les extraits cellulaires. C'est la raison pour laquelle de nombreux tests

immunologiques existants (tests directs ou en sandwich) ne sont pas suffisamment précis et peuvent donner une quantification biaisée des antigènes, sans discrimination d'une sous-population. Dans certains cas, ces tests biologiques doivent être repensés afin de prendre en compte la coexistence de variants protéiques.

Le besoin croissant de découvrir de nouveaux biomarqueurs, et de diagnostics cliniques sensibles, nécessite de mettre au point de nouveaux instruments d'analyse, qui fourniraient des informations plus exhaustives, et plus complètes sur la structure et les propriétés d'interaction des espèces capturées. Aujourd'hui, la spectrométrie de masse, combinée à une technique multiplexée, semble être le meilleur outil analytique pour la capture et l'analyse de biomarqueurs, car elle permet une identification sans ambiguïté des analytes par séquençage et interrogation de banques de données, fournissant ainsi de nouvelles informations permettant la découverte, ou la réévaluation de biomarqueurs connus, et ainsi que de leurs variants structuraux. Des travaux récents sur le couplage des microarrays avec la MS démontrent l'utilité de cette combinaison comme plateforme analytique pour la discrimination des isoformes structurelles de protéines et la découverte de biomarqueurs [129], [130]. Toutefois, comme dans l'approche commerciale SELDI-TOF décrite précédemment, les partenaires biologiques interagissent dans une région où la qualité de l'immunocapture n'est ni visualisable, ni quantifiable avant l'analyse en masse. C'est pourquoi les techniques d'analyse protéomique, couplant la MS à la technique d'enrichissement des biocapteurs, ont tendance à se diversifier. La plupart des plateformes de couplage consistent à enrichir la surface du biocapteur avec les analytes souhaités afin de les analyser en masse directement à partir de la surface de la puce ou après élution. À ce jour, les biocapteurs les plus utilisés à cette fin sont sans aucun doute les instruments de résonance plasmonique de surface (de l'anglais « surface plasmon resonance », SPR) qui seront décrits dans le chapitre suivant. Néanmoins, de nombreuses modifications et ajustements doivent être effectués sur les systèmes existants afin de mettre en œuvre une plateforme d'analyse fiable et efficace [128].

Chapter II. Développement des plateformes de biodétection de complexes

II-1 Résonance plasmonique de surface (SPR)

La résonance plasmonique de surface (SPR) est un phénomène optique découvert en 1902 par R. Wood, qui a observé un motif de bandes "anormales" sombres et blanches dans la lumière réfléchiée par le miroir avec un réseau de diffraction induit par une lumière polychromatique [131].

Ce phénomène n'a été théoriquement interprété qu'en 1941 par U. Fano et réellement étudié qu'à partir de 1968 avec le développement des configurations d'Otto [132] et de Kretschmann et Raether [133]. À ce moment, deux approches principales pour exciter la résonance plasmonique de surface ont été proposées: l'atténuation de la réflexion totale dans les systèmes à base de couple métal-diélectrique (à base de prismes) et la diffraction au niveau de réseaux de diffraction.

La dernière, avec l'utilisation de systèmes basés sur des réseaux de diffraction pour la détection par SPR, a été utilisée par Cullen *et al.* [134]. Ce type de capteurs a été étudié plus tard dans les années 90 [135], [136]. Cependant, la première approche utilisant des systèmes à base de prismes est devenue la plus populaire et la plus répandue. La raison de son succès est la relative simplicité et sa polyvalence; cette méthode a été largement appliquée pour la caractérisation cinétique de divers systèmes. Elle a été utilisée avec succès pour la détection et l'analyse des réactions immuno-chimiques (plus précisément pour la détection des gaz et la biodétection) par SPR en 1983 [137]. On constate un intérêt grandissant depuis. Le nombre d'articles sur le sujet a augmenté de façon exponentielle - à ce jour, on dénombre environ 24 000 articles dans "PubMed" avec le mot-clé "Surface Plasmon Resonance" (Figure II-1).

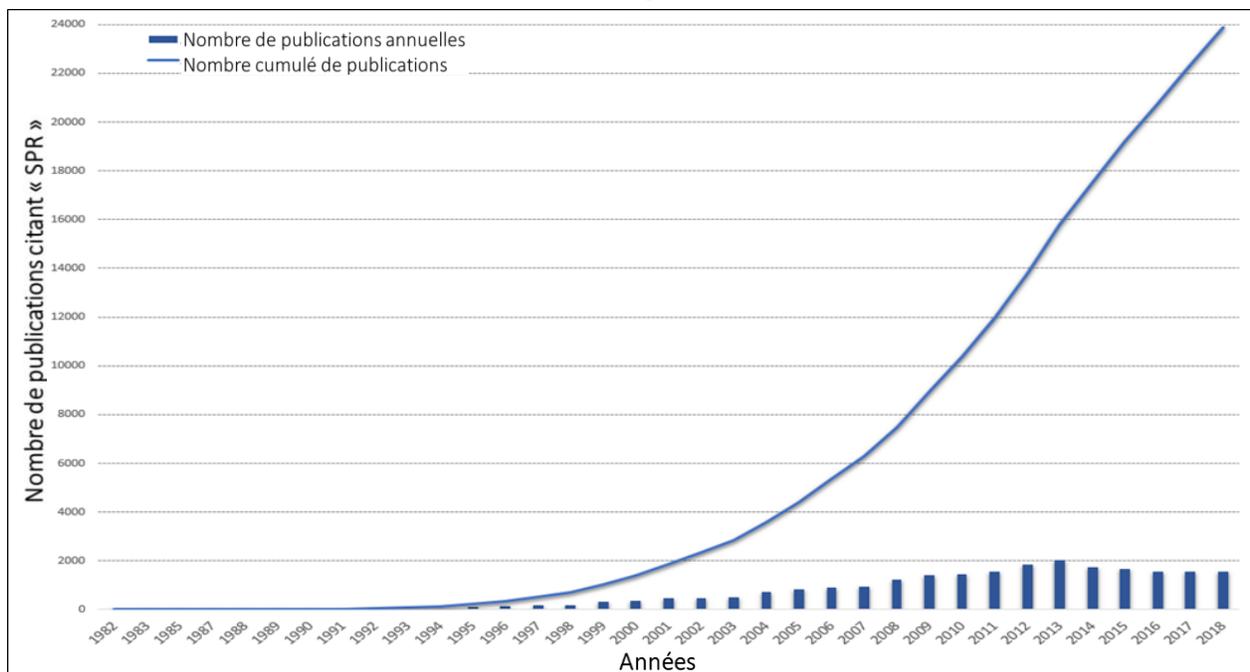


Figure II-1: Graphique représentant le nombre de publications citant « SPR » comme mot-clé. La courbe bleue représente le nombre total d'articles, cumulés depuis 1982 sur PubMed. Les barres bleues représentent le nombre d'articles référencés par an.

Dès les années 90, après sa première utilisation pour l'analyse en temps réel d'un système biologique, la SPR est devenue une importante technologie optique de biodétection sans marquage [138]. C'est à ce moment que le développement des surfaces de capteurs appropriées a commencé, et cela a abouti à la conception d'instruments modernes utilisés dans divers domaines de la biochimie, de la biologie et des sciences médicales en raison de sa nature « sans marquage », non invasive et des possibilités de détection en temps réel. Depuis lors, différents fabricants développent et améliorent en permanence de nouveaux systèmes SPR.

II-1.1 Théorie et dispositifs

La SPR est un phénomène physique qui peut être exploité pour détecter les changements d'indice de réfraction à la surface d'un capteur. Dans le cas le plus fréquent - la configuration de Kretschmann - le capteur est composé d'un substrat diélectrique (généralement un substrat de verre) avec un mince revêtement de métal noble (généralement de l'or). La lumière traverse le substrat et est réfléchiée par le film métallique (Figure II-2). Aux angles d'incidence de réflexion interne totale (TIR), une partie de l'énergie lumineuse interagit avec le revêtement de métal noble et crée une onde plasmonique de surface évanescente à l'interface entre l'échantillon et la surface du film métallique [139].

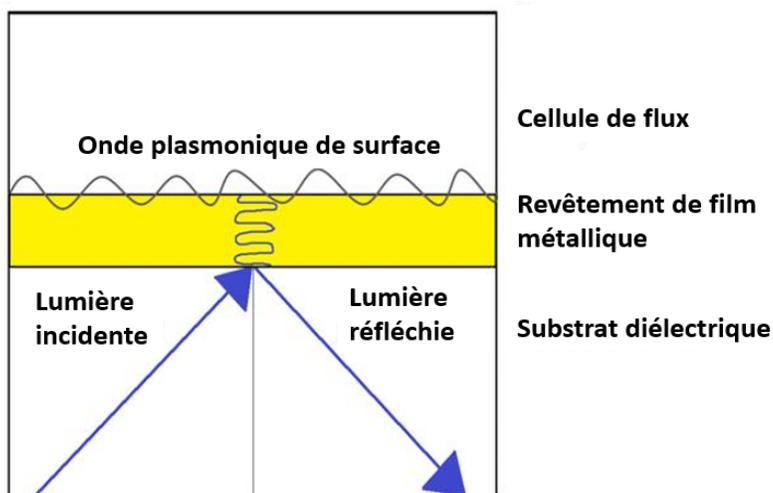


Figure II-2: Présentation schématique de l'installation expérimentale SPR.

Cette onde évanescente interagit avec les électrons libres présents dans la fine couche métallique, et son énergie est partiellement absorbée, ce qui provoque une réduction de l'intensité de la lumière réfléchiée. L'angle de résonance auquel un minimum d'intensité de lumière réfléchiée est produit est fonction de l'indice de réfraction de la solution à proximité de la couche de métal noble sur la face opposée de la surface du capteur. Cet angle particulier du rayon incident nécessaire pour maintenir l'onde plasmonique de surface est appelé angle SPR et est très sensible aux changements d'indice de réfraction au voisinage de la surface (lié au changement de masse), et ce sont ces changements qui sont utilisés pour suivre l'association et la dissociation des partenaires biomoléculaires.

Les capteurs SPR n'examinent les événements ne se produisant qu'à une proximité très limitée, ou dans un petit volume fixe, au voisinage de la surface du métal. La profondeur de pénétration du champ électromagnétique (également appelé champ évanescent) pour laquelle un signal est observé ne dépasse généralement pas 200 nm, et diminue de manière exponentielle avec la distance par rapport à la couche métallique à la surface du capteur. La profondeur de pénétration du champ évanescent est fonction de la longueur d'onde du rayon incident [140].

Le capteur SPR entièrement intégré est un modèle optique très sensible, statique et stable. À quelques exceptions près, comme Biacore™ Flexchip [141], qui est configuré comme un capteur à réseau [142], la configuration de Kretschmann est généralement adoptée. Différents montages expérimentaux peuvent être utilisés avec cette configuration. Le choix des montages comprend plusieurs options: goniomètre à balayage d'angle, faisceau focalisé et angle fixe (Figure II-3 A-C respectivement).

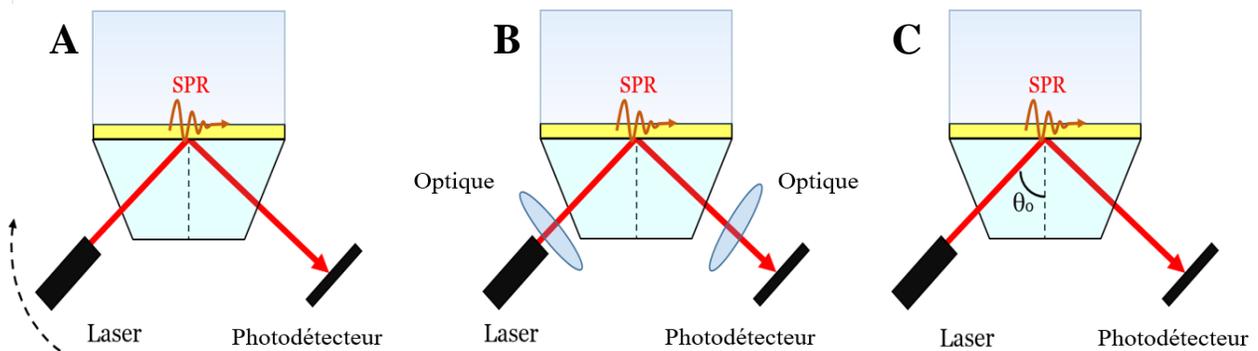


Figure II-3: Montages expérimentaux avec configurations de Kretschmann : goniomètre à balayage d'angle (A), faisceau focalisé (B) et angle fixe (C).

Dans la technologie de détection SPR basée sur le goniomètre à balayage angulaire, le laser et le photodétecteur sont tous deux reliés et se déplacent ensemble, offrant une large plage de balayage angulaire couvrant à la fois les phases liquide et gazeuse dans une seule installation mécanique. L'approche goniométrique permet également de collecter la courbe SPR complète avec une grande précision en fournissant des informations sur l'angle absolu. Elle permet une caractérisation optique complète des fluides et des couches ultra-minces [143].

Les prochains montages expérimentaux (faisceau focalisé/angle de balayage et angle fixe) partagent le même principe de fonctionnement et leur description est fournie ci-dessous.

Un faisceau de lumière émise par des LED passe à travers un polariseur et se réfléchit sur la surface métallique de détection. Un réseau de détecteurs mesure alors l'intensité de la lumière réfléchie et détermine l'angle sous lequel la lumière interagit par résonance avec les électrons libres à la surface du film métallique (observée comme une atténuation ou un creux dans le signal). Lorsque la masse s'accumule à la surface du capteur à la suite d'une interaction (et modifie les conditions d'excitation SPR), l'indice de réfraction change et un décalage de l'angle SPR se produit. Après le remplacement de l'échantillon par un tampon, la masse à la surface diminue

pendant la phase de dissociation et avec une diminution ultérieure du niveau de réflectivité (Figure II-4 A). En répétant ce cycle à différentes concentrations, on peut calculer les taux d'association et de dissociation d'une interaction biomoléculaire.

Les méthodes basées sur la SPR offrent deux possibilités pour assurer le suivi du processus de liaison intermoléculaire à la surface du capteur: 1. la mesure du déplacement de l'angle SPR (appelé "SPR dip") pendant la liaison des partenaires biomoléculaires à l'aide du montage expérimental de faisceau focalisé/angle de balayage mentionné ci-dessus; 2. lorsque l'angle SPR reste fixe, le système mesure les variations d'intensité de la lumière réfléchie ($\Delta R\%$) - montage expérimental de l'angle fixe (Figure II-4 B). Ce dernier est largement utilisé pour l'imagerie SPR (SPRi).

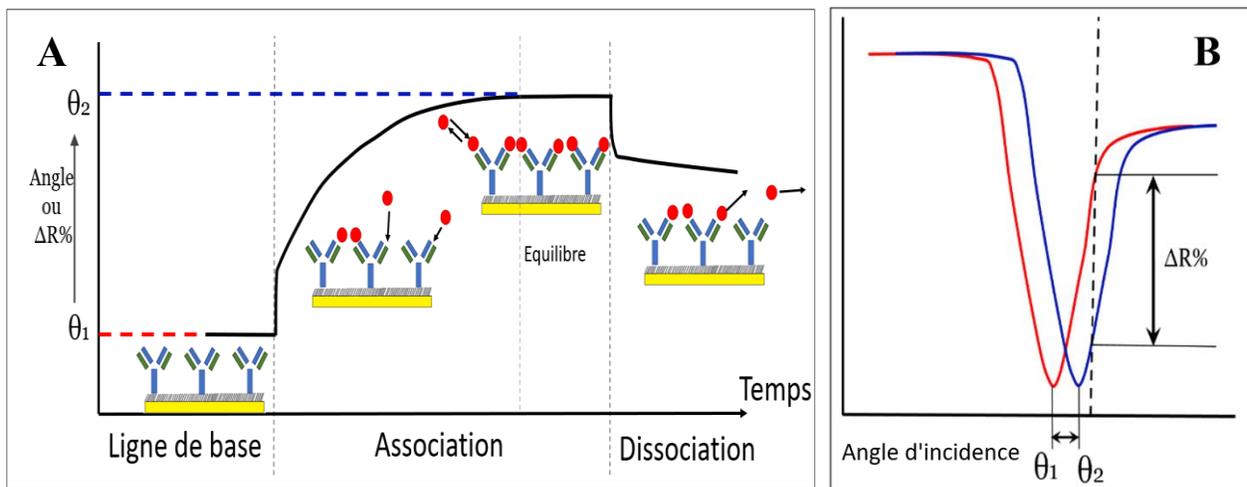


Figure II-4: Sensorgramme typique montrant le processus d'association/dissociation (A) et les changements d'angle SPR résultants (B). L'interaction ligand-récepteurs à la surface de la biopuce entraîne une accumulation de masse à la surface et affecte les conditions SPR (A). Les adsorptions des biomolécules à la surface entraînent des modifications de l'indice de réfraction et un déplacement de l'angle de résonance de la position θ_1 à la position θ_2 (B). Ce processus cinétique peut être suivi en temps réel et la quantité de ligand capturé peut être déterminée [311].

Le montage faisceau focalisé/angle de balayage est devenu "classique" pour la génération de SPR, après le lancement en 1990 de l'instrument Biacore par Pharmacia Biosensor AB. Dans cette configuration, la plage de balayage du système est relativement limitée (environ 10 degrés) par rapport au goniomètre à balayage angulaire, et il est plus difficile de caractériser les couches avec précision. Le SPR à faisceau focalisé/angle de balayage enregistre directement le déplacement de l'angle du SPR, également appelé SPR dips ($\theta_1 \rightarrow \theta_2$, Figure II-4 B), lié à la capture de l'analyte. Cette configuration est principalement utilisée pour la caractérisation cinétique des interactions biomoléculaires [144].

La technique SPR à angle fixe (ou instrument d'imagerie SPR, c'est-à-dire SPRi) est caractérisé par une plage angulaire encore plus étroite (environ 1 degré) et est équipé d'une caméra

nécessaire à la détection par imagerie. La mesure est effectuée en fixant un seul angle de travail qui génère la plus grande réponse plasmonique et en enregistrant la variation d'intensité ($\Delta R\%$, Figure II-4 B) de la lumière réfléchi à cet angle pour chaque site de récepteur également appelé régions d'intérêt (Regions of Interest, ROIs) avec affichage des interactions simultanées sous forme de sensorgrammes pour chaque ROI. La principale différence entre les montages expérimentaux faisceau focalisé/angle de balayage et angle fixe est basée sur la gamme dynamique de la variable enregistrée : décalage d'angle vs la variation de l'indice de réfraction (et, par conséquent, vs les variations de masse à la surface du capteur). Pour être plus précis, les mesures effectuées dans le montage à angle fixe sont limitées à la plage de relation linéaire entre la réflectivité et le changement de masse, ce qui correspond à une variation d'environ 5 % de la réflectivité et à une variation d'environ 50 mdeg d'angle du SPR « dip » [145], [146]. Cela peut réduire la sensibilité (rapport signal/bruit) du système par rapport à la configuration à faisceau focalisé; toutefois, cet inconvénient est compensé par une détection à haut débit (par multiplexage) et par une détection basée sur l'image produite par la caméra.

II-1.2 Imagerie par résonance plasmonique de surface (SPRi)

L'apport de l'imagerie fait franchir à la technologie SPR, une étape déterminante vers l'analyse multiplexe, l'analyse haut débit. La SPRi est une méthode sensible sans marquage permettant de visualiser l'ensemble de la biopuce à l'aide d'une caméra vidéo CCD. Cette conception permet de mettre œuvre des biopuces, où les sites d'interaction se présentent sous la forme d'une matrice (array), chaque site actif fournissant simultanément des informations SPR (Figure II-5). Une lumière polarisée monochromatique à large faisceau provenant d'une diode laser (à une longueur d'onde spécifique) illumine toute la zone fonctionnalisée de la surface de la biopuce SPRi.

La caméra vidéo CCD haute résolution fournit des images différentielles en temps réel à partir de toute la surface de la biopuce, qui peut se présenter comme une matrice contenant jusqu'à 400 sites de récepteurs actifs. Elle capture toutes les variations locales à la surface de la biopuce, comme des changements d'intensité depuis les sites actifs, fournissant des informations détaillées sur les interactions biomoléculaires, les processus cinétiques des interactions (Figure II-5 B).

Divers instruments SPRi ont été récemment commercialisés, par exemple, GWC Technologies (Madison, USA), IBIS Technologies B.V. (Hengelo, Pays-Bas), HORIBA Scientific (Orsay, France) et GE Healthcare (Uppsala, Suède). À l'exception de l'instrument IBIS iSPR, qui fonctionne en mode faisceau focalisé/angle de balayage, la configuration à angle fixe est la plus couramment utilisée.

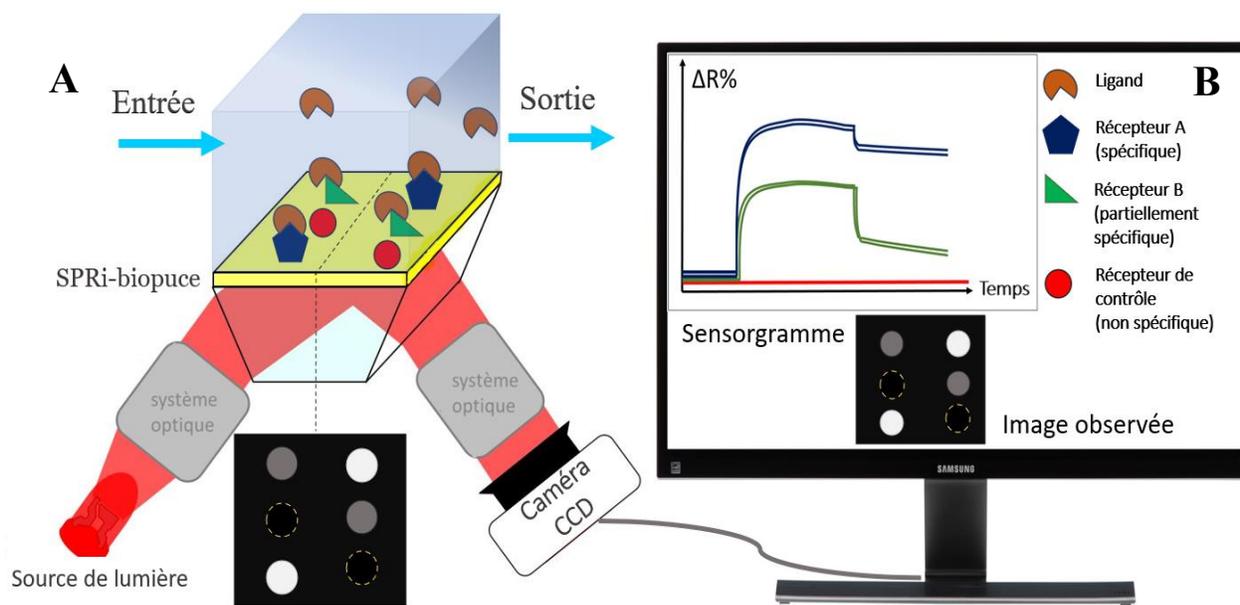


Figure II-5: Configuration du SPRi. L'analyte (ligand) en solution passe dans la cellule fluidique et peut réagir avec la surface du biocapteur. En raison de l'interaction par affinité, il est reconnu, et spécifiquement capturé par les molécules de récepteurs immobilisées sur la surface du capteur (A). Les données sont enregistrées par le système comme des variations de l'intensité de la lumière réfléchiée pour chaque ROI, puis affichées sur le sensorgramme et sur l'image différentielle en temps réel (B).

Le SPRi offre deux grandes avancées par rapport au SPR classique: l'une est le multiplexage – il nous permet de capturer plusieurs cibles simultanément, ce qui est important en médecine (dépistage à partir de fluides complexes, par exemple le sang ou le sérum), l'autre tient à sa capacité à visualiser toute la surface de la biopuce en temps réel. La technique SPRi fournit également des informations sur la stabilité du complexe formé à la surface (résultant de l'autoassemblage des biomolécules), et la dynamique de l'interaction, qui peuvent être détectées en mesurant la cinétique de l'interaction.

La SPRi permet également de contrôler la qualité de la matrice (array) de récepteurs immobilisés en visualisant l'image de surface, ce qui permet aussi de sélectionner avec précision les zones de détection. Les ROIs sont sélectionnées, par exemple, en fonction de la forme, de la taille et de la qualité du site du récepteur immobilisé, afin d'améliorer les performances du système et les résultats expérimentaux [146].

Lorsque l'on parle de la capacité de multiplexage en SPRi, on parle généralement de centaines de sites de récepteurs déposés sur la même surface. Cependant, d'autres systèmes SPR commerciaux ont été développés en 2009 pour traiter des matrices (arrays) beaucoup plus grandes (800-5 000 sites). Lausted *et al.* ont signalé l'utilisation d'un instrument capable de suivre simultanément la cinétique d'interactions à partir de 1350 sites, avec de très bonnes limites de détection ($\sim 0,3$ ng de protéine par cm^2) et une résolution temporelle de 1 s [147]. Le système peut aller jusqu'à 5 000 sites par array.

Un système similaire avec des microarrays à haute densité (>1000 spots dans 1,0 cm²) a également été présenté par Lumera Corporation's Proteomic Processor (Washington, USA), qui a développé un microscope SPRi avec une analyse multiplexe à haut débit des interactions biomoléculaires, comme l'illustre la Figure II-6 ci-dessous. Cette société utilisait des anticorps monoclonaux (MAcs) comme preuve de concept. Les anticorps monoclonaux contre l'antigène carcinoembryonnaire ont été immobilisés en trois exemplaires avec une densité de 1140 plots par 1,0 cm². La spécificité de liaison et les constantes cinétiques ont été obtenues avec succès grâce à l'utilisation de ce système [148].

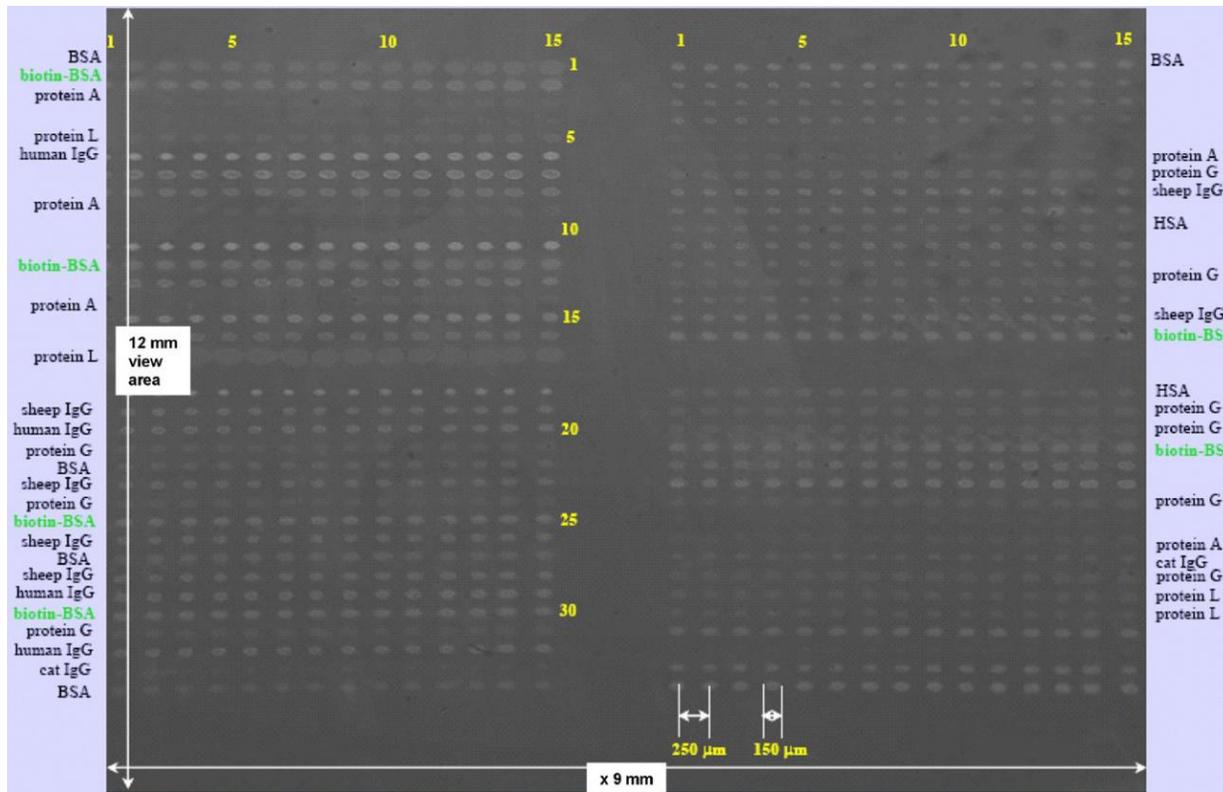


Figure II-6: Microarray à protéines avec 1020 sites imagés par le système de microscope SPR (Lumera Corp.). Les protéines utilisées pour ce microarray sont les suivantes: IgG1 humaine, IgG2 humaine, IgG3 humaine, IgG4 humaine, IgG ovine, IgG anti-mouton, IgG humaine, BSA, anti-BSA polyclonale, biotine-BSA, lysozyme, HSA, HSA monoclonale, IgM humaine, IgG de chat, protéine A, protéine L, anticorps anti-DNP et anti-ovalbumine monoclonale. Adopté de [148].

Récemment, Sun *et al.* ont publié une synthèse des différentes plateformes à haut débit pour la biodétection sans marquage. Diverses images SPR représentatives et les courbes en temps réel correspondantes ont été présentées dans l'article, décrivant des puces SPRi à protéines et à ADN. Les limites de détection annoncées étaient autour 10 fg/μL pour les puces à ADN, tandis que pour les puces à protéines, elles étaient présentées en unités de réflectivité, avec des variations correspondant à ~1,2 ng de protéines/cm² [149].

D'autres axes de développement de la technologie SPRi, consacrés à l'amélioration des capacités de détection SPRi en termes de sensibilité, de spécificité, et aux applications à des matrices réelles, ont également été largement explorés. La méthode la plus exploitée pour améliorer les paramètres de détection du SPRi est la combinaison avec des nanoparticules métalliques dans des essais de type sandwich (Figure II-7). L'amplification du signal est causée à la fois par l'augmentation de masse effective dans la couche de détection évanescente due à l'accumulation de nanoparticules sur la surface du capteur, ainsi que par l'interaction entre les plasmons de surface de propagation et localisés, qui se produit lorsque les nanoparticules sont proches de la surface plane métallique du SPRi [150].

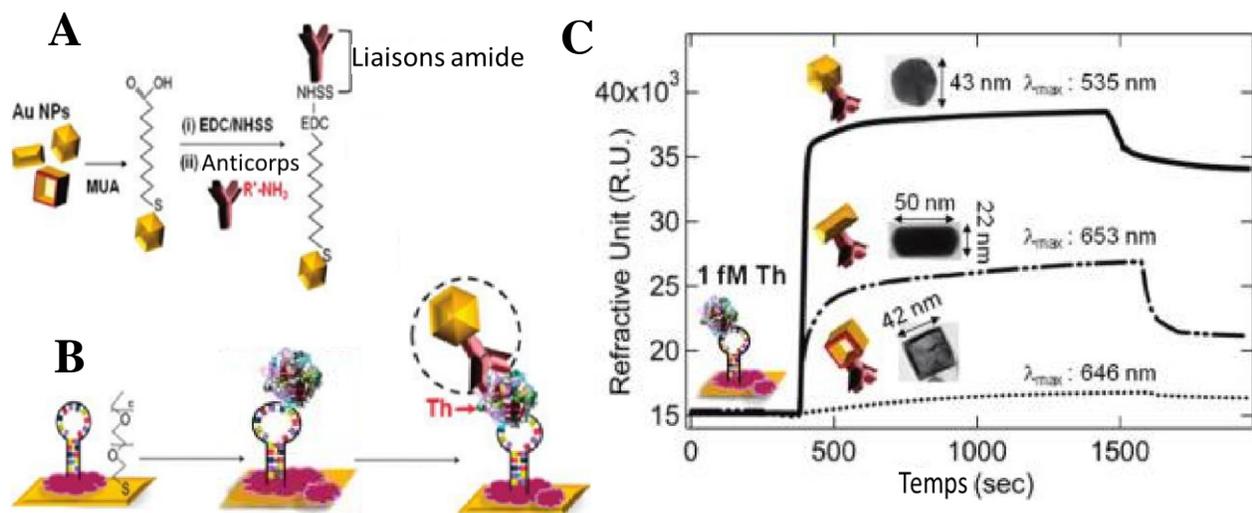


Figure II-7: Principe de l'expérience SPRi avec des performances améliorées par les nanoparticules. (A) La fonctionnalisation des anticorps avec différentes formes de nanoparticules d'or. (B) L'essai en sandwich sur la surface pour la thrombine (Th) en utilisant la puce SPR modifiée par des aptamères en conjonction avec différentes nanoparticules d'or recouvertes d'anti-Th. (C) Une comparaison de trois mesures SPR exaltée par des nanoparticules différentes (en anglais « nanoparticle-enhanced SPR ») à une concentration fixe de thrombine de 1 fM. Adopté de [151].

En parallèle des efforts déployés autour de la détection multiplexée et de l'amplification du signal, la technique SPRi a été développée pour des applications microbiologiques, comme la détection et l'analyse des bactéries, l'étude de la culture « on-chip » pour une meilleure détection [152] ou pour l'imagerie de films bactériens [153].

Les systèmes SPRi à haut débit pourraient être particulièrement utiles pour l'identification de biomarqueurs et la recherche de nouveaux médicaments. Étant sensibles et multiplexés, ils pourraient permettre une analyse rapide à partir de solutions complexes. Le couplage de ces instruments SPRi aux spectromètres de masse n'est pas encore sans difficulté. Si la quantité de ligand retenue est compatible avec les limites de détection des deux systèmes SPR et MS, ce type

de couplage pourrait permettre dans un proche avenir, des analyses à haut débit à partir d'une grande variété d'échantillons.

II-2 Le couplage de la résonance plasmonique de surface avec la spectrométrie de masse (SPR-MS) pour la quantification des interactions et l'identification de ligands

La découverte de nouveaux médicaments et de biomarqueurs nécessite des méthodes puissantes d'analyse et l'intérêt pour les techniques couplées ne fait qu'augmenter. Les méthodes de détection sans marquage, qui exploitent les propriétés biophysiques moléculaires, telles que le poids ou la charge d'une molécule (par exemple, dans le microcantilever et MS), les changements d'indice de réfraction (par exemple, en SPR, ou en SPR localisé - LSPR) pour détecter et suivre la présence ou l'activité moléculaire, ont commencé à attirer davantage l'attention. En effet, la méthode de détection idéale devrait posséder plusieurs caractéristiques essentielles: premièrement, un rapport signal/bruit élevé; deuxièmement, une bonne reproductibilité et, enfin, elle ne devrait pas modifier les paramètres des interactions. L'utilisation des méthodes avec marquage n'est pas idéale (en ce qui concerne la découverte de médicaments et de biomarqueurs, en raison de la définition de "marquage" - molécule étrangère qui est chimiquement ou temporairement attachée à la molécule d'intérêt pour détecter la présence ou l'activité moléculaire), car une telle modification peut potentiellement altérer les propriétés intrinsèques de l'analyte et, par conséquent, entraver l'interaction [154].

En lien avec les exigences évoquées pour une méthode de détection idéale, la technique SPR est la méthode "de premier choix" pour l'analyse des interactions puisqu'il s'agit d'une méthode sans marquage fournissant des données cinétiques des interactions biomoléculaires en temps réel, permettant aussi une quantification précise. Néanmoins, l'un des partenaires d'interaction est modifié de par son immobilisation sur une surface. Comme décrit précédemment dans la section II-1 la SPR est une sorte de "balance optique" car la détection est basée sur les changements d'indice de réfraction dus à l'accumulation de masse au voisinage de la surface du capteur. Cependant, de par sa nature, la mesure exploitant la modification de l'indice de réfraction ne peut pas distinguer entre elles, les molécules retenues de manière spécifique ou non spécifiques, au niveau de la molécule cible, et celles qui sont adsorbées de manière non spécifique sur la surface entourant la molécule cible. En outre, l'analyse de mélanges complexes peut être problématique. Comme la SPR ne fournit que des informations sur les changements de masse, il n'y a aucune certitude quant à la nature des constituants des mélanges complexes qui interagissent réellement. Dans ce cas, la récupération de la matière capturée à la surface et son identification ultérieure par MS constituent un outil d'identification puissant [155].

L'une des plateformes de couplage SPR-MS les plus connues aujourd'hui est la BIA/MS qui a été décrite pour la première fois en 1997 [156], [157]. Décrite par R.W. Nelson et J.R. Krone, cette technique de couplage SPR-MS a permis, d'une part, de caractériser par SPR l'affinité entre

le ligand et le récepteur immobilisé suite aux interactions et, d'autre part - a fourni l'identification du ligand capturé par MS.

II-2.1 Rôle de la chimie de surface dans le couplage SPR-MS

Chaque fois que la sélectivité ou la spécificité est abordée en SPR, elle l'est toujours en tenant compte de la biopuce et de sa chimie de surface – un composant central des biocapteurs SPR. Bien qu'elle soit petite (la surface est en mm^2) et de faible épaisseur (l'épaisseur du revêtement est mesurée en nanomètres), la chimie de surface de la biopuce a un immense impact sur ses performances, sur le rapport signal/bruit, la sensibilité globale du système, enfin sur la qualité des données récupérées, car les interactions biomoléculaires se produisent au niveau de cette surface [158].

La détection sans marquage, bien qu'elle soit directe, présente comme inconvénient majeur que les deux types d'interactions, spécifiques et non spécifiques, contribuent au signal du capteur. Des interactions non spécifiques, indésirables, avec des partenaires moléculaires présents en solution peuvent se produire lorsque l'on utilise une matrice complexe lors de l'analyse. Cette différence par rapport aux méthodes utilisant un marquage, qui ne détectent que le partenaire marqué et sont insensibles aux autres espèces non marquées, contraint les scientifiques à se concentrer sur la recherche d'une chimie de surface parfaite, idéale, qui permettrait d'éviter toute capture non spécifique à la surface du capteur.

Une autre caractéristique importante des surfaces des biopuces est leur réutilisabilité. Idéalement, elles devraient pouvoir être réutilisées aussi longtemps que possible, au moins pour une série de mesures en continu. Une biopuce peut être réutilisée après régénération de la surface, grâce à différentes solutions de régénération utilisées après chaque étape de capture de ligands. Malheureusement, les protéines et de nombreuses autres biomolécules ont tendance à s'adsorber de manière irréversible sur un métal non traité, le verre ou d'autres surfaces artificielles, perdant souvent leur activité (Figure II-8). Une régénération complète qui permette, qu'après chaque cycle de mesure, la surface de la puce soit ramenée à son état initial n'est pas toujours possible. C'est une raison supplémentaire importante pour rechercher une meilleure chimie de surface.

Il est bien connu que pour une analyse cinétique réussie, il est essentiel que les sites de liaison ne soient ni stériquement encombrés, ni que leur affinité soit affectée par le processus d'immobilisation, car les deux peuvent conduire à des mesures d'affinités distribuées de manière hétérogène. Par conséquent, une faible densité d'immobilisation des récepteurs peut être préférable pour ce type d'expériences, tandis que pour la détermination de la concentration de l'analyte ou pour l'analyse MS ultérieure, l'inverse peut être souhaitable. Que la densité d'immobilisation soit faible ou élevée - une fonctionnalisation de surface soigneusement contrôlée peut être extrêmement utile pour contrôler la quantité de récepteurs immobilisés [158].

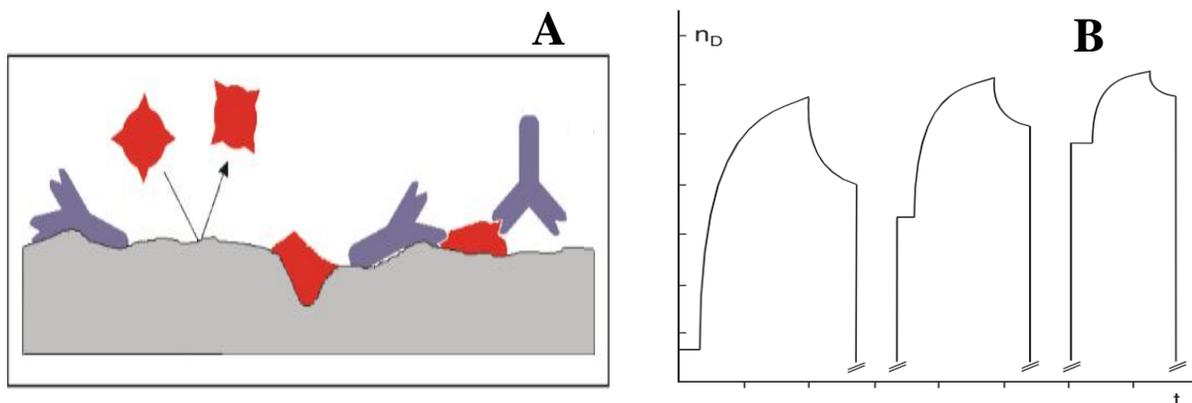


Figure II-8: Une immobilisation instable et la dénaturation partielle du ligand (rouge) et de l'analyte (bleu) à partir d'une surface incompatible (A) entraîne une régénération incomplète, ce qui se traduit par une augmentation de la ligne de base et une diminution de la capacité de liaison d'un cycle d'analyse à l'autre (B). Adopté de [158].

La cinétique d'adsorption et de désorption des protéines non spécifiquement liées à la surface, diffère considérablement de celles des interactions spécifiques des protéines liées avec la cible immobilisée. Par conséquent, une simple soustraction du signal de référence peut potentiellement modifier la forme des courbes cinétiques, introduisant ainsi des erreurs dans la détermination des constantes de liaison [159].

L'or est le matériau le plus couramment utilisé pour les surfaces de capteurs en raison de son inertie chimique. La méthode la plus courante de fonctionnalisation de surface est la création de monocouches auto-assemblées (de l'anglais « self-assembled monolayers », SAMs) de thiolates sur l'or. Les SAMs forment de minces films organiques qui s'organisent spontanément sur des supports solides. Le processus par lequel les SAMs sont formées, a lieu lorsque la surface du substrat (la surface d'or) est simplement immergée dans une solution diluée (μm - mM) de molécules appropriées qui comprennent à une extrémité, un groupement chimique réactif pour la réaction avec le substrat solide, une chaîne alkyle pour la création de la "brosse" dense de SAM et à l'autre extrémité de la chaîne, un autre groupement chimique fournissant la fonctionnalité des SAMs. La fonction chimique réactive thiol (-SH), la plus couramment utilisée, est tout d'abord chimisorbée sur le substrat (la surface d'or du capteur), ensuite le processus d'auto-organisation commence, induit par les interactions de van der Waals entre les chaînes d'alkyle [160]. Ce dernier processus prend généralement plusieurs heures, comme l'illustre la Figure II-9 ci-dessous.

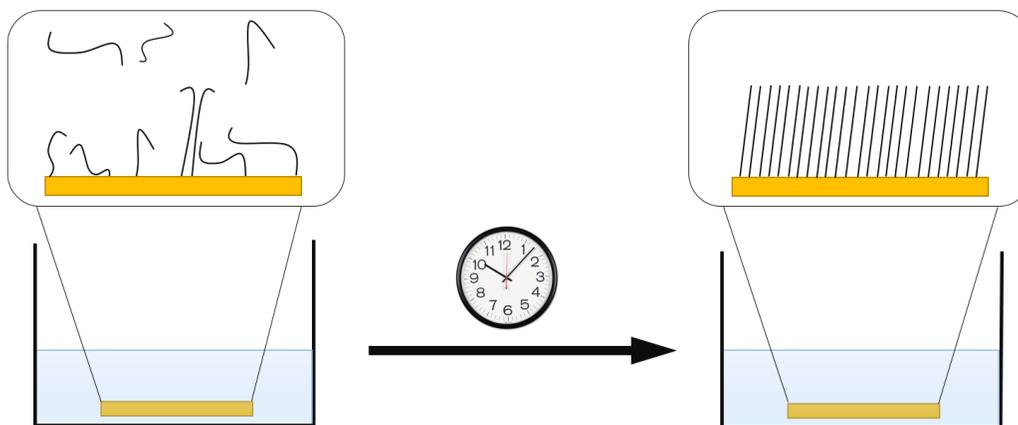


Figure II-9: Représentation schématique de la formation d'une SAM sur la surface du capteur. Les molécules possédant un groupe thiol sont chimisorbées rapidement à la surface du capteur, mais la formation d'une couche dense prend plusieurs heures.

Des SAMs sur l'or peuvent être formées en utilisant une large gamme de composés possédant un groupe thiol, qui présente une forte réactivité avec l'or. Les méthodes d'immobilisation utilisant divers liants chimiques sont illustrées Figure II-10. Des SAMs peuvent être formées à partir de divers alcanethiols, contenant comme terminaisons, des groupes fonctionnels amino, hydroxyliques ou carboxyliques [146]. L'un des exemples les plus étudiés est la création de biopuces à ADN [161], [162] (Figure II-10). Un autre exemple assez courant de biopuces est celui des sondes biotinylées sur divers substrats. Les procédures les plus couramment utilisées impliquent l'acide 11-mercaptoundécanoïque-poly(éthylénimine) (MUA-PEI) et le dextran (Figure II-10). Cette chimie de surface (méthode MUA-PEI) consiste à assembler sur la base d'interactions électrostatiques: l'acide 11-mercaptoundécanoïque (MUA), la poly(éthylèneimine) (PEI) et des couches d'extravidine, tandis que la méthode avec du dextran consiste à assembler une chimie de surface formée de couches de 11-mercaptoundécanol, de dextran et de streptavidine, qui sont liées par des liaisons covalentes [163]. Plusieurs approches ont été décrites afin résoudre le problème des liaisons non spécifiques rencontré avec des matrices complexes (comme le plasma ou la salive). Comme autre approche classique, des couches d'hydrogel de dextrane carboxyméthylé (carboxymethylated dextran, CM) sur substrat d'or ont souvent été utilisées pour l'immobilisation de biomolécules [164], [165]. La méthode la plus courante d'immobilisation des récepteurs réalisée avec des puces contenant du CM avec de la streptavidine consiste à utiliser des partenaires d'interaction modifiés (biotinylés), comme des anticorps, des protéines ou des glucides [166]–[169].

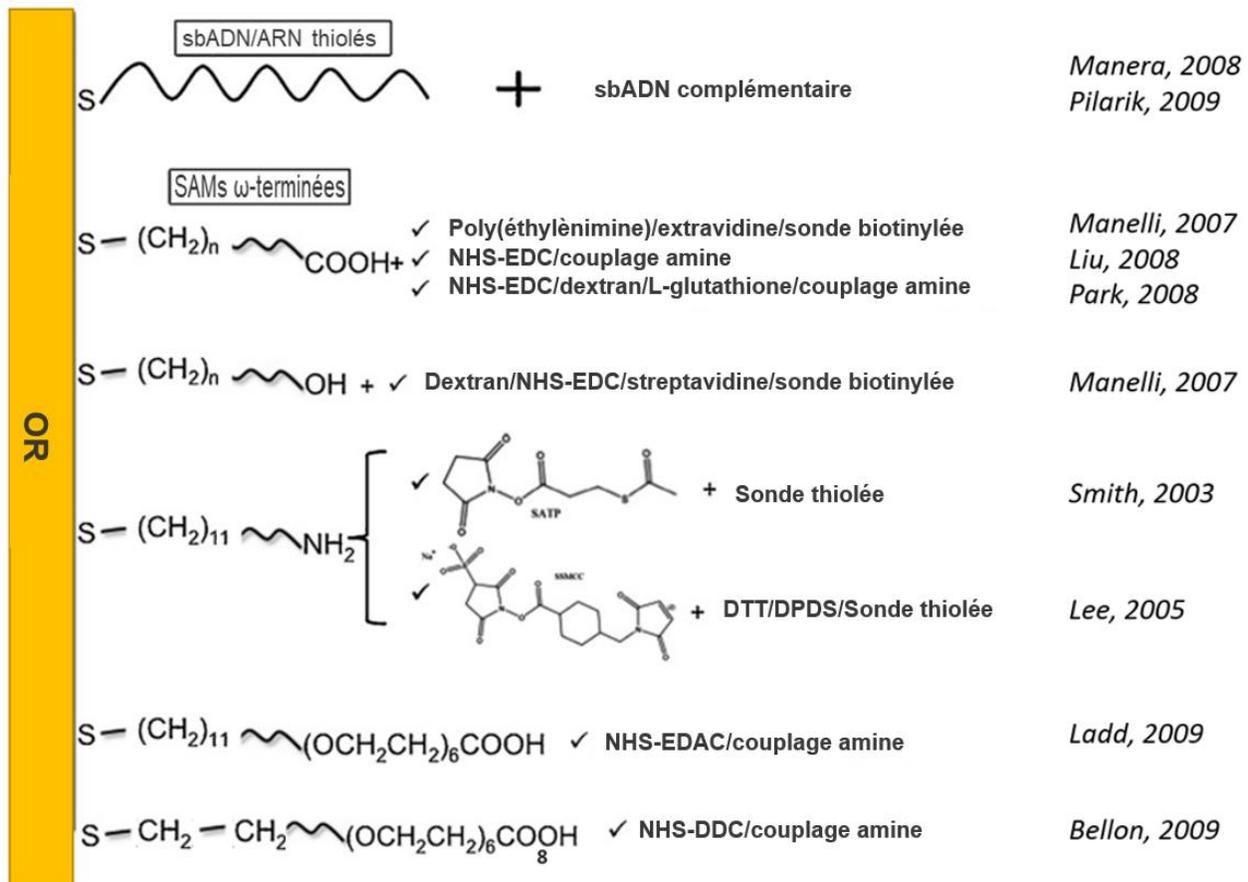


Figure II-10: Méthodes d'immobilisation utilisant divers liens chimiques. Une SAM est créée à partir d'alcanethiols. Après la formation de la couche thiolée, de nombreux procédés chimiques d'immobilisation peuvent être réalisés. Adopté de [146].

Les puces CM se sont avérées satisfaisantes pour permettre l'analyse par MS des molécules de ligand capturées à la surface [156], [168]. Il a été démontré qu'avec un protocole de préparation optimal, jusqu'à $\sim 2 \text{ pmol/mm}^2$ de protéines peuvent être retenues sur la surface du capteur à ADN [155]. Néanmoins, dans des études récentes impliquant du plasma, un niveau élevé d'adsorption non spécifique a été observé [170] entraînant une diminution des limites de détection, ainsi que de l'intensité du signal SPR. Afin de surmonter ces limitations, des échantillons de plasma dilués ont été complétés par un réducteur de liaison non-spécifique (non-specific binding reducer, NSBr, constitué principalement de sel de carboxyméthyl dextran sodique) disponible dans le commerce à la concentration prescrite par le fabricant (1 mg/ml). Le plasma dilué 100 ou 1000 fois avait encore un effet délétère sur la détection des analytes, donc pour pallier cet inconvénient, les échantillons de plasma ont été dilués 10 ou 100 fois dans du tampon de course contenant 0, 1 ou 10 mg/mL de NSBr. Cette dernière solution a permis d'obtenir de bien meilleures performances, mais la limite de détection était encore 20 fois plus élevée, que ce qu'elle devrait être, pour la détection de la thrombine dans un plasma dilué 100 fois. Cela montre que malgré des résultats prometteurs obtenus avec les puces CM, la chimie de surface doit encore être améliorée.

Alternativement, des SAMs plus polaires à base de poly- ou d'oligo(éthylène glycol) (PEG ou OEG) peuvent être utilisées pour réduire l'adsorption non spécifique des protéines sur une surface (Figure II-10). Les travaux de Prime et Whitesides ont permis le développement important de matériaux « résistant aux protéines » [171]. Ils ont démontré que les SAMs d'oligomères d'éthylène glycol terminés par des alcanethiols (OEG-SH) confèrent une résistance contre l'adsorption des protéines à l'or, comme cela a été vérifié par SPR. Les SAMs OEG-SH sur de l'or limitent plus efficacement les liaisons non spécifiques, par rapport au PEG greffé, et ont fourni des éclairages importants concernant les propriétés anti-adhérentes des surfaces PEGylées en général [171], [172].

Les travaux de Bellon *et al.* [173] et de Musso *et al.* [111] mettant en œuvre des SAMs OEG-SH ont permis d'obtenir une chimie de surface limitant les interactions non-spécifiques, adaptée et efficace pour le couplage SPR-MS (Figure II-10). Il s'agit d'une SAM formée par des chaînes de poly(oxyde d'éthylène) (PEO) relativement courtes portant un groupe terminal N-hydroxysuccinimide permettant l'immobilisation des molécules de récepteurs. Cette chimie de surface se caractérise par un faible niveau d'interactions non spécifiques, comme le montre l'exemple de l'utilisation d'échantillons de salive non pré-purifiés [111]. De plus, la chimie PEO mentionnée ci-dessus a permis de détecter deux biomarqueurs salivaires, α -amylase et lysozyme, sans doper les échantillons avec les biomarqueurs ciblés, directement à partir de l'échantillon biologique réel. À la suite de l'analyse SPR, les ligands spécifiquement capturés sur la surface, ont été aussi détectés par MALDI-TOF MS.

II-2.2 Les différentes configurations des systèmes SPR-MS

L'étude des interactions au sein d'un couple récepteur-ligand, ou plus généralement de l'association des partenaires d'une interaction, peut être suivie à l'aide de la technique SPRi à condition que l'un des partenaires d'interaction soit immobilisé sur la surface du capteur. Après séparation par affinité dans le milieu complexe, la molécule de ligand capturée peut être identifiée par MS. La combinaison de deux techniques aboutit à un outil unique pour la quantification et la caractérisation des interactions biomoléculaires [168].

L'association de la SPR et de la MS peut généralement être réalisée de deux manières différentes, comme l'illustre schématiquement la Figure II-11 : soit par l'analyse directe du matériel retenu à la surface par MS, soit par la récupération du matériel de la surface de la biopuce, par élution suivie d'une analyse MS de la solution éluée [174].

Dans la première approche, les expériences SPR et MS sont menées à partir de la même surface du biocapteur (Figure II-11 A). Elle présente des avantages importants : simplicité (car elle ne nécessite pas de transfert d'échantillon élaboré) et sensibilité, mais le principal inconvénient est que les biopuces ne peuvent pas être réutilisées après l'analyse par MS.

La deuxième approche consiste à éluer le ligand retenu et à analyser cette solution éluée par MS. Cette stratégie rend les biopuces réutilisables, mais les pertes potentielles liées à l'élution, au transfert ou au re-dépôt de l'échantillon doivent être prises en compte.

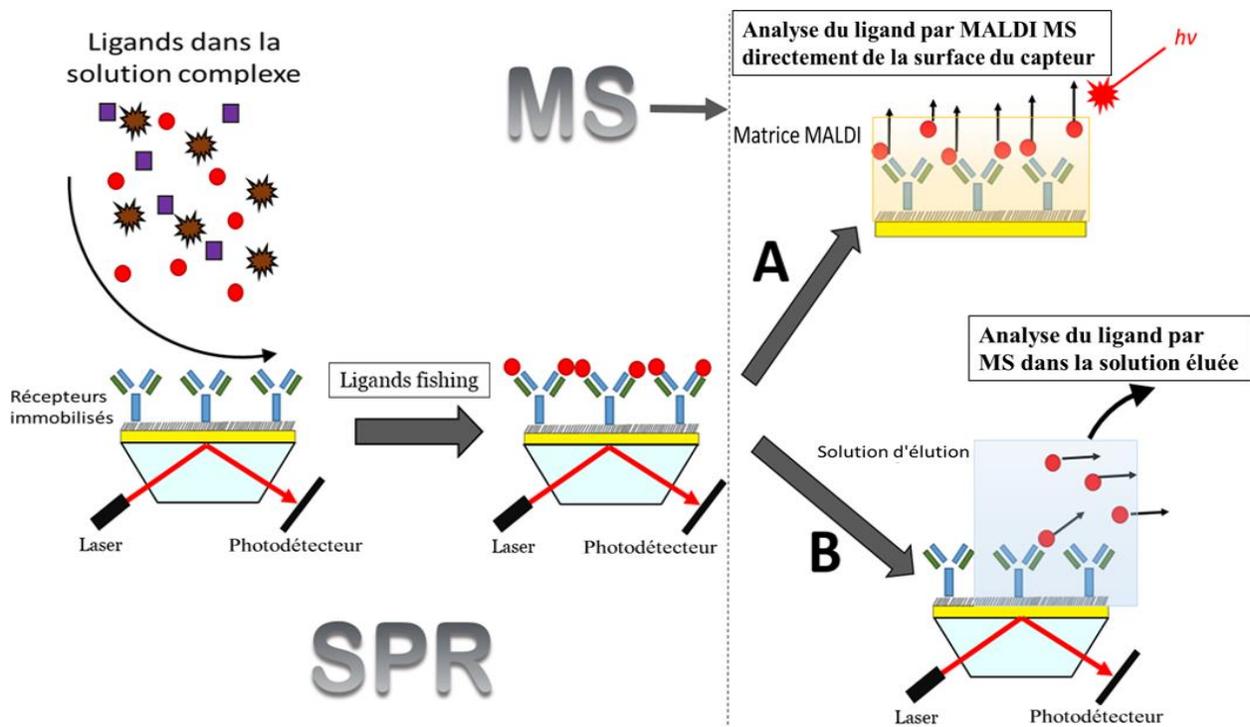


Figure II-11: Résonance plasmonique de surface (SPR) - Spectrométrie de masse (MS). Les molécules de récepteurs sont greffées de manière covalente sur la surface du capteur SPR. Une solution complexe contenant le ligand est injectée sur la surface du capteur et les interactions récepteur-ligand sont suivies en temps réel par SPR. Le ligand capturé par affinité peut ensuite être analysé soit (A) en retirant de la biopuce de l'instrument SPR puis après application de matrice par analyse MALDI-MS; soit (B) par microélution, suivie de la récupération du matériel retenu par les récepteurs, puis d'une analyse ESI-MS ou MALDI-MS.

II-2.2.1 Elution de l'échantillon avant l'analyse

L'approche par élution a été développée pour la récupération des molécules liées par affinité dans quelques microlitres de solution pour une analyse MS en 1998 par Sönksen *et al.* [175]. Son efficacité a été démontrée avec l'exemple de deux systèmes moléculaires: les interactions anticorps-antigène et ADN-protéine. Ces travaux ont démontré la capture de la myoglobine par des MACs immobilisés, dirigés contre de la myoglobine humaine, et la capture de la protéine de liaison à l'ADN, ParR, par une sonde d'ADN double brin biotinylé greffée sur la surface du capteur via une interaction biotine-streptavidine. Une seule étape d'élution a permis de fournir des quantités d'échantillons suffisantes pour une analyse MALDI-MS. Ce travail a été le premier à démontrer que l'élution des molécules retenues permet de réutiliser la puce du capteur, car la surface n'a pas été dégradée par la procédure d'élution. Afin de limiter les pertes de sensibilité en MS, causées par la dilution du ligand dans le volume de la solution d'élution, les auteurs ont utilisé différents tampons séparés par des bulles d'air, aspirés dans une pointe de pipette, injectés manuellement dans l'instrument SPR, puis récupérés dans une seconde pointe de pipette à la sortie du biocapteur. Toutes les manipulations ont été effectuées manuellement, ce qui a empêché l'utilisation généralisée de cette approche.

En 2002, une nouvelle amélioration de l'approche par élution des ligands capturés a été rapportée. L'automatisation du processus et le contrôle précis de chaque étape expérimentale était le principal objectif des travaux décrits par Gilligan *et al.* [176]. Cette étude représentait une nouvelle méthode de manipulation contrôlée par ordinateur, de volumes de la taille d'un microlitre en utilisant la microfluidique d'une pompe à seringue reliée à un instrument SPR BIAcore. Des séries de volumes de 5 μ l d'échantillon, ou de tampon, séparés par 2 μ l d'air, ont été aspirés dans la microfluidique (Figure II-12 A). Le principal avantage du système décrit était l'utilisation d'un flux oscillatoire, contrairement au flux unidirectionnel décrit auparavant. Le modèle de flux oscillatoire a été appliqué en utilisant une amplitude de 1 μ L à un débit de 20 μ L/min, ce qui a réduit de manière significative les besoins en volume de l'échantillon. L'efficacité du système a été démontrée avec l'exemple des MAcs contre le lysozyme qui a été exposé au mélange complexe de protéines cytosoliques. La capture spécifique, la récupération et l'analyse MS d'une protéine modèle, le lysozyme, a été démontrée à partir d'une solution contenant un excès 85 fois supérieur d'une protéine non apparentée, la myoglobine (Figure II-12 B-C).

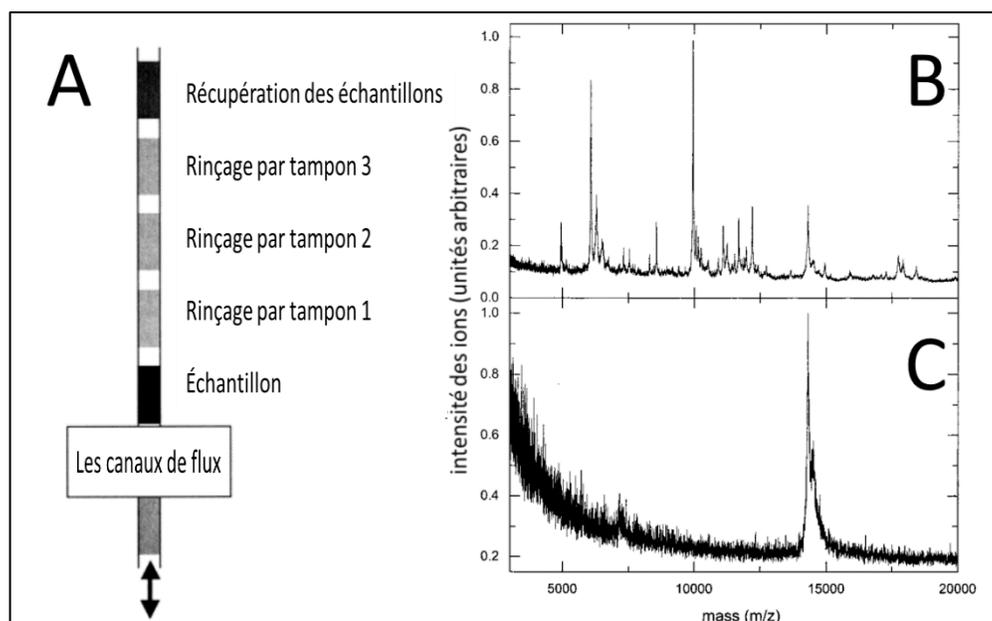


Figure II-12: (A) Représentation schématique de la méthode d'injection microfluidique. Spectres de masse d'un échantillon de 5 μ L avec 70 nM de lysozyme en présence d'un mélange complexe: (B) échantillon préparé avec de l'eau et repéré directement sur la plaque MALDI et (C) échantillon préparé dans du HBS-EP et récupéré après capture sur la biopuce.

L'amélioration suivante du couplage SPR/MS est intervenue deux ans plus tard. Le système SPR de BIAcore permettait d'analyser quatre surfaces en parallèle, mais l'analyse SPR avec récupération de la cible, suivie de l'analyse MS ne pouvaient toujours pas être effectuées simultanément. C'est pourquoi l'instrument BIAcore SPR a été couplé à un système HPLC qui lui-même a été couplé à ESI-MS [177]. Ce système a été utilisé pour l'identification des composants protéiques d'un complexe spécifique MAX/MAD/mSin3, un complexe répresseur modifiant la chromatine.

Plus tard, Boireau *et al.* ont conclu que la méthode d'échantillonnage par élution n'avait pas encore été exploitée avec un succès réel [178]. Certains inconvénients, notamment liés aux dilutions de l'échantillon élué, perte de matières et aux concentrations élevées de sel dans du tampon de course SPR ainsi qu'à l'utilisation de détergents, comme le Tween, le Triton ou le SDS, qui entravent la détection par MS, doivent encore être surmontés pour le couplage SPR-MS réussi.

Un état de l'art récent de l'approche par élution a permis de déterminer quatre exigences générales [179], [180]. Dans une expérience SPR-MS typique, les molécules doivent être isolées par liaison spécifique à un partenaire d'interaction immobilisé à la surface du capteur. Le ligand capturé doit ensuite être récupéré de manière non destructive pour permettre l'analyse de l'échantillon par MS. Par conséquent, une approche par élution acceptable doit satisfaire aux exigences suivantes:

- les molécules de récepteur immobilisées devraient idéalement reconnaître le ligand et ses espèces de dégradation potentielles au sein d'un mélange complexe,
- la solution de récupération utilisée doit dissocier complètement le ligand capturé de son partenaire d'interaction immobilisé, de manière non destructive,
- la solution de récupération doit être compatible avec l'analyse par MS,
- le tampon de récupération devrait préserver l'état fonctionnel des récepteurs immobilisés sur la surface de la puce, à des fins de réutilisation du biocapteur.

Des recherches ont été menées avec un traitement supplémentaire des échantillons, par exemple, par digestion. Le temps typique associé au processus de digestion de l'analyte était autour 3-11 h [181], ce qui limitait fortement le débit d'analyse. Une approche intéressante pour surmonter cette limitation a été décrite en 2009 [182]. La méthode proposée utilisait un capillaire modifié par une enzyme entre les systèmes SPR et MS, ce qui réduisait le temps nécessaire pour une analyse entièrement automatisée (nanoLC-MS/MS) à 60 min, pendant lesquelles une nouvelle expérience pouvait déjà être lancée. Deux capillaires modifiés par la trypsine et par la pepsine ont été utilisés dans ce travail, qui a donc permis de compléter la couverture de la séquence de la protéine modèle interféron- γ .

L'approche par élution des ligands a été utilisée avec succès à de nombreuses reprises. Néanmoins, à des fins de diagnostic (en particulier pour la découverte de biomarqueurs), cette stratégie était trop limitée - le faible débit du SPR lié au système nanoLC-MS/MS ne permettait pas d'utilisation ultérieure [180].

II-2.2.2 SPR-MS détection directement à partir de la surface d'une biopuce

A l'origine, la technologie SPR la plus utilisée en couplage SPR-MS était celle offerte par l'appareil BIAcore, et était basée sur la détection directement à partir de la surface d'une biopuce [156], [157]. L'histoire du couplage commence en 1997 lorsque le couplage SPR-MS (ou BIA/MS) a été mis au point pour l'étude du système d'affinité des IgG polyclonales anti-myotoxine *a* avec la myotoxine *a* purifiée ou avec le venin entier du *Crotalus v. viridis* [157]. Le but de l'expérience était de démontrer la compatibilité des systèmes SPR et MS, avec une sensibilité, des limites de détection et des caractéristiques analytiques comparables à celles des instruments individuels. Tout d'abord, pendant l'expérience SPR, les cellules fluidiques de la biopuce ont été exposées à la myotoxine *a* purifiée, ou au venin entier du crotale des prairies dilué dans la solution tampon. Après la capture spécifique de la molécule cible par l'IgG polyclonale anti-myotoxine *a*, immobilisée sur la surface du capteur, l'identification de l'antigène peptidique a été effectuée directement à partir de la biopuce par MALDI-TOF MS (Figure II-13).

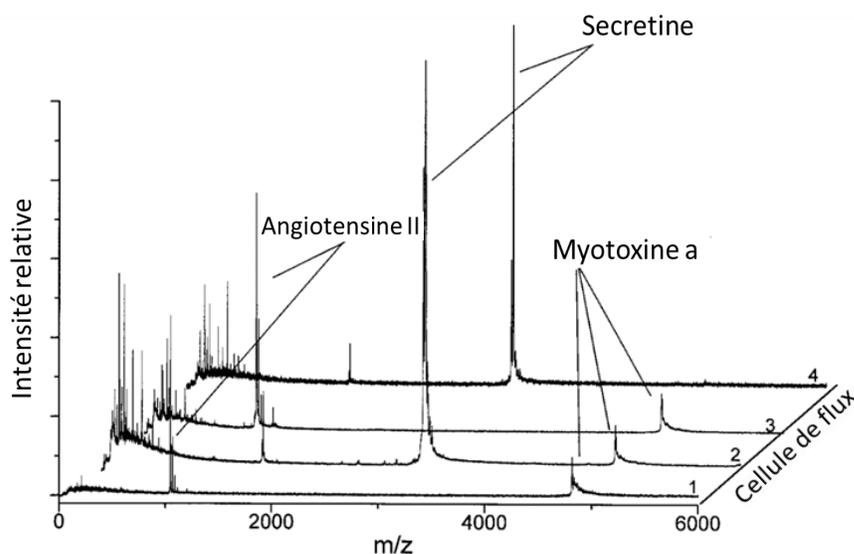


Figure II-13: Spectre BIA/MS de la myotoxine *a* retenu dans chaque cellule fluidique individuelle. La cible est observée dans toutes les cellules (ou canaux) sauf dans le canal 4 (blanc). Des protéines marqueurs, l'angiotensine II (cellules fluidiques 1 et 3) et la sécrétine (cellules fluidiques 2 et 4) ont été ajoutées à la matrice MALDI pour démontrer la résolution spatiale (les cellules fluidiques ont été ciblées individuellement avec le laser) et pour être utilisées comme calibrants de masse internes. Adapté de [157].

Plus tard la même année, une expérience SPR-MS similaire a été réalisée, avec des IgG polyclonales anti-myoglobine humaine /myoglobine humaine/ MAcS contre myoglobine humaine [156]. Cette étude a été centrée sur la capacité à détecter plusieurs analytes retenus sur une plage dynamique modérée (à la fois en quantité et en poids moléculaire), et sur l'optimisation des paramètres expérimentaux utilisés pour la préparation des échantillons et l'acquisition des données. Le schéma complet de l'expérience qui est devenue typique est montré dans la Figure II-14 ci-dessous.

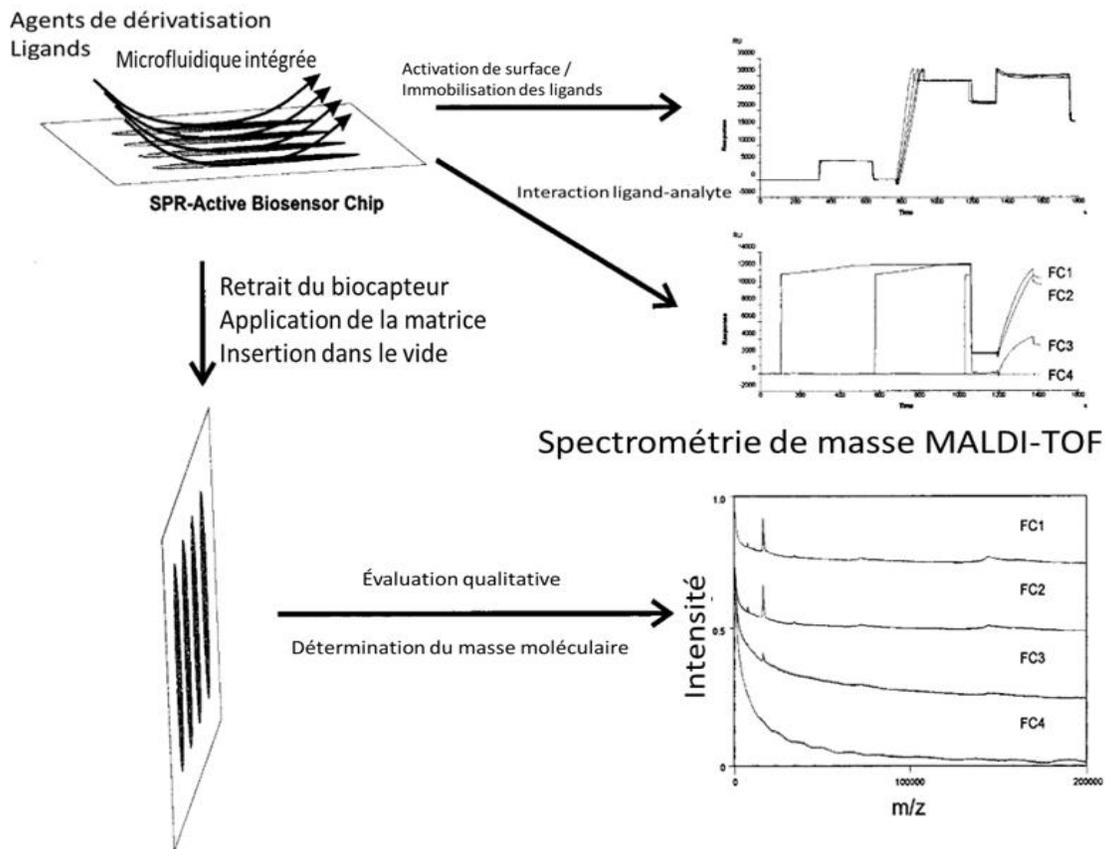


Figure II-14: Représentation schématique de la configuration du système SPR-BIA/MS à base de puces. Le SPR est utilisé pour suivre les interactions biospécifiques en fonction du temps, à partir duquel les paramètres d'association et de dissociation de l'interaction peuvent être déterminés. L'analyse MALDI-TOF des cellules fluidiques directement à partir de la surface de la biopuce est utilisée pour évaluer les analytes retenus pendant l'expérience SPR. Adopté de [156].

Des recherches plus approfondies dans ce domaine ont révélé qu'il est également possible de détecter simultanément différents biomarqueurs à partir de fluides complexes. Les travaux de Nedelkov *et al.* ont prouvé que le système BIA/MS est capable d'extraire et de détecter quatre biomarqueurs présents dans les fluides biologiques (cystatine C, β_2 -microglobuline, protéine urinaire 1 et une protéine qui se lie au rétinol) [183]. La limite de détection atteinte dans ce travail, pour les complexes protéiques, ainsi que la possibilité de détecter des protéines, et des complexes protéiques, ont démontré que le système BIA/MS était une technique de couplage avancée. Néanmoins, le développement de cette approche pour l'analyse à haut débit, a été limité en raison de la restriction de ne disposer seulement, que de quatre cellules fluidiques disponibles.

II-2.3 Utilisation du couplage SPR-MS pour la détection d'analytes multiples

Bien que les deux approches SPR-MS (par élution ou sur puce) décrites ci-dessus permettent une détermination précise et sensible de la masse, le nombre limité de biopuces commerciales disponibles pour des analyses simultanées a entravé leur utilisation pour des

applications de diagnostic. Les nouveaux systèmes SPRi devenus disponibles sur le marché ont apporté une solution à ce problème.

Le premier exemple de détection de protéines multiples fournissant des informations cinétiques en temps réel a été présenté par Nedelkov *et al.* en 2006. Le système Biacore X décrit dans leurs travaux utilise l'appareil SPR comme outil de séparation par affinité, et de suivi des interactions protéine-protéine avant l'analyse par MS. Biacore X a marqué le début des systèmes SPR-MS à haut débit, grâce à la possibilité de disposer des récepteurs dans un format « array » sur les puces SPR, permettant ainsi de capturer par affinité des protéines, suivi de l'analyse par MS de ces mêmes protéines capturées. Les anticorps, décrits dans ce travail, répartis sur 50 sites dans une même cellule fluïdique, ont capturé simultanément par affinité les protéines plasmatiques humaines d'échantillons de plasma humain. Ce réseau de récepteurs au format « array » se composait de cinq anticorps: β_2 -microglobuline, cystatine C, transferrine et d'anticorps de facteurs de croissance de type insuline I et II (Figure II-15).

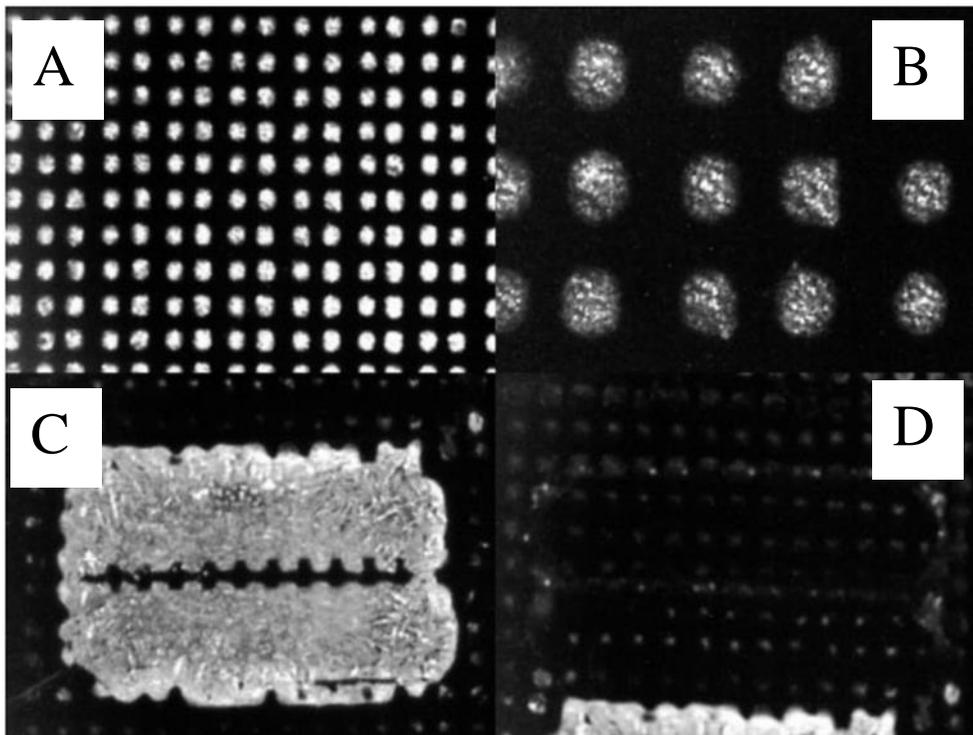


Figure II-15: Vue microscopique des dépôts d'anticorps (récepteurs) formant un « microarray ». (A) Agrandissement 60 \times ; (B) Agrandissement 200 \times . La distance entre les dépôts est de 200 μm ; diamètre du site = 135 μm . (C) Puce présentant une disposition au format matriciel (format array) d'anticorps après injection de plasma et retrait du biocapteur. Le tampon cristallisé indique les limites des cellules fluidiques actives. (D) L'empreinte des cellules fluidiques vides à côté des deux cellules fluidiques actives suggère qu'il y a 50 plots d'anticorps dans les limites de chaque cellule fluïdique (la surface est $\sim 1 \text{ mm}^2$). Adopté de [184].

La détection des ions par MALDI-MS de toutes les protéines cibles, après la capture par affinité SPR sur biopuce a fourni la preuve du concept de système SPR-MS à haut débit. De plus, les protéines cibles ont été détectées sur toutes les répliques, ce qui a montré que le couplage SPR-MS au format « array » était robuste et hautement reproductible.

Le développement du couplage SPR-MS au format « array » a franchit un nouveau stade avec les systèmes SPRi-MS, qui, par rapport aux équipements SPR classiques, ont permis un suivi de l'intensité de la lumière réfléchiée, en produisant des images différentielles en temps réel, à partir de l'ensemble de la surface de la puce au format « array » grâce à l'utilisation de caméras CCD haute résolution. Les couplages SPRi-MS ont élargi l'utilisation des systèmes SPR-MS à l'analyse multi-analyte, en particulier à des fins de diagnostic, lorsque, par exemple, plusieurs biomarqueurs doivent être examinés et les informations doivent être obtenues en temps réel [180], [185].

Les travaux de recherche dans ce domaine ont montré que les réseaux de protéines immobilisés sur des SAMs constituées de courtes chaînes d'oxyde de polyéthylène (PEO) offraient de multiples avantages, car cette chimie est efficace contre les interactions non spécifiques [111], [173], [186], [187]. L'analyse MALDI-MS de l'analyte retenu après l'analyse SPRi a montré que des quantités de l'ordre de la fmol de protéines étaient encore détectables. Comme l'adsorption non spécifique des protéines présentes dans les solutions complexes n'a pas été observée, la digestion des protéines à la surface de biopuce a été effectuée. Cette digestion a été combinée à une analyse MALDI-TOF-TOF en mode MS/MS pour une identification non ambiguë de l'analyte.

Le couplage SPR-MS est utilisé depuis de nombreuses années pour étudier les interactions biomoléculaires. Il est devenu une méthode de choix pour la caractérisation des interactions non covalentes, car les techniques SPR et MS forment une combinaison parfaite en termes de sensibilité et de complémentarité des informations qui peuvent être obtenues (informations quantitatives et qualitatives en même temps). Le perfectionnement des instruments SPRi utilisant des puces au format « array » a permis d'améliorer le débit et la quantité de données cinétiques provenant d'une seule expérience. Le couplage SPRi-MS reste toujours un domaine de recherche actif.

II-2.4 Autres types de biocapteur couplé à la spectrométrie de masse

L'une des approches récentes pour le suivi des interactions en temps réel qui a permis l'usage de réseaux matriciels de récepteurs (arrays) est la SPR localisé (LSPR). L'idée est née de la tendance à la miniaturisation, à l'intégration et à la multiplication des biocapteurs, tout en préservant leur grande sensibilité.

Contrairement aux plasmons de surface communs aux quels sont associés les champs électromagnétiques qui se propagent le long d'une surface plane dans les films métalliques (SPR classique), les plasmons de surface localisés sont confinés à une nanostructure plus petite que la longueur d'onde incidente (c'est-à-dire une nanoparticule métallique) [188]. Plusieurs différences fondamentales distinguent ces systèmes. Premièrement, le volume de détection est réduit au voisinage immédiat de la nanoparticule: il s'étend à quelques dizaines de nm (contre des centaines nm en SPR classique), ce qui permet une détection plus sensible des biomolécules. Deuxièmement,

la LSPR dépend fortement de la forme des nanoparticules, l'oscillation de plasmons de surface des nanoparticules métalliques est modifiée si la forme des nanoparticules s'écarte de la sphéricité (par exemple, les nanoparticules sous forme de disques, de tiges ou de coquilles) [189]. Cette dernière propriété permet de mesurer simultanément différents composés à différentes fréquences en fonction de la fonctionnalisation des différentes particules résonantes et selon leur forme. La détection réussie par les capteurs LSPR de divers types de molécules a été décrite, par exemple, des stéroïdes [190] et des protéines dont le poids moléculaire varie de 6,5 à 75 kDa [191]. La première démonstration de couplage LSPR et MS a été faite en 2009 par Anker *et al.* [192]. Dans ce travail, la détection et la caractérisation de ligands dérivés de l'amyloïde- β (de l'anglais « amyloid- β -derived diffusible ligands », ADDLs) ont été réalisées par le couplage de LSPR et de MALDI-TOF MS (Figure II-16). Le LSPR décrit consistait en nanoprismes d'argent sur une lame de verre. L'adsorption des ligands sur les nanoprismes a été contrôlée en temps réel à l'aide du LSPR. Après avoir été exposé à des ADDLs, l'échantillon a ensuite été couvert avec la matrice MALDI et une analyse MS a été effectuée. Cette combinaison s'est avérée utile pour la détection des modifications post-traductionnelles des protéines liées au capteur LSPR avec une limite de détection de 9 pmol de matière par site.

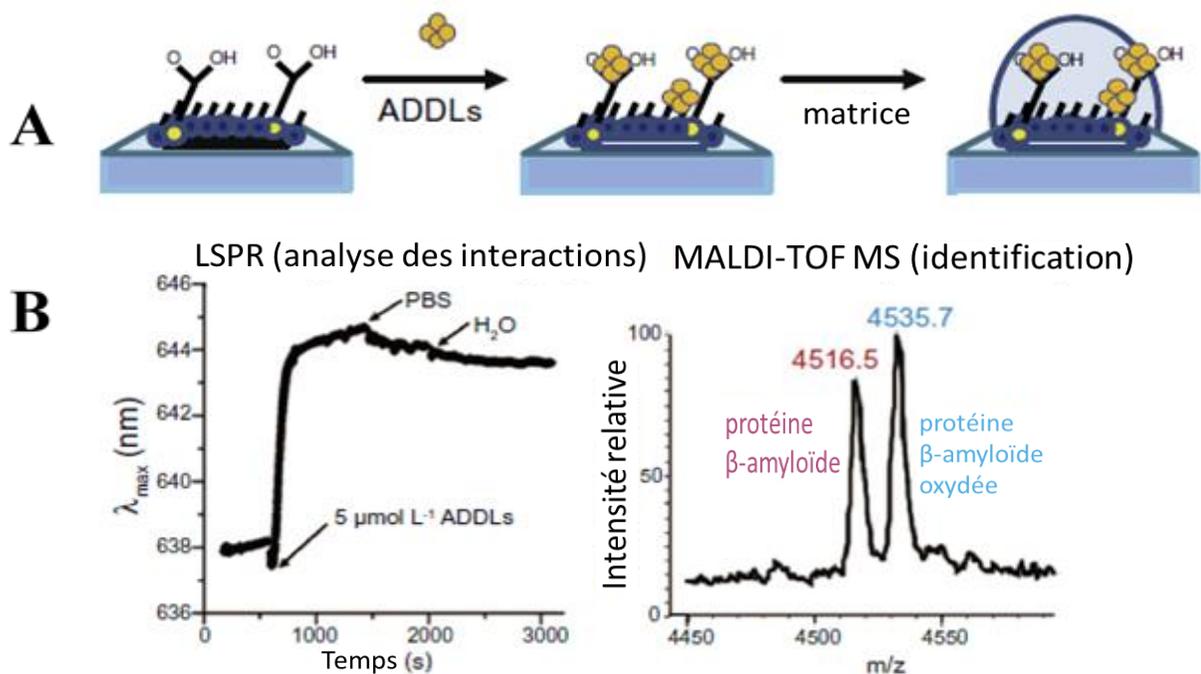


Figure II-16: Analyse par spectrométrie de masse couplée à la résonance plasmonique de surface localisée (LSPR-MS). La figure montre en (A) un protocole expérimental schématisé pour la liaison des ADDLs et le dépôt d'une couche d'acide sinapinique comme matrice pour l'analyse MALDI MS; et en (B) la détection en temps réel des ADDLs se liant aux nanoprismes fonctionnalisés octanethiol/11-MUA par LSPR et le résultat de la MS montrant les monomères des ADDLs oxydés et normaux isolés liés aux nanoprismes (adopté de [192]).

La fabrication d'un film plasmonique optiquement actif de nanoparticules d'or par un procédé d'autoassemblage et de calcination a également été rapportée. Cela a permis une caractérisation multidimensionnelle de la même surface par LSPR et MALDI MS. Le suivi en temps réel des interactions vésicules-surface et l'analyse par MS des peptides et de la digestion du cytochrome c ont été décrites par Chen *et al.* [193]. Malgré les développements de la technologie et de la méthodologie analytique, les instruments commerciaux utilisant la combinaison LSPR-MS ne sont pas encore disponibles [180].

Diverses autres combinaisons de biocapteurs avec la MS peuvent être utilisées avec une robustesse et une sensibilité similaire au couplage SPR-MS. L'un de ces types de capteurs qui peut être combiné avec MS est l'onde acoustique de surface (de l'anglais « surface acoustic wave », SAW). Le principe de fonctionnement du dispositif SAW est basé sur la propagation des ondes acoustiques près de la surface d'un matériau piézoélectrique (le substrat couramment utilisé pour le suivi des interactions moléculaires est le cristal de quartz). En réponse aux changements à la surface, comme les interactions ligand-récepteur, cette onde acoustique peut être piégée ou autrement modifiée pendant sa propagation [194].

Cet effet a été exploité pour l'analyse par couplage hors-ligne SAW MALDI-TOF MS de la cascade de coagulation du sang: impliquant la thrombine et le complexe thrombine-antithrombine III [195]. Après la capture par l'affinité, le ligand retenu a été digéré et analysé par MALDI-TOF MS directement à partir de la surface du capteur. La thrombine a été détectée, cependant, son identification sans équivoque a nécessité une étape de séparation supplémentaire. Ainsi, une autre approche SAW-MS a été développée - une combinaison SAW-ESI MS en ligne. Elle a été utilisée pour la détection directe, l'identification et la quantification de ligands liés par affinité, à partir d'un complexe protéine-ligand, pour une gamme d'anticorps et de ligands (peptidiques) [196].

MS-SAW n'est pas seulement utilisée comme une méthode de détection et de capture par affinité. La nébulisation par des ondes acoustiques de surface (de l'anglais « surface acoustic wave nebulization », SAWN) est devenue une nouvelle technique d'ionisation douce. Il a été démontré que la technique SAWN est une méthode faiblement énergétique, permettant la formation des ions et l'introduction d'échantillons en phase liquide dans un spectromètre de masse. Le processus d'ionisation SAWN est complètement différent de celui de l'ESI (Figure II-17): il n'y a pas de potentiel électrique appliquée à l'échantillon. Le principe du procédé d'ionisation SAWN n'est pas entièrement compris. La technique SAWN-MS a permis la détection sans ambiguïté de divers groupes de molécules, c'est-à-dire des peptides de différentes propriétés physico-chimiques et de différentes concentrations dans des mélanges en mode infusion [197], la caractérisation rapide et sensible de colorants synthétiques [198] et également l'analyse rapide de produits alimentaires [199].

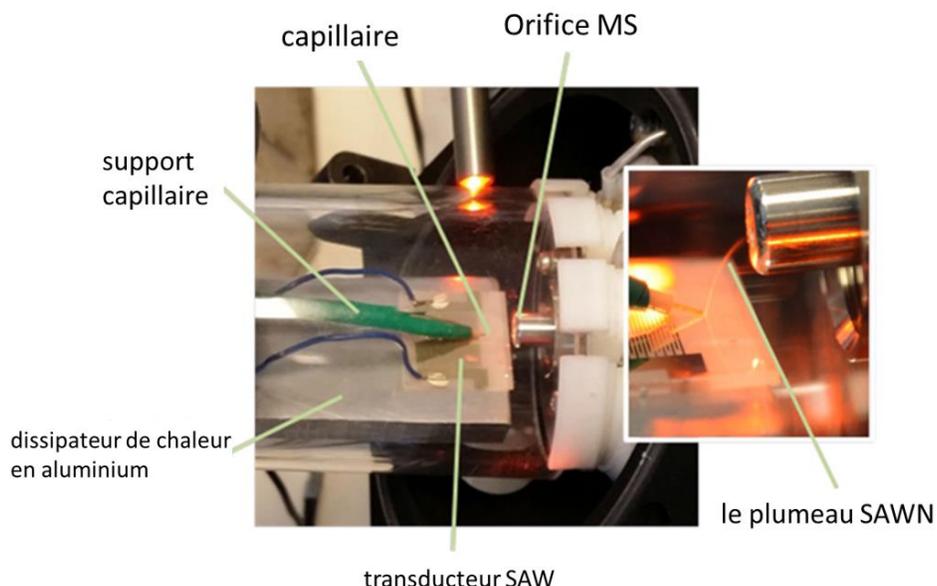


Figure II-17: Photographies annotées de l'appareil SAWN. L'encadré montre le plumeau généré par la nébulisation SAWN pendant la chromatographie liquide. Adopté de [197].

L'autre type de capteur qui peut être combiné avec MS est l'interférométrie. L'idée de ce couplage est née du besoin de dispositifs sensibles. L'interférométrie est une technique de détection optique très sensible utilisée pour la mesure des petits déplacements, des changements d'indice de réfraction et des irrégularités de surface qui peuvent être exploités pour la détection et le suivi des processus d'interaction biomoléculaire. Récemment, Machen *et al.* ont démontré le monitoring de l'assemblage/désassemblage cinétique de complexes protéiques spécifiques en utilisant cette méthodologie sans marque, et ont évalué la structure et l'identité de ces assemblages par microscopie électronique et MS (Figure II-18). Cela a été fait à partir de l'exemple de la toxine pré-endosomale de l'anthrax, qui a été assemblée et transféré dans le complexe endosomal [200].

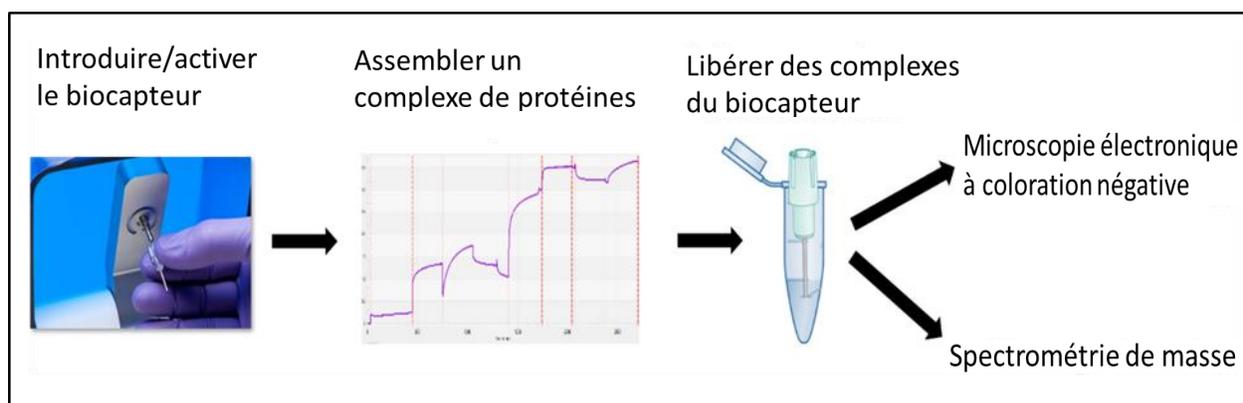


Figure II-18: Présentation schématique de l'analyse de complexes protéiques assemblés et isolés sur un biocapteur par interférométrie de biocouche (biolayer interferometry) en utilisant microscopie électronique et MS. Adopté de [200].

Les avancées les plus récentes dans ce domaine, comme nanoPore Optical Interferometry, permettent de détecter des interactions même faibles dans les complexes protéine-protéine et protéine-composé, et cette interférométrie peut être connectée directement à un spectromètre de masse pour l'identification des biomolécules liées [201], [202].

Une autre méthode, CE, capable de séparer les molécules selon un rapport charge/taille avec une haute résolution [203], est souvent couplée à la MS pour compléter cette méthode de séparation par affinité. De nombreuses revues et articles ont décrit l'utilisation de ce couplage permettant la caractérisation détaillée de nombreuses biomolécules et une identification des partenaires d'interaction grâce à une séparation efficace et sélective combinée à une détection sélective [204]. Les méthodes d'ionisation MS les plus fréquemment mises en œuvre comprennent ESI-MS [205]–[207], MALDI-MS [207]–[209] et l'ionisation par plasma à couplage inductif [211].

Le couplage CE-MALDI peut être effectué soit sur des instruments séparés comme cela a été démontré, par exemple, par Huang *et al.* [210], soit à partir d'un instrument CE modifié capable de déposer l'éluant du capillaire directement sur la plaque MALDI, comme représenté sur la Figure II-19. Au contraire, la combinaison CE-ESI est généralement un couplage direct.

Des systèmes CE-MS robustes et intégrés, disponibles dans le commerce, ont considérablement augmenté la popularité et l'accessibilité de la méthode. Ces systèmes permettent d'éviter la dilution associée au transfert de volumes de l'ordre du nanolitre. Les progrès récents dans la compatibilité de la CE avec la MS, qui comprennent de nouvelles stratégies d'ionisation et une plus grande flexibilité des systèmes, permettront plus tard une plus grande implication de cette technique de couplage dans l'analyse des interactions biomoléculaires [73].

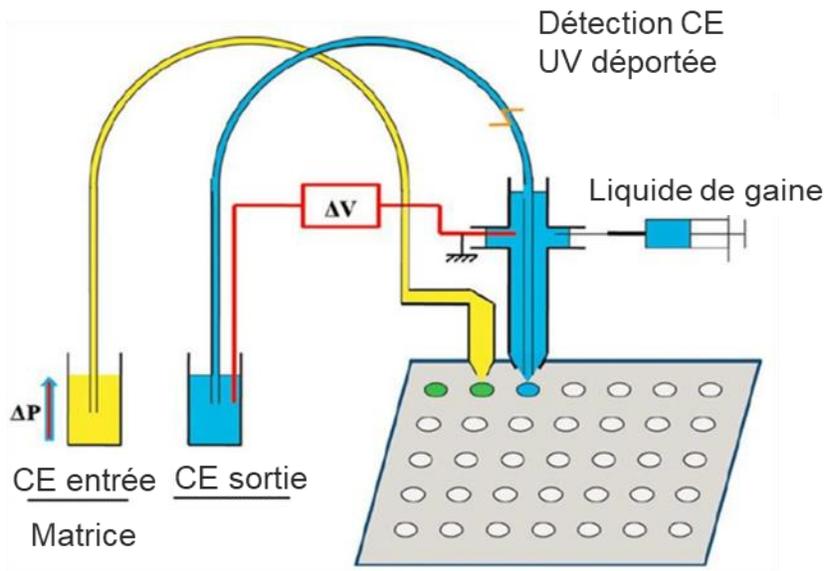


Figure II-19: Présentation schématique du dispositif expérimental de l'interface CE-UV/MALDI-MS comprenant la détection UV déportée et le système de distribution de la matrice intégré. Adapté de [213].

Le CE-MS est une technique de plus en plus utilisée et recherchée pour l'analyse dans différents domaines. Le principal avantage réside dans la disponibilité de grands ensembles de données comparables qui ont tous été obtenus en utilisant la même procédure pour la préparation des échantillons pour la CE-MS, l'analyse et l'évaluation ultérieure des données. Le CE-MS est particulièrement utilisé dans les applications "omiques" (protéomique, glycomique, métabolomique et également les applications génomiques) pour la détermination de biomarqueurs, le diagnostic des maladies et le suivi des traitements thérapeutiques. Ce couplage est également largement utilisé pour la recherche de biomarqueurs, la toxicologie, la pharmacologie, l'analyse des aliments et l'analyse des cellules individuelles [211].

II-3 Types d'éléments de détection pour les biocapteurs

Un biocapteur, tel que défini par Turner, est "un dispositif ou une unité analytique compacte incorporant un élément de reconnaissance sensible biologique ou dérivé de la biologie, intégré ou associé à un transducteur physio-chimique" [212]. Par conséquent, les éléments de reconnaissance moléculaire sont au cœur des techniques de biodétection. Les enzymes, les aptamères, l'ADN et les anticorps sont quelques exemples d'éléments de détection (appelés aussi biorécepteurs) utilisés maintenant (Figure II-20). La technologie des biocapteurs exploite les propriétés uniques de chaque biorécepteur, ce qui rend leurs applications variables et répandues [213].

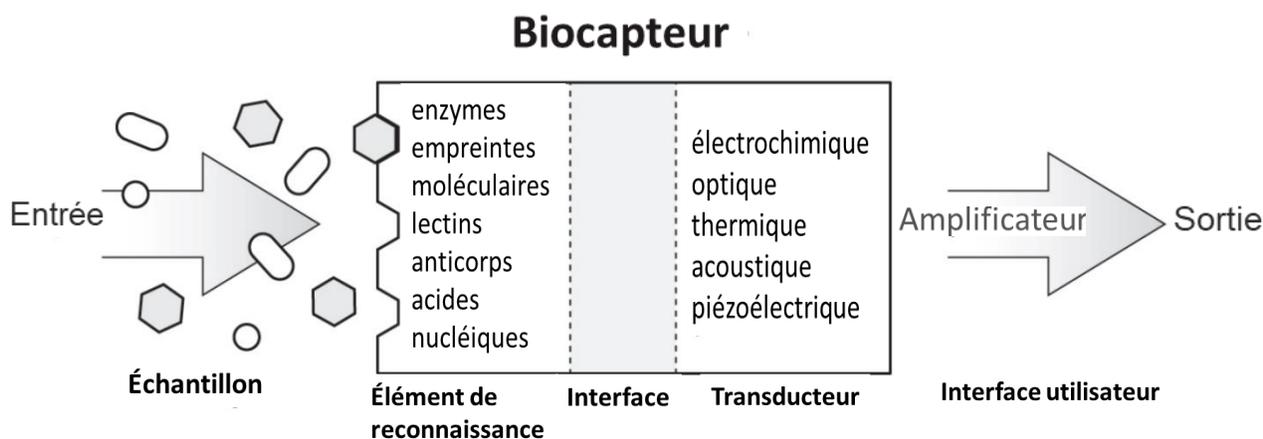


Figure II-20: Configuration schématique d'un biocapteur montrant les éléments de biorecognition, d'interface et de transduction. Adopté de [219].

La gamme de molécules et de réactifs d'affinité pouvant être utilisés à des fins de biodétection est assez large, donc un aperçu de leur diversité et de leurs applications ne sera fourni que pour les biorécepteurs utilisés dans ce travail. La détection basée sur les anticorps représente l'élément de détection d'affinité le plus commun en SPR. Cependant, les problèmes potentiels associés à l'utilisation d'anticorps liés à la disponibilité, la stabilité et la performance limitées de ces grandes protéines, qui peuvent entraîner une faible sensibilité, ont conduit à la mise en œuvre de molécules de récepteurs alternatives [22]. Ainsi de nouveaux récepteurs synthétiques gagnent actuellement du terrain en remplaçant les anticorps utilisés de manière conventionnelle pour de nombreuses applications [213]. Un intérêt particulier est consacré aux aptamères (petites molécules

oligonucléotidiques ou peptidiques) qui permettent une détection sans ambiguïté, tout en étant rentables (en termes du prix de la fabrication, de conservation et de transport pour la production de masse) et chimiquement stables. D'autres types de récepteurs, tels que les anticorps à domaine unique (également appelé « nanocorps ») ont également trouvé leur place dans la recherche, le diagnostic et la thérapie récemment [215] - [217].

II-3.1 Anticorps - comme élément de détection pour biocapteur

Les anticorps comme élément de reconnaissance (récepteur) ont révolutionné les diagnostics pour la détection d'un grand nombre d'analytes en 1975, qui est considérée comme l'année du premier développement des immunocapteurs [217]. Actuellement, les techniques de détection et de quantification robustes, fiables et à haut débit sont à la base des sciences omiques, dans lesquelles les biocapteurs à base d'anticorps continuent de jouer un rôle essentiel.

II-3.1.1 Que sont les anticorps ?

Les anticorps sont de grandes glycoprotéines produites naturellement par le système immunitaire de l'organisme en réponse à l'invasion de particules étrangères (antigènes). Toutes les molécules d'anticorps possèdent la même structure générale basé sur l'appariement de deux chaînes polypeptidiques lourdes et légères, qui permet de les intégrer dans la classe chimique commune des immunoglobulines. Il existe cinq types différents des immunoglobulines (Ig): IgG, IgA, IgM, IgE, IgD (selon l'ordre de leurs quantités respectives dans l'organisme), qui possèdent des rôles différents. Les biocapteurs à base d'anticorps sont actuellement basés sur l'utilisation des IgG qui prévalent dans le sérum. Cette classe de molécules joue un rôle essentiel dans la défense du système immunitaire contre les infections et les maladies.

La molécule d'anticorps est constituée de quatre chaînes polypeptidiques liées par des ponts disulfure, deux chaînes lourdes (H) et deux chaînes légères (L), qui à leur tour sont constituées de régions constantes (C) et variables (V) [218]. La chaîne L contient deux régions: une région variable (VL) et une constante (CL), tandis que chaque chaîne H possède une région variable (VH) et trois régions constantes (CH₁, CH₂ et CH₃), comme le montre la Figure II-21. La structure générale d'un anticorps peut être divisée en deux régions distinctes: le domaine de liaison à l'antigène (de l'anglais «antigen-binding fragment », Fab) et le domaine constant (Fc). Le composant Fab de l'anticorps est constitué par les deux régions variables: il renferme des sites de liaison à l'antigène (appelés paratopes), qui est responsable de la spécificité de l'antigène. La région Fc est nécessaire à la médiation des fonctions effectrices telles que la présentation de l'antigène au système immunitaire, la dégranulation, la régulation de l'activation et de la prolifération cellulaire [219].

En fonction de leur mode de production, les anticorps peuvent être classés en deux groupes: les anticorps polyclonaux et MAcs. Les anticorps polyclonaux sont préparés à partir de plusieurs plasmocytes contre une cible spécifique en utilisant des techniques conventionnelles. Cela entraîne la production d'une population d'anticorps inhomogènes ayant une spécificité et une affinité différentes, car les anticorps polyclonaux reconnaissent le même antigène mais par différent

épitopes. La technologie des MACs ou des hybridomes monoclonaux a révolutionné la production d'anticorps en tant qu'outils de recherche pour la prévention, la détection et le traitement des maladies, car elle a permis de générer une population uniforme d'immunoglobulines stables, hautement spécifiques et reproductibles [219]. Néanmoins, les anticorps polyclonaux peuvent être produits relativement rapidement par rapport aux anticorps monoclonaux, avec un faible coût, peu de compétences techniques, étant stables sur une large gamme de pH et de concentrations en sel.

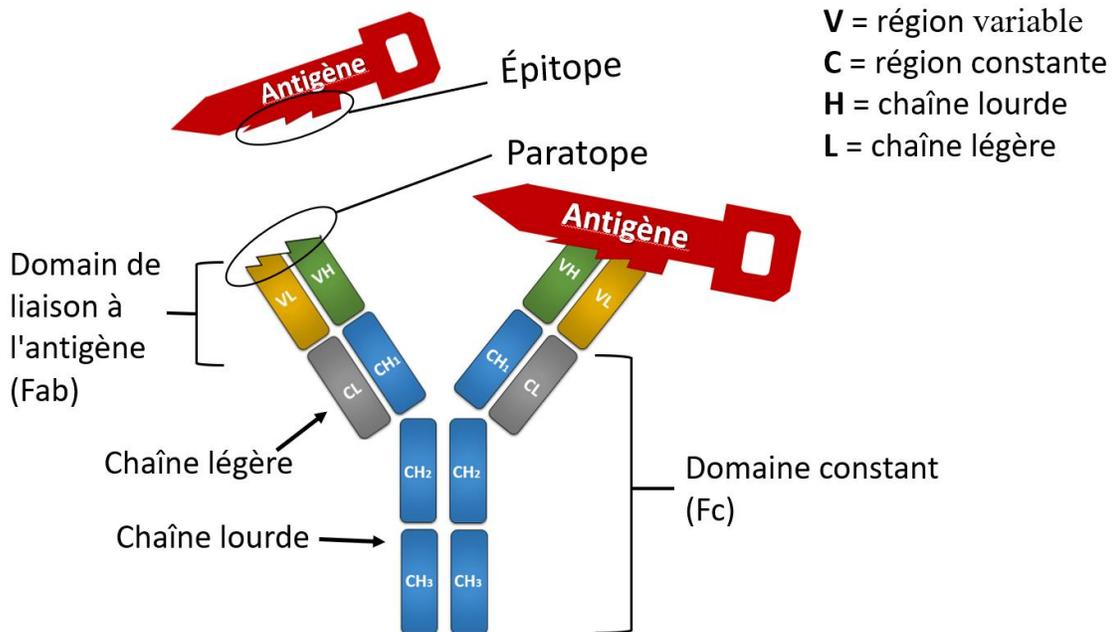


Figure II-21: Structure typique d'une molécule d'IgG. La molécule d'anticorps (~150 kDa) est constituée de quatre chaînes peptidiques contenant deux chaînes lourdes de classe identique d'environ 50 kDa et deux chaînes légères identiques d'environ 25 kDa. Le tétramère résultant a deux moitiés identiques, chacune contenant un site identique reconnaissant l'antigène.

II-3.1.2 Les anticorps comme élément de détection

Les anticorps, en tant que récepteurs hautement spécifiques et sensibles, ont suscité un intérêt pour le développement de différentes applications analytiques, notamment la détection de biomarqueurs de maladies, de contaminants alimentaires et environnementaux, d'agents de guerre biologique et de drogues illicites [219]. Ils constituent donc des éléments de reconnaissance les plus utilisés pour l'immobilisation à la surface du capteur.

Les performances des biocapteurs dépendent fortement de trois facteurs critiques: (i) les capacités de greffage des éléments de reconnaissance tout en maintenant l'activité naturelle des récepteurs; (ii) l'accessibilité des récepteurs immobilisés à l'analyte en solution; et (iii) la faible adsorption non spécifique à la surface du biocapteur.

Les propriétés physico-chimiques des surfaces des biocapteurs sont à prendre en compte pour une immobilisation optimale des anticorps, et pour limiter l'adsorption non spécifique [220]. Les anticorps doivent être greffés sur la surface du capteur sans altérer leur spécificité et leur

activité immunologique, afin de ne pas affecter la limite de détection, la sensibilité et la performance globale du biocapteur [221]. Les anticorps peuvent se fixer à la surface solide dans de nombreuses orientations différentes, ce qui peut entraver l'accès de l'antigène au site de liaison de l'antigène et donc diminuer les performances du capteur. Une orientation contrôlée et une modification structurelle minimale des anticorps pendant l'étape d'immobilisation permettront d'améliorer les facteurs de performance du biocapteur jusqu'à 200 fois par rapport à une immobilisation aléatoire [221]. Diverses approches ont été proposées pour induire l'orientation des récepteurs à la surface du capteur par immobilisation via des groupes réactifs. La plus couramment utilisée consiste à fonctionnaliser la surface du capteur avec du glutaraldéhyde, du carbodiimide, de l'ester succinimide, du maléimide avant de greffer les récepteurs. Les récepteurs sont donc dotés d'un groupe correspondant pour induire une greffe plus contrôlée à la surface (par exemple, en utilisant un domaine de liaison dextran-streptavidine pour immobiliser un récepteur biotinylé [170]). La détection par différentes plateformes de biocapteurs utilisant le signal amplifié par des nanoparticules (par exemple, les "forêts" de nanotubes disposées verticalement à la surface de capteur permettent la fixation d'anticorps à haute densité) est également un moyen intéressant pour augmenter la sensibilité de la biodétection [222]. Cependant, les anticorps sont des biomolécules naturelles dont les capacités de liaison et la stabilité dépendent fortement des conditions expérimentales (par exemple, la température et le pH), ce qui les rend incapables de rivaliser avec des fragments d'anticorps petits et puissants ou avec des molécules des récepteurs synthétisées chimiquement et donc extrêmement stables comme les aptamères.

II-3.2 Anticorps à domaine unique et fragments d'anticorps - nouvel élément de détection pour biocapteur

Les stratégies visant à améliorer les performances des IgG conventionnelles sont étudiées depuis au moins un demi-siècle. Il a été constaté que des domaines variables N-terminaux isolés de chaînes lourdes (VH) et légères (VL) sont suffisants pour la liaison des antigènes [223]. De plus, il a été démontré que les chaînes lourdes et légères des anticorps peuvent conserver la spécificité de liaison à l'antigène, et que les fragments d'anticorps peuvent donc être produits sous forme de fragment d'anticorps monovalent (Fab) ou de fragment variable à chaîne unique (de l'anglais « single-chain Fv », scFv) avec des domaines VH et VL reliés par un pont polypeptidique (Figure II-22). Cependant, l'affinité et la solubilité de ces fragments sont souvent réduites [214]. La découverte dans les années 90 chez les camélidés (par exemple les chameaux et les lamas) d'anticorps pleinement fonctionnels sans chaînes légères et dépourvus du premier domaine constant de chaîne lourde a permis de révolutionner l'utilisation des anticorps comme récepteurs de biodétection (Figure II-22) [224]. Le développement de nouveaux anticorps, dix fois plus petits que les IgG classiques, appelés nanobodies® (nanocorps) ou anticorps à domaine unique (sdAbs, VHHs), a favorisé leur large utilisation dans la recherche, le diagnostic et la thérapie.

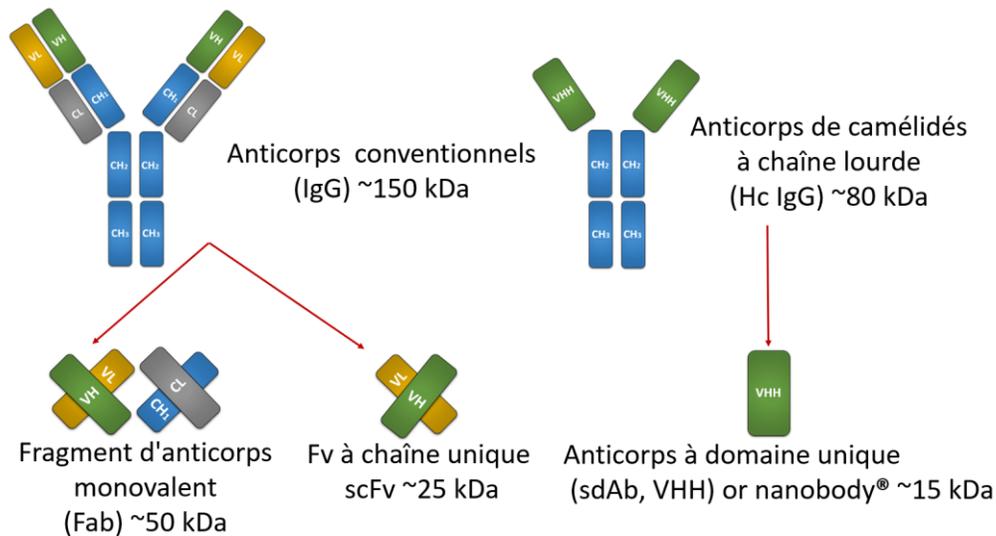


Figure II-22: Représentation schématique des anticorps conventionnels (humains) et de camélidés, ainsi que de leurs fragments disponibles.

II-3.2.1 Que sont les anticorps à domaine unique (nanobodies®)

Après la découverte de la structure des anticorps de camélidés, il a également été démontré que le domaine de liaison à l'antigène, de ces anticorps de camélidés, possèdent une très bonne solubilité et une stabilité remarquable. Ainsi, les sdAbs rivalisent avec les anticorps ou fragments d'anticorps conventionnels dans divers domaines d'application. Ces petits récepteurs ont des boucles plus longues que les VH des IgG conventionnelles, souvent reliées par un pont disulfure, afin d'assurer une rigidité globale et de fournir une surface de liaison à l'antigène adéquate. Les sdAbs possèdent des affinités de liaison similaires à celles des anticorps classiques [225].

Malgré la découverte de sdAbs chez les poissons cartilagineux [226], la plupart des recherches et des développements actuels ont été réalisés à l'aide d'anticorps de camélidés car ils sont plus faciles à manipuler et à produire, y compris pour l'immunisation. En outre, les méthodes d'isolement des sdAbs spécifiques utilisant des bactéries, des levures, des plantes, des lignées de cellules de mammifères ou des ribosomes sont maintenant bien établies [214], [225].

Les sdAbs ont un avenir prometteur dans les domaines de la thérapie et de la recherche, grâce à leur structure unique et à leur petite taille (rayon hydrodynamique de 2 à 2,5 nm et ~15 kDa). En effet, leur taille leur permet de pénétrer les tissus beaucoup plus efficacement qu'une IgG entière, ce qui constitue la base d'une nouvelle génération de molécules thérapeutiques [227]. Le domaine VHH du camélidé qui forme le nanocorps est homologue au domaine VH de l'anticorps et contient trois boucles très variables (H₁, H₂, H₃). Ces boucles forment une interface structurale allongée d'un côté du domaine protéique replié qui contribue à l'interface de liaison à l'antigène, ou paratope, qui détermine la spécificité de liaison des nanocorps à l'antigène. La diversité potentielle des séquences de ces trois boucles est beaucoup plus petite que celle des six boucles très variables qui déterminent en grande partie la spécificité de liaison sur le complexe de domaines VH-VL des anticorps [228].

Il a été démontré que les sdAbs ne génèrent pas de diversité autorisant la spécificité par une diversité élevée de séquence ou de structure dans la molécule. En effet, par rapport aux anticorps, les sdAbs n'exploitent pas la variation élevée de la séquence dans les boucles H₁ et H₂ pour compenser la perte du domaine VL. Toutefois, les sdAbs présentent une variation structurelle plus élevée, en particulier dans la boucle H₁. La boucle H₃ des sdAbs est la seule partie du domaine qui présente une plus grande diversité de séquences que les domaines VH des IgGs; et la majorité de cette diversité de séquences plus élevée est obtenue par l'incorporation, en moyenne, de seulement 3-4 résidus supplémentaires. Apparemment, la perte du domaine VL est compensée par une très petite insertion, associée à la liberté d'adopter des conformations de boucle plus diverses [228].

Contrairement aux IgG, ces petits récepteurs ont montré un repliement correct après dénaturation chimique ou thermique et une plus grande résistance aux conditions de dénaturation [214]. Les sdAbs ont une demi-vie limitée et une homologie considérable avec les séquences VH humaines, ce qui explique leur faible immunogénicité [229]. La structure plus simple des sdAbs leur permet d'être "humanisés" [230]. Ils peuvent encore être facilement fonctionnalisés, par exemple par des fluorophores, sans perdre leur affinité ou leur stabilité [225]. Cela indique que la capacité de spécificité moléculaire dans un petit domaine protéique est beaucoup plus élevée que ce à quoi on pourrait s'attendre sur la base des anticorps classiques, ce qui suggère qu'il existe un potentiel prometteur pour générer une liaison spécifique de haute affinité à une gamme diversifiée de cibles en utilisant des séquences d'acides aminés courtes qui sont relativement restreintes.

II-3.2.2 Les nanocorps comme élément de détection

Les sdAbs sont dotés de caractéristiques avantageuses en termes de taille, de solubilité, d'affinité (de nano- à picomolaire), idéales pour la médecine, les diagnostics et les applications biotechnologiques [231]–[233].

Un des exemples intéressants est celui des chromobodies ou fluobodies, fusion génétique exprimée à l'intérieur d'une cellule d'une protéine fluorescente avec des nanocorps. Ils sont utilisés pour tracer l'antigène dans divers compartiments cellulaires de cellules vivantes [234], [235]. L'application d'un sdAb lié à la protéine fluorescente verte (de l'anglais « green fluorescent protein », GFP) pour étudier les interactions protéine-protéine a été signalée [225]. L'utilisation de ces nanocorps de haute affinité ciblant la GFP en combinaison à la voie universelle du protéasome de l'ubiquitine a été décrit pour la dégradation des protéines ciblées [236]. Le premier exemple de déclenchement de la déplétion de l'antigène capturé dans ce complexe de nanocorps ubiquitinés a été démontré en utilisant l'expression intracellulaire dans des modèles de *Drosophila melanogaster* et de *Danio rerio* [237]. En outre, la localisation d'une seule molécule à l'aide de techniques d'imagerie à superrésolution est également possible grâce à l'utilisation de sdAbs ciblant la GFP couplés à des colorants organiques sur toute construction marquée par GFP [215]. La petite taille et la possibilité de radiomarquage font des nanocorps un outil idéal pour l'imagerie in vivo non invasive [238].

Les sdAbs représentent une classe de molécules des récepteurs à haute affinité qui peuvent piéger des cibles dotées de conformations changeant rapidement, ce qui conduit à l'identification de conformations inconnues et pourrait stabiliser les protéines qui sont sujettes à la dégradation, au dépliage ou à l'agrégation. Ceci est particulièrement utile pour la cristallographie aux rayons X, car elle permet d'identifier des régions fonctionnellement importantes d'enzymes et d'autres biomolécules. Plusieurs protéines membranaires et protéines instables ont été stabilisées avec les sdAbs, et un nombre impressionnant de structures cristallines de ces protéines "difficiles" ont été déterminées récemment [238].

Les nanocorps sont des outils précieux comme alternative aux anticorps, car ils peuvent être facilement modifiés sans altérer les groupes chimiquement réactifs proches du paratope. De plus, ils peuvent être fonctionnalisés du côté non réactif afin de diriger leur immobilisation sur la surface du capteur pour une capacité de capture maximale de l'antigène, ce qui en fait des candidats idéaux pour la production de microarrays à anticorps. Ces dernières ont permis la création de biocapteurs sensibles et sélectifs [230]. Les expériences SPR utilisant des nanocorps comme récepteurs ont permis de déterminer les paramètres cinétique de liaison des anticorps à domaine unique pour leur cible [239]–[241]. L'utilité des nanocorps a été rapportée pour la détection de marqueurs tumoraux tels que l'antigène prostatique spécifique à des concentrations cliniques pertinentes [230] ou pour l'évaluation de l'interaction entre une protéine fluorescente verte et un sdAb dérivé d'un anticorps à domaine unique de lama [242].

La capture de cibles par nanocorps peut être utilisée pour l'analyse par MS, pour étudier les complexes protéiques. La petite taille des nanocorps permet de minimiser la liaison non spécifique et de réduire la quantité de peptides tryptiques libérés de la résine d'affinité lors de la digestion sur billes [243]. Une méthode de dépistage des M-protéines associées aux gammopathies monoclonales et à certaines autres maladies a récemment été signalée [244]. Une immunopurification utilisant un mélange spécifique de nanocorps-billes a été réalisée pour le dépistage sérique de 556 patients et les protéines immunocapturées ont été analysés par MALDI-TOF MS. La méthode s'est avérée efficace et spécifique, avec un seul pic d'adsorption non spécifique de l'albumine dans la région de masse analysée [244].

Les caractéristiques des nanocorps en font un outil parfait pour être inclus dans des constructions plus importantes telle que des nanoparticules fonctionnalisées. La grande stabilité et la rigidité conformationnelle ont permis de conjuguer chimiquement les nanocorps à des nanoparticules d'or ramifiées (en anglais « branched gold nanoparticles »). Cela a créé des agents thérapeutiques photothermiques efficaces, activés par l'irradiation laser, pour le traitement du cancer [245].

Malgré les nombreux avantages de la technologie des nanocorps, certains inconvénients doivent encore être surmontés. Le principal inconvénient est le fait que la production de nanocorps est relativement coûteuse (hébergement d'animaux, immunisation, construction de bibliothèques et phagoculture) [225], ce qui limite leur application à grande échelle et intensifie l'intérêt pour d'autres types de récepteurs.

II-3.3 Aptamère - élément de détection pour le biocapteur

Au cours des dernières décennies, des aptamères d'acides nucléiques de haute affinité ont été développés pour la reconnaissance d'un large éventail de molécules, d'ions métalliques et de systèmes complexes, tels que des cellules vivantes entières ou des microorganismes pathogènes [246]. Les aptamères, souvent appelés "anticorps synthétiques", peuvent concurrencer les anticorps dans les applications thérapeutiques et diagnostiques, car ils sont plus petits, peuvent être facilement modifiés, sont moins chers à produire et peuvent être potentiellement dirigés contre toute molécule cible [247]. Ces oligonucléotides artificiels (ADN ou ARN), et beaucoup plus rarement des peptides, sélectionnés *in vitro*, représentent des éléments de reconnaissance sensibles mais simples pour le développement de biocapteurs. Comme dans ce travail, seuls des aptamères d'ADN ont été utilisés, toutes les parties suivantes feront donc exclusivement référence à ce type de molécules. À l'origine, les aptamères étaient exploités pour le diagnostic clinique, mais grâce à leurs caractéristiques uniques, leur utilisation s'est étendue à la plupart des domaines auparavant dominés par les anticorps. Les domaines relevant du champ d'application, le processus de sélection des aptamères et les principales caractéristiques seront abordés dans cette section.

II-3.3.1 Que sont les aptamères ?

Les aptamères (le mot vient du latin "aptus" qui signifie "s'adapter" et du grec "meros" qui signifie "partie" ou "corps") sont des molécules des récepteurs artificielles, qui peuvent être produites par deux méthodes principales: la méthode SELEX de l'évolution systématique de ligands par enrichissement exponentiel (de l'anglais « systemic evolution of ligands by exponential enrichment ») ou la méthode non-SELEX [248]. Les aptamères sont généralement des oligonucléotides à brin simple (15 à 80 nucléotides, avec des poids moléculaires de 5 à 30 kDa), tels que l'ARN ou l'ADN à brin simple (ADNsb), qui sont sélectionnés selon la méthode évolutionniste darwinienne. La liaison des aptamères à leurs cibles a référence au concept des interactions « lock- and-key ». Cela signifie que contrairement aux séquences d'ADN ou d'ARN, qui se lient en raison de la complémentarité des bases, les aptamères peuvent capturer leurs ligands en se repliant dans des structures 3D bien définies avec des interfaces uniques capables de se lier à une grande variété de cibles. Ces récepteurs artificiels sont le plus souvent sélectionnés à partir de bibliothèques combinatoires d'acides nucléiques synthétiques, possédant des caractéristiques de liaison spécifiques à leur ligand. Grâce à SELEX, de nombreux aptamères de haute affinité et hautement spécifiques ont été générés contre des cibles non immunogènes et toxiques, ce qui rend la technique supérieure aux anticorps et permet la conception et la synthèse de sondes ou de molécules de capture pour ces cibles "difficiles" [249]. Au milieu des années 60, le premier aptamère, bien qu'il n'était pas mentionné comme tel, a été créé par le groupe de Spiegelman, qui a réalisé que trois processus fondamentaux de l'évolution darwinienne - l'amplification, la mutation et la sélection - pouvaient être transformés en processus chimiques et appliqués à une population de molécules d'ARN [250]. Néanmoins, l'histoire connue des aptamères a commencé en 1990, lorsque plusieurs groupes ont appliqué presque simultanément SELEX, qui est une technique de chimie combinatoire, pour le criblage des aptamères des acides nucléiques [251]–

[253]. Depuis, la méthodologie SELEX a évolué et diverses approches améliorant ses performances ont été développées [254].

II-3.3.2 Processus de sélection des aptamères

Le principe général de SELEX repose sur la synthèse et le criblage simultané de grandes bibliothèques de séquences oligonucléotidiques structuralement distincts afin d'identifier et d'isoler les aptamères fonctionnels. Ce processus comprend trois grandes étapes cycliques:

1. l'incubation de la bibliothèque d'oligonucléotides, composée d'environ 10^{13} à 10^{15} oligonucléotides différents, avec la molécule cible;
2. la séparation par élution des complexes de liaison — les acides nucléiques liés sont ensuite séparés des oligonucléotides non liés et faiblement liés;
3. l'amplification en chaîne par polymérase (PCR, pour les aptamères ADN) et/ou par transcription inverse-amplification en chaîne par polymérase (RT-PCR, pour les aptamères ARN).

Le cycle est répété 8 à 15 fois avant qu'un pool enrichi d'acides nucléiques ayant une affinité de liaison et une spécificité élevées soit obtenu, cloné et séquencé comme illustré sur la Figure II-23 [254].

Grâce à des cycles itératifs de sélection et d'amplification dans des conditions de plus en plus strictes, il est possible d'obtenir quelques séquences optimisées — les aptamères potentiels. Toutefois, plusieurs cycles de sélection de cibles négatives sont généralement nécessaires pour éviter l'apparition de liants non spécifiques pour le matériau de support (colonne de chromatographie d'affinité, billes magnétiques, filtres de nitrocellulose, etc. De même, pour éviter la réactivité croisée et ne sélectionner que les aptamères très spécifiques de la cible, une étape de pré-incubation appelée contre-sélection est ajoutée au processus qui peut éliminer les séquences non spécifiques due à leur liaison à des molécules potentiellement interférentes [255].

Bien que le SELEX classique ait permis de sélectionner avec succès des dizaines d'aptamères fonctionnels *in vitro*, cette technique n'est pas toujours efficace pour les applications d'aptamères *in vivo* [256]. Cela peut s'expliquer par les changements de conformation de la molécule cible au cours de la sélection *in vitro*, qui peuvent différer considérablement de leurs conformations natives dans des conditions physiologiques *in vivo*. Afin de surmonter cet inconvénient, de nombreuses variantes de la méthode SELEX ont été proposées, comme SELEX génomique, spiegelmer, SELEX *in vivo*, photo-SELEX, monoLEX, SELEX sur cellules entières et *in silico*-SELEX [248], [257]. Néanmoins, plusieurs obstacles importants freinent le développement et l'application des aptamères. Le premier obstacle est que le processus SELEX est généralement long et que son taux de réussite est d'environ 50 %, dépendant du type de cible, de la taille, de la pureté, de la concentration, de la distribution de la charge, etc. [258]. La deuxième contrainte est liée aux inconvénients du processus SELEX lui-même. Ses bibliothèques aléatoires de départ sont toujours incomplètes (parce que le nombre théorique de séquences différentes possibles est de 4^n , où n est le nombre de nucléotides dans la séquence); l'augmentation de la bibliothèque peut augmenter les chances de sélectionner l'aptamère, mais elle rendra l'analyse déjà

longue encore plus longue et beaucoup plus coûteuse. De plus, une amplification PCR défavorable peut couvrir et cribler certaines séquences ayant la plus grande affinité et déformera les séquences non spécifiques [169].

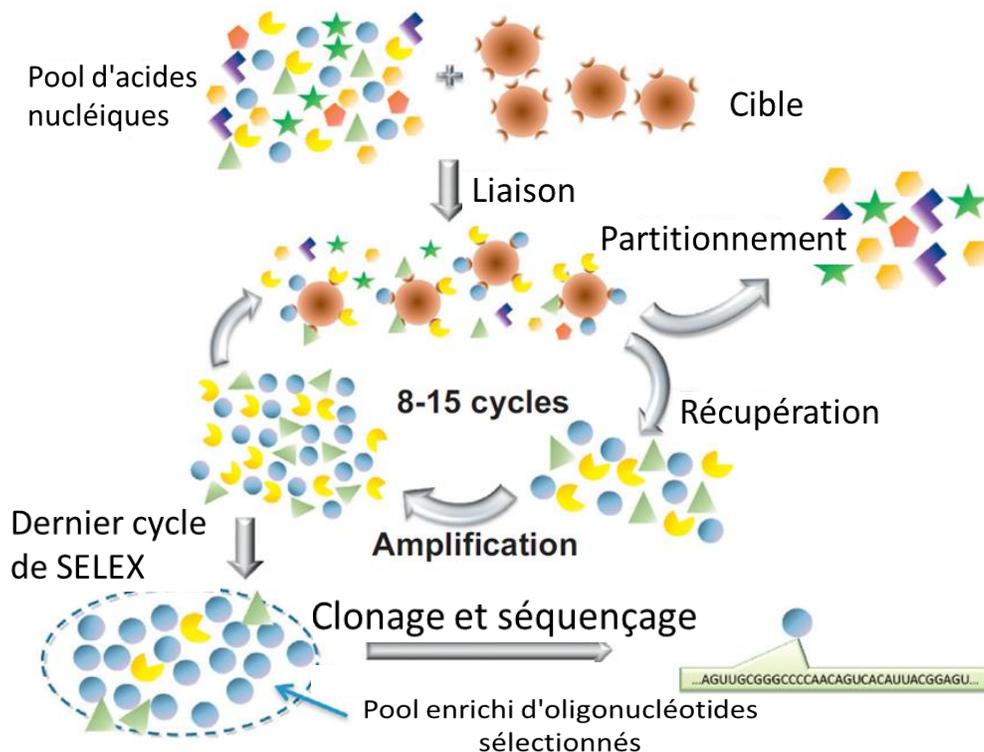


Figure II-23: Représentation schématique du processus de sélection *in vitro* des aptamères par SELEX. Adopté de [248].

Berezovski et Krylov ont proposé une solution à ce problème, en réalisant la première tentative expérimentale de sélection non-SELEX des aptamères d'acides nucléiques, qui évite l'étape d'amplification par PCR [76]. La méthode suggérée implique NECEEM basée sur la partition. Elle comprend deux étapes principales: l'incubation de la banque d'oligonucléotides avec la cible et la séparation des complexes de liaison de ceux qui ne sont pas liés sans qu'il soit nécessaire de les amplifier [259] (Figure II-24). Le partitionnement NECEEM est effectué après la détermination de la constante de dissociation (K_D) du mélange. Ce cycle est généralement répété quelques fois jusqu'à l'obtention de l'isolement des aptamères de haute affinité.

D'autres méthodes non-SELEX, comme une méthode à haut débit pour l'identification des aptamères le HAPIScreen [260] et la sélection à cycle unique des aptamères par la DNase pour les protéines déposées sur une membrane [261] ont été récemment signalées.

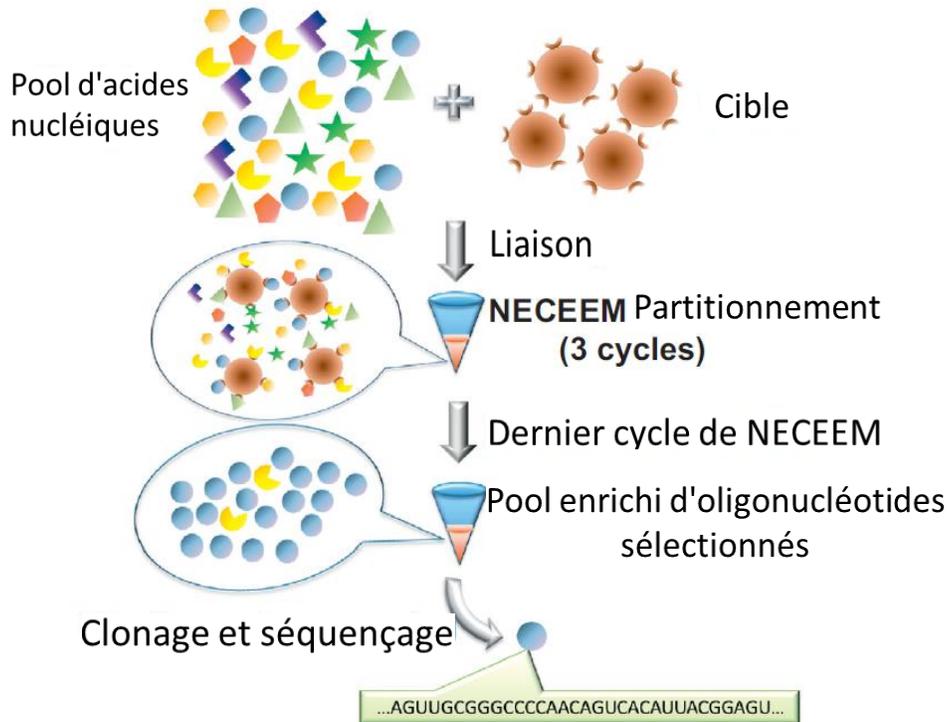


Figure II-24: Représentation schématique du processus de sélection non-SELEX des aptamères par NECEEM - partitionnement. Adopté de [248].

II-3.3.3 Les caractéristiques de l'aptamère comme élément de détection

En plus de caractéristiques similaires à celles des anticorps, par exemple une affinité et une sélectivité élevées, les aptamères présentent des avantages supplémentaires par rapport aux anticorps. Ils sont de taille plus petite que les anticorps, ce qui permet de cibler des ligands peu accessibles ou intracellulaires. Les aptamères peuvent distinguer des molécules très similaires qui diffèrent par un seul groupe fonctionnel [248]. Ainsi, les aptamères remplacent progressivement les anticorps dans les domaines basés sur la reconnaissance sélective: diagnostic médical et biologique, application de biodétection et thérapeutiques [247], [249], [262].

Une fois sélectionnés et optimisés, les aptamères d'acides nucléiques peuvent être facilement reproduits par synthèse chimique, ce qui réduit leurs coûts de production et offre les avantages des molécules chimiques et biologiques. Les aptamères peuvent facilement subir des modifications chimiques, ce qui permet d'augmenter leur stabilité et même d'améliorer l'affinité globale pour la cible [169]. De plus, ils sont rarement concernés par les contaminations ou les variations de lot à lot. Les aptamères sont produits par des processus chimiques bien établis, qui, contrairement à l'immunisation de l'hôte pour la production d'anticorps, permettent de sélectionner des récepteurs potentiellement dirigés contre n'importe quelle cible, même non immunogène ou toxique. En outre, une faible immunogénicité native permet l'utilisation d'aptamères *in vivo* et *ex vivo*, à l'intérieur et à l'extérieur des cellules. Toutefois, leur demi-vie est limitée par les nucléases, auxquelles on peut s'opposer par une fonctionnalisation chimique des aptamères. Cela

a permis une application médicale des aptamères, dont un médicament approuvé par US Food and Drug Administration (FDA) (pegaptanib (Macugen)), et deux en phase de développement avancée (ACR-1905 et E-10030) [263].

Contrairement aux anticorps, qui souffrent d'une dégradation permanente, les aptamères sont des récepteurs facilement régénérables pour un usage répété. Par exemple, afin de régénérer la surface des capteurs, les aptamères peuvent être chauffés, ce qui entraînera leur dénaturation avec la libération consécutive du ligand capturé. Afin de replier les aptamères dans une configuration fonctionnelle, il suffit d'abaisser la température ambiante. Ce processus peut être répété au moins 40 fois avec ~ 90% des aptamères préservant leur fonction [248]. En outre, les aptamères sont facilement adaptables à différentes plateformes de détection et à différentes modalités de signalisation par des modifications chimiques, ce qui permet leur intégration à d'autres molécules ou leur greffage sur diverses surfaces de support. Ces caractéristiques, en plus de leur remarquable stabilité à la déshydratation et à la dénaturation chimique, permettent d'identifier l'énorme potentiel des aptamères en tant que molécules des récepteurs à des fins de biodétection. La comparaison des anticorps aux aptamères est présentée dans le Tableau II-1 ci-dessous. Les nanocorps ne sont pas incluses dans ce tableau comparatif, car leur utilisation en tant que récepteurs pour la biodétection n'est pas encore aussi bien établie et caractérisée que celle des anticorps et des aptamères.

Tableau II-1: Anticorps vs Aptamères	
Anticorps	Aptamères
Sélection et production	
Immunisation de l'hôte :	Procédures SELEX et non-SELEX :
<i>In vivo</i> Cible hautement immunogène, mais non toxique Site d'interaction imprévu Des semaines pour le poly- et des mois pour le monoclonal Abs Conditions physiologiques	<i>In vitro</i> Potentiellement tout type de molécules Site d'interaction prédéfini Quelques jours avec un processus automatisé Potentiellement toutes les conditions de laboratoire
Production et transport	
Production induite par l'immunisation :	Synthèse chimique en phase solide :
Montant limité Le coût est raisonnable à grande échelle Variation d'un lot à l'autre Difficile à fonctionnaliser ou à marquer Conditions de transportation élaborées	Une fois sélectionnés, les stocks peuvent être reconstitués Rentable Reproductible Facile à fonctionnaliser ou à marquer Transportation à température ambiante

Caractéristiques et attributs	
Haute affinité	Haute affinité
Haute spécificité	Haute spécificité
Grande taille	Petite taille
Non-flexible	Flexible
Sensible aux conditions	Stabilité (pH, température, déshydratation)
Dénaturation irréversible	Dénaturation réversible
Souffre d'une dégradation permanente à la surface du biocapteur	Récepteurs de biocapteurs réutilisables et repliables
Durée de vie courte	Longue durée de vie
Plus difficile à conjuguer aux surfaces	Plus facile à conjuguer aux surfaces
Immunogénicité plus élevée	Immunogénicité plus faible
Applications extracellulaires	Applications intra et extra cellulaires
	Sensible à la dégradation des nucléases

Une nouvelle génération des récepteurs appelés SOMAmers (de l'anglais « Slow Off-rate Modified Aptamers ») est particulièrement bien adaptée à la biodétection [264], [265]. Ces molécules sont conçues à l'aide d'un ensemble polyvalent de modifications chimiques (analogues de nucléotides triphosphates modifiés en position 5 de l'uridine avec différentes fractions protéiques, par exemple le benzyle, le 2-naphtyle ou le 3-indolyl-carboxamide) qui confèrent aux SOMAmers des groupes protéiques et d'autres groupes fonctionnels. Ces modifications peuvent interagir avec un plus grand nombre d'épitopes sur une plus grande gamme de molécules cibles par rapport aux aptamères d'ADN "standard". De plus, seuls les SOMAmers caractérisés par un taux de dissociation lent sont sélectionnés *in vitro* dans de grandes bibliothèques de séquences randomisées par une version modifiée du SELEX. Cette qualité particulière permet la rupture sélective d'interactions de liaison non spécifiques (ou non apparentées), qui ont des taux de dissociation plus rapides que les interactions apparentées, permettant ainsi une détection plus efficace des ligands dans de petits volumes d'échantillons [266].

Les dispositifs réutilisables qui doivent être stockés pendant de longues périodes à des températures variables constituent un autre créneau d'application pour les capteurs basés sur l'aptamère, c'est-à-dire les capteurs de détection des contaminants environnementaux ou alimentaires, les plateformes de détection de bactéries ou de virus. Les aptamères, en raison de leur stabilité décrite ci-dessus, sont compatibles avec ces dispositifs miniatures et portables qui ne nécessitent pas de conditions de stockage particulières [262].

Objectifs de la thèse

Comme cela a été démontré, il existe un besoin de développer une plateforme de découverte de biomarqueurs pour divers domaines scientifiques, médicaux et pharmaceutiques. Les scientifiques focalisent leurs recherches sur l'analyse des interactions biomoléculaires, la compréhension de leurs paramètres cinétiques et thermodynamiques également. Ainsi, l'objectif de ce projet de doctorat était le développement de la méthode de couplage SPRi-MS, qui permet le suivi de la cinétique des complexes biomoléculaires ainsi que l'identification sans ambiguïté des partenaires d'interactions.

Le suivi en temps réel des interactions récepteur-ligand avec l'identification suivant des ligands capturés par SPR-MS est une approche bien connue actuellement. Cependant, le fait que jusqu'à présent, malgré l'intérêt explicite pour le développement d'une plateforme de biodétection performante, une seule classe de récepteur (anticorps) était utilisée, indique la complexité du problème. D'autres classes de récepteurs, notamment les aptamères et les nanocorps, adaptés à la capture de ligands hautement efficaces ont attiré l'attention des chercheurs, mais n'ont jamais été décrits dans le contexte du couplage SPRi-MS sur la même surface de capteur. La définition des conditions expérimentales appropriées pour SPRi et MS, la spécificité et l'affinité de ces nouveaux récepteurs, ainsi que leur potentiel pour le couplage de deux techniques expérimentales doivent être clarifiés et pris en compte lors de la conception d'une nouvelle plateforme de biodétection. Donc, l'objectif de cette thèse est l'exploration de différentes solutions pour le développement d'un nouveau support de biodétection utilisant des microarrays de récepteurs et l'évaluation de son utilité pour le suivi et la capture de ligands dans des conditions réelles. Je compte notamment profiter de la possibilité de greffer simultanément différentes classes de récepteurs sur le même support afin d'explorer et de comparer leur impact sur la détection SPRi-MS.

La preuve de concept des microarrays à aptamères et des microarrays mixtes à anticorps/aptamères pour le couplage sera étudiée et décrite sur les cas modèles: récepteurs de β -lactoglobuline et de α -thrombine. La conception d'essai et, par conséquent, son efficacité, sa sensibilité et sa performance globale doivent être déterminés et adaptées à chaque cas particulier. Par conséquent, le choix optimal des récepteurs, leur immobilisation et les conditions expérimentales seront évalués. Une présentation et l'évaluation de l'utilisation des nanocorps pour le couplage SPRi-MS sera faite. Le développement de l'imagerie MS sur microarray des récepteurs pour l'automatisation du couplage SPRi-MS sera décrit. En outre, de nouvelles géométries de surface de biocapteur et une méthode de dépôt de matrice pour l'optimisation de la procédure de couplage seront présentées.

Chapter III. **Matériels et méthodes**

Dans ce chapitre sont indiqués tous les produits chimiques, réactifs, méthodes et instruments d'analyse utilisés pour la recherche décrite dans la partie expérimentale de cette thèse. Le contexte théorique de certaines techniques expérimentales utilisées dans ce travail de thèse et non décrites dans les chapitres précédents est également couvert.

III-1 Réactifs et produits chimiques

III-1.1 Produits chimiques

Tous les produits chimiques utilisés dans ce travail sont indiqués dans le Tableau III-1. L'eau déionisée pure (18,2 M Ω) a été préparée en laboratoire juste avant son utilisation avec les systèmes d'eau ultrapure Milli-Q® (Merck Millipore, France).

Tableau III-1: Liste des produits chimiques utilisés.

Produit	Fournisseur	Référence	Conditionnement	Conservation
O-(2-mercaptoéthyl)- O'-méthyl-hexa(éthylène glycol)	Sigma-Aldrich-Merck	672572	250 mg	- 20°C
HS-PEO-CH ₃				
O-(2-carboxyéthyl)-O'-(2-mercaptoéthyl)hepta-éthylène glycol	Sigma-Aldrich-Merck	672688	250 mg	- 20°C
HS-PEO-COOH				
N-hydroxysuccinimide (NHS)	Sigma-Aldrich-Merck	130672	25g	T°C ambiante
N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC)	Sigma-Aldrich-Merck	D80002	25g	T°C ambiante
4-pyrrolidinopyridine	Sigma-Aldrich-Merck	213373	5g	T°C ambiante
L-Lysine	Sigma-Aldrich-Merck	L5501	1g	4°C
Chlorhydrates de L-Cystéine	Sigma-Aldrich-Merck	C1276	10g	4°C
Glycine	Sigma-Aldrich-Merck	G7126	1kg	T°C ambiante

Éthanolamine (EtAm)	Sigma- Aldrich- Merck	398136	25 ml	4°C
Solution d'acétate d'ammonium	Sigma- Aldrich- Merck	A2706	100 ml	4°C
Solution tampon Tris- EDTA (TE buffer)	Sigma- Aldrich- Merck	93283	100 ml	T°C ambiante
Tampon phosphate salin (PBS)	Sigma- Aldrich- Merck	P4417	50 comprimés	T°C ambiante
Acide trifluoroacétique (TFA)	Sigma- Aldrich- Merck	74564	100 ml	T°C ambiante
Acide sinapique (SA)	Sigma- Aldrich- Merck	85429	1g	4°C
Acide 2-(4- hydroxyphénylazo)- benzoïque (HABA)	Sigma- Aldrich- Merck	148032	25 g	T°C ambiante
Diméthyl sulfoxyde (DMSO)	VWR International	23500.260	500 ml	T°C ambiante
Acétone	Sigma- Aldrich- Merck	34850	1 L	T°C ambiante
Ethanol absolu	VWR International	153385E	1 L	T°C ambiante
Acétonitrile	VWR International	34967	1 L	T°C ambiante
Glycérol	Sigma- Aldrich- Merck	G8773	1 L	T°C ambiante
Solution d'hydroxyde de sodium (NaOH)	Sigma- Aldrich- Merck	72068	100 ml	T°C ambiante
Acide chlorhydrique (HCl)	Sigma- Aldrich- Merck	258148	500 ml	T°C ambiante
H ₂ O MilliQ	Préparée en laboratoire			

III-1.2 Molécules cibles (protéines et peptides)

Toutes les protéines lyophilisées ont été reconstituées dans de l'eau ultrapure déionisée en suivant les instructions du fabricant, des poudres sèches de β -lactoglobuline et d'ovalbumine ont été dissoutes dans le tampon approprié avant l'expérience. Les solutions mères ont été conservées en petites quantités aliquotes au congélateur à une température de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pour l'expérience, l'aliquote a été décongelée sur de la glace, puis mélangée au vortex et conservée sur de la glace avant d'être utilisée. La liste des protéines et des peptides utilisés dans ce travail est donnée dans le Tableau III-2 ci-dessous.

Tableau III-2: Liste des protéines et peptides utilisés.

Produit	Fournisseur	Référence	Poids moléculaire (g/mol)	Conservation	Solutions de stockage (état)
Albumine de blanc d'œuf de poulet (ovalbumine)	Sigma-Aldrich-Merck	A2512	44287	4°C	lyophilisée
β -lactoglobuline bovine	Sigma-Aldrich-Merck	L7880	18363	4°C	lyophilisée
Thrombine du plasma humain (α -Thrombine humaine)	Cryopep	9-HCT-0020	36700	-20°C	50 % Glycérol / H_2O (v/v)
Thrombine du plasma humain (α -Thrombine humaine)	Sigma-Aldrich-Merck	T4393	37400	-20°C	0.15 M NaCl et 0.05 M citrate de sodium, pH 6.5
Facteur de coagulation II (prothrombine) humain	Antibodies-online	ABIN 934835	72000	-20°C	50 % Glycérol / H_2O (v/v)
Peptide β -amyloïde ($\text{A}\beta$ 1-40)	Bachem	H-5568	4330	-20°C	PBS-HCl
Albumine de sérum bovin (BSA)	Sigma-Aldrich-Merck	A3059	66430	4°C	lyophilisée

III-1.3 Récepteurs biomoléculaires

III-1.3.1 Anticorps et nanocorps

Tous les anticorps lyophilisés ont été reconstitués dans de l'eau ultrapure déionisée, aliquotés et stockés selon les instructions du fabricant. Pour l'expérience, l'aliquote a été décongelée sur de la glace, puis mélangée au vortex et conservée sur de la glace jusqu'à son utilisation. Avant d'être déposés sur la biopuce, tous les anticorps ont été dilués à une concentration de 6 μ M dans le tampon approprié contenant 5 % de glycérol (v/v). Tous les nanocorps ont été généreusement fournis par le Prof. P. Lafaye (Institut Pasteur, CITECH, Plateforme d'Ingénierie des Anticorps). Une liste exhaustive des molécules des récepteurs protéiques/peptidiques utilisées dans ce travail est fournie dans le Tableau III-3.

Tableau III-3: Liste des anticorps et nanocorps utilisés.

Produit	Classe	Fournisseur	Référence	Conservation	
				[C]	tampon
Anticorps anti-albumine d'œuf de poulet (anti-ovalbumine)	monoclonal	Sigma-Aldrich-Merck	A6075	1 mg/ml	anticorps du liquide d'ascite / 15mM azide de sodium
Anticorps contre β -lactoglobuline	polyclonal	Abcam	ab112893	1 mg/ml	PBS / 0.1% azide de sodium
Anticorps contre Facteur de coagulation II (prothrombine)	monoclonal	Antibodies-online	ABIN 2504842	6,1 mg/ml	50% glycérol/eau (v/v)
Anticorps contre Facteur de coagulation II (prothrombine)	polyclonal	Antibodies-online	ABIN 1583288	1 mg/ml	PBS pH7.4 / 1 mg/ml BSA, 25% glycérol avec 0.09% azide de sodium
Anticorps contre Facteur de coagulation II (prothrombine)	polyclonal	Antibodies-online	ABIN 2776975	0,5 mg/ml	PBS / 0.09% (w/v) azide de sodium et 2% sucrose
Anticorps contre la thrombine	monoclonal	Sigma-Aldrich-Merck	05-880	1 mg/ml	20 mM NaH ₂ PO ₄ , 0,15 M NaCl, 1% mannitol, pH 7,4
Anticorps contre β -amyloid 17-24 OptimAb (4G8)	monoclonal	Eurogentec	SIG-39220	1 mg/ml	PBS

Anticorps de camélidé contre β -amyloid (nanocorps) R3VQ-SH	nanocorps	Institut Pasteur		0,1 mg/ml	PBS avec 300 mM NaCl, 250 mM imidazole
Anticorps de camélidé contre β -amyloid (nanocorps) R3VQ-SH	nanocorps	Institut Pasteur		3,1 mg/ml	PBS avec 300 mM NaCl

III-1.3.2 ADN à simple brin (ADNsb, aptamères)

Toutes les séquences d'ADNsb, également appelées récepteurs oligonucléotidiques (aptamères), figurant dans le Tableau III-4 ont été synthétisés à façon par Eurogentec (Belgique). Toutes les séquences contenaient un linker thymine pour apporter de la flexibilité à une molécule. Les échantillons ADN ont été reçus sous forme sèche. Les solutions mères 100 μ M dans le tampon TE recommandé ont été préparées et conservées en aliquotes à - 20 °C.

Tableau III-4: Liste des récepteurs de l'ADNsb (aptamères) utilisés.

Nom de l'oligo	Mod 5'	Séquence	Mod 3'
HD1 5'-T10 (aptamère anti thrombine)	Amino modificateur C6	TTT-TTT-TTT-TGG-TTG-GTG-TGG-TTG-G	
HD1 3'-T10 (aptamère anti thrombine)		GGT-TGG-TGT-GGT-TGG-TTT-TTT-TTT-T	Amino modificateur C7
HD 22 5'-T10 (aptamère anti thrombine)	Amino modificateur C6	TTT-TTT-TTT-TAG-TCC-GTG-GTA-GGG-CAG-GTT-GGG-GTG-ACT	
HD1-22 (aptamère anti thrombine)	Amino modificateur C6	TTT-TTT-TTT-TGG-TTG-GTG-TGG-TTG-GTT-TTT-TTT-TTT-TTT-TAG-TCC-GTG-GTA-GGG-CAG-GTT-GGG-GTG-ACT	
TC (aptamère de contrôle pour thrombine)	Amino modificateur C6	TTT-TTT-TTT-TGG-GGT-TTT-GGG-G	
HD1 5'-T5 (aptamère anti thrombine)	Amino modificateur C6	TTT-TTG-GTT-GGT-GTG-GTT-GG	

HD22 5'-T15 (aptamère anti thrombine)	Amino modificateur C6	TTT-TTT-TTT-TTT-TTT-AGT-CCG-TGG-TAG-GGC-AGG-TGG-GGG-TGA-CT	
BLG-10 (aptamère de contrôle pour β -lactoglobuline)	Amino modificateur C6	TTT-TTT-TTT-TTT-TTT-GGA-CAC-GGC-AAA-GGG-GTA-TAG-CCT-ACC-GGA-CCG-TGA-ACA-TGG-AAT-GAT-GTG-CTG-CGT-GG	
BLG-14 (aptamère anti- β -lactoglobulin)	Amino modificateur C6	TTT-TTT-TTT-TTT-TTT-CGA-CGA-TCG-GAC-CGC-AGT-ACC-CAC-CCA-CCA-GCC-CCA-ACA-TCA-TGC-CCA-TCC-GTG-TGT-G	
BLG-Sc (aptamère de contrôle pour β -lactoglobuline)	Amino modificateur C6	TTT-TTT-TTT-TTT-TTT-GGT-GGT-GGT-TGT-GGT	
BLG-G (aptamère anti- β -lactoglobulin)	Amino modificateur C6	TTT-TTT-TTT-TTT-TTT-GGG-GTT-GGG-GTG-TGG-GGT-TGG-GG	

III-1.4 Tampons

Tous les réactifs pour tampons étaient de qualité analytique et obtenus auprès de Sigma-Aldrich-Merck ou de VWR International. Après préparation, les tampons ont été conservés à +4 °C pendant un mois. Avant d'être utilisés, tous les tampons ont été filtrés à travers avec des filtres de 0,22 μ M et dégazés par ultra-sonification et, pendant l'expérience SPRI, par l'instrument de dégazage relié à notre système SPRI. Les tampons et solutions suivants ont été utilisés pour différentes expériences SPRI:

- Le tampon d'immobilisation pour les différents récepteurs était identique à leur solution de stockage, sauf mention contraire.

- Tampon de course:

1. Solution saline tamponnée au phosphate (PBS) pH 7,4 contenant 10mM de phosphate de sodium, 137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl (appelée "tampon de cours PBS sans sels divalents" ou "tampon de cours PBS sans MgCl₂ et CaCl₂" dans les chapitres suivant);

Dernièrement, un tampon PBS contenant en plus 1 mM de MgCl₂ et de CaCl₂ a été utilisé (appelé "tampon de course PBS avec MgCl₂ et CaCl₂" ou "nouveau tampon de course PBS").

2. Tampon d'acétate d'ammonium (AcNH₄⁺) pH 7,5 contenant 10 mM d'acétate d'ammonium.

- Solutions de régénération des surfaces: glycine 0,1 M pH 2,0 et/ou NaCl 1 M.

III-2 Méthodes et approches analytiques

Le couplage SPR / MS comprend trois étapes principales (Figure III-1): création de la *chimie de surface* (monocouche PEO auto-assemblée (SAM) activée avant l'immobilisation des récepteurs avec la chimie NHS-DCC) sur la surface de la biopuce avec la prochaine immobilisation des récepteurs, *expérience SPRi* avec la prochaine récupération de la biopuce et le rinçage à l'eau éventuel et, enfin, application de la matrice MALDI et *analyse MS*.

La fonctionnalisation du support, suivie de l'immobilisation des récepteurs (Figure III-1) est la première étape. Le support, appelé ensuite "biopuce", est constitué d'une lamelle de verre ($e \times L \times l = 500 \text{ mm} \times 28 \text{ mm} \times 12 \text{ mm}$) recouvert de chrome $1,5 \text{ nm} \pm 0,5 \text{ nm}$ et d'une fine couche d'or ($53 \text{ nm} \pm 3 \text{ nm}$) indispensable à la mesure SPR. Toutes les lamelles de verre ont été commandées auprès de SCHOTT-AG (Suisse).

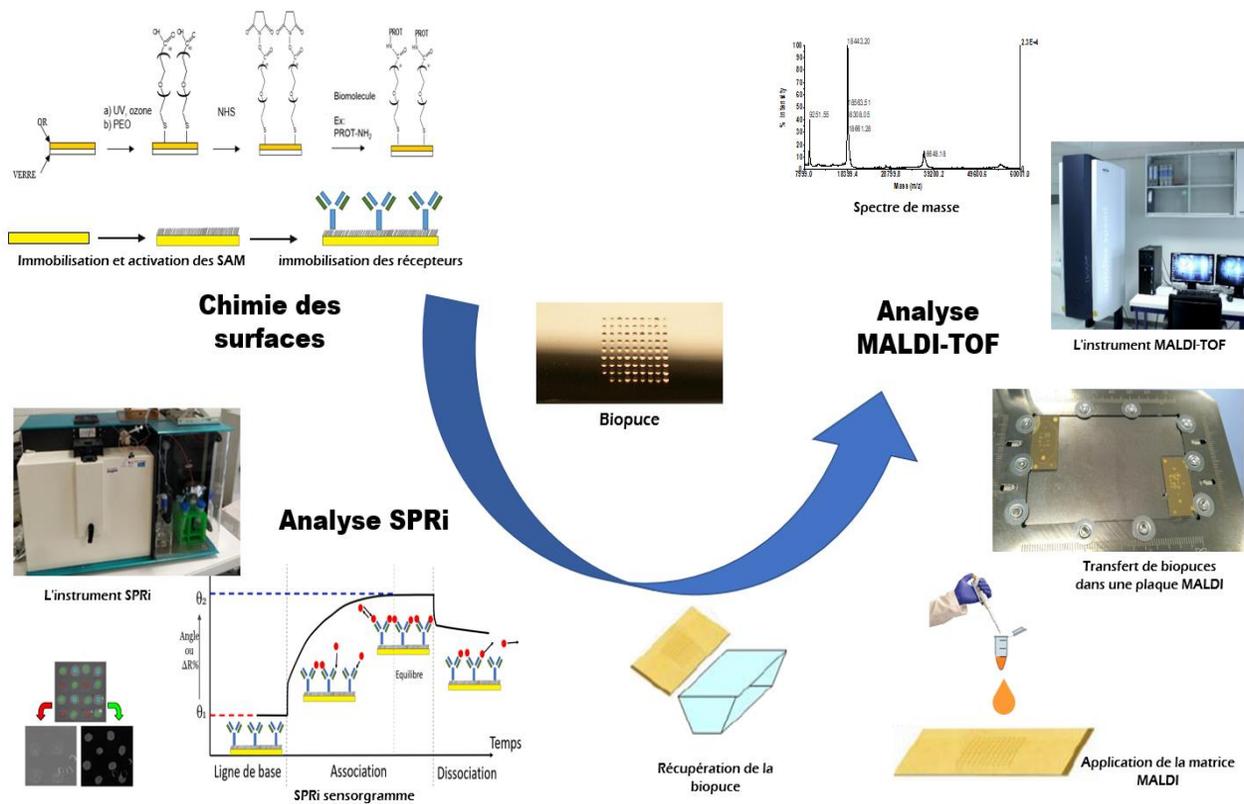


Figure III-1: Illustration des différentes étapes de l'expérience de couplage SPRi-MS

Lors des expériences SPRi, la biopuce est positionnée sur un prisme en verre couvert avec une huile incolore, ayant le même indice de réfraction optique - appelée "matching oil" à l'interface entre la biopuce et le prisme. Elle sert à assurer la continuité du passage optique entre le prisme et la lamelle de verre. La photo de la biopuce montée sur le prisme en verre (mais non alignée avec celui-ci) est présentée à la Figure III-2.



Figure III-2: Photo de la biopuce montée sur le prisme en verre avec la matrice MALDI déposée après l'expérience SPRi sur les sites où les récepteurs ont été immobilisés.

III-2.1 Fonctionnalisation de la surface des capteurs

Avant l'expérience SPR, la surface de la biopuce, qui a été préalablement traité par UV-ozonolyse, subit une modification chimique afin de fournir un point d'ancrage pour les récepteurs. La chimie de surface réalisée tout au long de ces travaux a été brevetée par le laboratoire en 2009 en collaboration avec Horiba (brevet international n° WO 2009/071852 A2).

Cette chimie à la surface des biopuces consiste en PEO SAM fournissant un faible taux d'adsorption non spécifique, elle est également compatible avec l'expérience SPRi et l'analyse MS [111]. En outre, elle permet également la digestion enzymatique *in situ*, permettant l'identification sans ambiguïté des ligands avec l'analyse MS/MS en tandem suivant [111]. La plupart des SAMs décrites dans la littérature pour les applications de SPR sont basées sur des chaînes d'alcanethiolate dérivées de l'acide tri- ou hexa- (éthylène glycol) carboxylique, utilisant principalement l'acide mercapto-undécanoïque (MUA). Cependant, la fonctionnalisation de surface avec ces chaînes aliphatiques entraîne une forte adsorption non spécifique par les interactions hydrophobes, ce qui interfère avec l'analyse SPR et la détection par MS.

C'est pourquoi dans ce travail nous avons choisi de fonctionnaliser le support SPR avec une SAM plus polaire, utilisant des chaînes courtes de polyoxyéthylène glycol (PEO, huit unités d'oxyéthylène), qui permettent de minimiser les interactions non spécifiques [111], [173].

L'immobilisation covalente des récepteurs, des protéines (généralement des anticorps) et/ou des acides nucléiques (c'est-à-dire des aptamères), a été réalisée via une liaison amide entre la fonction acide carboxylique libre (-COOH) du PEO constituant la SAM préalablement greffée sur le support SPR, et les fonctions amines (-NH₂) portées par les protéines ou par des oligonucléotides synthétisés chimiquement. Avant l'immobilisation des récepteurs, une étape supplémentaire était nécessaire – l'activation des fonctions -COOH avec le mélange N-NHS/DCC. Le protocole de fonctionnalisation de la surface complète est donné en **Annexe I**.

III-2.2 Analyse SPR par imagerie (SPRi)

La prochaine étape consiste à évaluer par SPRi l'interaction entre les récepteurs immobilisés à la surface de la biopuce et ses ligands potentiels en solution. Cela commence par une passivation de la surface du biocapteur, c'est-à-dire une neutralisation des fonctions libres (non couplées avec NHS). Cette passivation se fait directement dans l'instrument SPRi-Plex, par deux injections de L-lysine 1 mM et, éventuellement, par une injection supplémentaire de 200 µg/mL (≈ 3 µM) de BSA.

Des solutions de ligands à différentes concentrations sont ensuite injectées, et les interactions récepteur / ligand sont suivis en temps réel. Lorsque l'analyte circule sur la surface du capteur et des interactions se produisent avec des récepteurs immobilisés, on observe une variation de l'indice de réflectivité en fonction du temps, qui est enregistrée sur un sensorgram (Figure III-3 A). La phase de dissociation suivante commence lorsque la solution d'analyte est remplacée par un tampon de course et que le complexe analyte-ligand formé se dissocie, ce qui se traduit par la diminution du signal sur le sensorgramme. L'instrument SPRi offre également l'avantage de contrôler par imagerie l'ensemble du processus d'association-dissociation de la biopuce en temps réel par une caméra CCD haute résolution (Figure III-3 B). Les données obtenues à partir des sensorgrammes permettent de calculer les constantes de vitesse d'association (k_a) et de dissociation (k_d) et de déterminer l'affinité de liaison. Par conséquent, SPRi peut fournir une grande variété d'informations importantes sur les interactions biomoléculaires, notamment la spécificité, l'affinité, la cinétique et la thermodynamique des complexes en interaction.

Dans nos études, des mesures SPR ont été effectuées pour caractériser l'interaction entre β -lactoglobuline et ses récepteurs, thrombine/prothrombine et leurs récepteurs, et entre amyloïde- β (A β) 1-40 et ses récepteurs correspondants; en outre, ces études ont également permis d'étudier le comportement de récepteurs de nature diverse en présence de protéines non spécifiques. Les mesures ont été effectuées sur un instrument SPRi-Plex (Horiba-Scientific). L'appareil est équipé d'une diode électroluminescente dont la longueur d'onde de travail est 660 nm. Le logiciel utilisé pour contrôler l'appareil SPRi est SPRiView P4.1.0 (Horiba-Scientific). Les mesures de réflectivité ont été effectuées dans une cellule fluide thermostatée à 25° C avec un angle fixe; l'angle de travail a été défini avant le début de l'expérience. Avant les injections cibles, la passivation de la surface a été systématiquement réalisée par deux injections de L-lysine 1 mM et, finalement, de BSA 200 µg/mL (≈ 3 µM); les deux solutions ont été préparées dans un tampon de course.

Le tampon de course était soit de l'acétate d'ammonium 10 mM pH 7,5, soit du tampon PBS 10 mM pH 7,4, selon le couple récepteur-ligand utilisé. Les protéines/peptides cibles ont été dilués dans le tampon de course, et injectés à un débit de 50 µL/min en utilisant une boucle d'injection de 200 µL. À la fin de l'injection, une solution de glycine-HCl 0,1 M pH 2,0 et/ou de NaCl 1 M a été utilisée pour dissocier les interactions récepteur/ligand et afin de régénérer la surface de la biopuce.

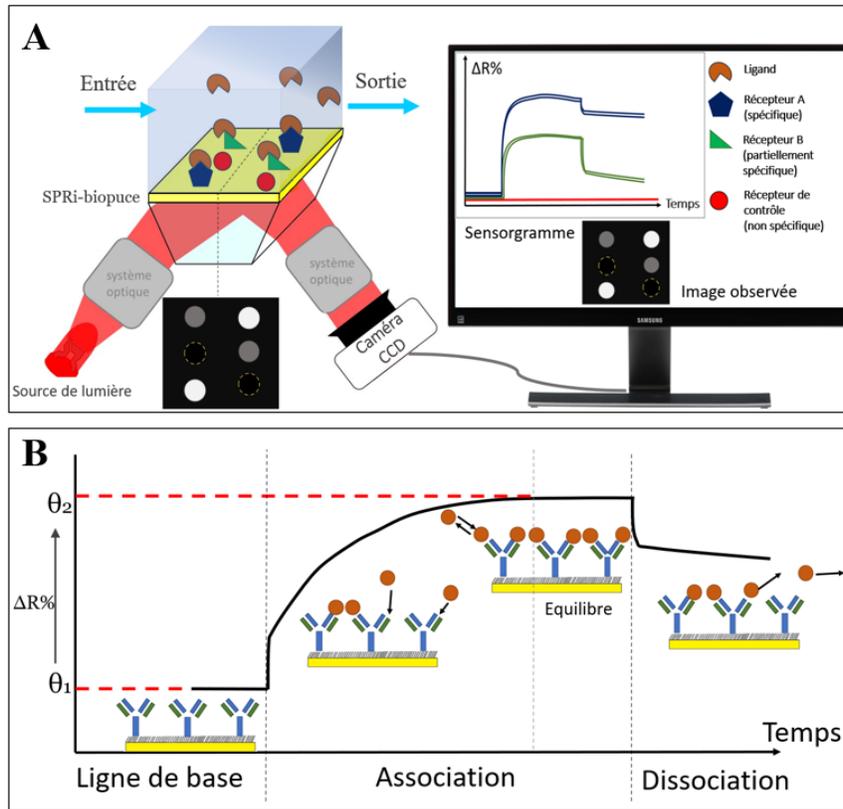


Figure III-3: Représentation schématique de l'expérience SPRi (A). Sensorgrams typique pendant l'expérience SPRi (B).

Au cours de l'expérience SPRi, la variation de réflectivité ΔR (en %) est mesurée, et la machine déduit le taux de récupération de la surface Γ (en pg/mm^2) de la formule suivante :

$$\Gamma = \frac{\Delta R \cdot L_{zc}}{S_{P,R} \cdot \delta n / \delta C}$$

Dans cette formule, L_{zc} est la pénétration de l'onde évanescente dans le milieu (en nm). Elle dépend de la longueur d'onde utilisée et du métal traversé. Dans notre cas, avec une longueur d'onde de 660 nm et avec la couverture par l'or de la surface, cette valeur est de 102 nm. Le paramètre $\delta n / \delta C$ représente l'incrément d'indice et est exprimé en $\text{RIU} / \text{pg} / \text{mm}^3$. Il dépend des molécules étudiées, et est de $1,9 \times 10^{-10} \text{ RIU} / \text{pg} / \text{mm}^3$ pour les protéines et les oligonucléotides. Enfin, $S_{P,R}$ est la sensibilité, elle est obtenue par une mesure d'étalonnage de l'appareil et s'exprime en variation de réflectivité en fonction de l'indice de réfraction (RIU).

L'analyse quantitative des données expérimentales a été effectuée par le logiciel SPRi Analysis 1.2.1 (Horiba-Scientific) qui calcule les densités de surface en pg / mm^2 , qui peuvent ensuite être transcrites en $\text{fmol} / \text{mm}^2$ du ligand capturé. A la fin de l'interaction, la solution dénaturante (0,1 M glycine-HCl, pH 2 ou 1 M NaCl) est injectée afin de régénérer les récepteurs.

Lorsque l'analyse par MS est effectuée après l'expérience SPR, la dernière injection de solution contenant le(s) ligand(s) potentiel(s) est suivie uniquement de l'étape de dissociation, au cours de laquelle le tampon de course est laissé de passer librement par la surface de la biopuce, afin de rincer le matériel lié non spécifiquement.

III-2.3 Analyse par MS

De que l'expérience SPR est terminée, la solution de matrice MALDI est déposée à la surface de la biopuce sur chaque site où un récepteur a été immobilisé et sur plusieurs sites sans récepteurs pour servir de contrôle (Figure III-4). Le volume par site pour le dépôt manuel de la matrice était 0,11 μL . Avant l'analyse par MALDI-TOF, tous les sites où la matrice a été déposée ont été séchés à l'air. Cette procédure permet la co-cristallisation des ligands avec l'excès de matrice, qui permet de désorber et d'ioniser l'échantillon, tout en le protégeant du rayonnement laser. Après le séchage de la matrice, la biopuce est insérée dans une plaque MALDI spécifique (adaptée pour l'analyse des échantillons de tissus). La plaque est ensuite introduite dans le spectromètre de masse, et chaque point est interrogée par MALDI-MS (Figure III-4).

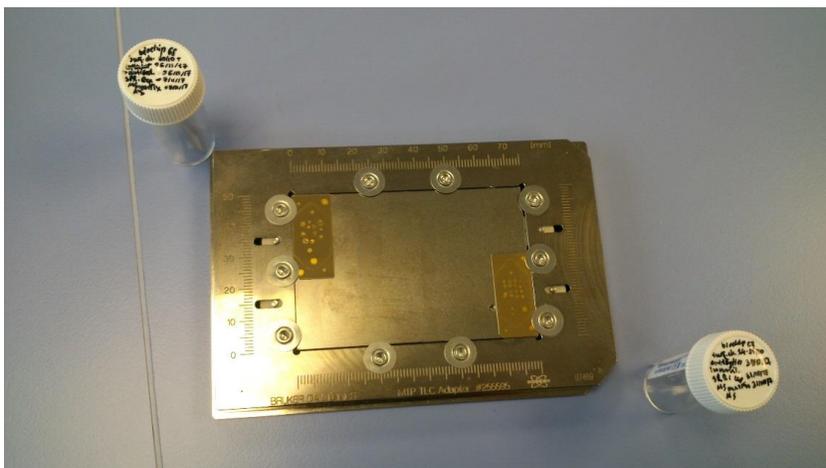


Figure III-4: Photo de la plaque cible MALDI avec les biopuces montées.

Il existe une grande variété de méthodes de dépôt de matrice. La méthode des gouttelettes séchées [97] est l'une des plus couramment utilisées. Elle consiste à préparer un mélange matrice/échantillon en phase liquide, à déposer ce mélange sur le support d'analyse et à attendre la co-cristallisation des composés (séchage à l'air). Cette technique est simple, rapide et efficace, mais elle nécessite que la matrice et l'analyte soient solubles dans des solvants miscibles. Une autre méthode populaire, appelée "méthode sandwich", consiste à déposer la matrice seule sur le support, en attendant sa cristallisation, puis à déposer l'échantillon sur les cristaux préformés en tant que deuxième couche. Après séchage de ce dernier, une petite quantité de matrice est à nouveau déposée, formant ainsi un "sandwich" de matrice avec l'échantillon cristallisé à l'intérieur. Cette méthode est plus longue, mais permet d'obtenir un analyte plus uniformément réparti. Néanmoins, les deux méthodes décrites précédemment présentent certains inconvénients, qui sont particulièrement critiques pour le couplage SPR-MS. Le dépôt manuel de la matrice et le séchage à l'air du mélange matrice/échantillon peuvent entraîner une distribution non homogène de

l'échantillon et une délocalisation des ligands, ce qui complique sérieusement l'analyse par SPR-MS. Afin de surmonter ces inconvénients, la pulvérisation de la matrice a été introduite. Le dépôt de matrice par des pulvérisateurs de matrice disponibles dans le commerce ou par une source d'électrospray convertie [267] peut également être utilisé pour obtenir un dépôt de matrice fin et régulier. Ces méthodes ont trouvé une application particulière dans les systèmes d'imagerie MS, où la localisation précise de l'analyte et le séchage très rapide de la matrice (en raison des minuscules gouttelettes de la matrice produites lors de la pulvérisation) permettent d'obtenir une empreinte fiable du spectre de masse du tissu analysé. Dans ce travail, deux méthodes de dépôt de matrice ont été utilisées: le dépôt manuel de la matrice de type "gouttelette sèche" et la pulvérisation de la matrice par la source d'ionisation par électrospray de désorption convertie (desorption electrospray ionization source, DESI, en cours de développement au laboratoire).

Dans le cadre de ce travail de thèse, l'instrument Autoflex Speed MALDI-TOF/TOF MS (Bruker Daltonics, Brême, Allemagne) a été utilisé. Cet instrument est équipé d'un laser SmartBeam II™ (laser Nd: YAG modifié) pulsé à une fréquence de 1 kHz. Les spectres ont été enregistrés en mode positif linéaire (retard 450 ns, tension de source d'ions 1 (IS1): 19,5 kV, tension de source d'ions 2 (IS2): 17,65 kV, tension de la lentille: 6,5 kV). L'acquisition des spectres MALDI a été effectuée dans une gamme de masse 5000-100000 Da (ou 2000 - 35000 Da pour l'analyse Aβ 1-40), et 1000 coups ont été ajoutés pour chaque spectre. Les spectres de masse ont été traités par le logiciel FlexAnalysis (version 3.3.80.0, Bruker Daltonics). L'instrument a été calibré en utilisant les ions mono- et multi-chargés des solutions standard de BSA et de myoglobine (Sigma-Aldrich-Merck, France). Les principales matrices utilisées dans ce travail étaient des solutions de 10 mg/mL de SA dans 70/30 (v/v) l'eau (avec 0,3 % de TFA)/acétonitrile et de HABA dans 50/50 (v/v) l'eau (avec 0,1 % de TFA)/acétonitrile. Les résultats de l'analyse MS avec de la matrice SA directement à partir de la surface dorée des biopuces étaient toujours inférieurs à ceux avec de HABA et, par conséquent, ne sont pas représentés ici. SA a été principalement utilisé pour l'analyse et le contrôle de l'état des protéines utilisées dans ce travail de doctorat.

Deux types d'analyse MS ont été effectués: le sondage classique de ROIs avec le laser et l'analyse de la surface par imagerie MS. Dans le cas de l'analyse MS contrôlée manuellement, les résultats sont obtenus pour chaque site de la biopuce en sondant différentes régions du site, ce qui nécessite souvent la recherche de ce que l'on appelle le "hot-spot", c'est-à-dire des grands clusters de la matrice à l'intérieur desquels le ligand est de préférence co-cristallisé. Cette analyse MS demande beaucoup de temps et n'est pas rigoureuse; de plus, le nombre de tirs laser est limité par l'épaisseur de la couche de matrice dans le cluster.

Au contraire, le principal avantage de l'analyse par imagerie MS est le balayage automatisé de la surface de la biopuce par la méthode AutoXecute avec du logiciel dédié FlexControl (Bruker Daltonics). Cet instrument est capable de générer des images de la distribution des ions de l'analyte à la surface pour chaque ROI prédéterminé après la conversion des données automatique par le logiciel Fleximaging 2.1 (Bruker Daltonics). Différents paramètres peuvent être choisis pour

la méthode AutoXecute, qui permet un balayage rapide, rigoureux et reproductible de la surface de la biopuce.

III-3 XPS

Avec le temps, la diminution des performances des biopuces a été observée ("vieillessement" de l'or) se traduisant par un mauvais contraste en imagerie SPRi, et par un faible niveau ou même l'absence d'interactions récepteur-ligand. J'ai analysé notre modèle récepteur-ligand utilisé (β -lactoglobuline) par MS et n'a trouvé aucuns signes de dégradation. Nous avons donc dû rechercher l'origine dans la qualité des produits chimiques - tous les produits chimiques utilisés pour le nettoyage et la fonctionnalisation des biopuces, ainsi que pour toutes les étapes expérimentales SPRi (par exemple, le tampon d'acétate d'ammonium ou tout autre type de solvant) ont été commandés à nouveau et utilisés à la livraison. Cela n'ayant pas résolu nos difficultés, nous avons décidé de vérifier les étapes initiales de nettoyage, qui consistaient notamment à rincer les lamelles avec de l'acétone et de l'éthanol absolu avant le traitement par UV-ozonolyse. La dernière étape est la méthode courante pour libérer les substrats des contaminations (par exemple des traces d'huiles, de résines, de silicones ou de tout résidu de solvant de nettoyage, etc.) par un processus d'oxydation photosensibilisé dans lequel les molécules contaminantes sont excitées et/ou dissociées par l'absorption de rayons UV de longueur d'onde courte [268]. Nous avons donc remplacé la lampe UV par la nouvelle et augmenté la durée du traitement de 20 min à 1h30, ce qui a donné des résultats positifs. L'activité des biopuces a été partiellement récupérée; cependant, une procédure de traitement aussi longue ne convenait pas à notre objectif et nous avons décidé de commander de nouvelles lamelles (utilisées comme support pour la préparation ultérieure des biopuces). Avec les nouvelles lamelles, nous avons observé une récupération complète des performances avec un temps de traitement et de fonctionnalisation minimal (20 min de traitement UV-ozonolyse), ce qui correspondait totalement au protocole établi précédemment dans notre laboratoire.

La différence de performance des lamelles de verre, recouvertes d'une fine couche de métal après un long stockage (environ 5 ans) et des celles récemment fabriquées n'avait pas été signalée auparavant, nous avons donc décidé d'étudier l'origine du problème. Nous avons suggéré que la raison possible de ces différences pourrait être la présence d'une contamination "résiduelle", qui ne peut pas être éliminée lors du nettoyage initial avec de l'acétone pure et de l'éthanol absolu, et ne peut être que partiellement éliminée après le traitement d'une heure et demie par UV-ozonolyse. Afin de trouver la cause réelle de ce problème, nous avons utilisé l'analyse XPS de la surface de l'or.

L'analyse XPS a été effectuée par F. Miserque au CEA Saclay, en France. Aucune différence n'a été constatée entre les lamelles fraîchement reçues et celles stockées, à l'exception d'une légère augmentation du niveau d'oxydation de la surface de l'or. Donc, l'effet du "vieillessement" de l'or doit être étudié encore. Il est vraisemblable qu'une oxydation de la surface accompagnée de dépôts de salissures apparaissant lors du stockage malgré les précautions prises, entraînent une mauvaise qualité d'immobilisation et par conséquent la dégradation des

performances. Pour les expériences décrites dans ce travail, seules des nouvelles lamelles (n'ayant pas montré de problèmes lors des expériences SPRi-MS) ont été utilisées.

Chapter IV. Microarrays à anticorps pour le couplage SPRi-MS. Développement de l'imagerie par spectrométrie de masse (MSi).

La reconnaissance biomoléculaire est au cœur de la biodétection [269] car de ses propriétés dépendent la spécificité, la sélectivité, la cinétique de la détection de l'analyte et *in fine* la sensibilité du biocapteur. Ces paramètres sont à prendre en compte pour le développement du biocapteur. Ainsi, le point de départ de la création d'un biocapteur est la compréhension du processus et des propriétés d'interaction des molécules sondes, comme les anticorps ou les aptamères, au cours de la reconnaissance, avec les molécules cibles - les analytes.

Tout au long de ces travaux, nous avons principalement traité des interactions entre les cinq protéines de la Figure IV-1 (thrombine et prothrombine, β -lactoglobuline et ovalbumine, ainsi que BSA) et un peptide (Amyloïde- β 1-42) avec leurs récepteurs. Ces biomolécules ont été choisies en particulier pour couvrir une large gamme de masse, et évaluer l'influence de la masse et la présence d'éventuels contaminants sur la détection des antigènes, la sensibilité en MS. L'objectif est également de comparer les performances des récepteurs anticorps bien connus, aux nouveaux types de récepteurs, notamment les aptamères et les nanocorps (les résultats pour les nanocorps ne sont pas inclus dans ce chapitre, mais dans le Chapitre VII). Les autres raisons qui ont également guidé notre choix ont été la possibilité d'utiliser ces protéines pour des applications biologiques concrètes et la disponibilité commerciale des récepteurs associés.

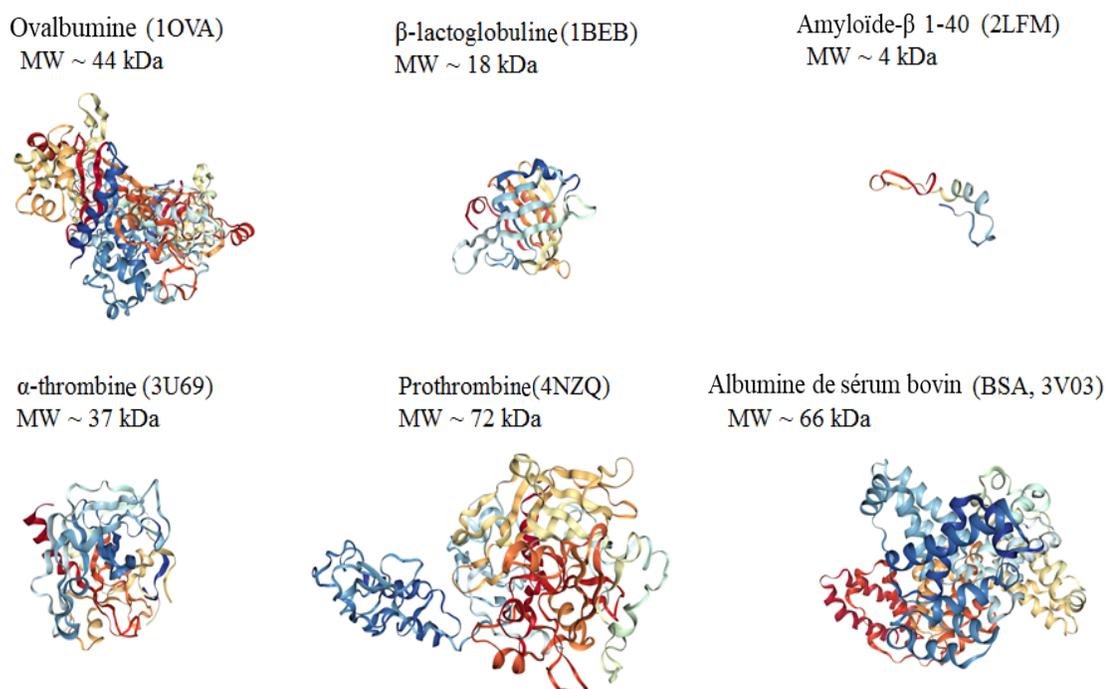


Figure IV-1: Les différentes protéines testées.

Comme la résonance plasmonique de surface fonctionne sur le principe d'une balance détectant une accumulation de masse à la surface de la biopuce, les résultats des différentes interactions peuvent être formulés sous la forme d'une quantité de ligand retenu sur le microarray de récepteurs en picogrammes par millimètre carré (pg / mm²). Toutefois, afin d'évaluer les

différentes interactions, permettre des comparaisons, ces quantités ont été converties en densités de surface de ligands retenus exprimées en femtomoles par millimètre carré (fmol / mm²). Ainsi, la conversion du pourcentage de réflectivité en densité de surface (fmol / mm²) sera effectuée pour tous les résultats présentés dans les différentes parties de chapitres suivants.

La β -lactoglobuline bovine, avec soit un anticorps spécifique, soient des aptamères, ont servi de couple "modèle" ligand-récepteur pour la comparaison des performances de différents récepteurs et l'optimisation des conditions expérimentales en SPRi-MS. La protéine α -thrombine humaine avec ses récepteurs a servi au développement d'un biocapteur mixte anticorps/aptamères pour le couplage SPRi-MS.

Une chimie de surface dédiée a été utilisée pour l'immobilisation des récepteurs sur la surface du biocapteur. Bien que les surfaces d'or puissent être directement fonctionnalisées avec des récepteurs thiolés, l'utilisation de SAM pour une conjugaison ultérieure avec les récepteurs, peut apporter un avantage significatif par rapport au greffage direct. La fonctionnalisation de la surface par une SAM peut empêcher l'adsorption non spécifique des récepteurs sur la surface de l'or, aider à contrôler l'immobilisation des aptamères par greffage au site spécifique et, en outre, fournir une chimie de surface efficace contre la liaison non spécifique des ligands [270].

IV-1 Microarrays à anticorps pour le couplage SPRi-MS

Bien que la chimie de surface PEO-NHS utilisée dans ce travail ait déjà été introduite il y a plusieurs années au laboratoire [111], [173], le couplage SPRi-MS souffre encore d'un manque de sensibilité, qui pourrait être corrigé en particulier avec l'amélioration du protocole de modification de la surface. Par conséquent, l'un des objectifs de ce chapitre est l'évaluation de la qualité de la réponse SPRi en fonction de changements apportés au protocole de modification de surface décrit dans le Chapitre III. Les principaux changements ont consisté en l'adaptation (augmentation) de la durée de traitement UV des lamelles de verre de 15 à 20 minutes, l'augmentation du temps d'activation des PEO thiolés déposés et du temps de greffage des récepteurs de 2 à 16 heures. Ces modifications ont dû être apportées suite au renouvellement du stock de lamelles de verre recouvertes d'or (lot de 2010 remplacé par un lot de 2016).

Les anticorps polyclonaux anti- β -lactoglobuline de lapin, l'immunoglobuline G de souris (IgG, comme contrôle négatif) ont été immobilisés à une concentration de 6 μ M dans des solutions contenant 5% de glycérol sur la biopuce fonctionnalisée avec une monocouche de PEO thiolés activés par la chimie NHS/DCC.

Tout d'abord, la β -lactoglobuline et l'ovalbumine (en tant que ligand non spécifique pour tester la sélectivité des récepteurs) ont été injectées successivement à des concentrations de 1 μ g/mL, 10 μ g/mL et 100 μ g/mL (pour l'ovalbumine), afin de visualiser les interactions anticorps/antigène et de vérifier leur spécificité et leur sélectivité. Chaque injection de protéine a ensuite été suivie d'une injection de solution de régénération. Enfin, un dernier cycle a consisté en une injection de β -lactoglobuline à une concentration de 100 μ g/mL, sans régénérer les récepteurs immobilisés à la surface de la biopuce pour l'analyse MS suivante.

Les sensorgrammes représentés sur la Figure IV-2 A montrent la réponse SPR obtenue à partir des sites d'anticorps anti- β -lactoglobuline (courbe rouge), les IgG de souris (courbes en pointillé bleu foncé) utilisées comme contrôle négatif. Les sensorgrammes ont été obtenus à la suite de différentes injections de solutions commerciales de β -lactoglobuline et d'ovalbumine de concentrations croissantes dans un tampon de course d'acétate 10 mM, pH 7,5, sans soustraction du signal obtenu à partir de la surface passivée (courbe solide bleu foncé).

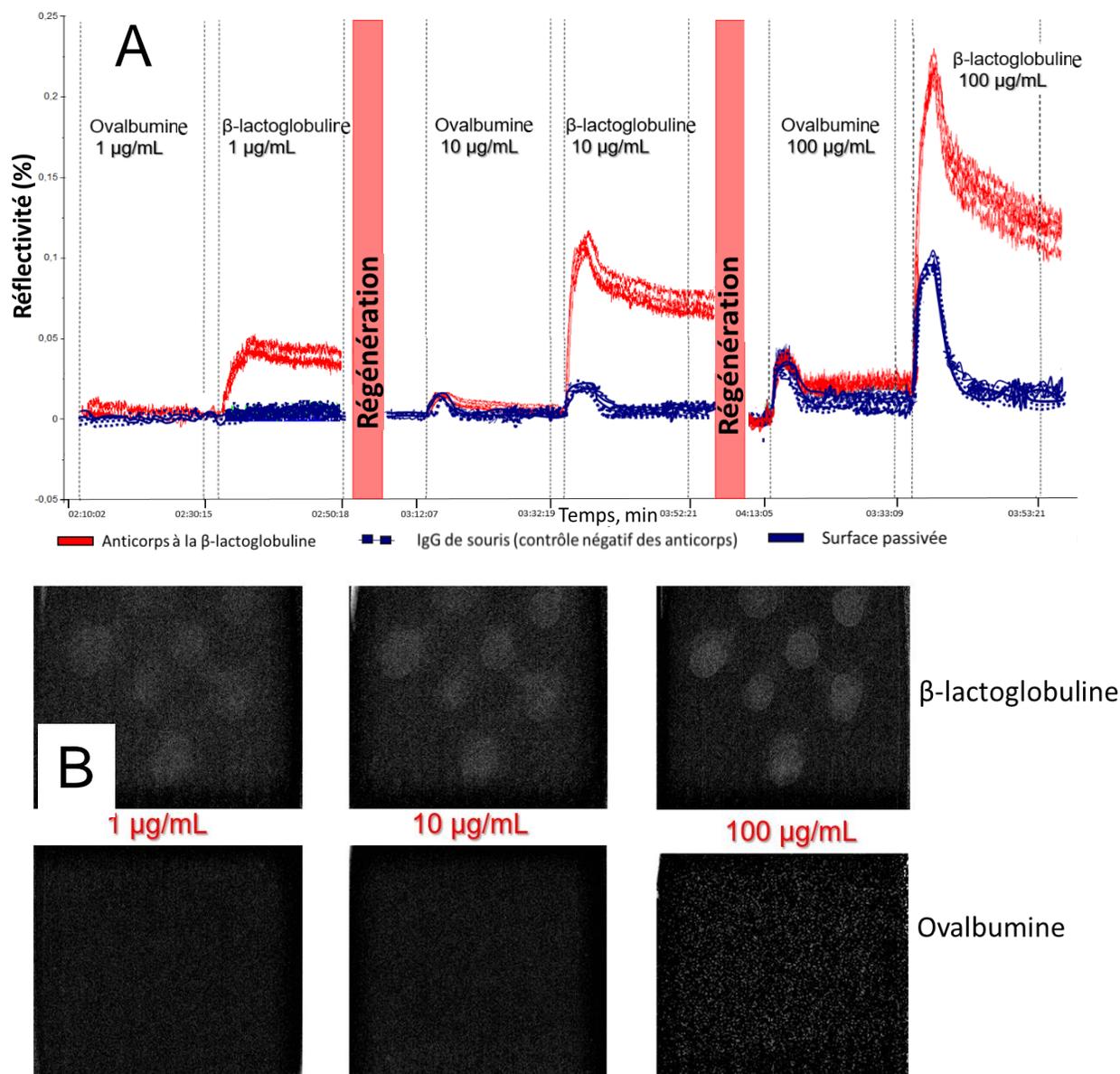


Figure IV-2: (A) sensorgrammes SPRi obtenus suite à différentes injections de solutions commerciales de β -lactoglobuline et d'ovalbumine à des concentrations croissantes dans le tampon courant d'acétate d'ammonium 10 mM pH 7,5. (B) Image de différence observée avec le logiciel SPRi pendant l'injection des protéines.

La première observation est que la réponse obtenue (exprimée en % de réflectivité) à partir des anticorps anti- β -lactoglobuline n'est importante que lors de l'injection du ligand correspondant, et que l'augmentation de la réflectivité est croissante avec l'augmentation des concentrations injectées.

La seconde observation est qu'aucune réponse non spécifique n'a été observée ($\leq 0,02\%$ de réflectivité) avec les sites d'IgG de souris. Le fait qu'une augmentation de la réflectivité ne soit observée que sur les spots récepteurs spécifiques, reflète l'absence de réaction croisée et indique la bonne spécificité des anticorps anti- β -lactoglobuline. En outre, l'absence d'interaction sur les zones de biopuces sans récepteur (surface passivée - contrôle positif) indique également que la chimie de surface utilisée (PEO-NHS) permet de minimiser les interactions non spécifiques. L'adaptation du protocole de fonctionnalisation de la surface existant précédemment a permis de créer des biopuces robustes pour l'analyse SPRi en utilisant des anticorps comme modèle de récepteur.

Après l'analyse SPR, les biopuces ont été systématiquement retirées de l'appareil SPR, rincées avec de l'eau MilliQ et séchées avec un flux d'air. De la matrice MALDI (acide 2-(4-hydroxyphénylazo)benzoïque, HABA), a ensuite été déposée sur chaque site où un récepteur était immobilisé sur la surface des biopuces, ainsi que sur certaines zones de surface. L'analyse MALDI-TOF par interrogation manuelle des sites où un récepteur a été immobilisé a été effectuée au début, mais cette méthode était fastidieuse et ne permettait pas une analyse approfondie de toute la surface couverte par la matrice. Au lieu de cela, un balayage automatisé par MS a été mis en place, puis systématiquement réalisé pour analyser la surface des biopuces à la suite des expériences SPRi. Les résultats obtenus sont identiques à ceux obtenus manuellement (données non présentées). Les résultats de ce dernier sont discutés ci-dessous au IV-2 .

IV-2 L'imagerie MS: une nouvelle étape dans l'analyse SPRi-MS

La technique de SPRi couplée à l'imagerie par spectrométrie de masse par désorption laser assistée par matrice (SPRi-MALDI MSi) permet l'acquisition d'informations complémentaires à partir d'une seule surface. Jusqu'à présent, cette méthode n'a été rapportée que pour l'analyse des transferts de tissus hépatiques par SPRi-MALDI-TOF MSi [271] et pour l'analyse des interactions entre l'anticorps anti-phosphotyrosine et les peptides phosphorylés dérivés du facteur de croissance épidermique dans le cadre de la caractérisation de la protéine tyrosine phosphatase YopH produite par la bactérie *Yersinia pestis* [272]. Dans ce dernier cas, les auteurs avaient immobilisé le ligand (différents peptides synthétiques) sur la surface du capteur, tandis que les molécules de récepteur passaient en solution à travers la cellule SPR. *McKee et al.* ont appliqué la technique MSi pour visualiser l'ensemble du microarray en une seule image composite en recueillant une trame prédéfinie de spectres MALDI-TOF MS à partir de la surface des lames de polycarbonate commercial recouvertes d'or, imprimées avec des peptides, mais l'application rapportée présentait de graves inconvénients. Tout d'abord, des peptides biotinylés synthétiques ont été imprimés à l'aide d'une imprimante à jet d'encre sur des lamelles commerciales coûteuses. Deuxièmement, il fallait systématiquement retirer soigneusement le couvercle de la puce SPRi à l'aide d'une pincette, avant de laver la surface et d'appliquer la matrice. Ensuite, le dépôt de la matrice MALDI a dû être

effectué à l'aide d'un pulvérisateur automatique uniquement, afin d'éviter la délocalisation des ligands. Enfin, concernant la plaque MALDI en acier, les auteurs ont utilisé un adaptateur spécial pour lamelle de microscope. La puce a été fixée dans cette plaque MALDI avec du ruban de cuivre qui a ponté les surfaces conductrices de la plaque et de la lamelle (puce SPRi) [272]. Par conséquent, le travail décrit dans ce chapitre est l'un des tous premiers exemples de suivi des interactions ligand-récepteur type protéine-protéine par couplage SPRi-MSi.

IV-2.1 MALDI MS sur biopuce: analyse par imagerie MS après expérience SPRi (biopuce à anticorps)

Le dépôt de la matrice MALDI a été effectué principalement manuellement dans ce travail. Toutes les zones recouvertes par la matrice (à la fois le récepteur et le contrôle) ont été définies comme des régions d'intérêt (ROI) et ont été balayées séquentiellement selon le procédé d'imagerie MALDI-TOF. Chaque ROI a fourni un résultat MSi distinct, contrairement à l'image unique pour toute la surface du microarray décrite par *McKee et al* [272]. Chaque ROI a été automatiquement divisé en zones de tir laser ($\varnothing \sim 200 \mu\text{m}$), le nombre total de tirs laser dépendant donc de la taille de la ROI. Les spectres de masse obtenus à partir de chaque ROI ont été moyennés pour produire un seul spectre de masse par ROI. À la fin du balayage, le logiciel MSi est capable de superposer la photo de la surface de la biopuce avec la distribution de l'intensité des ions pour une valeur m/z sélectionnée, appelée filtre de masse.

L'analyse MSi permet une analyse visuelle aisée de la biopuce à la suite des expériences SPRi: selon la valeur du filtre de masse choisi, ce procédé par imagerie permet de localiser rapidement la distribution des ions ligands à l'intérieur de la ROI et d'en évaluer la proportion, car l'intensité de la coloration dépend de l'abondance de l'ion.

L'image obtenue par MALDI-TOF MSi à partir d'un microarray de récepteurs anti β -lactoglobuline utilisant un filtre de masse à m/z 18364 (couleur rouge correspondant aux ions $[M+H]^+$ de la β -lactoglobuline) est représentée sur la Figure IV-3 A. Trois zones rouges relativement brillantes ont pu être distinguées au niveau des sites d'anticorps anti- β -lactoglobuline (ROI # 04, 12 et 13).

Le spectre de masse moyenné typiquement obtenu à partir de chacune des sites où un anticorps a été immobilisé (Figure IV-3 B) présente des signaux à m/z 18364 et 9183 correspondants à des ions de la β -lactoglobuline, les formes mono- et doublement chargées de la protéine ($[M+H]^+$ et $[M+2H]^{2+}$). Les spectres de masse moyennés à partir des sites de contrôle (l'exemple d'un spectre de masse enregistré à partir d'un site de contrôle négatif est représenté sur la Figure IV-3 C) étaient en accord avec les résultats obtenus lors de l'expérience SPRi - aucun ion de la β -lactoglobuline ou de l'ovalbumine n'a été détecté par MS. Ce résultat confirme une bonne spécificité et sélectivité de l'interaction entre la β -lactoglobuline et son anticorps respectif.

La coloration jaune des ROI de contrôle (ROI contrôle #06, 07 et 09) correspond à la couleur de la matrice HABA déposée sur la surface; ces ROIs n'ont pas de coloration rouge, ce qui signifie qu'aucun ion de la valeur m/z sélectionnée n'a été détecté. Tous les autres sites de récepteur

de la Figure IV-3 correspondant à des sites d'anticorps anti ovalbumine, n'ont pas interagi avec la β -lactoglobuline et ne présentent donc aucune coloration après application d'un filtre de masse.

On peut observer sur la Figure IV-3 A que β -lactoglobuline est distribuée de manière homogène sur les ROI #04 et 13, alors que sur le ROI #12, elle est concentrée en un seul endroit correspondant à un "hot-spot" de matrice, comme décrit précédemment dans le Chapitre III Matériels et méthodes. Ce problème probablement causé par la méthode de dépôt manuel de la matrice (selon la méthode de la "gouttelette séchée"), peut être évité par un autre mode de dépôt de la matrice, en particulier par nébulisation. A cette fin, nous avons converti une source DESI en nébuliseur de matrice. Les résultats préliminaires obtenus avec celle-ci par MALDI-TOF MSi sont présentés ci-après.

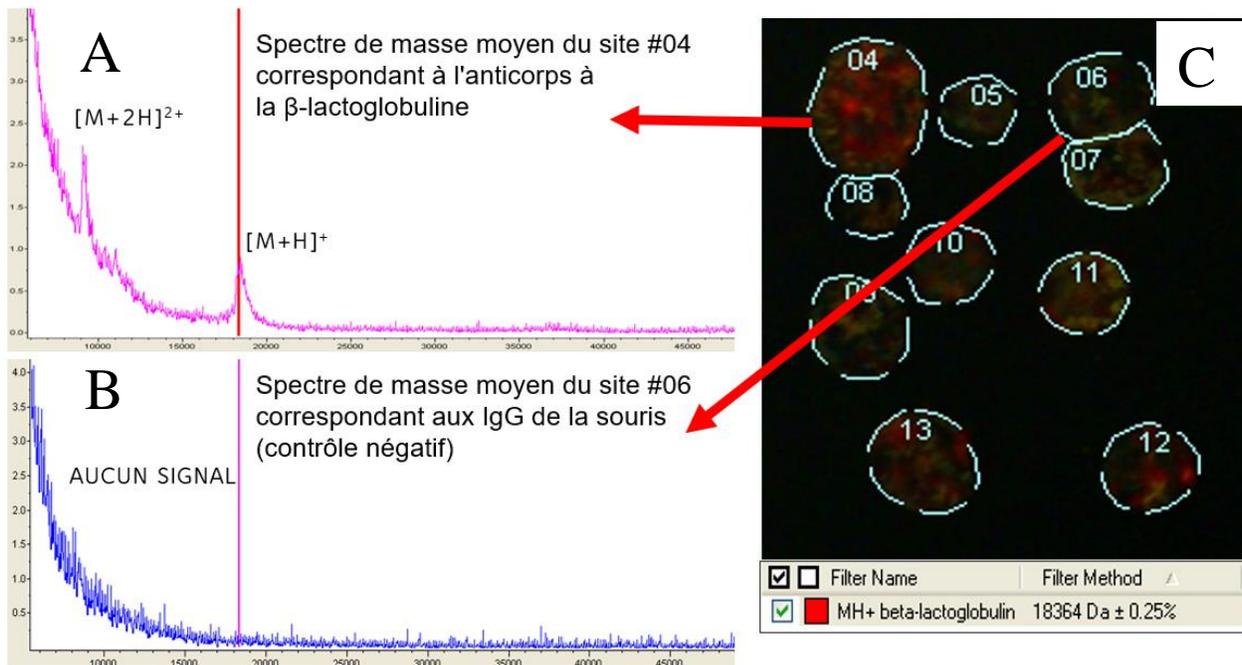


Figure IV-3: Résultats de l'imagerie MALDI-TOF MS obtenus après l'expérience SPRi dans un tampon d'acétate de 10 mM, directement à partir de la surface de la biopuce au format microarray d'anticorps anti β -lactoglobuline immobilisée sur la chimie PEO-NHS. Spectres de masse typiques obtenus à partir (A) des ROIs d'anticorps anti β -lactoglobuline et (B) des ROIs de contrôle négatif et positif, en mode linéaire positif en utilisant la matrice HABA. Chaque spectre de masse est la moyenne des spectres de masse obtenus à partir du ROI. (C) Photo de la surface de la biopuce avec superposition des résultats MS. Filtre de masse de couleur rouge appliqué afin de montrer la distribution des ions sur les ROIs analysés (numérotés et délimités par une ligne pointillée).

IV-2.2 Effet du dépôt de matrice par nébulisation sur l'analyse des biopuces SPRi par imagerie MS

L'analyse MALDI-TOF MS repose sur l'utilisation d'un composé organique, appelé matrice, qui agit comme un intermédiaire entre l'échantillon et le laser. La matrice contribue à vaporiser et à ioniser l'échantillon, en le protégeant de l'irradiation laser. Une fois que la matrice

MALDI appropriée a été choisie pour une application particulière, il faut s'assurer que sa méthode de dépôt est adéquate, afin de produire des données MALDI-TOF de qualité.

La méthode de la « gouttelette séchée » est une méthode couramment utilisée pour tester quelle matrice convient le mieux pour une application MALDI particulière. Elle est également utile pour confirmer la présence de molécules cibles, ou pour établir le profil d'un simple échantillon. Cependant, cette méthode de dépôt de matrice est moins adaptée pour des expériences d'imagerie MALDI. En effet, alors que le dépôt d'une goutte de matrice en solution peut entraîner une redistribution des ligands sur la surface, l'utilisation d'un nébuliseur permet de limiter ce phénomène. Pour acquérir des données de qualité, la surface entière de chaque ROI doit être recouverte de manière homogène d'une fine couche de matrice, en limitant la délocalisation de l'analyte afin de conserver la distribution spatiale d'origine.

Les dispositifs d'application de matrice MALDI automatisés sont certes efficaces et disponibles dans le commerce, mais leur prix élevé n'en a pas encore fait des instruments répandus. C'est pourquoi, avec l'aide de V. Legros et W. Buchmann, une source DESI disponible au laboratoire a été convertie en une plateforme de nébulisation de matrice (Figure IV-4).

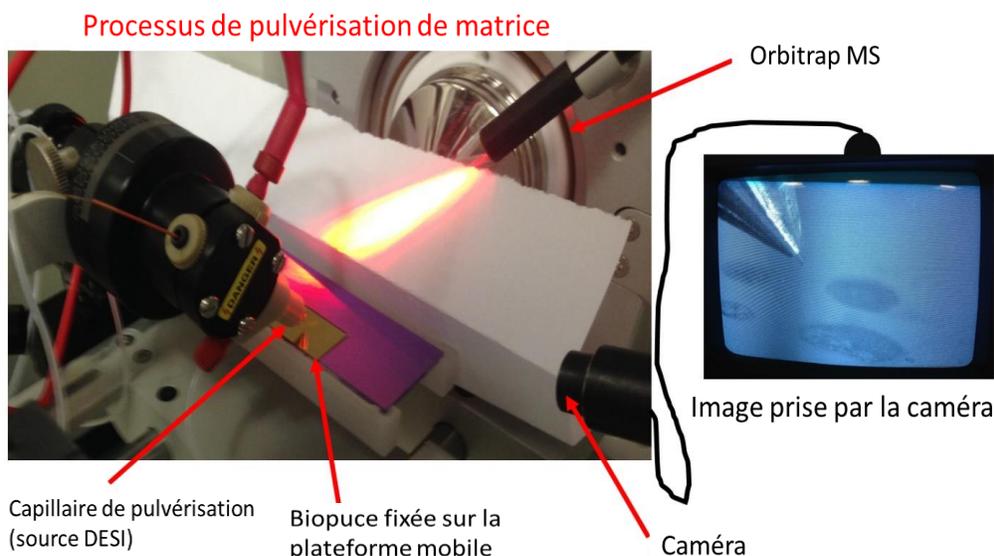


Figure IV-4: P Photo du processus de nébulisation d'une solution de matrice MALDI réalisée avec une source DESI convertie en sprayeur (tension désactivée). La distance appropriée entre la sortie du capillaire et la biopuce est choisie au début de la nébulisation (~2 mm) et reste constante tout au long du processus. La biopuce est fixée sur un support qui est déplacé manuellement selon des axes x-y pour obtenir une couverture homogène de matrice; le processus est contrôlé en observant l'image produite par une caméra. L'objectif de la caméra est centré pour visualiser simultanément le capillaire de spray et la surface de la biopuce afin de contrôler le dépôt de la matrice en temps réel.

Afin de vérifier la facilité d'utilisation et l'efficacité de la source DESI utilisée comme nébuliseur de matrice, nous avons décidé de déposer de 0,25 μ L d'une solution de protéines (mélange de standards BSA/myoglobine) sur quatre sites. Les dépôts ont été séchés à l'air et la

solution de matrice a ensuite été appliquée par nébulisation au-dessus. La solution de matrice HABA 10 mg/mL utilisée pour le dépôt manuel a été diluée 10× fois afin d'éviter l'obstruction du nébuliseur, les solutions de protéines et de matrice ont été préparées dans de l'acétonitrile 50/50 (v/v) / eau (avec 0,1 % de TFA). La tension a été désactivée et la caméra a été réglée pour observer et contrôler le processus de nébulisation. La distance et l'angle ($\angle \sim 45^\circ$) entre le capillaire de spray et la surface de la biopuce ont été ajustés (Figure IV-4). Le débit contrôlé de l'azote a permis de nébuliser la solution de matrice et de concentrer la pulvérisation à un débit de 2 $\mu\text{L}/\text{min}$ sur une petite surface, garantissant l'absence de délocalisation des analytes.

Afin d'obtenir un dépôt homogène de matrice, la biopuce a été installée sur une plateforme, et cette plateforme a été déplacée manuellement ligne par ligne afin d'obtenir la couverture souhaitée des sites d'intérêt (sites où les protéines ont été préalablement déposées). Le processus a été contrôlé en suivant l'image produite par la caméra. Des expériences de nébulisation de matrice ont été réalisées sur deux biopuces à un mois d'intervalle entre les deux, en raison de l'accès limité au spectromètre de masse MALDI-TOF. Les conditions de nébulisation sont restées les mêmes entre les deux séries d'expériences, les seuls paramètres modifiés étant le temps de pulvérisation par unité de surface (affectant l'épaisseur de la couche de matrice) et la distance entre le capillaire de spray et la surface des biopuces.

La première observation est que l'épaisseur de la matrice doit être suffisante pour couvrir complètement l'échantillon et être efficace lors de l'irradiation laser. En effet, la nébulisation de matrice sur des sites de $\varnothing \sim 0,5$ cm sur la première biopuce pendant 10 et 15 s par site n'a pas été concluante. Lors de l'introduction dans le spectromètre de masse, la matrice s'est évaporée, ou son épaisseur était à peine suffisante pour permettre la sélection des ROIs. Par conséquent, sur la deuxième biopuce, la solution de matrice a été pulvérisée pendant une période plus longue, c'est-à-dire 30 s et 1 min par spot. La nébulisation sur une plus grande surface (rectangle de $\sim 0,8$ cm \times 1 cm) a également été effectuée. L'analyse par l'imagerie MALDI-TOF a été fructueuse cette fois – il était possible de reconnaître et de délimiter facilement les ROIs. De plus, les spectres MS des deux sites couverts par la matrice étaient identiques, pour les deux durées de nébulisation de matrice 30 ou 60 s (Figure IV-5 A).

Un second paramètre important à considérer est la distance qui sépare l'extrémité du capillaire de spray de la surface (~ 2 mm). Si la distance était trop courte, nous avons observé la délocalisation des gouttelettes de matrice (vues sur la caméra comme de minuscules gouttelettes de matrice roulant sur la surface avant de sécher); si la distance était trop longue, la matrice cristallisait avant de toucher la surface, provoquant une couverture hétérogène. Cette couverture hétérogène de matrice a donné lieu à une coloration "faux-positif" au niveau des sites sans protéines présentes sur la surface, en raison du faible rapport signal/bruit sur le bord des sites (ROI #3 sur la Figure IV-5 B). C'est pourquoi, la distance entre la sortie du nébuliseur et la surface de la biopuce doit être finement ajustée au début du processus de nébulisation de matrice pour permettre une cristallisation de matrice instantanée dès que la gouttelette touche la surface.

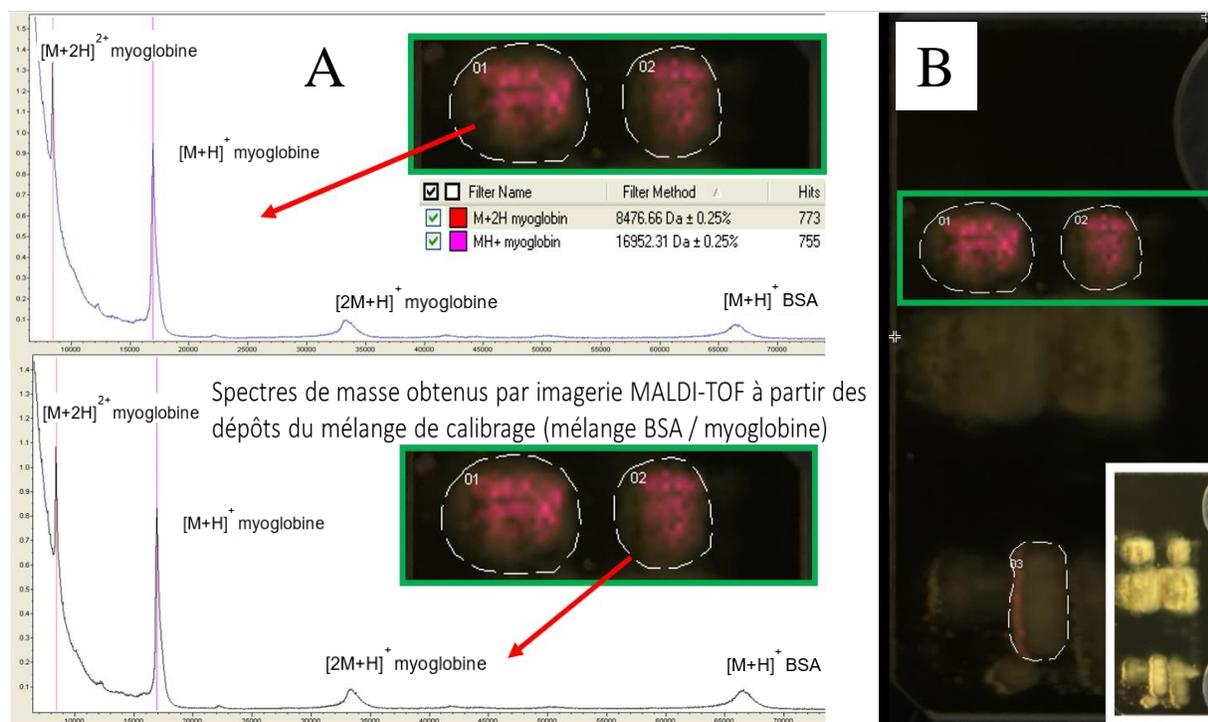


Figure IV-5: Résultats de l'imagerie MALDI-TOF MS obtenus après nébulisation de la matrice sur les sites contenant un mélange de calibrants (mélange BSA/myoglobine) déposés sur la biopuce fonctionnalisée avec la chimie PEO-NHS. (A) Spectres de masse moyennés obtenus à partir des ROIs indiqués. (B) La photo de la surface de la biopuce avec les filtres de masse de couleur rouge et magenta montre la distribution des ions issus de la myoglobine sur les ROIs analysés (numérotés et délimités par une ligne pointillée). ROI #3 présente une certaine coloration sur le côté gauche, malgré l'absence de dépôt et de détection de protéines. Cet effet est causé par une couverture de matrice hétérogène, qui se traduit par un niveau de bruit élevé générant un résultat "faux-positif". Une photo miniature de la biopuce après l'application de la matrice avant l'analyse MALDI-TOF est également représentée en bas à droite entourée d'un cadre blanc.

L'application de matrice par nébulisation à l'aide d'une source DESI est une méthode intéressante, car elle permet de couvrir la surface d'une couche homogène de la matrice. Bien que cette méthode puisse être utilisée pour augmenter les performances du couplage SPRi-MSi, nous n'avons pas pu suffisamment la développer faute de temps. Les expériences décrites ont été réalisées sur des surfaces plus grandes ($\varnothing \sim 0,5$ cm), que celle de chaque site de récepteur d'un véritable microarray qui ne dépasse pas $\varnothing \sim 0,2$ cm. La délimitation des ROIs après la nébulisation de la matrice, est rendue compliquée par l'absence de contours clairs des sites en particulier sur de si petites surfaces.

Une autre option peut consister à pulvériser une solution de matrice sur toute la surface de la biopuce. Dans ce cas, toute la zone couverte par la matrice sera balayée et traitée par le spectromètre de masse comme une seule ROI, ce qui devrait permettre d'éviter la sélection de ROI site par site. Cependant, cette méthode de dépôt de matrice présente plusieurs inconvénients. Tout d'abord, tous les spectres de masse obtenus à partir de la puce seront traités ensemble, en

fournissant un spectre de masse moyen pour toute la surface. L'obtention d'un spectre de masse à partir de chaque site de récepteur séparément nécessite une étape supplémentaire, c'est-à-dire l'interrogation des sites par traitement informatique, ce qui rallonge le temps d'analyse. De plus, le temps d'analyse MS dépend fortement de la surface interrogée: pour un balayage séparé ROI par ROI (comme effectué dans ce travail), il était généralement compris entre 30 min et 1h par biopuce, alors que pour la couverture totale de la surface du microarray (~ 1 cm × 1 cm), ce temps devrait doubler ou tripler, ce qui limite sérieusement la capacité d'analyse SPRi-MSi.

La gravure au laser de la surface de la biopuce avant la fonctionnalisation de la surface pourrait être l'une des solutions. L'idée consiste à délimiter les sites de la biopuce par ablation de l'or autour des futures positions des sites récepteurs. Cela pourrait simplifier l'étape d'immobilisation des récepteurs et l'étape d'application de la matrice, ainsi que celle de la localisation des ROIs pour l'étape d'analyse MS. Les premières biopuces d'essai avec des positions de sites délimitées ont été aimablement préparées par D. Farcage (CEA Saclay). L'ablation par laser de la surface de l'or a en effet facilité le repérage des sites de récepteurs et l'analyse par imagerie MALDI-TOF de la surface; cependant, les biopuces n'étaient plus fonctionnelles pour l'analyse SPRi. On peut supposer que l'effet observé a été causé par l'éjection et la redéposition des matériaux près de la zone d'impact du laser, ce qui a entraîné la pollution de la surface d'or. Par conséquent, la fonctionnalisation par la chimie de surface et le greffage ultérieure des récepteurs ont toutes deux été compromis, ce qui a conduit à l'absence de réponse du SPRi (Figure IV-6 A-B). Le dépôt du mélange d'étalons avec la solution de matrice sur les sites délimités "libres" (ne contenant pas de récepteurs) a permis une détection efficace par MS des protéines quelle que soit la géométrie des spots (spots en forme de "O" ou de "C", Figure IV-6 C-D). Des ajustements du protocole d'ablation de l'or étaient prévus, mais n'ont pas été réalisés en raison de la limitation de temps.

En conclusion, la nébulisation de matrice permet d'obtenir une couverture homogène de la surface de la biopuce, ce qui permet une détection plus efficace par MS. Les expériences de nébulisation de matrice sur des mélanges étalons ont permis de détecter avec succès les protéines déposées, et de déterminer les exigences minimales d'un dispositif d'application de la matrice par nébulisation. Ce nébuliseur de matrice, en théorie, devrait augmenter la sensibilité et l'efficacité globale du couplage SPRi-MSi, cependant, la nébulisation avec une source DESI nécessite le déplacement manuel de la biopuce immobilisée sur son support, ainsi qu'un contrôle visuel de l'efficacité du dépôt de matrice. Des expériences supplémentaires sont donc nécessaires pour adapter cette méthode au dépôt de matrice site par site, ou pour permettre la délimitation des sites sans compromettre les propriétés de la surface de la biopuce. Dans ce dernier cas, l'ablation par laser de la surface de l'or avec aspiration pourrait s'avérer utile – elle permettrait d'extraire et d'éliminer le matériau ablaté, afin d'empêcher sa dispersion vers la zone non traitée.

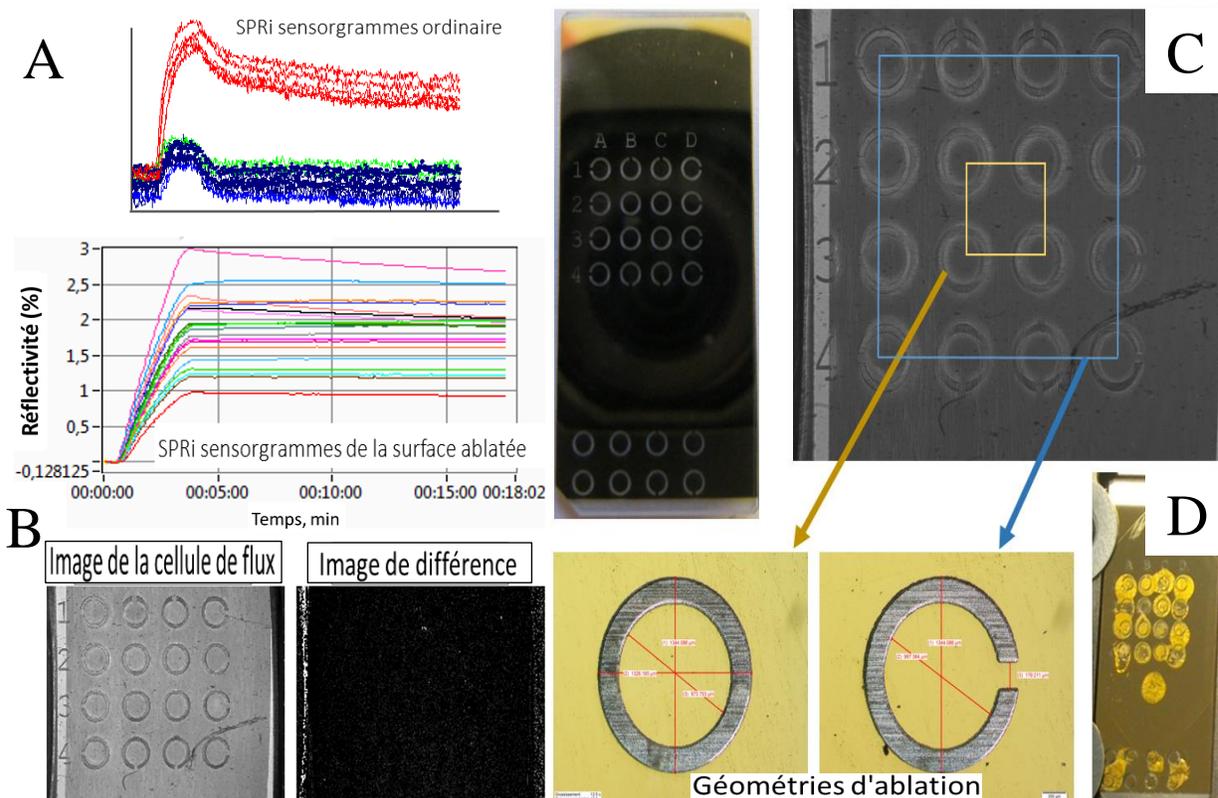


Figure IV-6: Sensorgrammes SPRi obtenus lors de l'injection de 150 μL de β - lactoglobuline à 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dans le tampon de course (A) à partir de la biopuce ordinaire et (B) à partir de la biopuce avec des ROIs délimités par ablation laser. L'image de la cellule SPRi et l'image de différence correspondante sont représentées sous les sensorgrammes, ces images ont été obtenues par SPRi lors de l'étape de dissociation. (C) Photo de la biopuce avec localisation des sites (ROIs) délimités et image zoomée de la partie de la puce SPRi obtenue par la caméra de cellule SPRi. (D) Deux géométries de spots sont représentées (photo après ablation laser, grossissement $\times 12,5$). La photo miniature de la biopuce après dépôt manuel de la matrice se trouve en bas à droite.

Chapter V. Microarrays à aptamères pour le couplage SPRi-MS.

L'objectif de cette partie du travail a été de développer de nouvelles biopuces à base d'aptamères pour le couplage SPRi-MS. L'évaluation de ces récepteurs aptamères greffés, et leur comparaison avec les anticorps précédemment étudiés, ont été réalisées en choisissant la β -lactoglobuline et l' α -thrombine comme cibles.

L'idée était de commencer avec des conditions expérimentales simplifiées, c'est-à-dire de réaliser des expériences cinétiques d'interactions entre les aptamères et les ligands cibles dans un tampon de course SPRi standard, puis de définir peu à peu les conditions de performance optimales. Toutes les modifications qui ont montré une influence positive sur les performances des aptamères ont été ensuite appliquées pour toutes les expériences suivantes. Par la suite, l'influence de diverses modifications des aptamères a été comparée au regard de leurs capacités de capture et de la cinétique globale; enfin, un cas plus complexe a été abordé, cas dans lequel le ligand est dilué dans un tampon complexe contenant un excès de BSA pour simuler un environnement réel. Cette stratégie devrait permettre d'élucider quel paramètre ou quelle étape de l'expérience pourrait influencer sur la sensibilité des puces à aptamères.

Expériences de contrôle

La possibilité que la capture du ligand par les récepteurs immobilisés puisse être due à des interactions non spécifiques, a été évaluée systématiquement par une série de contrôles lors de chacune des expériences.

Les contrôles négatifs des expériences menées avec les aptamères dirigés contre la thrombine, consistent en l'utilisation d'aptamère (quadruplex **TC**, 5'-GGG-GTT-TTG-GGG-3') et d'un anticorps IgG de souris incapables de se lier à la thrombine.

Les contrôles négatifs des expériences menées avec les aptamères dirigés contre la β -lactoglobuline, deux aptamères consistent en l'utilisation de deux aptamères (**BLG-Sc** 5'-T15-GGT-GGT-GGT-TGT-GGT-3' et **BLG-10** 5'-T15-GGA-CAC-GGC-AAA-GGG-GTA-TAG-CCT-ACC-GGA-CCG-TGA-ACA-TGG-AAT-GAT-GTG-CTG-CGT-GG-3'), et d'un anticorps IgG de souris incapables de se lier à la β -lactoglobuline.

Au début de chaque expérience SPRi, la portion de surface de PEO sans récepteurs a été systématiquement passivée par des injections de L-lysine. Lors des expériences SPRi, les récepteurs de contrôle négatif (anticorps et aptamères) ont produit un bruit de fond égal ou inférieur à celui de la chimie de la surface passivée, qui a servi de comme référence / ligne de base, et aucune interaction non spécifique n'a été observée à partir de ces récepteurs non spécifiques (données non présentées).

V-1 Aptamères anti β -lactoglobuline

L'utilisation d'aptamères anti β -lactoglobuline pour une application aux biocapteurs n'est pas courante, peu d'articles ont été publiés sur cette thématique à ce jour, aucun dans le contexte du couplage SPRi-MS [273], [274]. Deux aptamères anti β -lactoglobuline ont été choisis à partir de séquences publiées dans la littérature. Ils sont décrits pour interagir avec une grande affinité et

spécificité avec les deux variantes connues de β -lactoglobuline (A et B). Chacun de ces aptamères a été assorti d'un aptamère contrôle ne montrant aucune réactivité. De plus, afin de garantir que l'expérience SPRi a été menée correctement, des anticorps bien caractérisés, dirigés contre β -lactoglobuline ont été systématiquement immobilisés sur la surface du biocapteur (contrôle positif), parallèlement aux aptamères anti β -lactoglobuline.

Ces aptamères d'ADN de source commerciale ont été sélectionnés avec succès par la méthode SELEX. Ils possèdent un linker T15 à leur extrémité 5'. Il s'agit l'aptamère **BLG-G** à 4 plans (5'-T15-GGG-GTT-GGG-GTG-TGG-GGT-TGG-GG-3') et son aptamère contrôle **BLG-Sc** (5'-T15-GGT-GGT-GGT-TGT-GGT-3'), ainsi que le **BLG-14** (5'-T15-CGA-CGA-TCG-GAC-CGC-AGT-ACC-CAC-CCA-CCA-GCC-CCA-ACA-TCA-TGC-CCA-TCC-GTG-TGT-G-3') et son aptamère de contrôle **BLG-10** (5'-T15-GGA-CAC-GGC-AAA-GGG-GTA-TAG-CCT-ACC-GGA-CCG-TGA-ACA-TGG-AAT-GAT-GTG-CTG-CGT-GG-3').

Les anticorps polyclonaux anti- β -lactoglobuline de lapin et des immunoglobulines G de souris (IgG, contrôle négatif) ont été immobilisés à une concentration de 6 μ M dans des tampons contenant 5 % de glycérol. Les aptamères ont été immobilisées à des concentrations de 10 et/ou 20 μ M dans des tampons TE ou PBS sur la biopuce fonctionnalisée avec une monocouche de PEO thiolés activées par la chimie NHS/DCC.

Les protéines β -lactoglobuline et ovalbumine (cette dernière utilisée comme ligand non spécifique), ont été injectées à des concentrations de 1 μ g/mL, 10 μ g/mL et 100 μ g/mL successivement, avec injection d'une solution de régénération après chaque injection de protéine.

Les sensorgrammes représentés sur la Figure V-1 montrent la réponse SPR obtenue à partir des sites des anticorps anti- β -lactoglobuline (courbe rouge), des aptamères BLG-14 et BLF-G (courbes vert clair et bleu clair respectivement), des aptamères de contrôle BLG-SC et BLG-10 (bleu) et des IgG de souris de contrôle (courbes pointillées bleu foncé).

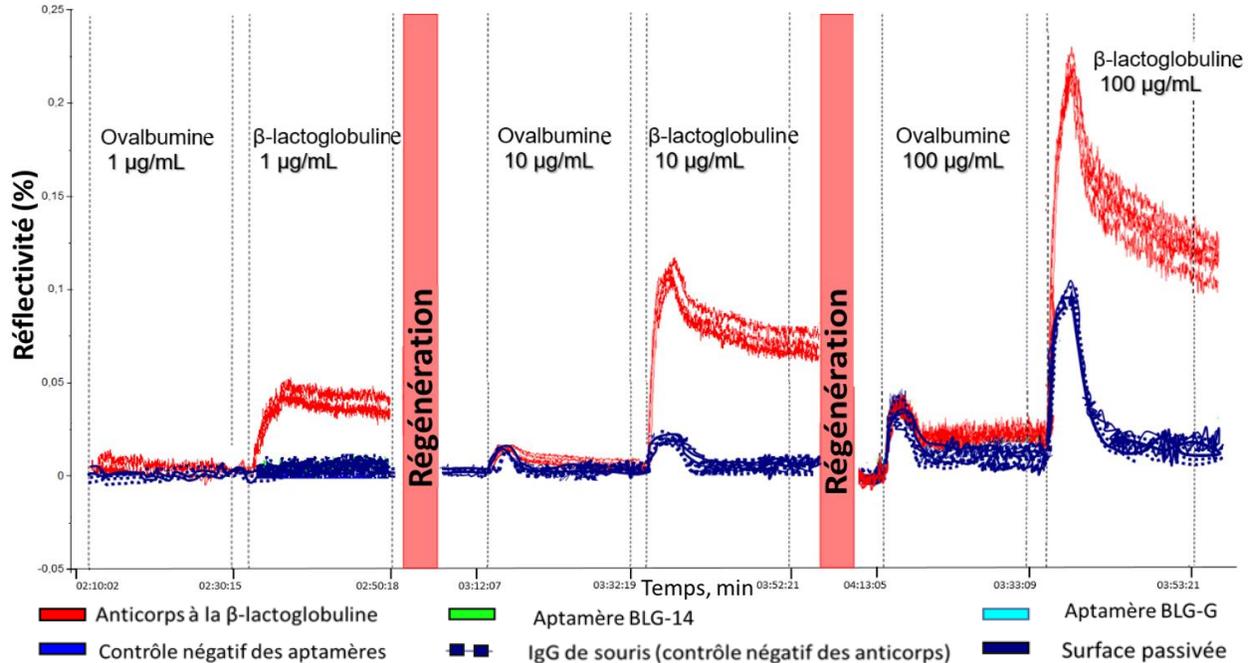


Figure V-1: Sensorgrammes SPRi obtenus suite à différentes injections de solutions commerciales purifiées de β -lactoglobuline et d'ovalbumine de concentrations croissantes dans un tampon de course d'acétate d'ammonium 10 mM, pH 7,5, sans soustraction du signal obtenu à partir de la surface passivée (courbe solide bleu foncé).

Les expériences SPRi avec les microarrays aptamères anti β -lactoglobuline ont révélé l'absence d'interactions des aptamères (immobilisés aux deux concentrations 10 et 20 μ M) avec les ligands quelques soient les concentrations testées (1-100 μ g/mL, données non présentées). Aucune réponse spécifique n'a été observée ($\leq 0,02\%$ de la réflectivité) avec les récepteurs de contrôle négatif (c'est-à-dire les sites d'IgG de souris, les sites d'aptamères BLG-Sc et BLG-10) lors d'injections de l'ovalbumine et de la β -lactoglobuline aux différentes concentrations. Par ailleurs, aucune interaction n'a été détectée avec la surface passivée ce qui montre l'efficacité de notre chimie de surface (PEO-NHS) pour limiter les interactions non spécifiques.

Les sensorgrammes SPRi (Figure V-1) démontrent que seule l'interaction de la β -lactoglobuline avec son anticorps spécifique entraîne une augmentation du niveau de réflectivité, alors qu'aucun des quatre aptamères sélectionnés n'a pu capturer la β -lactoglobuline, contrairement à ce qui était attendu [273], [274]. Les explications possibles pourraient résider dans des conditions de prétraitement des aptamères à optimiser ou une formulation inadaptée des tampons (tampon d'immobilisation des récepteurs ou tampon de course SPRi).

V-1.1 Recherche de conditions expérimentales appropriées pour l'aptasenseur de β -lactoglobuline

Concentration aptamère – Des changements dans les conditions expérimentales en SPRi étaient nécessaires en raison du manque de performance des aptamères anti β -lactoglobuline décrits précédemment. Ainsi, il a été décidé de modifier les conditions d'immobilisation des aptamères, et

la composition du tampon de course en SPRi. Les meilleurs résultats décrits dans la littérature, l'avaient été avec des aptamères immobilisés à une concentration de 10 μM censée assurer une couverture maximale de la surface sans aucune entrave stérique pour un repliement correct des aptamères [274]. Afin d'évaluer l'influence de la concentration des aptamères immobilisés sur la détection SPRi-MS de la β -lactoglobuline et de maximiser la quantité possible de ligand retenu, une concentration de 20 μM d'oligonucléotides a également été systématiquement testée dans ce travail. Toutefois, seuls les résultats pour les aptamères immobilisés à une concentration de 10 μM seront présentés puisque les résultats pour les deux concentrations d'immobilisation ont été identiques.

Composition tampon – En raison de leurs séquences riches en guanine (G), les aptamères sélectionnés sont censés former des structures G-quadruplex non canoniques par empilement de G-quartets [275]. On sait que le repliement et la stabilité de ces structures sont liés à la présence d'un cation monovalent, en particulier K^+ et Na^+ . Le principal problème est que la concentration en K^+ à laquelle les G-quadruplexes sont formés (100-150 mM) peut fortement influencer la détection et la qualité des données obtenues par MS [107]. L'aptamère à 4 plans est une exception, formant des G-quadruplexes même en l'absence de K^+ , il est stable en présence de 1 mM de KCl [273]. Afin de fournir aux aptamères des conditions adéquates pour être fonctionnels au sein du système SPRi, différentes approches ont été adoptées. Tout d'abord, K^+ requis a été substitué par NH_4^+ en augmentant la concentration initiale du tampon d'acétate d'ammonium de 10 mM à 150 mM. Ensuite, des quantités de K^+ (10 mM) compatibles avec la MS ont été ajoutées au tampon volatil (par exemple 150 mM d' AcNH_4^+ en présence de 10 mM de KCl) et, enfin, le tampon de course d'acétate d'ammonium a été remplacé par du PBS pH 7,4 (10 mM de phosphate, 2,7 mM de KCl, 137 mM de NaCl), ce qui n'empêche pas K^+ d'intervenir dans la structure des aptamères, tout en fournissant une force ionique suffisante.

Les changements du tampon de course ont été effectués en parallèle avec l'échange du tampon d'immobilisation des aptamères. Aucune des modifications testées n'a eu d'influence sur les performances des aptamères anti β -lactoglobuline. Les anticorps dirigés contre la β -lactoglobuline ont été les seuls récepteurs pour lesquels des interactions ont été observées (données non présentées).

Plusieurs études ont également rapporté une influence des ions métalliques divalents sur la formation et la stabilité des G-quadruplexes, comme résumé par Bhattacharyya *et al.* [275]. On peut suggérer que des ions divalents pourraient être nécessaires pour le bon fonctionnement des aptamères. Ainsi les deux, le tampon de course PBS utilisé précédemment et le tampon d'immobilisation des aptamères, ont été complétés par 1 mM de MgCl_2 et de CaCl_2 . Aucune amélioration des performances n'a été observée.

Renaturation aptamère – En parallèle, j'ai également vérifié l'impact des conditions d'immobilisation des aptamères. On sait que le repliement correct des aptamères pourrait être induit par une courte étape de dénaturation par simple chauffage, suivie d'une étape de stabilisation par refroidissement lent à température ambiante en présence d'ions [107]. Ainsi, tous les aptamères

ont été dénaturés par incubation pendant 5 minutes à 90 °C, suivie d'une étape de renaturation par refroidissement progressif jusqu'à température ambiante, ou jusqu'à 4 °C, dans différents tampons (solution de stockage TE, tampons PBS avec et sans MgCl₂ et CaCl₂), à des concentrations de 10, 20 et 100 μM. Des aptamères anti β-lactoglobuline ainsi traités et non traités, ont été immobilisés sur la surface du capteur avec des anticorps anti β-lactoglobuline et divers contrôles. Aucune de ces dernières modifications n'a permis aux aptamères de capturer le ligand (données non présentées).

V-1.2 Contrôle des aptamères anti β-lactoglobuline par électrophorèse d'affinité, et analyse MALDI-MS des surfaces microarrays

Électrophorèse d'affinité – Le manque de performance des aptamères anti β-lactoglobuline peut être lié à une possible influence néfaste de la monocouche de PEO utilisée pour le greffage des aptamères lors de l'immobilisation [270], ou à un manque d'efficacité des aptamères eux-mêmes. Par conséquent, des expériences supplémentaires pour contrôler la reconnaissance moléculaire, la liaison des aptamères anti β-lactoglobuline à leur ligand ont été menées par électrophorèse d'affinité qui permet la caractérisation des interactions biomoléculaires non covalentes librement en solution.

L'électrophorèse capillaire d'affinité (ACE) avec des G-quartet aptamères dans différents tampons d'acétate (10 mM d'acétate, 150 mM d'acétate avec et sans KCl) et dans le tampon PBS (sans MgCl₂ et CaCl₂) en tant que phase mobile a été utilisée comme méthode de référence pour l'étude des interactions des aptamères anti β-lactoglobuline avec la protéine ligand correspondante. ACE était censée fournir les conditions optimales pour le repliement des aptamères, conditions nécessaires à la reconnaissance et à la capture efficaces de β-lactoglobuline. Cependant, quelles que soient les conditions expérimentales et les aptamères testés, la mobilité électrophorétique de la β-lactoglobuline n'a jamais varié (données non montrées). Ainsi, on peut suggérer que, soit le choix des tampons utilisés n'était pas adapté, soit un autre paramètre influent n'a pas été convenablement pris en compte, soit des aptamères sélectionnés ne sont pas fonctionnels.

Analyse MALDI-TOF – Malgré le manque d'efficacité des aptamères anti β-lactoglobuline, l'analyse MALDI-TOF de la surface des microarrays a été systématiquement effectuée à la suite des expériences SPRi. Aucun signal de détection n'a été obtenu à partir des sites aptamères anti β-lactoglobuline. Les spectres de masse obtenus étaient les mêmes que ceux des sites de contrôle. Les résultats MS ont été en accord avec ceux obtenus avec le système SPRi pour toutes les conditions expérimentales et les modifications testées (données non présentées).

L'origine du manque de réactivité de ces aptamères anti β-lactoglobuline dans nos conditions reste encore à déterminer. Ainsi, on peut suggérer que, soit le choix des tampons utilisés n'était pas adapté, soit un autre paramètre influent n'a pas été convenablement pris en compte, soit des aptamères sélectionnés dans leur version actuelle (avec des modifications de 5' et des T-linkers / polyT utilisés dans ce travail) ne sont pas fonctionnels. Nous nous sommes donc tournés vers un autre système modèle.

V-2 Aptamères anti thrombine

Nous avons sélectionné trois aptamères dirigés contre la thrombine: il s'agit de deux oligonucléotides G-quadruplex généré via SELEX, qui reconnaissent des sites distincts de la thrombine humaine avec une grande affinité et une bonne spécificité. Le premier, l'aptamère HD1, a été décrit en 1992 [276], et le second aptamère, HD22, a été découvert en 1997 [277]. Le troisième est l'aptamère de fusion divalent HD1-22 [278]–[280]. À des fins de comparaison, un anticorps dirigé contre la thrombine a également été inclus à l'expérience. La spécificité et la sensibilité de la détection de la thrombine dans des conditions réelles ont également été évaluées.

Les deux aptamères HD1 et HD22 ont été largement étudiés et utilisés pour le développement de thérapies et de diagnostics basés sur les aptamères. Ils répondent également à toutes les exigences des biocapteurs (affinité, sélectivité et spécificité), ce qui en fait des candidats intéressants pour les applications thérapeutiques (anticoagulants) et pour la biodétection par affinité (comme éléments de détection - récepteurs), raison pour laquelle HD1 et HD22 sont probablement les aptamères les plus étudiés [170], [276], [277], [281], [282]. Leur association avec la thrombine est devenue un modèle largement utilisé pour le développement de plateformes de biodétection afin de démontrer la faisabilité de la technologie avec une détection impliquant des aptamères.

La thrombine est une protéase multidomaine impliquée dans un grand nombre de cascades biologiques (par exemple, réaction de coagulation du sang et de fibrinolyse, rôles pro/anti-inflammatoires). La thrombine résulte de l'activation protéolytique de la prothrombine, son précurseur qui circule dans le sang à une concentration de 0,1 mg/mL (≈ 1.4 mM) [283] [284]. La prothrombine est activée de manière protéolytique par différents facteurs ce qui entraîne la libération d' α -thrombine. La thrombine représente environ la moitié du poids moléculaire de la prothrombine (respectivement 37,4 et 72 kDa pour les protéines humaines, Figure V-2). Ce clivage permet l'exposition de régions fonctionnelles, c'est-à-dire le site actif et les sites de liaison, les exosites I et II, qui déterminent la spécificité de la thrombine et jouent un rôle crucial dans les différents modes d'actions de la thrombine [285]. Ces exosites constituées des clusters de résidus basiques bien exposés en surface sont impliqués dans la liaison de ligands anioniques (Figure V-2 C). L'occupation des exosites peut induire des changements allostériques au niveau du site actif et influencer l'activité catalytiques de la protéase [286].

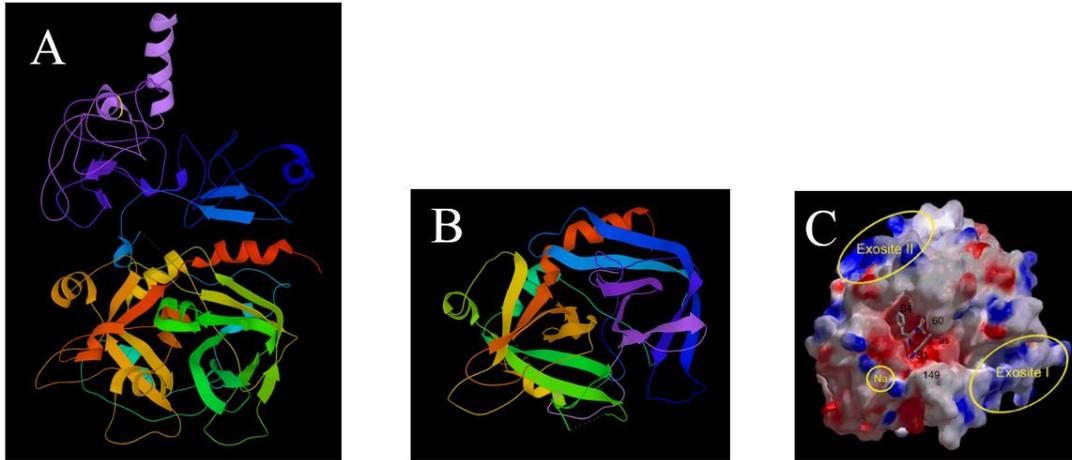


Figure V-2: Structures moléculaires de (A) la prothrombine humaine (4NZQ) et (B) l' α -thrombine humaine (1HAI). (C) Structure de la thrombine superposée à une représentation de la surface électrostatique, où l'emplacement de liaison du sodium et deux sites de surface, appelées exosite I et exosite II, sont surlignés en jaune.

Ainsi l'exosite I de reconnaissance du fibrinogène agit comme un guide pour les substrats (fibrinogène, la fibrine, le cofacteur II de l'héparine) au site actif, tandis que l'exosite II de liaison à l'héparine est aussi le site de fixation de l'antithrombine III, du récepteur activé par la protéase, des facteurs V, VIII et XI, de la protéine C, de l'inhibiteur de fibrinolyse activé par la thrombine et des GAGs [286]. Ces molécules permettent à la thrombine de participer à des interactions/réactions qui provoquent des fonctions pro- et anti-coagulantes.

L'aptamère HD1, est connu pour reconnaître l'exosite I de la thrombine [276]. HD22, reconnaît l'exosite II de la thrombine. Les aptamères HD1 et HD22 montrent un effet sur la modulation du processus de coagulation lors de la liaison à l'exosite I et II respectivement [281], [282].

La thrombine présente des similitudes structurales avec son précurseur prothrombine. Par conséquent, une question importante pour le biocapteur SPRi-MS est une possible interaction des aptamères anti thrombine, avec la prothrombine, qui est présente dans le sang à une concentration micromolaire. HD1 est connue pour reconnaître prothrombine [280], [281] mais aucune étude n'a été menée sur l'influence des modifications de l'aptamère sur les caractéristiques d'affinité et de spécificité de cette interaction. En revanche, rien n'est connu de l'interaction de l'anticorps spécifique de la thrombine avec la prothrombine. C'est pourquoi, l'interaction de la prothrombine avec les aptamères et l'anticorps a également été abordée dans ce travail de thèse.

V-2.1 Structure et spécificité des aptamères anti thrombine HD1 et HD22

Pour comprendre la complexité du problème de sélection des aptamères, il convient de présenter un aperçu de ce que l'on sait de la structure moléculaire des aptamères anti thrombine, de leurs possibles modifications et de leurs interactions.

HD22 (également noté dans la littérature HTDQ, et TBA-29 pour thrombin-binding aptamer 29-mer), est constitué d'ADN simple brin de 29 bases, selon la séquence 5'-AGT-CCG-TGG-TAG-GGC-AGG-TTG-GGG-TGA-CT-3' [277]. Il contient souvent différents T-linkers (polyT) à l'extrémité 5' et a une structure mixte duplex/G-quadruplex (Figure V-3 A) [287]. Il a été démontré par des expériences de compétition et de photo-réticulation que HD22 reconnaît l'exosite II de la thrombine (K_D $2,4 - 3,16 \times 10^{-9}$ M), qui est également un site de liaison primaire pour les GAGs et notamment de l'héparine [170], [280]. Les charges positives de l'exosite II créent un site de fixation pour HD22, formant un complexe qui est stabilisé par des interactions hydrophobes (Figure V-3 D) [170].

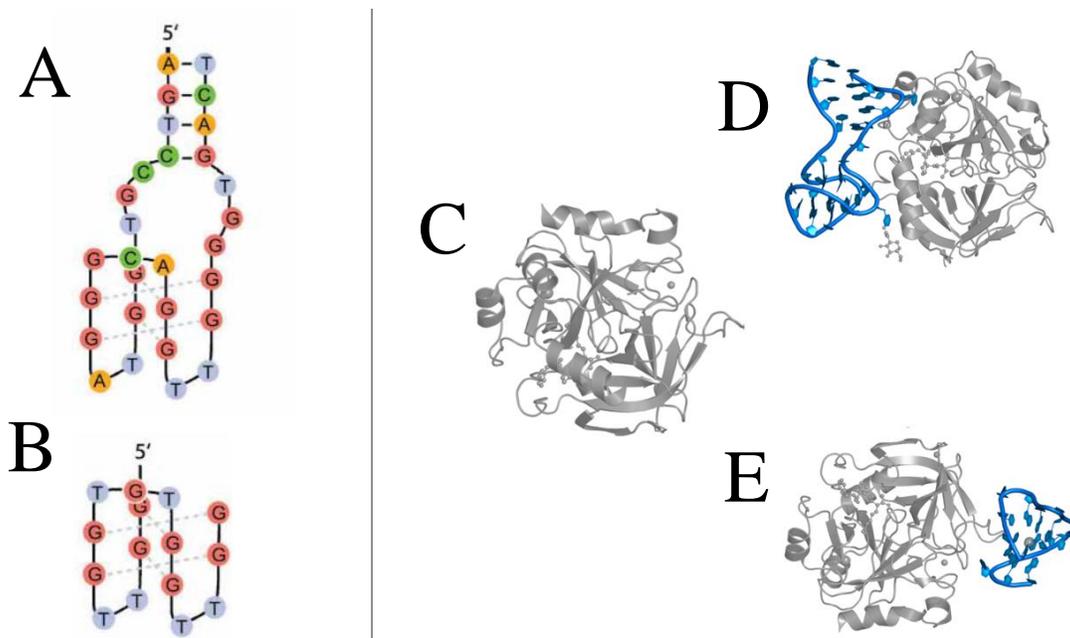


Figure V-3: Représentation schématique des aptamères anti thrombine (A) HD22 et (B) HD1. Structures moléculaires de la (C) thrombine (3U69) et des complexes thrombine-aptamère avec (D) HD22 (4I7Y) et (E) HD1 (4DIH). Les aptamères ADN sont mis en évidence en bleu, la molécule de thrombine est grise.

HD1, également connu dans la littérature sous les acronymes TBA-15, G15D, HTQ ou ARC183, est un aptamère d'ADN simple brin 15-mer de séquence 5'-GGT-TGG-TGT-GGT-TGG-3' [276]. Tout comme HD22, il contient souvent différents T-linkers à son extrémité 5' ou 3'. HD1 est capable d'inhiber les fonctions pro-coagulantes de la thrombine (c'est-à-dire la conversion du fibrinogène en fibrine et l'agrégation plaquettaire). De plus, il peut reconnaître le précurseur de la thrombine, la prothrombine, avec une affinité similaire entraînant l'inhibition de l'activation de la prothrombine (K_D $1,19 - 7,1 \times 10^{-9}$ M pour la thrombine contre $37,2 \times 10^{-9} - 7,8 \times 10^{-8}$ M pour la prothrombine) [170], [280], [281]. HD1 se replie dans une conformation de type chaise avec deux G-quartets espacés par deux boucles TT et un motif TGT (Figure V-3 B), ce qui conduit à une orientation antiparallèle [288]. HD1 interagit principalement avec l'exosite I de la thrombine, comme illustré par la Figure V-3 E, mais il existe également des preuves que la boucle TGT interagit avec l'exosite II, comme cela a été découvert et confirmé par des analyses

aux rayons X et par des analyses SPR Biacore (K_D 1,19 – $7,1 \times 10^{-9}$ M pour l'exosite I contre $17,4 \times 10^{-9}$ M pour l'exosite II) [170], [289].

L'existence de deux aptamères HD22 et HD1 montre que des différences dans la séquence d'aptamère peuvent modifier l'affinité de liaison et adresser les aptamères à des épitopes distincts d'une même protéine. La sélection de ces aptamères anti thrombine a été principalement motivée par les applications thérapeutiques possibles [263], [282], [290] mais ces molécules ont également été largement exploitées pour la biodétection. Les seuils de détection avec ces deux aptamères anti thrombine allant de pM à μ M sont prometteurs [170], [279], [291], [292]. Cependant, en général, ces études ont été menées en utilisant uniquement la thrombine comme récepteur modèle, de sorte que la sélectivité, la spécificité et la sensibilité de HD1 et HD22 n'ont pas été complètement caractérisées. Des aptasenseurs électrochimiques, des dispositifs SPR ou d'autres méthodes de séparation par affinité ont couramment été utilisés, pourtant ces techniques peuvent fournir des résultats biaisés dans des milieux complexes (notamment en raison d'interaction non spécifique) [169]. Par conséquent, une méthode de détection supplémentaire est nécessaire pour s'assurer de la nature du ligand retenu et confirmer la sélectivité et la spécificité des récepteurs de la thrombine, ce qui, dans ce travail, a été réalisé par imagerie MALDI-TOF après analyse SPRi (couplage SPRi-MSi).

V-2.2 Recherche de conditions expérimentales SPRi pour les aptamères HD1 et HD22 anti thrombine

Les aptamères doivent être fonctionnalisés avec un groupe fonctionnel à l'extrémité 5' ou 3' pour permettre leur greffage sur le support solide. Un linker entre ce groupe et la séquence d'oligonucléotides est nécessaire pour faciliter le repliement 3D des aptamères. Comme rapporté dans la littérature, les positions terminales 5' et 3' ont toutes deux été exploitées, pour l'immobilisation des aptamères, cependant, seuls quelques articles ont étudié l'effet de l'orientation de l'immobilisation, ou de la longueur du linker sur la performance de l'aptasenseur [270], [293]. Les auteurs ont affirmé que dans toutes les configurations testées, la meilleure capture de la thrombine était obtenue lorsque les aptamères HD1 étaient immobilisés par leur extrémité 3' plutôt qu'en 5'. Ainsi, j'ai d'abord étudié l'influence de la position 5' ou 3' de la fonctionnalisation des aptamères HD1 et HD22 sur leur capacité d'interaction.

Il est important de noter que, la prothrombine et la thrombine sont toutes deux présentes dans les échantillons biologiques, ce qui nécessite une évaluation systématique des interactions avec chaque protéine individuelle avec les aptamères sélectionnés. L'exosite I de la thrombine est également accessible sur la prothrombine, mais avec des propriétés de liaison différentes. Il est donc appelé proexosite I [285], [294]. La valeur de K_d de HD1 pour le proexosite I est comparable à celle de l'exosite I de la thrombine [280], mais la cinétique de la réaction de liaison est différente. L'exosite II est enfoui dans la prothrombine [281], si bien que la HD 22 est supposée n'avoir aucune affinité avec cette protéine. Par conséquent, une expérience de « ligand-fishing » directe, avec un suivi par SPRi a été réalisée en injectant une série de solutions diluées de thrombine et/ou

de prothrombine sur le microarray de récepteurs anti thrombine, afin d'évaluer la spécificité des aptamères envers la prothrombine.

V-2.2.1 Influence du tampon d'immobilisation HD1 et HD22

Deux aptamères, un aptamère HD1 et un aptamère HD22, avec des linkers de différentes longueurs, T5 ou T15, en position 5' ont été choisis (5'-T5-HD1-3', noté **HD1 5'-T5** et 5'-T15-HD22-3', noté **HD22 5'-T15**) et leur capacité à développer des interactions avec la thrombine a été comparée en fonction du tampon d'immobilisation.

Les deux aptamères, HD1 5'-T5 et HD22 5'-T15, dilués à 10 μ M soit dans le tampon de stockage des aptamères (tampon TE pH 8,0 contenant 1M de Tris-HCl avec 0,1M d'EDTA) soit dans le tampon de course SPRi (tampon PBS / tampon phosphate pH 7,4 contenant 10mM de phosphate de sodium, 137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl), ont été déposés sur la surface réactive PEO-NHS d'une biopuce, puis incubés une nuit complète pour leur immobilisation sur la surface. Les variations de réflectivité et la quantité de ligand capturé à partir d'injections de thrombine et de prothrombine ont été mesurées dans le tampon de course PBS. Il est bien connu que les cations jouent un rôle clé dans la détermination de la structure secondaire quadruplex et affectent la stabilité et l'activité de l'aptamère, comme cela a été signalé dans le cas des propriétés de HD1 [295], mais seules quelques études ont analysé l'effet des cations sur les oligonucléotides mixtes duplex/quadruplex comme HD22. On pense que l'addition de différents cations divalents, en particulier Mg^{2+} et Ca^{2+} , peuvent affecter la stabilisation de la structure des aptamères anti thrombine et, par conséquent, améliorer leurs capacités de liaison [275]. Cependant, la présence de ces sels divalents pourrait nuire à la détection ultérieure par MS, c'est pourquoi le tampon de course PBS a été préparé sans $MgCl_2$ et $CaCl_2$ [296], [297].

L'immobilisation de HD1 5'-T5 à la surface du capteur dans le tampon de stockage TE a entraîné une reconnaissance et une capture plus efficaces des protéines par rapport à l'immobilisation dans le tampon de course PBS. Cela se déduit d'une variation de réflectivité (%) environ deux fois plus importante pendant les injections de thrombine et de prothrombine. Les sensorgrammes SPRi montre aussi une interaction de plus grande affinité de HD1 5'-T5 avec la thrombine qu'avec la prothrombine, ce qui est en accord avec une moindre accessibilité de l'exosite I à la surface de la prothrombine. De plus, le complexe HD1-thrombine formé était plus stable, comme en témoigne la variation de réflectivité des sensorgrammes (Figure V-4).

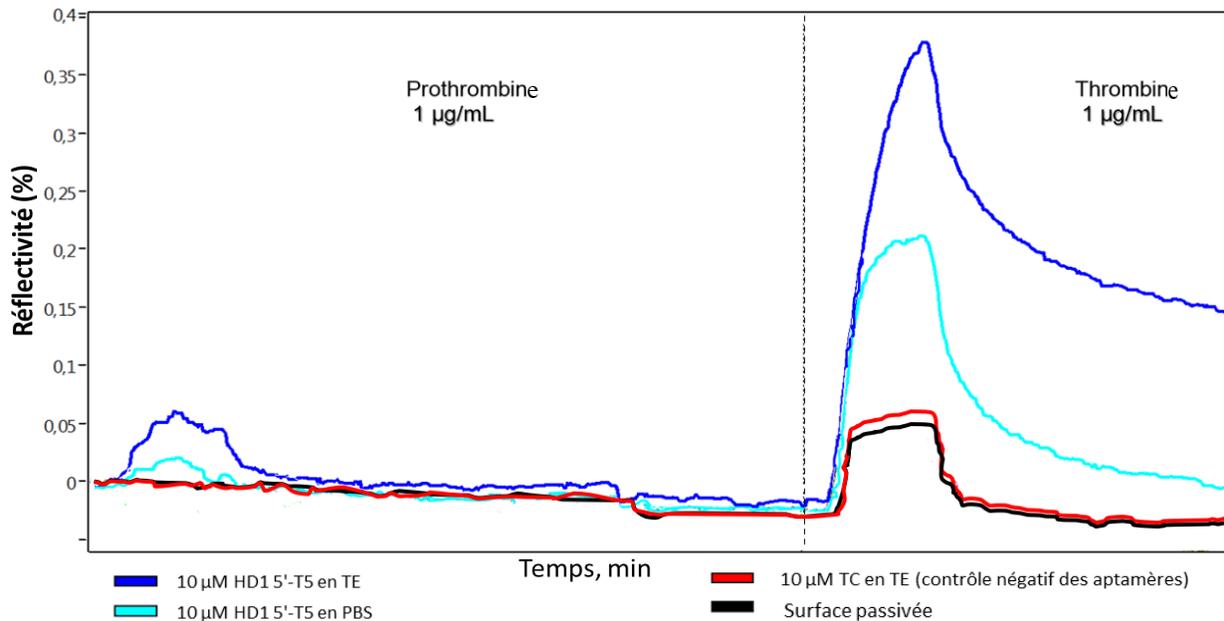


Figure V-4: Sensorgrammes SPRi obtenus à partir de microarray d'aptamère HD1 5'-T5 suite à des injections de solutions commerciales de prothrombine et de thrombine à des concentrations de 1 µg/mL dans un tampon de course PBS (sans sels divalents). HD1 5'-T5 immobilisé dans les tampons de course TE et PBS correspondent respectivement aux courbes bleu foncé et bleu claire, le contrôle négatif et la surface passivée correspondent respectivement aux courbes rouge et noire.

Aucune interaction entre HD22 5'-T15 et la thrombine, ou la prothrombine, n'a été observée: le niveau de réflectivité des sites HD22 5'-T15 était égal ou inférieur à celui des sites contrôles à la fin de l'injection (Figure V-5). L'absence de toute interaction de la thrombine avec HD22 5'-T15 pourrait être due soit à un repliement incorrect ou instable dans nos conditions expérimentales, soit à l'absence d'immobilisation de l'aptamère à la surface du capteur. Dans le cas de HD22-prothrombine, cette absence d'interaction était attendue, car HD22 est un aptamère spécifique de l'exosite II de la thrombine, qui n'est pas exposé à la surface de la prothrombine. Les données SPRi recueillies sur les différents sites de contrôles (TC et surface passivée) ont toujours montré une absence d'interaction comme attendu (Figure V-4, Figure V-5).

Comme les interactions aptamère-protéine n'ont été observées qu'avec HD1 5'-T5, cet aptamère a servi de référence pour l'optimisation initiale des conditions d'immobilisation des aptamères.

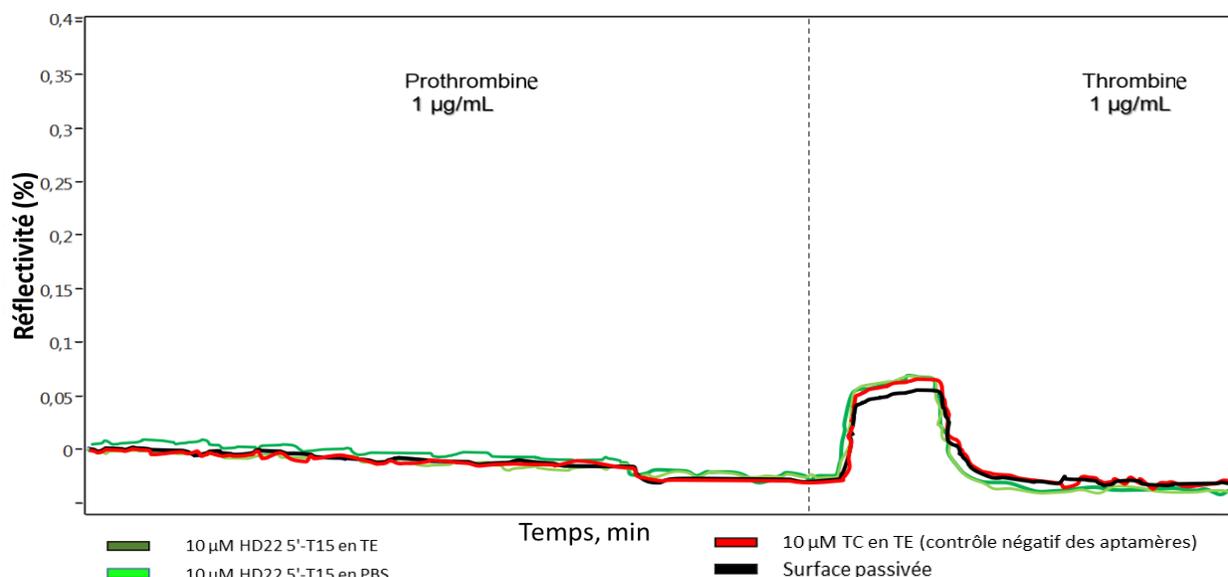


Figure V-5: Sensorgrammes SPRi obtenus à partir de microarray d'aptamère HD22 5'-T15 suite à des injections de solutions commerciales purifiées de prothrombine et de thrombine à des concentrations de 1 µg/mL dans le tampon de course PBS (sans sels divalents). HD22 5'-T15 immobilisé à partir de solutions dans les tampons de course TE et PBS correspondent respectivement aux courbes de couleur vert foncé et vert clair, le contrôle négatif et la surface passivée sont respectivement de couleur rouge et noire.

V-2.2.2 Influence de la concentration des aptamères HD1 et HD22 lors de leur immobilisation dans le tampon TE

L'influence de la concentration des aptamères déposés à la surface dans le tampon TE (surface SAM PEO-NHS, immobilisation 16 h) sur la quantité de ligands retenus a été étudiée aux concentrations suivantes 10, 20, 50 et 100 µM (cette dernière = concentration stock). L'efficacité de la capture de la thrombine par HD1 5'-T5 étant beaucoup plus élevée que celle de la prothrombine, la mesure de la quantité de ligand capturé a été effectué pour des injections de 1 µg/mL de thrombine (Sigma) et de 10 µg/mL de prothrombine.

La quantité de thrombine capturée par HD1 5'-T5 était environ 10 fois plus élevée que celle de la prothrombine, alors que la concentration de la prothrombine injectée était 10 fois plus élevée, ce qui indique une stabilité beaucoup plus élevée des complexes de thrombine-HD1 par rapport aux complexes de prothrombine-HD1. L'efficacité de la capture du ligand par HD1 5'-T5 varie de façon décroissante selon les concentrations suivantes d'aptamère: 10 µM > 100 µM > 50 µM > 20 µM pour les interactions avec la thrombine et 100 µM ≥ 10 µM > 50 µM > 20 µM pour la prothrombine, la concentration de 20 µM étant la moins performante (Figure V-6). Une augmentation jusqu'à 10 fois de la concentration d'aptamère ne modifie pas de manière significative la capture de ligand. Lorsque la concentration de HD1 est passée de 10 à 100 µM, on n'observe qu'une légère augmentation de la capture de prothrombine par HD1 5'-T5, donc la différence de performance entre 100 µM et 10 µM pourrait être attribuée à une liaison non

spécifique de la prothrombine lorsque l'aptamère est déposé à la plus forte concentration. On peut supposer qu'à 100 μM concentration les molécules d'aptamère saturent la surface et se fixent à la surface de manière mixte: orientée (par amino-groupe) et non orientée (l'adsorption aléatoire), tandis que a 10 μM les aptamères pourraient présenter une accessibilité maximale des ligands en raison de la favorisation de l'immobilisation orientée et, donc, la diminution de l'encombrement stérique. Par conséquent, l'immobilisation des aptamères à la concentration la plus faible (10 μM) a été choisie pour les expériences suivantes.

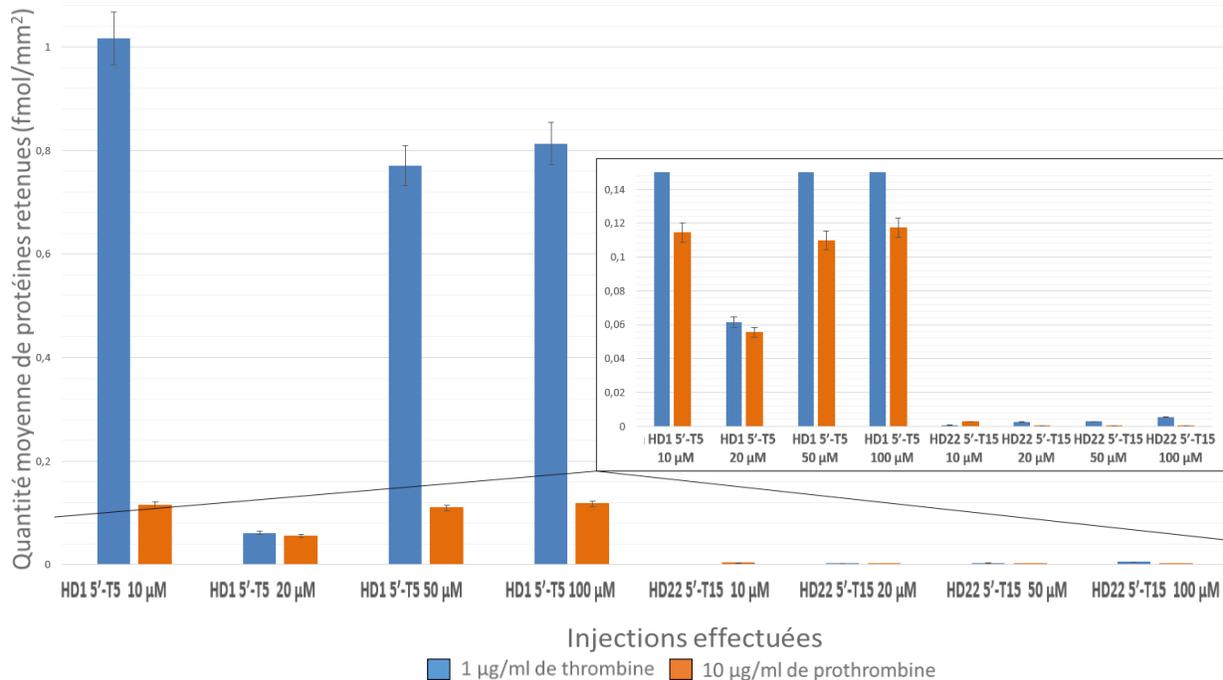


Figure V-6: Histogramme montrant la densité de surface moyenne des protéines retenues sur les sites d'aptamère anti thrombine (diluées dans du tampon TE) lors de l'injection de thrombine et de prothrombine dans du tampon de course PBS sans MgCl_2 et CaCl_2 . Les barres bleues correspondent à l'injection de thrombine 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ et les barres orange à l'injection de prothrombine 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. L'encadré montre un zoom sur la quantité moyenne de protéines retenues pour toutes les concentrations d'immobilisation des récepteurs HD1 5'-T5 et HD22 5'-T15.

V-2.2.3 Influence de la renaturation des aptamères HD1 et HD22 avant l'immobilisation sur la surface du biocapteur

Un mauvais repliement des aptamères pourrait altérer voire empêcher leurs interactions. C'est pourquoi, pour favoriser un repliement correct des aptamères, il a été décidé de procéder à leur renaturation. Cela consiste à chauffer les aptamères jusqu'à 90°C, avec ensuite un refroidissement lent en présence du tampon approprié. Cette méthodologie est appliquée en routine dans la littérature dans le but de déplier toute structure 3D préexistante qui pourrait interférer avec la liaison de la cible [293]. En parallèle, nous avons changé de fournisseur de thrombine: la protéine

de chez Sigma (MW 37,4 kDa) a été remplacée par celle de Cryopep (MW 36,7 kDa), et ce dernier a eu un effet positif sur la capture du ligand par HD22.

Les interactions des deux formes non renaturées (ou intactes) et renaturées de l'aptamère HD1 5'-T5 avec la prothrombine et la thrombine ont été suivies en SPRi (Figure V-7 A et B respectivement). Quelque soient les formes, nous observons que les variations de réflectivité sont environ deux fois plus intenses avec la thrombine qu'avec la prothrombine, et que les complexes formés sont plus stables avec la thrombine. Cependant, le complexes de la thrombine avec l'aptamère renaturé se dissocie beaucoup plus rapidement que celui formé avec HD1 5'-T5 non renaturées/intactes (comme le montre la baisse du niveau de réflectivité à la fin de la phase de dissociation sur la Figure V-7 B et l'historgramme de la quantité moyenne de ligand d'affinité retenu sur la Figure V-7 C).

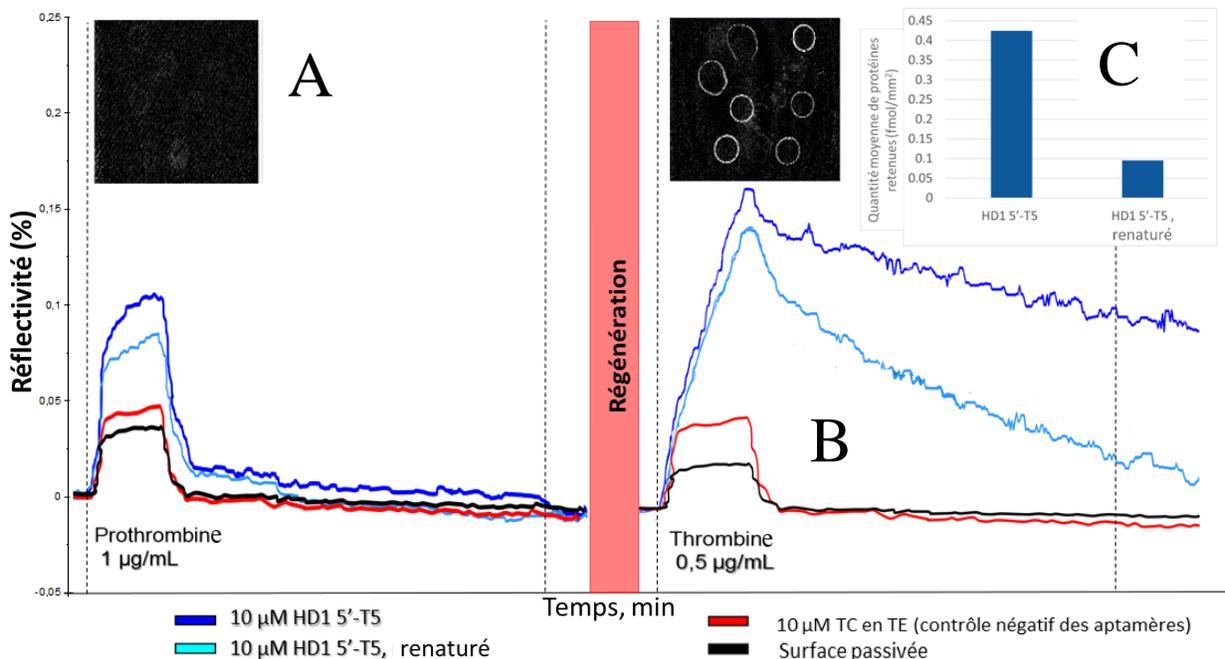


Figure V-7: Sensorgrammes SPRi obtenus à partir de microarray d'aptamère HD1 5'-T5 suite à des injections de solutions de prothrombine (A) et de thrombine (B) à des concentrations respectives de 1 µg/mL et 0,5 µg/mL dans un tampon de course PBS (sans sels divalents). La réponse de HD1 5'-T5 immobilisée en TE sans aucun traitement est illustrée en bleu foncé, la réponse de HD1 5'-T5 immobilisée après dénaturation et repliement en TE est illustrée en bleu clair, le contrôle négatif et la surface passivée correspondent respectivement aux courbes rouge et noire. L'image de différence de la cellule SPRi pendant chaque injection est présentée en haut de chaque sensorgramme. (C) L'encadré montre l'historgramme de la quantité moyenne de thrombine capturée par affinité sur les sites d'aptamères HD1 5'-T5 après une injection de 0,5 µg/mL de thrombine.

Concernant HD22 5'-T15, aucune interaction avec la prothrombine n'a été observée avec les deux formes non renaturées et renaturées de l'aptamère, comme attendu (Figure V-8 A). La seule interaction observée a été celle de HD22 5'-T15 non renaturée avec la thrombine

(Figure V-8 B). Néanmoins, presque aucun ligand n'a été retenu par affinité sur la surface après la phase de dissociation (Figure V-8 B et C). Aucune capture de ligand n'a été observée sur les sites de contrôle pendant les injections de prothrombine et de thrombine (Figure V-8).

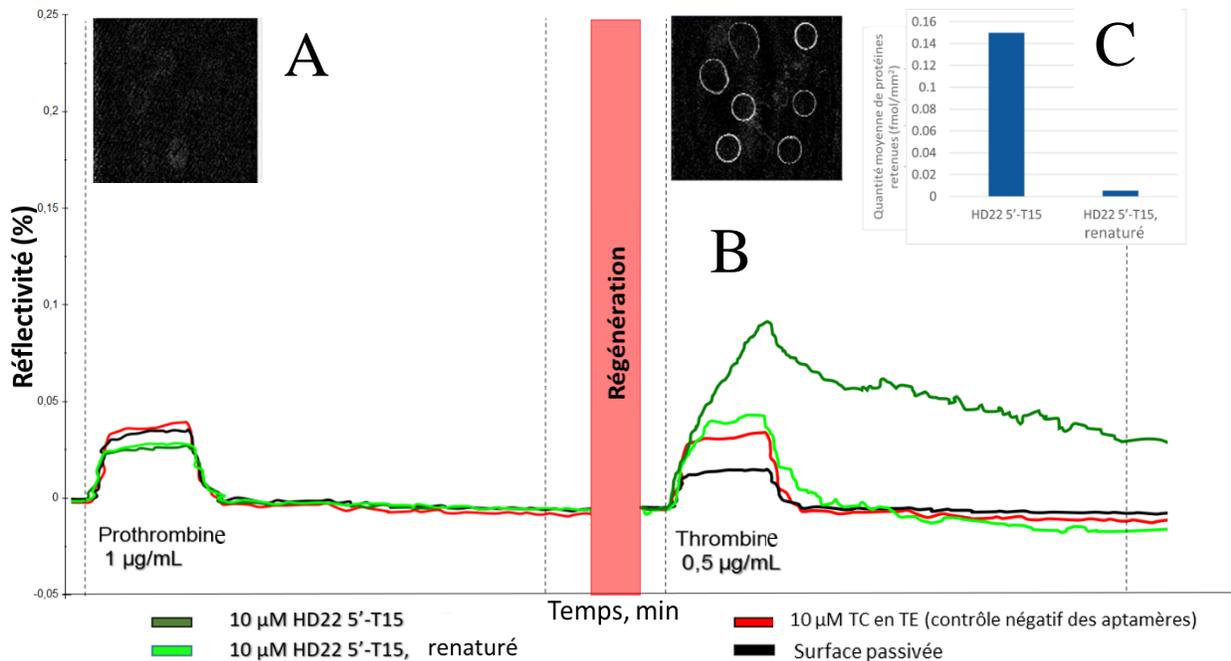


Figure V-8: Sensorgrammes SPRi obtenus à partir de microarray d'aptamère HD22 5'-T15 suite à des injections de prothrombine (A) et de thrombine (B) à des concentrations respectives de 1 µg/mL et 0,5 µg/mL dans le tampon de course PBS (sans sels divalents). La réponse de HD22 5'-T15 immobilisé en TE sans aucun traitement est illustrée en vert foncé, HD22 5'-T15 immobilisé après dénaturation et repliement en TE est illustré en vert clair, le contrôle négatif et la surface passivée correspondent respectivement aux courbes rouge et noire. L'image de différence de la cellule SPRi pendant chaque injection est présentée en haut de chaque sensorgramme. (C) L'encadré montre l'histogramme de la quantité moyenne de thrombine capturée par affinité sur les sites d'aptamères HD22 5'-T15 après une injection de 0,5 µg/mL de thrombine.

Les résultats obtenus suggèrent que dans nos conditions expérimentales, la renaturation des aptamères n'apporte aucune amélioration de leurs performances. Le HD22 5'-T15 non renaturé peut adopter la bonne conformation 3D en présence de la thrombine Cryopep, mais le complexe n'est pas stable dans le tampon de course PBS. Il est à rappeler que ce dernier ne contient pas de cations divalents. L'ajout de Ca^{2+} ou de Mg^{2+} pourrait peut-être améliorer cette stabilité. Pendant la phase de dissociation, lorsque le tampon contenant le ligand est progressivement remplacé par du tampon de course PBS pur et que la concentration de la thrombine diminue, le complexe thrombine-aptamère formé pourrait se dissocier en raison de l'instabilité de la conformation adoptée en l'absence du ligand (Figure V-8 B). Compte tenu de l'amélioration des performances de l'aptamère HD22 avec la nouvelle source de thrombine, seule la thrombine du fournisseur Cryopep (36,7 kDa) sera utilisée pour les expériences ultérieures.

V-2.2.4 Influence du greffage orienté 5' ou 3' de l'aptamère de thrombine avec linker T10

Afin d'étudier l'effet de la position 5' ou 3' du linker et donc de l'orientation de l'aptamère HD1 à la surface, deux aptamères ont été sélectionnés portant chacun un linker T10: HD1 5'-T10 et HD1 3'-T10. Les deux aptamères ont été immobilisés à une concentration de 10 μM dans le tampon TE sur une monocouche PEO-NHS. Les expériences ont été réalisées comme décrit précédemment, avec des injections de thrombine et de prothrombine dans le tampon de course PBS (sans sels divalents), systématiquement suivies d'injections de solution de régénération.

La Figure V-9 montre les sensorgrammes SPRi résultant de deux injections consécutives de thrombine à 1 $\mu\text{g/mL}$. Une première observation est que l'immobilisation avec le linker T10 en position 3' permet la liaison de la thrombine avec HD1, alors que l'immobilisation du côté 5' ne le permet pas. Ainsi, on peut en déduire que non seulement la position du linker mais aussi sa longueur sont deux paramètres importants. On peut suggérer que la longueur de linker pour chaque extrémité devrait être adaptée aux conditions expérimentales, car probablement l'immobilisation par l'extrémité 5' (avec linker T10) interfère avec capacité de HD1 à lier la thrombine tandis que la modification de 3' améliore la stabilité structurelle et sa capture de ligand.

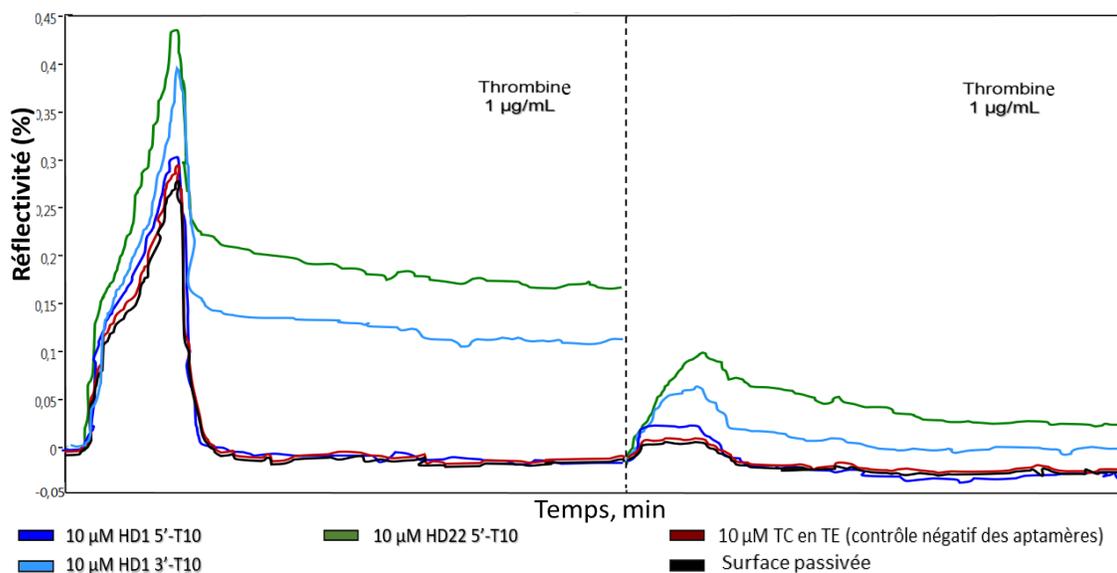


Figure V-9: Sensorgrammes SPRi obtenus à partir de microarray d'aptamères anti thrombine suite à des injections de solutions de thrombine à une concentration de 1 $\mu\text{g/mL}$ dans le tampon de course PBS (sans CaCl_2 et MgCl_2). La figure contient deux parties correspondant à 2 injections consécutives de thrombine, sans régénération de surface entre les deux. L'impact de l'orientation de l'immobilisation des aptamères a été étudié: HD1 5'-T10 est représenté en bleu foncé et HD1 3'-T10 en bleu clair, le contrôle négatif et la surface passivée sont respectivement des courbes marron et noire.

Dans cette série d'expériences, les deux injections successives de 1 $\mu\text{g/mL}$ de thrombine ont été effectuées sans injection de solution de régénération entre les deux (Figure V-9). Les résultats obtenus montrent que le microarray d'aptamères est déjà assez saturé dès la première injection de thrombine 1 $\mu\text{g/mL}$, car les injections suivantes conduisent à une capture par affinité

bien inférieure (la variation de réflectivité maximale est environ trois fois inférieure à celle observée à la première injection). Par conséquent, pour les expériences ultérieures, les concentrations maximales utilisées pour les injections de thrombine ont été, soit 0,5, soit 1 $\mu\text{g/mL}$ (13,5 ou 27 nM respectivement) de protéine purifiée.

V-2.2.5 Influence de la longueur du linker T5, T10, T15

Quelques indications sur l'effet de la longueur du linker peuvent être déduites des précédentes expériences. La comparaison des résultats obtenus à partir de HD1 5'-T5, avec ceux des HD1 5'-T10 (Figure V-10), montre encore que la longueur du linker peuvent changer radicalement les performances des aptamères. Ainsi, alors que la seule différence entre les séquences HD1 modifiées en 5' est la longueur du T-linker (T5 ou T10), HD1 5'-T5 a réussi à retenir la thrombine, tandis que HD1 5'-T10 n'a interagi avec aucun ligand.

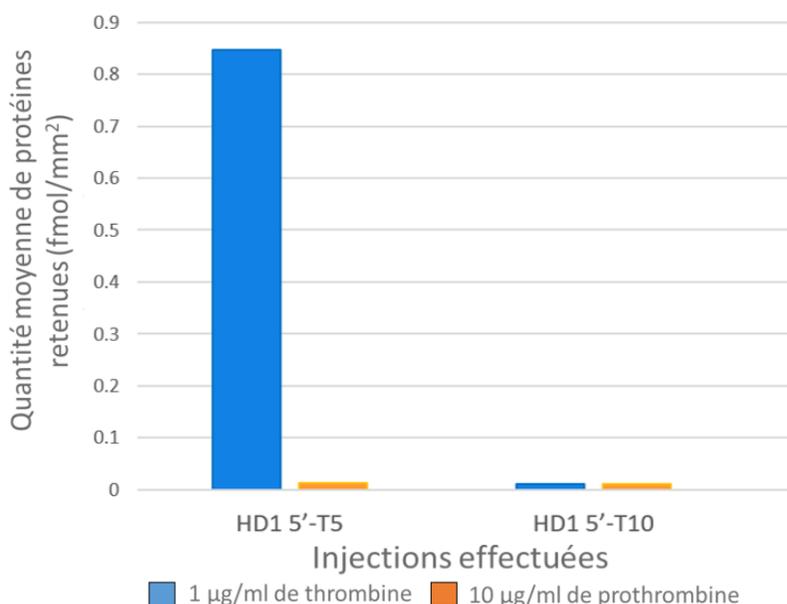


Figure V-10: Histogramme de la quantité moyenne de ligand capturé par affinité sur les sites des aptamères HD1 5'-T5 et HD1 5'-T10 après l'injection de 1 $\mu\text{g/mL}$ de thrombine (barres bleues) et de prothrombine (barres orange) dans le tampon de course PBS sans CaCl_2 et MgCl_2 .

Concernant l'aptamère HD22, la fonctionnalisation en 5' du linker T10 conduit à un aptamère pleinement fonctionnel car il a été capable de reconnaître et de capturer avec succès la thrombine à la surface de la biopuce, contrairement à la séquence HD22 5'-T15 précédemment utilisée qui a pu reconnaître le ligand, mais le complexe HD22-thrombine créé n'était pas stable (Figure V-11). Il est important de noter que les expériences ont été réalisées sur différentes biopuces. La quantité de thrombine retenue par affinité avec HD22 5'-T10 est même plus élevée qu'avec HD1 5'-T5 utilisé comme référence depuis le début.

Les résultats obtenus montrent que l'efficacité de capture de la cible n'est pas en corrélation directe avec la longueur du linker. En fonction de l'aptamère, la longueur idéale du linker dépend

aussi de sa position 5' ou 3', probablement afin de permettre le repliement 3D adéquat qui autorise la reconnaissance de la thrombine dans les conditions expérimentales spécifiques.

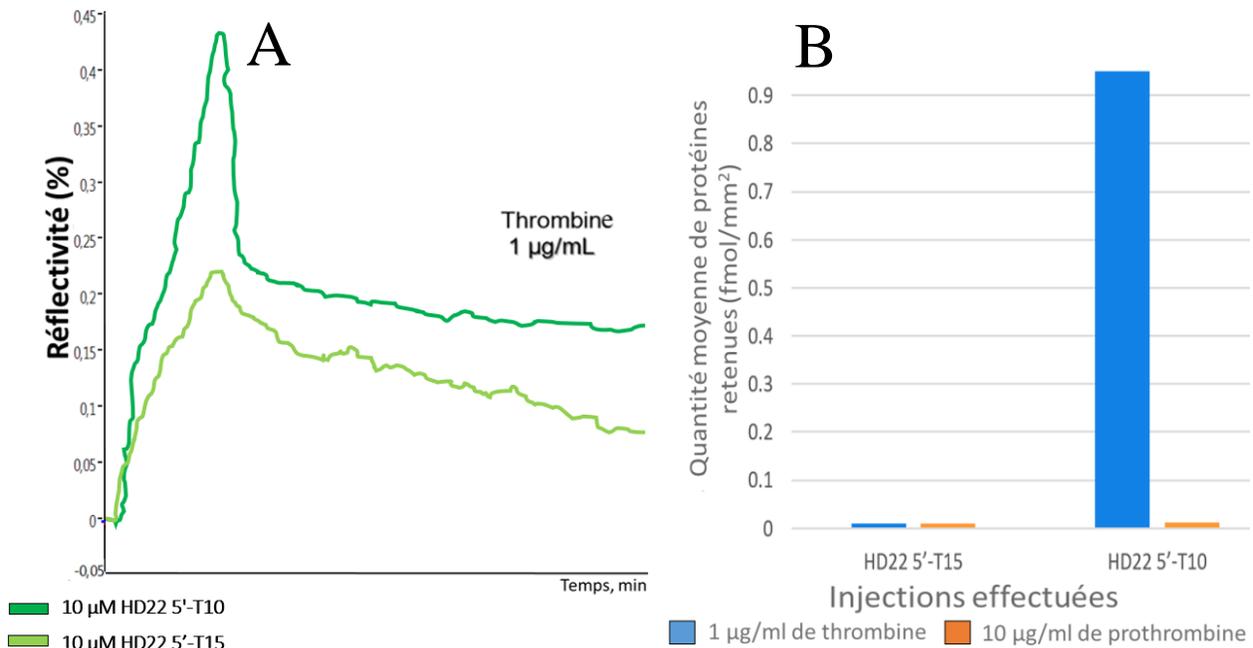


Figure V-11: (A) Sensorgrammes SPRi obtenus à partir de microarray d'aptamères anti thrombine suite à des injections de solutions de thrombine à une concentration de 1 µg/mL dans le tampon de course PBS (sans CaCl₂ et MgCl₂). L'impact de la longueur du T-linker des aptamères HD22 a été étudié: HD22 5'-T10 est représenté en vert foncé et HD22 5'-T15 en vert clair. (B) Histogramme de la quantité moyenne du ligand capturé par affinité sur les sites des aptamères HD22 5'-T15 et HD22 5'-T10 après 1 injection de 1 µg/mL de thrombine (barres bleues) et de prothrombine (barres orange) dans le tampon de course PBS sans CaCl₂ et MgCl₂. Les expériences ont été réalisées sur différentes biopuces.

V-2.2.6 Conclusions sur les conditions expérimentales SPRi pour les aptamères de la thrombine HD1 et HD22

Dans la section V-2.2., l'effet de diverses conditions expérimentales sur la détection SPRi de la thrombine et de la prothrombine par les aptamères HD1 et HD22 a été étudié. Tout d'abord, l'influence des conditions d'immobilisation des aptamères sur la reconnaissance et la capture des ligands a été analysée. Il a été constaté que pour les deux aptamères, l'immobilisation dans le tampon de stockage TE plutôt que dans le tampon de course PBS (sans ajout de sels divalents) était plus favorable pour l'interaction avec la thrombine. L'effet de la concentration des aptamères lors du greffage sur la surface de la biopuce a également été évalué, au travers de la réponse de l'aptamère HD1 vis-à-vis des deux protéines thrombine et prothrombine. Pour ces deux protéines, la concentration optimale d'aptamère est la plus faible utilisée soit 10 µM. Cela peut s'expliquer par la diminution de l'encombrement stérique, qui peut alors permettre plus facilement le correct repliement des aptamères, et par conséquent la capture du ligand lors de l'injection de thrombine et de prothrombine [298].

Dans toutes les expériences, HD1 a démontré une plus grande affinité pour la thrombine que pour la prothrombine, ce qui est en accord avec les données existantes démontrant que HD1 reconnaît principalement l'exosite I et que ce dernier est très peu exposé à la surface de la prothrombine.

Il a été observé au début, que HD22 5'-T15, était incapable de reconnaître et de capturer ni la thrombine ni la prothrombine. L'absence d'interactions avec la prothrombine était attendu puisque l'exosite II reconnu spécifiquement par HD22 n'est pas exposé à la surface de la prothrombine. Cependant, l'absence de reconnaissance de la thrombine est surprenante et pourrait s'expliquer par le repliement incorrect de l'aptamère après (ou avant) immobilisation à la surface du capteur. Par conséquent, afin d'induire un repliement 3D correct, la renaturation des aptamères a été effectuée avant le greffage sur la surface. Aucune amélioration de la capture de ligand n'a été observée avec ces aptamères renaturés. Dans le même temps, le changement de fournisseur de thrombine (de Sigma à Cryopep) a eu un effet positif sur les performances de HD22 5'-T15. L'aptamère HD22 5'-T15 non renaturé a pu reconnaître et lier la thrombine (tout comme le même aptamère renaturé), cependant le complexe formé n'était pas stable dans le tampon de course PBS sans ajout de sels divalents. Ainsi, on peut suggérer que soit le repliement correct de HD22 5'-T15 est induit par le ligand dans nos conditions expérimentales, soit la thrombine de Sigma avait une accessibilité moindre de l'exosite II, ce qui a entravé sa reconnaissance par HD22. Compte tenu de ces résultats, seule la thrombine de Cryopep a été utilisée pour les autres expériences. La renaturation des aptamères HD1 5'-T5 (effectuée en parallèle) a produit le même effet - les difficultés de reconnaissance et de capture des protéines.

Des expériences de renaturation des aptamères avant leur dépôt sur la biopuce ont également été réalisées avec des aptamères avec un linker T10. Aucun effet positif sur la reconnaissance et la capture du ligand par des aptamères n'a été observé (données non présentées), comme les résultats obtenus avec HD1 5'-T5 et HD22 5'-T15. Certains oligonucléotides formant des quadruplex produisent des mélanges de structures lorsqu'ils sont chauffés à 80-90 °C puis lentement refroidis, à l'exception des aptamères de thrombine, qui ont tendance à produire une seule conformation, ce qui signifie que les aptamères renaturés devraient retrouver leur configuration fonctionnelle une fois refroidis [293], [299]. Ainsi, la diminution de la performance des aptamères anti thrombine après chauffage peut être causée par la destruction partielle des aptamères.

La longueur du linker polyT, tout comme le choix de l'extrémité 5' ou 3' pour ce linker qui permet l'immobilisation, ont également influencé de manière drastique la performance mesurée par SPRi des aptamères anti thrombine. L'influence de la position 5' ou 3' du linker à base de thymine sur les performances de HD1 a été étudiée. Pour une comparaison rigoureuse, les aptamères HD1 5'-T10 et HD1 3'-T10 avec un linker de longueur identique T10 ont été choisis. L'immobilisation par l'extrémité 3' par rapport à 5', a été plus favorable pour HD1 ce qui pourrait être lié à plus grande stabilité structurale de l'aptamère dans une conformation qui permet la reconnaissance du ligand. L'absence de reconnaissance et de capture de la thrombine par

HD1 5'-T10, alors que HD1 5'-T5 était pleinement fonctionnel, montre également l'importance de la longueur du linker.

L'influence de la longueur du linker polyT sur les performances de HD22 a également été étudié. A des fins de comparaison, l'immobilisation via 5' a été sélectionnée, les deux aptamères HD22 5'-T15 et HD22 5'-T10 ont donc été utilisés pour les expériences. HD22 a été capable de reconnaître et de capturer avec succès la thrombine dans le tampon de course PBS (sans sels divalents) lorsque relié au linker T10 mais a perdu cette capacité avec un linker T15. Il y a donc une longueur optimale du linker propre à chaque aptamère et dépendant de la position 3' ou 5'. De plus, la quantité plus importante de thrombine retenue par affinité sur le site de HD22 5'-T10 par rapport à HD1 5'-T5, confirme les données rapportant une stabilité supérieure des complexes HD22-thrombine par rapport aux complexes HD1-thrombine [170], [280].

En tenant compte de ces résultats, trois aptamères ont été sélectionnés pour la suite des travaux de développement de microarrays aptamères en vue du couplage SPRi-MS: HD1 5'-T5, HD1 3'-T10 et HD22 5'-T10 qui ont démontré les meilleures performances. Ces aptamères utilisés sans renaturation préalable ont été greffés sur la surface du biocapteur à une concentration de 10 μ M dans un tampon TE.

V-2.3 Évaluation de l'aptadimer HD1-22

Deux fragments des différents anticorps (reliés entre eux par un linker polypeptidique) qui reconnaissent simultanément des épitopes adjacents, mais non chevauchants, avec une affinité plus élevée que les anticorps spécifiques à un seul épitope, ont été élaborés il y a plus de 20 ans [300], [301]. La fusion de deux anticorps peut en effet abaisser la valeur K_D lors de la liaison simultanée de deux sites de reconnaissance de la même cible en raison d'une augmentation de la constante d'association k_{on} et d'une diminution de la valeur dissociation k_{off} .

Le même concept a ensuite été appliquée aux aptamères par différents groupes de recherche qui ont essayé d'améliorer l'affinité des aptamères par dimérisation [278], [279]. La stratégie principale utilise deux aptamères oligonucléotidiques fonctionnellement distincts, qui ciblent différents sous-domaines protéiques de la même protéine. L'approche choisie s'est appuyée sur un modèle, celui de l'assemblage des aptamères HD1 et HD22 en un aptadimère ciblant les deux exosites distincts de la thrombine.

Les premiers aptadimères de fusion, développés contre la thrombine, ont été signalés et caractérisés par Muller *et al.* [278], [280], [302]. Le but initial de leur étude était d'améliorer l'activité inhibitrice. L'affinité globale de l'aptamère de fusion divalent HD1-22 5'-T10 pour l' α -thrombine humaine, a été multipliée par dix et quatre environ, par rapport à celles des aptamères précurseurs monovalents HD1 et HD22 respectivement. Le groupe de Hasegawa *et al.*, travaillant sur l'amélioration des performances des aptamères se liant à la thrombine grâce à la dimérisation de HD1 et de HD22, a également rapporté une augmentation (une valeur K_D subnanomolaire) des affinités globales de cet aptamère de fusion [279]. Le groupe de Muller a utilisé deux différents linkers polyA (A5 et A15), tandis que le groupe de Hasegawa a utilisé différents polyT (T0, T5,

T10 et T20). L'aptamère de fusion qui comprend le linker A5 a révélé des valeurs de K_D similaires à celles de l'aptamère de fusion contenant A15 [278]. L'étude de l'impact de la longueur des linkers polyT par le groupe de Hasegawa a révélé qu'à partir de T5, la valeur K_D devient subnanomolaire et que les affinités des aptamères de fusion divalents étaient proches pour T5, T10 et T20.

Dans ce travail, la sélection de la longueur optimale du linker interne pour l'aptamère de fusion divalent a été basée sur les calculs de Trapaidze [169]. Ces calculs sont basés sur la juxtaposition des modèles structuraux de HD1 (structure 4DII déposées dans la PDB) et HD22 (structure 4I7Y) avec celui de la thrombine au regard de leurs sites de liaison exosites 1 et 2, puis la distance linéaire entre les extrémités des aptamères a été mesurée (environ 7,3 nm, Figure V-12 A). La longueur de linker requise a été estimée à 9-10 nm minimum, pour tenir compte du contournement de la thrombine ($\varnothing = 4,2$ nm). Ainsi, sur la base de la taille de nucléotides d'environ 0,67 nm, cette longueur du linker correspond à 15 nucléotides (Figure V-12 B). Un linker T15 a donc été utilisé pour relier les deux aptamères HD1 et HD22 dans ce travail de thèse. Un polyT au lieu du polyA a été choisi pour la connexion de ces aptamères à la fois pour favoriser une plus grande affinité de l'aptadimère selon les données de la littérature, et pour prévenir les interactions polyA-polyT avec les linkers polyT présents aux extrémités, qui peuvent entraver le bon fonctionnement de l'aptadimère.

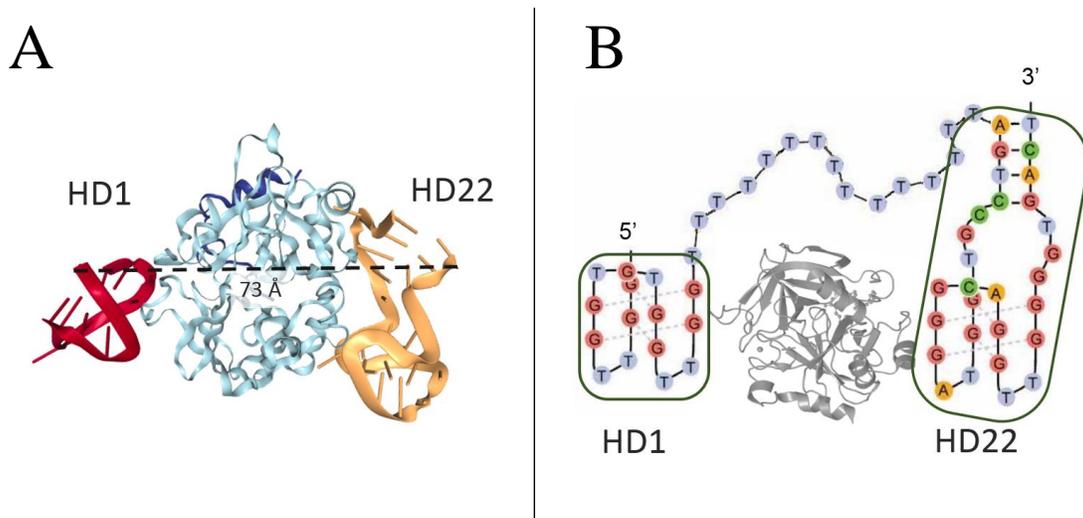


Figure V-12: Représentation schématique de HD1-22, l'aptadimère bivalent de fusion anti thrombine. (A) Structure moléculaire du complexe aptamère-thrombine-aptamère avec HD1 en rouge, HD22 en jaune (5EW2). (B) Aptamère HD1-22 avec le linker interne T15 représenté autour de la molécule de thrombine (3U69).

Il faut noter que tous les aptadimères décrits dans la littérature ont été immobilisés sur des biopuces de streptavidine par l'intermédiaire du groupe fonctionnel biotine fixé à l'extrémité 5', sans aucun linker polyT ou polyA supplémentaire inclus entre la biotine et l'extrémité de l'aptamère. Comme tous les aptamères anti thrombine utilisés dans ce projet ont été immobilisés sur des SAM PEO-NHS via un linker polyT à l'extrémité 5' ou 3' (HD22 via l'extrémité 5' et HD1

via l'extrémité 5' et 3'), nous avons conçu un aptadimère avec un linker polyT (T10) à l'extrémité 5' et un polyT (T15) reliant les deux séquences monovalentes de l'aptamère - **HD1-22 5'-T10**.

J'ai comparé les performances de l'aptadimère aux précurseurs monovalents, parmi ceux des aptamères ayant montré les meilleurs résultats SPRi dans nos conditions expérimentales et qui portent un linker polyT de même longueur: HD1 3'-T10 et HD22 5'-T10. Ces aptamères, ainsi que l'aptamère TC (contrôle négatif), ont été immobilisés à une concentration de 10 μM , tandis que l'aptamère de fusion HD1-22 5'-T10 a été immobilisé à des concentrations de 10 et 20 μM dans le tampon de stockage TE sur la surface PEO-NHS. Les interactions des aptadimères avec leur cible ont été évaluées en injectant différentes concentrations de thrombine (Figure V-13) et de prothrombine (Figure V-14) purifiées dans le tampon de course PBS (sans ajout de sels divalents).

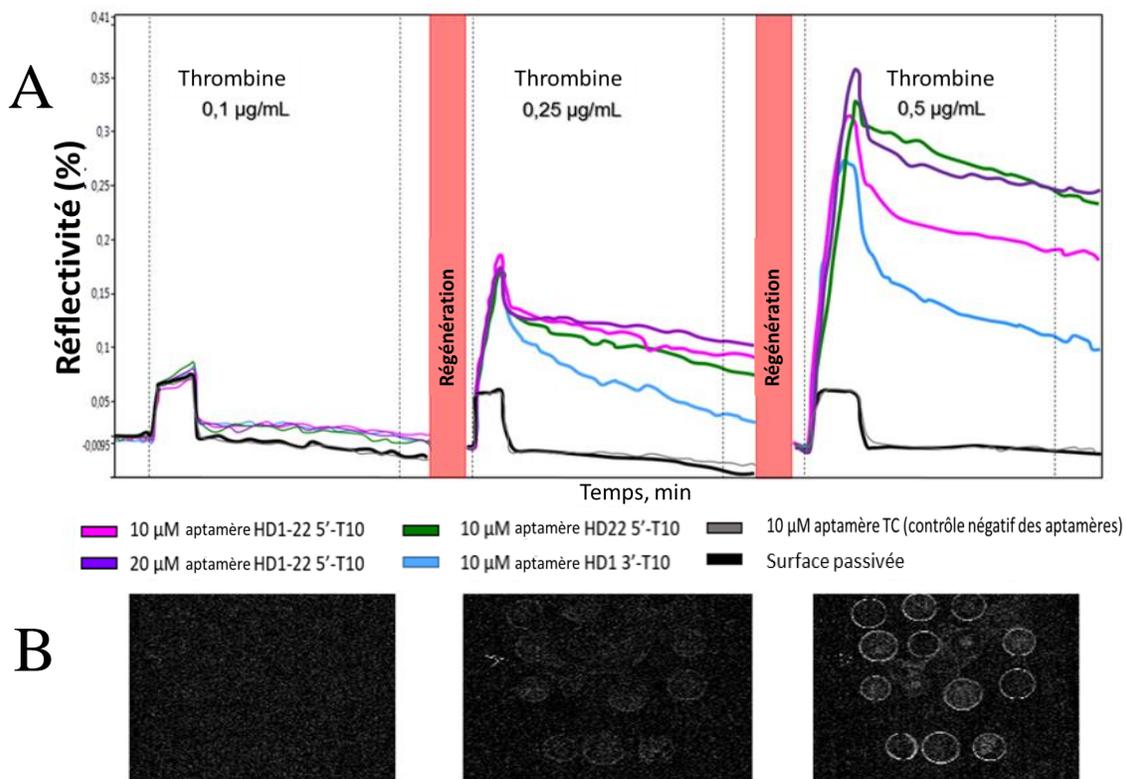


Figure V-13: (A) Sensorgrammes SPRi obtenus à partir d'un microarray d'aptamères anti thrombine suite à des injections de thrombine en solution à différentes concentrations dans un tampon de course PBS sans sels divalents. HD22 5'-T10 est représenté en vert, HD1 3'-T10 en bleu et HD1-22 5'-T10 aptamère bivalent fusionné immobilisé à 10 et 20 μM concentration en couleurs magenta et violette respectivement. (B) Images différence de la cellule SPRi obtenues lors de chaque injection de thrombine.

La liaison de la thrombine aux récepteurs immobilisés a été testée sur une gamme de concentrations de 0,025 à 1 $\mu\text{g/mL}$ de thrombine (Figure V-13 A). La limite de détection de la thrombine par l'aptadimère dans les conditions expérimentales décrites ci-dessus a été évaluée à environ 0,1 $\mu\text{g/mL}$ (% des changements de réflectivité après la phase de dissociation $\geq 0,02$). L'efficacité globale de capture de la thrombine par l'aptadimère HD1-22 5'-T10 est égale ou

supérieure à celle des aptamères monovalents HD22 5'-T10 et HD1 3'-T10 (Figure V-13 A). La quantité de ligand retenu est presque deux fois plus élevée pour HD1-22 5'-T10 que pour HD1 3'-T10. Par rapport à HD22 5'-T10, ce facteur de proportion est plus important pour les faibles concentrations de thrombine et presque inexistant pour les concentrations égales ou supérieures à 0,5 µg/mL (13,5 nM). On peut également déduire de la Figure V-13 A, que HD1-22 5'-T10 donne de meilleurs résultats lorsqu'il est déposé à 20 µM plutôt qu'à 10 µM, à la différence des aptamères monovalents (comme vu précédemment, Figure V-6).

À l'image de HD22 5'-T10 [280], [302], l'aptadimère HD1-22 5'-T10 ne montre aucune interaction avec la prothrombine (Figure V-14). L'interaction de HD1 3'-T10 avec la prothrombine montre une dynamique d'association/dissociation très rapide. Par conséquent, les deux aptamères HD1-22 5'-T10 et HD22 5'-T10 peuvent être considérés comme des aptamères spécifiques de la thrombine.

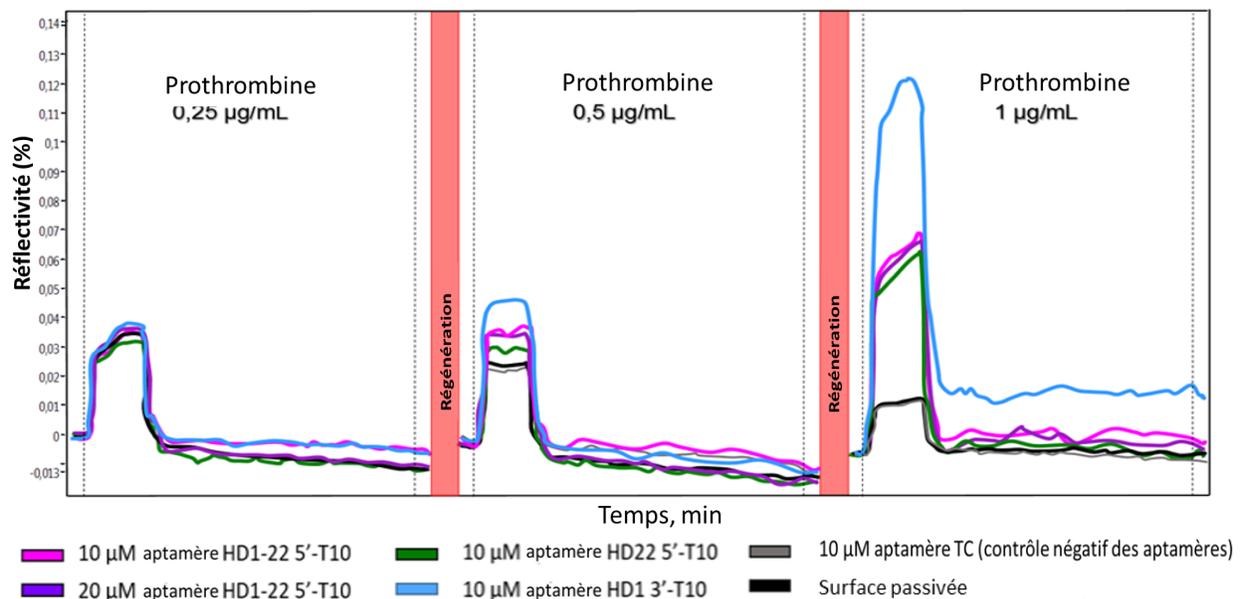


Figure V-14: Sensorgrammes SPRi obtenus à partir d'un microarray d'aptamères anti thrombine suite à des injections de solution de prothrombine commerciale purifiée à différentes concentrations dans un tampon de course PBS sans sels divalents. HD22 5'-T10 est représenté en vert, HD1 3'-T10 en bleu et HD122 5'-T10 aptamère bivalent fusionné immobilisé à 10 et 20 µM concentration en couleurs magenta et violette respectivement.

À la différence des données de la littérature qui indiquent des affinités des aptadimères deux à dix fois supérieures pour la thrombine comparées aux aptamères monovalents HD22 et HD1, une telle différence d'affinité n'a pas été observée avec notre aptadimère HD1-22 5'-T10. La quasi absence de différences de cinétique d'interaction avec la thrombine entre HD22 5'-T10 et HD1-22 5'-T10 observées au cours de l'expérience SPRi suggèrent que les conditions expérimentales n'étaient pas optimales pour HD1-22 5'-T10. Il est probable qu'en ajoutant des ions divalents (1mM de MgCl₂ et CaCl₂) dans le tampon de course SPRi, les performances de

HD1-22 pourraient se rapprocher de celles rapportées dans la littérature. Malheureusement, ces expériences avec l'aptadimère bivalent HD1-22 en ajoutant des sels divalents au tampon PBS n'ont pas pu être réalisées par manque de temps.

V-2.4 Couplage avec la détection par MALDI MS et imagerie MS des biopuces à aptamères

Toutes les surfaces de biopuces à aptamères ont été systématiquement interrogées par MALDI-TOF MSi après le suivi cinétique des interactions par SPRi. Pour le couplage avec la MS, l'injection du ligand thrombine (0,5 ou 1 µg/mL dans le tampon de course PBS) lors de l'étape SPRi a été suivie d'un rinçage de la surface des biopuces non pas avec le tampon de régénération mais avec le tampon de course, afin de maintenir le ligand sur les récepteurs aptamères. Puis les biopuces ont été rincées avec de l'eau ultrapure afin d'éliminer les sels, puis séchées avec de l'air, avant le dépôt de la matrice HABA. La matrice a été appliquée manuellement sur chaque site d'interaction de la biopuce (méthode de dépôt de matrice de type "gouttelette sèche"), ainsi que sur certaines portions de surface passivée (surface contrôle).

Les biopuces ont été ensuite analysées par imagerie MALDI-TOF. Toutes les régions d'intérêt (ROIs) couvertes par la matrice ont été balayées automatiquement par le laser, et les spectres de masse obtenus à partir de chacune des ROIs ont été moyennés afin de produire un seul spectre de masse pour chaque ROI. Le résultat est constitué d'une distribution 2D de l'intensité d'une sélection d'ions (filtre de masse m/z) superposée à la photo de la surface de la biopuce, et des spectres de masse de chaque ROI. Il faut noter qu'outre cette analyse automatisée, une analyse MS manuelle des ROIs a été également effectuée: les signaux obtenus ont été similaires à ceux produits par l'analyse automatisée et systématique par MSi.

V-2.4.1 Analyse des biopuces à aptamères HD1 et HD22 par imagerie MALDI-TOF

Les surfaces de biopuces avec les deux types d'aptamères HD1 (HD1 5'-T5, HD1 5'-T10, HD1 3'-T10) et HD22 (HD22 5'-T15, HD22 5'-T10) ont été imagées par imagerie MALDI-TOF.

Les spectres de masse à partir des biopuces à aptamère HD1 ayant démontré des interactions avec la thrombine par SPRi indiquent tous la détection de cette protéine sur les ROIs. Ainsi les spectres de masse obtenus à partir de HD1 5'-T5 présentent deux pics, l'un à m/z 17568 $[M+2H]^{2+}$ et l'autre à m/z 35982 $[M+H]^+$, qui correspondent aux ions thrombine doublement et simplement chargés (Figure V-15 A). Par ailleurs, les spectres de masse obtenus à partir des sites d'aptamère HD1 3'-T10 montrent systématiquement un seul pic à m/z 35982 $[M+H]^+$ correspondant à l'ion ligand monochargé (Figure V-15 B). La détection de deux états de charges de la thrombine indique vraisemblablement une quantité de thrombine capturée sensiblement supérieure, ce qui pourrait traduire une plus grande efficacité de capture de ligand à partir de HD1 5'-T5, comparé à HD1 3'-T10 lors de l'expérience SPRi dans le tampon PBS (sans sels divalents).

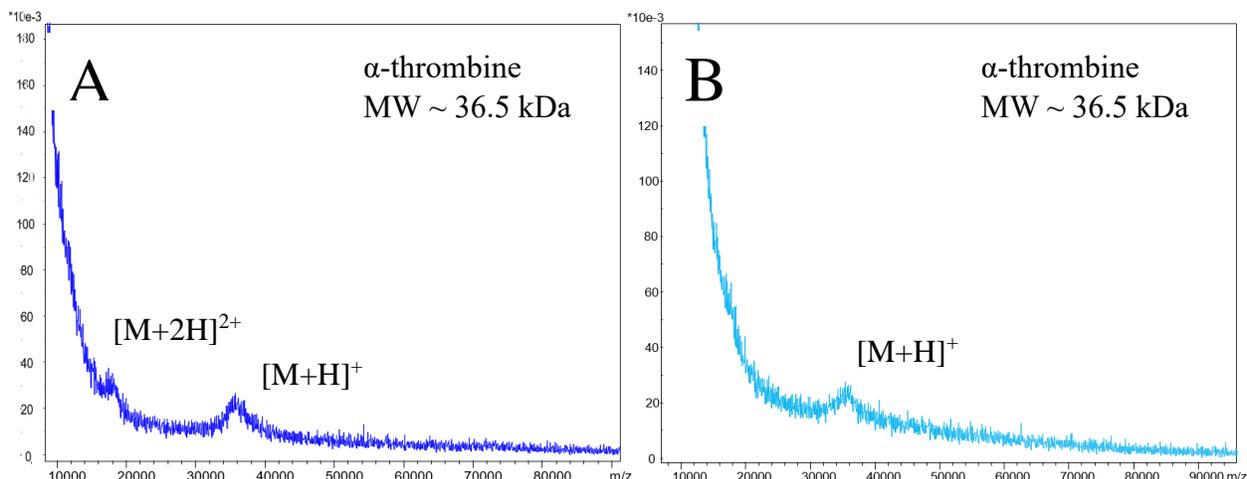


Figure V-15: Résultats MSi MALDI-TOF obtenus après l'expérience SPRi (tampon de course PBS, sans sels divalents) directement à partir de la surface de microarray d'aptamères anti thrombine immobilisés sur la chimie PEO-NHS. (A) Spectre de masse typique obtenu à partir de sites HD1 5'-T5 et (B) spectre de masse typique obtenu à partir de sites HD1 3'-T10. Chaque spectre de masse représenté est la moyenne des spectres de masse obtenus à partir de la ROI.

La biopuce à aptamère HD1 5'-T10 qui n'a démontré aucune interaction par SPRi conduit à des spectres de masse ne montrant aucune détection de la thrombine à la surface des ROIs (Figure V-16 A). Les différents spectres de masse enregistrés à partir des sites de contrôle étaient également en accord l'absence de détection par SPRi - aucun pic d'ion protéique n'a été détecté par MS (Figure V-16 B), ce qui confirme une bonne spécificité des aptamères HD1 5'-T5 et HD1 3'-T10 se liant à la thrombine, et que la passivation de la surface du capteur a réussi.

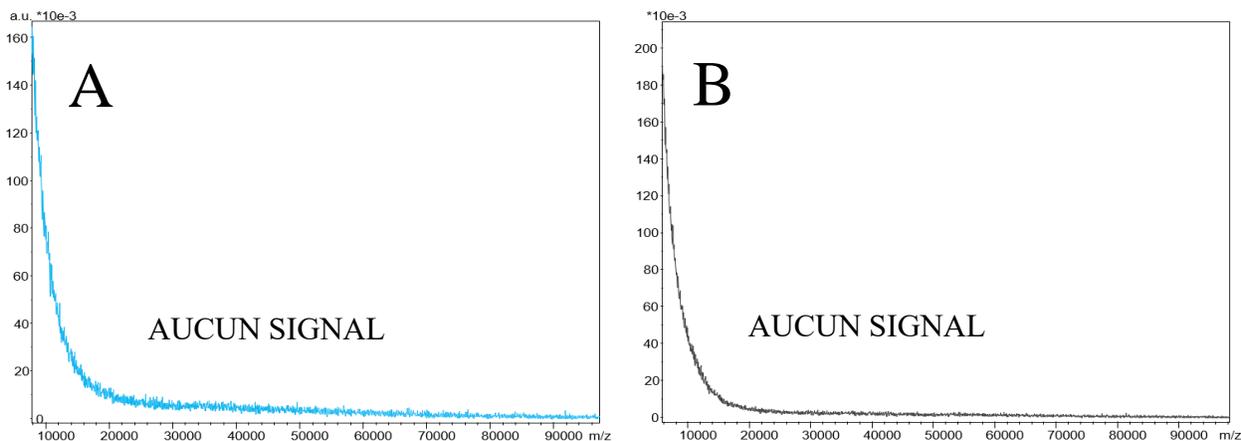


Figure V-16: Résultats MSi MALDI-TOF obtenus après l'expérience SPRi (tampon de course PBS, sans sels divalents) directement à partir de la surface de microarray des aptamères anti thrombine immobilisés sur une SAM PEO-NHS. (A) Spectre de masse typique obtenu à partir de sites HD1 5'-T10 et (B) spectre de masse typique obtenu à partir de sites TC (contrôle négatif). Chaque spectre de masse représenté est la moyenne des spectres de masse obtenus à partir de la ROI.

Concernant les spectres de masse à partir des biopuces à aptamère HD22, seule la biopuce HD22 5'-T10 avait démontré des interactions avec la thrombine par SPRi. En accord avec ce résultat, le spectre de masse obtenu à partir de cette biopuce montre les ions spécifiques de la thrombine à m/z 17568 $[M+2H]^{2+}$ et 35982 $[M+H]^+$ (Figure V-17 B). Ce spectre est similaire à celui obtenu avec la biopuce HD1 5'-T5 (Figure V-17 A). Comme attendu, aucun signal n'a été détecté à partir de la région où l'aptamère HD22 5'-T15 est immobilisé et où aucune interaction n'a été observée par SPRi.

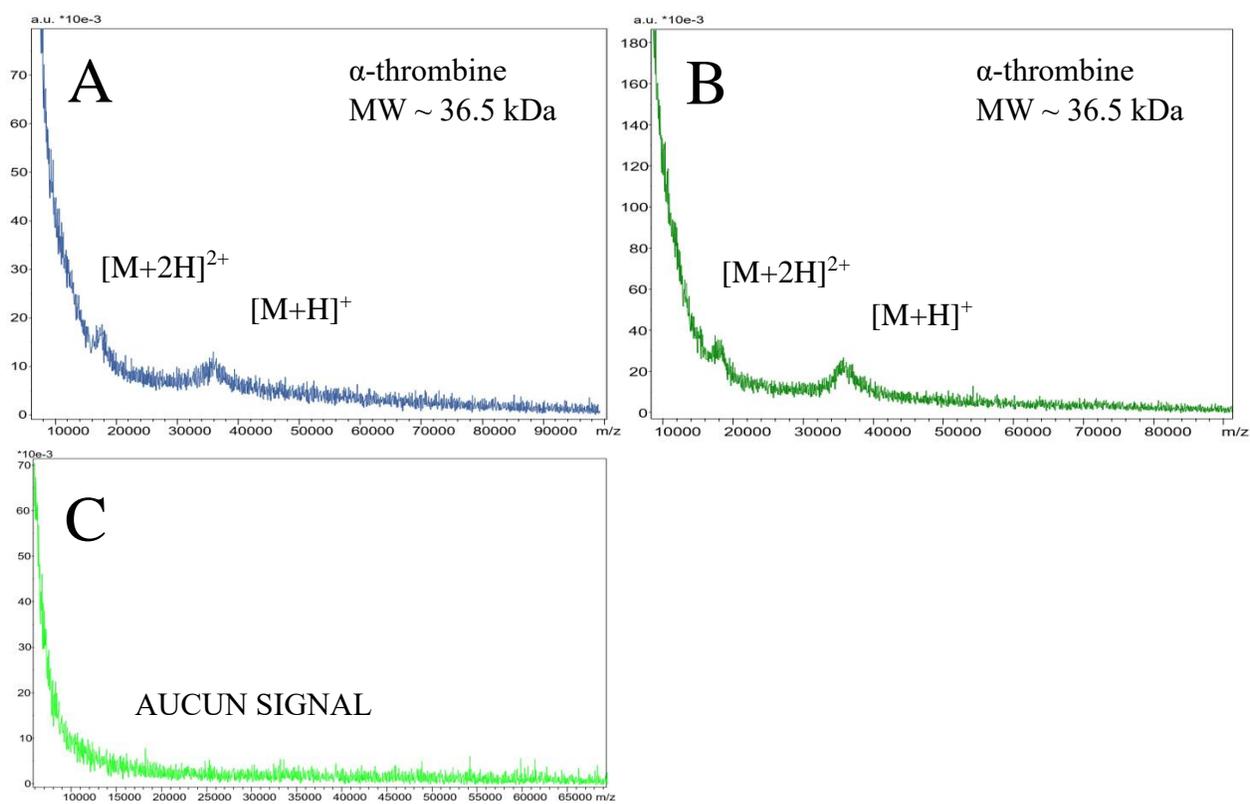


Figure V-17: Résultats MSi MALDI-TOF obtenus après l'expérience SPRi (tampon de course PBS, sans sels divalents) directement à partir de la surface de la biopuce à microarray d'aptamères anti thrombine immobilisés sur une SAM PEO-NHS. (A) Spectre de masse typique obtenu à partir de sites d'aptamère HD1 5'-T5. Spectres de masse typiques obtenus à partir de sites d'aptamère HD22 5'-T10 (B) et HD22 5'-T15 (C). Chaque spectre de masse représenté est la moyenne des spectres de masse obtenus à partir de la ROI.

L'imagerie par spectrométrie de masse a ensuite permis une nouvelle analyse visuelle des biopuces, en sélectionnant un filtre de masse correspondant à l'un des ions de la thrombine. L'image MALDI-TOF de la surface de la biopuce avec un filtre de masse à m/z 36534 (ion $[M+H]^+$ de la thrombine) est présentée sur la Figure V-18 A. La représentation schématique de la position des sites de récepteurs sur la surface du microarray est représentée à côté (Figure V-18 B). La localisation des ions provenant de la thrombine sur les sites des aptamères a été facilement déterminée, cependant, une coloration brillante de certains sites de contrôle (non liée à l'adsorption

de ligands et à la thrombine en particulier), car aucune protéine n'a été détectée sur les sites de contrôle, données non présentées) a également été observée (par exemple, ROI #13 et #16). Cela peut s'expliquer par le niveau de bruit élevé dans ces zones, causé par la cristallisation hétérogène de la matrice.

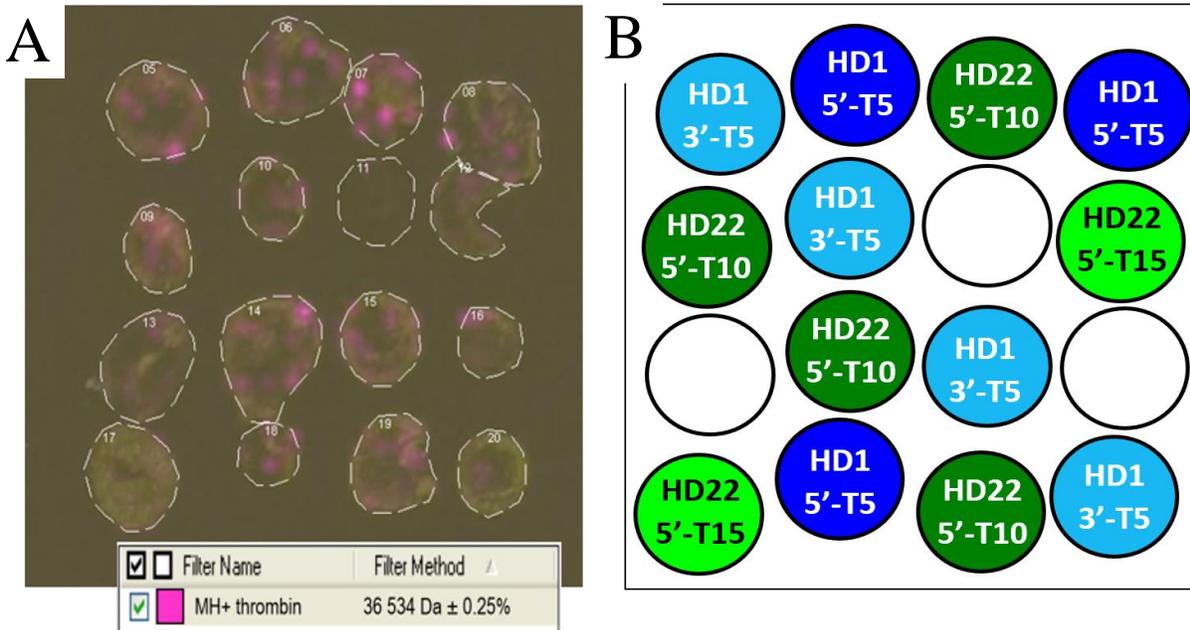


Figure V-18: Résultats MSi MALDI-TOF obtenus après l'expérience SPRi dans un tampon de course PBS (sans sels divalents) directement à partir de la surface de microarray d'aptamères anti thrombine immobilisés sur une SAM PEO-NHS. (A) Photo typique de la surface de microarray avec un filtre de masse de couleur magenta appliqué afin de montrer la distribution des ions sur les ROIs analysés (numérotés et délimités par une ligne pointillée). (B) Représentation schématique de la position des sites des récepteurs sur la surface de microarray. HD1 5'-T5 et HD1 3'-T10 en bleu foncé et bleu clair respectivement. HD22 5'-T10 et HD22 5'-T15 en vert foncé et vert clair respectivement. Les cercles blancs non nommés correspondent à différentes régions de contrôle.

V-2.4.2 Analyse des biopuces à aptadimère HD1-22 par imagerie MALDI-TOF

Des images MALDI-TOF ont été produites à partir des surfaces des biopuces, à aptadimère HD1-22 5'-T10 et des spectres de masse moyens ont été déduits de ces images MALDI-TOF. L'analyse SPRi a démontré des interactions avec la thrombine avec cet aptadimère et en accord avec ce résultat les spectres de masse ont mis en évidence la présence de thrombine capturée à la surface de ces biopuces. Quel que soit la concentration de l'aptadimère HD1-22 5'-T10 à l'immobilisation (10 et 20 μM), seul un ion à m/z 36534 correspondant au $[\text{M}+\text{H}]^+$ de la thrombine a été observé (Figure V-19). Par comparaison les spectres de masse à partir des biopuces HD22 5'-T10 (Figure V-17 B) montrent toujours deux signaux à m/z 17568 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ et 35982 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Ce résultat suggère une quantité plus faible de thrombine retenue sur la biopuce à aptadimère alors les résultats SPRi ont montré que la capture de thrombine par HD1-22 5'-T10 (déposé à 20 μM) est presque égale à celle par HD22 5'-T10 (Figure V-13 A). Le fait que les

récepteurs aptadimères fournissent des signaux MS moins intenses pourrait s'expliquer par la formation d'un complexe thrombine-aptadimère moins stable que celui de la thrombine-HD22 dans nos conditions expérimentales.

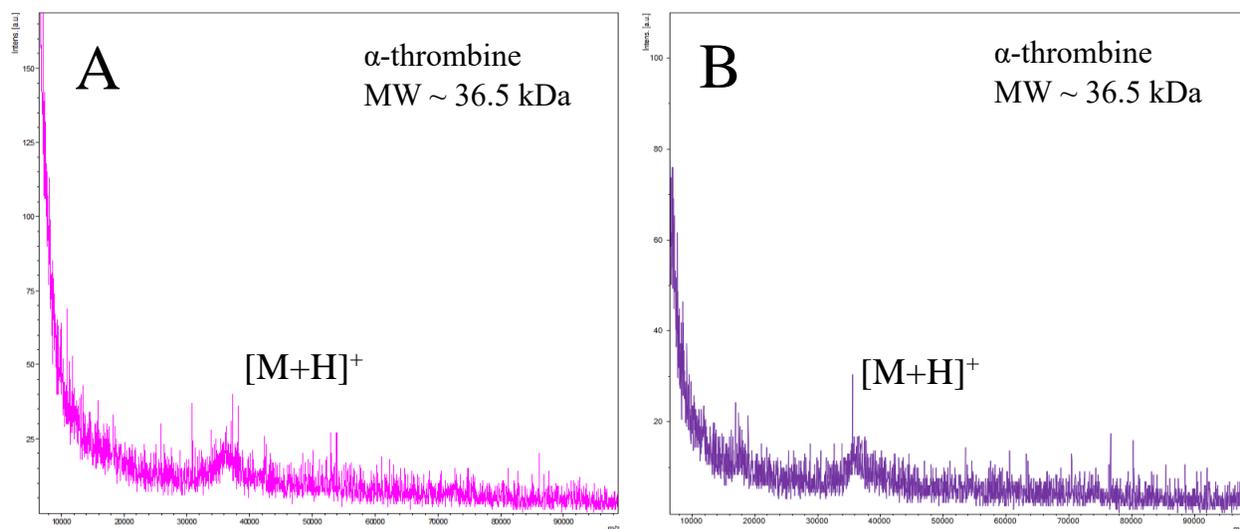


Figure V-19: Résultats MSi MALDI-TOF obtenus après l'expérience SPRi (tampon de course PBS sans sels divalents) directement à la surface de microarray des aptamères anti thrombine immobilisés sur la SAM PEO-NHS. Spectres de masse typiques obtenus à partir de sites HD1-22 5'-T10 immobilisés et à une concentration de 10 μM (A) et 20 μM (B) respectivement. Chaque spectre de masse représenté est la moyenne des spectres de masse obtenus à partir de la ROI.

V-2.4.3 Conclusion sur la détection par MSi en fonction du type d'aptamère et de ses modifications

Les limites de détection en SPRi-MS à base de microarrays d'anticorps se situent dans la plage nano- à micromolaire. Les aptamères sont souvent associés à des affinités plus élevées que les anticorps envers la molécule cible, de sorte que la limite de détection du système de couplage SPRi-MS pourrait théoriquement être abaissée avec l'utilisation de microarrays à base d'aptamères. Cependant, des conditions optimales doivent être définies pour permettre à la fois, le suivi SPRi et l'identification du ligand MSi directement à partir de la surface du biocapteur, après les expériences SPRi.

Les résultats obtenus par imagerie MALDI-TOF à partir de biopuces à aptamères anti thrombine ont été en bon accord avec les résultats de l'analyse SPRi. La technique MALDI-TOF MSi a produit une image de la surface des biopuces à microarray, qui correspond à une cartographie de la distribution des ions d'intérêt. Cependant, la coloration de certains sites contrôles après l'application du filtre de masse a également été observée. Cela peut s'expliquer par un niveau de bruit élevé dans certaines zones dû fait d'une cristallisation hétérogène de la matrice après le dépôt manuel de la matrice. Comme prévu, aucun signal n'a été détecté dans les régions HD1 5'-T10, HD22 5'-T15 et sur tous les sites contrôles, ce qui confirme l'absence de capture non spécifique de ligand et une bonne passivation de la surface du biocapteur.

La thrombine a été détectée sous la forme d'un ion $[M+H]^+$ à partir de tous les spectres de masse obtenus à partir de sites où les aptamères étaient fonctionnels (HD1 5'-T5, HD1 3'-T10, HD22 5'-T10 et HD1-22 5'-T10), tandis que les ions $[M+2H]^{2+}$ n'ont été détectés qu'avec un seul petit nombre d'entre eux: HD1 5'-T5 et HD22 5'-T10. Cela est certainement dû à la quantité plus importante de ligand retenu par ces deux aptamères, comme cela a été observé lors des expériences SPRI.

La capture de la thrombine était presque équivalente pour les deux aptamères HD22 5'-T10 et HD1-22 5'-T10 pendant l'expérience SPRI, cependant seul l'ion $[M+H]^+$ a été détecté sur les spectres de masse de l'aptadimère, alors que des ions $[M+2H]^{2+}$ et $[M+H]^+$ ont été détectés sur les sites de HD22 5'-T10.

Ce chapitre représente l'une des tentatives de création du biocapteur pour la détection de la thrombine à base sur les aptamères et l'aptadimère et c'est le premier travail qui utilise les deux sur la même surface de capteur simultanément. Étant encore en phase de conception, nous avons été confrontés à certains problèmes qui doivent être résolus et réfléchis aux étapes suivantes du développement du biocapteur basé sur l'aptadimère. Tout d'abord, il faut encore déterminer les conditions expérimentales optimales pour l'aptadimère. Deuxièmement, la comparaison des aptamères et des aptadimères doit être effectuée avec la définition de l'affinité et de la spécificité envers la thrombine dans les conditions réelles. Enfin, les interactions des aptadimères avec la thrombine devraient être caractérisées (les paramètres d'interaction devraient être définis). Néanmoins, nous pensons que cette technologie est un pas en avant pour le développement de capteurs basés sur les aptadimères, non seulement pour la thrombine mais aussi pour d'autres cibles.

Chapter VI. Les microarrays mixtes anticorps/aptamères pour le couplage SPRi-MS

VI-1 Les microarrays mixtes anti β -lactoglobuline pour la détection SPRi

Dans ce chapitre est rapportée une série d'expériences basées sur l'exploitation de biopuces mixte combinant anticorps et aptamères, pour la capture spécifique de la β -lactoglobuline. L'idée a été de concevoir une biopuce à la surface de laquelle sont immobilisés sur des sites distincts les anticorps et les aptamères, afin de pouvoir comparer les deux types de récepteurs dans des conditions strictement identiques. Ainsi ces biopuces à microarrays mixtes pourraient offrir l'opportunité de comparer directement l'impact de changements de protocoles expérimentaux sur la performance de récepteurs de différentes natures (anticorps vs aptamère), sans avoir à pratiquer des expériences comparatives à partir de biopuces différentes, à des moments différents, ce qui peut engendrer des biais. Enfin, ces expériences pourraient aider à comprendre les raisons du manque de performance des aptamères anti β -lactoglobuline.

J'ai décidé de reproduire les conditions expérimentales décrites dans la littérature, faisant état d'aptamères anti β -lactoglobuline fonctionnels, afin de découvrir la raison de l'absence de performance des aptamères anti β -lactoglobuline présentée dans ce travail dans la section précédente (IV-1). Les essais avec des aptasenseurs anti β -lactoglobuline rapportés dans la littérature ont utilisé l'une ou l'autre des configurations suivantes: soit les aptamères étaient immobilisées sur la surface des électrodes de graphène sérigraphiées par absorption physique, et ce dernier était immédiatement utilisé; soit les aptamères étaient immobilisés à l'aide d'une liaison chimique et des échantillons de protéines étaient ensuite injectés [273], [274]. Pour cette dernière configuration, il est précisé que les biocapteurs étaient stockés à 4 °C avant et entre les séries d'expériences. Dans ce travail de thèse, des biopuces détectant la β -lactoglobuline ont été utilisées après l'étape d'immobilisation des aptamères pendant 2h soit à température ambiante, soit à 4°C. Ainsi, nous ne pouvons pas exclure qu'une étape de stockage à 4°C dans le tampon approprié pourrait être une étape clé pour le repliement correct des aptamères greffés, et leur bon fonctionnement. L'influence du temps et des conditions d'immobilisation des récepteurs a donc été étudiée.

Afin de comparer le protocole expérimental SPRi précédemment établi (avec un temps d'immobilisation de 2h) à celui rapporté dans la littérature, j'ai sélectionné deux temps de greffage des récepteurs (2h et 16h), sous atmosphère humide à 4 °C. Les résultats obtenus ont conduit à la conclusion que les aptamères β -lactoglobuline utilisés dans ce travail n'étaient pas fonctionnels quel que soient les tampons SPRi testés, c'est pourquoi ils ne seront pas présentés.

A partir des microarrays mixtes, j'ai tout de même pu évaluer l'influence du tampon de course et du temps d'immobilisation des récepteurs sur la performance des anticorps anti β -lactoglobuline. La Figure VI-1 montre les densités surfaciques de β -lactoglobuline retenues sur les sites d'anticorps correspondant, en fonction du tampon de course utilisé, et des durées d'immobilisation des anticorps (2h ou 16h). Premièrement, on peut observer à partir de l'histogramme que l'immobilisation des récepteurs pendant 16h (pendant la nuit) a abouti une

meilleure performance dans trois cas sur quatre - plus de ligand a été retenu à la surface pour tous les tampons d'immobilisation/de course, sauf pour le tampon d'acétate d'ammonium 150 mM. Deuxièmement, avec une durée longue d'immobilisation (16h), une quantité quasi équivalente de ligand a été capturée lors de l'injection de 100 µg/mL de β-lactoglobuline, pour tous les tampons à l'exception du tampon PBS en présence de MgCl₂ et CaCl₂. Ce tampon a été préparé à partir de tablettes de sels de tampon PBS en ajoutant MgCl₂ et CaCl₂ à une concentration de 1 mM. Dans ce cas, la quantité de ligand capturé était presque deux fois plus élevée qu'avec le tampon PBS sans sels divalents. Par conséquent, dans nos conditions, un temps de greffage des récepteurs de 16 h et un tampon de course PBS contenant des sels de MgCl₂ et de CaCl₂ sont plus appropriés pour la détection de β-lactoglobuline en SPRi.

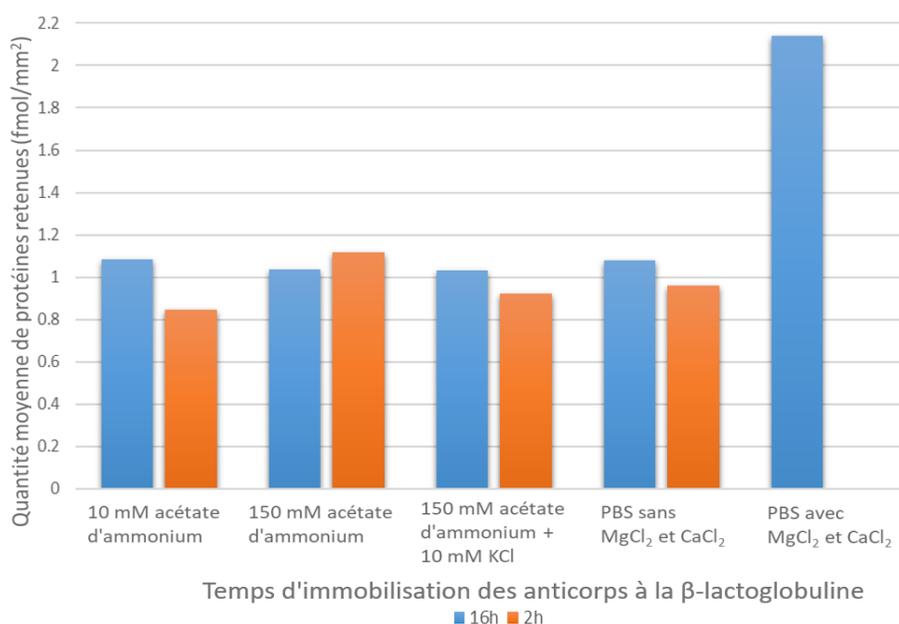


Figure VI-1: Histogramme montrant la densité de surface moyenne de protéines retenues sur les sites d'anticorps anti β-lactoglobuline lors de l'injection de 100 µg/mL de β-lactoglobuline dans différents tampons de course. Les barres bleues correspondent à l'immobilisation des récepteurs pendant 16 heures et les barres orange - pendant 2 heures.

VI-2 Analyse par MALDI-TOF MS et MSi des microarrays mixtes anti β-lactoglobuline

Les conditions de préparation de la matrice et de l'échantillon ont une grande influence sur l'efficacité de la détection par spectrométrie de masse [303]. Une détection satisfaisante par MS nécessite souvent des procédures de dessalage supplémentaires, et une accumulation des signaux afin d'augmenter la qualité du spectre de masse, après la séparation par affinité des ligands. Une faible résolution et faible intensité des signaux en spectrométrie de masse peut être causée par les

sels des tampons utilisés, retenus sur la surface de la biopuce après l'expérience SPRi [304]. Les résultats de l'analyse par MS des biopuces avec pour but la détection de la β -lactoglobuline à la suite d'expériences SPRi dans des tampons de course PBS non volatils sont représentés dans cette partie. Contrairement au tampon acétate d'ammonium 10 mM utilisé précédemment, l'utilisation du PBS comme tampon de course en SPRi a nécessité des efforts supplémentaires lors de l'acquisition des spectres de masse – l'interrogation manuelle des ROIs a été systématiquement effectuée après l'imagerie MALDI-TOF afin d'obtenir des spectres de masse bien résolus.

La Figure VI-2 A montre une photo de la biopuce SPRi avec un microarray (3x3) constitué de récepteurs mixtes au centre, accompagnés de divers contrôles. Sur la Figure VI-2 B, une photo d'une partie du microarray zoomée est superposée aux résultats de la détection par MS – trois ROI de couleur magenta relativement brillants ont pu être remarqués (ROI # 06, 07 et 12); ils correspondent tous aux sites d'anticorps anti β -lactoglobuline. Tous les autres ROIs correspondent soit, à des sites où des aptamères anti β -lactoglobuline ont été immobilisés, soit à des sites de contrôle – aucun ligand n'y a été détecté dans tous les cas et toute coloration résiduelle après application du filtre de masse était due au niveau de bruit élevé. Les spectres de masse obtenus à partir des sites anticorps, après analyse SPRi dans le tampon de course PBS sans $MgCl_2$ et $CaCl_2$, ont montré des signaux de très faible intensité, avec à m/z 18364, l'ion correspondant à la forme $[M+H]^+$ de la β -lactoglobuline (Figure VI-2 C et D). Comme on peut le voir, la coloration de la distribution des ions est relativement intense, tandis que l'intensité des pics d'ions sur le spectre de masse est faible. Cet effet est particulièrement important pour la ROI #12, qui montre une coloration brillante à proximité du bord. Ce phénomène est attribué au niveau élevé de bruit sur le bord de la ROI, lié à la couche plus fine de matrice cristallisée à cet endroit. Cet inconvénient pourrait être résolu en remplaçant la méthode de dépôt de matrice par une pulvérisation homogène sur la surface.

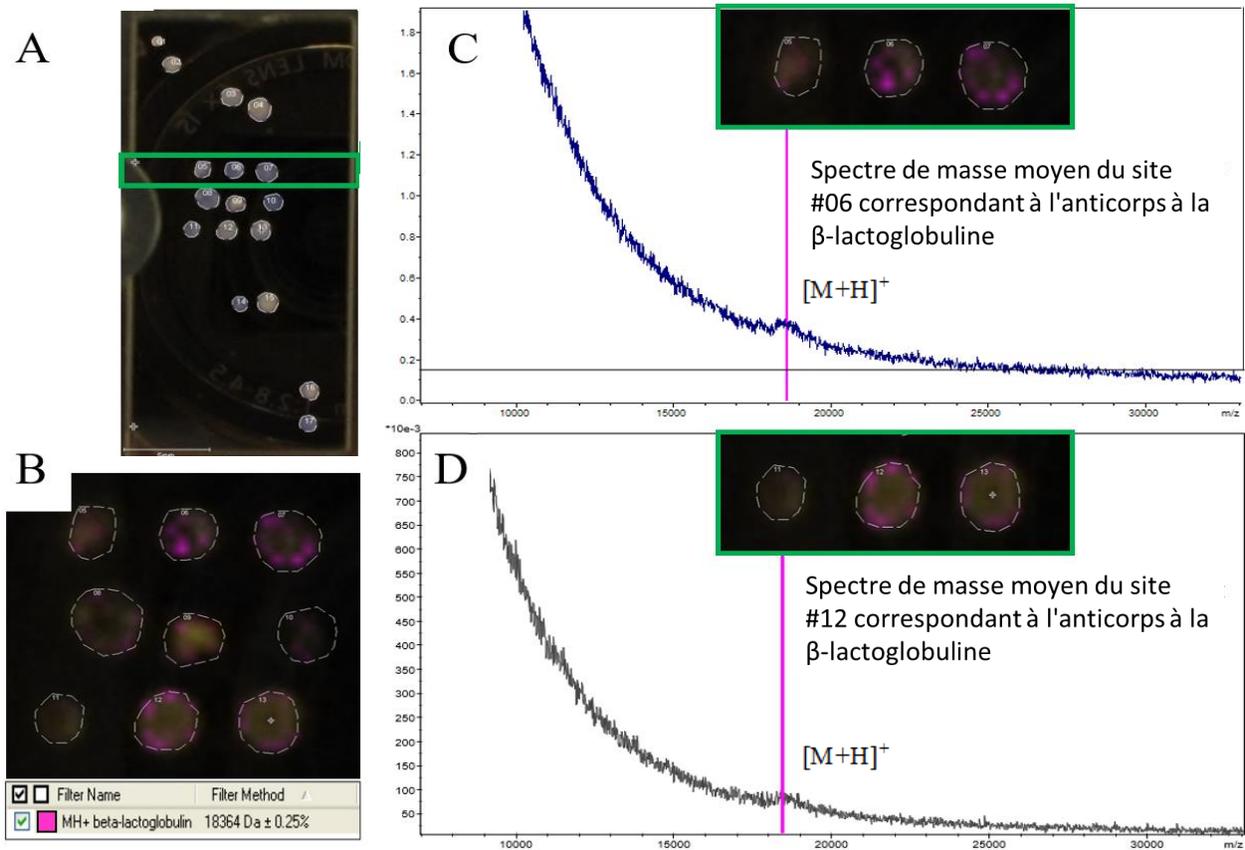


Figure VI-2: Résultats de MALDI-TOF MSi obtenus après l'expérience SPRI menée avec un tampon de course PBS (sans sels divalents) directement à partir de la surface de microarray mixte anticorps/aptamères anti β -lactoglobuline immobilisés sur la chimie PEO-NHS. (A) Photo de la surface entière de la biopuce avec délimitation des ROIs. (B) Photo de la surface du microarray avec les résultats MSi superposés. Filtre de masse de couleur magenta appliqué afin de montrer la distribution des ions sur les ROIs analysés. Spectres de masse typiques obtenus à partir de sites d'anticorps contre β -lactoglobuline (C et D) en mode linéaire positif en utilisant la matrice HABA. Chaque spectre de masse représenté est la moyenne des spectres de masse obtenus à partir de la ROI.

Comme les spectres obtenus n'étaient pas de bonne qualité (faible rapport signal/bruit, faible résolution), j'ai décidé de procéder à une interrogation manuelle de la surface afin de n'accumuler que des spectres significatifs sans faire la moyenne sur l'ensemble de la ROI, ce qui est fait automatiquement à la fin du balayage par imagerie MALDI-TOF. Les spectres de masse obtenus par interrogation manuelle à partir des mêmes sites d'anticorps anti β -lactoglobuline sont présentés sur la Figure VI-3. Ces données sont le résultat de l'accumulation d'au moins 2000 tirs laser obtenus à partir de différentes parties de la ROI. Comme on peut l'observer, les nouveaux spectres de masse ont des signaux avec un rapport S/B bien meilleur, ce qui signifie que le tampon PBS utilisé (avec rinçage à l'eau avant l'application de la matrice) peut être toléré par MALDI-TOF.

Sur la Figure VI-3 C-D, des spectres de masse obtenus à partir de différents récepteurs anti β -lactoglobuline (anticorps vs aptamère) sont superposés. Les résultats MS sont en accord avec ceux issus de l'expérience SPRi seule, indiquant l'absence d'interactions avec les aptamères immobilisés. Le spectre de masse avec le signal le plus faiblement résolu, obtenu à partir d'un site à base d'anticorps anti β -lactoglobuline (#12), a été utilisé pour la Figure VI-3 C-D, mais il était encore suffisant pour une détermination univoque des pics par comparaison avec les spectres de masse des aptamères qui eux, ne présentent pas de signaux.

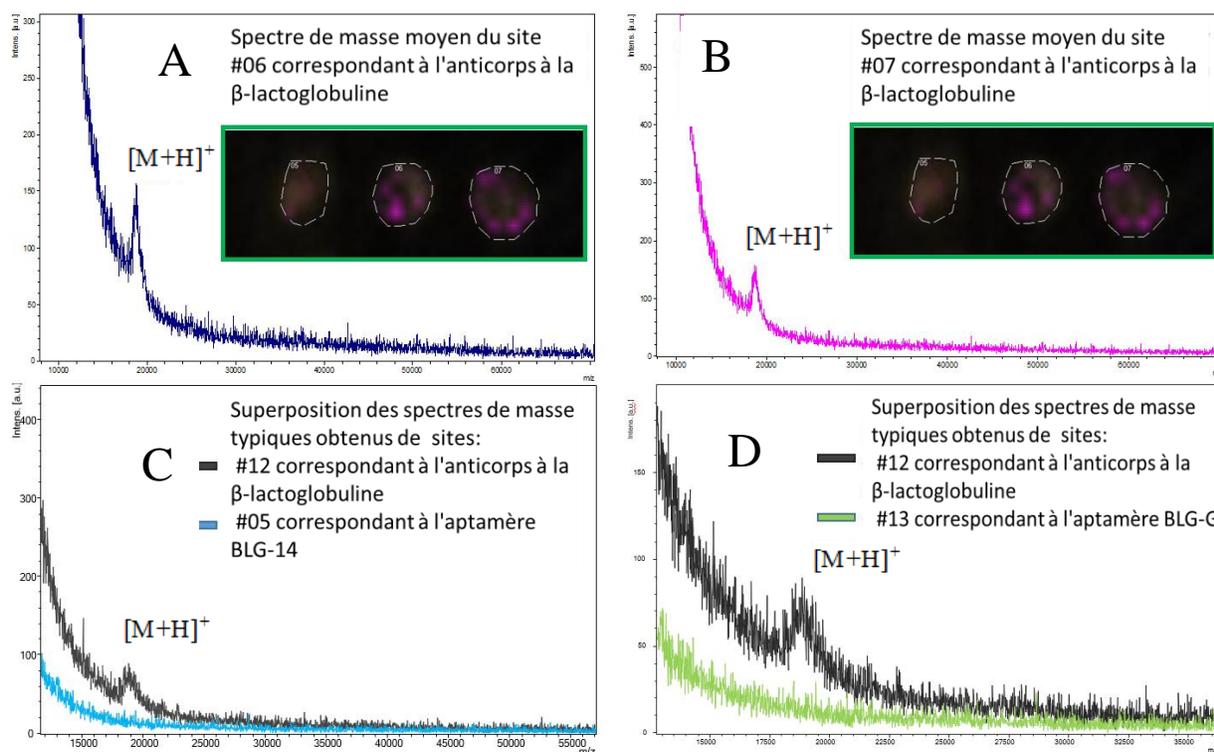


Figure VI-3: Résultats MALDI-TOF MSi obtenus directement à partir de la surface de microarray mixte anticorps/ aptamères anti β -lactoglobuline immobilisés sur la chimie PEO-NHS après l'expérience SPRi menée avec un tampon de course PBS (sans sels divalents). (A) et (B) Spectres de masse typiques obtenus à partir des sites d'anticorps anti β -lactoglobuline. Le spectre de masse obtenu à partir d'un site anticorps anti β -lactoglobuline (en noir) est superposé avec un spectre de masse typique obtenu à partir (C) d'un site aptamère BLG-14 (en bleu) et (D) d'un site aptamère BLG-G (en vert). Chaque spectre de masse représenté est la moyenne de spectres de masse obtenus à partir d'une ROI.

Les spectres de masse moyens des différents sites de contrôle étaient similaires, quel que soit le tampon de course utilisé en SPRi (tampon volatil à base d'acétate d'ammonium ou non volatil avec le tampon PBS) - les protéines n'ont pas été détectés par MS à partir de ces sites, ni par imagerie MALDI-TOF, ni par interrogation manuelle des sites (données non présentées).

Ensuite, l'influence de la présence d'ions métalliques divalents dans le tampon de course, sur la capture de la β -lactoglobuline (toujours à partir des microarrays mixtes) et sur l'analyse par MS a été étudiée. Après les expériences SPRi réalisées avec un tampon de course non volatil

(tampon PBS contenant 1 mM de $MgCl_2$ et de $CaCl_2$), les biopuces ont été extraites et rincées avec de l'eau pour éliminer l'excès de sel éventuellement présent en surface. Après une étape de séchage, la matrice HABA a été déposée sur chaque plot du microarray comme décrit précédemment. J'ai pu détecter par imagerie MALDI-TOF uniquement des quantités infimes de β -lactoglobuline, qui ont été retenus sur les sites d'anticorps correspondants (Figure VI-4 A). J'ai donc procédé à une interrogation manuelle par MS des divers sites d'interaction (Figure VI-4 B). Les spectres de masse obtenus sont en parfait accord avec les résultats obtenus lors de l'expérience SPRi, la présence de 1 mM de $MgCl_2$ et de $CaCl_2$ dans le tampon PBS a permis une capture de ligand plus efficace par rapport à toutes les compositions de tampon de course SPRi testées précédemment. Etant donné que la quantité de ligand retenu par affinité sur les sites d'anticorps estimée par SPRi, était presque deux fois plus élevée, en présence de $MgCl_2$ et $CaCl_2$ par rapport aux expériences avec PBS sans $MgCl_2$ et $CaCl_2$, ou dans des tampons acétate d'ammonium, la détection par MS d'ions $[M+H]^+$ et $[M+2H]^{2+}$ à partir de la β -lactoglobuline et d'agrégats de protéines à charges multiples n'a pas été surprenante (Figure VI-4 C). Le spectre de masse présenté est le résultat de l'accumulation d'au moins 2000 tirs laser effectués aux voisinages d'un "hot-spot" de la matrice. Bien que des sels soient encore éventuellement présents à la surface de la biopuce après l'expérience SPRi, la protéine a été désorbée/ionisée efficacement en MALDI, probablement parce que sa masse n'est pas trop importante (~18,4 kDa).

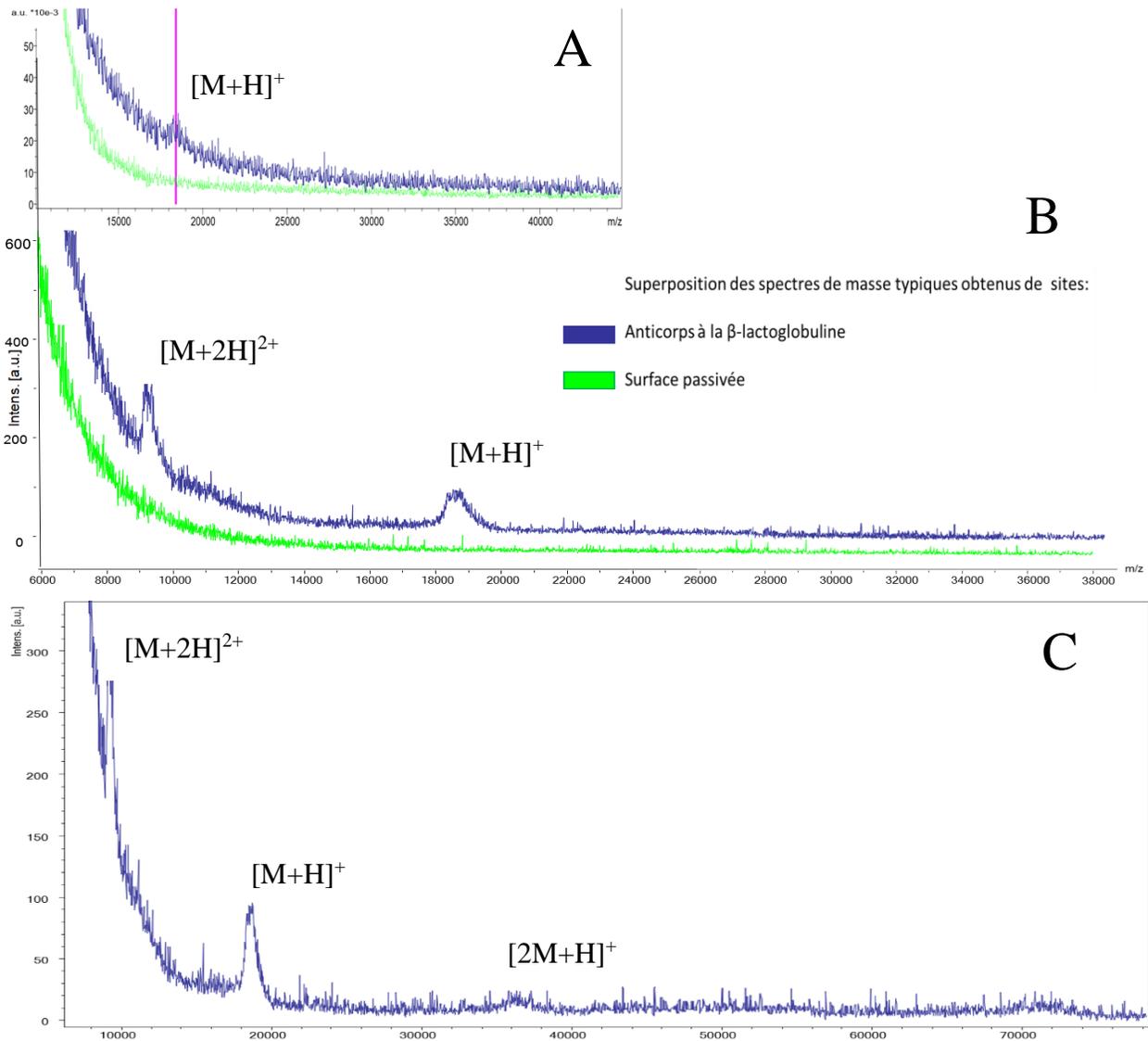


Figure VI-4: Résultats MALDI-TOF obtenus par MSi (A) et par interrogation manuelle de la surface (B) après l'expérience SPRi dans un tampon de course PBS (contenant 1 mM $MgCl_2$ et $CaCl_2$) directement à partir la surface de microarray mixte anticorps/aptamères anti β -lactoglobuline immobilisés sur la chimie PEO-NHS. Spectre de masse obtenu à partir des sites d'anticorps anti β -lactoglobuline, représenté en bleu foncé et des sites de la surface passivée représenté en vert. (C) Spectre de masse obtenu à partir de « hot-spots » de matrice (site d'anticorps anti β -lactoglobuline), montrant de multiples ions de la molécule cible.

Conclusion à propos des microarrays mixtes anti β -lactoglobuline

A partir d'une biopuce modèle au format microarray, avec des récepteurs de type anticorps ou aptamère, ciblant spécifiquement la β -lactoglobuline, le protocole expérimental SPRi existant a été adapté. Un temps d'immobilisation des récepteurs plus long (pendant la nuit, ~16h) et un tampon de course PBS contenant 1 mM de $MgCl_2$ et $CaCl_2$ (pour les expériences SPRi) ont induit une augmentation importante de l'efficacité de capture par affinité de la β -lactoglobuline par les anticorps pendant l'expérience SPRi, pour toutes les concentrations de protéine injectées. Aucune interaction non spécifique n'a été observée avec l'ovalbumine indépendamment des concentrations injectées. Cette expérience peut servir de preuve de l'affinité et de la sélectivité des anticorps dirigés contre la β -lactoglobuline. Toutes les modifications appliquées ont été bénéfiques aux anticorps, en revanche malgré tous les efforts déployés, aucune interaction moléculaire n'a été observée avec les aptamères anti β -lactoglobuline. Aucune des conditions expérimentales testées n'a permis d'observer la capture la protéine cible par les aptamères. Ce problème doit faire l'objet d'une étude plus approfondie.

L'analyse de la surface de la biopuce par imagerie MALDI-TOF a été systématiquement effectuée à la suite des expériences SPRi. L'identification du ligand retenu par affinité a été possible dans toutes les conditions SPRi testées. Néanmoins, une influence du tampon de course SPRi sur l'efficacité de détection suivante par MS a été observée: l'analyse est plus exigeante en termes de travail à réaliser et de temps, après l'expérience SPRi dans le tampons PBS, ce qui est en accord avec les données rapportées dans la littérature. Cependant, l'amélioration du signal, liée à une plus grande quantité de ligand retenu sur la surface du capteur dans ces conditions, compense ces inconvénients. J'ai constaté que la quantité de β -lactoglobuline capturée dans le tampon PBS contenant 1 mM de $MgCl_2$ et de $CaCl_2$, était telle qu'elle permettait de détecter des ions de type dimères de la protéine cible, alors que dans le tampon d'acétate d'ammonium, seuls des ions mono- et doublement chargés de monomères de β -lactoglobuline ont été observés.

On peut noter à partir des spectres de masse obtenus, l'importance de la méthode de dépôt de matrice et du mode d'analyse par MS. Dans le cas de la détection de la β -lactoglobuline suite à l'expérience SPRi dans le tampon PBS, qui est à la limite des quantités de sels tolérées par MALDI-TOF, l'imagerie MS peut servir au moins pour l'identification des sites de récepteurs recherchés - des ROI colorés où les ions m/z cibles ont été détectés. Un examen supplémentaire des ROI sélectionnés par interrogation manuelle (en MALDI-TOF MS classique) a souvent été nécessaire afin d'obtenir un signal plus intense et mieux résolu. Par conséquent, une procédure d'élimination des sels plus efficace après les expériences SPRi réalisées en PBS avec 1 mM de $MgCl_2$ et de $CaCl_2$ pourrait être nécessaire, en particulier si l'analyse MS est effectuée pour des molécules de taille plus importante, souvent plus difficiles à désorber/ioniser en MALDI.

VI-3 Les microarrays mixtes anti thrombine pour la détection SPRi

Dans cette partie du chapitre VI, nous souhaitons encore comparer les performances de deux types de récepteurs: des aptamères et des anticorps immobilisés sur une unique surface (biopuce au format microarray mixte). Ces aptamères et les anticorps serviront à la reconnaissance et à la capture d'une autre protéine: la thrombine (prothrombine).

VI-3.1 Détection de la thrombine en utilisant des microarrays mixtes

Pour observer la cinétique de liaison entre la α -thrombine et les aptamères HD1, HD22 immobilisés, et pour comparer la performance de ces aptamères à celles des anticorps dirigés contre la thrombine, différentes concentrations de thrombine allant de 0,025 à 1 $\mu\text{g/mL}$ (0,68 nM à 27 nM) ont été injectées. Conformément aux recommandations pour l'analyse cinétique SPRi, les concentrations de thrombine ont été obtenues par des dilutions en série d'un facteur 2 à partir de la concentration la plus élevée (27 nM). J'ai sélectionné ces concentrations afin de couvrir le niveau de concentration pertinent pour les accidents thrombotiques [170] et afin de tester une large gamme de concentrations.

L'anticorps monoclonal contre la thrombine et l'immunoglobuline G de souris (IgG, utilisé comme contrôle négatif) ont été immobilisés à une concentration de 6 μM dans des solutions contenant 5% de glycérol. Les aptamères HD22 5'-T10, HD1 5'-T5, HD1 3'-T10 préalablement sélectionnés, et l'aptamère de contrôle (TC) ont été immobilisés dans un tampon TE à une concentration de 10 μM sur une biopuce fonctionnalisée avec une monocouche de PEO thiolés activés par la chimie NHS/DCC. Les premières expériences SPRi avec des microarrays mixtes anticorps/aptamères détectant la thrombine ont été réalisées dans un tampon de course PBS sans MgCl_2 et CaCl_2 (mêmes conditions que pour l'aptasenseur de thrombine décrit précédemment dans le Chapitre V). Une réponse significative (variation de réflectivité $\geq 0,02$ % après l'étape de dissociation) a été observée à une concentration de thrombine aussi faible que 0,68 nM (Figure VI-5). La réponse la plus élevée a été observée pour l'interaction de la thrombine avec les anticorps, puis pour HD22 5'-T10 et HD1 5'-T5 et la plus faible pour HD1 3'-T10.

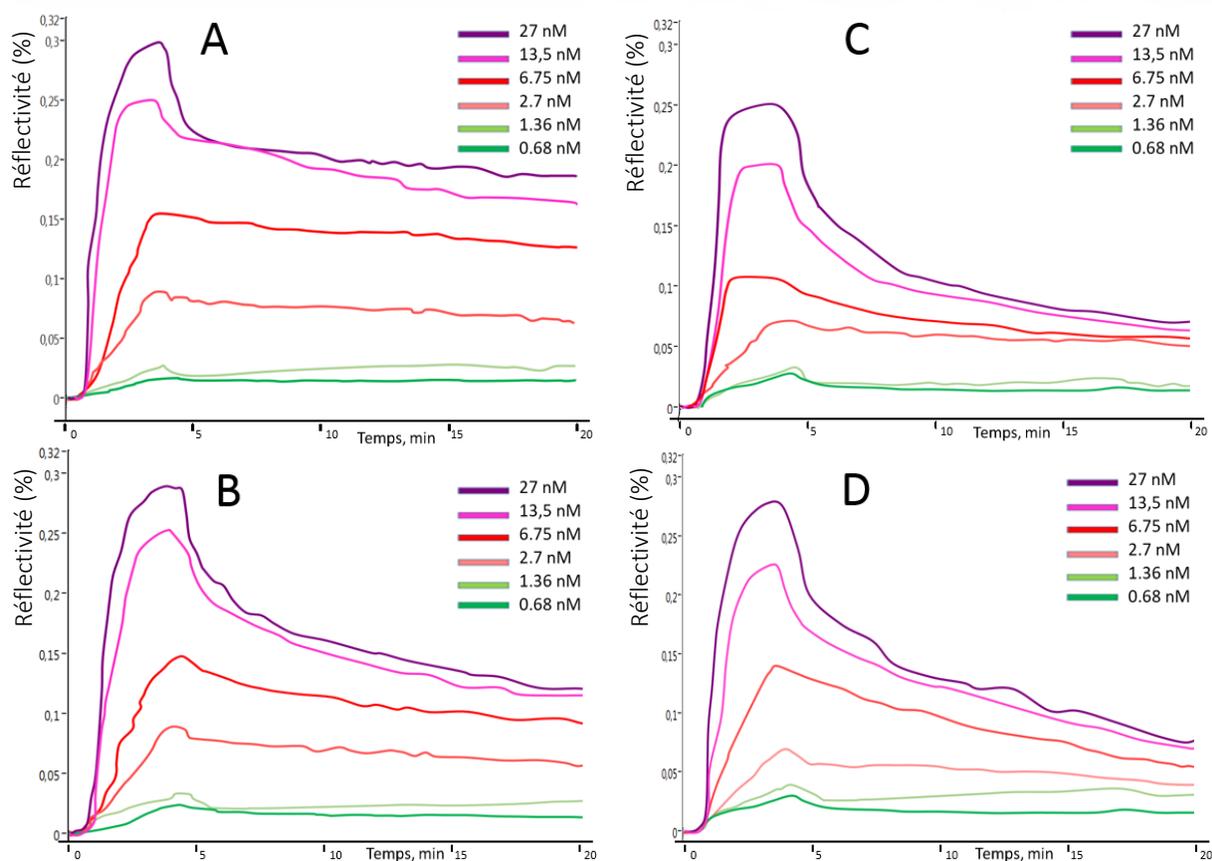


Figure VI-5: Sensorgrammes SPRI des interactions des d'anticorps contre la thrombine (A) et des aptamères HD22 5'-T10 (B), HD1 3'-T10' (C), HD1 5'-T5 (D) avec des concentrations croissantes de thrombine injectée dans le tampon de course PBS sans MgCl₂ et CaCl₂. La légende colorée sur le côté droit de chaque ensemble de courbes indique la concentration de la protéine injectée.

Pour l'évaluation de l'affinité des récepteurs envers la thrombine, des quantités de ligand retenue par unité de surface ont été calculées à partir de tous les sites où des récepteurs ont été immobilisés, ainsi qu'à partir des sites de contrôle. En accord avec les résultats montrés précédemment à partir des sensorgrammes, le niveau le plus élevé de capture par affinité a été obtenu par les anticorps anti thrombine. Ensuite parmi les aptamères testés, HD22 5'-T10, a conduit à la plus grande quantité de thrombine retenue, suivie par HD1 5'-T5 et HD1 3'-T10 (Figure VI-6). La capture non spécifique de ligands par l'aptamère de contrôle (TC) était proche de zéro pendant toute l'expérience, pour toutes les concentrations de thrombine injectées (Figure VI-6). Les données concernant la liaison de la thrombine aux sites de surface passivés, et aux sites d'anticorps de contrôle ne sont pas représentées, car la capture non spécifique était inférieure à celle de l'aptamère TC, elle a donc été négligée.

Il est intéressant de noter que les cinétiques d'association pour les trois aptamères testés étaient très proches de ceux du couple anticorps-thrombine (avec une légère différence pour HD1 3'-T10, qui présente de moins bons résultats). La principale différence réside dans la stabilité

des complexes formés: la dissociation du complexe à partir de HD22 5'-T10 a été plus rapide que celle à partir des anticorps, les complexes HD1-thrombine se dissociant encore plus vite par rapport à HD22 5'-T10. Nous avons attribué cette différence de stabilité des complexes formés aux 2 facteurs. Premièrement, l'affinité beaucoup plus élevée de HD22 par rapport à HD1 est très bien corrélée avec la valeur presque doublée de la zone d'interface et du nombre de résidus en interaction affichés par HD22, signalée par Russo Kraus *et al.* [287]. Deuxièmement, étant donné que HD1 interagit principalement avec l'exosite I et ensuite avec l'exosite II [169], [170], nous avons attribué cette différence de stabilité des complexes formés aux interactions potentielles de certains HD1 immobilisés avec l'exosite II de la thrombine, qui rendent ces complexes instables, fragiles pendant l'étape de dissociation, diminuant ainsi l'affinité globale des sites HD1 pour la thrombine.

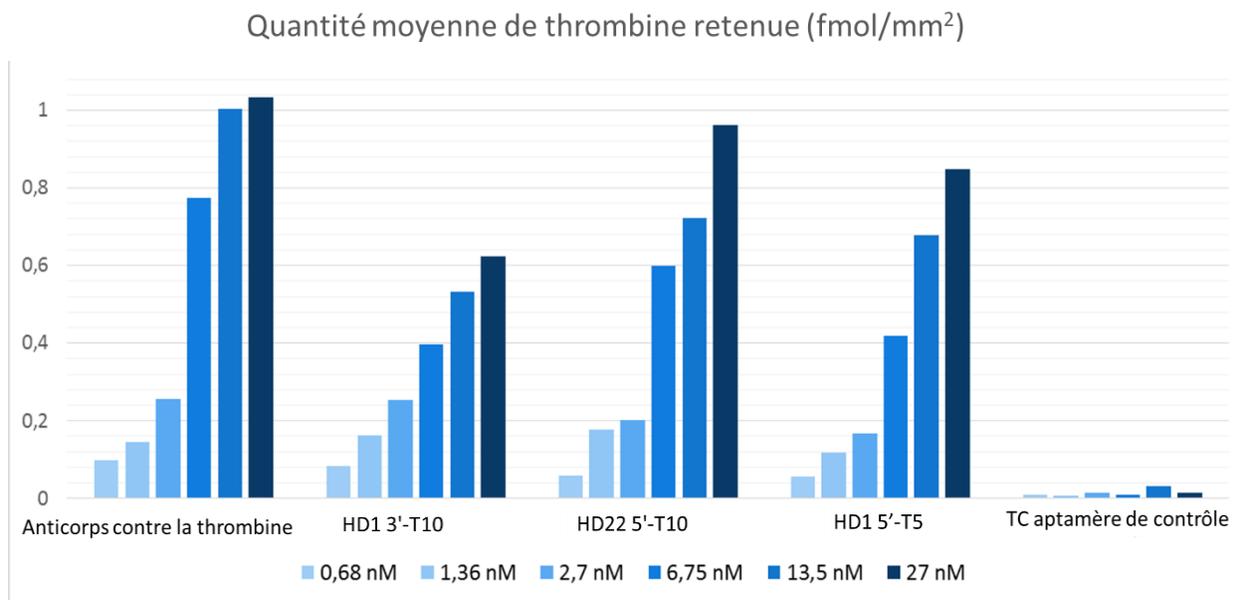


Figure VI-6: Histogramme montrant la densité de surface moyenne de la thrombine retenue par affinité sur les sites de différents récepteurs lors d'injections de thrombine de concentrations croissantes pendant l'expérience SPRi dans le tampon de course PBS sans MgCl₂ et CaCl₂.

VI-3.2 Détection de la prothrombine en utilisant des microarrays mixtes

Différents auteurs ont démontré clairement que HD1 interagit avec le proexosite I de la prothrombine [278], [281] avec une affinité comparable à celle de l'exosite I de la thrombine. En revanche, nous ne savons pas si la cinétique de la réaction de liaison reste la même quelle que soit l'orientation de l'immobilisation des aptamères.

Des expériences SPRi ont été réalisées avec des microarrays mixtes préparées comme décrit précédemment (avec différents aptamères et anticorps). Pour étudier la cinétique de liaison de la prothrombine avec des récepteurs immobilisés, différentes solutions de prothrombine à des concentrations allant de 0,1 à 2 µg/mL (1,75 nM à 27,5 nM) ont été injectées. Comme pour les

concentrations de thrombine, les solutions ont été préparées par des dilutions en série d'un facteur 2 à partir de la concentration la plus élevée (27,5 nM).

Une réponse significative (variation maximale de la réflectivité différente de celle des sites contrôles) a été observée à partir de 3,45 nM (Figure VI-7), ce qui est 5 fois plus élevé que la LOD de la thrombine. Comme la prothrombine n'a pas interagi avec HD22 5'-T10 et l'anticorps contre la thrombine, seuls les résultats des interactions prothrombine-HD1 seront présentés ci-dessous.

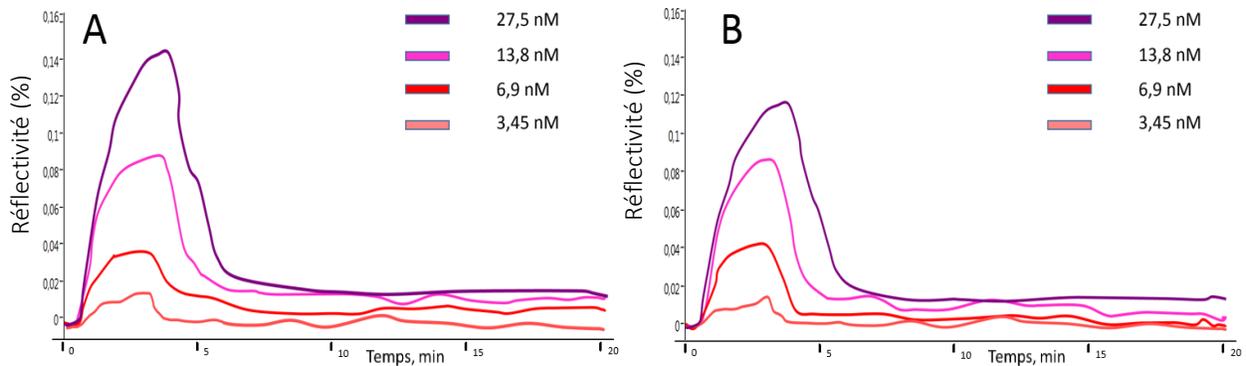


Figure VI-7: Sensorgrammes SPRi des interactions des aptamère HD1 3'-T10' (A) et HD1 5'-T5 (B) avec des concentrations croissantes de prothrombine injectée dans le tampon de course PBS sans $MgCl_2$ et $CaCl_2$. Une légende colorée sur le côté droit de chaque sensorgramme indique la concentration de la protéine injectée.

Comme pour les complexes thrombine-récepteur, l'affinité des interactions HD1-prothrombine a été évaluée en calculant la quantité de ligands spécifiquement retenus sur les sites d'aptamères. L'histogramme de la Figure VI-8 montre que la quantité de prothrombine retenue sur les sites HD1 3'-T10 était environ deux fois plus élevée que celle sur HD1 5'-T5. En admettant que le taux d'immobilisation des aptamères est le même peu importe, la longueur du linker et sa position 3' ou 5', cela suggère que l'immobilisation via 3' en utilisant un linker T10 influence positivement la reconnaissance de la prothrombine. Comme la prothrombine est environ deux fois plus grosse que la molécule de thrombine, il est possible que sa reconnaissance et sa liaison à HD1 5'-T5 soient gênées stériquement, ce qui entraînerait une diminution de l'efficacité de liaison, une affinité plus faible. Une autre explication des résultats observés peut être que l'immobilisation de HD1 via l'extrémité 3' avec un linker plus long, est plus favorable au repliement 3D des aptamères, permettant ainsi une meilleure reconnaissance des récepteurs. Afin de savoir si c'est la longueur du linker polyT ou l'orientation de l'immobilisation qui influence la reconnaissance et la capture de la prothrombine, une nouvelle série d'expériences a dû être réalisée avec HD1 portant le linker T10 en 5'. Ces expériences seront décrites dans la partie suivante.

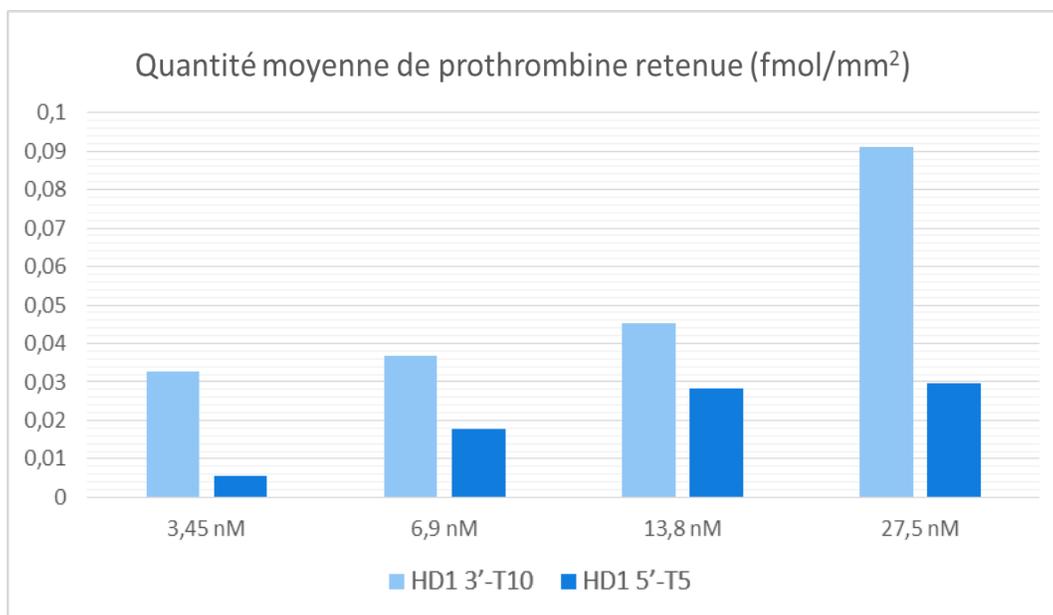


Figure VI-8: Histogramme montrant la densité de surface moyenne de la prothrombine retenue par affinité sur les sites de différents récepteurs, lors d'injections de prothrombine de concentrations croissantes pendant l'expérience SPRi dans le tampon de course PBS sans MgCl₂ et CaCl₂.

VI-3.3 Influence du tampon de course sur la détection par SPRi en utilisant des microarrays mixtes: rôle des ions divalents dans la réponse des aptamères

Au cours de ce travail, une faible ou une absence d'efficacité de liaison a été observée pour plusieurs des aptamères testés, pourtant on rapporte dans la littérature que les mêmes aptamères avec la même longueur de linker polyT sont pleinement fonctionnels [170], [305], [306]. En comparant les conditions expérimentales, notamment la composition du tampon de course employé lors de la capture du ligand en SPR, j'ai constaté que la principale différence résidait dans la présence de sels divalents présents à une concentration de 1mM. Ces résultats concordent avec les données publiées indiquant que le repliement des G-quartets de l'ADN peut être affectée par les ions Mg²⁺ et Ca²⁺ et par les forces ioniques du tampon utilisé [275]. Ces ions peuvent interagir en différents points de l'oligonucléotide, induisant différentes tailles de G-quartets. Des conformations légèrement différentes du quadruplex peuvent être la cause d'affinités différentes pour la thrombine et/ou la prothrombine [293]. C'est pourquoi l'influence d'un nouveau tampon de course, PBS contenant en plus, 1 mM de MgCl₂ et de CaCl₂ (par rapport au tampon PBS utilisé jusqu'à présent) a été examinée.

VI-3.3.1 Rôle des ions divalents dans la détection de la thrombine en utilisant des microarrays mixtes

Les interactions entre l' α -thrombine et différents récepteurs immobilisés ont été suivies en SPRi dans un tampon de course PBS contenant 1 mM de MgCl₂ et de CaCl₂. Tous les aptamères ont été dilués dans un nouveau tampon de course à une concentration de 10 μ M. Avant l'immobilisation, diverses solutions de thrombine de concentrations allant de 0,025 à 0,5 μ g/mL

(0,68 nM à 13,5 nM) ont été injectées dans la cellule à circulation continue; HD1 5' avec le linker T10 (HD1 5'-T10) a été testé dans de nouvelles conditions expérimentales au lieu de HD1 5'-T5. Tous les autres réglages et paramètres ont été conservés sans aucune modification.

Une réponse significative (variation de réflectivité répétée $\geq 0,02$ % après l'étape de dissociation) a été observée à partir d'une concentration de thrombine de 1,36 nM (Figure VI-9), ce qui rend la LOD de la thrombine plus élevée dans le PBS contenant 1 mM de $MgCl_2$ et de $CaCl_2$ que dans le tampon PBS utilisé auparavant (sans sels divalents ajoutés). Les injections de ligand à la plus faible des concentrations testées (0,68 nM) ont provoqué une variation de réflectivité $\approx 0,02$ % uniquement avec les aptamères, pas avec les anticorps. Néanmoins, il faut noter que l'injection suivante de thrombine à 1,36 nM a provoqué des changements de réflectivité allant jusqu'à 0,05% (Figure VI-9 A), soit deux fois plus que lors d'une injection similaire dans PBS ne contenant pas $MgCl_2$ et $CaCl_2$ - ce qui signifie que la LOD pour les anticorps se situe entre 0,68 nM et 1,36 nM. Des expériences spécifiques visant à définir la valeur précise de la LOD n'ont pas été réalisées en raison de la limitation de temps.

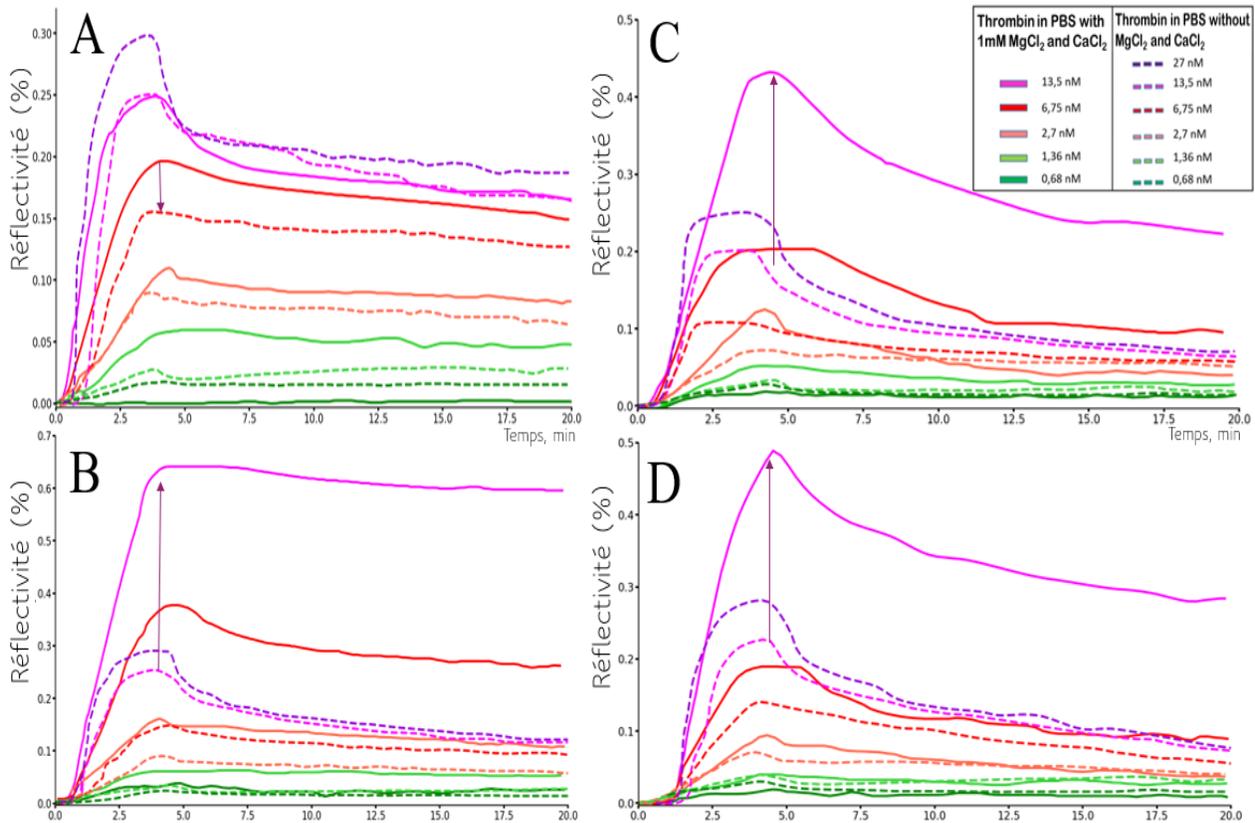


Figure VI-9: Sensorgrammes SPRi obtenus à partir (A) d'anticorps et à partir des aptamères (B) HD22 5'-T10, (C) HD1 3'-T10, (D) HD1 5'-T10 (courbes solides) vs HD1 5'-T5 (courbes pointillés) dirigés contre la thrombine lors d'injections de thrombine à des concentrations croissantes dans le tampon de course PBS avec (courbes solides) et sans (courbes pointillés) 1 mM $MgCl_2$ et $CaCl_2$. Des expériences dans différents tampons de course ont été réalisées sur des biopuces séparées.

La réponse la plus importante a été observée pour l'interaction de la thrombine avec HD22 5'-T10, puis avec HD1 5'-T10 et HD1 3'-T10, la réponse la plus faible a été mesurée à partir des anticorps. Comme l'injection de thrombine 13,5 nM dans le nouveau tampon de course a entraîné une augmentation de la réflectivité deux fois plus importante que celle de l'expérience SPRi dans le PBS sans MgCl₂ et CaCl₂, j'ai décidé de l'utiliser comme concentration maximale injectée.

Il faut noter que l'efficacité des anticorps n'était pas très différente dans les deux tampons de course utilisés (Figure VI-9 A), alors que les interactions de la thrombine avec les aptamères dans le nouveau tampon PBS avec MgCl₂ et CaCl₂ ont entraîné une augmentation de la réflectivité d'au moins un facteur deux pour la même gamme de concentrations testées. L'augmentation significative du niveau de réflectivité mesurée à partir des sites d'anticorps dirigés contre la thrombine, lors l'étape d'association pour 1,36 et 6,75 nM de thrombine injectée, a été contrebalancée par un taux de dissociation accru, d'où des quantités de ligands capturés par affinité similaires. Par conséquent, on peut considérer que la structure et la fonction des anticorps ne sont pas affectées par le contenu du tampon PBS utilisé dans ce travail. On peut remarquer à partir des sensorgrammes que les anticorps dirigés contre la thrombine ont une gamme de concentrations accessibles pour la détection beaucoup plus réduite comparée aux aptamères - l'augmentation des concentrations injectées de 6,75 à 13,5 nM dans le nouveau tampon PBS (avec 1 mM de MgCl₂ et CaCl₂) et de 13,5 à 27 nM pour les injections dans le tampon PBS sans MgCl₂ et CaCl₂ n'a pas entraîné d'augmentation significative de la quantité de protéine retenue. On peut supposer qu'avec des injections de 13,5 à 27 nM de thrombine, nous nous trouvons autour de la saturation de l'anticorps, ce qui définit la limite supérieure de détection de ce récepteur. Des expériences supplémentaires seraient encore nécessaires pour définir la valeur précise des LOD inférieure et supérieure des anticorps dirigés contre la thrombine dans les nouvelles conditions expérimentales.

Les profils cinétiques d'association pour les trois aptamères testés sont similaires (le HD22 5'-T10 présentant la meilleure performance), cependant la différence observée dans la stabilité des complexes formés est notable (Figure VI-9 B-D). La dissociation des deux complexes HD1-thrombine a été beaucoup plus rapide que celle des anticorps et du complexe HD22 5'-T10-thrombine. Il est intéressant de noter que les taux de dissociation des deux aptamères HD1 dans le nouveau tampon de course étaient similaires de ceux du PBS sans MgCl₂ et CaCl₂, tandis que la stabilité du complexe HD22 5'-T10-thrombine a augmenté de manière significative. En outre, il faut souligner que dans les nouvelles conditions expérimentales, HD1 5'-T10 était totalement fonctionnel, contrairement aux résultats obtenus dans le tampon de course PBS sans MgCl₂ et CaCl₂, et son efficacité de liaison était bien meilleure par rapport à HD1 5'-T5 testé précédemment (Figure VI-9 D). Les résultats obtenus permettent d'en déduire que les aptamères HD22 et HD1 5' avec des linkers T10 avaient besoin de la présence des ions Mg²⁺ et Ca²⁺ afin de stabiliser leur structure, pour permettre la reconnaissance et la liaison avec la thrombine, ce qui est cohérent avec les informations rapportées dans la littérature [275], [293]. La reprise de la fonctionnalité par HD1 5' avec T10 a permis de supposer que les longueurs de linker peuvent avoir

un grand impact sur la stabilité et la performance des aptamères, le T10 étant la longueur optimale dans nos conditions expérimentales et pour l'application testées¹.

Dans le but d'évaluer l'affinité de la thrombine pour les différents types de récepteurs, les quantités de ligands retenus par affinité, par unité de surface, ont été calculées pour tous les sites où des récepteurs ont été immobilisés, ainsi que pour l'aptamère contrôle. Comme attendu, HD22 5'-T10 a présenté la meilleure affinité avec la plus grande quantité de thrombine retenue, suivi de HD1 3'-T10, puis de HD1 5'-T10, et enfin par l'anticorps dirigé contre la thrombine (Figure VI-10). HD1 5'-T10 ne fonctionnait que dans le tampon PBS avec MgCl₂ et CaCl₂, alors que dans le PBS sans ces sels, il n'était pas efficace, tandis que HD1 5'-T5 n'était utilisé que dans le PBS sans sels divalents. Par conséquent, l'histogramme montre la comparaison de HD1 5'-T10 à HD1 5'-T5 afin de comparer l'effet de la présence de sels divalents dans le tampon SPRi. La capture non spécifique de ligands par l'aptamère contrôle TC était proche de zéro tout au long des expériences, indépendamment de la concentration de thrombine injectée (Figure VI-10, l'encadré en haut à droite représente un histogramme montrant les interactions non spécifiques entre la thrombine et l'aptamère TC). L'histogramme de la Figure VI-10 montrent une stabilité un peu plus grande des complexes HD1 3'-thrombine par rapport à HD1 5'-thrombine. Par conséquent, on peut supposer que l'immobilisation des aptamères par l'extrémité 3' est plus favorable, au moins pour la stabilité du complexe récepteur-ligand HD1, ce qui entraîne une dissociation plus lente. Rappelons que notre but *in fine* était la création d'un aptasenseur SPRi-MS, or une forte rétention des ligands est un point clé pour la suite - l'identification des ligands par MS. Dans ce contexte, le greffage des récepteurs HD1 par l'extrémité 3' sur la surface du biocapteur présente un net avantage par rapport à l'immobilisation par l'extrémité 5'. Les données relatives aux liaisons (interactions) avec les anticorps de contrôle, ou avec la surface passivée, ne sont pas fournies, car la capture non spécifique était égale à celle dans du tampon de course PBS sans MgCl₂ et CaCl₂, également inférieur à la capture par l'aptamère TC (Figure VI-10), et pouvait donc être négligée.

¹ Les résultats obtenus avec tous les aptamères correspondent à ce qui était attendu sur la base de la littérature [170], ainsi le linker T10 a été choisi afin de fournir des conditions expérimentales comparables entre les différents aptamères anti thrombine. HD1 5'-T5 et HD22 5'-T15 n'ont pas été testés dans le nouveau tampon PBS avec 1 mM MgCl₂ et CaCl₂ par manque de temps.

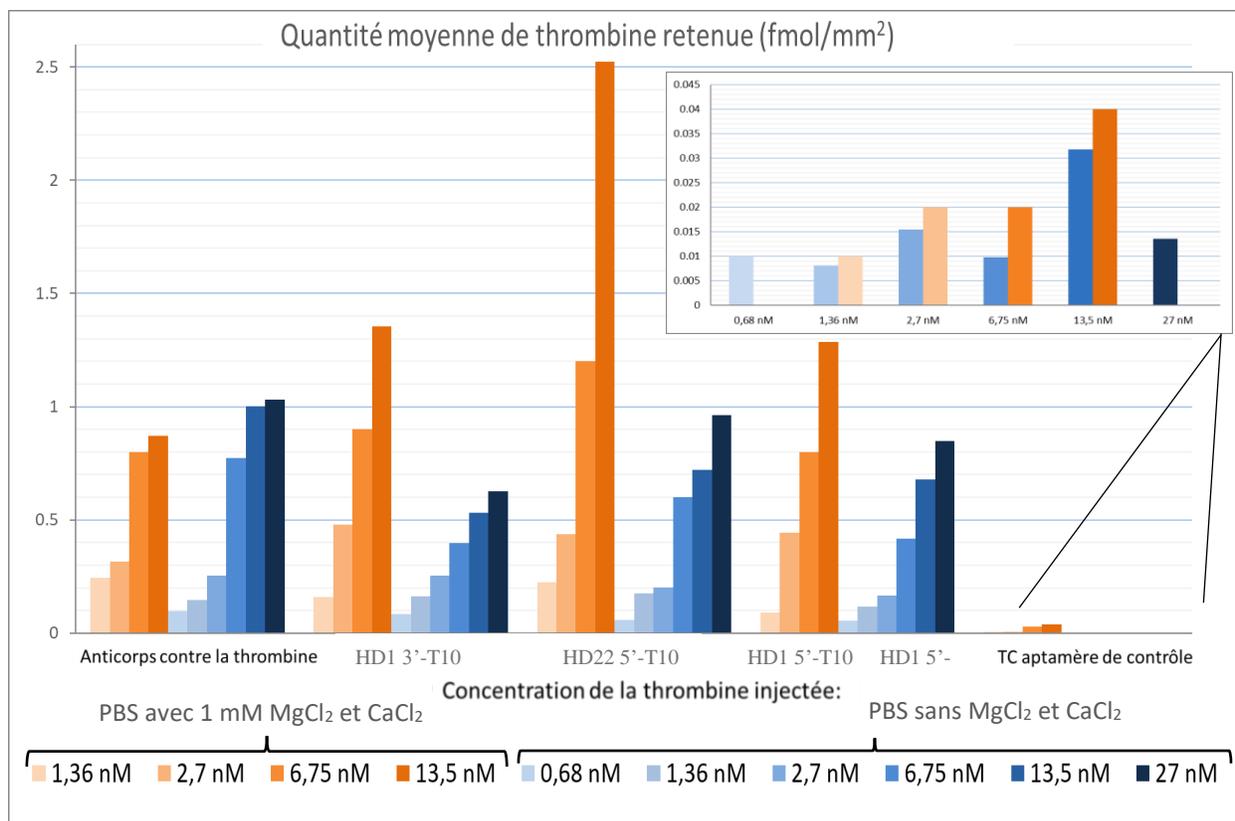


Figure VI-10: Histogramme montrant la densité de surface moyenne de la thrombine retenue par affinité sur les sites de différents récepteurs après des injections de thrombine de concentrations croissantes pendant l'expérience SPRi avec le tampon de course PBS en présence de 1 mM MgCl₂ et CaCl₂ (barres dans les tons oranges) et avec un tampon de course PBS sans MgCl₂ et CaCl₂ (barres dans les tons bleus). En général, plus la couleur des barres est claire, plus la concentration du ligand injecté est faible. L'encadré en haut à droite est une image zoomée de l'histogramme montrant les interactions non spécifiques entre la thrombine et l'aptamère TC (contrôle négatif).

Conclusion pour la détection de la thrombine purifiée en utilisant des microarrays mixtes

La composition du tampon de course SPRi joue un rôle crucial dans la détection de la thrombine par divers récepteurs. L'effet le plus prononcé est celui sur les aptamères – HD1 5'-T10 a retrouvé son activité, et HD22 5'-T10 a augmenté de manière significative sa capacité de liaison dans le tampon de course PBS, en présence de 1 mM MgCl₂ et CaCl₂. Ces aptamères avaient certainement besoin des ions Mg²⁺ et Ca²⁺ pour stabiliser leur structure 3D, ce qui a permis une reconnaissance, suivie d'une capture efficace de la thrombine. Les résultats obtenus sont en accord avec les informations rapportées dans la littérature [275], [293].

L'effet de la composition du tampon était moins important sur la performance de l'anticorps dirigé contre la thrombine – une légère diminution de l'efficacité de capture du ligand a été observée dans le nouveau tampon de course PBS avec MgCl₂ et CaCl₂. L'ajout d'un sel divalent dans le tampon PBS, qui a permis rendre fonctionnels les aptamères HD1 et HD22 avec le linker

T10, a également permis de comparer rigoureusement l'influence du site d'immobilisation (5' ou 3') sur la détection de la thrombine par les aptamères. Par conséquent, pour la caractérisation plus approfondie des microarrays mixtes anticorps/aptamères pour la détection de la thrombine, des aptamères avec la même longueur de linker (T10) ont été sélectionnés: HD1 3'-T10, HD1 5'-T10 et HD22 5'-T10.

VI-3.3.2 Rôle des ions divalents dans la détection de la prothrombine en utilisant des microarrays mixtes

Pour observer la cinétique de liaison de la prothrombine avec les aptamères immobilisés, différentes solutions de prothrombine ont été injectées à des concentrations allant de 0,1 à 1 µg/mL (1,75 nM à 13,8 nM) dans le système SPRi. Puisque les variations de réflectivité pour la prothrombine à 13,8 nM dans le nouveau tampon de course de PBS dépassaient celles obtenues lors d'injections à des concentrations équivalentes ou supérieures à 27,5 nM dans le PBS sans MgCl₂ et CaCl₂, les injections ont été réalisées à une concentration maximale de 13,8 nM. Comme pour les expériences SPRi dans le tampon de course PBS sans MgCl₂ et CaCl₂, une réponse significative a été observée pour l'interaction de la prothrombine avec HD1 3'-T10 et avec HD1 5'-T10 seulement, tandis que la réponse de HD22 5'-T10 et des anticorps, ainsi qu'à partir de tous les contrôles était négligeable et, par conséquent, n'est pas représentée ici.

Une réponse significative (variation maximale de la réflectivité différente des sites contrôles) a été observée à partir d'une injection de prothrombine à la concentration de 1,73 nM (Figure VI-11), ce qui est similaire à la LOD de la détection de la thrombine en présence des sels divalents. Ceci est en accord avec les données de la littérature indiquant que l'affinité de HD1 pour la prothrombine, est comparable à celle de HD1 pour la thrombine [278], [281]. Néanmoins, les affinités des aptamères testés envers la prothrombine sont beaucoup plus faibles que celles envers la thrombine, principalement en raison de la dissociation relativement rapide des complexes formés.

Les profils de la phase d'association de HD1 3' et HD1 5' avec la prothrombine, dans PBS en présence de MgCl₂ et CaCl₂, sont similaires à ceux obtenus dans PBS sans MgCl₂ et CaCl₂, avec toutefois les variations maximales de la réflectivité multipliée par deux environ (Figure VI-11). En outre, les taux de dissociation des complexes de prothrombine avec HD1 5'-T10 et avec HD1 5'-T5 étaient similaires à ceux de HD1 3'-T10-prothrombine dans le PBS sans MgCl₂ et CaCl₂ (comme on peut le voir sur la Figure VI-11, courbes en pointillés correspondent à l'expérience réalisée dans le PBS sans MgCl₂ et CaCl₂), tandis que la durée de vie du complexe prothrombine-HD1 3'-T10 a été significativement augmentée dans le nouveau tampon de course avec sels divalents. Ces données permettent de montrer que l'ajout de MgCl₂ et CaCl₂ à une concentration de 1 mM a amélioré la stabilité des complexes HD1-prothrombine, en augmentant le taux d'association, tout en réduisant les taux de dissociation.

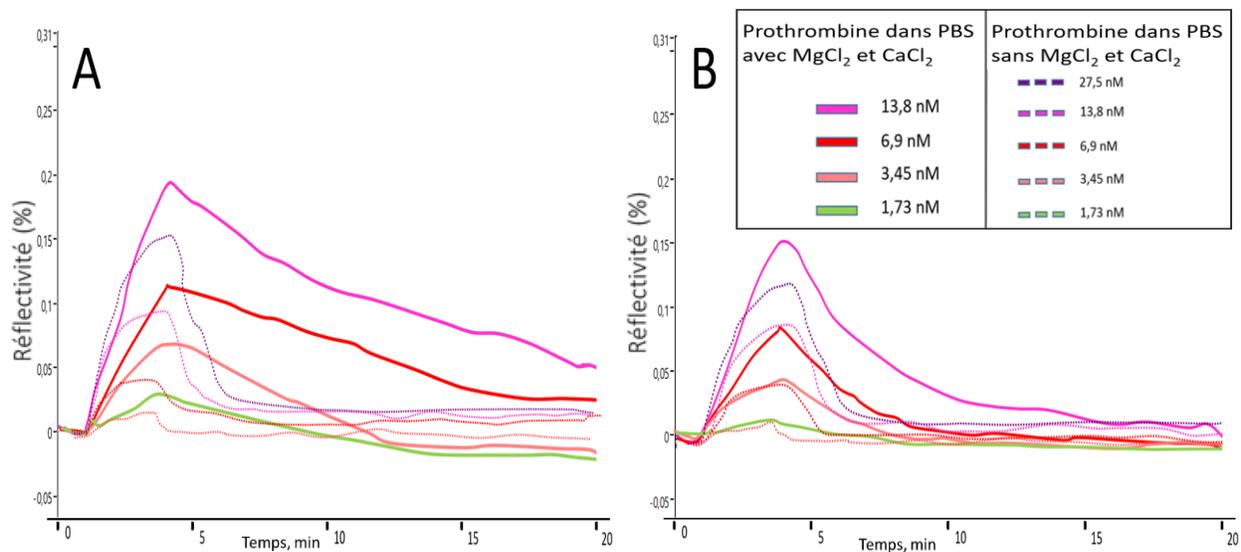


Figure VI-11: Sensorgrammes SPRi des interactions des aptamères HD1 3'-T10 (A), HD1 5'-T10 (B, courbes pleines) et HD1 5'-T5 (B, courbes en pointillés) avec des concentrations croissantes de prothrombine injectée dans du PBS contenant 1 mM de MgCl₂ et CaCl₂ (courbes pleines) et dans le tampon de course PBS sans MgCl₂ et CaCl₂ (courbes en pointillés). La comparaison de l'interaction entre HD1 5' et la prothrombine a été réalisée en utilisant des aptamères avec des longueurs de linker différentes (T10 et T5), car ni l'aptamère avec T5, ni celui avec T10 n'étaient fonctionnels dans les deux tampons PBS. Les expériences dans différents tampons de course ont été réalisées sur des biopuces séparées.

Dans le tampon de course PBS, en l'absence ou en présence de MgCl₂ et CaCl₂, l'affinité de HD1 3'-T10 envers la prothrombine est supérieure à celle de HD1 5'. On peut le constater à la fois en comparant les variations de la réflectivité sur les sensorgrammes (Figure VI-11) et au travers de la quantité de ligand retenu par affinité (Figure VI-12).

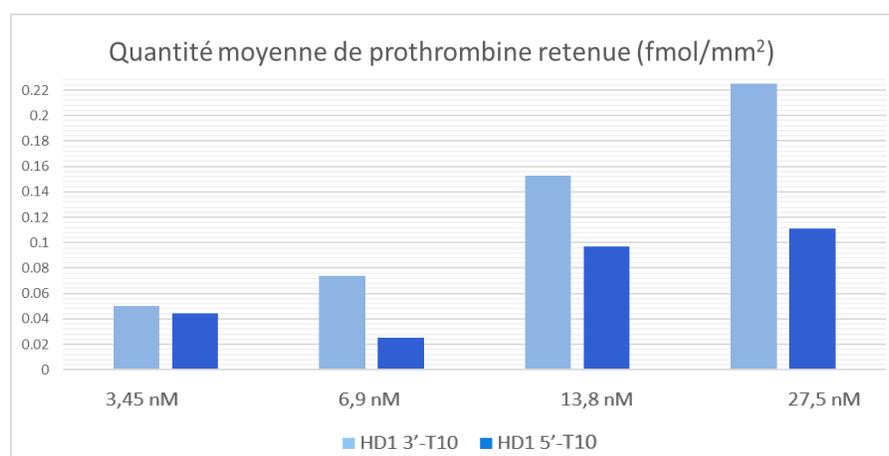


Figure VI-12: Histogramme montrant la densité de surface moyenne de prothrombine retenue par affinité sur les sites des aptamères HD1 3'-T10 (barres bleu claire) et HD1 5'-T10 (barres bleu foncé) lors des injections de concentrations croissantes de la prothrombine pendant l'expérience SPRi dans le tampon de course PBS avec 1 mM MgCl₂ et CaCl₂.

La quantité de prothrombine retenue sur les sites de HD 3'-T10 est environ deux fois plus élevée que celle de HD1 5'-T10 dans le tampon de course PBS en présence de sels divalents. Les données obtenues peuvent s'interpréter de la manière suivante: l'immobilisation via 5' est probablement moins favorable au repliement 3D de l'aptamère HD1, ce qui entraverait la reconnaissance de la prothrombine et diminuerait la stabilité globale du complexe.

VI-3.4 Performance de microarrays mixtes dans des solutions biologiques complexes (conditions réelles): effet de l'albumine

Les aptamères, en tant qu'éléments de détection, sont censés être des oligonucléotides très spécifiques et affins pour leur cible. Leurs caractéristiques d'affinité devraient être les meilleures parmi les récepteurs connus, permettant une détection sélective et sensible de la cible. Néanmoins, avec des fluides complexes comme le plasma ou le sang, contenant diverses biomolécules en quantité, la capture de ligands spécifiques peut être compromise. L'un des principaux inconvénients de la détection à l'aide d'un biocapteur en milieu complexe est, à ce jour, la réactivité croisée avec d'autres ligands [170]. Il est donc important d'étudier la performance des récepteurs anti thrombine dans des conditions réelles, en particulier en présence d'albumines - les protéines plasmatiques les plus abondantes [307].

VI-3.4.1 Effet de la BSA purifiée sur les microarrays mixtes

En conditions réelles, un biocapteur SPRi-MS devra être capable de détecter une protéine cible dans son environnement réel, comme le plasma ou le sang. Il est donc important de savoir comment les aptamères et les anticorps se comporteront dans un milieu aussi complexe. La principale question est la suivante: nos éléments de détection sont-ils suffisamment spécifiques pour distinguer la thrombine d'autres composés présents des fluides complexes? Comme les instruments SPRi ont leurs limites dans les milieux complexes, par exemple la salive [308] ou le plasma [169], les performances des récepteurs doivent d'abord être testées avec un modèle simplifié de fluide biologique.

Afin de modéliser le plasma, les possible interactions des récepteurs immobilisés avec la protéine plasmatique la plus abondante, l'albumine sérique, ont été étudiées [307]. Il a été rapporté que l'albumine sérique était présente à la concentration de 500-700 μM dans le plasma, dans lequel elle présente des propriétés de liaison multifonctionnelles, le rôle le plus important étant consacré au transport de divers composés, c'est-à-dire les hormones, les acides gras, etc. Dans les systèmes SPR, on rapporte souvent que l'albumine sérique développe des interactions non spécifiques avec la surface des capteurs [170], [309]. J'ai décidé d'utiliser la BSA (albumine de sérum bovin) pour cette étude en raison de sa présence en forte concentration, de sa capacité à interagir avec un large éventail de molécules et de son influence sur les performances en SPR, ce qui fait d'elle un candidat potentiel pour des interactions non spécifiques avec les anticorps et les aptamères. La spécificité des aptamères HD1, HD22 et des anticorps spécifiques dirigés contre la thrombine a été vérifiée par l'injection de solutions de BSA à deux concentrations (100 nM et 1 μM) dans un tampon de course PBS en présence de MgCl_2 et CaCl_2 (1 mM). Les sensorgrammes d'interaction des

aptamères (HD1 3'-T10, HD1 5'-T10 et HD22 5'-T10) et des anticorps avec la BSA purifiée sont présentés sur la Figure VI-13.

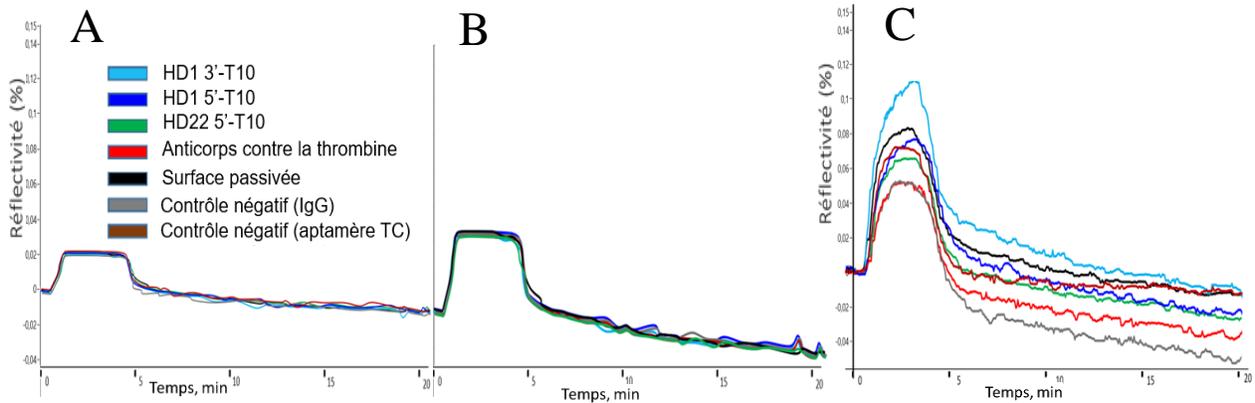


Figure VI-13 Sensorgrammes SPRi des interactions entre les aptamères HD1 3'-T10, HD1 5'-T10, HD22 5'-T10, l'anticorps anti thrombine et la BSA purifiée injectée à 100 nM (A) et 1 µM (B) dans du tampon de course PBS contenant 1 mM de MgCl₂ et de CaCl₂. (C) Injection de BSA dans le tampon de course utilisé pour passiver la surface au tout début de l'expérience SPRi.

Contrairement aux informations rapportées dans la littérature indiquant que des interactions non spécifiques se produisaient entre HD1 et la BSA à partir d'une concentration de 800 nM [169], les interactions suivies par SPRi avec les deux concentrations injectées de BSA (100 nM et 1 µM) ont eu le même résultat, aucune non-spécificité envers la BSA n'a été observée avec les sites de récepteurs et de contrôles dans nos conditions. Le signal non spécifique le plus important a été rapporté dans les travaux de Trapaidze pour une concentration de 3,2 µM [169], ce qui permet de suggérer que l'affinité de la BSA pour HD1 pourrait être de l'ordre du micromolaire. Il faut noter qu'une injection de 200 µg/mL (≈3 µM) a été systématiquement effectuée au début de chaque expérience SPRi comme étape supplémentaire de passivation de la surface PEO-NHS. Un faible niveau d'interactions non spécifiques a été observé avec HD1 3'-T10 et avec la surface PEO-NHS pendant cette injection, mais après l'étape de dissociation, aucune protéine n'a été retenue par affinité sur ces sites (Figure VI-13 C). Compte tenu du fait que cette étape a été réalisée pour assurer une passivation de surface adéquate, ces données ont permis de suggérer que bien qu'il existe une certaine affinité non spécifique entre HD1 et la BSA, elle ne devrait pas influencer notre détection de la thrombine. En outre, les travaux mentionnés ci-dessus montrent clairement l'avantage de notre chimie de surface par rapport aux puces de dextrane. Comme la BSA est une protéine homologue de l'albumine sérique humaine (HSA), on peut supposer que l'effet observé avec la BSA devrait être équivalent à celui de la HSA.

VI-3.4.2 Effet de la BSA purifiée sur la détection de la thrombine en utilisant des microarrays mixtes

La sélectivité des aptamères (HD1 3'-T10, HD1 5'-T10 et HD22 5'-T10) et de l'anticorps spécifique dirigés contre la thrombine a été évaluée après des injections de thrombine purifiée à

des concentrations de 2,7 et 13,5 nM, contenant de 100 nM à 1 μ M BSA. Les sensorgrammes SPRi correspondants sont indiqués sur la Figure VI-14.

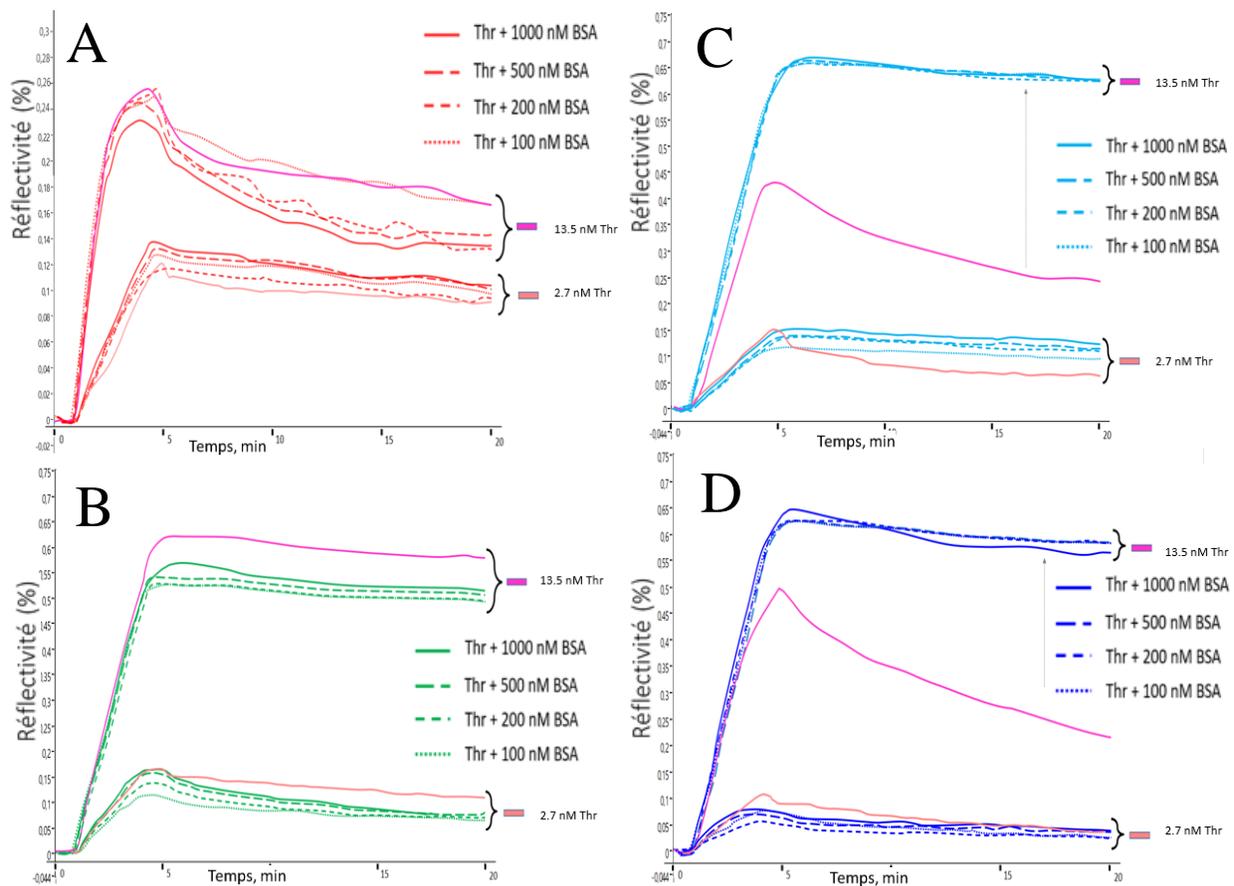


Figure VI-14: Sensorgrammes SPRi obtenus à partir d'anticorps anti thrombine (A, courbes rouges) et des aptamères HD22 5'-T10 (B, courbes verts), HD1 3'-T10' (C, courbes bleu claire), HD1 5'-T10 (D, bleu foncé) après des injections de concentrations croissantes de 100 nM à 1 μ M de BSA dopées avec de la thrombine (Thr) de 2,7 nM et 13,5 nM dans le tampon de course PBS en présence de 1 mM MgCl₂ et CaCl₂. Des ensembles de courbes expérimentales pour chaque concentration de thrombine co-injectée avec la BSA sont séparés par des accolades; la thrombine pure injectée sans BSA est représentée en magenta (courbes solides). Les interactions des aptamères HD1 avec la thrombine 13,5 nM en présence de BSA ont démontré une augmentation significative du niveau de variation de la réflectivité, ainsi la position des ensembles de sensorgrammes par rapport à l'injection de même concentration de thrombine pure est indiquée par des flèches.

La présence de BSA dans le tampon de course a eu un léger effet interférent sur l'association de la thrombine avec l'aptamère HD22 5'-T10 et avec l'anticorps contre la thrombine, tandis que les interactions avec les deux HD1 ont été sérieusement affectées. A partir des sites de HD22 5'-T10 et des sites d'anticorps spécifiques dirigés contre la thrombine, l'injection de thrombine à deux concentrations 2,7 et 13,5 nM, co-injectée avec 100 à 1000 nM de BSA, a montré une réponse plus faible que la même concentration de thrombine pure, la différence observée dans

les signaux étant inférieure à 10%. On peut supposer que la reconnaissance des ligands est légèrement entravée en présence de BSA, mais que toutes les autres propriétés de liaison sont préservées.

L'impact de la BSA sur la détection de la thrombine par HD1 5'-T10 a été similaire à celui observé avec l'anticorps spécifique pour une faible concentration de thrombine (2,7 nM), tandis que pour HD1 3'-T10, il a provoqué une légère amplification du signal. L'influence de la BSA co-injectée était beaucoup plus importante pour la thrombine de 13,5 nM (Figure VI-14 C-D). Le niveau de variation de la réflectivité observé a été multiplié par deux pour toutes les concentrations de BSA co-injectées. Tous les aptamères ont été immobilisés sur la même surface de biocapteur et ont été soumis à la même solution circulante en même temps, mais cette augmentation du signal n'a été observée qu'avec les aptamères HD1. Par conséquent, une telle augmentation de la réflectivité ne peut être imputée aux sauts de l'indice de réfraction global liés aux différences de tampons. Elle doit donc refléter la contribution de liaisons non spécifiques, qui n'ont jamais été observées jusqu'à présent. Je suppose qu'une telle amplification du signal pourrait être liée, soit à la capture non spécifique de la BSA en présence de la thrombine, soit à la liaison non spécifique de la BSA aux complexes thrombine-HD1. Une analyse par MS a été réalisée afin d'identifier le ligand capturé par affinité et de découvrir la cause des effets observés. Les résultats de ces expériences seront présentés dans la partie suivante de ce chapitre.

Les quantités de ligands retenus par affinité par unité de surface ont été calculées à partir de tous les sites où des récepteurs ont été immobilisés, ainsi qu'à partir des sites de contrôle. La hausse de la concentration en thrombine (de 2,7 à 13,5 nM), conduit à une capture plus importante avec les aptamères qu'à partir des anticorps. HD22 5'-T10 est l'aptamère dont la capture est la moins perturbée par la présence de la BSA (Figure VI-15). Cet effet peut être causé par l'entrave à la reconnaissance des ligands spécifique ou par une capture non spécifique de BSA co-injectée par HD1.

Les résultats obtenus confirment que le HD22 5'-T10 est le seul aptamère qui convient sans conditions particulières au développement d'un biocapteur de thrombine. La capture du ligand non spécifique par TC était proche de zéro pendant toute l'expérience, indépendamment des concentrations de protéines injectées (Figure VI-14, Figure VI-15). Les données relatives à la capture par les sites de surface passivées et par sites d'anticorps de contrôle ne sont pas représentées, car le niveau de liaison non spécifique était inférieur à celui du TC.

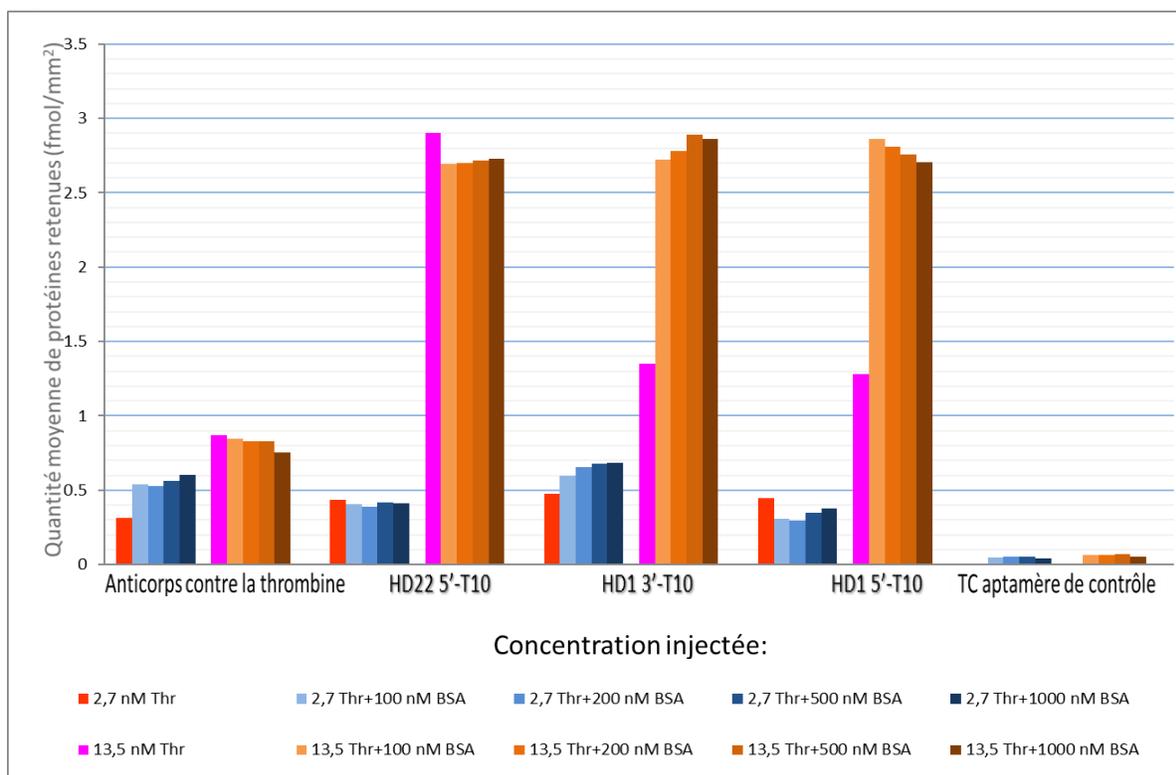


Figure VI-15: Histogramme montrant la densité de surface moyenne de ligand retenu par affinité sur les différents récepteurs de la thrombine après des injections de concentrations croissantes de BSA de 100 nM à 1 µM, dopées avec de la thrombine (Thr) de 2,7 nM et 13,5 nM, dans le tampon de course PBS en présence de MgCl₂ et CaCl₂ (1 mM). Les résultats pour les solutions de BSA dopées avec 2,7 nM Thr (barres dans les tons de bleu) et pour les solutions dopées avec 13,5 nM Thr (barres dans les tons d'orange) sont représentés à côté des résultats pour l'injection de 2,7 nM Thr pure (barres rouges) et de 13,5 nM Thr pure (barres magenta). En général, plus la couleur des barres est foncée, plus la concentration de BSA injectée est importante.

VI-4 Analyse MALDI-MS des microarrays pour la détection de la thrombine

Après les expériences SPRI, l'imagerie MALDI-TOF MS (MALDI-TOF MSi) a été systématiquement employée dans le but d'identifier le ligand capturé. Les biopuces extraites de l'appareil SPRI et rincées à l'eau MilliQ ont été séchées avec un flux d'air avant le dépôt de la matrice HABA. Cette procédure a été effectuée pour tous les tampons de course utilisés pour SPRI. La matrice a été appliquée sur chaque site de la biopuce, ainsi que sur certaines surfaces passivées (afin d'avoir un contrôle positif). Tous les sites couverts par la matrice ont été balayés et les spectres de masse obtenus de chacune des zones de tir laser ont été moyennés sur la ROI pour produire un seul spectre de masse résultant pour chaque spot. Le résultat de l'imagerie MALDI-TOF a été représenté sous la forme d'une photo de la surface de biopuce superposée avec la distribution de

l'intensité des ions pour toute valeur m/z sélectionnée (filtre de masse). Après l'analyse MSi, chaque ROI a été soumise à une interrogation manuelle supplémentaire (toujours en MALDI-MS).

Les résultats typiquement obtenus par MSi à partir de microarrays constitués de récepteurs anti thrombine (suite à l'expérience SPRi dans un tampon de course PBS sans MgCl₂ et CaCl₂) avec un filtre de masse positionné à m/z 36534 (ion [M+H]⁺ de la thrombine sur les spectres de masse) sont représentés ci-dessous (Figure VI-16). Des signaux à m/z 17968 [M+2H]²⁺ et 36534 [M+H]⁺, qui correspondent à des ions de thrombine doublement et simplement chargés, ont été observés à partir de tous les aptamères testés et de l'anticorps spécifique anti thrombine. L'application d'un filtre de masse a permis de mettre en évidence les sites de capture de la thrombine. Cependant, la coloration de la ROI #10 (Figure VI-16 A) correspondant au site de TC (contrôle négatif) a été causée par un niveau de bruit élevé sur le site où de la matrice a cristallisé de manière hétérogène. La réduction de la couche de matrice après le premier balayage laser pour l'imagerie MALDI-TOF a influencé l'efficacité de l'ionisation des ligands, donc les interrogations supplémentaires par MS effectuées sur le même microarrays n'ont apporté rien.

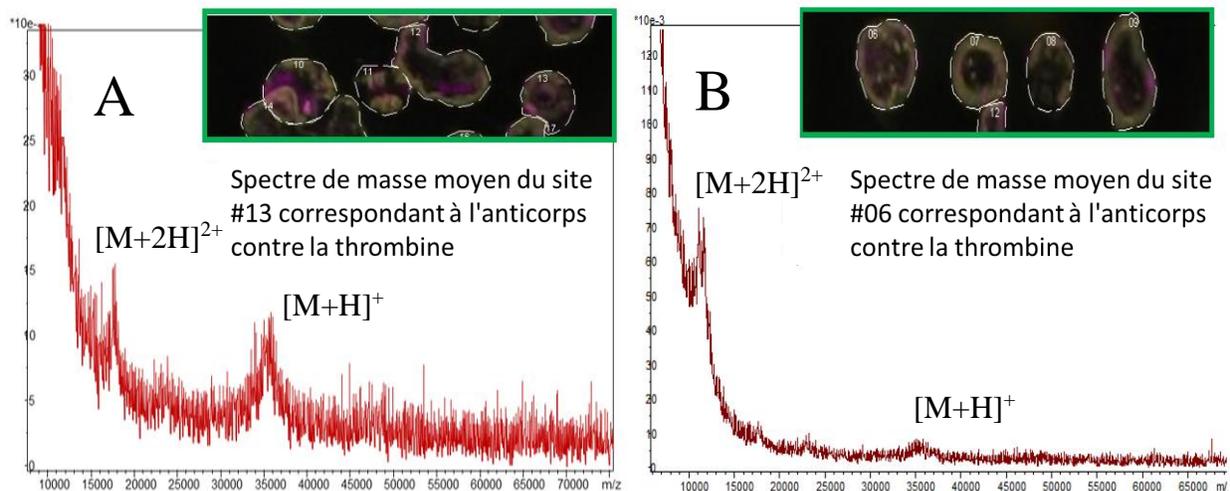


Figure VI-16: Résultats de l'imagerie MALDI-TOF MS obtenus directement à partir de la surface des microarrays conçus pour la détection de la thrombine (chimie PEO-NHS) après une expérience SPRi réalisée avec comme tampon de course PBS sans MgCl₂ et CaCl₂. Un filtre de masse de couleur magenta a été appliqué afin de montrer la distribution des ions sur les ROI analysées (numérotées et délimitées par une ligne pointillée). Les spectres de masse (A) et (B) correspondent aux sites d'anticorps de thrombine #13 et #06 respectivement. Chaque spectre de masse représenté est la moyenne des spectres de masse obtenus à partir de ROI indiqué.

Une analyse par imagerie MALDI-TOF des biopuces après SPRi « ligand-fishing » a aussi été effectuée dans du PBS contenant 1 mM de MgCl₂ et de CaCl₂. Malheureusement, aucun signal n'a été observé, à partir des sites d'aptamère ou des sites d'anticorps immobilisés. L'interrogation manuelle suivante de la surface par MS (même microarray), n'a apporté aucune amélioration. Seules des traces de thrombine ont été identifiées, le signal émergeant très faiblement du bruit de fond (Figure VI-17 A). Compte tenu de l'augmentation de la quantité de ligand capturé d'environ deux fois dans le tampon PBS en présence de sels divalents, par rapport au même tampon

sans $MgCl_2$ et $CaCl_2$, la dégradation du signal de détection en MS peut paraître surprenante. La cause la plus probable semble être un mauvais rendement de désorption-ionisation, probablement causé par la présence des sels retenus sur la surface du capteur après les expériences SPRI menée avec un tampon PBS avec $MgCl_2$ et $CaCl_2$. On peut remarquer que la détection de la β -lactoglobuline n'a pas été trop affectée dans des conditions similaires, cela est certainement dû à la taille plus réduite du ligand retenu par l'affinité ($\sim 18,4$ kDa pour la β -lactoglobuline par rapport à $\sim 36,7$ kDa pour la thrombine).

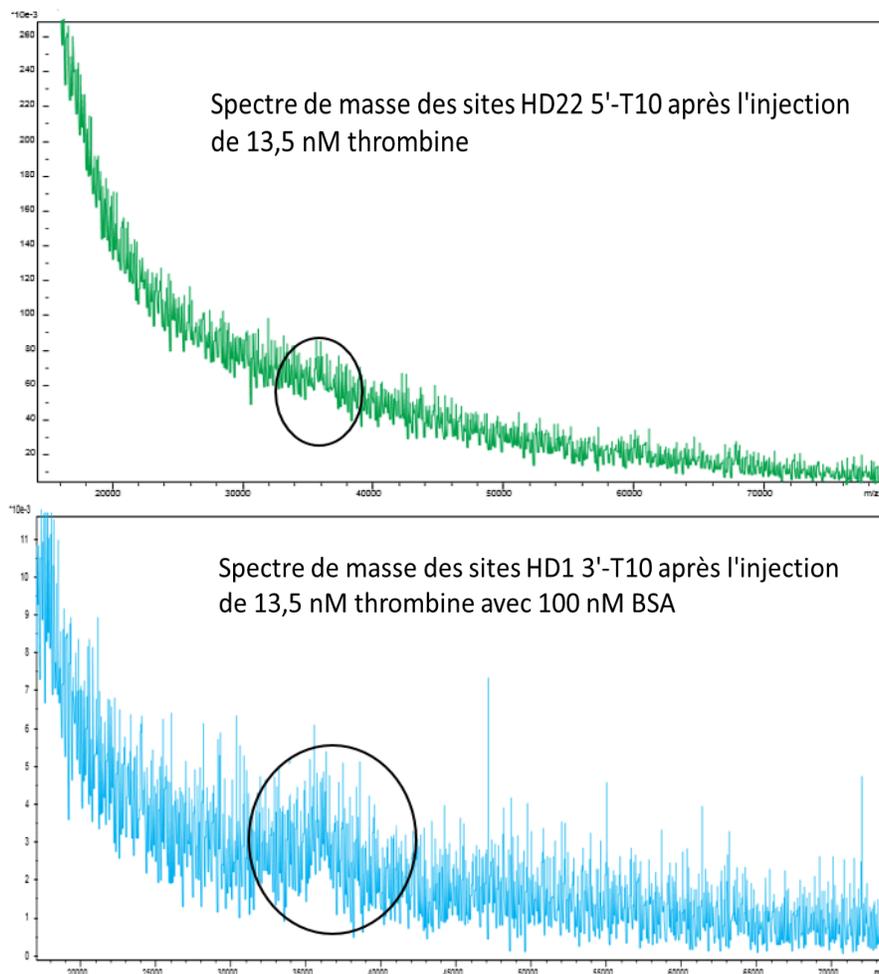


Figure VI-17: Résultats de l'analyse par MALDI-TOF MS obtenus après l'expérience SPRI dans un tampon de course PBS avec 1 mM $MgCl_2$ et $CaCl_2$ directement à partir de la surface des microarrays pour la détection de thrombine (chimie PEO-NHS). (A) Spectre de masse typique obtenu à partir des sites d'aptamère HD22 5'-T10 après injection de thrombine 13,5 nM pure dans le tampon de course. (B) Spectre de masse typique obtenu à partir des sites d'aptamère HD1 3'-T10 suite à l'injection de thrombine 13,5 nM co-injectée avec 1000 nM de BSA.

Comme la détection par MS de la thrombine a été possible à partir de tous les sites où des récepteurs ont été immobilisés en utilisant comme tampon de course du PBS sans $MgCl_2$ et de $CaCl_2$, les résultats observés par MS en présence de sels doivent être liés soit de l'ajout de $MgCl_2$,

soit de CaCl_2 (ou des deux) au tampon de course SPRi. Ceci est en accord avec les informations de la littérature qui indiquent que les sels dans les tampons peuvent entraver la détection par MS, et en particulier empêcher la cristallisation de la matrice et l'ionisation en MALDI-TOF [310]. Toutefois aucune différence dans le dépôt et le séchage de la matrice n'a été observée après les expériences SPRi avec le tampon de course PBS en présence de sels divalents. L'échec de la détection par MS serait être lié aux quantités de sels retenus sur la surface du capteur après les expériences cinétiques malgré le rinçage à l'eau.

J'ai également effectué une analyse par imagerie MALDI-TOF sur les biopuces utilisées pour l'évaluation des microarrays pour la détection de la thrombine en présence de BSA. Comme pour les résultats obtenus précédemment, aucun ion provenant de la thrombine ou de toute autre protéine n'a été détectée à la suite des expériences SPRi dans un tampon PBS contenant 1 mM de MgCl_2 et de CaCl_2 (données non présentées). L'interrogation de la surface par MS a permis d'obtenir un signal unique à m/z 36534 correspondant à l'ion $[M+H]^+$ de la thrombine. Cet ion n'a été détecté qu'à partir des sites HD1 3'-T10, aucun autre site où un récepteur a été immobilisé, n'a permis de détecter le ligand retenu. La thrombine a été capturée par affinité avec la surface lors de la co-injection avec un excès de BSA (13,5 nM de thrombine avec 1000 nM de BSA). Par conséquent, la détection par MS à partir des sites HD1 3'-T10 est en accord avec les données SPRi, qui ont démontré une importante amplification du signal pour les sites aptamères HD1 indépendamment de la concentration en BSA injectée. L'absence d'ions de la BSA sur les spectres de masse, malgré une concentration injectée relativement élevée, peut servir soit de preuve d'une bonne sélectivité des récepteurs anti thrombine, soit d'une indication des difficultés de l'ionisation du BSA dans les conditions expérimentales décrites.

Conclusions sur la détection de la thrombine par des microarrays en présence de BSA

Le comportement des aptamères en présence d'un excès de la protéine plasmatique la plus abondante, la BSA, a été étudié. L'injection de 3 μM de BSA purifiée utilisée pour l'étape de passivation supplémentaire a provoqué des interactions non spécifiques avec HD1 3'-T10, tandis que les injections suivantes à des concentrations inférieures n'ont provoqué aucune réponse. Néanmoins, la co-injection de BSA avec de la thrombine à une faible concentration (2,7 nM) a induit une diminution du signal (environ 10%), par rapport à une injection de thrombine seule, depuis tous les récepteurs testés à l'exception de HD1 3'-T10, qui a montré une légère augmentation du signal. Cet effet peut être attribué à une légère interférence lors de la reconnaissance des ligands par des récepteurs, en présence de concentrations excessives de BSA. Des injections de thrombine (13,5 nM) avec différentes concentrations de BSA ont eu un effet similaire sur la capture par HD22 5'-T10 et par les anticorps spécifiques dirigés contre la thrombine, alors que ces injections ont provoqué une amplification significative du signal avec les deux aptamères HD1 testés. Ceci pourrait être lié à la probable liaison non spécifique de la BSA au complexe HD1-thrombine formé.

L'identification du ligand retenu à la surface du biocapteur par MALDI-TOF MS a été rendu plus difficile dans le nouveau tampon de course PBS contenant des sels divalents ajoutés.

Seules des quantités infimes de thrombine ont été détectées depuis les sites aptamères après une injection de thrombine pure (13,5 nM) dans SPRi. La présence d'un excès de BSA lors de l'injection de thrombine a également eu un effet sur la qualité de la détection par MS, un seul signal (correspondant à la thrombine protonée à m/z 36534) présentant un faible rapport signal/bruit a été obtenu à partir de sites de HD1 3'-T10. La BSA n'a jamais été détectée, à partir d'aucun des sites où des récepteurs ont été immobilisés, ou des sites de contrôle. Ce résultat est en accord avec les données issues des expériences SPRi et peut servir de preuve de la bonne affinité et de la sélectivité des aptamères, permettant ainsi son utilisation ultérieure pour le développement d'un biocapteur applicable à la détection de la thrombine dans les fluides complexes.

Le seul aptamère nécessitant un simple ajustement du tampon de course était HD22 5'-T10 dans les conditions étudiées, il s'agissait du seul récepteur dont la capture de ligand lors du suivi SPRi n'était pas influencée par la présence de concentrations relativement élevées de BSA. Il est probable que la reconnaissance de son ligand ait été affectée, mais la différence d'interactions des récepteurs avec la thrombine seule par rapport à la co-injection thrombine/ BSA est restée dans une fourchette de 10 % pour toutes les concentrations testées.

Compte tenu de la détection limitée en MS suite aux expériences SPRi réalisées dans le tampon de course PBS en présence de 1 mM de $MgCl_2$ et de $CaCl_2$, une procédure de nettoyage supplémentaire devrait être mise au point pour permettre d'éliminer plus efficacement les sels de la surface du biocapteur. En outre, l'influence précise de chaque sel ajouté sur la détection SPRi-MSi nécessite une étude plus approfondie.

Chapter VII. Nanocorps pour le couplage SPRi-MS

VII-1 Nanocorps pour le couplage SPRi-MS

Le principal objectif de cette série d'expériences était d'évaluer la possibilité d'utiliser des anticorps de camélidés à domaine unique (aussi appelés "nanocorps") comme nouveaux récepteurs pour le couplage SPRi-MS. La sensibilité en SPRi (et la sensibilité de l'analyse qui suit par MALDI-TOF des ligands retenus) dépend de la quantité de ligand capturé par les récepteurs à la surface de la biopuce au format microarray. Les anticorps classiques (MW ~150 kDa) ont deux sites de capture d'antigènes, mais sont de grande taille comparés aux nanocorps, qui comme un anticorps entier, sont capables de se lier sélectivement à un antigène spécifique, alors que leur taille est seulement d'environ 12 à 15 kDa. La taille plus petite et la structure à domaine unique font de ces molécules des récepteurs très attrayants pour le couplage SPRi-MS car l'augmentation de la quantité d'antigènes capturés par unité de surface pourrait augmenter l'efficacité et la sensibilité globales de l'analyse SPRi-MS; c'est pourquoi il a été décidé de tester les nanocorps et de comparer leurs performances aux anticorps disponibles dans le commerce.

Des anticorps de camélidés à domaine unique (R3VQ-SH) qui reconnaissent spécifiquement les dépôts amyloïdes extracellulaires ont été synthétisés et fournis gracieusement par le professeur P. Lafaye (Institut Pasteur, CITECH, Plateforme d'Ingénierie des Anticorps). Les anticorps monoclonaux correspondants (β -amyloïd 17-24 OptimAb (4G8)) ont été achetés à Eurogentec (France) à des fins de comparaison. Le couple anticorps/antigène β -lactoglobuline a été utilisé comme modèle pour permettre une comparaison, et aussi pour s'assurer des bonnes conditions expérimentales. Tous les anticorps ont été immobilisés à 6 μ M, tandis que les concentrations en nanocorps utilisés pour le greffage sur la surface, variaient de 6 μ M à 46,5 mM (concentration de la solution mère utilisée sous forme non diluée).

VII-1.1 Détection SPRi-MS avec des nanocorps immobilisés directement sur l'or

Tout d'abord, il a été décidé d'immobiliser les nanocorps fraîchement reçus directement sur la surface de l'or de la biopuce sans fonctionnalisation préalable avec la chimie de surface, puisque ces molécules possèdent un groupe -SH qui peut normalement se lier efficacement à l'or de la surface de la biopuce. 500 μ L de solution de nanocorps ont été déposés pour couvrir toute la surface de la biopuce. L'essai d'immobilisation semble avoir été efficace - il a été relativement facile de distinguer la zone couverte par les nanocorps de la surface libre (Figure VII-1), ce qui peut témoigner de la liaison des nanocorps à la surface du capteur.

Afin de vérifier l'hypothèse d'une immobilisation efficace des nanocorps, l'étape suivante a consisté à tester les interactions ligand-récepteur en SPRi. Au cours de l'expérience SPRi dans un tampon de course d'acétate d'ammonium, des interactions entre R3VQ-SH et le peptide β -amyloïde (A β 1-40) ont été observées, mais il était difficile de savoir si l'accumulation de masse observée était spécifique ou non (Figure VII-1), en raison de variations importantes du niveau de réflectivité des différentes zones couvertes par les récepteurs.

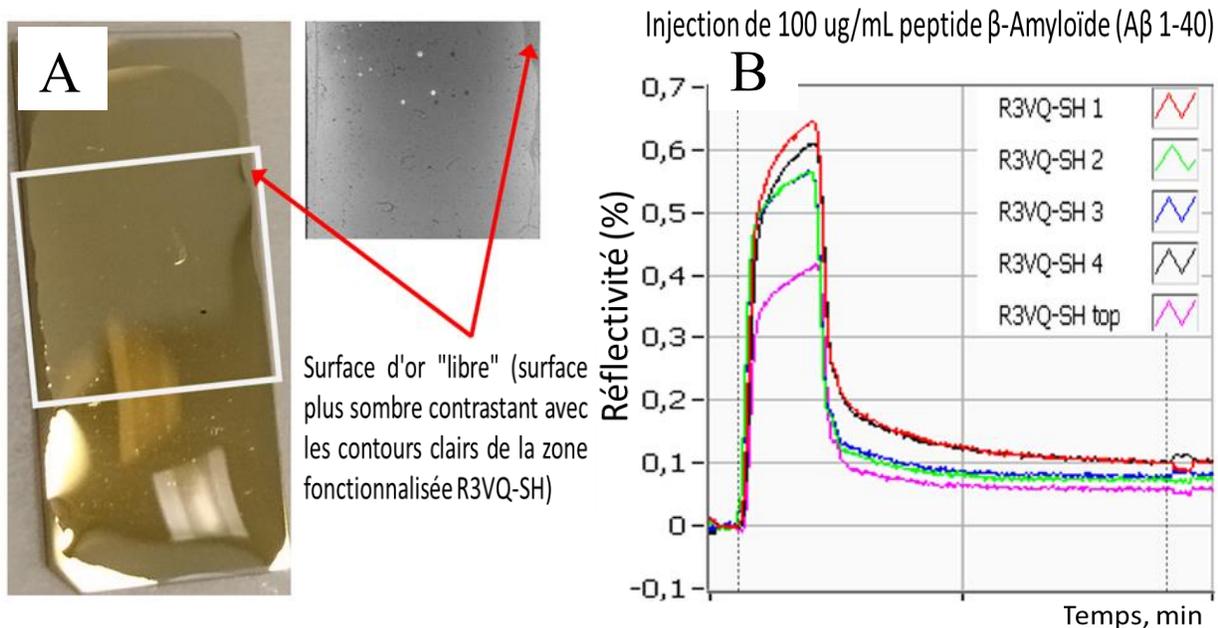


Figure VII-1: (A) Immobilisation d'anticorps de camélidés à domaine unique (R3VQ-SH) sur toute la surface de la biopuce, les flèches rouges indiquant les bords de la zone couverte de liquide et la différence entre la surface d'or fonctionnalisée par R3VQ-SH et la zone non fonctionnalisée. (B) sensorgrammes SPRi obtenus après injection de 150 μ l de peptide β -amyloïde commercial purifié à 100 μ g/ml ($A\beta$ 1-40). Les courbes ont été obtenues à partir de sites de même taille et de même type, seul l'emplacement des sites était différent.

L'analyse MALDI-TOF et la cartographie des ROIs par MSi ont également été compliquées, en raison des difficultés liées à l'application de la matrice - les gouttelettes de matrice fusionnaient spontanément sur la surface uniformément fonctionnalisée. Néanmoins, des spectres de masse prouvant l'accumulation de peptides amyloïdes sur la surface de la biopuce ont été obtenus suite à l'injection de 100 μ g/mL $A\beta$ 1-40 (Figure VII-2). Un filtre de masse de couleur magenta a été appliqué pour montrer la distribution de $A\beta$ 1-40 sur les sites où un récepteur a été immobilisé, ainsi la coloration jeune-marron de la ROI correspond aux sites de contrôle, où il n'y avait pas de récepteur immobilisé.

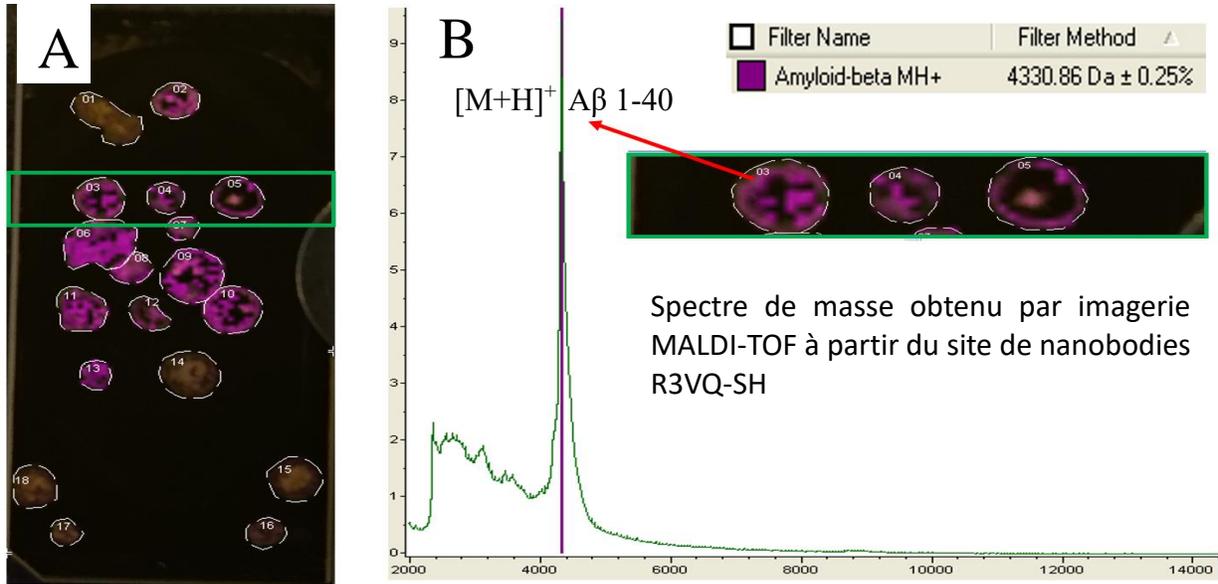


Figure VII-2: Résultats de MALDI-TOF MSi obtenus suite à une expérience SPRI menée avec un tampon d'acétate d'ammonium directement à partir de la surface de la biopuce uniformément fonctionnalisée avec des nanocorps R3VQ-SH dirigés contre le peptide amyloïde (sans la chimie PEO-NHS). (A) Photo de la surface de la biopuce superposée avec la répartition des ions sur les ROIs analysés (numérotés et délimités par une ligne pointillée). (B) Spectre de masse correspondant à la moyenne des spectres de masse obtenus à partir du ROI #03 indiqué. C'est un spectre de masse typique obtenu pour chaque ROI de couleur magenta. Tous les autres ROI (A, sites jeune-marrons aux coins de la photo de la biopuce) correspondent à des sites de contrôle à partir desquels aucun ion n'a été détecté (spectres de masse correspondants non présentés).

Ensuite, j'ai essayé d'améliorer l'efficacité d'immobilisation des nanocorps (afin d'éviter les différences entre les sites) et de vérifier un possible effet de la passivation de surface sur le processus de détection SPRI-MSi et sur le dépôt de matrice. Une biopuce au format microarray à nanocorps a été préparée à partir de récepteurs déposés avec et sans 5% de glycérol (Figure VII-3). Au début de chaque expérience SPRI, après l'immobilisation de R3VQ-SH, une étape de passivation de la surface "libre" (ou non fonctionnalisée) a été ajoutée. Plusieurs molécules (L-Cystéine, saccharose et BSA) ont été testées, mais aucune d'entre elles n'a été efficace (Figure VII-3). En outre, un problème de régénération de la surface après l'injection de la solution de passivation a été rencontré: une solution aqueuse contenant 0,1 M glycine-HCl, pH 2,0 a d'abord été utilisée, sans que cela soit efficace, l'utilisation de NaOH 50 mM n'a pas non plus apporté d'amélioration. On peut supposer que la L-Cysteine se lie à la surface non modifiée du capteur et peut probablement remplacer les nanocorps, ainsi après injection de glycine, les nanocorps sont éliminées de la surface (ce qui aura conduit à une baisse significative du niveau de variation de la réflectivité en SPRI, Figure VII-3).

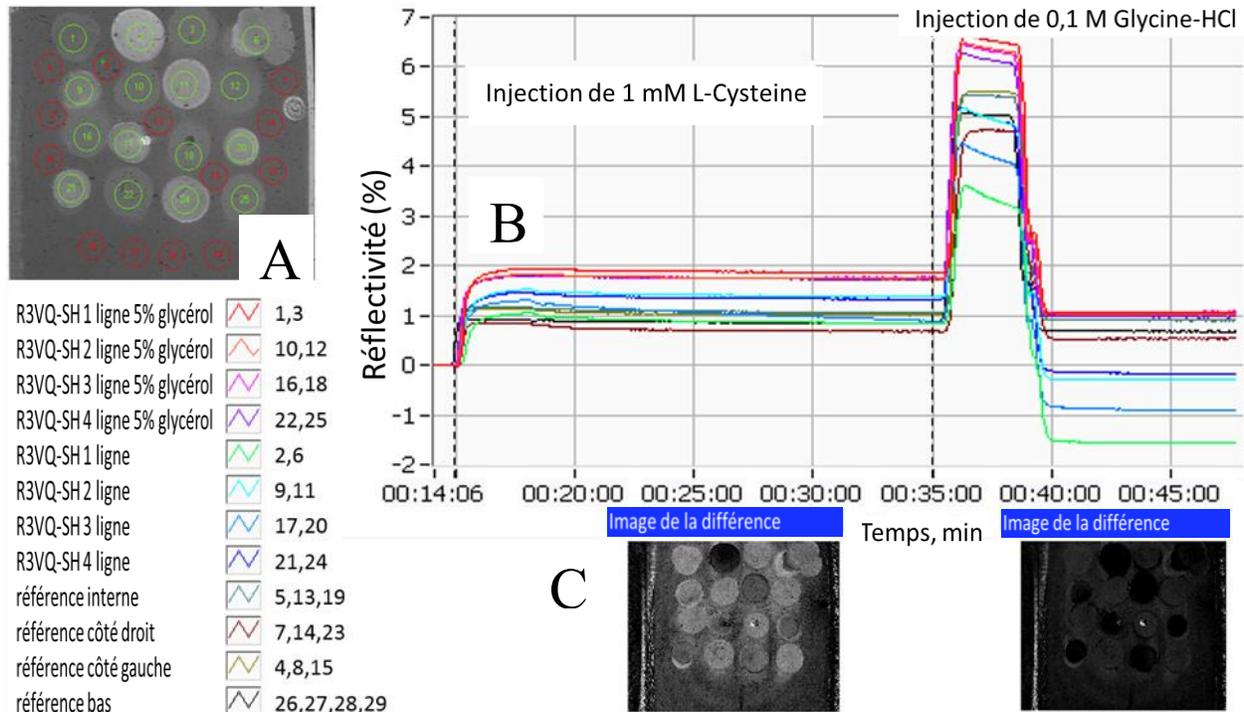
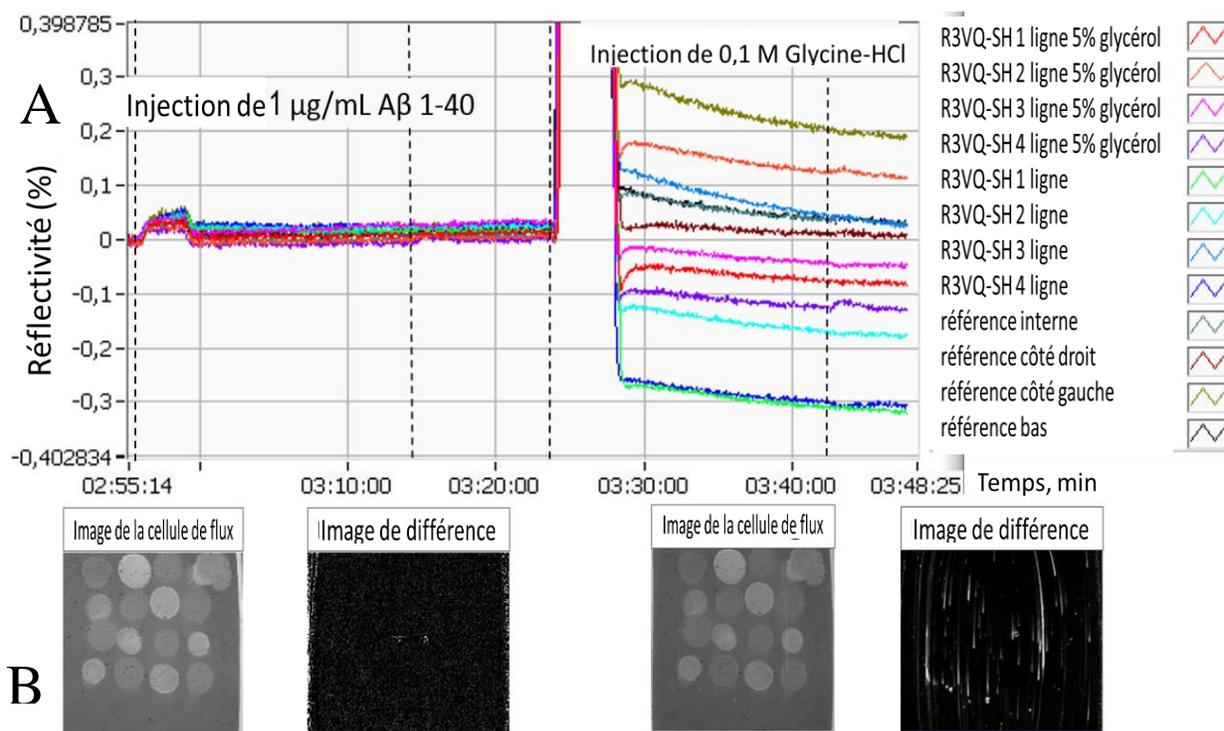


Figure VII-3: A gauche (A), photo de la surface de la biopuce superposée à la carte des ROIs sélectionnés (cercles verts – sites des récepteurs nanocorps R3VQ-SH greffés sur la surface de la biopuce et cercles rouges - sites contrôle). Les sites plus lumineux sur la photo de la surface correspondent à des nanocorps immobilisés dans une solution mère et les sites plus foncés - à des sites contenant en plus 5 % de glycérol. (B) Sensorgrammes SPRi obtenus après injection de 150 μ L d'une solution de L-Cystéine (1 mM) dans le tampon de course, suivie d'une régénération avec 0,1 M de glycine-HCl pH 2,0. (C) Deux images de différence sont représentées, l'une après injection de L-Cystéine et l'autre après régénération par de la glycine. Ces images ont été obtenues par le système SPRi lors de l'étape de dissociation après chaque injection, reflétant ainsi l'accumulation de masse (zones et ROIs lumineux) ou l'élimination de masse à partir de la surface du capteur.

L'un des problèmes majeurs, restait cependant, l'impossibilité de régénérer la surface après l'injection de A β 1-40 (Figure VII-4). Indépendamment du contenu et de la concentration de la solution de régénération utilisée, j'ai observé l'apparition de points irréguliers et de bandes sur la surface de la biopuce en SPRi, qui pourraient être le résultat d'une liaison non spécifique de la surface avec la protéine amyloïde. Cela peut également être lié à une passivation inefficace de la surface, c'est pourquoi les conditions expérimentales ont nécessité des ajustements supplémentaires.

Afin de greffer les récepteurs plus efficacement, une solution de tris (2-carboxyéthyl) phosphine (TCEP) pourrait être utilisée, elle peut éliminer la liaison S-S formée dans la solution mère de R3VQ-SH, augmentant ainsi le nombre de groupes thiol disponibles pour la formation de la liaison Au-S. Cependant, la TCEP est incompatible avec les tampons phosphate et ne peut pas résoudre le problème de l'accumulation non spécifique d'amyloïde- β à la surface de la biopuce. Pour résoudre ce dernier problème, on pourrait envisager d'immobiliser une monocouche à base

de MUA sur la surface contenant des sites de nanocorps préalablement greffés, ce qui devrait permettre de passiver la surface non fonctionnalisée et d'éviter la liaison non spécifique de la protéine amyloïde. Quels que soient les résultats que l'on pourrait obtenir avec la réduction de la liaison S-S et la couverture de surface par du MUA, le design expérimental proposé ne pourra pas permettre de comparer les nanocorps aux anticorps conventionnels, en raison des différences dans la chimie d'immobilisation et les conditions expérimentales requises. Par conséquent, une nouvelle approche expérimentale est nécessaire pour atteindre des conditions qui satisfassent aux deux types de récepteurs.



VII-1.2 Détection SPRi-MS en utilisant des microarrays pour la détection de d'amyloïde sur PEO-NHS SAM

Il a été décidé d'utiliser notre chimie de surface conventionnelle PEO-NHS afin d'éviter le problème de la liaison non spécifique et les difficultés de comparaison entre les nanocorps et les

anticorps. Les premières expériences ont été réalisées dans un tampon aqueux d'acétate d'ammonium (couramment utilisé en laboratoire pour le couplage SPRi-MS), mais ce n'était pas la solution optimale pour le stockage et l'utilisation de A β 1-40 (peptide a été reçu dans PBS-HCl). En outre, même une dilution 100 fois plus importante du ligand dans le tampon de course a entraîné une baisse persistante de la réflectivité pendant l'injection (Figure VII-5 A - B). Afin d'éviter les problèmes d'incompatibilité des tampons, toutes les expériences suivantes ont été réalisées dans du tampon PBS.

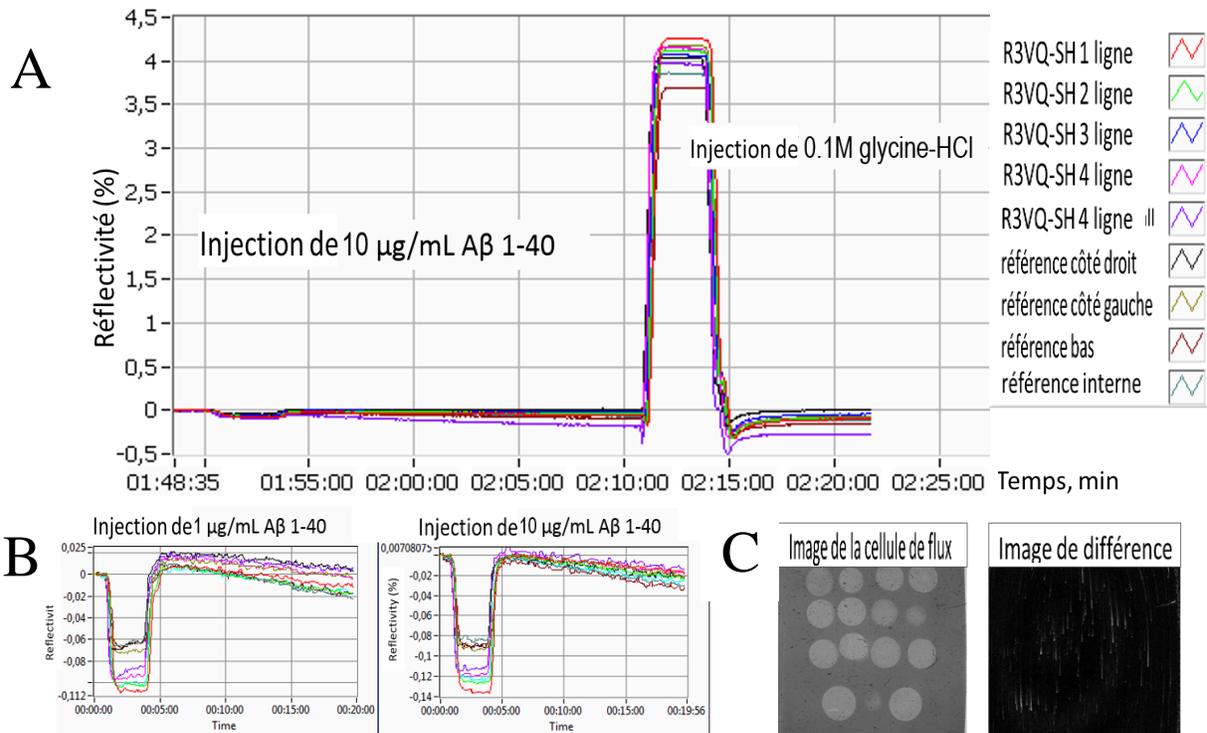


Figure VII-5: (A) sensorgrammes SPRi obtenus avec l'injection de 150 μ L de peptide amyloïde- β (A β 1-40) à 10 μ g/mL dans un tampon de course d'acétate d'ammonium, suivie d'une régénération par 0,1 M de glycine-HCl, pH 2,0. (B) sensorgrammes SPRi obtenus lors de l'injection de 150 μ L de A β 1-40 à 1 μ g/mL et 10 μ g/mL dans le tampon de course. (C) L'image de la cellule de flux et l'image de différence obtenues par le système SPRi lors de l'étape de dissociation avec l'injection de 0,1 M glycine-HCl, pH 2,0. L'image de différence reflète donc l'accumulation de masse (zones lumineuses) à la surface du biopuce. Les bandes lumineuses apparaissant après la régénération sont probablement dues à une liaison non spécifique de la protéine amyloïde avec la surface.

Dans la série d'expériences suivante, la création de microarrays mixtes anticorps/nanocorps (y compris des anticorps β -lactoglobuline bien caractérisés utilisés comme modèle) a été réalisée sur la chimie de surface du PEO-NHS (Figure VII-6 A). Les expériences SPRi ont été réalisées dans le tampon de course PBS sans MgCl₂ et CaCl₂. La passivation de la surface a été effectuée selon le protocole établi au laboratoire en utilisant 1 mM de L-Lysine dans

le tampon de course, 0,1 M de glycine-HCl, pH 2.0 a été utilisé pour la régénération. J'ai observé des interactions spécifiques avec le couple anticorps-antigène β -lactoglobuline, cependant le niveau d'interaction non spécifique était élevé, indiquant que la passivation de la surface n'était pas complète. L'injection de A β 1-40 dilué n'a pas entraîné d'interaction spécifique, de plus une légère baisse de réflectivité a été observée à nouveau. J'ai également observé une liaison non spécifique de faible niveau des anticorps A β 1-40 à β -lactoglobuline lors de l'injection de 50 μ g/mL de protéine (Figure VII-6 B). Les résultats obtenus montrent que la composition du tampon PBS actuellement utilisée est différente de celle fournie avec la solution mère de A β 1-40, et que les nanocorps utilisés n'étaient probablement pas fonctionnels dans ces conditions expérimentales. En outre, l'étape suivante de régénération de la surface a révélé le même problème de liaison non spécifique de la protéine amyloïde avec la surface (Figure VII-6 C).

J'ai décidé de changer les récepteurs spécifiques de l'amyloïde afin de vérifier la disponibilité de l'amyloïde dans la solution injectée pour les récepteurs immobilisés sur la surface. J'ai donc utilisé des anticorps dirigés contre A β (4G8) disponibles dans le commerce, au lieu des nanocorps testés précédemment. La performance des nouveaux récepteurs après immobilisation sur la surface du capteur a été comparée aux anticorps bien caractérisés contre la β -lactoglobuline. Cependant, des problèmes d'incompatibilité de tampon et de dépôt non spécifique d'amyloïde sur la surface de la biopuce, ont persisté indépendamment de la méthode de passivation utilisée, et de l'ajustement du tampon de course SPRi pour s'adapter au tampon de stockage du peptide A β 1-40 (données non présentées).

Les analyses MALDI-TOF MS qui ont succédées à ces expériences SPRi n'ont montré aucune différence par rapport à la première analyse effectuée avec des nanocorps immobilisés directement sur la surface d'or. De la protéine A β 1-40 a en effet été trouvée sur chaque ROI du microarray.

Les principales difficultés rencontrées ont été:

- La liaison non spécifique et "non régénérable" de A β 1-40 avec la chimie de surface, qui a probablement provoqué une agrégation de l'amyloïde observée dans l'image de différence sous forme de bandes lumineuse sur toute la surface de la biopuce. Ces agrégats ne peuvent être éliminés par aucune solution de régénération de surface utilisée sans endommager les récepteurs immobilisés sur la biopuce.
- La différence entre le tampon de la solution mère A β 1-40 (dont le contenu précis reste inconnu) et le tampon de course PBS (ou acétate d'ammonium), qui ne permet pas de suivre la cinétique du processus de liaison (l'incompatibilité des tampons entraîne des variations brutales de réflectivité lors de l'injection, observés comme la variation de réflectivité négative sur les sensorgrammes).
- L'adaptation du tampon de course SPRi au contenu de la solution mère A β 1-40 a également été limitée en raison de l'absence d'informations précises de la part du fabricant. Le processus d'échange de tampons pour la solution mère de A β 1-40 n'a pas non plus

réussi pour toutes les méthodes utilisées (données non présentées) – on peut supposer que cela a été causé par l'agrégation amyloïde pendant le processus d'échange de tampons, qui a conduit à l'absence de peptide monomère "libre". Ce dernier a probablement entraîné l'absence de toute interaction ligand-récepteur pendant l'injection de A β 1-40 (données non présentées).

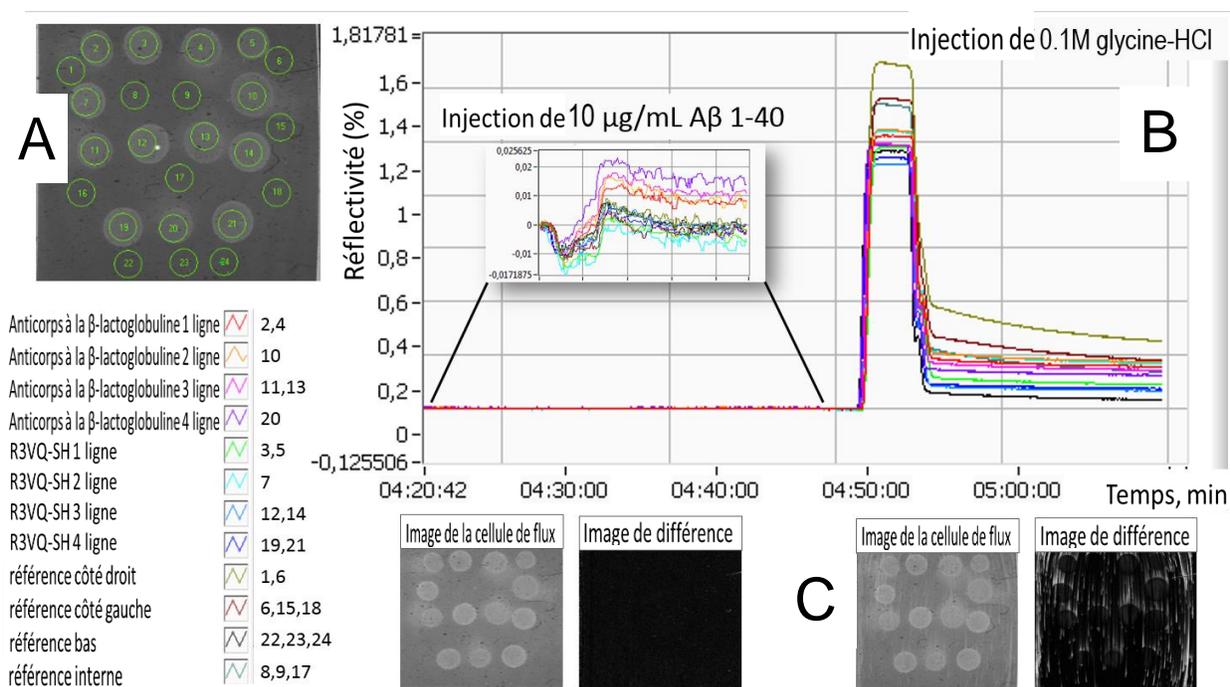


Figure VII-6: À gauche (A), la photo de la surface de la biopuce superposée à la carte des ROIs sélectionnés. (B) SPRi sensorgrammes obtenus lors de l'injection 150 μ L 10 μ g/mL de peptide amyloïde- β (A β 1-40) dans le tampon de course PBS sans MgCl₂ et CaCl₂, suivie d'une régénération par 0,1 M glycine-HCl, pH 2.0. (C) Les images de la cellule de flux et de la différence sont représentées sous l'injection correspondante. Ces images ont été obtenues par le système SPRi lors de l'étape de dissociation de chaque injection, reflétant ainsi l'accumulation de masse (zones lumineuses) ou l'élimination de masse de la surface du capteur. Les bandes lumineuses apparaissant après la régénération sont probablement dues à une liaison non spécifique d'amyloïde à la surface.

Conclusion sur l'utilisation des microarrays pour la détection de d'amyloïde pour le couplage SPRi-MS

Les expériences du SPRi avec des récepteurs spécifiques de protéines amyloïdes et, en particulier, avec les nanocorps, se sont révélées compliquées pour de diverses raisons. L'incompatibilité du tampon de course du SPRi avec celui de la solution mère de peptide amyloïde a perturbé le suivi de la cinétique des interactions ligand-récepteur. La liaison non spécifique et

irréversible de A β 1-40 à la surface du biocapteur, malgré toutes les méthodes de passivation de la surface utilisées jusqu'à présent, a également contribué à compliquer les analyses SPRi et MS.

Il existe encore plusieurs moyens susceptibles d'améliorer les conditions d'utilisation des nanocorps, comme l'immobilisation sur l'or directement avec MUA ou PEG-CH₃, avec ou sans réduction des groupes S-S préformés dans la solution mère R3VQ-SH, l'utilisation de nouvelles solutions de régénération, etc. Toutefois, identifier une solution tampon qui serait adaptée à la fois à l'expérience SPRi et au stockage du peptide A β 1-40 reste le problème majeur.

Pour conclure, l'utilisation d'un autre couple nanocorps-ligand moins complexe pour le développement du couplage SPRi-MS serait préférable.

Conclusions et perspectives

Réussir en routine, la détection multiplexe en temps réel, d'un grand nombre de ligands ou de biomarqueurs à partir de fluides complexes, avec la possibilité d'identifier les ligands capturés directement par le biocapteur, constituerait une contribution majeure pour de nombreuses applications biomédicales et pharmaceutiques.

Afin de s'approcher au plus près de cet objectif, le travail de recherche effectué dans le cadre de cette thèse a été principalement consacré à la conception de nouvelles biopuces au format microarrays, destinés au couplage SPRi-MS, et faisant appel à des récepteurs alternatifs aux anticorps, notamment des microarrays à aptamères, des microarrays mixtes anticorps/aptamères et des microarrays à base de nanocorps. Une partie des travaux a également été dédiée au développement d'un couplage innovant entre deux technologies d'imagerie, la SPRi et la MSi. Dans le cadre de ce projet doctoral, les aspects fondamentaux liés aux interactions moléculaires entre des aptamères et leur cible, entre récepteurs anticorps/nanocorps avec leurs antigènes correspondants ont aussi été abordés. Plusieurs difficultés affectant la performance des biopuces à aptamères et à nanocorps ont été identifiées.

Au cours de ce projet, trois principaux types de récepteurs (molécules sondes) ont été étudiés pour le couplage SPRi-MS: les anticorps, les aptamères et les nanocorps. Des adaptations de protocoles expérimentaux ont été nécessaires pour répondre aux besoins de chaque type de récepteur. La faisabilité des microarrays mixtes anticorps/aptamères a également été évaluée. Ces différents systèmes ont été étudiés sur la base de couples récepteur-ligand considérés comme modèles dans la littérature, à savoir des récepteurs ciblant la β -lactoglobuline et la thrombine. Un couplage SPRi-MSi mettant en œuvre une seule et même surface de biocapteur a été mis en œuvre pour la première fois au cours de ces travaux de thèse. Le développement de cette méthode, et les progrès réalisés avec l'automatisation de la procédure de détection en MSi ont été décrits en détail à partir de l'exemple des microarrays mixtes anticorps/aptamères.

Les premiers couples étudiés en SPR-MS ont impliqués des anticorps ou des aptamères anti β -lactoglobuline. Un manque de performance a été observé à partir des aptamères anti β -lactoglobuline, malgré tous les efforts déployés pour découvrir des conditions expérimentales appropriées. Des expériences complémentaires réalisées avec les aptamères anti β -lactoglobuline en utilisant l'ACE n'ont pas permis de révéler l'origine du problème. La capacité des aptamères à la reconnaissance et la capture efficaces de la β -lactoglobuline, n'a pas été démontrée quels que soient les tampons testés (tampons acétate avec et sans KCl, tampon PBS sans $MgCl_2$ et $CaCl_2$). Des expériences supplémentaires sont donc nécessaires pour comprendre le manque de performance des aptamères anti β -lactoglobuline, peut-être relié à des problèmes de repliement adéquat ou d'orientation à la surface de la biopuce. L'optimisation du protocole SPRi-MSi a donc été réalisée à partir du récepteur anticorps dirigé contre la β -lactoglobuline: de nettes améliorations de la capture par affinité de la β -lactoglobuline ont été obtenues lors d'expériences SPRi réalisées en utilisant un tampon de course PBS contenant 1 mM de $MgCl_2$ et de $CaCl_2$. L'identification par MS du ligand retenu montre également une amélioration du rapport signal/bruit.

Le deuxième système modèle employé pour l'étude de la faisabilité d'un couplage SPRi-MSi a été celui impliquant des récepteurs de la thrombine. Une étude rigoureuse en SPRi a révélé que la bonne fonctionnalité des aptamères anti thrombine dépend de la composition du tampon: des ions divalents sont nécessaires pour stabiliser leur structure 3D, ce qui est crucial pour la reconnaissance et la capture des ligands. La détermination des conditions de performance optimales pour les aptamères anti thrombine a permis de comparer l'importance du site d'immobilisation de ces récepteurs (selon 5' ou 3'), sur la détection de la thrombine par les aptamères. L'immobilisation par l'extrémité 3' de l'aptamère HD1 s'est révélée meilleure pour la capture de la thrombine purifiée, par rapport à l'immobilisation en 5'. L'étude de la spécificité des récepteurs de la thrombine a révélé que les aptamères HD1 immobilisés en 3' et 5' étaient aussi capables de reconnaître et de capturer la prothrombine, tandis que HD22 et l'anticorps spécifique contre la thrombine n'avaient aucune affinité pour la prothrombine. Quant au récepteur anticorps anti thrombine, l'impact du tampon de course SPRi sur le fonctionnement d'anticorps spécifiques contre la thrombine a été moins prononcé, l'ajout de $MgCl_2$ et de $CaCl_2$ ayant même légèrement diminué l'efficacité de capture des anticorps.

L'impact d'espèces moléculaires interférentes, comme l'albumine sérique, sur la détection de la thrombine en SPRi-MSi en utilisant des microarrays mixtes aptamère/anticorps a également été étudié dans le cadre de ce travail. L'aptamère HD1 est probablement impliqué dans des interactions non spécifiques avec l'albumine sérique (BSA), mais son affinité pour la BSA n'a été observée qu'à partir de concentration relativement élevée ($\sim 3 \mu M$). Il a été observé que la BSA interagissait avec les complexes HD1-thrombine. L'injection de thrombine en présence d'un excès de BSA a provoqué une augmentation de la masse accumulée sur la surface du capteur, par rapport à l'injection de thrombine seule pour les deux aptamères HD1 testées (HD1 3'-T10 et HD1 5'-T10) à partir d'une concentration de BSA de 500nM. Cela suggère que l'effet observé est le résultat de l'affinité de la BSA pour le complexe HD1-thrombine. Néanmoins, la thrombine a pu être identifiée par MS sur tous les récepteurs spécifiques anti thrombine, même en présence de BSA presque cent fois plus concentrée. HD22 et les anticorps spécifiques dirigés contre la thrombine n'ont pas montré d'interaction significative avec la BSA, se traduisant par leur capacité à capturer la thrombine qui n'est que légèrement réduite en présence de BSA, mais la quantité moyenne de ligand retenu sur les sites d'anticorps était presque trois fois plus faible que celle retenue par HD22. Ainsi, l'aptamère HD22 s'est avéré être un élément de détection spécifique, sélectif et très affin pour la thrombine, et à titre de comparaison il a montré un net avantage sur les aptamères HD1 et l'anticorps spécifique anti thrombine.

Une approche utilisant un aptadimère HD1-22 en couplage SPRi-MSi a également été exposée. Cette approche a permis de détecter la thrombine avec une spécificité et une sélectivité élevée. L'aptadimère est une molécule bi-spécifique composée de deux aptamères interconnectés avec un linker d'acide nucléique. L'aptadimère permet de cibler simultanément deux épitopes distincts sur la même molécule cible. HD1-22 offre donc une solution efficace pour améliorer la détection de la thrombine, grâce à une bonne spécificité, une sélectivité et une affinité au ligand.

Des résultats prometteurs ont été obtenus lors de tests préliminaires dans un tampon de course PBS bien que les conditions expérimentales optimales restent à définir.

Les analyses par MSi des microarrays mixtes ont été peu fructueuses après les expériences SPRi dans des tampons de course PBS. Malgré le rinçage des biopuces avec de l'eau ultrapure avant le dépôt de la matrice, l'identification MS des ligands n'a été possible qu'après l'accumulation du signal en interrogeant manuellement la surface. L'automatisation par MSi avec un signal moyenné sur l'ensemble de la ROI n'a pas pu fournir de résultats suffisants. Les difficultés rencontrées peuvent s'expliquer par le fait que la désorption/ionisation de la cible a été perturbée en présence de sels. Seules des quantités infimes de thrombine ont été détectées à partir des sites d'aptamères après « ligand-fishing », à la fois après injection de thrombine seule et de thrombine en présence d'un excès de BSA. Compte tenu de ces résultats, une procédure de nettoyage supplémentaire devrait être développée pour une élimination plus efficace du sel de la surface du biocapteur après les expériences SPRi. Néanmoins, les quelques résultats positifs obtenus avec des biopuces au format microarray à partir d'aptamères anti thrombine au cours de ce travail s'avèrent prometteurs pour le couplage SPRi-MSi à des fins de biodétection.

L'utilisation de nanocorps comme nouveau type de récepteur pour le couplage SPRi-MSi a également été évaluée. Des anticorps à domaine unique, spécifiquement dirigés contre la protéine amyloïde (R3VQ-SH), aimablement fournis par le professeur Pierre Lafaye (Institut Pasteur, CITECH, Plateforme d'Ingénierie des Anticorps), ainsi que des anticorps commerciaux dirigés contre la protéine amyloïde ont été étudiés. L'utilisation des amyloïdes pour l'étude du couplage SPRi-MSi s'est avérée complexe. Plusieurs problèmes sont survenus: l'accumulation non spécifique de peptides amyloïdes à la surface du biocapteur, et la différence de nature entre le tampon de stockage (solution mère) des peptides amyloïdes et le tampon de course SPRi ont rendu impossible l'étude des interactions récepteur-ligand. L'analyse MSi des biopuces après les expériences SPRi a confirmé la nature non spécifique de la liaison amyloïde avec la surface du biocapteur. En outre, des difficultés ont été rencontrées lors de l'étape de régénération de la surface des biocapteurs en SPRi, ainsi que lors de l'échange du tampon de stockage de la protéine amyloïde. Il serait intéressant de poursuivre les recherches entreprises avec les nanocorps, en tant que nouveau type de récepteur pour le couplage SPRi-MSi, en prenant un ligand modèle moins complexe que la protéine amyloïde.

Dans le cadre de ce travail de doctorat, j'ai également porté mes efforts sur les possibilités que peut offrir le couplage SPRi-MSi en termes de facilitation et d'automatisation des mesures. La méthode de dépôt de matrice est l'un des paramètres importants du couplage. Son impact sur la détection par MS et par MSi a été démontré dans ce travail: la couverture non homogène des microarrays par la matrice a conduit à une mauvaise cartographie des sites de capture de ligand en MSi, ce qui a nécessité une interrogation manuelle supplémentaire par MS des sites des récepteurs et des sites de contrôle. Afin d'apporter une solution à ce problème, la nébulisation de la matrice à l'aide d'une source DESI convertie en simple sprayeur a été développée. Elle a permis une couverture homogène de la surface du biocapteur par la matrice, ce qui s'est traduit par une

identification homogène des protéines déposées sur la surface. Les futurs développements du couplage SPR-MS devront inclure une procédure de nébulisation de la matrice. Une autre source d'amélioration des performances des biopuces SPR destinées au couplage MS a été la gravure par ablation laser la surface d'or afin de faciliter l'identification des ROIs pour l'analyse MSi. Les expériences SPRi en utilisant ces nouvelles biopuces gravées n'ont pas apporté de résultat positif – seules des interactions non spécifiques ont été observées. On peut supposer que cela a été causé par la méthode employée – l'or éjecté pendant l'ablation laser a été redéployé aux abords de la région ablatée, ce qui a probablement entraîné la pollution de la surface d'or. D'autres expériences sont encore nécessaires pour perfectionner l'organisation de la surface des biopuces selon cette stratégie. Une des solutions possibles pourrait être l'ablation laser avec aspiration du matériel éjecté pour éviter son redéploiement sur la surface. Le potentiel de développement du couplage SPRi-MSi avec ces nouvelles biopuces gravées, en particulier en combinaison avec le dépôt de matrice par nébulisation, est important. Les résultats obtenus doivent être capitalisés pour poursuivre le développement ultérieur de la méthode.

Pour conclure, de nouvelles biopuces SPRi au format microarray ont été conçues avec des récepteurs de type aptamère, anticorps et nanocorps, avec des succès autour d'un cas modèle basé sur l'utilisation de récepteurs spécifiques de la thrombine. En particulier, des progrès importants ont été réalisés dans la compréhension des exigences expérimentales pour réussir la détection SPRi en utilisant des aptamères. A notre connaissance, l'utilisation d'aptamères dans le contexte du couplage SPRi-MSi constitue une « première », mais ce travail montre que leur utilisation nécessite de bien maîtriser les conditions expérimentales. Les résultats obtenus ont nécessité le développement d'un outil SPRi-MSi qui, dans un avenir proche, pourrait être très utile dans les domaines biomédical et pharmaceutique.

Annexe I

Protocole de fonctionnalisation de SAM

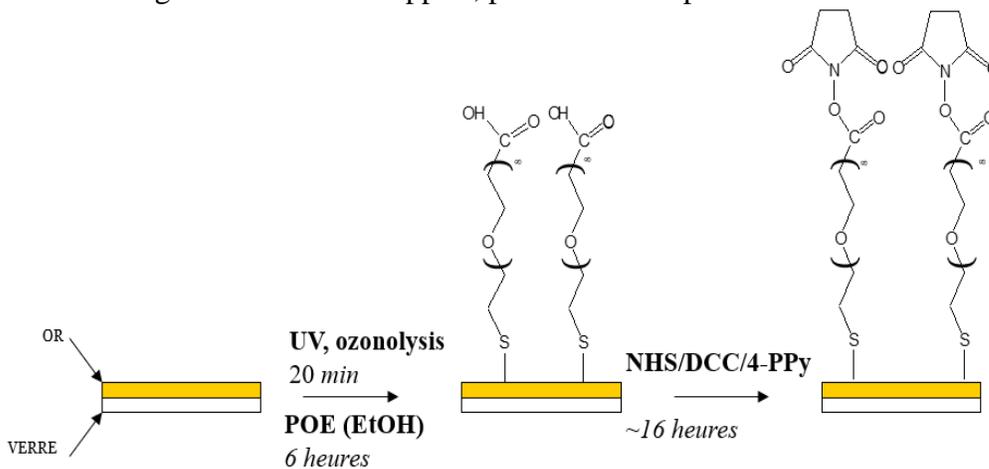
Introduction

Ce protocole décrit la procédure de fonctionnalisation d'une surface métallique d'or par une monocouche auto-assemblée de polyoxyéthylènes thiolés (PEO) dont la fonction acide carboxylique libre est activée par le NHS. Cette méthode est basée sur la forte affinité des atomes de soufre (présents dans les molécules de PEO thiolés) pour l'or et sur la réactivité des fonctions du NHS sur les fonctions amines libres des biomolécules à immobiliser.

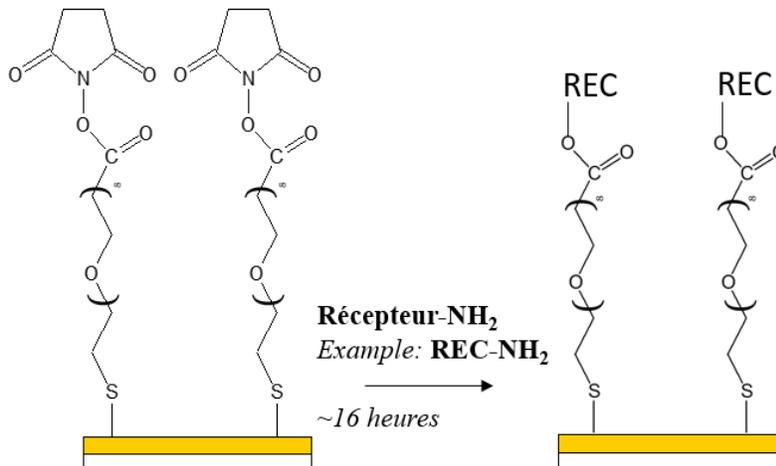
Principe :

Immobilisation de molécules des récepteurs (protéines, peptides, oligonucléotides...) sur des surfaces fonctionnalisées par une monocouche auto-assemblée de PEO-NHS.

1. Greffage de PEO sur le support, puis activation par NHS



2. Immobilisation des récepteurs de protéines



Procédure pour deux biopuces :

1. **Nettoyage par UV-ozonolysis** pendant 20 minutes: les biopuces sont déposées dans UV-ozonolyseur avec face métallique vers le haut après avoir été rincées avec de grandes quantités d'acétone et d'éthanol absolu.

2. **Dépôt de PEO thiolés**: 4 mg de PEO sont dissous dans 3,48 ml d'éthanol absolu, et les biopuces sont immergées dans cette solution directement après le traitement dans UV-ozonolyseur. Le bécher est ensuite enveloppé de plusieurs couches de parafilm pour éviter l'évaporation, puis de papier d'aluminium (car les fonctions thiol du PEO sont photosensibles). Enfin, le bécher couvert est placé dans une boîte en polystyrène et est laissé en agitation pendant 6 heures dans un endroit avec une température ambiante constante de 22 °C.

Après les 6 heures d'immobilisation de PEO, les biopuces sont retirées du premier bain, rincées à l'éthanol absolu, puis immergées dans le bécher suivant rempli d'éthanol absolu et laissés en agitation pendant 5 minutes dans les mêmes conditions que pour l'étape 2 (parafilm, feuille d'aluminium, à l'intérieur de la boîte en polystyrène). Cela permet d'éliminer toutes les molécules non immobilisées, c'est-à-dire de rincer les biopuces de PEO non-greffé. Enfin, les biopuces sont extraites du bain d'éthanol absolu, rincées à l'éthanol absolu et séchées sur l'essuie-tout, côté métallique vers le haut, par de flux d'air doux d'une bouteille vide.

3. **Activation de PEO thiolé déposé**: 55,2 mg de NHS, 106 mg de DCC et 7 mg de 4-pyrrolidinopyridine sont dissous dans 2,17 ml de DMSO. Les biopuces séchées sont ensuite immergées dans le bain de DMSO avec le mélange d'activation dissous fraîchement préparé. Le bécher est enveloppé d'une feuille d'aluminium, placé à l'intérieur de la boîte en polystyrène et est laissé en agitation pendant 16 heures (pendant la nuit) dans un endroit avec une température ambiante constante de 22 °C.

Ensuite, les biopuces sont rincées au DMSO et deux fois à l'eau MilliQ de la même manière que lors de l'étape 2 de rinçage après l'immobilisation de PEO (rinçage au solvant, biopuces dans le bain de solvant pendant 5 min et rinçage à nouveau). Enfin, les deux biopuces doivent être séchées sur l'essuie-tout, côté métallique vers le haut, par de flux d'air doux d'une bouteille vide. Enfin, les biopuces doivent être stockées à 4 °C, dans un flacon scellé avec du parafilm et recouvert d'une feuille d'aluminium pour les protéger de la lumière, jusqu'à leur utilisation.

4. **Immobilisation des récepteurs de protéines**: les biopuces sont laissées pendant 1 heure à température ambiante avant d'être déposées. Les récepteurs concernés doivent être déposés sur la surface de la biopuce au moins 2 heures avant l'expérience SPRi (mais les meilleurs résultats ont été obtenus avec un temps d'immobilisation égal à ~ 16 heures). Pour le dépôt manuel, le volume standard par site de récepteur était 0,2 µL.

Annexe II

Surface Plasmon Resonance Imaging-Mass Spectrometry Coupling on Antibody Array Biochip: Multiplex Monitoring of Biomolecular Interactions and On-Chip Identification of Captured Antigen

Anastasiia Halushkina, William Buchmann, Nathalie Jarroux, and Régis Daniel

Abstract

The coupling of surface plasmon resonance imaging (SPRi) with mass spectrometry (MS) offers a very promising multidimensional analysis. This system takes advantage of the two well-established techniques: SPR, which allows for the analysis of biomolecular interactions through the determination of kinetic and thermodynamic constants, and MS, which can characterize biological structures from mass measurements and fragmentation experiments. Here, a protocol for the coupling of SPRi with matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-MS) is described using a biochip grafted by antibodies in an array format. Interaction between β -lactoglobulin antibodies and the protein antigen is detected and analyzed by SPRi. Then, the arrayed biochip which fitted a commercially MALDI target was inserted in a MALDI source, and mass spectra were recorded directly from the biochip surface from each antibody spot, showing protein ions attributed to the corresponding specific protein antigens.

Key words: Biomolecular interactions, Surface plasmon resonance, Mass spectrometry, Matrix-assisted laser desorption/ionization, Poly(ethylene glycol), β -Lactoglobulin, Antibodies

Introduction

Biomolecular interactions are at the core of numerous biological processes, and several techniques are available to determine either their thermodynamic features or their structural determinants. The hyphenation of thermodynamic and structural methods raises much interest as it allows a multidimensional and comprehensive characterization of bio-interactions. The coupling of surface plasmon resonance (SPR) with mass spectrometry (MS) from a unique surface common to both techniques, so-called SPR-MS coupling, meets this objective of full characterization as SPR provides kinetic and thermodynamic data by real-time monitoring of bio-interactions [1–6] and MS allows the structural identification of the specifically captured ligands on the SPR sensor surface [7–9]. The SPR monitoring of bio-interactions requires the immobilization of one partner of interaction (i.e., receptor) on a biosensor surface or in a channel, whereas potential binding partners (ligands) are flowed over the immobilized receptors. Because SPR does not provide any structural data about the captured ligands due to the principle of SPR detection based on optical measurement, the coupling with MS provides a real added value in this respect [10].

Initial SPR-MS developments were based on the use of a sensor chip with a limited number of flow cells, requiring elution steps for the recovery of the captured biomolecules and their subsequent MS analysis [11–16]. Alternatively, a SPR-MS coupling based on a sensor chip in a

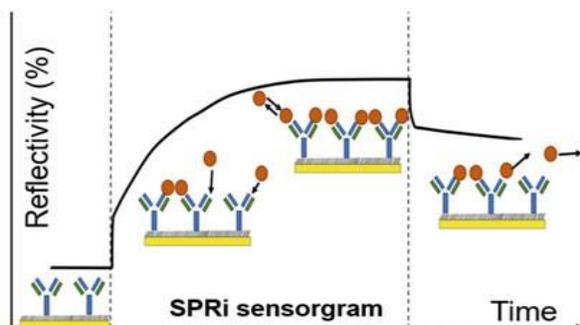
microarray format has been developed in the past decade, allowing multiplexed and high-throughput SPR-MS analyses involving SPR imaging (SPRi) and matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI)-MS on the same sensor surface [17–22]. This chapter will describe a step-by-step procedure to implement this recently developed SPRi-MALDI-MS method, including (1) the SPRi biochip preparation, (2) the SPRi experiment allowing the determination of interaction and the ligand capture, and (3) the direct on-chip MALDI-MS detection of specifically retained ligands (Fig. 1). More precisely, the procedure will be applied to the analysis of antibody-antigen interactions as an example. We will detail in a first step the functionalization of the chip gold surface by a self-assembled monolayer (SAM) of short poly(ethylene glycol) (PEG) chains, a key step in order to reduce the nonspecific binding, especially when analyzing bio-interactions in complex mixtures such as in biological fluids. The PEG chains are terminated by a N-hydroxysuccinimide (NHS) group as an active end for antibody grafting. Then, we will describe the SPRi detection and recording of the complex formation between β -lactoglobulin and its corresponding antibody immobilized on the sensor surface over a range of concentrations (1–100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ \sim 54.5 nM–5.45 μM) (Fig. 2a). Last, we will describe the MALDI-MS detection and identification of the specifically retained antigen on the receptor spots directly from the biochip surface. Femtomolar amounts of captured β -lactoglobulin, as determined by SPR, were sufficient for the on-chip direct MS detection and to obtain good quality mass spectra. The mass spectra exhibited protein ions corresponding to the specific antigen, without any trace of nonspecific ligand (Fig. 2b). The biochip surface free from receptors was also devoid of nonspecifically bound proteins (Fig. 2c), indicating that the functionalization of the sensor surface by short PEG chains greatly minimizes the unspecific binding.

(1) SPRi biochip preparation



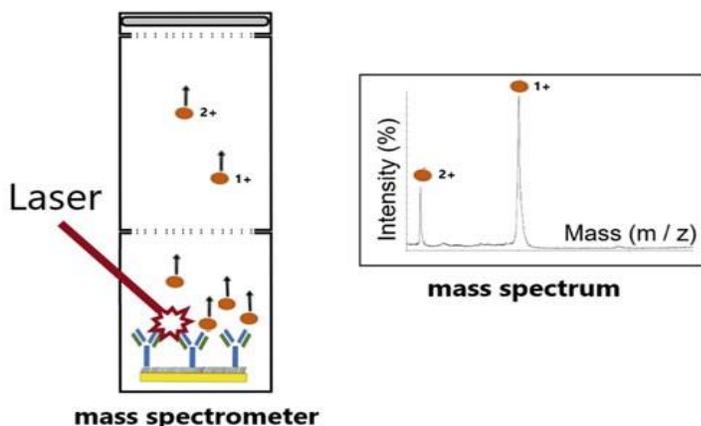
Biochip and Glass prism

(2) SPRi Experiment



SPR Biochip holder

(3) MALDI-TOF analysis



MALDI plate with 2 biochips

Fig. 1 Main steps of the SPRi-MALDI-MS experiment: (1) SPRi biochip preparation, (2) SPRi experiment allowing the determination of interaction and ligand capture, and (3) direct on-chip MALDI-MS detection of specifically retained ligands

Materials

2.1 Chemical Reagents

1. O-(2-Carboxyethyl)-O'-(mercaptoethyl) heptaethylene glycol (PEG) aliquoted to 3.5 μ L (~4 mg) and stored at 20 $^{\circ}$ C.
2. 4-Pyrrolidinopyridine.
3. N-Hydroxysuccinimide (NHS).
4. N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide (DCC).
5. 2-(4-Hydroxyphenylazo)-benzoic acid (HABA, MALDI matrix).
6. Trifluoroacetic acid (TFA).
7. High index liquid "Serie B" for connection between glass prism and SPRi-Slides (HORIBA Scientific, France).

- 55% (v/v) Glycerol prepared by dilution in deionized water from 100% glycerol.

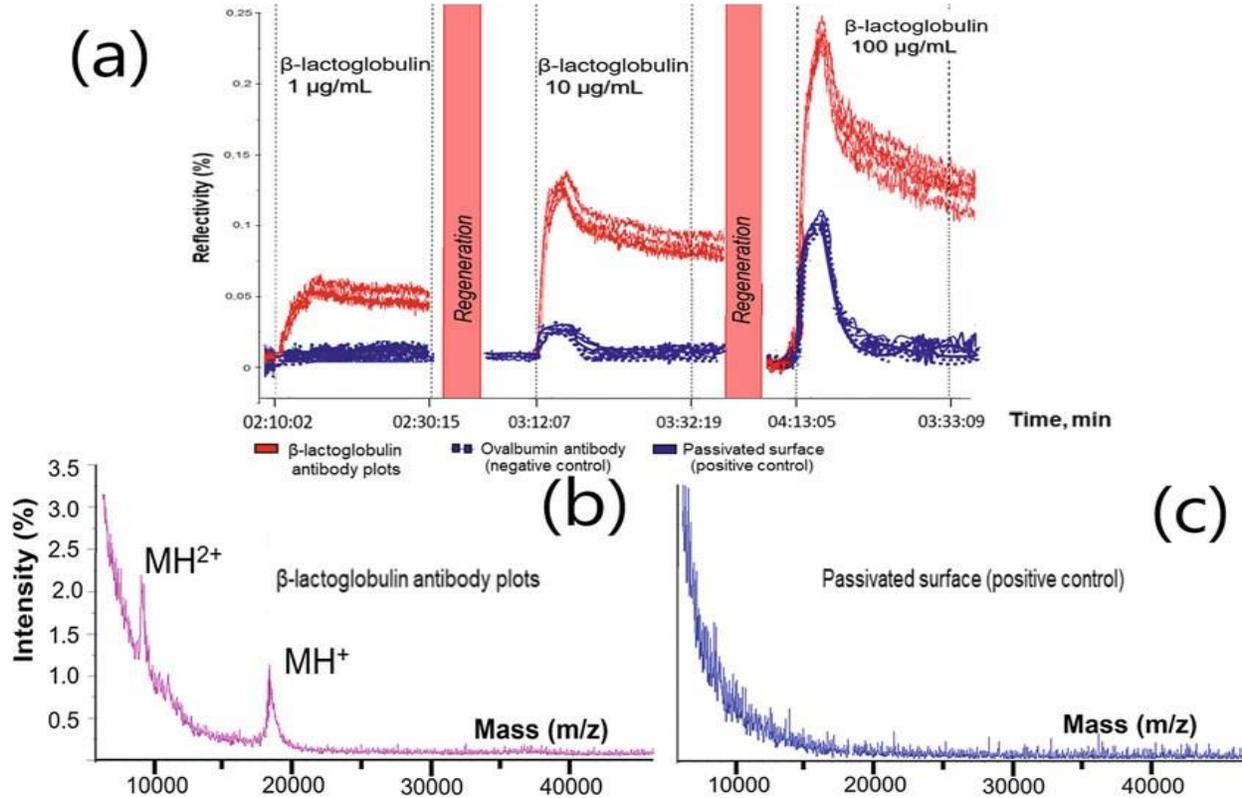


Fig. 2 (a) SPRi sensorgrams obtained after injections of β -lactoglobulin at different concentrations (1, 10, and 100 $\mu\text{g/mL}$) in 10 mM ammonium acetate buffer pH 7.5, (b) MALDI-TOF mass spectrum obtained after the SPRi experiment directly from an anti- β -lactoglobulin antibody plot of biochip surface, (c) MALDI-TOF mass spectrum obtained after the SPRi experiment directly from a passivated area of the biochip surface

2.2 Proteins (Receptors and Ligands)

Protein solutions can be prepared and stored up to 1 week, at 4 $^{\circ}\text{C}$ (unless indicated otherwise).

- β -Lactoglobulin from bovine milk.
- Polyclonal antibody against β -lactoglobulin.
- Monoclonal antibody against ovalbumin.

2.3 Solvents, Buffer, and Solutions for SPRi Experiment

All aqueous solutions were prepared using ultrapure water and analytical grade reagents.

- Ultrapure water, 18.2 M Ω cm.
- Ethanol absolute.
- Dimethyl sulfoxide (DMSO).
- Current buffer for SPRi: 10 mM ammonium acetate, pH 7.5. Add about 500 mL water to a 1 L graduated cylinder or a glass beaker, and transfer

1.33 mL of 7.5 M ammonium acetate stock solution to the cylinder as well. Add water to a volume of 900 mL. Mix and adjust pH with ammonium hydroxide. Make up to 1 L with water. Store at 4 °C.

5. Passivation solution: 1 mM L-lysine. Add about 40 mL of current buffer to a 50 mL plastic flacon. Weigh 0.00731 g L-lysine, and transfer to the flacon. Dissolve the powder, and add current buffer to a final volume of 50 mL. Leave one aliquot at 4 °C for current use, and store the remaining aliquots at 20 °C.

6. Regeneration solution: 0.1 M glycine-HCl, pH 2.0. Add about 35 mL water to a 50 mL graduated cylinder or a glass beaker. Weigh 0.37535 g glycine, and transfer to the cylinder. Add water to a volume of 40 mL. Mix and adjust pH with HCl (see Note 1). Add water to a final volume of 50 mL with water. Store at 4 °C.

2.4 Equipment

1. UV-ozonolyzer.
2. Laboratory rocker.
3. Light table.
4. Petri dish.
5. Polystyrene box.
6. Box filled with ice.
7. Empty squeeze bottle.
8. 50 mm diameter glass beakers.
9. Plastic flacons 50 mL.
10. Aluminum foil.
11. Parafilm.
12. Lens wipes (no-dust optic wipes).
13. Plastic tweezers.

2.5 Instrument

2.5.1 SPR

1. SPR imaging (SPRi) experiments should be performed using an SPRi-Plex imager (HORIBA Scientific, France) equipped with 660 nm light-emitting diode (LED) and charge-coupled device (CCD) camera or imager with similar specifications. Data acquisition and instrument control should be performed via SPRi-View P4.1.0, and quantitative analysis of the experimental data should be done with the software SPRi-Analysis 1.2.1 or equivalent.
2. SPRi glass prism.

Gold-covered glass slides (SCHOTT-AG, Switzerland): thickness \times length \times width = 0.5 mm \times 28 mm \times 12 mm, chromium bonding layer 1 to 2 nm, gold layer 50 nm, roughness: maxi 7 Å° (see Note 2).

1. MALDI-TOF experiments should be performed using an Autoflex Speed MALDI-TOF/TOF MS instrument or equivalent. This instrument is equipped with a SmartBeam II™ laser (modified Nd:YAG laser) pulsed with 1 kHz frequency. Mass spectra acquisition and instrument control should be performed via FlexControl 3.4. Mass spectra should be processed using FlexAnalysis software (version 3.3.80.0) or equivalent.
2. TLC adapter MALDI target plate (i.e., target plate for MALDI imaging with fixations).
3. Customized transparent plastic film, used as a mask figuring the array pattern to guide the manual spot deposition (see Note3).
4. Matrix solution: 0.05 M 2-(4-Hydroxyphenylazo)-benzoic acid (HABA) in acetonitrile/water 50%/50% (v/v), 0.2% trifluoroacetic acid (TFA). Weigh 12.1 mg of HABA in a plastic vial. Add 1 mL of acetonitrile/water 50%/50% (v/v), 0.2% TFA. Dissolve matrix and mix solution thoroughly to ensure that matrix solution is homogeneous.

Methods	Preparation steps described in Subheadings 3.1–3.3 are for the preparation of two biochips (see Note 4).
3.1 Gold Surface Cleaning	<p>Prior to use, the gold surface of the glass slides is systematically cleaned by ozonolysis. Glass slide handling should be performed exclusively with plastic tweezers.</p> <ol style="list-style-type: none">1. Rinse the gold-covered glass slides with copious amounts of acetone, and dry with airflow using an empty squeeze bottle nozzle (see Note 5).2. Rinse glass slides with copious amounts of ethanol absolute and dry again as in step 1.3. Drop glass slides off (gold side up) in the UV-ozonolyzer for 30 min.
3.2 PEG Self-Assembled Monolayer	<ol style="list-style-type: none">1. Dissolve aliquot (3.5 μL ~4 mg) of PEO in 3.48 mL of ethanol absolute to obtain 2.5 mM PEO solution and mix it thoroughly. Transfer solution into \varnothing 50 mm beaker. Tightly cover the beaker with parafilm and aluminum foil (see Note 6).2. Immerse the UV-ozonolysis cleaned biochips (golden side up) one-by-one in the PEO solution. Take care not to overlay them.3. Cover the beaker with several layers of parafilm and aluminum foil. Put the covered beaker inside a polystyrene box and close the lid.

4. Place the polystyrene box on the laboratory rocker and leave stirring at 50 rpm for 6 hours.
5. Stop the rocker and take out beaker with biochips. Take biochips out one by one, rinse with ethanol absolute and immerse into another beaker filled with ethanol absolute.
6. Repeat step 3 and leave on the laboratory rocker for stirring at 50 rpm for 5 min.
7. Stop the rocker and take out beaker with biochips. Take biochips out, rinse with ethanol absolute once again. Handling biochips one by one, place them (golden side up) on a paper towel and dry using airflow from an empty squeeze bottle.
8. Transfer biochips inside Petri dish and close the lid. Cover the Petri dish with aluminum foil.

3.3 PEG Activation

1. Mix 727 μ L of 715 mM DCC in DMSO with 727 μ L of 660 mM NHS in DMSO and 727 μ L of 660 mM 4-pyrrolidinopyridine in DMSO (or dissolve 55.2 mg of NHS, 106 mg of DCC and 7 mg of 4-pyrrolidinopyridine in 2.17 ml of DMSO; see Note 7) in a beaker.
2. Take the biochips out of the Petri dish, and immerse them one by one in the activation solution mixture prepared in step 1.
3. Cover the beaker with several layers of aluminum foil. Put the covered beaker inside the polystyrene box, and close the lid.
4. Place the polystyrene box on the laboratory rocker, and rock at 50 rpm for 16 h.
5. Stop the rocker, and take out the beaker with the biochips. Take biochips out, rinse them with DMSO, and immerse them into another beaker filled with DMSO.
6. Repeat step 3, and leave on the laboratory rocker rocking at 50 rpm for 5 min.
7. Stop the rocker, and take out the beaker with the biochips. Take the biochips out, rinse them with water, and immerse them into another beaker filled with water.
8. Repeat step 3, and leave on the laboratory rocker rocking at 50 rpm for 5 min.
9. Stop the rocker, and take out the beaker with the biochips. Take the biochips out one by one, and rinse them with water again.
10. Place the biochips (gold side up) on a paper towel, and dry them using airflow from an empty squeeze bottle.

11. Transfer the biochips into separate empty, labelled flacons. Tightly close the lids, and wrap the flacons with aluminum foil. Store at 4 °C (see Note 8).

3.4 Antibody Grafting

1. Take the flacon with the biochip from the fridge, and leave it for 1h at room temperature before immobilization of antibodies. Do not remove the aluminum foil before using the biochip.
2. Prepare 6 μM antibody solution containing 5% glycerol: To each 5 μL aliquot of 1 mg/mL (~6.67 μM) solution of each antibody, add 0.5 μL of 55% glycerol. Mix thoroughly and keep on ice during the spotting of the antibodies. Afterward, store at 4 °C and mix thoroughly prior to next usage.
3. Indicate the positions to be arrayed on the transparent plastic film. Then place this plastic film on the light table. Place the biochip over the transparent plastic film in order to see where to spot.
4. Spot manually 0.2 μL droplets of anti- β -lactoglobulin and control anti-ovalbumin antibody solutions (prepared in step 2) onto the surface of the biochip in an array format according to the spot locations indicated on the transparent plastic film placed on the light table.
5. Put the biochip inside the Petri dish with a piece of wet paper towel inside (to ensure humidity), close the lid, and wrap it tightly with parafilm and cover with aluminum foil.
6. Leave the biochips for immobilization at 4 °C for 16 h before the SPRi experiment. If time-saving is a priority, immobilization time can be reduced (see Note 9).

3.5 Biochip - SPRi Prism Assembly

1. Clean the SPRi glass prism by spraying it with ethanol absolute and wiping with lens wipes. Thoroughly dry the prism, and insert it in the prism holder of the SPRi device.
2. Depose 1 μL (or less, see Note 10) of the refractive index matching oil on the surface of the prism, and gently slide the biochip over the prism. Ensure no air bubbles remain between the glass slide and the prism (see Note 11).

3.6 Passivation of the Biochip Surface

The free reactive NHS groups remaining after antibody grafting are passivated by reaction with L-lysine.

1. Insert the prism holder containing the prism and mounted biochip inside the SPRi device, and fix it.
2. Inject 150 μL of 1 mM L-lysine in current buffer followed by injection of 150 μL of the regeneration solution (see Note 12 for injection details). Repeat this injection sequence three times.

3.7 SPRi Experiment

1. Prepare a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ stock solution of β -lactoglobulin ($\sim 5.45 \mu\text{M}$): weigh 0.2 mg of β -lactoglobulin in a plastic vial (i.e., 2 mL plastic tube), and add 2 mL of SPRi current buffer. Mix well to dissolve the powder completely. Store at 4 °C up to 1 week and mix thoroughly prior to next use.
2. Dilute the 5.45 μM β -lactoglobulin stock solution in the SPRi current buffer to obtain the tenfold analyte dilution series 545 and 54.5 nM β -lactoglobulin (see Note 13). Store at 4 °C up to 1 week, and mix thoroughly prior to next use.
3. Define the spots as regions of interest (ROIs) in the SPRi analysis software. Set the flow rate to obtain a laminar flow in the flow cell (50 $\mu\text{L}/\text{min}$ when using the SPRi-Plex device (see Note 14 for experimental setup details). Wait for the SPRi baseline stabilization.
4. Inject 150 μL of 54.5 pM (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) β -lactoglobulin solution, and monitor the receptor-ligand interactions (see Note 12 for the injection details).
5. At the end of the dissociation phase, inject 150 μL of the regeneration solution.
6. Repeat steps 4 and 5 for successive increasing concentrations of β -lactoglobulin (see Note 15).
7. For the biochip dedicated to further MALDI analysis, the last injection of β -lactoglobulin should not be followed by the regeneration step in order to keep the captured ligand on the biochip.
8. Stop the SPRi experiment, and remove the prism holder from the SPRi. Gently remove the biochip from the prism, and dry it thoroughly with airflow (see Note 16).
9. Clean the SPRi prism by spraying it with ethanol absolute and wiping with lens wipes. Thoroughly dry the prism, and store it.

3.8 MALDI-TOF MS Experiment

1. Depose 0.11 μL of MALDI matrix solution on each receptor spot as well as on several receptor-free locations serving as control immediately after the biochip drying (see Note 17). The spot positions are identified after SPRi experiment by using the transparent plastic stencil (figuring spot location) placed over a light table.
2. Allow the matrix to crystalize (dry) completely. Put the biochip in a labelled flacon, tightly close it, and store it at 4 C until MALDI-TOF MS experiment (see Note 18).
3. Insert the biochip into the MALDI target plate, and introduce it into the mass spectrometer source.

4. Record mass spectra using the following set of parameters: linear mode, positive ion mode, extraction delay, 450 ns; ion source 1 (IS1) voltage, 19.5 kV; ion source 2 (IS2) voltage, 17.65 kV; lens voltage, 6.5 kV. Mass range: 5000–100,000 Da. The laser intensity should be set to just above the desorption/ ionization threshold. Laser shots should be accumulated over each spot to obtain a better signal-to-noise ratio (see Note19).
5. Eject the MALDI plate (target), and recover the biochip. Put the biochip in a labelled flacon, and store it for possible further analysis at room temperature in the absence of light.

Notes

1. Concentrated HCl (12 M) can be used at first to narrow the gap from the starting pH to the desired pH. From then on, it would be better to use less concentrated HCl (e.g., 6 and 1 M) to avoid a sudden drop in pH beyond the target pH value.
2. At first glance, it is difficult to identify the gold side. We recommend using glass slides with a mark, for instance, a bevelled corner in order to facilitate orientation and routine manipulations.
3. A light table and a customized plastic film with marked spot localizations are required for manual spotting and matrix deposition. Alternatively, a commercial spotter can be used; in this case, refer to the settings of the manufacturer. Keep the spot deposition scheme, indicating the position of immobilized molecules — it will be required for the definition of SPRi spots and matrix deposition as well.
4. Given the duration of the activation procedure (~20 h), it is convenient to functionalize two biochips at the same time. For that purpose, all materials (including the beaker size) were adapted for preparation of two biochips. Materials, such as beaker size and chemicals, should be readjusted for different numbers of biochips.
5. Ensure that you are handling the biochips with the gold side up all the time and that the gold-covered surface does not come into contact with any objects (wipes, beaker walls, etc.) in order to avoid any contamination or damage. Take care not to damage or scratch the gold coverage during manipulations, especially with the tweezers.
6. Parafilm is used to prevent evaporation, while aluminum foil (and, eventually, the polystyrene box) ensures protection against any photochemical reaction of the thiol function of PEG.
7. We find it most convenient to prepare separate stock solutions by accurate weighing of dry DCC, NHS, and 4-pyrrolidinopyridine in distinct plastic vials (i.e., 2 mL plastic tubes). Right before the activation step, dry products should be dissolved in the proper amount of DMSO

directly in the vial. We advise to use a vortex and/or ultrasound bath (short pulses) to ensure that reagents are completely dissolved. Alternatively, DCC, NHS, and 4-pyrrolidinopyridine solutions might be prepared a few hours in advance and stored in separate tightly covered glass beakers at room temperature (25 °C) in the absence of light.

8. Activated SPRi biochips can be stored up to 1 month at 4 °C, protected from humidity and in the absence of light.
9. 2 hours is the minimum required time. If time-saving is not a priority, immobilization time can be extended for better results.
10. The volume of the refractive index matching oil required for the efficient adhesion of the biochip to the prism depends strongly on the viscosity of the oil and the surface to be covered, so it should be adapted for each particular case. The volume should be sufficient to completely fill the space without air bubbles between the prism and the biochip, but not in excess to avoid oil bleed at the prism sides.
11. We suggest depositing the oil in a line shape, rather than droplet, and start sliding the biochip over the surface. We have found that relatively viscous oil deposition near the short side of the prism and slow sliding along the surface result in optimal coverage without air bubbles.
12. Each injection consists of two phases of distinct lengths: an association phase (~5 min at a 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ flow rate) and a dissociation phase (~15–30 min at a 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ flow rate), successively. The length of each phase depends on the SPRi system design and receptor-ligand couple used; thus, it should be adapted for each particular case.
13. For protein serial dilution, we recommend the use of plastic tubes with volumes slightly superior to the syringe volume used for protein loading into the flow cell. For example, the use of 2 mL plastic tubes combined with 1 mL syringe will allow the highest recovery of the solution from the bottom of the vial.
14. We are using an SPRi system with a hexagonal-shaped flow cell. It was maintained at 25 °C, and the flow rate was fixed at 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ across all experiments. The flow rate should be adapted depending on the SPR system used: it should be neither fast, nor mass transport limited, to permit efficient monitoring of molecular interactions.
15. We have found that additional injection of current buffer prior to the next analyte injection maintains the cleanliness of the loop and ensures that the obtained SPRi response is produced by the analyte interactions with the immobilized receptors only.
16. At this stage, it is possible to include a direct on-chip trypsin digestion step in order to ascertain the identification of the affinity-captured antigen protein. It is performed by directly dropping the trypsin protease

on each spot of the biochip followed by MALDI-TOF MS identification of the resulting peptides according to [18, 21].

17. Control MALDI matrix spots should be located both inside and outside the SPRi flow cell area in order to control the efficiency of the surface chemistry passivation.
18. We strongly recommend performing MS analysis immediately after matrix deposition and drying. Nevertheless, storage at 4 °C in the dark for up to 1 week is also acceptable. Beyond this period, the efficiency (sensitivity) of MS analysis is seriously decreased, likely due to protein degradation.
19. We suggest accumulating hundreds of shots per spot to obtain a clear mass spectrum.

Acknowledgments

Authors are indebted to Dr. D. Lebeau for access to the MALDI TOF/TOF MS instrument (Den-Service d'Etude du Comportement des Radionucléides, CEA, Paris-Saclay University, France); A. H. acknowledges fellowships from Université d'Evry—Paris Saclay and Région Ile-de France (Dim Analytics).

References

1. Karlsson R, Michaelsson A, Mattsson L (1991) Kinetic analysis of monoclonal antibody-antigen interactions with a new biosensor based analytical system. *J Immunol Methods* 145(229–240):229–240
2. Homola J (2003) Present and future of surface plasmon resonance biosensors. *Anal Bioanal Chem* 377(3):528–539
3. Wassaf D et al (2006) High-throughput affinity ranking of antibodies using surface plasmon resonance microarrays. *Anal Biochem* 351(2): 241–253
4. Homola J (2008) Surface plasmon resonance sensors for detection of chemical and biological species. *Chem Rev* 108(2):462–493
5. Noguez C, Leh H, Langendorf CG, Law RHP, Buckle AM, Buckle M (2010) Characterisation of peptide microarrays for studying antibody-antigen binding using surface plasmon resonance imagery. *PLoS One* 5(8):1–7
6. Noguez C, Leh H, Lautru J, Delelis O, Buckle M (2012) Efficient antifouling surface for quantitative surface plasmon resonance based biosensor analysis. *PLoS One* 7(9):e44287
7. Nedelkov D, Nelson RW (2001) Analysis of native proteins from biological fluids by biomolecular interaction analysis mass spectrometry (BIA/MS): exploring the limit of detection, identification of non-specific binding and detection of multi-protein complexes. *Biosens Bioelectron* 16(9–12):1071–1078
8. Gilligan JJ, Schuck P, Yergey AL (2002) Mass spectrometry after capture and small-volume elution of analyte from a surface plasmon resonance biosensor. *Anal Chem* 74(9): 2041–2047
9. Boireau W, Rouleau A, Lucchi G, Ducoroy P (2009) Revisited BIA-MS combination: entire ‘on-a-chip’ processing leading to the proteins identification at low femtomole to sub-femtomole levels. *Biosens Bioelectron* 24(5):1121–1127
10. Xue J, Bai Y, Liu H (2019) Hybrid methods of surface plasmon resonance coupled to mass spectrometry for biomolecular interaction analysis. *Anal Bioanal Chem* 411(17): 3721–3729
11. Krone JR, Nelson RW, Dogruel D, Williams P, Granzow R (1997) BIA/MS: interfacing biomolecular interaction analysis with mass spectrometry. *Anal Biochem* 244(1):124–132
12. Jansson Ö, Larsericsdotter H, Zhukov A, Areskoug D, Oscarsson S, Buijs J (2006) Optimizing the surface plasmon resonance/mass spectrometry interface for functional proteomics applications: how to avoid and utilize nonspecific adsorption. *Proteomics* 6:2355–2364
13. Bouffartigues E, Leh H, Anger-Leroy M, Rimsky S, Buckle M (2007) Rapid coupling of Surface Plasmon Resonance (SPR and SPRi) and ProteinChip™ based mass spectrometry for the identification of proteins in nucleoprotein interactions. *Nucleic Acids Res* 35(6):e39
14. Stigter ECA, de Jong GJ, van Bennekom WP (2009) Development of an on-line SPR-digestion-nanoLC-MS/MS system for the quantification and identification of interferon- γ in plasma. *Biosensor Bioelectron* 24(7): 2184–2190
15. Zhang Y et al (2015) Interface for online coupling of surface plasmon resonance to direct analysis in real time mass spectrometry. *Anal Chem* 87(13):6505–6509
16. Joshi S, Zuilhof H, van Beek TA, Nielen MWF (2017) Biochip spray: simplified coupling of surface plasmon resonance biosensing and mass spectrometry. *Anal Chem* 89(3): 1427–1432
17. Nedelkov D (2007) Development of surface plasmon resonance mass spectrometry array platform. *Anal Chem* 79(15):5987–5990
18. Bellon S et al (2009) Hyphenation of surface plasmon resonance imaging to matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry by on-chip mass spectrometry and tandem mass spectrometry analysis. *Anal Chem* 81(18):7695–7702
19. Remy-Martin F et al (2012) Automated cancer marker characterization in human plasma using Surface Plasmon Resonance in Array combined with Mass Spectrometry (SUPRA-MS). *Procedia Chem* 6:11–19
20. Stigter ECA, de Jong GJ, van Bennekom WP (2013) Coupling surface-plasmon resonance and mass spectrometry to quantify and to identify ligands. *TrAC—Trends Anal Chem* 45:107–120
21. Musso J et al (2015) Biomarkers probed in saliva by surface plasmon resonance imaging coupled to matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry in array format. *Anal Bioanal Chem* 407(5):1285–1294
22. Przybylski C et al (2020) Surface plasmon resonance imaging coupled to on-chip mass spectrometry: a new tool to probe protein-GAG interactions. *Anal Bioanal Chem* 412:507–519

RÉFÉRENCES

- [1] M. Vailati-riboni, V. Palombo, and J. J. Loor, “What Are Omics Sciences?,” pp. 1–7.
- [2] L. Bonetta, “Interactome under construction,” *Nature*, vol. 468, p. 851, Dec. 2010.
- [3] A. Re, E. Kulberkyte, T. Joshi, and C. T. Workman, “RNA Sequence, Structure, and Function: Computational and Bioinformatic Methods,” vol. 1097, no. March 2014, 2014.
- [4] C. Jin, L. Qiu, J. Li, T. Fu, X. Zhang, and W. Tan, “Cancer biomarker discovery using DNA aptamers,” *Analyst*, vol. 141, no. 2. pp. 461–466, 2016.
- [5] G. Figueroa-Miranda *et al.*, “Aptamer-based electrochemical biosensor for highly sensitive and selective malaria detection with adjustable dynamic response range and reusability,” *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 255, pp. 235–243, 2018.
- [6] S. Z. Mousavisani, J. B. Raoof, A. P. F. Turner, R. Ojani, and W. C. Mak, “Label-free DNA sensor based on diazonium immobilisation for detection of DNA damage in breast cancer 1 gene,” *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 264, pp. 59–66, 2018.
- [7] D. L. Nelson and M. M. Cox, *Lehninger Biochemie*, vol. 5. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2001.
- [8] H. Lodish, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore, and J. Darnell, *Molecular Cell Biology. 4th edition*, 4th ed., vol. 29, no. 3. New York, 2000.
- [9] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, and L. Stryer, *Biochemistry, Fifth Edition*. W.H. Freeman, 2002.
- [10] A. J. Tudos and R. B. Schasfoort, “Chapter 1. Introduction to Surface Plasmon Resonance,” in *Handbook of Surface Plasmon Resonance*, Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2008, pp. 1–14.
- [11] M. Schena, D. Shalon, R. W. Davis, and P. O. Brown, “Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray,” *Science (80-.)*, vol. 270, no. 5235, pp. 467–470, 1995.
- [12] A. Berard, A. L. Kroeker, and K. M. Coombs, “Transcriptomics and quantitative proteomics in virology,” *Future Virol.*, vol. 7, no. 12, pp. 1193–1204, 2012.
- [13] Q. Xu and K. S. Lam, “Protein and Chemical Microarrays—Powerful Tools for Proteomics,” *J. Biomed. Biotechnol.*, vol. 2003, no. 5, pp. 257–266, 2003.
- [14] F. Santos, M. Martínez-García, V. Parro, and J. Antón, “Microarray tools to unveil viral-microbe interactions in nature,” *Front. Ecol. Evol.*, vol. 2, no. July, pp. 1–5, 2014.
- [15] H.-P. Saluz, J. Iqbal, G. Limmon, A. Ruryk, and Z. H. Wu, *Fundamentals of DNA-chip/array technology for comparative gene-expression analysis*, vol. 83. 2002.
- [16] S. C. Sealfon and T. T. Chu, “RNA and DNA Microarrays,” in *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, vol. 671, no. 3, 2011, pp. 3–34.
- [17] R. Bumgarner, “Overview of DNA Microarrays: Types, Applications, and Their Future,” in *Current Protocols in Molecular Biology*, vol. 6137, no. 206, Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2013, pp. 1–17.

- [18] T. S. Furey, “ChIP–seq and beyond: new and improved methodologies to detect and characterize protein–DNA interactions,” *Nat. Rev. Genet.*, vol. 13, no. 12, pp. 840–852, Dec. 2012.
- [19] T. Waller, T. Gubała, K. Sarapata, M. Piwowar, and W. Jurkowski, “DNA microarray integromics analysis platform,” *BioData Min.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–23, 2015.
- [20] S. Fodor, J. Read, M. Pirrung, L. Stryer, A. Lu, and D. Solas, “Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis,” *Science (80-.)*, vol. 251, no. 4995, pp. 767–773, Feb. 1991.
- [21] R. Volkmer, V. Tapia, and C. Landgraf, “Synthetic peptide arrays for investigating protein interaction domains,” *FEBS Lett.*, vol. 586, no. 17, pp. 2780–2786, 2012.
- [22] L. Berrade, A. E. Garcia, and J. A. Camarero, “Protein Microarrays: Novel Developments and Applications,” *Pharm. Res.*, vol. 28, no. 7, pp. 1480–1499, Jul. 2011.
- [23] G. MacBeath and S. L. Schreiber, “Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination,” *Science*, vol. 289, no. 5485, pp. 1760–3, Sep. 2000.
- [24] H. Zhu *et al.*, “Global analysis of protein activities using proteome chips,” *Science (80-.)*, vol. 293, no. 5537, pp. 2101–2105, 2001.
- [25] H. Zhu *et al.*, “Global analysis of protein phosphorylation in yeast,” *Nature*, vol. 438, no. 7068, pp. 679–684, 2005.
- [26] S. C. Popescu *et al.*, “MAPK target networks in *Arabidopsis thaliana* revealed using functional protein microarrays,” *Genes Dev.*, vol. 23, no. 1, pp. 80–92, 2009.
- [27] J. M. Boutell, D. J. Hart, B. L. J. Godber, R. Z. Kozlowski, and J. M. Blackburn, “Functional protein microarrays for parallel characterisation of p53 mutants,” *Proteomics*, vol. 4, no. 7, pp. 1950–1958, Jul. 2004.
- [28] R. B. Jones, A. Gordus, J. A. Krall, and G. MacBeath, “A quantitative protein interaction network for the ErbB receptors using protein microarrays,” *Nature*, vol. 439, no. 7073, pp. 168–174, 2006.
- [29] K. Tomizaki, K. Usui, and H. Mihara, “Protein-protein interactions and selection: array-based techniques for screening disease-associated biomarkers in predictive/early diagnosis,” *FEBS J.*, vol. 277, no. 9, pp. 1996–2005, May 2010.
- [30] D. Mattoon, G. Michaud, J. Merkel, and B. Schweitzer, “Biomarker discovery using protein microarray technology platforms: Antibody-antigen complex profiling,” *Expert Rev. Proteomics*, vol. 2, no. 6, pp. 879–889, 2005.
- [31] G. Arakere, A. E. Flores, P. Ferrieri, and C. E. Frasch, “Inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for serotyping of group B streptococcal isolates,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 37, no. 8, pp. 2564–2567, 1999.
- [32] Z. Weng and Q. Zhao, “Utilizing ELISA to Monitor Protein-Protein Interaction,” vol. 23, 2015, pp. 341–352.
- [33] K. Lawlor, A. Jacovina, D. S. Gembitsky, P. Tempst, and M. Yaneva, “A Prototype

- Antibody Microarray Platform to Monitor Changes in Protein Tyrosine Phosphorylation,” *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 3, no. 11, pp. 1102–1118, 2004.
- [34] S. Chen *et al.*, “Multiplexed analysis of glycan variation on native proteins captured by antibody microarrays,” *Nat. Methods*, vol. 4, no. 5, pp. 437–444, 2007.
- [35] J. R. Sydor *et al.*, “Chip-Based Analysis of Protein-Protein Interactions by Fluorescence Detection and On-Chip Immunoprecipitation Combined with μ LC-MS/MS Analysis,” *Anal. Chem.*, vol. 75, no. 22, pp. 6163–6170, 2003.
- [36] J. Voshol and D. A. Guthy, “Antibody-based arrays in disease proteomics,” *Antib. Technol. J.*, p. 15, 2015.
- [37] A. Britschgi *et al.*, “JAK2/STAT5 Inhibition Circumvents Resistance to PI3K/mTOR Blockade: A Rationale for Cotargeting These Pathways in Metastatic Breast Cancer,” *Cancer Cell*, vol. 22, no. 6, pp. 796–811, Dec. 2012.
- [38] K. Y. Tomizaki, K. Usui, and H. Mihara, “Protein-detecting microarrays: Current accomplishments and requirements,” *ChemBioChem*, vol. 6, no. 5, pp. 782–799, 2005.
- [39] S. Ray, G. Mehta, and S. Srivastava, “Label-free detection techniques for protein microarrays: Prospects, merits and challenges,” *Proteomics*, vol. 10, no. 4, pp. 731–748, 2010.
- [40] K. D. G. Pflieger, R. M. Seeber, and K. A. Eidne, “Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) for the real-time detection of protein-protein interactions,” *Nat. Protoc.*, vol. 1, no. 1, pp. 337–345, 2006.
- [41] D. W. Piston and G. J. Kremers, “Fluorescent protein FRET: the good, the bad and the ugly,” *Trends Biochem. Sci.*, vol. 32, no. 9, pp. 407–414, 2007.
- [42] K. G. Harikumar, Y. Yan, T.-H. Xu, K. Melcher, H. E. Xu, and L. J. Miller, “Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) Assay for Determination of Molecular Interactions in Living Cells,” *Bio-protocol*, vol. 7, no. 22, p. e2904, 2017.
- [43] Y. Yan, T.-H. Xu, K. G. Harikumar, L. J. Miller, K. Melcher, and H. E. Xu, “Dimerization of the transmembrane domain of amyloid precursor protein is determined by residues around the γ -secretase cleavage sites,” *J. Biol. Chem.*, vol. 292, no. 38, pp. 15826–15837, Sep. 2017.
- [44] T.-H. Xu, Y. Yan, Y. Kang, Y. Jiang, K. Melcher, and H. E. Xu, “Alzheimer’s disease-associated mutations increase amyloid precursor protein resistance to γ -secretase cleavage and the A β 42/A β 40 ratio,” *Cell Discov.*, vol. 2, no. 1, p. 16026, Dec. 2016.
- [45] M. Strianese, M. Staiano, A. Capo, G. Pinto, C. Pellicchia, and S. D’Auria, “Modern fluorescence-based concepts and methods to study biomolecular interactions,” *Mol. Syst. Des. Eng.*, vol. 2, no. 2, pp. 123–132, 2017.
- [46] J. R. Lakowicz *et al.*, “Radiative decay engineering: 2. Effects of silver island films on fluorescence intensity, lifetimes, and resonance energy transfer,” *Anal. Biochem.*, vol. 301, no. 2, pp. 261–277, 2002.

- [47] R. Y. Tsien and A. Miyawaki, "Seeing the machinery of live cells," *Science* (80-.), vol. 280, no. 5371, pp. 1954–1955, 1998.
- [48] S. Karasawa, T. Araki, T. Nagai, H. Mizuno, and A. Miyawaki, "Cyan-emitting and orange-emitting fluorescent proteins as a donor/acceptor," *Biochem. J.*, vol. 381, pp. 307–312, 2004.
- [49] C. E. Rowland, C. W. Brown, I. L. Medintz, and J. B. Delehanty, "Intracellular FRET-based probes: a review," *Methods Appl. Fluoresc.*, vol. 3, no. 4, p. 042006, Oct. 2015.
- [50] P. Manavalan and W. C. Johnson, "Variable selection method improves the prediction of protein secondary structure from circular dichroism spectra," *Anal. Biochem.*, vol. 167, no. 1, pp. 76–85, 1987.
- [51] M. Urbanová, "Bioinspired interactions studied by vibrational circular dichroism," *Chirality*, vol. 21, no. 1E, pp. E215–E230, 2009.
- [52] J. M. Batista, E. W. Blanch, and V. Da Silva Bolzani, "Recent advances in the use of vibrational chiroptical spectroscopic methods for stereochemical characterization of natural products," *Nat. Prod. Rep.*, vol. 32, no. 9, pp. 1280–1302, 2015.
- [53] D. Kurouski, "Advances of Vibrational Circular Dichroism (VCD) in bioanalytical chemistry. A review," *Anal. Chim. Acta*, vol. 990, no. Vcd, pp. 54–66, 2017.
- [54] B. Ranjbar and P. Gill, "Circular dichroism techniques: Biomolecular and nanostructural analyses- A review," *Chem. Biol. Drug Des.*, vol. 74, no. 2, pp. 101–120, 2009.
- [55] H. J. Byrne, P. Knief, M. E. Keating, and F. Bonnier, "Spectral pre and post processing for infrared and Raman spectroscopy of biological tissues and cells," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 45, no. 7, pp. 1865–1878, 2016.
- [56] C. Lee and C. D. Bain, "Raman spectra of planar supported lipid bilayers," *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1711, no. 1, pp. 59–71, 2005.
- [57] C. Lee, H. Wacklin, and C. D. Bain, "Changes in molecular composition and packing during lipid membrane reconstitution from phospholipid-surfactant micelles," *Soft Matter*, vol. 5, no. 3, pp. 568–575, 2009.
- [58] J. Kundu, C. S. Levin, and N. J. Halas, "Real-time monitoring of lipid transfer between vesicles and hybrid bilayers on Au nanoshells using surface enhanced Raman scattering (SERS)," *Nanoscale*, vol. 1, no. 1, pp. 114–117, 2009.
- [59] C. L. Leverette and R. A. Dluhy, "Vibrational characterization of a planar-supported model bilayer system utilizing surface-enhanced Raman scattering (SERS) and infrared reflection-absorption spectroscopy (IRRAS)," *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 243, no. 1–3, pp. 157–167, 2004.
- [60] F. Bonnier *et al.*, "Imaging live cells grown on a three dimensional collagen matrix using Raman microspectroscopy," *Analyst*, vol. 135, no. 12, pp. 3169–3177, 2010.
- [61] B. S. Kalanoor, M. Ronen, Z. Oren, D. Gerber, and Y. R. Tischler, "New Method to Study the Vibrational Modes of Biomolecules in the Terahertz Range Based on a Single-Stage

- Raman Spectrometer,” *ACS Omega*, vol. 2, no. 3, pp. 1232–1240, 2017.
- [62] Y. Neehaul, Y. Chen, C. Werner, J. A. Fee, B. Ludwig, and P. Hellwig, “Electrochemical and infrared spectroscopic analysis of the interaction of the CuA domain and cytochrome c552 from *Thermus thermophilus*,” *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.*, vol. 1817, no. 10, pp. 1950–1954, 2012.
- [63] A. Rohman, A. Windarsih, E. Lukitaningsih, M. Rafi, K. Betania, and N. A. Fadzillah, “The use of FTIR and Raman spectroscopy in combination with chemometrics for analysis of biomolecules in biomedical fluids: A review,” *Biomed. Spectrosc. Imaging*, vol. 8, pp. 55–71, 2019.
- [64] G. Dittmar and M. Selbach, “SILAC for biomarker discovery,” *Proteomics - Clin. Appl.*, vol. 9, no. 3–4, pp. 301–306, 2015.
- [65] H. Kaur, S. R. Bhagwat, T. K. Sharma, and A. Kumar, “Analytical techniques for characterization of biological molecules - Proteins and aptamers/oligonucleotides,” *Bioanalysis*, vol. 11, no. 2, pp. 103–117, 2019.
- [66] B. Meyer and T. Peters, “NMR spectroscopy techniques for screening and identifying ligand binding to protein receptors,” *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 42, no. 8, pp. 864–890, 2003.
- [67] A. Viegas, J. Manso, F. L. Nobrega, and E. J. Cabrita, “Saturation-transfer difference (STD) NMR: A simple and fast method for ligand screening and characterization of protein binding,” *J. Chem. Educ.*, vol. 88, no. 7, pp. 990–994, 2011.
- [68] R. P. Venkitakrishnan, O. Benard, M. Max, J. L. Markley, and F. M. Assadi-porter, “Membrane Protein Structure and Dynamics,” vol. 914, pp. 47–63, 2012.
- [69] A. Velazquez-Campoy, S. A. Leavitt, and E. Freire, “Characterization of protein-protein interactions by isothermal titration calorimetry,” *Methods Mol. Biol.*, vol. 261, p. 35–54, 2004.
- [70] E. Boeri Erba, K. Barylyuk, Y. Yang, and R. Zenobi, “Quantifying protein-protein interactions within noncovalent complexes using electrospray ionization mass spectrometry,” *Anal. Chem.*, vol. 83, no. 24, pp. 9251–9259, 2011.
- [71] D. L. Cameron, J. Jakus, S. R. Pauleta, G. W. Pettigrew, and A. Cooper, “Pressure perturbation calorimetry and the thermodynamics of noncovalent interactions in water: Comparison of protein-protein, protein-ligand, and cyclodextrin-adamantane complexes,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 114, no. 49, pp. 16228–16235, 2010.
- [72] H. Whatley, “Basic Principles and Modes of Capillary Electrophoresis BT - Clinical and Forensic Applications of Capillary Electrophoresis,” J. R. Petersen and A. A. Mohammad, Eds. Totowa, NJ: Humana Press, 2001, pp. 21–58.
- [73] G. Lu, C. L. Crieffeld, S. Gattu, L. M. Veltri, and L. A. Holland, “Capillary Electrophoresis Separations of Glycans,” *Chem. Rev.*, vol. 118, no. 17, pp. 7867–7885, 2018.
- [74] Y. H. Chu, L. Z. Avila, H. A. Biebuyck, and G. M. Whitesides, “Use of affinity capillary

- electrophoresis to measure binding constants of ligands to proteins,” *J. Med. Chem.*, vol. 35, no. 15, pp. 2915–2917, Jul. 1992.
- [75] H. M. Albishri *et al.*, “Recent advances in affinity capillary electrophoresis for binding studies,” *Bioanalysis*, vol. 6, no. 24, pp. 3369–3392, 2014.
- [76] M. Berezovski and S. N. Krylov, “Nonequilibrium capillary electrophoresis of equilibrium mixtures - A single experiment reveals equilibrium and kinetic parameters of protein-DNA interactions,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 124, no. 46, pp. 13674–13675, 2002.
- [77] D. T. Tran *et al.*, “Selection and characterization of DNA aptamers for egg white lysozyme,” *Molecules*, vol. 15, no. 3, pp. 1127–1140, 2010.
- [78] J. A. Loo, “Studying noncovalent protein complexes by electrospray ionization mass spectrometry,” *Mass Spectrom. Rev.*, vol. 16, no. 1, pp. 1–23, 1997.
- [79] C. V. Robinson *et al.*, “Probing the Nature of Non-covalent Protein Ligand interactions by Mass Spectrometry,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 118, no. 5, pp. 8646–8653, 1996.
- [80] S. J. Shields, O. Oyeyemi, F. C. Lightstone, and R. Balhorn, “Mass spectrometry and non-covalent protein-ligand complexes: Confirmation of binding sites and changes in tertiary structure,” *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 14, no. 5, pp. 460–470, 2003.
- [81] J. L. P. Benesch, B. T. Ruotolo, D. A. Simmons, and C. V. Robinsons, “Protein complexes in the gas phase: Technology for structural genomics and proteomics,” *Chem. Rev.*, vol. 107, no. 8, pp. 3544–3567, 2007.
- [82] A. E. Ashcroft, “Recent developments in electrospray ionisation mass spectrometry: Noncovalently bound protein complexes,” *Nat. Prod. Rep.*, vol. 22, no. 4, pp. 452–464, 2005.
- [83] J. L. P. Benesch and B. T. Ruotolo, “Mass spectrometry: Come of age for structural and dynamical biology,” *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 21, no. 5, pp. 641–649, 2011.
- [84] A. J. R. Heck, “Native mass spectrometry: A bridge between interactomics and structural biology,” *Nat. Methods*, vol. 5, no. 11, pp. 927–933, 2008.
- [85] M. Sharon and C. V. Robinson, “The Role of Mass Spectrometry in Structure Elucidation of Dynamic Protein Complexes,” *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 76, no. 1, pp. 167–193, 2007.
- [86] T. Wytenbach and M. T. Bowers, “Intermolecular Interactions in Biomolecular Systems Examined by Mass Spectrometry,” *Annu. Rev. Phys. Chem.*, vol. 58, no. 1, pp. 511–533, 2007.
- [87] G. R. Hilton and J. L. P. Benesch, “Two decades of studying non-covalent biomolecular assemblies by means of electrospray ionization mass spectrometry,” *J. R. Soc. Interface*, vol. 9, no. 70, pp. 801–816, 2012.
- [88] A. R. McKay, B. T. Ruotolo, L. L. Ilag, and C. V. Robinson, “Mass measurements of increased accuracy resolve heterogeneous populations of intact ribosomes,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 128, no. 35, pp. 11433–11442, 2006.
- [89] F. Sobott and C. V. Robinson, “Characterising electrosprayed biomolecules using tandem-

- MS - The noncovalent GroEL chaperonin assembly,” *Int. J. Mass Spectrom.*, vol. 236, no. 1–3, pp. 25–32, 2004.
- [90] J. Greaves and J. Roboz, *Mass Spectrometry for the Novice*. CRC Press, 2013.
- [91] A. C. Leney and A. J. R. Heck, “Native Mass Spectrometry : What is in the Name ?,” *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, pp. 5–13, 2017.
- [92] Y. Gordiyenko, S. Deroo, M. Zhou, H. Videler, and C. V. Robinson, “Acetylation of L12 Increases Interactions in the Escherichia coli Ribosomal Stalk Complex,” *J. Mol. Biol.*, vol. 380, no. 2, pp. 404–414, 2008.
- [93] C. Uetrecht *et al.*, “High-resolution mass spectrometry of viral assemblies: Molecular composition and stability of dimorphic hepatitis B virus capsids,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 105, no. 27, pp. 9216–9220, 2008.
- [94] N. P. Barrera *et al.*, “Mass spectrometry of membrane transporters reveals subunit stoichiometry and interactions,” *Nat. Methods*, vol. 6, no. 8, pp. 585–587, 2009.
- [95] J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, and C. M. Whitehouse, “Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules,” *Science (80-.)*, vol. 246, no. 4926, pp. 64–71, 1989.
- [96] K. Tanaka *et al.*, “Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry,” *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 2, no. 8, pp. 151–153, 1988.
- [97] M. Karas and F. Hillenkamp, “Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons,” *Anal. Chem.*, vol. 60, no. 20, pp. 2299–2301, 1988.
- [98] R. D. Smith, J. A. Loo, C. G. Edmonds, C. J. Barinaga, and H. R. Udseth, “New developments in biochemical mass spectrometry: electrospray ionization,” *Anal. Chem.*, vol. 62, no. 9, pp. 882–899, 1990.
- [99] A. Tessitore *et al.*, “Serum biomarkers identification by mass spectrometry in high-mortality tumors,” *Int. J. Proteomics*, vol. 2013, pp. 1–15, 2013.
- [100] B. van Breukelen, A. Barendregt, A. J. R. Heck, and R. H. H. van den Heuvel, “Resolving stoichiometries and oligomeric states of glutamate synthase protein complexes with curve fitting and simulation of electrospray mass spectra,” *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 20, no. 16, pp. 2490–6, Dec. 2006.
- [101] L. A. Lane *et al.*, “Mass spectrometry reveals stable modules in holo and apo RNA polymerases i and III,” *Structure*, vol. 19, no. 1, pp. 90–100, 2011.
- [102] A. Poliakov *et al.*, “Macromolecular mass spectrometry and electron microscopy as complementary tools for investigation of the heterogeneity of bacteriophage portal assemblies,” *J. Struct. Biol.*, vol. 157, no. 2, pp. 371–383, 2007.
- [103] F. Chen, B. Gülbakan, S. Weidmann, S. R. Fagerer, A. J. Ibáñez, and R. Zenobi, “Applying mass spectrometry to study non-covalent biomolecule complexes,” *Mass Spectrom. Rev.*, vol. 35, no. 1, pp. 48–70, Jan. 2016.

- [104] J. Marcoux and C. V. Robinson, “Twenty years of gas phase structural biology,” *Structure*, vol. 21, no. 9, pp. 1541–1550, 2013.
- [105] K. Chingin, K. Barylyuk, and H. Chen, “On the preservation of non-covalent protein complexes during electrospray ionization,” *Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.*, vol. 374, no. 2079, 2016.
- [106] R. R. Abzalimov and I. A. Kaltashov, “Electrospray ionization mass spectrometry of highly heterogeneous protein systems: Protein ion charge state assignment via incomplete charge reduction,” *Anal. Chem.*, vol. 82, no. 18, pp. 7523–7526, 2010.
- [107] M. Scalabrin, M. Palumbo, and S. N. Richter, “Highly Improved Electrospray Ionization-Mass Spectrometry Detection of G-Quadruplex-Folded Oligonucleotides and Their Complexes with Small Molecules,” *Anal. Chem.*, vol. 89, no. 17, pp. 8632–8637, 2017.
- [108] V. Greco *et al.*, “Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical proteomics,” *Expert Rev. Proteomics*, vol. 15, no. 8, pp. 683–696, Aug. 2018.
- [109] P. Ma, S. Ju, Y. Cao, B. Gu, W. Fan, and L. Wang, “Accuracy of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of Mycobacteria: a systematic review and meta-analysis,” *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–9, 2018.
- [110] W. Florio, A. Tavanti, E. Ghelardi, and A. Lupetti, “MALDI-TOF MS Applications to the Detection of Antifungal Resistance: State of the Art and Future Perspectives ,” *Frontiers in Microbiology* , vol. 9. p. 2577, 2018.
- [111] J. Musso *et al.*, “Biomarkers probed in saliva by surface plasmon resonance imaging coupled to matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry in array format,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 407, no. 5, pp. 1285–1294, 2015.
- [112] U. Anders *et al.*, “SPRi-MALDI MS: characterization and identification of a kinase from cell lysate by specific interaction with different designed ankyrin repeat proteins,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 409, no. 7, pp. 1827–1836, 2017.
- [113] F. Ardito *et al.*, “Novel possibilities in the study of the salivary proteomic profile using SELDI-TOF/MS technology (Review),” *Oncol. Lett.*, vol. 11, no. 3, pp. 1967–1972, 2016.
- [114] T. W. Hutchens and T. -T Yip, “New desorption strategies for the mass spectrometric analysis of macromolecules,” *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 7, no. 7, pp. 576–580, 1993.
- [115] S. Balamurugan, A. Obubuafo, S. A. Soper, R. L. McCarley, and D. A. Spivak, “Designing highly specific biosensing surfaces using aptamer monolayers on gold,” *Langmuir*, vol. 22, no. 14, pp. 6446–6453, 2006.
- [116] L. O. Lomas and S. R. Weinberger, “Surface-Enhanced Laser Desorption / Ionization (SELDI) Technology,” *John Wiley Sons, Ltd.*, p. 10, 2007.
- [117] B. T. Ruotolo, “Evidence for Macromolecular Protein Rings in the Absence of Bulk Water,” *Science (80-.)*, vol. 310, no. 5754, pp. 1658–1661, Dec. 2005.

- [118] B. T. Ruotolo, S. Hyung, P. M. Robinson, K. Giles, R. H. Bateman, and C. V. Robinson, "Ion Mobility – Mass Spectrometry Reveals Long-Lived, Unfolded Intermediates in the Dissociation of Protein Complexes **," pp. 8001–8004, 2007.
- [119] A. A. Shvartsburg, S. V. Mashkevich, E. S. Baker, and R. D. Smith, "Optimization of Algorithms for Ion Mobility Calculations," pp. 2002–2010, 2010.
- [120] Y. Feng *et al.*, "Global analysis of protein structural changes in complex proteomes," *Nat. Biotechnol.*, vol. 32, no. 10, pp. 1036–1044, 2014.
- [121] S. R. Marcsisin and J. R. Engen, "Hydrogen exchange mass spectrometry: what is it and what can it tell us?," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 397, no. 3, pp. 967–972, 2010.
- [122] J. G. Kiselar and M. R. Chance, "Future directions of structural mass spectrometry using hydroxyl radical footprinting," *J. Mass Spectrom.*, vol. 45, no. 12, pp. 1373–1382, 2010.
- [123] K. S. Li, L. Shi, and M. L. Gross, "Mass Spectrometry-Based Fast Photochemical Oxidation of Proteins (FPOP) for Higher Order Structure Characterization," *Acc. Chem. Res.*, vol. 51, no. 3, pp. 736–744, Mar. 2018.
- [124] J. H. Morris *et al.*, "Affinity purification–mass spectrometry and network analysis to understand protein-protein interactions," *Nat. Protoc.*, vol. 9, no. 11, pp. 2539–2554, Nov. 2014.
- [125] A. Bauer and B. Kuster, "Affinity purification-mass spectrometry," *Eur. J. Biochem.*, vol. 270, no. 4, pp. 570–578, Jan. 2003.
- [126] J. Rappsilber, "The beginning of a beautiful friendship: Cross-linking/mass spectrometry and modelling of proteins and multi-protein complexes," *J. Struct. Biol.*, vol. 173, no. 3, pp. 530–540, 2011.
- [127] J. D. Chavez and J. E. Bruce, "Chemical cross-linking with mass spectrometry: a tool for systems structural biology," *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 48, pp. 8–18, Feb. 2019.
- [128] H. Li, R. Popp, and C. H. Borchers, "Affinity-mass spectrometric technologies for quantitative proteomics in biological fluids," *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 90, pp. 80–88, 2017.
- [129] M. Pabst *et al.*, "Self-Aliquoting Microarray Plates for Accurate Quantitative Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry," *Anal. Chem.*, vol. 85, no. 20, pp. 9771–9776, Oct. 2013.
- [130] A. J. Ibanez *et al.*, "Mass spectrometry-based metabolomics of single yeast cells," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 110, no. 22, pp. 8790–8794, May 2013.
- [131] R. W. W. Wood, "On a Remarkable Case of Uneven Distribution of Light in a Diffraction Grating Spectrum," *Proc. Phys. Soc. London*, vol. 18, no. 1, p. 269, 1902.
- [132] A. Otto, "Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection," *Physics (College Park, Md.)*, vol. 410, pp. 398–410, 1968.
- [133] E. Kretschmann and H. Raether, "Radiative decay of nonradiative plasmons excited by light," *Z. Naturforsch. A*, vol. 23, no. November 1968, pp. 2135–2136, 1968.

- [134] D. C. Cullen, R. G. W. Brown, and C. R. Lowe, "Detection of immuno-complex formation via surface plasmon resonance on gold-coated diffraction gratings," *Biosensors*, vol. 3, no. 4, pp. 211–225, 1987.
- [135] M. J. Jory, G. W. Bradberry, P. S. Cann, and J. R. Sambles, "A surface-plasmon-based optical sensor using acousto-optics," *Meas. Sci. Technol.*, vol. 6, no. 8, pp. 1193–1200, 1995.
- [136] C. R. Lawrence, N. J. Geddes, D. N. Furlong, and J. R. Sambles, "Surface plasmon resonance studies of immunoreactions utilizing disposable diffraction gratings," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 11, no. 4, pp. 389–400, 1996.
- [137] B. Liedberg, C. Nylander, and I. Lunström, "Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing," *Sensors and Actuators*, vol. 4, no. C, pp. 299–304, 1983.
- [138] Robert Karlsson, Anne Michaelsson, and Lars Mattsson, "Kinetic analysis of monoclonal antibody-antigen interactions with a new biosensor based analytical system," *J. Immunol. Methods*, vol. 145, no. 229–240, pp. 229–240, 1991.
- [139] J. Homola, "Present and future of surface plasmon resonance biosensors," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 377, no. 3, pp. 528–539, Oct. 2003.
- [140] R. P. H. Kooyman, "Chapter 2. Physics of Surface Plasmon Resonance," *Handb. Surf. Plasmon Reson.*, pp. 15–34.
- [141] D. Wassaf *et al.*, "High-throughput affinity ranking of antibodies using surface plasmon resonance microarrays," *Anal. Biochem.*, vol. 351, no. 2, pp. 241–253, Apr. 2006.
- [142] J. Homola, "Surface plasmon resonance sensors for detection of chemical and biological species," *Chem. Rev.*, vol. 108, no. 2, pp. 462–493, 2008.
- [143] H. Liang *et al.*, "Surface plasmon resonance instrument as a refractometer for liquids and ultrathin films," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 149, no. 1, pp. 212–220, 2010.
- [144] P. Pattnaik, "Surface Plasmon Resonance: Applications in Understanding Receptor–Ligand Interaction," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 126, no. 2, pp. 079–092, 2005.
- [145] B. P. Nelson, T. E. Grimsrud, M. R. Liles, R. M. Goodman, and R. M. Corn, "Surface Plasmon Resonance Imaging Measurements of DNA and RNA Hybridization Adsorption onto DNA Microarrays," *Anal. Chem.*, vol. 73, no. 1, pp. 1–7, Jan. 2001.
- [146] S. Scarano, C. Scuffi, M. Mascini, and M. Minunni, "Surface plasmon resonance imaging for affinity-based biosensors," *Lect. Notes Electr. Eng.*, vol. 54 LNEE, pp. 425–428, 2010.
- [147] C. Lausted, Z. Hu, L. Hood, and C. T. Campbell, "SPR Imaging for High Throughput, Label-Free Interaction Analysis," *Comb. Chem. High Throughput Screen.*, vol. 12, no. 8, pp. 741–751, 2009.
- [148] C. T. Campbell and G. Kim, "SPR microscopy and its applications to high-throughput analyses of biomolecular binding events and their kinetics," *Biomaterials*, vol. 28, no. 15, pp. 2380–2392, 2007.
- [149] Y. S. Sun, "Use of Microarrays as a High-Throughput Platform for Label-Free

- Biosensing,” *J. Lab. Autom.*, vol. 20, no. 4, pp. 334–353, 2015.
- [150] G. Spoto and M. Minunni, “Surface plasmon resonance imaging: What next?,” *J. Phys. Chem. Lett.*, vol. 3, no. 18, pp. 2682–2691, 2012.
- [151] M. J. Kwon, J. Lee, A. W. Wark, and H. J. Lee, “Nanoparticle-enhanced surface plasmon resonance detection of proteins at attomolar concentrations: Comparing different nanoparticle shapes and sizes,” *Anal. Chem.*, vol. 84, no. 3, pp. 1702–1707, 2012.
- [152] P. N. Abadian, C. P. Kelley, and E. D. Goluch, “Cellular Analysis and Detection Using Surface Plasmon Resonance Techniques,” *Anal. Chem.*, vol. 86, no. 6, pp. 2799–2812, Mar. 2014.
- [153] Y.-Z. Dai, J.-H. Qiu, B. Feng, P. Zhang, and Y.-P. Chen, “Imaging the Microprocesses in Biofilm Matrices,” *Trends Biotechnol.*, vol. 37, no. 2, pp. 214–226, 2018.
- [154] A. Syahir, K. Usui, K. Tomizaki, K. Kajikawa, and H. Mihara, “Label and Label-Free Detection Techniques for Protein Microarrays,” *Microarrays*, vol. 4, no. 2, pp. 228–244, 2015.
- [155] E. Bouffartigues, H. Leh, M. Anger-Leroy, S. Rimsky, and M. Buckle, “Rapid coupling of Surface Plasmon Resonance (SPR and SPRi) and ProteinChip??? based mass spectrometry for the identification of proteins in nucleoprotein interactions,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 35, no. 6, 2007.
- [156] R. W. Nelson, J. R. Krone, and O. Jansson, “Surface Plasmon Resonance Biomolecular Interaction Analysis Mass Spectrometry. 1. Chip-Based Analysis,” *Anal. Chem.*, vol. 69, no. 21, pp. 4363–4368, Nov. 1997.
- [157] J. R. Krone, R. W. Nelson, D. Dogruel, P. Williams, and R. Granzow, “BIA/MS: Interfacing biomolecular interaction analysis with mass spectrometry,” *Anal. Biochem.*, vol. 244, no. 1, pp. 124–132, 1997.
- [158] E. T. Gedig, “Chapter 6. Surface Chemistry in SPR Technology,” *Handb. Surf. Plasmon Reson.*, pp. 173–220, 2008.
- [159] C. Noguees, H. Leh, J. Lautru, O. Delelis, and M. Buckle, “Efficient Antifouling Surface for Quantitative Surface Plasmon Resonance Based Biosensor Analysis,” *PLoS One*, vol. 7, no. 9, 2012.
- [160] R. Valiokas, S. Svedhem, S. C. T. Svensson, and B. Liedberg, “Self-assembled monolayers of oligo(ethylene glycol)-terminated and amide group containing alkanethiolates on gold,” *Langmuir*, vol. 15, no. 10, pp. 3390–3394, 1999.
- [161] M. Piliarik and L. Párová, “Biosensors and Bioelectronics High-throughput SPR sensor for food safety,” vol. 24, pp. 1399–1404, 2009.
- [162] M. G. Manera, R. Rella, J. Spadavecchia, J. Moreau, and M. Canva, “Real-time monitoring of carbonarius DNA structured biochip by surface plasmon resonance imaging,” *J. Opt. A Pure Appl. Opt.*, vol. 10, no. 6, p. 64018, 2008.
- [163] I. Mannelli, L. Lecerf, M. Guerrouache, M. Goossens, M. Millot, and M. Canva, “DNA

- immobilisation procedures for surface plasmon resonance imaging (SPRI) based microarray systems,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 22, no. 6, pp. 803–809, Jan. 2007.
- [164] B. Johnsson, S. Löfås, and G. Lindquist, “Immobilization of proteins to a carboxymethyl-dextran-modified gold surface for biospecific interaction analysis in surface plasmon resonance sensors,” *Anal. Biochem.*, vol. 198, no. 2, pp. 268–277, 1991.
- [165] J. Lahiri, L. Isaacs, J. Tien, and G. M. Whitesides, “A strategy for the generation of surfaces presenting ligands for studies of binding based on an active ester as a common reactive intermediate: A surface plasmon resonance study,” *Anal. Chem.*, vol. 71, no. 4, pp. 777–790, 1999.
- [166] V. Mansuy-Schlick, R. Delage-Mourroux, M. Jouvenot, and W. Boireau, “Strategy of macromolecular grafting onto a gold substrate dedicated to protein-protein interaction measurements,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 21, no. 9, pp. 1830–1837, 2006.
- [167] S. Elg and J. Deinum, “The interaction between captured human thrombin and antithrombin studied by surface plasmon resonance, and the effect of melagatran,” *Spectroscopy*, vol. 16, pp. 257–270, 2002.
- [168] Ö. Jansson, H. Larsericsdotter, A. Zhukov, D. Areskou, S. Oscarsson, and J. Buijs, “Optimizing the surface plasmon resonance / mass spectrometry interface for functional proteomics applications : How to avoid and utilize nonspecific adsorption,” vol. 6, pp. 2355–2364, 2006.
- [169] A. Trapaidze, “Integration of thrombin-binding aptamers in point-of-care devices for continuous monitoring of thrombin in plasma,” Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier), 2015.
- [170] A. Trapaidze, J.-P. Héroult, J.-M. Herbert, A. Bancaud, and A.-M. Gué, “Investigation of the selectivity of thrombin-binding aptamers for thrombin titration in murine plasma,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 78, pp. 58–66, Apr. 2016.
- [171] K. L. Prime and G. M. Whitesides, “Adsorption of proteins onto surfaces containing end-attached oligo(ethylene oxide): a model system using self-assembled monolayers,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 115, no. 23, pp. 10714–10721, 1993.
- [172] A. J. Pertsin and M. Grunze, “Low-Energy Configurations of Methoxy Triethylene Glycol Terminated Alkanethiol Self-Assembled Monolayers and Their Relevance to Protein Adsorption,” vol. 5647, no. 98, pp. 4918–4926, 1998.
- [173] S. Bellon *et al.*, “Hyphenation of Surface Plasmon Resonance Imaging to Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry by On-Chip Mass Spectrometry and Tandem Mass Spectrometry Analysis,” *Anal. Chem.*, vol. 81, no. 18, pp. 7695–7702, Sep. 2009.
- [174] E. Bouffartigues, H. Leh, M. Anger-Leroy, S. Rimsky, and M. Buckle, “Rapid coupling of Surface Plasmon Resonance (SPR and SPRI) and ProteinChip™ based mass spectrometry for the identification of proteins in nucleoprotein interactions,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 35, no. 6, 2007.
- [175] C. P. Sönksen, E. Nordhoff, Ö. Jansson, M. Malmqvist, and P. Roepstorff, “Combining

- MALDI Mass Spectrometry and Biomolecular Interaction Analysis Using a Biomolecular Interaction Analysis Instrument,” *Anal. Chem.*, vol. 70, no. 13, pp. 2731–2736, 1998.
- [176] J. J. Gilligan, P. Schuck, and A. L. Yergey, “Mass spectrometry after capture and small-volume elution of analyte from a surface plasmon resonance biosensor,” *Anal. Chem.*, vol. 74, no. 9, pp. 2041–2047, 2002.
- [177] M. P. Font *et al.*, “Repression of transcription at the human T-cell receptor V β 2.2 segment is mediated by a MAX/MAD/mSin3 complex acting as a scaffold for HDAC activity,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 325, no. 3, pp. 1021–1029, 2004.
- [178] W. Boireau, A. Rouleau, G. Lucchi, and P. Ducoroy, “Revisited BIA-MS combination: Entire ‘on-a-chip’ processing leading to the proteins identification at low femtomole to sub-femtomole levels,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 24, no. 5, pp. 1121–1127, 2009.
- [179] E. C. A. Stigter, “Surface Plasmon Resonance on-line with Liquid Chromatography – Mass Spectrometry for the Quantification and Identification of Proteins,” 2011.
- [180] E. C. A. Stigter, G. J. de Jong, and W. P. van Bennekom, “Coupling surface-plasmon resonance and mass spectrometry to quantify and to identify ligands,” *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 45, pp. 107–120, 2013.
- [181] S. Matsumoto *et al.*, “Solution structure of the variable-type domain of the receptor for advanced glycation end products: New insight into AGE-RAGE interaction,” *Biochemistry*, vol. 47, no. 47, pp. 12299–12311, 2008.
- [182] E. C. A. Stigter, G. J. de Jong, and W. P. van Bennekom, “Development of an on-line SPR-digestion-nanoLC-MS/MS system for the quantification and identification of interferon- γ in plasma,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 24, no. 7, pp. 2184–2190, 2009.
- [183] D. Nedelkov and R. W. Nelson, “Analysis of native proteins from biological fluids by biomolecular interaction analysis mass spectrometry (BIA/MS): exploring the limit of detection, identification of non-specific binding and detection of multi-protein complexes,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 16, no. 9–12, pp. 1071–1078, Dec. 2001.
- [184] D. Nedelkov, K. A. Tubbs, and R. W. Nelson, “Surface plasmon resonance-enabled mass spectrometry arrays,” *Electrophoresis*, vol. 27, no. 18, pp. 3671–3675, 2006.
- [185] Y. E. Kim, S. Y. Yi, C.-S. Lee, Y. Jung, and B. H. Chung, “Gold patterned biochips for on-chip immuno-MALDI-TOF MS: SPR imaging coupled multi-protein MS analysis,” *Analyst*, vol. 137, no. 2, p. 386, 2012.
- [186] F. Remy-Martin *et al.*, “Surface plasmon resonance imaging in arrays coupled with mass spectrometry (SUPRA-MS): Proof of concept of on-chip characterization of a potential breast cancer marker in human plasma,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 404, no. 2, pp. 423–432, 2012.
- [187] F. Remy-Martin *et al.*, “Automated Cancer Marker Characterization in Human Plasma Using SURface PLASMON Resonance in Array combined with Mass Spectrometry (SUPRA-MS),” *Procedia Chem.*, vol. 6, pp. 11–19, 2012.
- [188] S. S. Hinman, K. S. McKeating, and Q. Cheng, “Surface Plasmon Resonance: Material

- and Interface Design for Universal Accessibility,” *Anal. Chem.*, vol. 90, no. 1, pp. 19–39, 2018.
- [189] S. K. Ghosh and T. Pal, “Interparticle Coupling Effect on the Surface Plasmon Resonance of Gold Nanoparticles: From Theory to Applications,” *Chem. Rev.*, vol. 107, no. 11, pp. 4797–4862, 2007.
- [190] M. P. Kreuzer, R. Quidant, J. P. Salvador, M. P. Marco, and G. Badenes, “Colloidal-based localized surface plasmon resonance (LSPR) biosensor for the quantitative determination of stanozolol,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 391, no. 5, pp. 1813–1820, 2008.
- [191] M. Cottat *et al.*, “Localized Surface Plasmon Resonance (LSPR) Biosensor for the Protein Detection,” *Plasmonics*, vol. 8, no. 2, pp. 699–704, 2013.
- [192] J. N. Anker *et al.*, “Detection and identification of bioanalytes with high resolution LSPR spectroscopy and MALDI mass spectrometry,” *J. Phys. Chem. C*, vol. 113, no. 15, pp. 5891–5894, 2009.
- [193] C. Y. Chen, S. S. Hinman, J. Duan, and Q. Cheng, “Nanoglassified, optically-active monolayer films of gold nanoparticles for in situ orthogonal detection by localized surface plasmon resonance and surface-assisted laser desorption/ionization-MS,” *Anal. Chem.*, vol. 86, no. 24, pp. 11942–11945, 2014.
- [194] M. F Hribšek, D. V Tošić, and M. R Radosavljević, “Surface Acoustic Wave Sensors in Mechanical Engineering,” *FME Trans.*, vol. 38, no. 1, pp. 11–18, 2010.
- [195] G. Treitz, T. M. A. Gronewold, E. Quandt, and M. Zabe-Kühn, “Combination of a SAW-biosensor with MALDI mass spectrometric analysis,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 23, no. 10, pp. 1496–1502, 2008.
- [196] M. Dragusanu, B. A. Petre, S. Slamnoiu, C. Vlad, T. Tu, and M. Przybylski, “On-Line Bioaffinity-Electrospray Mass Spectrometry for Simultaneous Detection, Identification, and Quantification of Protein-Ligand Interactions,” *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 21, no. 10, pp. 1643–1648, 2010.
- [197] K. Tveen-Jensen, F. Gesellchen, R. Wilson, C. M. Spickett, J. M. Cooper, and A. R. Pitt, “Interfacing low-energy SAW nebulization with liquid chromatography-mass spectrometry for the analysis of biological samples,” *Sci. Rep.*, vol. 5, pp. 1–5, 2015.
- [198] A. Astefanei, M. van Bommel, and G. L. Corthals, “Surface Acoustic Wave Nebulisation Mass Spectrometry for the Fast and Highly Sensitive Characterisation of Synthetic Dyes in Textile Samples,” *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 28, no. 10, pp. 2108–2116, 2017.
- [199] T. Schneider *et al.*, “Rapid Food Product Analysis by Surface Acoustic Wave Nebulization Coupled Mass Spectrometry,” *Food Anal. Methods*, vol. 11, no. 9, pp. 2447–2454, 2018.
- [200] M. T. Villar, A. J. Machen, M. T. Fisher, B. L. Pentelute, P. T. O’Neil, and A. Artigues, “Analyzing Dynamic Protein Complexes Assembled On and Released From Biolayer Interferometry Biosensor Using Mass Spectrometry and Electron Microscopy,” *J. Vis. Exp.*, no. 138, pp. 1–9, 2018.
- [201] N. Nakayama *et al.*, “Developments of mass spectrometry-based technologies for effective

- drug development linked with clinical proteomes,” *Drug Metab. Pharmacokinet.*, vol. 31, no. 1, pp. 3–11, 2016.
- [202] N. Obi *et al.*, “Development of drug discovery screening system by molecular interaction kinetics–mass spectrometry,” *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 32, no. 8, pp. 665–671, 2018.
- [203] J. Jorgenson and K. Lukacs, “Capillary zone electrophoresis,” *Science (80-.)*, vol. 222, no. 4621, pp. 266–272, Oct. 1983.
- [204] V. Robledo and W. Smyth, “Review of the CE-MS platform as a Powerful Alternative to Conventional Couplings in Bio-omics and Target-Based Applications.,” *Electrophoresis*, vol. 35, Aug. 2014.
- [205] X. Zhong, Z. Chen, S. Snovida, Y. Liu, J. C. Rogers, and L. Li, “Capillary Electrophoresis-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry for Quantitative Analysis of Glycans Labeled with Multiplex Carbonyl-Reactive Tandem Mass Tags,” *Anal. Chem.*, vol. 87, no. 13, pp. 6527–6534, Jul. 2015.
- [206] C. M. Snyder, X. Zhou, J. A. Karty, B. R. Fonslow, M. V. Novotny, and S. C. Jacobson, “Capillary electrophoresis–mass spectrometry for direct structural identification of serum N-glycans,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1523, no. 3, pp. 127–139, Nov. 2017.
- [207] G. S. M. Kammeijer *et al.*, “Sialic acid linkage differentiation of glycopeptides using capillary electrophoresis – electrospray ionization – mass spectrometry,” *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–10, 2017.
- [208] T. Kazmaier, S. Roth, J. Zapp, M. Handing, and R. Kuhn, “Quantitative analysis of malto-oligosaccharides by MALDI-TOF mass spectrometry, capillary electrophoresis and anion exchange chromatography,” *Fresenius. J. Anal. Chem.*, vol. 361, no. 5, pp. 473–478, 1998.
- [209] J. Preisler, P. Hu, T. Rejtar, and B. L. Karger, “Capillary electrophoresis - Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry using a vacuum deposition interface,” *Anal. Chem.*, vol. 72, no. 20, pp. 4785–4795, 2000.
- [210] C. Huang, Y. Liu, H. Wu, D. Sun, and Y. Li, “Characterization of IgG glycosylation in rheumatoid arthritis patients by MALDI-TOF-MSn and capillary electrophoresis,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 409, no. 15, pp. 3731–3739, 2017.
- [211] A. Týčová, V. Ledvina, and K. Klepárník, “Recent advances in CE-MS coupling: Instrumentation, methodology, and applications,” *Electrophoresis*, vol. 38, no. 1, pp. 115–134, Jan. 2017.
- [212] A. P. F. Turner, “BIOCHEMISTRY: Biosensors-Sense and Sensitivity,” *Science (80-.)*, vol. 290, no. 5495, pp. 1315–1317, Nov. 2000.
- [213] N. Bhalla, P. Jolly, N. Formisano, and P. Estrela, “Introduction to biosensors,” *Essays Biochem.*, vol. 60, no. 1, pp. 1–8, Jun. 2016.
- [214] M. M. Harmsen and H. J. De Haard, “Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 77, no. 1, pp. 13–22, 2007.

- [215] H. Ewers, H. Eghlidi, C. Kaplan, J. Ries, and E. Platonova, “A simple, versatile method for GFP-based super-resolution microscopy via nanobodies,” *Nat. Methods*, vol. 9, no. 6, pp. 582–584, 2012.
- [216] T. Li *et al.*, “Camelid single-domain antibodies: A versatile tool for in vivo imaging of extracellular and intracellular brain targets,” *J. Control. Release*, vol. 243, pp. 1–10, 2016.
- [217] J. Janata, “Immuno-electrode,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 97, no. 10, pp. 2914–2916, May 1975.
- [218] P. J. Conroy, S. Hearty, P. Leonard, and R. J. O’Kennedy, “Antibody production, design and use for biosensor-based applications,” *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 20, no. 1, pp. 10–26, 2009.
- [219] S. Sharma, H. Byrne, and R. J. O’Kennedy, “Antibodies and antibody-derived analytical biosensors,” *Essays Biochem.*, vol. 60, no. 1, pp. 9–18, 2016.
- [220] D. Kim and A. E. Herr, “Protein immobilization techniques for microfluidic assays,” *Biomicrofluidics*, vol. 7, no. 4, 2013.
- [221] A. K. Trilling, J. Beekwilder, and H. Zuilhof, “Antibody orientation on biosensor surfaces: a minireview,” *Analyst*, vol. 138, no. 6, p. 1619, 2013.
- [222] M. R. Kierny, T. D. Cunningham, and B. K. Kay, “Detection of biomarkers using recombinant antibodies coupled to nanostructured platforms,” *Nano Rev.*, vol. 3, no. 1, p. 17240, Jan. 2012.
- [223] E. J. Sundberg and R. A. Mariuzza, “Molecular recognition in antibody-antigen complexes,” in *Protein Engineering, Design and Selection*, vol. 6, 2002, pp. 119–160.
- [224] C. Hamers-Casterman *et al.*, “Naturally occurring antibodies devoid of light chains,” *Nature*, vol. 363, no. 6428, pp. 446–448, 1993.
- [225] E. Beghein and J. Gettemans, “Nanobody Technology : A versatile Toolkit for Microscopic imaging , Protein – Protein interaction Analysis , and Protein Function exploration Primary Detection Reagents in,” vol. 8, no. July, pp. 1–14, 2017.
- [226] A. S. Greenberg, A. L. Hughes, J. Guo, D. Avila, E. C. McKinney, and M. F. Flajnik, “A novel ‘chimeric’ antibody class in cartilaginous fish: IgM may not be the primordial immunoglobulin,” *Eur. J. Immunol.*, vol. 26, no. 5, pp. 1123–1129, May 1996.
- [227] R. C. Roovers *et al.*, “Efficient inhibition of EGFR signalling and of tumour growth by antagonistic anti-EGFR Nanobodies,” *Cancer Immunol. Immunother.*, vol. 56, no. 3, pp. 303–317, Mar. 2007.
- [228] L. S. Mitchell and L. J. Colwell, “Comparative analysis of nanobody sequence and structure data,” *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.*, vol. 86, no. 7, pp. 697–706, 2018.
- [229] M. Vandesquille *et al.*, “Chemically-defined camelid antibody bioconjugate for the magnetic resonance imaging of Alzheimer’s disease,” *MAbs*, vol. 9, no. 6, pp. 1016–1027, 2017.
- [230] D. Saerens *et al.*, “Engineering Camel Single-Domain Antibodies and Immobilization

- Chemistry for Human Prostate-Specific Antigen Sensing,” vol. 77, no. 23, pp. 7547–7555, 2005.
- [231] A. Q. Abbady, A. Al-daoude, A. Al-mariri, M. Zarkawi, and S. Muyldermans, “Veterinary Immunology and Immunopathology Chaperonin GroEL a Brucella immunodominant antigen identified using Nanobody and MALDI-TOF-MS technologies,” *Vet. Immunol. Immunopathol.*, vol. 146, no. 3–4, pp. 254–263, 2012.
- [232] S. A. Walper, P. A. Brozozog Lee, E. R. Goldman, and G. P. Anderson, “Comparison of single domain antibody immobilization strategies evaluated by surface plasmon resonance,” *J. Immunol. Methods*, vol. 388, no. 1–2, pp. 68–77, 2013.
- [233] C. I. L. Justino, T. A. Rocha-Santos, and A. C. Duarte, “Review of analytical figures of merit of sensors and biosensors in clinical applications,” *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 29, no. 10, pp. 1172–1183, 2010.
- [234] U. Rothbauer *et al.*, “Targeting and tracing antigens in live cells with fluorescent nanobodies,” *Nat. Methods*, vol. 3, no. 11, pp. 887–889, 2006.
- [235] A. Olichon and T. Surrey, “Selection of genetically encoded fluorescent single domain antibodies engineered for efficient expression in Escherichia coli,” *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 50, pp. 36314–36320, 2007.
- [236] L. J. Fulcher, T. Macartney, P. Bozatzki, A. Hornberger, A. Rojas-Fernandez, and G. P. Sapkota, “An affinity-directed protein missile system for targeted proteolysis,” *Open Biol.*, vol. 6, no. 10, 2016.
- [237] E. Caussin, O. Kanca, and M. Affolter, “Fluorescent fusion protein knockout mediated by anti-GFP nanobody,” *Nat. Publ. Gr.*, vol. 19, no. 1, pp. 117–121, 2011.
- [238] S. Muyldermans, “Nanobodies: Natural Single-Domain Antibodies,” *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 82, no. 1, pp. 775–797, 2013.
- [239] G. P. Anderson, R. D. Bernstein, M. D. Swain, D. Zabetakis, and E. R. Goldman, “Binding Kinetics of Antiricin Single Domain Antibodies and Improved Detection Using a B Chain Specific Binder,” *Anal. Chem.*, vol. 82, no. 17, pp. 7202–7207, Sep. 2010.
- [240] G. P. Anderson, P. M. Legler, D. Zabetakis, and E. R. Goldman, “Comparison of Immunoreactivity of Staphylococcal Enterotoxin B Mutants for Use as Toxin Surrogates,” *Anal. Chem.*, vol. 84, no. 12, pp. 5198–5203, Jun. 2012.
- [241] K. Conrath *et al.*, “Camelid nanobodies raised against an integral membrane enzyme, nitric oxide reductase,” *Protein Sci.*, vol. 18, no. 3, pp. 619–628, 2009.
- [242] E. A. Della Pia and K. L. Martinez, “Single domain antibodies as a powerful tool for high quality surface plasmon resonance studies,” *PLoS One*, vol. 10, no. 3, pp. 1–17, 2015.
- [243] A. H. Smits and M. Vermeulen, “Characterizing Protein–Protein Interactions Using Mass Spectrometry: Challenges and Opportunities,” *Trends Biotechnol.*, vol. 34, no. 10, pp. 825–834, 2016.
- [244] M. C. Kohlhagen *et al.*, “Screening Method for M-Proteins in Serum Using Nanobody

- Enrichment Coupled to MALDI-TOF Mass Spectrometry,” vol. 1352, 2016.
- [245] B. Van de Broek *et al.*, “Specific Cell Targeting with Nanobody Conjugated Branched Gold Nanoparticles for Photothermal Therapy,” *ACS Nano*, vol. 5, no. 6, pp. 4319–4328, Jun. 2011.
- [246] A. Sassolas, L. J. Blum, and B. D. Leca-Bouvier, “Homogeneous assays using aptamers,” *Analyst*, vol. 136, no. 2, pp. 257–274, 2011.
- [247] S. D. Jayasena, “Aptamers: An emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics,” *Clin. Chem.*, vol. 45, pp. 1628–1650, 1999.
- [248] S. Y. Toh, M. Citartan, S. C. B. Gopinath, and T. H. Tang, “Aptamers as a replacement for antibodies in enzyme-linked immunosorbent assay,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 64, pp. 392–403, 2014.
- [249] P. Hong, W. Li, and J. Li, “Applications of Aptasensors in Clinical Diagnostics,” *Sensors*, vol. 12, no. 2, pp. 1181–1193, Jan. 2012.
- [250] D. R. Mills, R. L. Peterson, and S. Spiegelman, “An extracellular Darwinian experiment with a self-duplicating nucleic acid molecule,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 58, no. 1, pp. 217–24, Jul. 1967.
- [251] A. D. Ellington and J. W. Szostak, “In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands,” *Nature*, vol. 346, no. 6287, pp. 818–22, Aug. 1990.
- [252] D. L. Robertson and G. F. Joyce, “Selection in vitro of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA,” *Nature*, vol. 344, no. 6265, pp. 467–8, Mar. 1990.
- [253] C. Tuerk and L. Gold, “Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase,” *Science (80-.)*, vol. 249, no. 4968, pp. 505–510, Aug. 1990.
- [254] R. Stoltenburg, C. Reinemann, and B. Strehlitz, “SELEX—A (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands,” *Biomol. Eng.*, vol. 24, no. 4, pp. 381–403, Oct. 2007.
- [255] T. Fitzwater and B. Polisky, “A SELEX primer,” *Methods Enzymol.*, vol. 267, no. 1995, pp. 275–301, 1996.
- [256] I. C. Elle *et al.*, “Selection of LNA-containing DNA aptamers against recombinant human CD73,” *Mol. Biosyst.*, vol. 11, no. 5, pp. 1260–1270, 2015.
- [257] H. Sun and Y. Zu, “A Highlight of recent advances in aptamer technology and its application,” *Molecules*, vol. 20, no. 7, pp. 11959–11980, 2015.
- [258] A. Mayer, M. Lidschreiber, M. Siebert, K. Leike, J. Söding, and P. Cramer, “Uniform transitions of the general RNA polymerase II transcription complex,” *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 17, no. 10, pp. 1272–1278, 2010.
- [259] M. Berezovski, M. Musheev, A. Drabovich, and S. N. Krylov, “Non-SELEX selection of aptamers,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 128, no. 5, pp. 1410–1411, 2006.

- [260] E. Dausse, S. Taouji, L. Evadé, C. Di Primo, E. Chevet, and J. J. Toulmé, “HAPIScreen, a method for high-throughput aptamer identification,” *J. Nanobiotechnology*, vol. 9, no. 1, p. 25, 2011.
- [261] Y. Liu *et al.*, “DNase-mediated single-cycle selection of aptamers for proteins blotted on a membrane,” *Anal. Chem.*, vol. 84, no. 18, pp. 7603–7606, 2012.
- [262] M. Ilgu and M. Nilsen-Hamilton, “Aptamers in analytics,” *Analyst*, vol. 141, no. 5, pp. 1551–1568, 2016.
- [263] J. Zhou and J. Rossi, “Aptamers as targeted therapeutics: current potential and challenges,” *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 16, p. 181, Nov. 2016.
- [264] E. N. Brody *et al.*, “Aptamer-Based Multiplexed Proteomic Technology for Biomarker Discovery,” *PLoS One*, vol. 5, no. 12, p. e15004, 2011.
- [265] D. O’Connell *et al.*, “Unique motifs and hydrophobic interactions shape the binding of modified DNA ligands to protein targets,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 109, no. 49, pp. 19971–19976, 2012.
- [266] L. Gold, J. J. Walker, S. K. Wilcox, and S. Williams, “Advances in human proteomics at high scale with the SOMAscan proteomics platform,” *N. Biotechnol.*, vol. 29, no. 5, pp. 543–549, 2012.
- [267] C. Wong, M. So, and T.-W. Chan, “Origins of the proton in the generation of protonated polymers and peptides in matrix-assisted laser desorption/ionization,” *Eur. J. Mass Spectrom.*, vol. 4, no. 1, p. 223, 2007.
- [268] A. Mesnage, “Diazonium salts induced anchoring process : mechanism , application (s),” Ecole Polytechnique X, 2011.
- [269] J. P. Chambers, B. P. Arulanandam, L. L. Matta, A. Weis, and J. J. Valdes, “Biosensor recognition elements.,” *Curr. Issues Mol. Biol.*, vol. 10, no. 1–2, pp. 1–12, 2008.
- [270] S. Balamurugan, A. Obubuafo, S. A. Soper, and D. A. Spivak, “Surface immobilization methods for aptamer diagnostic applications,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 390, no. 4, pp. 1009–1021, 2008.
- [271] S. Forest, J. Breault-Turcot, P. Chaurand, and J.-F. Masson, “Surface Plasmon Resonance Imaging-MALDI-TOF Imaging Mass Spectrometry of Thin Tissue Sections,” *Anal. Chem.*, p. acs.analchem.5b03309, 2016.
- [272] C. J. McKee, H. B. Hines, and R. G. Ulrich, “Analysis of protein tyrosine phosphatase interactions with microarrayed phosphopeptide substrates using imaging mass spectrometry,” *Anal. Biochem.*, vol. 442, no. 1, pp. 62–67, Nov. 2013.
- [273] M. A. Rehder and L. B. McGown, “Open-tubular capillary electrochromatography of bovine β -lactoglobulin variants A and B using an aptamer stationary phase,” *Electrophoresis*, vol. 22, no. 17, pp. 3759–3764, Sep. 2001.
- [274] S. Eissa and M. Zourob, “In vitro selection of DNA aptamers targeting β -lactoglobulin and their integration in graphene-based biosensor for the detection of milk allergen,”

Biosens. Bioelectron., vol. 91, no. December 2016, pp. 169–174, 2017.

- [275] D. Bhattacharyya, G. Mirihana Arachchilage, and S. Basu, “Metal Cations in G-Quadruplex Folding and Stability,” *Front. Chem.*, vol. 4, no. September, pp. 1–14, 2016.
- [276] L. C. Bock, L. C. Griffin, J. A. Latham, E. H. Vermaas, and J. J. Toole, “Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin,” *Nature*, vol. 355, no. 6360, pp. 564–566, Feb. 1992.
- [277] D. M. Tasset, M. F. Kubik, and W. Steiner, “Oligonucleotide inhibitors of human thrombin that bind distinct epitopes,” *J. Mol. Biol.*, vol. 272, no. 5, pp. 688–698, 1997.
- [278] J. Müller, B. Wulffen, B. Pötzsch, and G. Mayer, “Multidomain targeting generates a high-affinity thrombin-inhibiting bivalent aptamer,” *ChemBioChem*, vol. 8, no. 18, pp. 2223–2226, 2007.
- [279] H. Hasegawa, K. I. Taira, K. Sode, and K. Ikebukuro, “Improvement of aptamer affinity by dimerization,” *Sensors*, vol. 8, no. 2, pp. 1090–1098, 2008.
- [280] J. Müller, D. Freitag, G. Mayer, and B. Pötzsch, “Anticoagulant characteristics of HD1-22, a bivalent aptamer that specifically inhibits thrombin and prothrombinase,” *J. Thromb. Haemost.*, vol. 6, no. 12, pp. 2105–2112, 2008.
- [281] C. A. Kretz, A. R. Stafford, J. C. Fredenburgh, and J. I. Weitz, “HD1, a Thrombin-directed Aptamer, Binds Exosite 1 on Prothrombin with High Affinity and Inhibits Its Activation by Prothrombinase,” *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 49, pp. 37477–37485, Dec. 2006.
- [282] K. Derszniak *et al.*, “Comparison of effects of anti-thrombin aptamers HD1 and HD22 on aggregation of human platelets, thrombin generation, fibrin formation, and thrombus formation under flow conditions,” *Front. Pharmacol.*, vol. 10, no. FEB, pp. 1–13, 2019.
- [283] S. Butenas, C. van’t Veer, and K. G. Mann, “‘Normal’ thrombin generation,” *Blood*, vol. 94, no. 7, pp. 2169–78, 1999.
- [284] D. A. Lane, H. Philippou, and J. A. Huntington, “Directing thrombin,” *Blood*, vol. 106, no. 8, pp. 2605–2612, 2005.
- [285] J. T. B. Crawley, S. Zanardelli, C. K. N. K. Chion, and D. A. Lane, “The central role of thrombin in hemostasis. [Review] [55 refs],” *J. Thromb. Haemost.*, vol. 5, pp. 95–101, 2007.
- [286] W. Bode, “Structure and interaction modes of thrombin,” *Blood Cells, Mol. Dis.*, vol. 36, no. 2, pp. 122–130, 2006.
- [287] I. Russo Krauss, A. Pica, A. Merlino, L. Mazzarella, and F. Sica, “Duplex–quadruplex motifs in a peculiar structural organization cooperatively contribute to thrombin binding of a DNA aptamer,” *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, vol. 69, no. 12, pp. 2403–2411, Dec. 2013.
- [288] I. Russo Krauss, A. Merlino, A. Randazzo, E. Novellino, L. Mazzarella, and F. Sica, “High-resolution structures of two complexes between thrombin and thrombin-binding aptamer shed light on the role of cations in the aptamer inhibitory activity,” *Nucleic Acids*

Res., vol. 40, no. 16, pp. 8119–8128, Sep. 2012.

- [289] I. Russo Krauss, A. Merlino, C. Giancola, A. Randazzo, L. Mazzarella, and F. Sica, “Thrombin–aptamer recognition: a revealed ambiguity,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 39, no. 17, pp. 7858–7867, Sep. 2011.
- [290] R. F. Macaya *et al.*, “Structural and Functional Characterization of Potent Antithrombotic Oligonucleotides Possessing Both Quadruplex and Duplex Motifs,” *Biochemistry*, vol. 34, no. 13, pp. 4478–4492, Apr. 1995.
- [291] T. Hianik, V. Ostatná, M. Sonlajtnerova, and I. Grman, “Influence of ionic strength, pH and aptamer configuration for binding affinity to thrombin,” *Bioelectrochemistry*, vol. 70, no. 1, pp. 127–133, 2007.
- [292] B. Deng *et al.*, “Aptamer binding assays for proteins: The thrombin example-A review,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 837, pp. 1–15, 2014.
- [293] E. Baldrich, A. Restrepo, and C. K. O’Sullivan, “Aptasensor development: Elucidation of critical parameters for optimal aptamer performance,” *Anal. Chem.*, vol. 76, no. 23, pp. 7053–7063, 2005.
- [294] P. J. Anderson, A. Nasset, K. R. Dharmawardana, and P. E. Bock, “Characterization of proexosite I on prothrombin,” *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 22, pp. 16428–16434, 2000.
- [295] M. Tsiang, C. S. Gibbs, L. C. Griffin, K. E. Dunn, and L. L. K. Leung, “Selection of a suppressor mutation that restores affinity of an oligonucleotide inhibitor for thrombin using in vitro genetics,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 270, no. 33, pp. 19370–19376, 1995.
- [296] F. Hillenkamp, M. Karas, R. C. Beavis, and B. T. Chait, “Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Biopolymers,” *Anal. Chem.*, vol. 63, no. 24, pp. 1193 A-1202 A, 1991.
- [297] K. O. Börnsen, “Influence of Salts, Buffers, Detergents, Solvents, and Matrices on MALDI-MS Protein Analysis in Complex Mixtures BT - Mass Spectrometry of Proteins and Peptides: Mass Spectrometry of Proteins and Peptides,” J. R. Chapman, Ed. Totowa, NJ: Humana Press, 2000, pp. 387–404.
- [298] A. B. Steel, R. L. Levicky, T. M. Herne, and M. J. Tarlov, “Immobilization of nucleic acids at solid surfaces: Effect of oligonucleotide length on layer assembly,” *Biophys. J.*, vol. 79, no. 2, pp. 975–981, 2000.
- [299] V. M. Marathias and P. H. Bolton, “Determinants of DNA quadruplex structural type: sequence and potassium binding,” *Biochemistry*, vol. 38, no. 14, pp. 4355–64, Apr. 1999.
- [300] D. Neri, M. Momo, T. Prospero, and G. Winter, “High-affinity Antigen Binding by Chelating Recombinant Antibodies (CRABs),” *J. Mol. Biol.*, vol. 246, no. 3, pp. 367–373, 1995.
- [301] F. Viti, L. Tarli, L. Giovannoni, L. Zardi, and D. Neri, “Increased binding affinity and valence of recombinant antibody fragments lead to improved targeting of tumoral angiogenesis,” *Cancer Res.*, vol. 59, no. 2, pp. 347–352, 1999.

- [302] G. Mayer, F. Rohrbach, B. Pötzsch, and J. Müller, "Aptamer-based modulation of blood coagulation," *Hamostaseologie*, vol. 31, no. 4, pp. 258–263, 2011.
- [303] S. L. Cohen and B. T. Chait, "Influence of Matrix Solution Conditions on the MALDI-MS Analysis of Peptides and Proteins," *Anal. Chem.*, vol. 68, no. 1, pp. 31–37, Jan. 1996.
- [304] K. O. Börnsen, "Influence of Salts, Buffers, Detergents, Solvents, and Matrices on MALDI-MS Protein Analysis in Complex Mixtures," in *Mass Spectrometry of Proteins and Peptides*, no. February 2000, J. R. Chapman, Ed. New Jersey: Humana Press, 2003, pp. 387–404.
- [305] C. Daniel, F. Mélaïne, Y. Roupioz, T. Livache, and A. Buhot, "Real time monitoring of thrombin interactions with its aptamers: Insights into the sandwich complex formation," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 40, no. 1, pp. 186–192, 2013.
- [306] C. Daniel, Y. Roupioz, T. Livache, and A. Buhot, "On the use of aptamer microarrays as a platform for the exploration of human prothrombin/thrombin conversion," *Anal. Biochem.*, vol. 473, pp. 66–71, 2015.
- [307] J. N. Adkins *et al.*, "Toward a Human Blood Serum Proteome," *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 1, no. 12, pp. 947–955, 2002.
- [308] J. Musso, "Développement du couplage entre la Résonance Plasmonique de Surface à imagerie et la Spectrométrie de Masse (SPRi-MS)," Université d'Evry Val d'Essonne, 2013.
- [309] A. E. Kennedy, R. Vohra, J. A. Scott, and G. M. Ross, "Effects of serum albumin on SPR-measured affinity of small molecule inhibitors binding to nerve growth factor," *Sens. Bio-Sensing Res.*, vol. 15, no. June, pp. 1–4, 2017.
- [310] K. O. Börnsen, "Influence of Salts, Buffers, Detergents, Solvents, and Matrices on MALDI-MS Protein Analysis in Complex Mixtures," in *Mass Spectrometry of Proteins and Peptides*, no. February 2000, J. R. Chapman, Ed. New Jersey: Humana Press, 2003, pp. 387–404.
- [311] V. Shpacovitch, "Application of Surface Plasmon Resonance (SPR) for the Detection of Single Viruses and Single Biological Nano-objects," *J. Bacteriol. Parasitol.*, vol. 03, no. 07, 2012.

Titre : Nouvelles biopuces pour le couplage de la Résonance Plasmonique de Surface par imagerie et de la spectrométrie de masse (SPRi-MS)

Mots clés : aptamère, résonance plasmonique de surface, spectrométrie de masse

Résumé : Le couplage de la Résonance Plasmonique de Surface par imagerie et de la spectrométrie de masse (SPRi-MS) offre une analyse multidimensionnelle très prometteuse. Son essor est cependant freiné par le manque de sensibilité lors de la détection MS. Cette sensibilité est conditionnée par, entre autres facteurs, la fonctionnalisation chimique de la surface de la biopuce, par la nature des récepteurs et par les caractéristiques de leur immobilisation sur la surface. L'objectif de cette thèse a été d'exploiter des récepteurs alternatifs aux anticorps, dont la taille importante et l'orientation aléatoire représentent des facteurs limitants, et d'évaluer l'impact sur la sensibilité de détection par SPR-MS. Deux types de récepteurs ont été étudiés, (i) des sondes synthétiques

oligo-nucléotidiques à ADN (aptamères) présentant une affinité très élevée pour leurs cibles, (ii) des nanobodies (ou nanocorps) correspondant au seul domaine variable d'anticorps, donc de taille réduite et monovalentes. Ces récepteurs alternatifs ont été immobilisés sur des biopuces fonctionnalisées par du poly(éthylène glycol) et leur propriétés d'interaction évaluées dans le cadre du couplage SPRi-MS. L'utilisation de l'imagerie MALDI-MS a permis une recherche et une détection semi-automatique des biomolécules capturées directement à partir de la surface de la biopuce. Des résultats prometteurs ont été obtenus avec des biopuces au format microarray à partir d'aptamères anti thrombine.

Title : New biochips for Surface Plasmon Resonance imaging coupled to Mass Spectrometry (SPRi-MS)

Keywords : aptamer, surface plasmon resonance, mass spectrometry

Abstract : The coupling of Surface Plasmon Resonance Imaging and Mass Spectrometry (SPRi-MS) offers a very promising multidimensional analysis. However, its development is hampered by the lack of sensitivity in MS detection. This sensitivity is conditioned by, among other factors, the chemical functionalization of the biochip surface, the nature of the receptors and the characteristics of their immobilization on the surface. The objective of this thesis was to exploit alternative receptors to antibodies whose large size and random orientation represent limiting factors, and to evaluate their impact on the sensitivity of detection by SPR-MS. Two types of receptors were studied, (i) synthetic

oligonucleotide DNA probes (aptamers) with a very high affinity for their targets, (ii) nano antibodies (or nanobodies) corresponding to the single variable domain of antibodies, and therefore small in size and monovalent. These alternative receptors were immobilized on biochips functionalized by poly(ethylene glycol) and their interaction properties evaluated within the framework of SPRi-MS coupling. The use of MALDI-MS imaging allowed a semi-automated search and detection of biomolecules captured directly from the surface of the biochip. Promising results have been obtained with biochips in microarray-format using anti thrombin aptamers.