



HAL
open science

Fonctionnalisation de surface et développement de biocapteurs SPR microfluidiques pour la détection du *Zymoseptoria tritici* et de *Candida albicans*

Mohamed Taieb Bakouche

► **To cite this version:**

Mohamed Taieb Bakouche. Fonctionnalisation de surface et développement de biocapteurs SPR microfluidiques pour la détection du *Zymoseptoria tritici* et de *Candida albicans*. Micro et nanotechnologies/Microélectronique. Université de Lille, 2022. Français. NNT : 2022ULILN012 . tel-04684765

HAL Id: tel-04684765

<https://theses.hal.science/tel-04684765>

Submitted on 3 Sep 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.



THESE DE DOCTORAT

Présentée à

l'Université de Lille

Ecole Doctorale Science de l'Ingénierie et des Systèmes

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR en

Micro et NanoTechnologies, Acoustique et Télécommunications

par

Mohamed Taieb BAKOUCHE

***Fonctionnalisation de surface et développement de biocapteurs
SPR microfluidiques pour la détection du Zymoseptoria tritici et de
Candida albicans.***

Soutenue le 10 Juin 2022

| | | |
|--------------------|--------------|---|
| Boualem SENDID | Président | Professeur, Université de Lille, Centre Hospitalier Universitaire de Lille, Institut de Microbiologie Centre de Biologie Pathologie Génétique (Lille) |
| Eric FINOT | Rapporteur | Professeur, Université de Bourgogne, Laboratoire Interdisciplinaire Carnot de Bourgogne (Dijon) |
| Yoann ROUPIOZ | Rapporteur | Directeur de Recherche CNRS, Systèmes Moléculaires et nanoMatériaux pour l'Énergie et la Santé (Grenoble) |
| Sylvain DESPREZ | Examineur | Ingénieur, Materia Nova (Mons, BE) |
| Deborah LANTERBECQ | Examinatrice | Enseignant-chercheur, Haute Ecole Provinciale de Hainaut Condorcet Laboratoire de recherche et de service en Biotechnologie et Biologie Appliquée (Ath, BE) |
| - | | |
| Sophie MARICOT | Encadrante | Maitre de Conférences, Université de Lille, Institut d'Electronique, de Microélectronique et de Nanotechnologie (Villeneuve d'Ascq) |
| Mohamed BOUAZAOU | Co-directeur | Professeur, Université de Lille, Laboratoire de Physique des Lasers, Atomes et Molécules (Villeneuve d'Ascq) |
| Jean-Pierre VILCOT | Co-directeur | Directeur de Recherche CNRS, Institut d'Electronique, de Microélectronique et de Nanotechnologie (Villeneuve d'Ascq) |

Remerciements

J'ai mené mes travaux de thèse essentiellement à l'Institut d'Électronique, de Microélectronique et de Nanotechnologie (IEMN-UMR CNRS 8520), laboratoire que j'ai visé il y a exactement dix ans. Six ans après, j'y ai mis les pieds malgré une longue attente.

Je tiens à remercier du fond du cœur mes co-directeurs de thèse, *DR. Jean-Pierre Vilcot* et *Pr. Mohamed Bouazaoui*, qui m'ont tant attendus pour m'avoir donné la chance de travailler dans un des laboratoires d'excellence et de m'avoir permis de travailler dans un cadre professionnel hautement qualifié.

Je tiens également à remercier énormément mon encadrante, *Dr. Sophie Maricot*, pour l'aide qu'elle m'a apportée avant mon arrivée et pour son soutien dans les moments les plus difficiles.

Je réitère ma gratitude envers mes trois encadrants, même si insuffisante puisse être, pour leur temps consacré à nos discussions, leur aide pour l'utilisation des bancs expérimentaux, leurs conseils, ainsi que pour la relecture et la correction de ce manuscrit et nous savons ô combien ! ça a été dur de se comprendre par moments, puisque nous venons de deux, voire trois disciplines différentes.

Je voudrais exprimer mes remerciements aussi envers les membres du Jury, *Dr. Eric Finot*, *DR. Yoann Roupioz*, *Dr. Sylvain Desprez*, *Dr. Deborah Lanterbecq* et *Pr. Boualem Sendid* pour avoir accepté de relire ce travail.

Les travaux de cette thèse ont nécessité de fortes interactions pluridisciplinaires avec les partenaires du projet BIOSENS, je cite ici :

Les physiciens *Dr. S.Ganesan* et *Dr. Laurent Hay*, que je remercie pour m'avoir initié à l'utilisation des bancs expérimentaux ;

Les biologistes agronomes de l'institut *C.A.R.A.H*, *Dr. Camille Dekuijper* et *Dr. Deborah Lanterbecq*, que je remercie de nous avoir fourni les monobrins d'oligonucléotides et d'avoir échangé avec moi à propos des protocoles de greffage dès mon premier jour au laboratoire ;

Les biologistes médecins du *C.H.U Lille*, *Dr. Karine Lecointe* que je remercie pour le temps accordé aux expériences réalisées à l'IEMN et au C.H.U et les explications auxquelles j'ai eu droit, au *Pr. Boualem Sendid* pour nous avoir fourni les éléments biologiques pour la détection des candida albicans ;

Dr. Sylvain Desprez, électronicien et *Dr. Aline Roobroeck*, chimiste de *MateriaNova* que je remercie également pour leur disponibilités et la programmation d'expériences menées conjointement.

Les électroniciens de *Multitel*, *Dr. Fabien Dortu* et *Dr. Damien Bernier*, que je remercie pour le développement, le prêt du dispositif de détection *Valisette* et ma formation à son utilisation, mais aussi pour les expériences menées dans leurs locaux avec les partenaires de *Materianova*.

Les électroniciens du *Centre Spatial de Liège (CSL)*, *Dr. Cedric Laenarts* et *Juri Hastanin*, que je remercie pour les échanges constructifs quant à la conception du système microfluidique.

Je tiens aussi à remercier le personnel technique de la Centrale de Micro et NanoFabrication (CMNF) de l'IEMN, en particulier *Annie Fattorini* et *Dr. Mark Dewitte*, *Dr. François Vaurette*, *Dr. Pascal Tilmant* ainsi que *David Guérin* pour leur aide à différentes étapes de processus de fabrication de bio/capteurs plasmoniques.

Mes remerciements vont aussi particulièrement *DR. Djamilia Hourlier* pour son aide sur le plan professionnel et son énorme soutien personnel, il est rare de rencontrer des personnes de confiance et qui se soucient d'autrui.

Je tiens aussi à remercier les anciens et actuels membres de l'équipe OPTO permanents, *Dr. Cathy Sion* et *Dr. Vincent Magnin* et les non-permanents avec qui j'ai noué des liens d'amitié, *Boubakeur, Mohammad, Mostafa, Pierre-Vincent, Thanh, Phuong, Achwek et Khaoula*.

Mes pensées vont aussi aux membres d'autres groupes, comme *DR. Kamal Lmimouni, Abdelghafour, Warda, Baker et Ibrahim*.

Je remercie aussi *Nora* et *Andy* du pôle RH ainsi que *Jean-François Demeyer* que j'ai embêté maintes fois pour l'activation de mon badge, mais particulièrement pour les discussions qu'on a partagées.

Mes pensées vont aussi au *Pr. Abdelkader* que je tiens à remercier particulièrement et peut-être sans qui je n'aurais pu être là.

Merci aux membres de mon actuelle équipe (MATHYB) à l'UCCS ; *Pr. Christophe Volkringer* de m'avoir laissé la liberté de finir ma thèse durant mon année d'ATER. Merci aussi à *Amandine, Despoina, Iro, Julie, Julien, Nelly, Nicolas, Orféas, Pauline et Teddy* pour les merveilleux moments de rires qui me sont tant essentiels.

Bien évidemment, mes remerciements les plus chaleureux vont aux membres de ma famille qui me soutiennent inlassablement de loin dans l'espace et dans le temps.

Je remercie spécialement mon ami de longue date *Abderrahmane*, qui avec le temps devint un frère pour son soutien depuis le début de mes démarches, nous y voilà mon cher ! presque à la fin, ensemble. Qui l'eût cru ? On vient de loin, mais toujours sur le bon chemin.

Pour finir sur une belle note, je te remercie toi *Rym*, ma chérie avec qui j'ai réellement partagé ce long parcours. Fous de voyages, je dirais que nous avons pris un billet pour la même destination mais avec deux moyens de locomotion différents, selon nos tempéraments, tu as préféré l'avion et ses turbulences, pendant que j'ai pris le bateau, plus long mais traversant un fleuve paisible. Malgré les péripéties de chacun, on a su se soutenir, on a su tenir et rien que pour ça, MERCI.

Table des matières

| | |
|--|----|
| Introduction générale..... | 1 |
| References..... | 4 |
| Chap. I. Contexte de l'étude | 5 |
| I.1 La septoriose du blé..... | 7 |
| I.1.1 La culture du blé: production, coûts et pertes | 7 |
| I.1.2 Le champignon <i>Zymoseptoria tritici</i> | 8 |
| I.1.3 Traitements et moyens de contrôle | 11 |
| I.1.3.1 Les fongicides chimiques..... | 11 |
| I.1.3.2 Les biofongicides | 11 |
| I.1.3.3 Assistance biotechnologique..... | 11 |
| I.2 La candidose chez l'humain | 12 |
| I.2.1 Le champignon <i>Candida albicans</i> | 12 |
| I.2.2 Formation de biofilms..... | 12 |
| I.2.3 Traitements | 13 |
| I.3 Méthodes de détection | 14 |
| I.3.1 Techniques usuelles..... | 14 |
| I.3.1.1 Culture cellulaire | 14 |
| I.3.1.2 PCR | 14 |
| I.3.1.3 ELISA..... | 14 |
| I.3.2 Techniques non-conventionnelles..... | 15 |
| I.3.2.1 Imagerie | 15 |
| I.3.2.2 Résonance plasmonique de surface..... | 15 |
| I.3.3 Statut sur la détection des pathogènes ciblés | 16 |
| I.3.3.1 <i>Zymoseptoria tritici</i> | 16 |
| I.3.3.2 <i>Candida albicans</i> | 16 |
| I.4 Biologie moléculaire..... | 16 |
| I.4.1 Acides nucléiques (ADN)..... | 17 |
| I.4.2 Interactions anticorps-antigènes..... | 18 |
| I.5 Biocapteurs..... | 19 |
| I.5.1 Le biorécepteur | 19 |

| | | |
|--------------|---|----|
| I.5.2 | Le transducteur..... | 19 |
| I.5.3 | Développement des biocapteurs..... | 20 |
| I.5.4 | Types de biocapteurs..... | 21 |
| I.5.5 | Applications | 22 |
| I.6 | Conclusion | 22 |
| | Références..... | 23 |
| Chap. II. | Capteur et biocapteur SPR..... | 31 |
| II.1 | La résonance plasmonique de surface | 33 |
| II.1.1 | Historique | 33 |
| II.1.2 | Principe physique | 33 |
| II.1.3 | Le système de mesure par SPR..... | 34 |
| II.1.3.1 | Capteur SPR..... | 34 |
| II.1.3.2 | Le système de lecture du capteur | 35 |
| II.1.3.2.1 | Couplage par prisme | 35 |
| II.1.3.2.2 | Mode d'interrogation..... | 36 |
| II.1.3.2.2.1 | Interrogation angulaire | 36 |
| II.1.3.2.2.2 | Interrogation spectrale | 36 |
| II.1.3.3 | Sensorgramme | 37 |
| II.1.3.3.1 | Cinétique d'interaction | 37 |
| II.1.3.3.1.1 | Phase d'association..... | 38 |
| II.1.3.3.1.2 | Phase de dissociation..... | 39 |
| II.2 | Fonctionnalisation de surface..... | 40 |
| II.2.1 | Qu'est-ce qu'une SAM ? | 41 |
| II.2.2 | Stratégies d'immobilisation directes..... | 42 |
| II.2.2.1 | Adsorption physique et ionique | 42 |
| II.2.2.2 | Chimisorption | 43 |
| II.2.3 | Stratégies d'immobilisation indirectes..... | 43 |
| II.2.3.1 | Immobilisation non-covalente..... | 43 |
| II.2.3.2 | Immobilisation covalente | 44 |
| II.2.3.2.1 | Couplage amine (EDC/NHS) | 44 |
| II.2.3.2.2 | Couplage maléimide-thiol..... | 45 |
| II.2.3.2.3 | Chimie-click..... | 46 |

| | | |
|-------------|---|----|
| II.2.4 | Stratégie d'immobilisation basée sur la bioaffinité | 46 |
| II.3 | Conclusion | 47 |
| | Références | 48 |
| Chap. III. | Instrumentation..... | 53 |
| III.1 | Matériels et méthodes | 55 |
| III.1.1 | Matériels..... | 55 |
| III.1.1.1 | Interrogation angulaire | 55 |
| III.1.1.2 | Interrogation spectrale..... | 56 |
| III.1.2 | Méthodes de suivi du déplacement de la réponse SPR | 57 |
| III.1.2.1 | Déplacement du minimum..... | 57 |
| III.1.2.2 | Calcul du centroïde..... | 58 |
| III.1.2.3 | Variation d'intensité | 59 |
| III.1.2.4 | Ajustement de courbe | 59 |
| III.1.3 | Performances de l'analyse SPR | 59 |
| III.1.3.1 | Sensibilité | 60 |
| III.1.3.2 | Résolution | 61 |
| III.1.3.3 | Limite de détection (LOD) | 61 |
| III.1.3.4 | Dynamique de mesure | 61 |
| III.1.4 | Capteurs utilisés | 62 |
| III.1.4.1 | Interrogation angulaire | 62 |
| III.1.4.2 | Interrogation spectrale..... | 63 |
| III.1.5 | Etalonnage..... | 64 |
| III.1.5.1 | Calcul de l'indice de réfraction de l'éthylène glycol | 64 |
| III.1.5.2 | Interrogation angulaire | 66 |
| III.1.5.2.1 | Sensibilité | 66 |
| III.1.5.2.2 | Résolution | 67 |
| III.1.5.2.3 | Limite de détection (LOD) | 67 |
| III.1.5.2.4 | Dynamique de mesure | 68 |
| III.1.5.3 | Interrogation spectrale (valisette)..... | 68 |
| III.1.5.3.1 | Sensibilité | 68 |
| III.1.5.3.2 | Résolution | 70 |
| III.1.5.3.3 | Limite de détection (LOD) | 70 |

| | | |
|-------------|--|----|
| III.1.5.3.4 | Dynamique de mesure | 70 |
| III.2 | Conclusion | 70 |
| | Références | 72 |
| Chap. IV. | Développement de capteurs SPR à microfluidique intégrée | 73 |
| IV.1 | Matériels et méthodes | 75 |
| IV.1.1 | Banc d'interrogation | 75 |
| IV.1.2 | Substrats de verre..... | 75 |
| IV.1.3 | Le PDMS..... | 75 |
| IV.1.4 | Produits chimiques | 75 |
| IV.2 | Fabrication des capteurs SPR..... | 76 |
| IV.2.1 | Capteurs (surfaces plasmoniques)..... | 76 |
| IV.2.2 | Capot PDMS (microfluidique) | 76 |
| IV.2.3 | Capteurs avec microfluidique clampée et intégrée..... | 77 |
| IV.3 | Fabrication de capteurs SPR avec microfluidique intégrée | 77 |
| IV.3.1 | Fabrication par traitement plasma-corona..... | 77 |
| IV.3.2 | Fabrication par traitement chimique..... | 78 |
| IV.3.2.1 | Collage 11MUA-APTMS | 78 |
| IV.4 | Fabrication du capteur avec microfluidique intégrée par collage MPTMS..... | 79 |
| IV.4.1 | Préparation du capot microfluidique en PDMS | 79 |
| IV.4.2 | Traitement du capot PDMS pour le collage | 79 |
| IV.4.3 | Collage PDMS-Au | 80 |
| IV.5 | Caractérisation de surfaces | 81 |
| IV.5.1 | Mesure de l'angle de contact | 82 |
| IV.5.2 | Spectroscopie ATR-FTIR..... | 83 |
| IV.6 | Tests mécaniques | 86 |
| IV.7 | Test du capteur SPR avec fluidique intégré | 87 |
| IV.7.1 | Test visuel | 87 |
| IV.7.2 | Test SPR | 88 |
| IV.8 | Conclusion | 89 |
| | Références | 91 |
| Chap. V. | Biodétection de <i>Zymoseptoria tritici</i> | 93 |
| V.1 | Matériels..... | 95 |

| | | |
|-----------|--|-----|
| V.1.1 | Système de lecture | 95 |
| V.1.2 | Capteurs | 95 |
| V.1.3 | Produits chimiques | 96 |
| V.1.4 | Molécules biologiques (ADN) | 96 |
| V.1.4.1 | Oligonucléotides Adénine et Thymine | 96 |
| V.1.4.2 | Oligonucléotides relatifs au <i>Zymoseptoria tritici</i> | 97 |
| V.1.5 | Molécules biologiques (protéines) | 98 |
| V.2 | Méthodes expérimentales: détection à base d'oligonucléotides | 99 |
| V.2.1 | Préparation des capteurs..... | 99 |
| V.2.1.1 | Fonctionnalisation de surface | 99 |
| V.2.1.2 | Caractérisation des surfaces fonctionnalisées | 100 |
| V.2.1.2.1 | Mesure d'angle de contact | 101 |
| V.2.1.2.2 | Spectroscopie vibrationnelle Raman | 101 |
| V.2.1.2.3 | Spectroscopie photoélectronique aux rayons X (XPS) | 102 |
| V.2.1.2.4 | Microscopie à Force Atomique | 104 |
| V.2.1.2.5 | Voltampérométrie cyclique | 105 |
| V.2.2 | Tests d'appariement préliminaires : séquences Adénine et Thymine | 106 |
| V.2.2.1 | Interaction en mode statique et dynamique (fonctionnalisation uniforme)..... | 106 |
| V.2.2.2 | Spécificité de l'interaction et densité des sondes (fonctionnalisation localisée)..... | 108 |
| V.2.2.2.1 | Spécificité de l'interaction et influence de la densité des sondes (1) ... | 108 |
| V.2.2.2.2 | Influence de la densité des sondes (2)..... | 111 |
| V.2.2.3 | Conclusion sur les tests d'appariement T100-A100 sur la valisette | 112 |
| V.2.3 | Détection de <i>Zymoseptoria tritici</i> | 113 |
| V.2.3.1 | Sensibilité de détection | 114 |
| V.2.3.1.1 | Injection cyclique d'analyte de concentration identique..... | 114 |
| V.2.3.1.2 | Injection cyclique d'analyte de concentration différente | 115 |
| V.2.3.2 | Évaluation de la Limite de détection (LOD) | 117 |
| V.2.3.3 | Étude de la cinétique d'interaction | 118 |
| V.3 | Méthodes expérimentales: détection à base d'anticorps polyclonaux | 120 |
| V.3.1 | Fonctionnalisation de surface..... | 120 |

| | | |
|------------|---|-----|
| V.3.2 | Caractérisation des surfaces fonctionnalisées..... | 122 |
| V.3.3 | Détection des protéines <i>Zymo</i> | 123 |
| V.3.3.1 | Relation cinétique d'interaction-concentration d'analyte | 125 |
| V.3.4 | Voltampérométrie cyclique | 125 |
| V.4 | Conclusion | 126 |
| | Références..... | 128 |
| Chap. VI. | Biodétection de <i>Candida albicans</i> | 133 |
| VI.1 | Matériels et méthodes | 135 |
| VI.1.1 | Système de lecture | 135 |
| VI.1.2 | Capteurs | 135 |
| VI.1.2.1 | Mesures réalisées en interrogation angulaire..... | 135 |
| VI.1.2.2 | Mesures réalisées en interrogation spectrale (valisette) | 135 |
| VI.1.3 | Réactifs chimiques..... | 136 |
| VI.1.4 | Anticorps monoclonaux Anti-mannanes (IgM 5B2)..... | 136 |
| VI.1.5 | <i>Carbohydrates/Glucides</i> (Antigènes) | 136 |
| VI.2 | Greffage de la surface..... | 137 |
| VI.3 | Fonctionnalisation de surface..... | 138 |
| VI.3.1 | Protocole | 138 |
| VI.3.2 | Optimisation de la durée du greffage..... | 139 |
| VI.3.2.1 | Greffage des surfaces..... | 139 |
| VI.3.2.2 | Caractérisation du caractère hydrophobe/hydrophile des surfaces greffées..... | 139 |
| VI.3.2.3 | Fonctionnalisation en Anti-mannanes (IgM 5B2)..... | 141 |
| VI.3.2.4 | Interaction Anti-mannanes (IgM 5B2)/mannanes..... | 143 |
| VI.3.3 | Caractérisation des surfaces fonctionnalisées..... | 145 |
| VI.3.3.1 | ATR-FTIR | 145 |
| VI.3.3.2 | Spectroscopie XPS | 145 |
| VI.3.3.3 | Microscopie AFM | 148 |
| VI.4 | Tests d'interaction Anti-mannanes (IgM 5B2)/mannanes en SPR | 150 |
| VI.4.1 | Banc en interrogation angulaire | 150 |
| VI.4.1.1 | Protocole de test | 151 |
| VI.4.1.1.1 | Fonctionnalisation de surface..... | 151 |

| | | |
|------------|---|-----|
| VI.4.1.1.2 | Interaction Anti-mannanes (IgM 5B2)/mannanes | 152 |
| VI.4.2 | Banc en interrogation spectrale (valisette)..... | 155 |
| VI.4.2.1 | Protocole de test | 155 |
| VI.4.2.1.1 | Fonctionnalisation de surface | 155 |
| VI.4.2.1.2 | Interaction Anti-mannanes (IgM 5B2)/mannanes | 155 |
| VI.5 | Caractérisations complémentaires | 157 |
| VI.5.1 | SPR: Anti-mannanes (IgM 5B2)/mannanes versus mannanes/Anti-mannanes (IgM 5B2) 157 | |
| VI.5.1.1 | Interaction Anti-mannanes (IgM 5B2)/mannanes..... | 157 |
| VI.5.1.2 | Interaction mannanes/Anti-mannanes (IgM 5B2)..... | 160 |
| VI.5.2 | Voltampérométrie cyclique | 162 |
| VI.6 | Conclusion | 163 |
| | Références | 164 |
| | Conclusion générale | 169 |
| | Perspectives..... | 173 |
| | Références | 174 |
| | Annexe..... | 175 |
| | Validation par test Elisa de l'interaction Anti-mannanes (IgM 5B2)/mannane | 175 |
| | Publications et communications..... | 177 |
| | Résumé..... | 180 |
| | Abstract..... | 180 |

Liste des abréviations

| | |
|--|---|
| μTAS. micrototal analysis system | SAM. Self-Assembled-Monolayer |
| Å. Angström | SDHI. Succinate deshydrogenase inhibitors |
| Ac. Anticorps | SDN. Stimulateurs de défense naturels |
| ADN. Acide désoxyribonucléique | SPR. Surface plasmon resonance, Surface Plasmon Resonance |
| Ag. Argent, Antigène, Antigène | ssDNA. single strand DNA |
| Al. Aluminium | Ti. Titane |
| ATR. Attenuated total reflectance | TIR. Total internal reflectance |
| Au. Or | UFC. Unité formant colonie |
| Au-S. Liaison Or-Soufre | UV. Ultraviolet |
| bp. pair de base | v/v. Volume pour volume |
| C. albicans. <i>Candida albicans</i> | VH. Variable lourde |
| CA. <i>Candida albicans</i> | VL. Variable légère |
| CH. Constante lourde | z. tritici. <i>Zymoseptoria tritici</i> |
| CL. Constante légère | %(p/p) Concentration massique en pourcentage |
| dsDNA. double strand DNA | |
| DTT. Dithiotréitol | |
| ECM. Extracellular matrix | |
| EDC. (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride) | |
| ELISA. Enzyme-linked immunosorbent assay | |
| fg/μL. femtogramme par microlitre | |
| h. Heure | |
| ha. hectare | |
| HE. Huiles essentielles | |
| Ig. Immunoglobuline | |
| IgA. Immunoglobuline A | |
| IgD. Immunoglobuline D | |
| IgE. Immunoglobuline E | |
| IgG. Immunoglobuline G | |
| Anti-mannanes (IgM 5B2). Immunoglobuline M | |
| J. Jour | |
| Kcal/mol. kilocalorie par mole | |
| kDa. kilodalton | |
| M. Molaire (mole/litre) | |
| mAc. Anticorps monoclonal | |
| Mha. Million d'hectares | |
| mL. millilitre | |
| Mt. Million de tonnes | |
| MUA. Acide Mercaptoundecanoïque | |
| NHS. N-Hydroxysuccinimide | |
| nm. nanomètre | |
| OAD. Outils d'aide à la décision | |
| pAc. Anticorps polyclonal | |
| PCR. Polymerase chain reaction | |
| pg/μL. picogramme par microlitre | |
| pI. Point isoélectrique | |
| Qoi. Quinone outside inhibitors | |
| qPCR. Quantitative polymerase chain reaction | |
| RIU. Refractive index unit | |
| RSH. Organothiol | |
| rt-PCR. Real-time polymerase chain reaction | |

Liste des Figures

Chapitre I

| | |
|---|----|
| Figure I. 1 : Production mondiale annuelle de blé tendre (données collectées du site de la FAO). | 7 |
| Figure I. 2 :Histogramme montrant les dix premiers producteurs de blé dans le monde durant l'année 2019-2020 (Données collectées du site de la FAO et IGC)..... | 8 |
| Figure I. 3 : Feuille de blé infectée par le <i>Zymoseptoria tritici</i> | 9 |
| Figure I. 4 : Mécanisme infectieux du champignon <i>Zymoseptoria tritici</i> , adapté d'après [15]. | 10 |
| Figure I. 5 : Cycle de formation d'un biofilm de <i>Candida albicans</i> [27]. | 13 |
| Figure I. 6 : Principe de fonctionnement du test ELISA..... | 15 |
| Figure I. 7 : a. structure en hélice d'un monobrin d'ADN b. structure en double hélice d'un ADN et c. bases nucléosides formant l'ADN. | 17 |
| Figure I. 8 : Structures d'anticorps IgG, Anti-mannanes (IgM 5B2) et IgA, adaptées d'après [67]. | 18 |
| Figure I. 9 : Schéma descriptif d'un biocapteur. | 20 |

Chapitre II

| | |
|---|----|
| Figure II. 1: Historique de la SPR..... | 33 |
| Figure II. 2 : a. Configuration de Kretschmann et b. Configuration d'Otto. | 35 |
| Figure II. 3 : a. Principe de biodétection par résonance plasmonique de surface selon la configuration de Kretschmann, b. Réponse plasmonique lorsque l'indice du milieu diélectrique varie ($nd_1 \rightarrow nd_2$),c. Sensorgramme correspondant. | 37 |
| Figure II. 4 : Variation de la réponse plasmonique en fonction de la concentration de l'analyte C et sa relation avec la constante de dissociation à l'équilibre K_D | 39 |
| Figure II. 5: Exemple de détermination de la constante de dissociation par régression linéaire en utilisant l'Eq. II.10 (figure adaptée d'après [32]). | 39 |
| Figure II. 6: Monocouche auto-assemblée de 11-MUA sur or et B. Monocouche auto-assemblée mixte de 11MUA et de molécules "espaceur" Mercaptopentanol sur Or | 42 |
| Figure II. 7: Immobilisation d'anticorps sur une puce plasmonique par voie ionique. | 42 |
| Figure II. 8: Schéma d'immobilisation d'une sonde ADN thiolée sur une surface d'Au par voie covalente Au-S. | 43 |
| Figure II. 9: Schéma d'immobilisation d'un IgG par voie ionique indirecte..... | 44 |
| Figure II. 10: Schéma d'immobilisation d'un IgG via EDC/NHS. | 45 |
| Figure II. 11:Schéma d'immobilisation d'une protéine via l'approche maléimide. | 45 |
| Figure II. 12: Schéma d'immobilisation d'un IgG par cycloaddition catalysée au cuivre..... | 46 |
| Figure II. 13: Schéma d'immobilisation d'un anticorps via l'approche Avidine-Biotine. | 47 |

Chapitre III

| | |
|--|----|
| Figure III. 1 : Banc de détection en interrogation angulaire. | 55 |
|--|----|

| | |
|---|----|
| Figure III. 2 : Réponse SPR en interrogation angulaire expérimentale: image de caméra (haut) et profil d'intensité correspondant schématique (bas). | 55 |
| Figure III. 3 : Valisette de test (gauche) et équipement de lecture seul (droite). | 56 |
| Figure III. 4 : Réponse SPR en interrogation spectrale expérimentale: spectrogramme (haut) et schématique (bas). | 57 |
| Figure III. 5 : Méthode de suivi du minimum de la réponse SPR (interrogation angulaire). | 58 |
| Figure III. 6 : Méthode de suivi par calcul du centroïde (interrogation angulaire). | 58 |
| Figure III. 7 : Méthode de suivi de l'intensité (interrogation angulaire) | 59 |
| Figure III. 8 : Détermination de la sensibilité. | 60 |
| Figure III. 9 : Largeur à mi-hauteur de la réponse SPR (ici dans le cas d'une interrogation angulaire)..... | 60 |
| Figure III. 10 : Interrogation angulaire à 1550 nm: sensibilité, FWHM, FOM et contraste d'un capteur sur substrat H-ZF1 en fonction de l'épaisseur du film d'or (couche plasmonique). | 63 |
| Figure III. 11 : Interrogation spectrale sur la gamme 500-1000nm: sensibilité, FWHM, FOM et contraste d'un capteur sur substrat BK7 en fonction de l'épaisseur du film d'or (couche plasmonique)..... | 63 |
| Figure III. 12 : Valeurs théoriques de l'indice de réfraction de solutions d'EG en fonction de la concentration en EG. La variation de cet indice par rapport à celui de l'eau est aussi donnée (en RU) car c'est principalement cette valeur qui est utilisée pour la détermination de la courbe d'étalonnage..... | 65 |
| Figure III. 13 : Sensorgramme de solutions d'éthylène glycol à différentes concentrations. Le niveau de base correspond à l'injection d'eau dé-ionisée..... | 66 |
| Figure III. 14 : Courbe d'étalonnage du banc de détection en interrogation angulaire..... | 67 |
| Figure III. 15 : Fluctuations du niveau de base permettant d'estimer la LOD. | 68 |
| Figure III. 16 : Sensorgrammes de solutions d'éthylène glycol à différentes concentrations. Le niveau de base correspond à l'injection d'eau dé-ionisée pour le capteur avec une couche métallique de 35 nm (gauche) et 48 nm (droite)..... | 69 |
| Figure III. 17 : Courbe d'étalonnage du banc de détection en interrogation spectrale (valisette) pour le capteur avec une couche métallique de 35 nm et 48 nm d'épaisseur. | 69 |

Chapitre IV

| | |
|--|----|
| Figure IV. 1: Capteur sous test SPR en goutte (D-SPR)..... | 76 |
| Figure IV. 2: Processus de collage du capot PDMS au capteur SPR par traitement plasma-corona. | 77 |
| Figure IV. 3: a) Puce microfluidique fabriquée par collage corona, b) Réponse plasmonique de trois canaux de la puce. | 78 |
| Figure IV. 4: Réalisation de capteurs avec microfluidique appliquée: a) par pression mécanique b) par collage avec préparation "physique" (plasma "corona") (cf. § IV.3.1) c) par collage avec préparation chimique (11MUA-APTMS)..... | 79 |
| Figure IV. 5 : Molécule MPTMS..... | 80 |

| | |
|--|----|
| Figure IV. 6 : Processus de collage du PDMS traité au MPTMS sur la surface d'or du capteur SPR (le dessin de droite représente schématiquement le collage par le MPTMS)..... | 80 |
| Figure IV. 7 : Aspect final du capteur SPR avec microfluidique intégrée. | 81 |
| Figure IV. 8 : gauche: Capteur SPR souple (haut) avec microfluidique intégrée (bas), droite: Surface d'un capteur SPR utilisant les plasmons localisés (bas: détail). | 81 |
| Figure IV. 9 : Mesures d'angle de contact de surface de PDMS traitée à l'UV-O ₃ et traitée au MPTMS. | 82 |
| Figure IV. 10 : Spectres ATR-FTIR normalisés de surfaces de PDMS traitées à l'UV-O ₃ et au MPTMS. | 83 |
| Figure IV. 11 : Modification de la surface du PDMS par UV-O ₃ | 84 |
| Figure IV. 12 : Mécanisme de l'auto-assemblage du MPTMS sur PDMS [24, 25]. | 85 |
| Figure IV. 13 : a) Échantillon collé par plasma-corona (à gauche) et échantillon chimi-collé (à droite). b) Échantillons sous test de résistance à la traction. | 86 |
| Figure IV. 14 : Courbes de résistance à la traction pour les échantillons de PDMS liés par décharge corona (ligne pleine) et chimiquement (ligne pointillée)..... | 87 |
| Figure IV. 15 : a) Remplissage d'un canal à moitié, b) remplissage entier d'un canal, c) Remplissage de tous les canaux, d) zoom sous microscope optique sur 2 canaux fluidiques remplis lors du test d'encre noire..... | 88 |
| Figure IV. 16 : Réponse plasmonique normalisée pour les deux capteurs avec microfluidique collée par plasma corona et chimiquement. | 89 |

Chapitre V

| | |
|--|-----|
| Figure V. 1: Capteur utilisé dans la valisette. La microfluidique est réalisée par un capot en PDMS clampé par pression mécanique sur la surface du capteur. | 95 |
| Figure V. 2: Schéma du traitement de "déprotection" de l'ADN T100-SH par traitement au DTT. | 97 |
| Figure V. 3: Protocole de fonctionnalisation uniforme en T100-SH ou <i>Zymo</i> -SH. L'utilisation d'un espaceur (MCH) (étapes du bas) n'a été effective que pour la fonctionnalisation en T100..... | 99 |
| Figure V. 4: Protocole de fonctionnalisation localisée en T100-SH ou <i>Zymo</i> -SH. | 100 |
| Figure V. 5: Photographie d'une goutte d'eau dé-ionisée déposée sur des surfaces a.) d'Au nu, b.) d'Au traité aux UV-O ₃ , c.) d'Au fonctionnalisées par <i>Zymo</i> -SH. | 101 |
| Figure V. 6: Spectre RAMAN de la surface du capteur greffée en oligonucléotide thiolé. | 101 |
| Figure V. 7: Spectre XPS de la surface d'Au fonctionnalisée par l'oligonucléotide thiolé <i>Zymo</i> -SH..... | 102 |
| Figure V. 8: Spectres XPS à haute résolution de: a. Au 4f, b. S 2p, c. du C1s, d. N 1s, et O 1s. | 103 |
| Figure V. 9: Images AFM de : a) surface d'Au vierge b) partie de surface d'Au vierge, c) surface d'Au fonctionnalisée au <i>Zymo</i> -SH. | 105 |
| Figure V. 10: Voltammogrammes d'une surface d'or, seule (noir), fonctionnalisée en sondes (<i>Zymo</i> -SH) (rouge) et après l'hybridation avec le monobrin <i>Zymo</i> (bleu)..... | 106 |

| | |
|--|-----|
| Figure V. 11: Fonctionnalisation uniforme: Schéma récapitulatif indiquant la fonctionnalisation de surface et l'analyte utilisé pour chaque canal..... | 106 |
| Figure V. 12: Sensorgrammes de l'interaction des sondes T100-SH avec les monobrans complémentaires A100: en mode statique, en mode dynamique et référence PBS..... | 107 |
| Figure V. 13: Réponse comparative obtenue en mode statique (canal 2) et en mode dynamique (canal 3) sur l'interaction T100-A100..... | 108 |
| Figure V. 14: Fonctionnalisation localisée: schéma récapitulatif indiquant la fonctionnalisation de surface et l'analyte utilisés pour chaque canal. | 109 |
| Figure V. 15: Sensorgrammes: spécificité de l'appariement (canal 1) et influence de la densité de sondes T100 (canaux 2 et 4). | 110 |
| Figure V. 16: Répartition des analytes pour le test complémentaire sur l'influence de la concentration en sondes T100. | 111 |
| Figure V. 17: Sensorgrammes: influence de la densité de sondes T100 (canaux 1 et 3). | 112 |
| Figure V. 18: Réponses obtenues après rinçage et stabilisation du signal pour les différentes configurations de chimie de surface (pourcentage sonde T100 - espaceur MCH)..... | 113 |
| Figure V. 19: Sensorgrammes relatifs à la détection du nucléotide <i>Zymo</i> (injections de concentrations identiques). | 114 |
| Figure V. 20: a. Sensorgramme du test 2 de la détection nucléotide <i>Zymo</i> (injections de concentrations différentes). b. Évolution du niveau d'affinité en fonction de la concentration après rinçage au PBS..... | 116 |
| Figure V. 21: Sensorgrammes correspondant à l'injection d'analytes de concentration différente en analyte <i>Zymo</i> | 118 |
| Figure V. 22: Phases de l'étape de la fonctionnalisation de surface: a) greffage d'une monocouche de 11-MUA, b) activation de la monocouche 11-MUA par EDC-NHS, c) fonctionnalisation par l'IgG- <i>Zymo</i> , d) désactivation à l'éthanolamine, e) passivation de la surface par BSA et f) Interaction des sondes IgG anti- <i>Zymo</i> avec l'analyte protéines- <i>Zymo</i> .. | 121 |
| Figure V. 23: Sensorgramme d'immobilisation de l'IgG- <i>Zymo</i> | 122 |
| Figure V. 24: Voltammogramme d'une surface fonctionnalisée en IgG- <i>Zymo</i> | 122 |
| Figure V. 25: Sensorgrammes de détection des protéines <i>Zymo</i> . En noir, La détection d'un mélange de protéines pathogéniques pures. En vert et en rouge des protéines pathogéniques extraites de feuilles après 21 jours d'innoculation..... | 123 |
| Figure V. 26: Voltammogramme de l'interaction de l'IgG- <i>Zymo</i> -protéines <i>Zymo</i> | 126 |

Chapitre VI

| | |
|--|-----|
| Figure VI .1: Capteur utilisé sur le banc en interrogation angulaire. La microfluidique est réalisée par un capot en PDMS intégré (cf. Chapitre III). | 135 |
| Figure VI .2: Structure chimique des <i>glucides</i> mannanes sous forme anomère α et β | 137 |
| Figure VI. 3: Spectre RAMAN de la monocouche de 11MUA immobilisée sur une surface d'or. | 138 |
| Figure VI. 4: Processus de greffage des surfaces d'Au en 11MUA. | 139 |
| Figure VI. 5 : Étapes principales de l'immobilisation de l'Anti-mannanes (IgM 5B2)..... | 139 |

| | |
|---|-----|
| Figure VI. 6 : Photographies d'une goutte d'eau déposée sur des surfaces d'or nu, d'or greffée (temps de greffage de 4 h à 20 h) en 11MUA et d'or greffée en 11MUA puis activée avec la valeur de l'angle de contact correspondant. | 140 |
| Figure VI. 7: Sensorgrammes d'immobilisation de l'Anti-mannanes (IgM 5B2) sur des surfaces d'or greffées en 11MUA pendant 4 h (noir), 8 h (bleu), 14 h (vert) et 20 h (violet) | 141 |
| Figure VI. 8: Sensorgrammes d'interaction Anti-mannanes (IgM 5B2)/mannanes sur des surfaces greffées en 11MUA pendant 4 h, 8 h, 14 h et 20 h. | 143 |
| Figure VI. 9: Spectre ATR-FTIR des surfaces d'or modifiées: bas (noir): surface d'or greffée avec une SAM de 11MUA; haut (rouge), SAM de 11MUA activée à l'EDC/NHS. | 145 |
| Figure VI. 10: Spectres XPS généraux: bas (noir): SAM de 11MUA formée sur la surface d'or; haut (bleu) surface fonctionnalisée avec l'anticorps Anti-mannanes (IgM 5B2). | 146 |
| Figure VI. 11: Spectres XPS à haute résolution du S 2p, du C 1s, du N 1s, du et O 1s (de haut en bas) des surfaces greffées (gauche) et fonctionnalisées (droite). | 147 |
| Figure VI. 12: Images AFM d'une surface d'or. a. greffée en 11MUA, b. et b'. fonctionnalisées avec des Anti-mannanes (IgM 5B2), c. et c'. après interaction Anti-mannanes (IgM 5B2)/mannanes et d. surface biphasique Anti-mannanes (IgM 5B2) et Anti-mannanes (IgM 5B2)/mannanes. | 149 |
| Figure VI. 13: Schéma représentatif de la conformation en agrafes du 5B2 suite à l'interaction avec les mannanes, adapté de [33,34]. | 150 |
| Figure VI. 14: Répartition des analytes pour le test d'interaction Anti-mannanes (IgM 5B2)/mannanes sur le banc en interrogation angulaire. | 151 |
| Figure VI. 15: Sensorgrammes d'immobilisation de l'Anti-mannanes (IgM 5B2) pour chaque canal utilisé par la suite (suivi de la fonctionnalisation de surface). | 152 |
| Figure VI. 16: Sensorgrammes correspondant aux tests d'interactions Anti-mannanes (IgM 5B2)/mannanes. | 153 |
| Figure VI. 17: Schéma descriptif des différentes étapes de fonctionnalisation de surface d'Au : a. Greffage des 11MUA à la surface d'Au ; b. Activation de la surface avec l'EDC/NHS ; c. Immobilisation de l'Anti-mannanes (IgM 5B2) ; d. Désactivation des NHS n'ayant pas réagi ; e. Injection de l'analyte (mannanes) | 154 |
| Figure VI. 18: Répartition des analytes pour le test d'interaction Anti-mannanes (IgM 5B2)/mannanes sur le banc en interrogation spectrale (valisette). | 155 |
| Figure VI. 19: Sensorgrammes d'interactions 5B2-Anti-mannanes (IgM 5B2)/mannanes sur la valisette (interrogation spectrale). | 156 |
| Figure VI. 20: Répartition des analytes pour le test d'interaction Anti-mannanes (IgM 5B2)/mannanes. | 157 |
| Figure VI. 21: Sensorgrammes d'immobilisation de l'Anti-mannanes (IgM 5B2) (200µg/mL) et d'interaction Anti-mannanes (IgM 5B2)/mannanes (100 et 200 µg/mL) dans le canal 3 (a) et le canal 4 (b). | 159 |
| Figure VI. 22: Répartition des analytes pour le test d'interactions mannanes/Anti-mannanes (IgM 5B2). | 160 |

| | |
|--|-----|
| Figure VI. 23: Sensorgrammes d'immobilisation de mannanes (200 µg/mL) et d'interactions des sondes mannanes avec les analytes Anti-mannanes (IgM 5B2) (10 et 100 µg/mL). | 161 |
| Figure VI. 24: Voltammogrammes correspondant aux étapes successives de greffage (11MUA), activation (EDC/NHS), fonctionnalisation (Anti-mannanes (IgM 5B2)), passivation ("surface deactivation") et interaction (mannanes)..... | 162 |

Annexe

| | |
|--|-----|
| Figure A. 1 : Schéma descriptif du test ELISA..... | 175 |
| Figure A. 2 : Résultat du test ELISA | 176 |

Liste des tableaux

Chapitre I

| | |
|--|----|
| Tableau I. I : Techniques de détection du <i>Candida albicans</i> | 16 |
| Tableau I. II : Classification des biocapteurs selon la nature du transducteur (adapté de [101]). | 21 |

Chapitre II

| | |
|---|----|
| Tableau II. I : Paramètres cinétiques issus d'une analyse SPR. | 40 |
| Tableau II. II : Les quatre types de monocouches auto-assemblées [37]. | 41 |

Chapitre III

| | |
|---|----|
| Tableau III. I : Paramètres et performances des deux capteurs utilisés pour l'étalonnage du banc spectral « valisette ». | 64 |
| Tableau III. II : Récapitulatif des paramètres des capteurs et performances en détection expérimentales obtenues sur les deux systèmes utilisés durant ce travail. | 71 |

Chapitre IV

| | |
|--|----|
| Tableau IV. I : Attribution des raies des spectres ATR-IR pour les surfaces PDMS traitées par UV-O ₃ et MPTMS [14,17–19] | 83 |
|--|----|

Chapitre V

| | |
|--|-----|
| Tableau V. I : Monobrins ADN de synthèse utilisés pour les tests préliminaires. | 96 |
| Tableau V. II : Monobrins ADN de synthèse relatifs au <i>Zymoseptoria tritici</i> | 98 |
| Tableau V. III : Extraction des paramètres cinétiques à partir des interactions compl. <i>Zymo</i> – <i>zymo</i> obtenues sous différentes concentrations d'analytes. | 119 |
| Tableau V. IV: Types de forces de liaison intermoléculaires engagées dans le couple anticorps-antigène à pH physiologique . Adapté de [54]. | 124 |
| Tableau V. V : Données cinétique d'interaction du couple IgG <i>zymo</i> -protéines <i>zymo</i> . pures | 125 |

Chapitre VI

| | |
|--|-----|
| Tableau VI. I: Classement des protocoles de greffage (différents par leur durée) en fonction de la réponse enregistrée lors de l'immobilisation de l'anticorps Anti-mannanes (IgM 5B2). * indique que cette valeur n'est pas vraiment significative suite à un processus de fonctionnalisation ne s'étant pas déroulé de manière cohérente. | 142 |
| Tableau VI. II : Classement ascendant des temps de greffage en fonction du rapport 5B2/Mannanes (Anticorps/Antigènes) immobilisés-détectés. | 144 |
| Tableau VI. III : Rugosité extraites des caractérisations AFM. | 150 |
| Tableau VI. IV : Pentés du début d'interaction mannanes/Anti-mannanes (IgM 5B2). | 162 |

Introduction générale

Ce travail s'est inscrit dans le cadre du projet BIOSENS financé par le programme Interreg France-Wallonie-Vlaanderen V *via* le portefeuille de projets SMARTBIOCONTROL qui comprend quatre autres projets : BIOCOMGEST, BIOPROTECT, BIOPROD et BIOSCREEN. Le projet BIOSENS a eu pour but de mettre au point un dispositif portable d'analyse par SPR (SPR, pour Surface Plasmon Resonance en Anglais) afin de mesurer, sur site, le taux de pathogènes présents dans l'environnement sous test. La détection précoce des contaminations permet d'adapter plus rapidement et efficacement les traitements préventifs voire curatifs. Le portefeuille SMARTBIOCONTROL a pour but originel la mise au point de traitements biologiques en agronomie et les différents projets constitutifs traitent de ce domaine. Une spécificité du projet BIOSENS est d'étendre le domaine de détection aux pathogènes humains. Brièvement, les objectifs de chaque projet du portefeuille sont :

BIOCOMGEST : projet « chapeau » qui permet la gestion coordonnée des différents projets et l'échange d'informations entre eux,

BIOSCREEN : projet axé sur le développement de nouvelles molécules biosourcées et multifonctionnelles pour le contrôle des agents phytopathogènes (<http://www.smartbiocontrol.eu/fr/projet-bioscreen/>),

BIOPROTECT : projet visant à définir les protocoles de traitements biofongicides phytosanitaires (<http://www.smartbiocontrol.eu/fr/projet-bioprotect/>)

BIOPROD : projet permettant la production en quantité suffisante de biomolécules pour les évaluer en champ (<http://www.smartbiocontrol.eu/fr/projet-bioprod/>),

BIOSENS : projet dans lequel se situe ce travail et dont le but est de développer un système de mesure sur site permettant la détection des agents pathogènes (<http://www.smartbiocontrol.eu/fr/projet-biosens/>).

Actuellement, la détection de pathogènes biologiques peut se décliner suivant deux familles de schémas de détection que l'on pourrait qualifier de:

- « classiques » : examen direct, culture et examen anatomopathologique.
- « modernes » : détection d'antigènes présents sur la paroi externe des espèces (*via* test ELISA, essentiellement) et par détection d'ADN du pathogène (par PCR).

Bien que ces techniques soient efficaces et couramment utilisées, elles présentent certains inconvénients tels qu'une faible sensibilité, un temps de traitement long, une incapacité à suivre la détection en temps réel, un coût élevé et l'utilisation de biomarqueurs.

Depuis quelques années, grâce à l'émergence des micro et nanotechnologies, des biocapteurs destinés à la détection de pathogènes ont émergé et continuent d'être développés à tel point que le marché des biocapteurs a connu une croissance remarquable. En effet, il en existe plusieurs types suivant le principe de détection (*e.g.* potentiométrique, thermique, optique, électrochimique...) et sont employés pour la détection de diverses pathologies telles que le diabète, l'hépatite B, la dengue ou la détection de médicaments dans le sang [1]. Parmi les différents principes de détection disponibles, le projet BIOSENS s'est basé sur la résonance plasmonique de surface qui affiche plusieurs avantages tels qu'une forte sensibilité, une analyse en temps réel et la non-utilisation d'un pré-marquage des molécules à détecter.

Les pathogènes ciblés pour cette étude sont des champignons. Le règne fongique dénombre environ 144000 espèces [2] touchant principalement la faune et la flore, seules 200 d'entre elles

peuvent affecter l'humain [3]. Elles peuvent se développer sous forme de levures ou de moisissures dont certaines sont pathogéniques et provoquent des infections de l'organisme contaminé. Dans le domaine principal phytosanitaire du portefeuille SMARTBIOCONTROL, le pathogène fongique du blé *Zymoseptoria tritici* a été ciblé. Dans le domaine secondaire, médical, spécifique à notre projet, l'étude a visé le champignon *Candida albicans*.

Le *Zymoseptoria tritici* est un champignon de la famille des *mycospharellaceae* qui se développe sous des conditions climatiques particulières et qui cause une des principales maladies dans la culture du blé : la septoriose. Elle se caractérise par l'apparition de taches brunes sur les feuilles de la plante avec un aspect nécrotique et des points sombres nommés pycnides.

Cette phytopathologie cause parfois une détérioration des cultures allant jusqu'à 50%. En France la dégradation de 5 à 10% des récoltes se traduisent par des pertes économiques estimées entre 350 à 700 millions d'euros [4].

Quant aux *Candida albicans*, qui sont des levures ubiquitaires de la famille des *saccharomycetaceae*, ils sont présents naturellement dans les muqueuses de l'être humain. Ce champignon prolifère de manière opportuniste dans les organismes immunodéficients (patients atteints de cancers, du SIDA, ayant subi une transplantation d'organes...) causant ainsi la candidose chez l'Homme. L'infection fongique invasive se caractérise par un dépôt blanchâtre au niveau du site infecté (partie buccale, œsophage, parties génitales...).

La candidose causée par les *Candida albicans* est responsable d'au moins 50 000 décès/an au niveau mondial.

Les agents pathogènes fongiques sont essentiellement traités avec des fongicides à base de soufre, d'azoles ou autres traitements bio-inspirés. Toutefois, ces mycoses développent une résistance immunitaire envers ces traitements dits classiques qui sont onéreux, ce qui complexifie leur traitement et le rend encore plus cher.

Comme mentionné précédemment, la résonance plasmonique de surface est le principe de détection utilisé dans ces travaux. Il repose sur la détection d'interactions moléculaires qui seront déclinées ici sous deux aspects: soit une interaction antigène-anticorps soit une interaction entre deux monobrins d'ADN complémentaires. Le système de détection, objet du projet BIOSENS se compose « classiquement » d'un banc portable de lecture et d'un capteur amovible auxquels il faut associer un protocole de détection des espèces recherchées.

Six partenaires ont participé au projet BIOSENS et leur rôle est résumé ci-dessous:

- Materia Nova (Mons, BE) (coordonnateur du projet) : réalisation de capteurs basés sur la résonance plasmonique de surface localisée, détection du *Zymoseptoria tritici* par interaction ADN,
- Centre pour l'Agronomie et l'Agro-industrie de la Province du Hainaut (C.A.R.A.H.) (Ath, BE) : détermination des séquences ADN cible et sonde pour le *Zymoseptoria tritici*, bioinformatique, techniques de récoltes des spores en champ,
- Multitel (Mons, BE) : fabrication du prototype de l'équipement de détection portable (appelé « valisette »),
- Université de Liège, Centre Spatial de Liège (CSL) (Liège, BE): réalisation de capteurs basés sur la résonance plasmonique de surface localisée, technique de mesure par interrogation spectrale du capteur,

- Centre Hospitalier Universitaire (Lille, FR) : détermination et fourniture des antigènes et anticorps pour *Candida albicans* et *Zymoseptoria tritici*, techniques de purification des échantillons biologiques, protocoles originels d'interaction antigènes-anticorps,
- Université de Lille et CNRS (Villeneuve d'Ascq, FR) -via deux laboratoires, PhLAM et IEMN- : réalisation de capteurs basés sur la résonance plasmonique de surface, techniques de mesure par interrogation angulaire et spectrale du capteur, instrumentation microfluidique, fonctionnalisation de surface, détection du *Zymoseptoria tritici* par interaction ADN et antigènes-anticorps, détection du *Candida albicans* par interaction antigènes-anticorps

Le travail mené dans cette thèse s'inscrit donc dans les thématiques dévolues aux partenaires Université de Lille et CNRS et plus particulièrement sur leurs aspects physico-chimiques. Ces aspects ont été traités dans la mise au point de l'instrumentation microfluidique et celle des différents protocoles de fonctionnalisation de surface et de détection des pathogènes fongiques. On peut retrouver les études purement physiques (capteurs et schémas d'interrogation) dans la thèse de S. Ganesan [5] dont les travaux se sont terminés récemment.

Les objectifs de cette thèse ont alors consisté en i) l'appropriation des bancs de lecture des capteurs et notamment de la valisette, ii) le développement d'une technologie d'intégration de la microfluidique aux capteurs, iii) l'élaboration des protocoles de fonctionnalisation de surface des capteurs avec de l'ADN et des anticorps de type IgG et Anti-mannanes (IgM 5B2) permettant de convertir les capteurs SPR en des biocapteurs, iv) la validation de la détection par SPR des deux pathologies ciblées à l'aide des biocapteurs développés.

Ce manuscrit est organisé comme suit :

Le chapitre I décrira les deux pathologies fongiques (la septoriose du blé causée par *Zymoseptoria tritici* et la candidose causée par *Candida albicans*) ciblées dans le cadre du projet BIOSENS, leurs traitements actuels, ainsi qu'un état de l'art des méthodes de leur détection par des techniques usuelles, non-conventionnelles (dont la SPR). Cette partie sera suivie d'une initiation aux biocapteurs.

Le chapitre II présentera le principe physique de la technique de détection par SPR, son utilisation pour le suivi de la variation d'indice de réfraction, mais aussi les différentes stratégies de fonctionnalisation de surface permettant de convertir un capteur SPR en un biocapteur.

Le chapitre III détaillera les deux bancs de mesure par SPR utilisés lors de nos différentes études, le premier à base d'une interrogation angulaire et le second (valisette) à base d'une interrogation spectrale.

Le chapitre IV exposera les travaux expérimentaux menés pour la réalisation de capteurs plasmoniques avec microfluidique intégrée par collage chimique, de la mise au point de leur procédé de fabrication à la validation de leur fonctionnement en passant par la caractérisation physico-chimique des états de surface aux différentes étapes du procédé de fabrication. Une étude de la résistance mécanique a aussi été menée.

Le chapitre V sera dédié à la détection de *Zymoseptoria tritici* et sera divisé en deux parties. La première est basée sur une interaction monobrin d'ADN-monobrin d'ADN et la seconde sur une interaction antigène-anticorps. L'ensemble des expérimentations a été mené sur la valisette. Ce chapitre comporte aussi une partie dédiée à la caractérisation physico-chimique des surfaces fonctionnalisées.

Le chapitre VI présentera les travaux visant la détection de *Candida albicans* basée sur une interaction anticorps-antigène. Identiquement au chapitre précédent, une partie sera dédiée à la

caractérisation des surfaces et une autre aux résultats des expérimentations de biodétection. A noter que les deux schémas d'interrogation, angulaire et spectrale, du capteur ont ici été investigués.

Références

- [1] P. Tarlekar et S. Chatterjee, « Enhancement in sensitivity of non-steroidal anti-inflammatory drug mefenamic acid at carbon nanostructured sensor », *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol. 803, p. 51-57, 2017, doi: 10.1016/j.jelechem.2017.09.005.
- [2] S. Pinhey et M. Tebbs, *Plants for Soil Regeneration: An Illustrated Guide*. CABI, 2022.
- [3] M. C. Fisher *et al.*, « Threats Posed by the Fungal Kingdom to Humans, Wildlife, and Agriculture », *mBio*, vol. 11, n° 3, 2020, doi: 10.1128/mBio.00449-20.
- [4] H. Fones, « The impact of Septoria tritici Blotch disease on wheat: An EU perspective », *Fungal Genetics and Biology*, p. 5, 2015.
- [5] S. Ganesan, « Utilisation de la résonance plasmonique de surface pour la réalisation de capteurs appliqués au domaine phytosanitaire », These de doctorat, Lille, 2020. [En ligne]. Disponible sur: <http://theses.fr/2020LILUI059>

Chap. I. Contexte de l'étude

Dans ce chapitre introductif, nous exposons succinctement les deux pathologies fongiques dont la détection a été le sujet du projet BIOSENS:

- la première chez les plantes et, en particulier, le blé: la septoriose liée au champignon *Zymoseptoria tritici*. Nous présenterons également l'impact économique et écologique de cette phytopathologie.
- la seconde chez l'humain: la candidose liée au champignon *Candida albicans*.

Nous continuons par un état de l'art des techniques actuellement utilisées pour leur détection.

Les derniers paragraphes donnent les notions élémentaires de biologie moléculaire qui permettent d'appréhender les techniques de détection utilisées dans les chapitres suivants ainsi qu'une introduction aux biocapteurs avec des définitions générales.

I.1 La septoriose du blé

Le blé est une céréale de la famille végétale des graminées ou poacées qui constitue un aliment de base pour l'être humain depuis l'antiquité, car constitué essentiellement d'amidon, de protéines glutéiniques, de caroténoïdes, de minéraux et de vitamines B et E ; il assure un apport nutritionnel quasi-complet [1]. Découvert et anciennement cultivé dans le berceau proche-oriental, il est aujourd'hui présent aux quatre coins du monde et s'adapte aux climats tempérés comme aux extrêmes [2, 3].

Au-delà de son utilisation comme denrée alimentaire dans les domaines de la meunerie et de la panification, le blé tendre est utilisé dans l'alimentation animale, l'amidonnerie et la glutennerie. De plus, depuis les dernières décennies le blé est une importante source de bioéthanol [4].

On dénombre deux principaux types de blé, le blé tendre ou le froment (*triticum aestivum*) et le blé dur (*triticum durum*); dans cette thèse nous aborderons uniquement le blé tendre, car d'une part il s'agit de l'espèce la plus cultivée en France et la seule en Belgique et d'autre part elle est la plus touchée par la maladie de septoriose.

I.1.1 La culture du blé: production, coûts et pertes

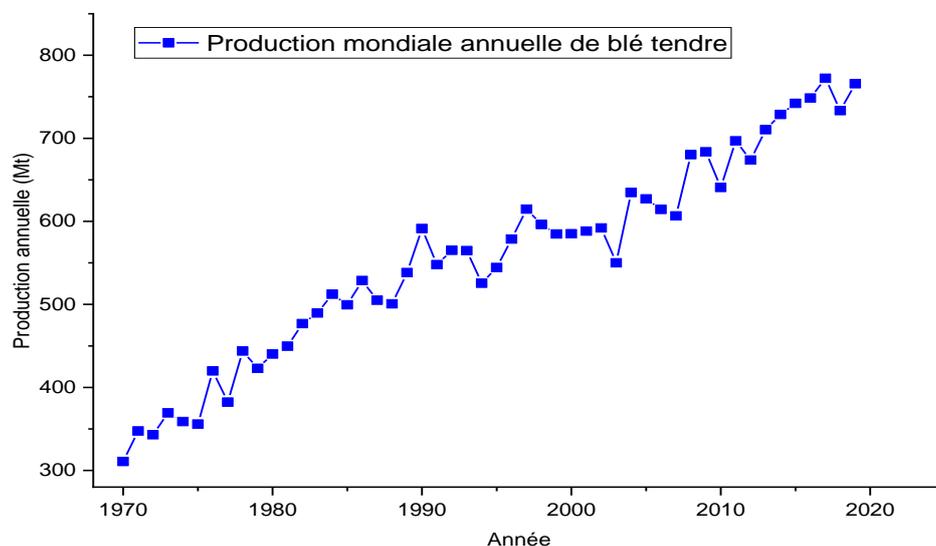


Figure I. 1 : Production mondiale annuelle de blé tendre (données collectées du site de la FAO).

Au fil des années, la production du blé s'est adaptée à l'évolution démographique mondiale. Selon les données de l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (Food And Agriculture Organization (FAO) <http://www.fao.org/faostat/fr/#data/QC/visualize>) et le rapport mensuel du conseil international des céréales (http://igc.int/fr/gmr_summary.aspx#), la production a plus que doublé en l'espace de cinquante ans en passant de 310 Mt (1970) à 776 Mt (2021) (Figure I. 1).

Chapitre I : Contexte de l'étude

Le blé est la deuxième céréale la plus cultivée à l'échelle internationale avec 29 % de la production céréalière mondiale représentant un marché des exportations d'environ 32 milliards d'euros [5,6]. La liste des dix premiers producteurs de blé sur l'année 2019-2020 est résumée sous forme d'histogramme dans la **Figure I. 2**, l'Union-Européenne figure à la tête du peloton avec plus de 155 millions de tonnes, talonnée par la Chine et l'Inde avec plus de 133 et 103 Mt respectivement. Il est à noter que ce classement a très peu changé sur les cinq dernières années.

Une telle production a été atteinte en ayant cultivé près de 216 Mha de terres agricoles, ce qui a tout de même assuré un rendement mondial de blé de 3,5 tonnes/ha. Ce rendement varie énormément d'une région géographique planétaire à une autre et bien évidemment d'un pays à l'autre à cause, d'une part, des moyens techniques utilisés par chacun et, d'autre part, des conditions climatiques et météorologiques. Car, même si le blé est aujourd'hui vastement cultivé dans le monde entier pendant toute l'année, on cite la culture estivale et hivernale du blé. Dans la partie nord de l'Europe occidentale, on cultive le blé dit « d'hiver » parce que le procédé de *vernalisation* -procédé froid accélérant et favorisant la germination et la floraison des plantes [7]- est favorisé. En effet, la semence se fait en automne pour que les graines germent pendant l'hiver avec l'arrivée des pluies et de la neige, puis elles croissent et fleurissent pendant le printemps où le climat est plus doux, ainsi la moisson peut avoir lieu en été [1, 8]. Bien que ces conditions météorologiques confèrent à l'Union-Européenne le meilleur rendement de production de blé enregistré, indirectement elles causent des pertes colossales du fait qu'elles favorisent le développement de maladies fongiques. Cette partie est plus détaillée et discutée dans le paragraphe suivant.

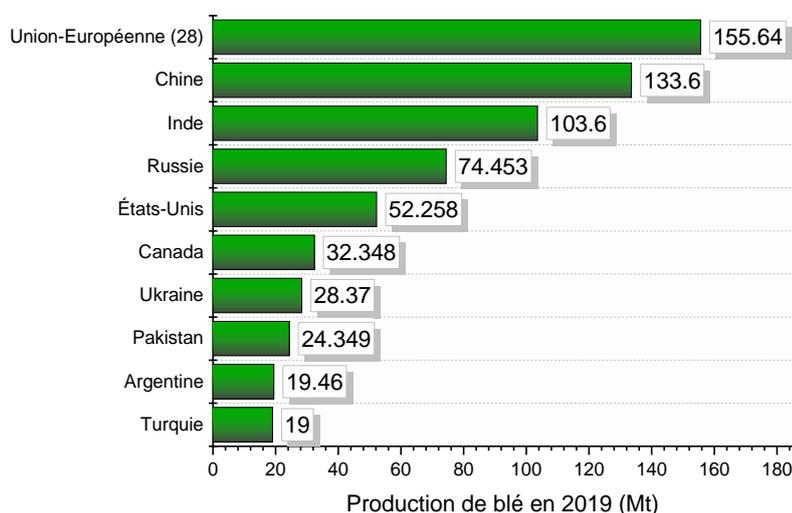


Figure I. 2 :Histogramme montrant les dix premiers producteurs de blé dans le monde durant l'année 2019-2020 (Données collectées du site de la FAO et IGC).

I.1.2 Le champignon *Zymoseptoria tritici*

Tout comme l'Homme, les plantes sont aussi menacées par des maladies à l'origine de pertes conséquentes en termes de quantité et qualité, impactant alors directement le coût [9,

10]. Concernant le blé, les principales maladies sont le piétin-verse, l'oïdium, la rouille jaune, les fusarioses et la septoriose. Dans ce travail, c'est cette dernière infection fongique qui a été ciblée et nous nous sommes donc intéressés au champignon étant à la base: le *Zymoseptoria tritici* (**Figure I. 3**).



Figure I. 3 : Feuille de blé infectée par le *Zymoseptoria tritici*.

Classée au premier rang des maladies du blé, la septoriose du blé (*wheat leaf blotch*, en anglais) est avant tout une pathologie foliaire hémibiotrophe: organisme qui infecte les tissus vivants d'une plante et poursuit son développement sur les tissus morts [9] causée principalement par l'agent fongique *Zymoseptoria tritici* (connu aussi sous le nom scientifique *mycospharella graminicola*) [9, 10]. Indubitablement, l'élément déclencheur de cette phytopathologie est le climat humide accompagné de faibles chaleurs, ce qui est inévitable à l'automne. De plus, l'utilisation massive de fertilisants azotés sert de foyers de contamination du pathogène [10]. Une fois installée, cette maladie se répand rapidement dans un champ par des spores aéroportées ou *via* des éclaboussures d'eau. La septoriose causée par le pathogène *Zymoseptoria tritici* se manifeste par l'apparition de tâches irrégulières brunâtres sur les feuilles de la plante qui s'éclaircissent au centre au fur et à mesure que la maladie se propage au niveau local, avec un aspect nécrotique accompagné de petits points sombres nommés *pycnides* [11–13].

Eyal *et al.* ont rapporté que ce champignon cause jusqu'à 50 % des pertes d'une exploitation sur une seule année, ce taux a été abaissé à environ 5 à 10 % grâce à la sélection de variétés de blé résistantes à l'ascomycète filamenteux et à l'utilisation de fongicides [10, 16]. Néanmoins, ce chiffre représente des sommes considérables pour les agriculteurs mais aussi un désastre d'un point de vue écologique.

Bien que certaines études proposent que le *Zymoseptoria tritici* pénètre les feuilles de blé par les jonctions présentes entre les cellules épidermiques, il est approuvé que le parasite infecte la plante hôte *via* des ascospores développés sur des résidus de cultures antérieures pendant l'automne [14] en attaquant les stomates des feuilles en deux phases distinctes (**Figure I. 4**), i) la phase biotrophe et ii) la phase nécrotrophe [18, 19], ce processus est cyclique.

Chapitre I : Contexte de l'étude

- 1- La phase biotrophe, décrite comme latente est souvent asymptomatique car l'agent fongique attaque et détériore les mécanismes de défense de la plante.
- 2- Pendant les 48 heures suivant l'inoculation, les spores germent à la surface des feuilles sous des conditions thermiques douces formant ainsi un mycélium. Ce dernier pénètre à l'intérieur de la feuille par les stomates pour coloniser les cavités sub-stomatales [17, 20].
- 3- A partir du moment où les feuilles sont atteintes et jusqu'à quatorze jours après l'infection, une croissance filamenteuse (hyphale) de la colonie fongique se poursuit au niveau des cellules mésophiles [17, 19].

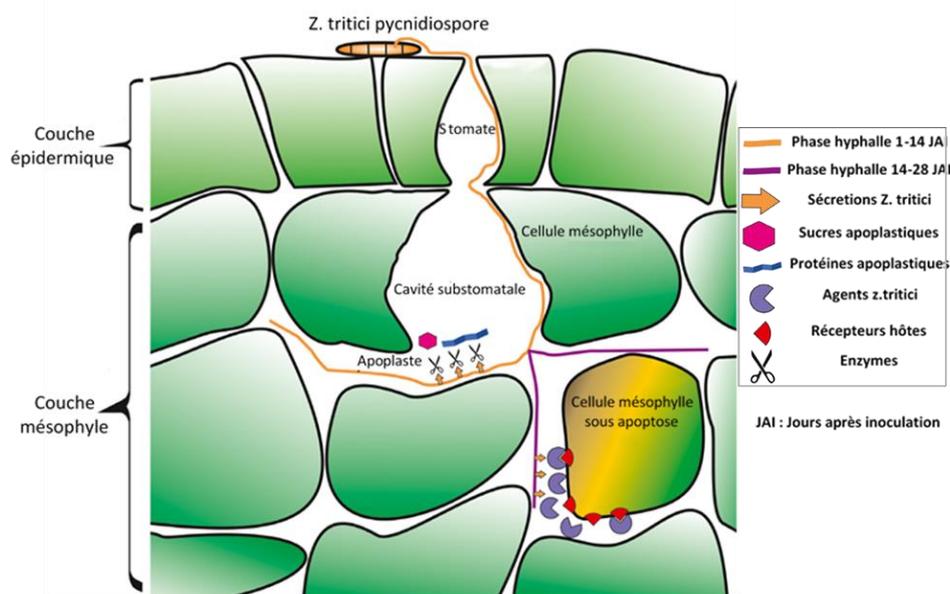


Figure I. 4 : Mécanisme infectieux du champignon *Zymoseptoria tritici*, adapté d'après [15].

- 4- Du quatorzième (J14) jusqu'au vingt-quatrième jour (J24), la phase nécrotrophe, à partir de laquelle les premiers symptômes apparaissent, commence. Le champignon se nourrit des cellules, ce qui conduit à leur désintégration qui est associée à une mort cellulaire (apoptose). Le contenu des phytocellulose est relargué et les métabolites d'apoplastes augmentent proportionnellement, s'en suit une augmentation de la biomasse fongique. Les pycnides contenant des macropycnidiospores sont alors formés et dispersés dans le champ par les éclaboussures engendrées par la pluie et le vent [17, 19].
- 5- Lors de la dernière étape du cycle infectieux nommée saprophyte et qui a lieu entre J25 et J28, Une croissance saprophytique est observée au niveau des cellules mortes conduisant à une production sexuée de pseudothèces [16] qui sont à l'origine de la reproduction sexuelle. Cette reproduction permet au champignon de mieux s'adapter à son environnement et confère une plasticité à son génome qui se traduit par une meilleure résistance aux fongicides [17]. En fin de saison, la reproduction sexuée représente environ 20 à 30% de la population de *Zymoseptoria tritici* [18].

I.1.3 Traitements et moyens de contrôle

Le blé possède de nature une résistance immunitaire naturelle envers le *Zymoseptoria tritici*, d'ailleurs une culture mixte de différentes variétés sur une même parcelle est l'une des méthodes permettant de faire face à une attaque fongique. Néanmoins, la lutte contre la septoriose causée par le *Zymoseptoria tritici* repose actuellement essentiellement sur une pratique conventionnelle chimique à base de fongicides controversés et tend vers la biocompatibilité avec le développement et l'utilisation de biofongicides ou de biocontrôles.

I.1.3.1 Les fongicides chimiques

À ce jour, le contrôle du *Zymoseptoria tritici* se fait par l'emploi de combinaisons de fongicides classiques dominés par les azoles, les inhibiteurs externes de quinones (QoI) ou les inhibiteurs de la succinate déshydrogénase (SDHI)[10,19]. Leur utilisation est si importante pour la lutte contre ce pathogène que les fermiers européens dépensent environ 1Mrd € chaque année [20].

Certes, leur efficacité a été prouvée depuis les années 1960, mais au fil du temps l'ascomycète développe une résistance aux traitements antifongiques, en particulier envers les azoles [21], de par ses deux systèmes de reproduction sexué et asexué, ainsi que de sa recombinaison génétique dans les champs [19,20,22]. D'ailleurs l'association de plusieurs fongicides est conseillée pour contrer la maladie plus efficacement [24, 27–29].

En outre, avec l'engouement écologique et sachant qu'il faut au minimum deux applications/an le coût de charge (estimé à 100 €/ha) [21] et la nature chimique très controversée de ces produits, amènent les biologistes à trouver de nouvelles approches pour remplacer l'usage de ce traitement conventionnel par des méthodes biocompatibles.

I.1.3.2 Les biofongicides

En guise d'alternative aux méthodes classiques jugées coûteuses, laborieuses et bioincompatibles, des techniques de biocontrôle de la maladie sont actuellement développées, entre autres, par les équipes de recherche des projets du portefeuille SMARTBIOCONTROL, *i.e.* Bioscreen, Bioprod et Bioprotect.

Leur approche fait appel à l'utilisation de stimulateurs de défense naturels (SDN) de type lipopeptides cycliques (biosurfactants), des molécules amphiphiles, pour simuler une attaque pathogénique et ainsi stimuler la défense immunitaire de manière précoce [12, 26, 30]. Il en existe trois familles : i) les iturines, ii) les surfactines et iii) les fengycines [22]. Des essais avec de la surfactine dans des serres ont montré une efficacité avec un taux de 70% égalant ainsi une référence classique industrielle Bion®50WG [23].

I.1.3.3 Assistance biotechnologique

La biotechnologie se met aussi au service des agriculteurs pour mieux contrer les attaques pathogéniques. En effet, des chercheurs ont mis en œuvre des systèmes de modélisation prédictifs de contaminations pathogéniques à partir de données collectées (performances

Chapitre I : Contexte de l'étude

climatiques, contaminations et traitements antérieures...), connus aussi sous le terme d'outils d'aide à la décision (OAD), ils permettent d'anticiper la nuisibilité de maladies et ainsi positionner les fongicides avec précision, on nomme le programme Avizio™ pour un large spectre de maladies. Spécifiquement pour le *Zymoseptoria tritici*, à titre d'exemple, Chaloner *et al.* ainsi que Tee Beest *et al.* ont développé des modèles dépendant de données météorologiques [31, 32].

I.2 La candidose chez l'humain

I.2.1 Le champignon *Candida albicans*

Les *Candida albicans* (CA) sont des levures ubiquitaires opportunistes polymorphiques de la famille des *saccharomycetacea* se trouvant majoritairement au niveau du mucus digestif humain et des parties urogénitales [24]. On dénombre plus de 150 espèces de *candida* [25], mais cette catégorie est la plus répandue, provoquant des infections liées directement à un taux élevé de morbidité et de mortalité (au moins 50 000 cas de décès/an) [54, 55].

Rapidement, les *Candida albicans* se développent et forment des biofilms à la fois sur du matériel médical (cathéters, pacemakers, valves...) et des surfaces biologiques (muqueuses, cellules épithéliales...) leur conférant une grande résistance antibactérienne et antimicrobienne et prolifèrent ainsi largement.

I.2.2 Formation de biofilms

La formation d'un biofilm de *Candida albicans* s'effectue en 4 étapes principales (**Figure I. 5**):

- 1- l'**adhésion** pendant laquelle des cellules de levure se déposent sur une surface formant la couche de base permettant l'accroche du biofilm, ceci se fait en moyenne en 1 heure et demie.
- 2- l'**initiation** ou la **prolifération** en 24- 48h ; durant cette étape les cellules subissent une transformation pseudo-hyphale et hyphale (filamenteuse), sécrètent des enzymes hydrolitiques et envahissent la surface contaminée, qu'elle soit biotique ou abiotique.
- 3- la **maturation** pendant laquelle se forme la matrice extracellulaire constituée principalement de glycoprotéines et de polysaccharides dont 87% sont des α -1,2-mannanes et des α -1,6-mannanes [26]. Ces polyoses sont à l'origine de la résistance antifongique.
- 4- la **dispersion**, les cellules latérales se déplacent sur le reste de la surface du substrat contaminé et amorcent un nouveau cycle de formation du biofilm. Cela dit, à ce stade les cellules sont plus nocives car elles peuvent intégrer le flux sanguin et générer une candidémie. [57, 58].

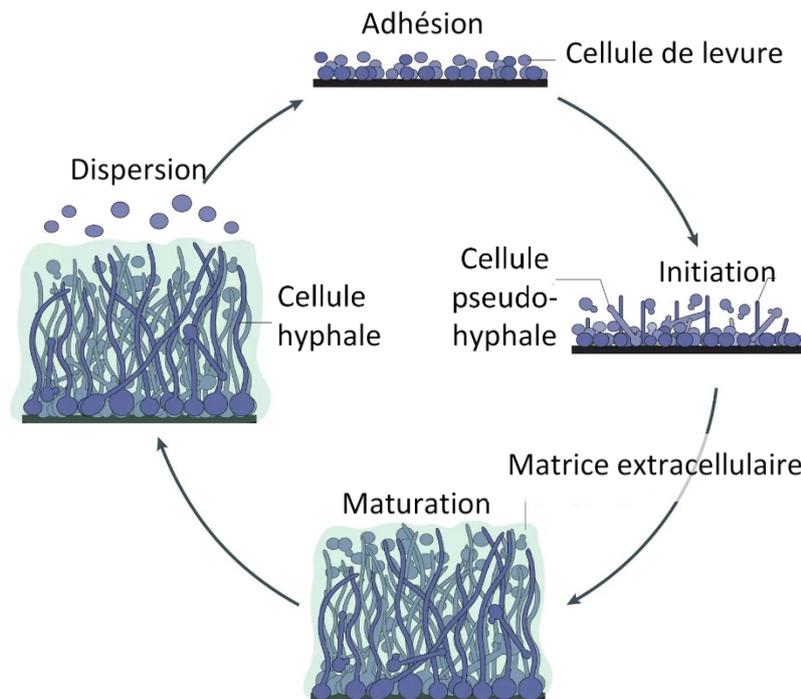


Figure I. 5 : Cycle de formation d'un biofilm de *Candida albicans* [27].

I.2.3 Traitements

La capacité des *Candida albicans* à former des biofilms rend leur traitement très complexe. En effet, la composition de la matrice extracellulaire (ECM, pour extracellular matrix) leur confère un pouvoir résistant aux traitements antifongiques classiques à base d'azoles, de pyrimidine d'exhinocandines ou de polyenes comme l'amphotericine B [28].

D'ailleurs pour contourner cette résistance antifongique, le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques est nécessaire, sans pour autant écarter leur combinaison avec les molécules conventionnelles précitées. À titre d'exemples, le mélange d'extraits de propolis d'abeille à une concentration de 0,02 % (v/v) avec du fluconazole et du voriconazole a eu un effet synergétique significatif sur des biofilms de *Candida albicans* lors de tests *in-vitro* [29]. Aussi, la formulation de médicaments sous forme de liposomes contenant des traitements classiques tel que l'amphotericine B permettrait de réduire la toxicité cellulaire des agents fongiques [30]. De plus, plusieurs huiles essentielles (HE) ont fait l'objet d'études *in vitro* sur leur efficacité contre les *Candida albicans*, il s'est avéré que les HE de menthe, de sarriette des montagnes et d'origan avaient les meilleurs pouvoirs inhibitoires de la croissance des souches vaginales de *Candida albicans* testées, de l'ordre de 80% pour la menthe et de 100% pour la sarriette et l'origan [31]. En outre, des microsphères de chitosane contenant des huiles essentielles de citronnelle et de germanium ont inhibé la croissance de *Candida albicans* sous forme planctonique et de biofilms [32].

À titre préventif, la technique nommée « lock » permet d'éradiquer la formation de biofilms sur des instruments médicaux. Elle consiste à traiter la surface d'appareillages type cathéters avec des agents antimicrobiens, fongicides, voire de l'éthanol avant utilisation. Une autre

Chapitre I : Contexte de l'étude

stratégie convoitée permet l'anti-biofouling (le dépôt de biomatériaux) de manière intelligente *via* la modification de surface ab-initio du matériel clinique i.e avec du chitosane [33], des silanes [34] ou des nanomatériaux [35–37].

I.3 Méthodes de détection

La détection de pathogènes ou de phytopathogènes est une étape cruciale pour appliquer le bon traitement au bon moment. Ce paragraphe met en évidence des techniques de détection classiques (usuelles) et d'autres moins conventionnelles.

I.3.1 Techniques usuelles

I.3.1.1 Culture cellulaire

Indéniablement, il s'agit de la technique la plus ancienne et la plus simple, basée sur l'intégration d'un échantillon dans un milieu de culture, dans lequel les cellules se multiplient et peuvent par la suite être comptées sous microscope. Les inconvénients de cette méthode sont la sensibilité (les résultats faux négatifs générés) et le fait qu'elle requiert beaucoup de temps pour avoir le résultat final (environ 1 semaine) [50, 51].

I.3.1.2 PCR

La réaction en chaîne par polymérase (PCR) est la technique la plus répandue et la plus utilisée pour la détection pathogénique, elle peut être réalisée en temps-réel (rt-PCR), comme elle peut quantifier les organismes analysés (qPCR). Cette technique est basée sur l'amplification en très grand nombre de séquences d'ADN d'un pathogène de manière très spécifique, Beck et Ligon l'ont employée pour la première fois pour l'identification et l'isolation d'une séquence de l'ADN du *Zymoseptoria tritici* [38]. L'amplification leur a permis de produire un oligonucléotide de 345 paires de bases non-spécifiques d'après Guo *et al.*. Depuis, plusieurs études ont montré une grande spécificité [39–41], voire une forte sensibilité de 0,1 pg/ μ L [42] et de 50 fg/ μ L [43]. Un autre atout de la PCR est qu'elle permet de détecter des mutations génomiques. *A contrario*, ses inconvénients sont un coût élevé et une technique complexe qui demande du personnel qualifié [44].

I.3.1.3 ELISA

Tout comme la PCR, l'ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) est la deuxième technique à être la plus connue et la plus utilisée par les biologistes, notamment pour la détection de *phytofungus* [45]. Elle consiste en un diagnostic immunoenzymatique en immobilisant un anticorps pour détecter un antigène ou une enzyme et inversement selon une configuration sandwich (**Figure I. 6**), où l'analyte à détecter est piégé entre l'anticorps greffé et l'anticorps biomarqueur (*i.e.* avec un fluorophore) le tout sur support solide (microplaques 96 puits) [46]. Bien qu'elle présente l'avantage d'être peu compliquée et peu chère, cette technique fait appel à une modification de la sonde par des biomarqueurs, mais ne permet pas un suivi en temps-réel et ne peut pas être utilisée dans les champs.

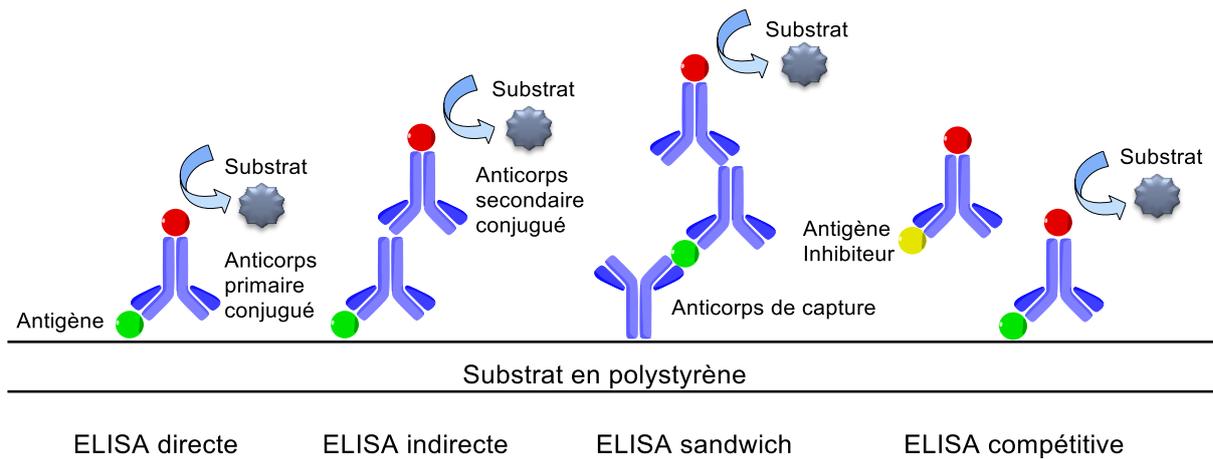


Figure I. 6 : Principe de fonctionnement du test ELISA.

I.3.2 Techniques non-conventionnelles

I.3.2.1 Imagerie

La détection de phytopathogènes par imagerie est une technique analytique innovante qui présente l'avantage d'être non-invasive, non-destructive, se fait directement sur le champ de culture et permet même une détection à distance [46, 47]. Le principe est simple: des images de la canopée en dehors du spectre visible sont collectées (i.e. spectrales, hyperspectrales, thermiques) ce qui permet d'observer des maladies au stade asymptomatique, La connaissance des mécanismes physiologiques de la plante infectée est indispensable, c'est pourquoi cette approche de détection n'est qu'au stade de preuve de concept [47]. Néanmoins, trois essais de détection du *Zymoseptoria tritici* par différentes techniques d'imagerie ont été réalisés sur site. La première par Wang *et al.* dans laquelle ils ont utilisé l'imagerie thermographique à infrarouge, une étude où il a été possible de détecter une augmentation de température pendant la phase asymptomatique liée directement à la contamination des plantations [48]. La deuxième étude, réalisée par Anderegg *et al.* en employant l'imagerie hyperspectrale-temporelle a permis de détecter la maladie selon la variation de la réflectance de la canopée, mais avec un manque de spécificité envers la maladie à certains moments [49]. La dernière étude menée par Bebronne *et al.* en champ sur des plantations au stade symptomatique, consiste en l'estimation du taux de leur atteinte par le *Zymoseptoria tritici*. Leurs résultats ont montré une précision de l'ordre de 81% [50].

I.3.2.2 Résonance plasmonique de surface

La résonance plasmonique de surface est une technique sans marquage ("label-free"), contrairement à d'autres techniques classiques (ELISA, PCR...), mettant en œuvre des interactions à base d'ADN, de protéines, d'aptamers... Cette technique ne demande que très peu de temps comparé aux techniques précitées et permet le suivi d'interactions moléculaires en temps réel ainsi que la quantification des interactions à de très faibles concentrations

Chapitre I : Contexte de l'étude

d'analytes, le nanomolaire a été reporté [51–53]. Etant au cœur de notre étude, nous en détaillerons son principe et son utilisation dans les chapitres suivants.

I.3.3 Statut sur la détection des pathogènes ciblés

I.3.3.1 *Zymoseptoria tritici*

Une étude unique rapporte la détection de l'ascomycète *Zymoseptoria tritici* par la technique ELISA. Sa détection n'a été possible qu'à partir de 8 jours avec une quantité non-significative [9, 43].

Zymoseptoria tritici a aussi pu être identifié à l'aide d'autres techniques d'analyse classiques lourdes tel que la chromatographie en phase liquide et la spectroscopie de masse [54] ou alors par le séquençage à haut débit (NGS, pour Next-Generation-Sequencing) [55].

À ce jour, aucune étude de détection du *Zymoseptoria tritici* par SPR n'a été rapportée.

I.3.3.2 *Candida albicans*

La détection et le mapping de ce pathogène se fait habituellement par des techniques de biologie moléculaire usuelles comme la PCR, l'ELISA (cf. §I.3.1.3.), le western-blot ou l'immunofluorescence par séquençage de l'ADN du génome pathogénique ou à l'aide d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux (**Tableau I. I**).

| Technique | Sonde | Limite de détection | Référence |
|------------------------|-------------------------|-----------------------------------|-----------|
| PCR | - | 10 UFC/mL | [56] |
| PCR-HRM | - | 0,1 UFC/mL | [57] |
| ELISA | Anticorps 5B2 et EB-CA1 | - | [58] |
| Fluorescence peptide | - | - | [59] |
| Spectroscopie de masse | - | $\sim 1,5 \cdot 10^5$ cellules/mL | [60] |
| SPR | IgG polyclonaux | 10^6 cellules/mL | [61] |
| SPR | Mannanes | 10^5 UFC/mL | [62] |
| LSPR | Anticorps IgG | 50 ng/mL | [63] |

Tableau I. I : Techniques de détection du *Candida albicans*.

Parmi les anticorps, on dénomme l'Anti-mannanes IgM 5B2 (Ig de type M) 5B2 connu aussi sous le nom d'*Anti-mannanes*. Les études menées par Trinel *et al.* [64] et Sendid *et al.* [65] montre que l'Anti-mannanes (IgM 5B2) présente une très bonne affinité vis-à-vis des mannanes (antigène-paratope) présents dans la matrice extracellulaire des *Candida albicans*, c'est pourquoi ils ont été choisis pour notre étude.

I.4 Biologie moléculaire

Dans cette étude, deux types d'interactions moléculaires seront utilisés: ss-ADN/ss-ADN et anticorps/antigène. Nous détaillons ici brièvement ces entités.

I.4.1 Acides nucléiques (ADN)

L'Acide DésoxyriboNucléique (ADN) (DNA en terminologie anglo-saxonne) est une macromolécule qui regroupe le patrimoine génétique de tout être vivant, il se voit attribuer le terme de « molécule de la vie ». L'ADN est présent au niveau des chromosomes d'un organisme vivant.

Structurellement, l'ADN se présente de manière naturelle sous forme d'une double hélice (dsDNA, pour double strand DNA) composée de deux monobrin (ssDNA, pour single strand DNA) liés par des ponts hydrogène (liaisons hydrogène), chaque monobrin d'ADN est constitué d'une chaîne d'unités nommées nucléotides liés dans le sens « 5' à 3' » et formés de trois entités distinctes, à savoir, un cycle ribose/désoxyribose, un triphosphate et une base nucléoside. Il existe quatre bases complémentaires qui se lient comme suit : Adénine (A) avec Thymine (T) et Guanine (G) avec Cytosine (C), leur complémentarité est réciproque. On parle dès lors, de pair de bases (bp) (**Figure I. 7**). L'accroche de deux monobrin complémentaires s'appelle l'hybridation ou bien l'appariement.

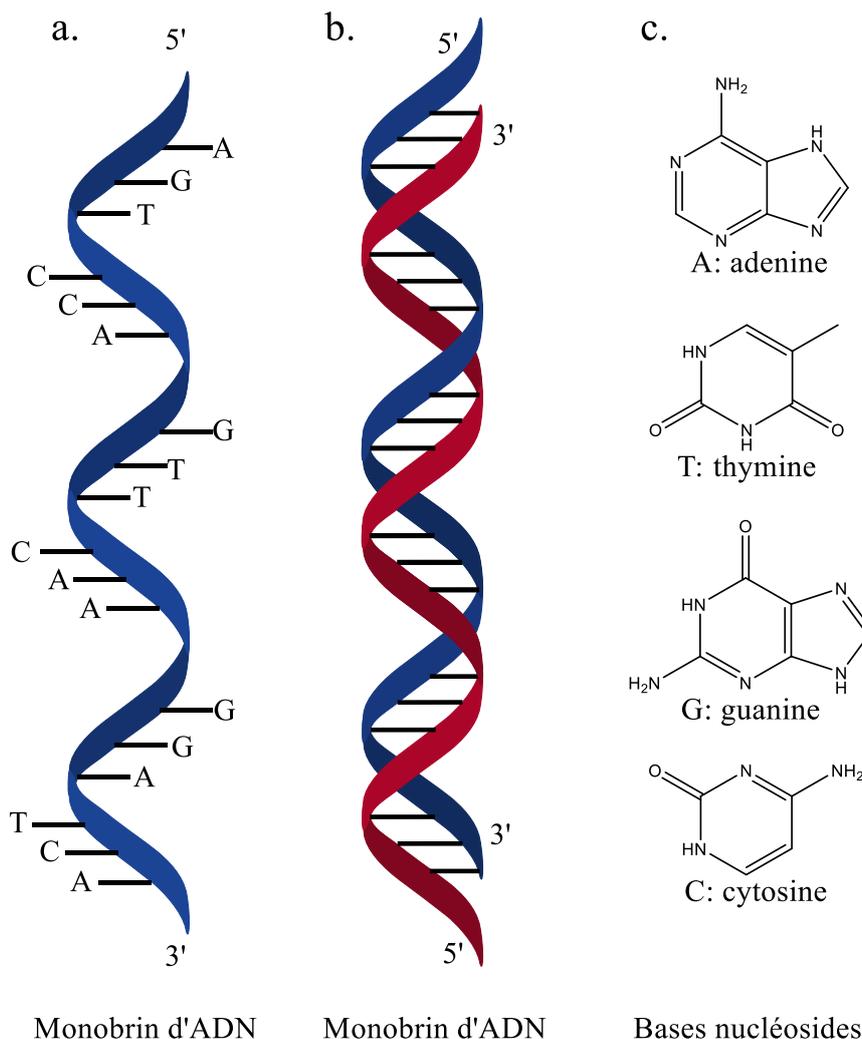


Figure I. 7 : a. structure en hélice d'un monobrin d'ADN b. structure en double hélice d'un ADN et c. bases nucléosides formant l'ADN.

1.4.2 Interactions anticorps-antigènes

Les anticorps (Ac ou Immunoglobulines (Ig)) sont des glycoprotéines formées essentiellement d'acides aminés, ils servent de récepteurs d'antigènes Ag à la surface des lymphocytes B et sont sécrétés naturellement dans le corps suite à une réponse immunitaire [66]. Il existe cinq isotopes d'immunoglobulines : IgG, IgA, Anti-mannanes (IgM 5B2) (**Figure I. 8**), IgD et IgE et chacun possède une particularité structurale et fonctionnelle.

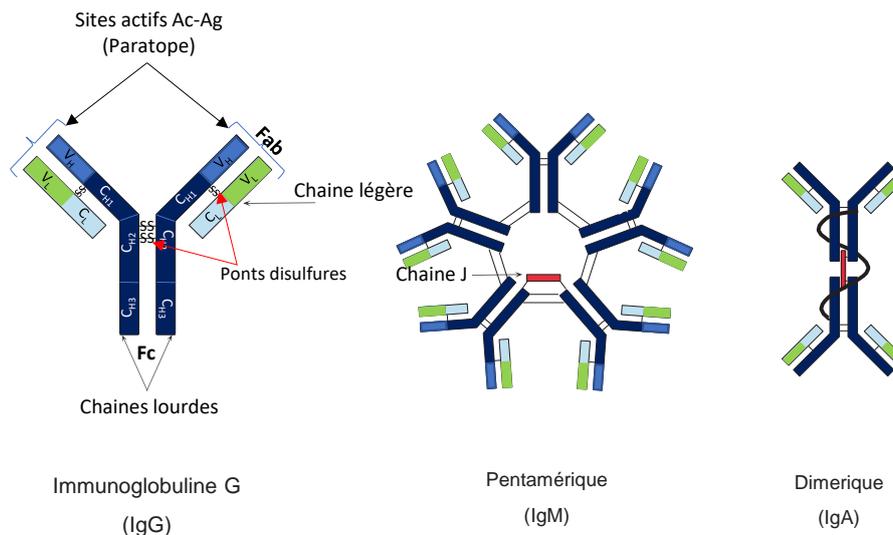


Figure I. 8 : Structures d'anticorps IgG, Anti-mannanes (IgM 5B2) et IgA, adaptées d'après [67].

Un anticorps est constitué de quatre chaînes protéiniques, deux chaînes légères identiques et deux chaînes lourdes identiques qui sont dotées de portions variables et constantes liées par des ponts disulfures [68], d'autres types d'interactions non-covalentes sont présentes et donnent à l'anticorps sa forme en Y [69]. La chaîne légère consiste en un domaine variable (V_L, pour Variable light) et un autre constant (C_L, pour Constant light), alors que la chaîne lourde comprend un domaine variable (V_H, pour Variable heavy) et trois autres constants (C_{H1}, C_{H2}, C_{H3}) [69].

Un monomère d'Ac de forme Y dont la masse moléculaire est de ~150 kDa est fragmenté en deux, un fragment Fc (fragment cristallisable) issu de l'association des domaines C_{H2}-C_{H3} et d'un fragment Fab (Fragment antigène binding ou Fragment antibody), appelé aussi paratope formé par l'association V_H-V_L [68].

Les antigènes (Ag) sont des complexes de macromolécules de masse supérieure à 1 kDa [70] qui existent sous forme de protéines, glycoprotéines, polysaccharides et d'autres formes conjuguées à de l'ADN ou ARN. Ils contiennent des sites antigéniques nommés haptènes ou épitopes et qui sont complémentaires de manière spécifique avec les paratopes des anticorps lors des interactions/reconnaitances biologiques [71], il s'agit de l'affinité ou de sélectivité.

Tous les anticorps, de toutes classes, peuvent être polyclonaux ou monoclonaux. Un anticorps est dit polyclonal (PAC) lorsqu'il possède des paratopes qui peuvent reconnaître

plusieurs épitopes antigéniques. À contrario, un anticorps monoclonal (MAc) contient des paratopes ayant une affinité uniquement avec un épitope antigénique précis [72].

Le choix de l'un ou l'autre dépend principalement de l'application visée. Pour la fabrication de biocapteurs, il est préférable d'utiliser un MAc. En effet, même si son coût de fabrication est plus élevé que celui d'un PAc, l'anticorps monoclonal présente quelques avantages dont le plus important est sa monospécificité qui est un point déterminant dans le domaine de l'immunodétection [87, 88].

I.5 Biocapteurs

Le terme biocapteur désigne tout dispositif analytique, qui peut être d'origine électrochimique, physique ou optique et permettant de détecter un ou plusieurs éléments biologiques ciblés. Il est constitué d'un biorécepteur et d'un transducteur [89, 90].

I.5.1 Le biorécepteur

Le biorécepteur est la partie biochimique d'un biocapteur, il s'agit de molécules chimiques ou biologiques dites *sondes* de type ADN [73], anticorps [93, 94], aptamère [74] ou enzyme qui reconnaissent et interagissent avec la molécule analyte (cible d'intérêt) de manière spécifique *via* des sites actifs nommés ligands. Dans l'architecture commune d'un biocapteur, le biorécepteur est situé à la surface ou à l'interface d'un matériau inerte, donc biocompatible et qui fait partie intégrante du transducteur [75].

En prenant l'exemple d'un immunocapteur (Immunoglobuline capteur) que l'on détaillera plus loin dans ce manuscrit, la sonde anticorps est immobilisée à la surface du transducteur et s'apparie avec son complément analyte de type antigène une fois mis en réaction [76].

I.5.2 Le transducteur

Le transducteur est un composant électronique clé dans la structure d'un biocapteur, qui peut être de nature acoustique, chimique ou optique. La fonction d'un transducteur est de traduire/convertir l'interaction biologique en un signal lisible et interprétable, de l'analyser et de l'enregistrer (*Figure I. 9*).

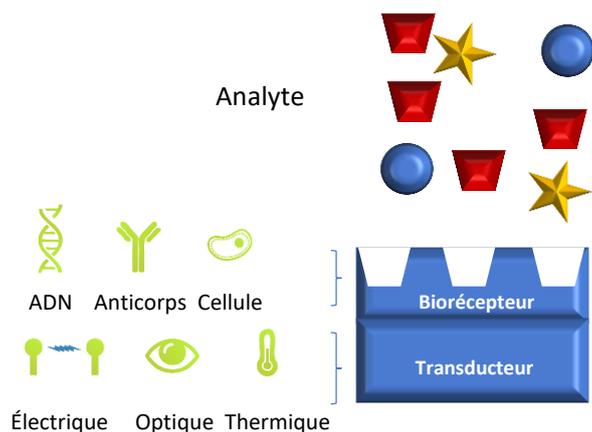


Figure I. 9 : Schéma descriptif d'un biocapteur.

Le type de transducteur est choisi en fonction de la nature, des propriétés des molécules biologiques, mais aussi de l'application visée [75]. Lors de notre étude nous avons développé des capteurs à résonance plasmonique de surface classés dans la catégorie des capteurs optiques, leur classification dépend de la nature du transducteur [77–80].

I.5.3 Développement des biocapteurs

Le concept du biocapteur tel que nous le connaissons aujourd'hui a été longtemps mal-compris. En effet, avant l'apparition du premier biocapteur développé par Leland Clark entre 1956 et 1962 [81], qui permettait de mesurer le taux d'oxygène dans le sang sur une électrode de platine, tous les outils tels que le pH-mètre ou le thermomètre pouvaient être considérés comme des biocapteurs. Ensuite, au cours des années 1970, les chercheurs se sont mis au développement de capteurs à base d'électrodes sélectives d'ions et depuis l'introduction du terme "biocapteur" par Karl Camman [81], l'application des capteurs à des éléments non-électrochimiques et non-ioniques intéressait d'avantage la communauté scientifique. D'ailleurs l'enjeu était de parvenir à trouver la bonne combinaison entre les biorécepteurs (enzymes, bactéries...) et le type de transducteur. Cette même décennie (70-80) a enregistré la première commercialisation d'un glucomètre [82–84] ainsi que le premier immunocapteur intégrant un microbe comme bioélément [85]. Il s'en est suivi en 1982 le premier biocapteur à base de fibre optique pour la détection de l'oxygène et du dioxyde de carbone [86], puis en 1984 de la fabrication du premier biocapteur ampérométrique et la commercialisation du premier capteur SPR suivi de la miniaturisation du biocapteur portable i-STAT [87]. De plus, afin de mieux maîtriser les interactions biologiques et d'en assurer leur reproductibilité, les systèmes microfluidiques ont parallèlement vu le jour pendant les années 1980-1990, grâce à l'avancée technologique apportée par la photolithographie [88]. Au début des années 2000, le procédé de lithographie LIGA (de l'allemand Lithographie, Galvanoformung Abformung) qui permet de produire facilement un moule permettant la production "en masse" de systèmes microfluidiques [89] a propulsé les outils de diagnostic (point-of-care), notamment des Lab-On-Chips et des μ TAS (micro Total Analysis System) sur le devant de la scène. Les analyses s'effectuaient sur des instruments lourds et n'avaient lieu qu'au niveau du laboratoire. Certes,

c'est toujours le cas mais en plus compact et dans certains cas ces dispositifs analytiques tiennent dans une poche. D'ailleurs, aujourd'hui on tend plutôt à rendre ces appareils plus performants par le biais de la fonctionnalisation de surface.

I.5.4 Types de biocapteurs

Plusieurs types de biocapteurs sont aujourd'hui développés afin de détecter, d'analyser et de caractériser des interactions biomoléculaires. Les principales catégories sont classées dans le **Tableau I. II** suivant la nature du transducteur.

| Principe | Transducteur | Méthode de détection | Exemple |
|-----------------|------------------------|--|---|
| Électrochimique | Ampérométrie | Détection des déplacements électroniques lors d'une réaction d'oxydoréduction | Glucose [104, 105] |
| | Potentiométrie | Détection des changements dans la distribution de charges responsables d'un potentiel électrique | <i>Candida albicans</i> [90] |
| | Conductimétrie | Détection d'un changement de conductivité dans le milieu | Bactéries [91] |
| Thermique | Calorimétrie | Détection de la chaleur dégagée lors d'une réaction | Urée, glucose et peroxyde [92] |
| Optique | SPR | Détection du déplacement plasmonique sous forme de variation angulaire de la lumière réfléchie ou d'un déplacement du spectre lumineux absorbé | Allergènes [93] Hépatite B [94] Dengue [95] ADN [96] |
| | Chimi/bio-luminescence | Détection du changement d'intensité de la lumière émise par le système. | Thrombine [97] Benzimidazoles [98] |
| Acoustique | Piézoélectrique | Détection des effets induits par la masse des réactifs ou produits | Vapeurs d'amines [99] B-caryophyllène [100] |

Tableau I. II : Classification des biocapteurs selon la nature du transducteur (adapté de [101]).

Chapitre I : Contexte de l'étude

I.5.5 Applications

Les biocapteurs ont fortement évolué grâce aux avancements technologiques observés durant les trois dernières décennies et ils sont actuellement utilisés et appliqués à divers domaines [102]. De plus, leur fiabilité et leur précision répondent aux exigences sanitaires et sécuritaires. De ce fait, on rencontre des biocapteurs dans les secteurs de l'environnement [103], l'industrie, la sécurité [104], mais surtout dans l'agroalimentaire [94, 128] et la santé/le biomédical [129, 130].

L'aspect miniaturisé de certains biocapteurs leur confère l'avantage d'utiliser de petits volumes d'échantillons biologiques [105] et d'être intégrés dans des systèmes compacts afin de les utiliser *in-situ*, comme en aérospatial [106].

I.6 Conclusion

Comme il a été montré dans ce chapitre, les pathogènes d'origine fongiques nuisent aux plantes et à l'être-humain et causent à la fois des dégâts écologiques, médicaux et économiques. De plus, les traitements utilisés à ce jour sont limités car ces maladies sont de plus en plus résistantes.

De ce fait, la détection préventive de ces maladies est un facteur clé pour les contrer et le développement de biocapteurs à base de résonance plasmonique est une des solutions possibles.

Le prochain chapitre, introduira l'utilisation de la résonance plasmonique de surface (SPR) pour la biodétection pathogénique.

Références

- [1] S. Uthayakumaran et C. Wrigley, « Chapter 5 - Wheat: Grain-Quality Characteristics and Management of Quality Requirements », dans *Cereal Grains (Second Edition)*, C. Wrigley, I. Batey, et D. Miskelly, Éd. Woodhead Publishing, 2017, p. 91-134. doi: 10.1016/B978-0-08-100719-8.00005-X.
- [2] C. Wrigley, « The World of Food Grains », p. 1956.
- [3] H. Le Stum, *Le blé*. Editions France Agricole, 2017. [En ligne]. Disponible sur: <http://www.scholarvox.com/catalog/book/docid/88839614>
- [4] B. T. Oleson, « World wheat production, utilization and trade », dans *Wheat: Production, Properties and Quality*, W. Bushuk et V. F. Rasper, Éd. Springer US, 1994, p. 1-11. doi: 10.1007/978-1-4615-2672-8_1.
- [5] « Wheat Exports by Country », *World's Top Exports*, 5 juillet 2020. <http://www.worldstopexports.com/wheat-exports-country/>
- [6] « 2019 United States Agricultural Export Yearbook | USDA Foreign Agricultural Service ». <https://www.fas.usda.gov/sites/default/files/2020-07/2019-export-yearbook.pdf>
- [7] J. D. Sherman et L. E. Talbert, « Vernalization-induced changes of the DNA methylation pattern dans winter wheat », *Genome*, vol. 45, n° 2, p. 253-260, 2002, doi: 10.1139/g01-147.
- [8] J. C. Forbes, J. C. Forbes, et D. Watson, *Plants dans Agriculture*. Cambridge University Press, 1992.
- [9] R. Corbaz, *Principes de phytopathologie et de lutte contre les maladies des plantes*. PPUR presses polytechniques, 1990.
- [10] S. Mejri, « Efficacités et modes d'action de nouveaux simulateurs de défenses des plantes sur le pathosystème blé-*Zymoseptoria tritici* », p. 209, 2018, doi: HAL Id : tel-02001770.
- [11] J. M. Prescott *et al.*, *Wheat diseases and pests: a guide for field identification*. CIMMYT, 1986. [En ligne]. Disponible sur: <https://repository.cimmyt.org/handle/10883/3215>
- [12] A. Serfling, D. Kopahnke, A. Habekuss, F. Novakazi, F. Ordon, et J. Kühn-Institute, « Wheat diseases: an overview », p. 33, 2016.
- [13] Z. Eyal et International Maize and Wheat Improvement Center, Éd., *The Septoria diseases of wheat: concepts and methods of disease management*. Mexico, D.F: CIMMYT, 1987.
- [14] F. Collin, « The tolerance of wheat (*Triticum aestivum* L.) to *Septoria tritici* blotch », p. 282, 2017, doi: HAL Id: tel-02443529.
- [15] C. J. Brennan, H. R. Benbow, E. Mullins, et F. M. Doohan, « A review of the known unknowns dans the early stages of septoria tritici blotch disease of wheat », *Plant Pathology*, vol. 68, n° 8, p. 1427-1438, 2019, doi: <https://doi.org/10.1111/ppa.13077>.
- [16] A. Sánchez-Vallet, M. C. McDonald, P. S. Solomon, et B. A. McDonald, « Is *Zymoseptoria tritici* a hemibiotroph? », *Fungal Genetics and Biology*, vol. 79, p. 29-32, 2015, doi: 10.1016/j.fgb.2015.04.001.

Chapitre I : Contexte de l'étude

- [17] S. J. Bearchell, B. A. Fraaije, M. W. Shaw, et B. D. L. Fitt, « Wheat archive links long-term fungal pathogen population dynamics to air pollution », *PNAS*, vol. 102, n° 15, p. 5438-5442, 2005, doi: 10.1073/pnas.0501596102.
- [18] L. Eriksen, M. W. Shaw, et H. Østergård, « A Model of the Effect of Pseudothecia on Genetic Recombination and Epidemic Development dans Populations of *Mycosphaerella graminicola* », *Phytopathology*®, vol. 91, n° 3, p. 240-248, 2001, doi: 10.1094/PHYTO.2001.91.3.240.
- [19] T. Vidal, « Intérêt de la diversité architecturale des plantes cultivées pour limiter la progression épidémique de maladies foliaires à dispersion pluviale: cas de la septoriose au sein d'associations variétales de blé », p. 167, 2017, doi: HAL Id: tel-01917890.
- [20] S. F. F. Torriani, J. P. E. Melichar, C. Mills, N. Pain, H. Sierotzki, et M. Courbot, « *Zymoseptoria tritici*: A major threat to wheat production, integrated approaches to control », *Fungal Genetics and Biology*, vol. 79, p. 8-12, 2015, doi: 10.1016/j.fgb.2015.04.010.
- [21] H. Fones, « The impact of Septoria tritici Blotch disease on wheat: An EU perspective », *Fungal Genetics and Biology*, p. 5, 2015, doi: 10.1016/j.fgb.2015.04.004.
- [22] S. Mejri *et al.*, « Biocontrol of the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* using cyclic lipopeptides from *Bacillus subtilis* », *Environ Sci Pollut Res*, vol. 25, n° 30, p. 29822-29833, oct. 2018, doi: 10.1007/s11356-017-9241-9.
- [23] G. Le Mire, A. Siah, M.-N. Brisset, M. Gaucher, M. Deleu, et M. H. Jijakli, « Surfactin Protects Wheat against *Zymoseptoria tritici* and Activates Both Salicylic Acid- and Jasmonic Acid-Dependent Defense Responses », *Agriculture*, vol. 8, n° 1, Art. n° 1, 2018, doi: 10.3390/agriculture8010011.
- [24] J. C. Cailliez et D. Poulain, « Analyse cytologique de l'expression d'un épitope porté par les glycoprotéines excrétées par *Candida albicans* », *Annales de l'Institut Pasteur / Microbiologie*, vol. 139, n° 2, p. 171-188, 1988, doi: 10.1016/0769-2609(88)90003-8.
- [25] N. Yapar, « Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis », *Ther Clin Risk Manag*, vol. 10, p. 95-105, févr. 2014, doi: 10.2147/TCRM.S40160.
- [26] C. G. Pierce *et al.*, « The *Candida albicans* Biofilm Matrix: Composition, Structure and Function », *J Fungi (Basel)*, vol. 3, n° 1, 2017, doi: 10.3390/jof3010014.
- [27] M. B. Lohse, M. Gulati, A. D. Johnson, et C. J. Nobile, « Development and regulation of single- and multi-species *Candida albicans* biofilms », *Nature Reviews Microbiology*, vol. 16, n° 1, p. 19-31, 2018, doi: 10.1038/nrmicro.2017.107.
- [28] S. Costa-de-Oliveira et A. G. Rodrigues, « *Candida albicans* Antifungal Resistance and Tolerance dans Bloodstream Infections: The Triad Yeast-Host-Antifungal », *Microorganisms*, vol. 8, n° 2, 2020, doi: 10.3390/microorganisms8020154.
- [29] K. Gucwa, B. Kusznierevicz, S. Milewski, P. Van Dijck, et P. Szweda, « Antifungal Activity and Synergism with Azoles of Polish Propolis », *Pathogens*, vol. 7, n° 2, 2018, doi: 10.3390/pathogens7020056.

- [30] M. Henriques et D. Williams, « Pathogenesis and Virulence of *Candida albicans* and *Candida glabrata* », *Pathogens*, vol. 9, n° 9, Art. n° 9, 2020, doi: 10.3390/pathogens9090752.
- [31] E. Bona *et al.*, « Sensitivity of *Candida albicans* to essential oils: are they an alternative to antifungal agents? », *Journal of Applied Microbiology*, vol. 121, n° 6, p. 1530-1545, 2016, doi: <https://doi.org/10.1111/jam.13282>.
- [32] L. G. S. Garcia *et al.*, « Essential oils encapsulated dans chitosan microparticles against *Candida albicans* biofilms », *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 166, p. 621-632, 2021, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.10.220.
- [33] A. Silva-Dias *et al.*, « Anti-biofilm activity of low-molecular weight chitosan hydrogel against *Candida* species », *Med Microbiol Immunol*, vol. 203, n° 1, p. 25-33, 2014, doi: 10.1007/s00430-013-0311-4.
- [34] N. Villard, C. Seneviratne, J. K. H. Tsoi, M. Heinonen, et J. Matinlinna, « *Candida albicans* aspects of novel silane system-coated titanium and zirconia implant surfaces », *Clinical Oral Implants Research*, vol. 26, n° 3, p. 332-341, 2015, doi: <https://doi.org/10.1111/clr.12338>.
- [35] M. Cavalheiro et M. C. Teixeira, « *Candida* Biofilms: Threats, Challenges, and Promising Strategies », *Front Med (Lausanne)*, vol. 5, févr. 2018, doi: 10.3389/fmed.2018.00028.
- [36] V. Humblot et C.-M. Pradier, « Adsorption of Proteins and Anti-biofilm Strategies », dans *Surface and Interface Science*, John Wiley & Sons, Ltd, 2020, p. 197-227. doi: 10.1002/9783527680597.ch51.
- [37] J. Landoulsi, K. E. Cooksey, et V. Dupres, « Review – Interactions between diatoms and stainless steel: focus on biofouling and biocorrosion », *Biofouling*, vol. 27, n° 10, p. 1105-1124, 2011, doi: 10.1080/08927014.2011.629043.
- [38] J. Beck, « Polymerase Chain Reaction Assays for the Detection of *Stagonospora nodorum* and *Septoria tritici* dans Wheat », *Phytopathology*, vol. 85, n° 3, p. 319, 1995, doi: 10.1094/Phyto-85-319.
- [39] V. F. Consolo, C. Albani, C. Berón, G. Salerno, et C. Cordo, « A conventional PCR technique to detect *Septoria tritici* dans wheat seeds », *Australasian Plant Pathology*, vol. 38, p. 222-227, 2009, doi: 10.1071/AP08099.
- [40] A. Kuzdraliński *et al.*, « Novel Primer Sets for Rapid Detection of *Zymoseptoria tritici* dans Wheat », *Plant Disease*, 2020, doi: 10.1094/PDIS-02-20-0318-SC.
- [41] A. Rahman, F. Doohan, et E. Mullins, « Quantification of dans Planta *Zymoseptoria tritici* Progression Through Different Infection Phases and Related Association with Components of Aggressiveness », *Phytopathology*[®], vol. 110, n° 6, p. 1208-1215, 2020, doi: 10.1094/PHYTO-09-19-0339-R.
- [42] J.-R. Guo, F. Schnieder, et J.-A. Verreet, « Presymptomatic and quantitative detection of *Mycosphaerella graminicola* development dans wheat using a real-time PCR assay », *FEMS Microbiology Letters*, vol. 262, n° 2, p. 223-229, 2006, doi: 10.1111/j.1574-6968.2006.00393.x.

Chapitre I : Contexte de l'étude

- [43] K. Abd-Elsalam, A. H. Bahkali, M. Moslem, P. J. G. M. De Wit, et J.-A. Verreet, « Detection of *Mycosphaerella graminicola* dans Wheat Leaves by a Microsatellite Dinucleotide Specific-Primer », *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 12, n° 1, Art. n° 1, 2011, doi: 10.3390/ijms12010682.
- [44] K. Kivirand et T. Rinke, « Introductory Chapter: Why Do We Need Rapid Detection of Pathogens? », dans *Biosensing Technologies for the Detection of Pathogens - A Prospective Way for Rapid Analysis*, T. Rinke et K. Kivirand, Éd. InTech, 2018. doi: 10.5772/intechopen.74670.
- [45] B. Tsedaley, « A Review on Disease Detection, Pathogen Identification and Population Genetics dans Fungi », *Journal of Biology*, p. 16, 2015.
- [46] D. Wild, *The Immunoassay Handbook : Theory and applications of ligand binding, ELISA and related techniques Ed. 4*. Elsevier Science, 2013. [En ligne]. Disponible sur: <http://univ.scholarvox.com/catalog/book/docid/88811985>
- [47] A. M. Mutka et R. S. Bart, « Image-based phenotyping of plant disease symptoms », *Front. Plant Sci.*, vol. 5, 2015, doi: 10.3389/fpls.2014.00734.
- [48] Y. Wang, S. Zia-Khan, S. Owusu-Adu, T. Miedaner, et J. Müller, « Early Detection of *Zymoseptoria tritici* dans Winter Wheat by Infrared Thermography », *Agriculture*, vol. 9, n° 7, Art. n° 7, 2019, doi: 10.3390/agriculture9070139.
- [49] J. Anderegg, A. Hund, P. Karisto, et A. Mikaberidze, « In-Field Detection and Quantification of Septoria Tritici Blotch dans Diverse Wheat Germplasm Using Spectral–Temporal Features », *Front. Plant Sci.*, vol. 10, 2019, doi: 10.3389/fpls.2019.01355.
- [50] R. Bebronne *et al.*, « In-field proximal sensing of septoria tritici blotch, stripe rust and brown rust dans winter wheat by means of reflectance and textural features from multispectral imagery », *Biosystems Engineering*, vol. 197, p. 257-269, 2020, doi: 10.1016/j.biosystemseng.2020.06.011.
- [51] H. Šípová et J. Homola, « Surface plasmon resonance sensing of nucleic acids: A review », *Analytica Chimica Acta*, vol. 773, p. 9-23, 2013, doi: 10.1016/j.aca.2012.12.040.
- [52] H. Vaisocherová, V. M. Faca, A. D. Taylor, S. Hanash, et S. Jiang, « Comparative study of SPR and ELISA methods based on analysis of CD166/ALCAM levels dans cancer and control human sera », *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 24, n° 7, p. 2143-2148, 2009, doi: 10.1016/j.bios.2008.11.015.
- [53] N. H. Mustafa, « Comparison of Surface-Plasmon-Resonance Biosensor Measurements and Western Blot Assay for Detection of GPE- Strain of Classical Swine Fever Virus by Using WH211 and WH303 Monoclonal Antibodies », *Viral Mycol*, vol. 03, n° 03, 2014, doi: 10.4172/2161-0517.1000134.
- [54] S. Ben M'Barek *et al.*, « FPLC and liquid-chromatography mass spectrometry identify candidate necrosis-inducing proteins from culture filtrates of the fungal wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* », *Fungal Genetics and Biology*, vol. 79, p. 54-62, 2015, doi: 10.1016/j.fgb.2015.03.015.
- [55] M. C. McDonald, A. H. Williams, A. Milgate, J. A. Pattemore, P. S. Solomon, et J. K. Hane, « Next-generation re-sequencing as a tool for rapid bioinformatic screening of presence

- and absence of genes and accessory chromosomes across isolates of *Zyloseptoria tritici* », *Fungal Genetics and Biology*, vol. 79, p. 71-75, 2015, doi: 10.1016/j.fgb.2015.04.012.
- [56] C. L. Taira, T. S. Okay, A. F. Delgado, M. E. J. R. Ceccon, M. T. G. de Almeida, et G. M. B. Del Negro, « A multiplex nested PCR for the detection and identification of *Candida* species dans blood samples of critically ill paediatric patients », *BMC Infect Dis*, vol. 14, n° 1, p. 406, 2014, doi: 10.1186/1471-2334-14-406.
- [57] P. Goldschmidt *et al.*, « New Strategy for Rapid Diagnosis and Characterization of Fungal Infections: The Example of Corneal Scrapings », *PLOS ONE*, vol. 7, n° 7, p. e37660, 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0037660.
- [58] B. Sendid *et al.*, « Increased Sensitivity of Mannanemia Detection Tests by Joint Detection of - and -Linked Oligomannosides during Experimental and Human Systemic Candidiasis », *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 42, n° 1, p. 164-171, 2004, doi: 10.1128/JCM.42.1.164-171.2004.
- [59] W. Aoki *et al.*, « Detection of *Candida albicans* by using a designed fluorescence-quenched peptide », *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 116, n° 5, p. 573-575, 2013, doi: 10.1016/j.jbiosc.2013.05.003.
- [60] S. Zehm, S. Schweinitz, R. Würzner, H. P. Colvin, et J. Rieder, « Detection of *Candida albicans* by Mass Spectrometric Fingerprinting », *Curr Microbiol*, vol. 64, n° 3, p. 271-275, 2012, doi: 10.1007/s00284-011-0064-5.
- [61] S. Yodmongkol *et al.*, « Application of surface plasmon resonance biosensor for the detection of *Candida albicans* », *Jpn. J. Appl. Phys.*, vol. 55, n° 2S, p. 02BE03, 2015, doi: 10.7567/JJAP.55.02BE03.
- [62] S. Damians *et al.*, « Characterization of the recognition of *Candida* species by mannose-binding lectin using surface plasmon resonance », *Analyst*, vol. 138, n° 8, p. 2477, 2013, doi: 10.1039/c3an36670g.
- [63] W. W. Neves *et al.*, « Development of a localized surface plasmon resonance platform for *Candida albicans* antigen identification », dans *2015 SBMO/IEEE MTT-S International Microwave and Optoelectronics Conference (IMOC)*, 2015, p. 1-4. doi: 10.1109/IMOC.2015.7369224.
- [64] P. A. Trinel, C. Faille, P. M. Jacquinet, J. C. Cailliez, et D. Poulain, « Mapping of *Candida albicans* oligomannosidic epitopes by using monoclonal antibodies. », *Infect Immun*, vol. 60, n° 9, p. 3845-3851, 1992.
- [65] B. Sendid *et al.*, « Dissection of the anti-*Candida albicans* mannan immune response using synthetic oligomannosides reveals unique properties of β -1,2 mannotriose protective epitopes », *Sci Rep*, vol. 11, n° 1, p. 10825, 2021, doi: 10.1038/s41598-021-90402-4.
- [66] W. Hoffman, F. G. Lakkis, et G. Chalasani, « B Cells, Antibodies, and More », *CJASN*, vol. 11, n° 1, p. 137-154, 2016, doi: 10.2215/CJN.09430915.
- [67] G. T. Hermanson, « Antibody Modification and Conjugation », dans *Bioconjugate Techniques (Third Edition)*, G. T. Hermanson, Éd. Boston: Academic Press, 2013, p. 867-920. doi: 10.1016/B978-0-12-382239-0.00020-0.

Chapitre I : Contexte de l'étude

- [68] A. Chevailler, F. Batteux, O. Garraud, Y. Renaudineau, et L. Vallat, « Les immunoglobulines : structure et fonctions », dans *Immunologie fondamentale et immunopathologie*, Elsevier Masson., 2018, p. 112-118.
- [69] A. C. Marques, P. J. Costa, S. Velho, et M. H. Amaral, « Functionalizing nanoparticles with cancer-targeting antibodies: A comparison of strategies », *Journal of Controlled Release*, vol. 320, p. 180-200, 2020, doi: 10.1016/j.jconrel.2020.01.035.
- [70] E. Galopin, « Adressage par microfluidique digitale : application à la détection de marqueurs biologiques par plasmon de surface et détection intégrée », These de doctorat, Lille 1, 2007. [En ligne]. Disponible sur: <http://theses.fr/2007LIL10100>
- [71] G. T. Hermanson, « Vaccines and Immunogen Conjugates », dans *Bioconjugate Techniques*, Elsevier, 2013, p. 839-865. doi: 10.1016/B978-0-12-382239-0.00019-4.
- [72] N. S. Lipman, L. R. Jackson, L. J. Trudel, et F. Weis-Garcia, « Monoclonal Versus Polyclonal Antibodies: Distinguishing Characteristics, Applications, and Information Resources », *ILAR Journal*, vol. 46, n° 3, p. 258-268, 2005, doi: 10.1093/ilar.46.3.258.
- [73] G. Bhatt et S. Bhattacharya, « DNA-Based Sensors », dans *Environmental, Chemical and Medical Sensors*, S. Bhattacharya, A. K. Agarwal, N. Chanda, A. Pandey, et A. K. Sen, Éd. Singapore: Springer, 2018, p. 343-370. doi: 10.1007/978-981-10-7751-7_15.
- [74] K. Sergelen, B. Liedberg, W. Knoll, et J. Dostálek, « A surface plasmon field-enhanced fluorescence reversible split aptamer biosensor », *Analyst*, vol. 142, n° 16, p. 2995-3001, 2017, doi: 10.1039/C7AN00970D.
- [75] R. Béland, « Développement d'un biocapteur couplant la résonance des plasmons de surface et la microcalorimétrie pour le suivi des interactions moléculaires à l'interface liquide/solide », These de doctorat, Ecole centrale de Lyon, 2013. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.theses.fr/2013ECDL0040>
- [76] S. A. Lim et M. U. Ahmed, « CHAPTER 1 Introduction to Immunosensors », dans *Immunosensors*, Royal Society of Chemistry, 2019, p. 1-20. doi: 10.1039/9781788016162-00001.
- [77] E. Korotkaya, « Biosensors: Design, Classification, and Applications dans the Food Industry », *Foods and Raw Materials*, vol. 2, p. 161-171, 2014, doi: 10.12737/5476.
- [78] R. Monošík, M. Stredánský, et E. Šturdík, « Biosensors - classification, characterization and new trends », *Acta Chimica Slovaca*, vol. 5, n° 1, p. 109-120, 2012, doi: 10.2478/v10188-012-0017-z.
- [79] Y.-T. Chen *et al.*, « Review of Integrated Optical Biosensors for Point-of-Care Applications », *Biosensors*, vol. 10, n° 12, p. 209, 2020, doi: 10.3390/bios10120209.
- [80] C. Chen et J. Wang, « Optical biosensors: an exhaustive and comprehensive review », *Analyst*, vol. 145, n° 5, p. 1605-1628, 2020, doi: 10.1039/C9AN01998G.
- [81] R. Renneberg *et al.*, « Frieder Scheller and the Short History of Biosensors », dans *Biosensing for the 21st Century*, R. Renneberg et F. Lisdat, Éd. Berlin, Heidelberg: Springer, 2008, p. 1-18. doi: 10.1007/10_2007_086.

- [82] A. H. Clemens, P. H. Chang, et R. W. Myers, « Development of an automatic system of insulin infusion controlled by blood sugar, its system for the determination of glucose and control algorithms », *Journ Annu Diabetol Hotel Dieu*, p. 269-278, 1976.
- [83] A. H. Clemens, P. H. Chang, et R. W. Myers, « The development of Biostator, a Glucose Controlled Insulin Infusion System (GCIIS) », *Horm Metab Res*, vol. Suppl 7, p. 23-33, 1977.
- [84] M. Mascini, « A Brief Story of Biosensor Technology », dans *Biotechnological Applications of Photosynthetic Proteins: Biochips, Biosensors and Biodevices*, M. T. Giardi et E. V. Piletska, Éd. Boston, MA: Springer US, 2006, p. 4-10. doi: 10.1007/978-0-387-36672-2_2.
- [85] S. Suzuki, F. Takahashi, I. Satoh, et N. Sonobe, « Ethanol and Lactic Acid Sensors Using Electrodes Coated with Dehydrogenase—Collagen Membranes », *BCSJ*, vol. 48, n° 11, p. 3246-3249, 1975, doi: 10.1246/bcsj.48.3246.
- [86] S. Mansouri et J. S. Schultz, « A Miniature Optical Glucose Sensor Based on Affinity Binding », *Nat Biotechnol*, vol. 2, n° 10, p. 885-890, 1984, doi: 10.1038/nbt1084-885.
- [87] N. Bhalla, P. Jolly, N. Formisano, et P. Estrela, « Introduction to biosensors », *Essays Biochem*, vol. 60, n° 1, p. 1-8, 2016, doi: 10.1042/EBC20150001.
- [88] M. D. Shelley, *Microfluidic Techniques*, vol. 321. New Jersey: Humana Press, 2005. doi: 10.1385/1592599974.
- [89] N. Convery et N. Gadegaard, « 30 years of microfluidics », *Micro and Nano Engineering*, vol. 2, p. 76-91, 2019, doi: 10.1016/j.mne.2019.01.003.
- [90] R. Y. A. Hassan, R. O. El-Attar, H. N. A. Hassan, M. A. Ahmed, et E. Khaled, « Carbon nanotube-based electrochemical biosensors for determination of *Candida albicans*'s quorum sensing molecule », *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 244, p. 565-570, 2017, doi: 10.1016/j.snb.2017.01.028.
- [91] M. Xu, R. Wang, et Y. Li, « Rapid detection of Escherichia coli O157:H7 and Salmonella Typhimurium dans foods using an electrochemical immunosensor based on screen-printed interdigitated microelectrode and immunomagnetic separation », *Talanta*, vol. 148, p. 200-208, 2016, doi: 10.1016/j.talanta.2015.10.082.
- [92] Y. Zhang et S. Tadigadapa, « Calorimetric biosensors with integrated microfluidic channels », *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 19, n° 12, p. 1733-1743, 2004, doi: 10.1016/j.bios.2004.01.009.
- [93] J. Ashley *et al.*, « An SPR based sensor for allergens detection », *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 88, p. 109-113, 2017, doi: 10.1016/j.bios.2016.07.101.
- [94] Y.-H. Choi, G.-Y. Lee, H. Ko, Y. W. Chang, M.-J. Kang, et J.-C. Pyun, « Development of SPR biosensor for the detection of human hepatitis B virus using plasma-treated parylene-N film », *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 56, p. 286-294, 2014, doi: 10.1016/j.bios.2014.01.035.
- [95] N. A. S. Omar *et al.*, « Sensitive Detection of Dengue Virus Type 2 E-Proteins Signals Using Self-Assembled Monolayers/Reduced Graphene Oxide-PAMAM Dendrimer Thin Film-SPR Optical Sensor », *Sci Rep*, vol. 10, n° 1, p. 2374, 2020, doi: 10.1038/s41598-020-59388-3.
- [96] Y. Huang *et al.*, « Development of a Portable SPR Sensor for Nucleic Acid Detection », *Micromachines*, vol. 11, n° 5, Art. n° 5, 2020, doi: 10.3390/mi11050526.

Chapitre I : Contexte de l'étude

- [97] Y. Sun *et al.*, « Novel Chemiluminescence Sensor for Thrombin Detection Based on Dual-Aptamer Biorecognition and Mesoporous Silica Encapsulated with Iron Porphyrin », *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 12, n° 5, p. 5569-5577, 2020, doi: 10.1021/acscami.9b20255.
- [98] Y. Cai *et al.*, « Preparation of a chemiluminescence sensor for multi-detection of benzimidazoles dans meat based on molecularly imprinted polymer », *Food Chemistry*, vol. 280, p. 103-109, 2019, doi: 10.1016/j.foodchem.2018.12.052.
- [99] K. Zhang, R. Hu, G. Fan, et G. Li, « Graphene oxide/chitosan nanocomposite coated quartz crystal microbalance sensor for detection of amine vapors », *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 243, p. 721-730, 2017, doi: 10.1016/j.snb.2016.12.063.
- [100] S. B. Ali *et al.*, « Detection of β -caryophyllene dans mango using a quartz crystal microbalance sensor », *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 255, p. 3064-3073, 2018, doi: 10.1016/j.snb.2017.09.131.
- [101] H. R. Schnerr, « Food and Beverage Applications of Biosensor Technologies », dans *Handbook of Biosensors and Biochips*, R. S. Marks, D. C. Cullen, I. Karube, C. R. Lowe, et H. H. Weetall, Éd. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2008, p. hbb118. doi: 10.1002/9780470061565.hbb118.
- [102] P. Mehrotra, « Biosensors and their applications – A review », *J Oral Biol Craniofac Res*, vol. 6, n° 2, p. 153-159, 2016, doi: 10.1016/j.jobcr.2015.12.002.
- [103] P. Yeh, N. Yeh, C.-H. Lee, et T.-J. Ding, « Applications of LEDs dans optical sensors and chemical sensing device for detection of biochemicals, heavy metals, and environmental nutrients », *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 75, p. 461-468, 2017, doi: 10.1016/j.rser.2016.11.011.
- [104] D. P. Nikolelis et G.-P. Nikoleli, Éd., *Biosensors for Security and Bioterrorism Applications*. Cham: Springer International Publishing, 2016. doi: 10.1007/978-3-319-28926-7.
- [105] B. Špačková, H. Šípová-Jungová, M. Käll, J. Fritzsche, et C. Langhammer, « Nanoplasmonic–Nanofluidic Single-Molecule Biosensors for Ultrasmall Sample Volumes », *ACS Sens.*, 2020, doi: 10.1021/acssensors.0c01774.
- [106] K. V. Yassine, « Résonance plasmon et développements instrumentaux vers la conception de biopuces et biocapteurs innovants », p. 233, 2017, doi: HAL Id: tel-01801300.

Chap. II. Capteur et biocapteur SPR

Nous introduisons ici la technique de mesure de résonance plasmonique de surface en partant de ses origines jusqu'à sa mise en œuvre expérimentale, en passant par le principe physique qui la régit.

Nous verrons que cette technique est avant tout une méthode de caractérisation d'un paramètre physique, l'indice de réfraction, qui n'a de prime abord aucun lien avec la biologie.

Afin qu'une telle technique de mesure puisse être utilisée dans le domaine de la biodétection, le capteur doit subir un traitement physico-chimique lui permettant de convertir une activité biomoléculaire en ce qu'il sait mesurer, i.e. une variation d'indice de réfraction. Cela constitue l'étape de fonctionnalisation du capteur qui est décrite en seconde partie de ce chapitre.

II.1 La résonance plasmonique de surface

II.1.1 Historique

La première observation du phénomène de résonance plasmonique de surface ou SPR pour "Surface Plasmon Resonance" remonte à 1902, lorsque Wood observa des anomalies spectrales sous formes de raies ou marquages sombres en projetant une lumière polarisée sur la face arrière d'un métal réfléchissant [1–3]. En 1907, Lord Rayleigh a procédé au traitement théorique et a pu établir une interprétation physique de ces anomalies [4,5]. Cependant, il a fallu attendre 1968 pour que Otto [6] et Kretschmann [7] établissent séparément la possibilité d'exciter les plasmons par la méthode de réflectance totale atténuée (ATR), ce qui a donné naissance à deux géométries expérimentales aux noms des deux scientifiques (*cf.* § II.1.3.2.1). L'application de ce principe à l'étude de phénomènes biologiques a été lancée en 1983 par Liedberg, Nylander et Lundström en essayant de détecter des IgG humains [8]. Depuis 1984, Pharmacia Biosensor AB, aujourd'hui Cytiva (ex GE Healthcare™) n'a cessé de développer des appareils de diagnostic basés sur le principe de la SPR, connus sous la dénomination Biacore™ (*Figure II. 1*). L'entreprise est aujourd'hui l'un des leaders mondiaux du domaine avec son concept instrumental « BIA » (Biomolecular Interaction Analysis) [1,2].

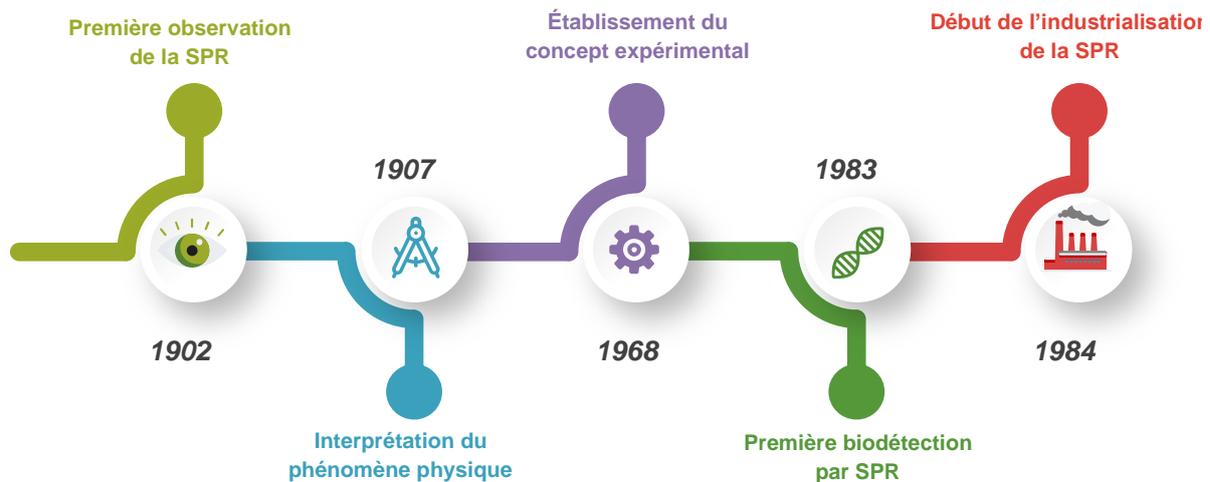


Figure II. 1: Historique de la SPR.

II.1.2 Principe physique

La résonance plasmonique de surface est un phénomène physique pouvant prendre place à l'interface de deux matériaux de permittivité de signe contraire, généralement un métal (permittivité négative) et un diélectrique (permittivité positive), avec l'apport d'une énergie extérieure véhiculée par un faisceau optique [1,2]. Cette excitation ne peut se faire que sous certaines conditions qui, lorsqu'elles sont remplies, entraînent une oscillation collective des électrons du métal à l'interface des deux matériaux [9]. Celle-ci se traduit sous la forme d'une onde électromagnétique évanescente, dont les propriétés dépendent de celles du métal et du

Chapitre II : Capteur et biocapteur SPR

milieu diélectrique et plus spécifiquement de la valeur de leur permittivité respective, donc de leur indice optique. La profondeur de pénétration de cette onde évanescente dans le milieu diélectrique varie entre 100 et 600 nm [10], valeur principalement dépendante de la longueur d'onde du faisceau optique. Cette caractéristique particulière confère une très grande sensibilité des propriétés de cette onde au moindre changement d'indice optique au niveau de cette interface. Les capteurs SPR mesurent donc l'indice de réfraction optique du milieu en contact avec le capteur et ceci au proche voisinage de l'interface de ce milieu avec le métal constituant le capteur.

Pour transformer un capteur SPR en biocapteur, il faudra donc que l'interaction biomoléculaire dont l'existence est recherchée se situe dans la profondeur de pénétration de l'onde plasmonique. Il faut donc localiser ces interactions en surface du capteur, ce qui nécessite une étape de fonctionnalisation de surface des capteurs qui sera présentée au § II.2.

II.1.3 Le système de mesure par SPR

Il existe différentes configurations pour mettre en œuvre le principe de résonance plasmonique de surface, principalement liées à la manière dont le faisceau optique de lecture est couplé au capteur: i) par prisme, ii) par réseau de diffraction, iii) par guide d'onde optique et iv) via une fibre optique. Les deux premières utilisent un capteur que l'on peut grossièrement assimiler à une lame de microscope métallisée, la troisième est plutôt un dispositif de laboratoire complexe à mettre en œuvre expérimentalement, qui plus est, dans un environnement portable comme celui envisagé dans le projet BIOSENS et la dernière est principalement utilisée pour des analyses *in vivo*, là aussi plutôt dans un contexte d'expérimentations de laboratoire. Nous ne décrivons donc ici que la première technique, car c'est celle-ci qui sera utilisée dans notre étude. A noter que la seconde a été étudiée dans un projet précédent [11,12].

Le système de mesure SPR peut alors être scindé en deux parties:

- le capteur SPR: comme mentionné plus haut, il prend généralement la forme d'une lame ou lamelle de microscope métallisée. C'est au niveau du capteur que le milieu à sonder est appliqué. Il constitue la partie "consommable" du dispositif de mesure.
- le dispositif de lecture: il comprend la source optique permettant d'exciter le phénomène de résonance plasmonique de surface au sein du capteur, *via* le faisceau optique incident, et le dispositif de lecture du faisceau réfléchi qui contient l'information utile. C'est la partie "équipement" du dispositif de mesure. Il sera constitué ici par la valisette développée dans le projet BIOSENS (*cf.* § III.1.1.2).

II.1.3.1 Capteur SPR

Sa partie active est constituée d'un film métallique. Le métal doit présenter certaines propriétés, notamment représentées *via* sa permittivité complexe. Les métaux nobles (Au, Ag, Al, Ti...) ont les propriétés requises. Parmi ceux-ci, l'or (111) se distingue particulièrement pour les applications biocapteurs car il présente plusieurs avantages tels que:

- i) la non-réactivité (stabilité) chimique: hormis avec les thiols et les amines, l'or (111) n'interagit pas avec les autres entités fonctionnelles,
- ii) la biocompatibilité: l'or est considéré comme le métal le plus biocompatible,
- iii) la possibilité d'activation de surface par oxydation: il s'agit d'un pré-traitement qui permet à la fois de nettoyer mais aussi d'activer des sites actifs sur la surface d'or afin d'y greffer des molécules avec un certain degré de contrôle [13]: la technique la plus employée est l'UV-ozone,
- iv) la forte affinité aux thiols: la liaison Au-S est une très forte liaison covalente, la force de cette liaison est de l'ordre de 40 Kcal/mol. Ce qui mène à un espacement entre chaque atome de soufre d'une longueur de 4,99 Å, cela permet d'avoir de fortes interactions intermoléculaires [14]. En effet, leur stabilité dépend des interactions de type Van-der-Waals entre chaque molécule attachée au substrat [15] mais aussi de l'affinité de ces molécules avec le substrat lui-même [16].

De ce fait l'or est le métal classiquement retenu pour la réalisation de biocapteurs SPR.

II.1.3.2 Le système de lecture du capteur

II.1.3.2.1 Couplage par prisme

Comme cité plus haut, les deux géométries les plus connues permettant d'exciter l'onde plasmonique de surface par un prisme sont celles d'Otto et de Kretschmann (*Figure II. 2*). Cette dernière est la plus répandue (et c'est celle que nous utiliserons) car elle permet une mise en œuvre simple pour le test de solutions liquides et l'utilisation de dispositifs microfluidiques.

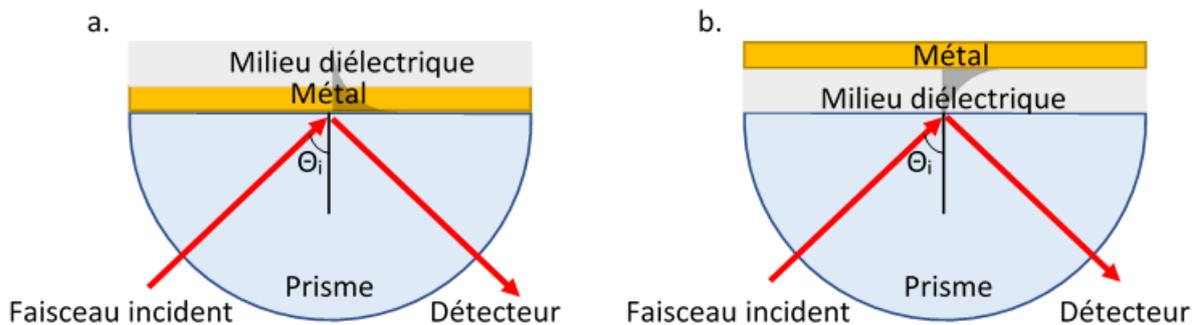


Figure II. 2 : a. Configuration de Kretschmann et b. Configuration d'Otto.

Dans la configuration de Kretschmann [7], schématisée en *Figure II. 2.a.*, le faisceau lumineux incident est injecté sur la surface arrière du film métallique, dont l'épaisseur est de l'ordre de quelques dizaines de nanomètres, *via* un prisme d'indice de réfraction n selon une configuration de réflexion interne totale (TIR). Les modèles théoriques permettent de calculer les conditions de création du phénomène de résonance plasmonique de surface [17,18] en fonction de l'angle d'incidence, θ_i , et de la longueur d'onde du faisceau optique incident, de l'indice optique du prisme, de celui du métal et du milieu diélectrique et enfin de l'épaisseur du film métallique. Lors de la création de l'onde évanescente, la partie de l'énergie de l'onde incidente lui ayant été transmise est donc absente du faisceau réfléchi, nous sommes alors dans une configuration de réflectance totale atténuée (ATR). Comme nous le voyons dans les paramètres régissant la création de l'onde plasmonique, l'indice du prisme et celui du métal

Chapitre II : Capteur et biocapteur SPR

étant supposés constants, toute variation de l'indice optique du milieu diélectrique entrainera la variation de la longueur d'onde ou de l'angle d'incidence du faisceau incident afin d'observer la résonance plasmonique. Cela conduit aux deux modes d'interrogation du capteur, respectivement spectral et angulaire, présentés au § II.1.3.2.2. Le signal réfléchi est détecté et son suivi est enregistré [19].

Dans la géométrie d'Otto [6] représentée dans la *Figure II. 2.b.*, le milieu diélectrique est mis en sandwich entre le film métallique et le prisme. La génération de plasmons de surface dans cette configuration est régie par les mêmes lois que précédemment. Pratiquement, cette configuration se prête mal à l'expérimentation en milieu liquide, qui doit alors être injecté entre le prisme et le film métallique. Toutefois, elle peut s'avérer utile pour l'étude d'échantillons solides [1,20,21].

À ce jour, la majorité des instruments de mesure SPR commerciaux et développés au niveau des laboratoires repose sur le principe de couplage par prisme [22]. Ces équipements fixes sont assez volumineux, mais évoluent récemment vers des systèmes portatifs et plus compacts [23–27]. Nous utiliserons ici, au sein de la valisette, également un couplage par prisme dans une configuration Kretschmann (*Figure II. 3.a.*).

II.1.3.2.2 Mode d'interrogation

Expérimentalement, parmi les différents paramètres régissant la création de la résonance plasmonique, les indices du prisme et du métal, l'épaisseur du métal sont des valeurs invariables dépendant du système de lecture ou du capteur. Lors de la modification de l'indice optique du matériau, les seules variables qui permettent de conserver la résonance plasmonique sont alors l'angle d'injection ou la longueur d'onde du faisceau incident. En découlent alors les deux modes d'interrogation du capteur.

II.1.3.2.2.1 Interrogation angulaire

La configuration angulaire requiert une source optique monochromatique polarisée offrant un éventail d'angles d'incidence (faisceau focalisé) pour exciter les plasmons de surface. Ensuite, l'intensité du spectre de la lumière réfléchie est enregistrée en fonction de l'angle d'excitation. Cette excitation des plasmons se caractérise par une chute du signal réfléchi (réflectivité) à un certain angle et s'affiche sous forme d'une courbe en "cloche inversée" communément appelée par abus de langage "profil du plasmon" (*Figure II. 3.b.*).

Le déplacement angulaire du minimum de cette courbe est suivi, il varie lorsque l'indice de réfraction varie à l'interface métal-diélectrique, dû à un changement d'analyte ou à une interaction biologique [17,28]. L'approche angulaire présente la plus forte sensibilité qui est de l'ordre de 10^{-7} RIU (unité d'indice de réfraction, Refractive Index Unit en Anglais) [29].

II.1.3.2.2.2 Interrogation spectrale

En fonctionnement dual de l'approche décrite ci-dessus, l'interrogation spectrale met en jeu une source polychromatique polarisée dont l'angle d'incidence est fixe (faisceau collimaté ou parallèle). L'excitation des plasmons n'a alors lieu qu'à une certaine longueur d'onde. Tout comme en interrogation angulaire, l'excitation des plasmons se traduit par une chute du signal

à une certaine longueur d'onde et se présente sous forme d'une "cloche inversée" (**Figure II. 3.b.**). La sensibilité de l'interrogation spectrale est de l'ordre de 10^{-6} RIU [29].

II.1.3.3 Sensorgramme

Le sensorgramme (**Figure II. 3.c.**) est la courbe de suivi temporel du déplacement de la réponse plasmonique en fonction des modifications d'indice en surface du capteur. Son axe y est alors représentatif d'un déplacement soit angulaire soit spectral, suivant le mode d'interrogation.

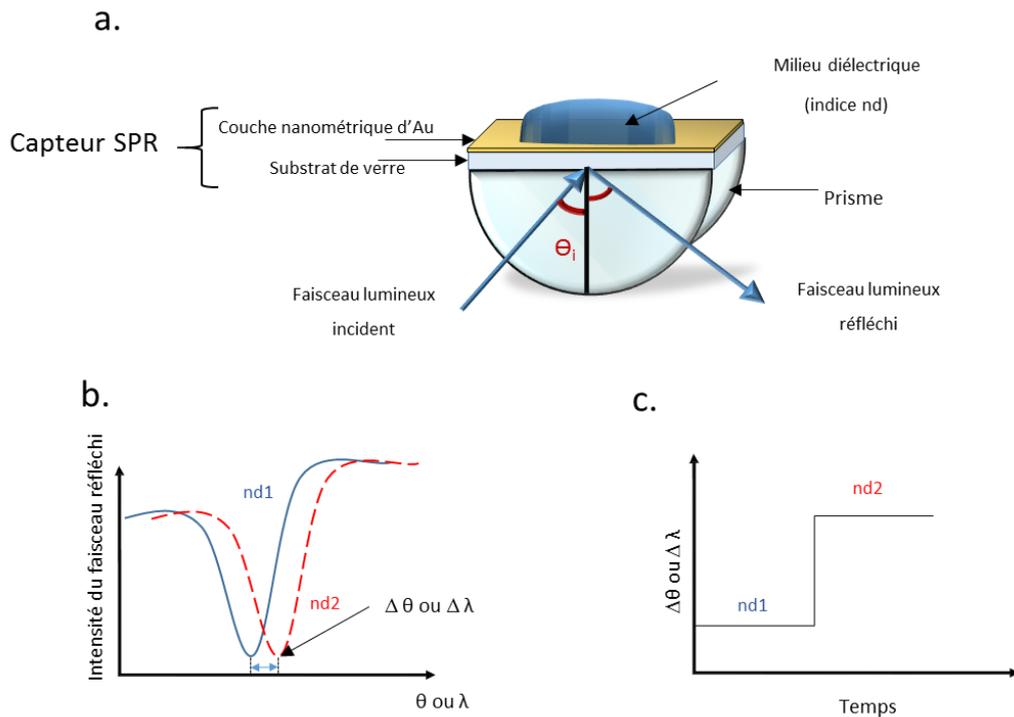


Figure II. 3 : a. Principe de biodétection par résonance plasmonique de surface selon la configuration de Kretschmann, b. Réponse plasmonique lorsque l'indice du milieu diélectrique varie ($nd_1 \rightarrow nd_2$), c. Sensorgramme correspondant.

II.1.3.3.1 Cinétique d'interaction

Lors de la mesure d'indices de réfraction, le sensorgramme se présente effectivement suivant la courbe présentée en Figure II. 3.c. Dans le cas d'interactions biologiques (biodétection), les courbes ne présentent généralement pas de transition aussi brusque et reflètent la cinétique d'interaction moléculaire, *i.e.* la vitesse à laquelle interagissent les molécules sonde et cible (*cf.* **Figure II. 4**).

Prenons le cas d'étude d'une interaction entre deux molécules complémentaires, le ligand (immobilisé sur la surface du capteur) dénommé L et l'analyte amené par le flux microfluidique noté A . l'analyte se lie au ligand de manière réversible (dans la majorité des cas) formant ainsi un complexe ligand-analyte dénommé LA , suivant une constante d'association k_a exprimée en $L \cdot mol^{-1} s^{-1}$. À l'inverse, la rupture du couple ligand-analyte suit une constante de dissociation k_d exprimée en s^{-1} comme le montre l'équilibre dans l'Eq. II. 1. Il en résulte la constante de

Chapitre II : Capteur et biocapteur SPR

dissociation à l'équilibre noté K_D , définie par l'Eq. II. 2. Dans une interaction 1:1, il s'agit de la concentration d'analyte permettant de saturer la moitié des ligands se trouvant à la surface de détection [30].



$$K_D = \frac{k_d}{k_a} \quad \text{Eq. II. 2}$$

II.1.3.3.1.1 Phase d'association

En début d'expérience, une solution tampon est injectée sur la surface du biocapteur pour obtenir une ligne de base, à ce stade tous les ligands sont libres. Dès l'injection de l'analyte, le complexe Ligand-Analyte (LA) se forme mais aussi se rompt en fonction du temps et des constantes d'association et de dissociation de l'interaction moléculaire mise en jeu. Les complexes LA peuvent être quantifiés en utilisant l'Eq. II. 3.

$$\frac{d[LA]}{dt} = k_a[L][A] - k_d[LA] \quad \text{Eq. II. 3}$$

La concentration du ligand L est exprimé en fonction du temps par l'Eq. II. 4.

$$[L]_t = [L]_{t=0} - [LA]_t \quad \text{Eq. II. 4}$$

Remplacer cette équation dans l'Eq. II. 3 résulte en l'Eq. II. 5.

$$\frac{d[LA]}{dt} = k_a[A]([L]_{t=0} - [LA]_t) - k_d[LA] \quad \text{Eq. II. 5}$$

Lors d'une analyse SPR, la formation du complexe LA est suivie en temps réel et résulte en une réponse notée R (précédemment représentée en $\Delta\lambda$ ou $\Delta\theta$). La concentration C de l'analyte injecté est considérée constante, car les différences de concentration en analyte A sont négligeables lors de la formation du complexe Ligand-Analyte. Donc la réponse plasmonique issue de la formation du complexe est considérée comme une cinétique du pseudo-premier ordre [31,32], l'Eq. II. 5 peut alors être reformulée en Eq. II. 6.

$$\frac{dR}{dt} = k_a C (R_{max} - R_t) - k_d R_t \quad \text{Eq. II. 6}$$

où : C est la concentration de l'analyte, R_{max} est la réponse plasmonique à saturation, *i.e.* enregistrée lorsque toutes les sondes sont saturées, R_t est la réponse plasmonique à l'instant t , k_d est la constante de dissociation, k_a est la constante d'association du couple ligand-analyte.

L'Eq. II.7 est résolue sous la forme de l'Eq. II.8 et simplifiée en Eq. II.9.

$$R = \frac{k_a C R_{max}}{k_a C + k_d} (1 - e^{-(k_a C + k_d)t}) \quad \text{Eq. II. 7}$$

$$R = R_0 (1 - e^{-(k_a C + k_d)t}) \quad \text{Eq. II. 8}$$

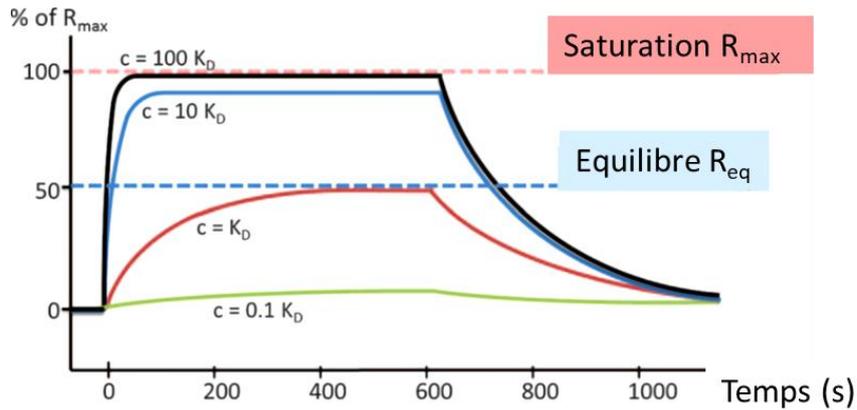


Figure II. 4 : Variation de la réponse plasmonique en fonction de la concentration de l'analyte C et sa relation avec la constante de dissociation à l'équilibre K_D .

Le niveau R_{max} , est déterminé graphiquement comme le montre la **Figure II. 4**.

La constante d'association est calculée à partir de la pente en tout point sur la courbe de la phase de dissociation.

II.1.3.3.1.2 Phase de dissociation

Lors de la phase de dissociation, $C = 0$, donc d'après l'Eq. II. 6, cette phase est décrite par l'Eq. II.9.

$$\frac{dR}{dt} = -k_d R \quad \text{Eq. II. 9}$$

Qui résulte en l'Eq. II.10.

$$R = R_0 e^{-k_d t} \quad \text{Eq. II.10}$$

où R_0 , est la réponse en début de la phase de dissociation et R_t la réponse enregistrée en fonction du temps pendant la phase de dissociation.

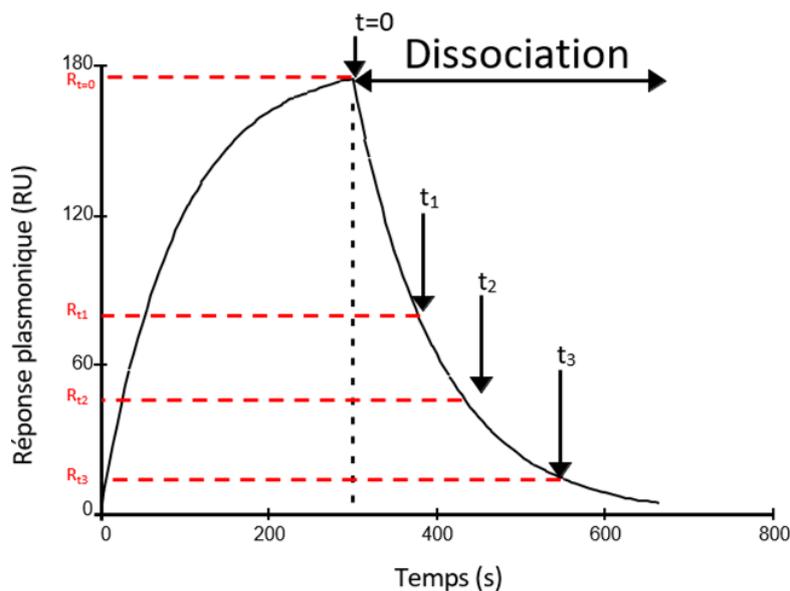


Figure II. 5: Exemple de détermination de la constante de dissociation par régression linéaire en utilisant l'Eq. II.10 (figure adaptée d'après [32]).

Chapitre II : Capteur et biocapteur SPR

La constante de dissociation du complexe Ligand-Analyte peut désormais être déterminée à partir de l'Eq. II.10 par régression linéaire sur la partie de dissociation du sensorgramme comme montré dans la **Figure II. 5**. Elle peut aussi être déterminée par régression non-linéaire directement du sensorgramme à l'aide de l'Eq. II.10 [32,33].

Concrètement, l'étude cinétique est réalisée à l'aide de logiciels de calcul (*e.g.* Tracedrawer, KE-software...) dans lesquels sont introduits les fichiers de points issus des résultats expérimentaux. Comme il existe différents modèles cinétiques, seul celui qui assure un meilleur fit est retenu. Le **Tableau I. I** résume les informations concernant les paramètres d'une cinétique d'interaction.

| Paramètre | Constante d'association k_a | Constante de dissociation k_d | Constante d'équilibre de dissociation K_D |
|----------------|-------------------------------------|-----------------------------------|--|
| | $L+A \xrightarrow{k_a} LA$ | $LA \xrightarrow{k_d} L+A$ | $K_D = \frac{k_d}{k_a}$ |
| Unité | $M^{-1}s^{-1}$ | s^{-1} | M |
| Description | Vitesse de formation du complexe LA | Vitesse de rupture du complexe LA | Détermine la tendance de dissociation ; K_D élevée signifie une faible affinité. |
| Valeur typique | $[10^{-3} - 10^{-7}]$ | $[10^{-5} - 5 \times 10^{-6}]$ | $[10^{-5} - 10^{-12}]$ |

Tableau II. I : Paramètres cinétiques issus d'une analyse SPR.

II.2 Fonctionnalisation de surface

L'étape qui permet de convertir un capteur SPR en un biocapteur SPR est l'immobilisation de bioéléments, les sondes, sur la surface métallique du capteur grâce à la fonctionnalisation de surface.

Fondamentalement, la chimie de surface a toujours été considérée comme l'étude des phénomènes physico-chimiques ayant lieu à une interface liquide-liquide, solide-liquide ou liquide-vapeur et qui a été principalement référencée à la catalyse hétérogène, mais depuis l'avènement des micro et nanotechnologies, notamment grâce à l'émergence des biocapteurs cette vision s'est quelque peu modifiée en un concept d'apport technologique en vue d'une modification de surface qui a pour but d'analyser et d'établir un suivi réactionnel, précisément biochimique (dans le cadre de la biodétection) [34]. La fonctionnalisation de surface est une modification de l'interface, dans le but de la rendre interactive vis-à-vis d'une propriété souhaitée.

Il existe principalement deux catégories d'approche pour la fonctionnalisation de surface. En premier, la technique directe qui induit une immobilisation des sondes de manière directe sur la surface métallique. En deuxième, la technique indirecte où les sondes sont immobilisées sur une monocouche auto-assemblée (SAM) de molécules dites porteuses.

Le travail présenté dans ce manuscrit consiste en l'utilisation des deux techniques. Cependant, nous présentons ci-dessous de manière globale les principales approches connues et utilisées dans le développement de biocapteurs.

II.2.1 Qu'est-ce qu'une SAM ?

Une monocouche auto-assemblée ou SAM ("Self-Assembled Monolayer") est un assemblage moléculaire bidimensionnel ordonné qui se forme spontanément sur la surface d'un substrat à la suite de son immersion dans un solvant contenant les molécules appropriées. La molécule adsorbée est constituée de trois parties distinctes : i) la queue, formée par le groupement d'ancrage ayant une affinité avec le substrat, ii) l'ossature qui forme l'espaceur¹ moléculaire et iii) la tête ou le groupe terminal, composé d'un groupement fonctionnel réactif. Par exemple, des SAMs sont formées spontanément lorsqu'une solution d'alcanethiols est déposée sur de l'or ou de l'argent pendant une durée déterminée [35], de même lorsqu'une solution d'organosilanes est déposée sur une surface hydroxylée ou sur de l'alumine [36–38] (Tableau II. II).

| Substrat | Molécule | Liaison | Avantages | Inconvénients |
|---|-----------------------------|--------------|---|----------------------------|
| Or, Argent, | Thiols et organosulfures | Au-S, Ag-S | Les plus étudiés, contrôlés, Forte affinité | Oxydation du métal (Ag) |
| Surfaces oxydées et siliconées | Organosilanes | Si-O | Faciles à utiliser | Formation de multi-couches |
| Hydrides et surfaces siliconées | Alcynes et alcènes | Si-C | Bonne stabilité | Formation de multi-couches |
| Matériaux carbonés, oxydés et siliconés | Sels d'Aryles de diazoniums | Aryl-surface | Bonne stabilité | Contrôle limité |

Tableau II. II : Les quatre types de monocouches auto-assemblées

L'autoassemblage s'effectue en deux phases. La première est rapide, en l'espace de quelques minutes 70% des molécules sont greffées et 80 à 90 % de l'épaisseur finale de la monocouche est atteinte. Tandis que la deuxième phase est plus lente (2-20 h), elle consiste principalement en un réarrangement des molécules adsorbées de sorte qu'elles soient bien orientées [39]. A la fin de cette étape, une monocouche auto-assemblée est obtenue en surface du capteur (*Figure II. 6*).

¹ l'espaceur moléculaire ne doit pas être confondu avec une molécule "espaceur", telle le mercaptohexanol (MCH) utilisée dans le §.V.2.1.1, qui définit une molécule venant s'intercaler entre d'autres.

Chapitre II : Capteur et biocapteur SPR

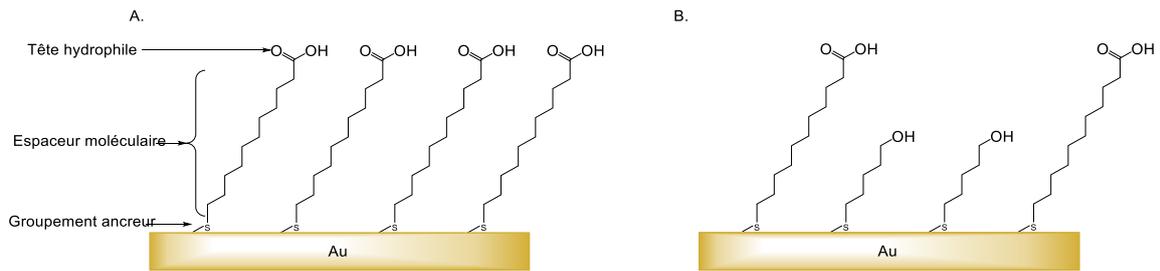


Figure II. 6: Monocouche auto-assemblée de 11-MUA sur or et B. Monocouche auto-assemblée mixte de 11MUA et de molécules "espaceur" Mercaptentanol sur Or

II.2.2 Stratégies d'immobilisation directes

On définit par stratégie d'immobilisation directe, la technique qui permet d'immobiliser la sonde en une seule étape. Il s'agit de la voie de fonctionnalisation la moins laborieuse, mais qui nécessite la présence d'un groupement fonctionnel compatible avec l'élément chimique formant la surface plasmonique de la puce.

II.2.2.1 Adsorption physique et ionique

L'immobilisation de ligands par physisorption signifie que les molécules détectrices sont adsorbées à la surface grâce à des interactions électrostatiques, des liaisons hydrogène des interactions hydrophobes ou par forces attractives de Van der Waals. Alors que la voie ionique permet le dépôt des sondes à la surface grâce à des charges ioniques de signe opposé entre le substrat et la sonde (**Figure II. 7**).

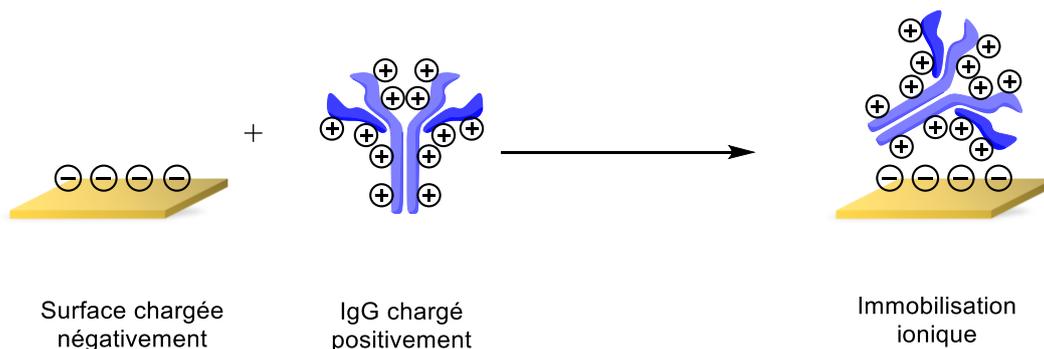
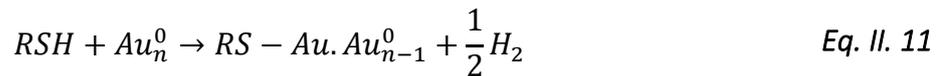


Figure II. 7: Immobilisation d'anticorps sur une puce plasmonique par voie ionique (cas IgG humain avec $pI = 6,6-8,3$).

L'adsorption physique est plus rapide et plus simple puisqu'elle ne requiert aucun traitement préalable du substrat et permet l'immobilisation d'un anticorps de manière réversible. Toutefois, ces deux techniques présentent une faible stabilité du système interactionnel biologique et la bio-interaction est peu reproductible. De plus, une forte concentration en sondes est nécessaire [40].

II.2.2.2 Chimisorption

Par cette technique, il est possible de fonctionnaliser directement la surface des biocapteurs où l'adsorption des sondes se fait de manière covalente. Pour ce faire, la molécule à adsorber doit avoir un groupement ayant une affinité avec le substrat métallique et un des exemples les plus connus déjà cité plus haut est celui des thiols (R-SH) dans lesquels l'atome de soufre forme une liaison avec des métaux (R-S-M) tels que l'au ou l'Ag. Dans ce cas de figure, l'au/l'Ag joue le rôle d'un accepteur d'électrons et le soufre celui de donneur (Eq. II. 11)



Un exemple phare de greffage direct sur une surface métallique (Au, Ag..) est celui de l'ADN thiolé ou aminé. En effet, ce type d'immobilisation peut être réalisé en modifiant au préalable la sonde avec un groupement fonctionnel compatible avec la surface de la puce. C'est ce qui a été utilisé dans ce travail (**Figure II. 8**) (cf. § V.1.4.1).

En revanche, il n'est pas recommandé de suivre ce schéma pour immobiliser des protéines, car elles sont à la fois dénaturées et leur orientation dans l'espace n'est pas maîtrisée et réduit dans la plupart des cas leur valence (aptitude à interagir avec le complément via les sites actifs), donc la sensibilité du biocapteur [41].

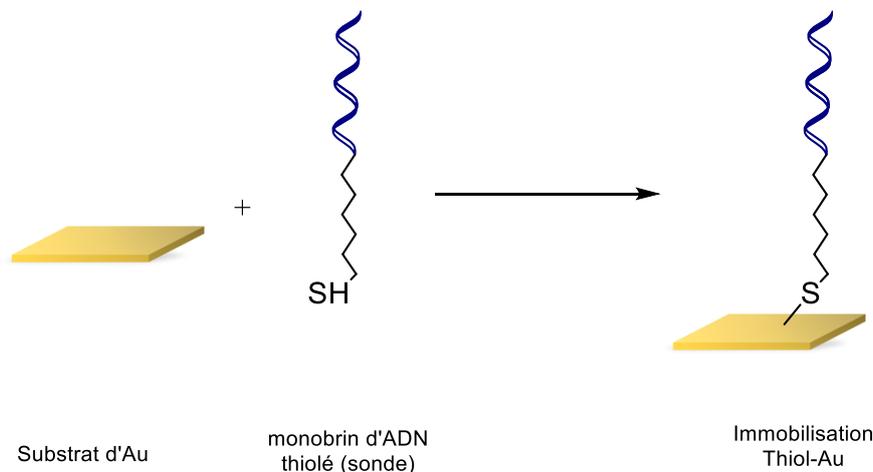


Figure II. 8: Schéma d'immobilisation d'une sonde ADN thiolée sur une surface d'au par voie covalente Au-S.

II.2.3 Stratégies d'immobilisation indirectes

Les stratégies indirectes se présentent sous forme de processus en multi-étapes où une première couche de molécules porteuses est adsorbée à la surface de manière covalente pour former une SAM. Ensuite, les sondes biologiques sont immobilisées suivant de multiples schémas décrits dans cette partie.

II.2.3.1 Immobilisation non-covalente

Tout comme en immobilisation directe, il est possible de fonctionnaliser de manière indirecte la surface d'un capteur plasmonique par physisorption ou *via* des interactions

Chapitre II : Capteur et biocapteur SPR

ioniques. Dans ce cas-ci, la monocouche formée préalablement stabilise les sondes qui seront immobilisées par des interactions hydrophobes, van der Waals ou ioniques. La technique dépend du point isoélectrique (pI) de la molécule étudiée, il faut dans ce cas-là adapter le pH des solvants en fonction du pI et de la nature du groupement terminal de la SAM (**Figure II. 9**). L'avantage de cette approche par rapport à la stratégie directe est que la sonde est portée, ce qui lui permet de mieux interagir avec son complément analyte. Un des exemples de cette approche est l'immobilisation physique d'anticorps anti-ALCAM et anti-salmonelles sur une SAM de mercaptoamines (amines thiolées) chargée positivement. L'étude a permis à la fois de détecter la protéine complémentaire et d'évaluer sa sensibilité par rapport à une détection en ELISA [42].

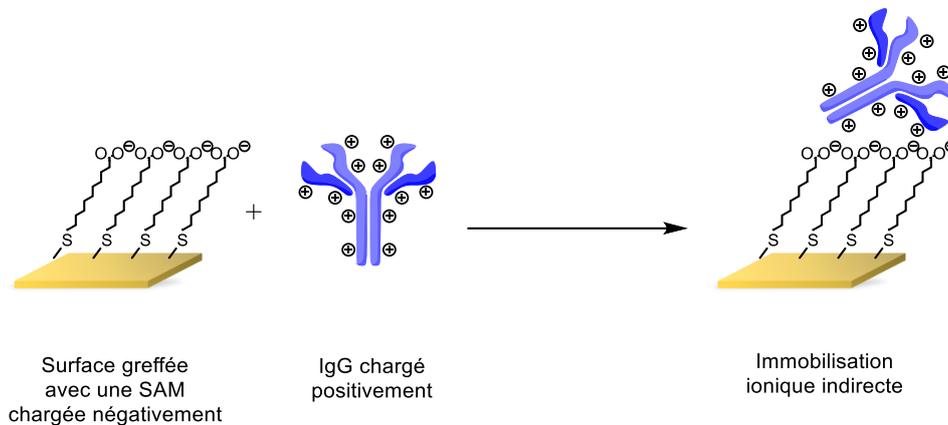


Figure II. 9: Schéma d'immobilisation d'un IgG par voie ionique indirecte (cas IgG humain avec $pI = 6,6-8,3$).

II.2.3.2 Immobilisation covalente

II.2.3.2.1 Couplage amine (EDC/NHS)

Il s'agit de la stratégie la plus utilisée pour la fonctionnalisation de surfaces, plasmoniques entre autres, avec des anticorps ou des protéines. Elle implique la présence:

- d'un groupement acide carboxylique ($R-COOH$). Ce dernier est activé par un mélange d'agents de couplage composé de carbodiimide et succinimide, le plus souvent par la combinaison de l'EDC/NHS formant un ester qui possède un groupement labile.
- d'un groupement amine primaire ($R-NH_2$, présent dans la structure de l'anticorps/protéine) qui réagit sur l'ester semi-stable préalablement formé laissant place à la formation d'une liaison amide (**Figure II. 10**).

Cette technique est simple d'utilisation, présente l'avantage de former une liaison amide stable et d'être une méthode versatile non-coûteuse. En outre, avec une optimisation, le couplage amine permet d'éviter la gêne stérique entre les sondes.

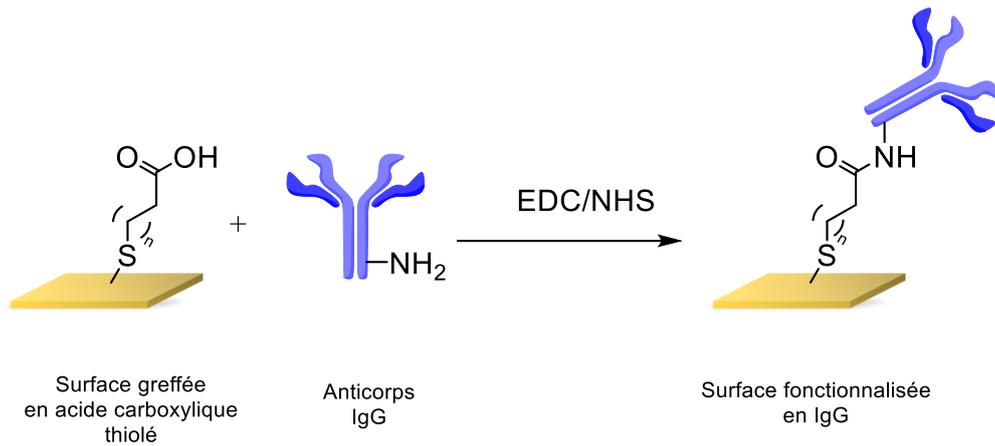


Figure II. 10: Schéma d'immobilisation d'un IgG via EDC/NHS.

II.2.3.2.2 Couplage maléimide-thiol

Une autre approche de couplage covalent fait intervenir le groupement sulfhydryle d'anticorps, connu sous le nom de thiol, ces groupements sont présents dans la chaîne latérale de l'acide aminé cystéine, mais n'est pas aussi abondant que les amines primaires. Cependant, seuls les sulfhydryles libres (R-SH) ou générés par réduction des ponts disulfures (S-S) qui lient les deux chaînes lourdes d'un anticorps (cf. §1.4.2) peuvent réagir avec la double liaison du cycle maléimide [43] (**Figure II. 11**).

La réduction des ponts disulfures peut se faire en utilisant des agents réducteurs tels que le dithiothréitol (DTT) ou le β -mercaptoéthanol. L'inconvénient de cette approche est que le maléimide peut être hydrolysé en milieu alcalin (pH > 8,5), ce qui conduit à l'ouverture du cycle le transformant en acide maléique [43,44].

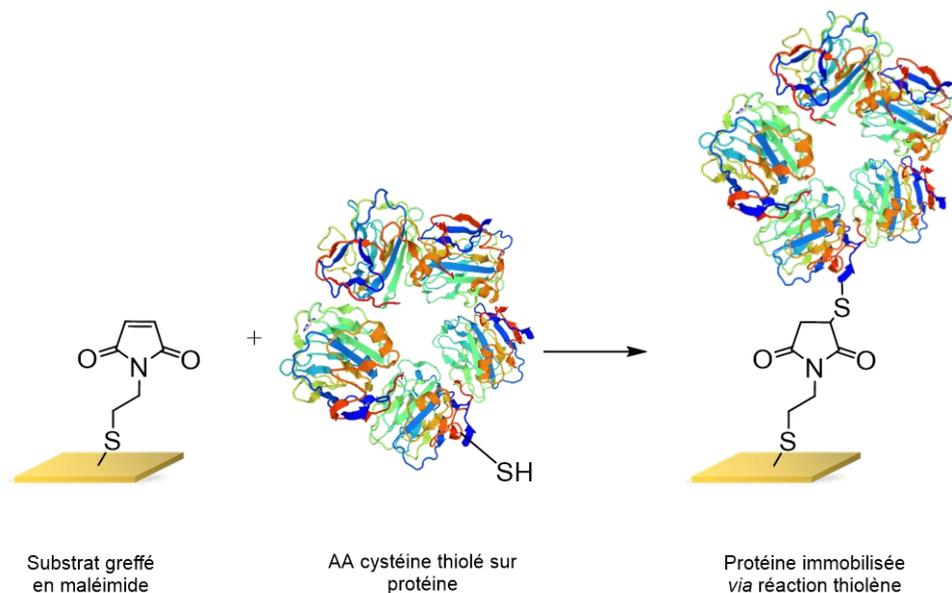


Figure II. 11: Schéma d'immobilisation d'une protéine via l'approche maléimide.

Chapitre II : Capteur et biocapteur SPR

II.2.3.2.3 Chimie-click

La chimie click est un ensemble de réactions biocompatibles utilisées pour greffer des biomolécules spécifiques à un substrat donné. Il en existe plusieurs types, dont la cycloaddition 1,3-dipolaire entre un azoture et un alcyne (AAC: Azide-Alkyne Cycloaddition) donnant lieu à un cycle 1,2,3-triazole. La plus connue étant la cycloaddition catalysée par le cuivre (Cu AAC) (**Figure II. 12**) qui, cependant présente un risque de toxicité et peut être remplacée par une réaction similaire dans laquelle le cuivre est substitué par des dérivés cyclooctynes (SPAAC: Strain Promoted AAC) [43,45,46].

Elle s'effectue à température ambiante sous conditions douces et produit une liaison stable.

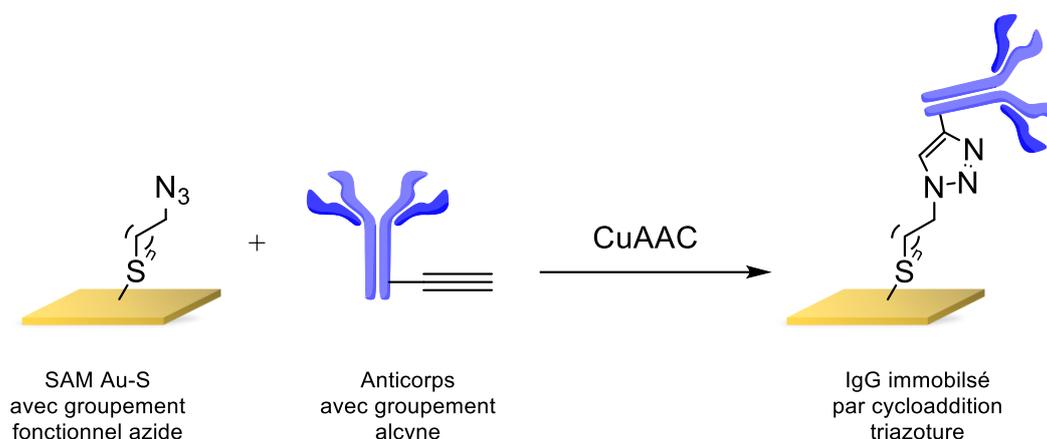


Figure II. 12: Schéma d'immobilisation d'un IgG par cycloaddition catalysée au cuivre.

II.2.4 Stratégie d'immobilisation basée sur la bioaffinité

Le principe de l'immobilisation par bioaffinité est basé sur des interactions non-covalentes, mais qui sont très spécifiques et permettent l'orientation des protéines ou des anticorps dans la bonne conformation interactionnelle. En toute simplicité, il s'agit d'un bio-marquage dont le modèle le plus utilisé est celui de la Biotine-Avidine. Cette liaison qui, bien qu'elle soit non-covalente, présente un faible taux de dissociation de l'ordre de 10^{-15} M, il s'agit d'ailleurs de l'interaction la plus forte rencontrée dans la nature [47]. Pour une application à la biodétection, une des entités est greffée à la surface du capteur jouant le rôle de la sonde suivant un des schémas présentés plus haut, le plus souvent l'avidine, pendant que la molécule complémentaire est préalablement attachée à l'analyte de manière covalente (**Figure II. 13**). La forte avidité de l'avidine envers la biotine garantit une interaction spécifique, rapide, avec une orientation maîtrisée, le tout en maximisant le taux de couverture de la surface du capteur [48,41,49].

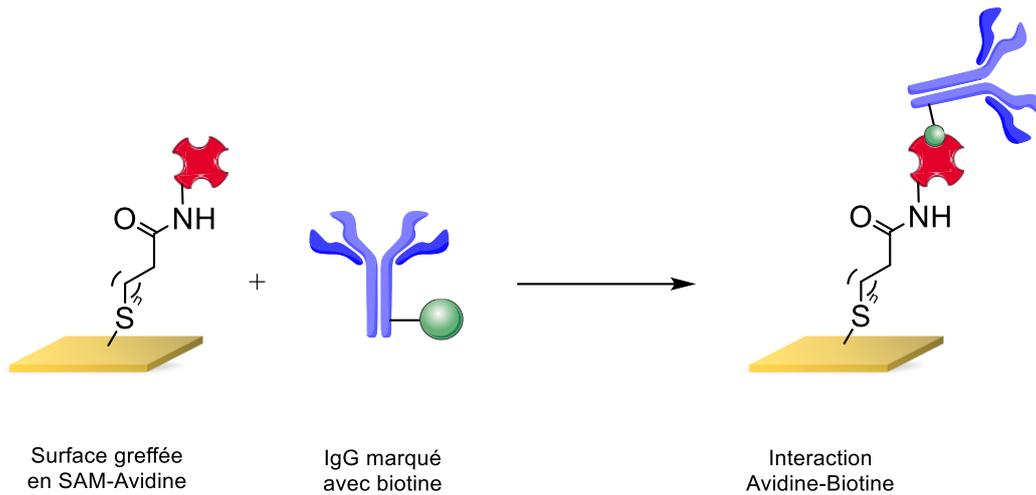


Figure II. 13: Schéma d'immobilisation d'un anticorps via l'approche Avidine-Biotine.

II.3 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons présenté la technique de mesure par résonance plasmonique de surface appliquée à la biodétection en partant de son principe de fonctionnement physique. Deux configurations expérimentales ont été utilisées, à savoir, l'interrogation angulaire et l'interrogation spectrale. Les capteurs utilisés en SPR ont été présentés, notamment leur conversion en biocapteurs *via* différentes stratégies de fonctionnalisation de surface. Parmi celles-ci figurent celles qui sont basées sur la formation de monocouches auto-assemblées (chimisorption et couplage amine) utilisées par la suite.

Le prochain chapitre, introductif de la partie expérimentale du manuscrit concerne la présentation et l'étalonnage des équipements de lecture ainsi que les capteurs plasmoniques utilisés sur chaque banc expérimental.

Références

- [1] J. A. Marquart, *Surface Plasmon Resonance and Biomolecular Interaction Analysis - Theory and Practice*, 4th éd. Zwaag: Pumbo BV, 2014. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.boekenbestellen.nl/boek/spr-theory-and-practice/7982?lang=en>
- [2] R. B. M. Schasfoort, « Chapter 2:History and Physics of Surface Plasmon Resonance », dans *Handbook of Surface Plasmon Resonance*, 2017, p. 27-59. doi: 10.1039/9781788010283-00027.
- [3] R. W. Wood, « On a Remarkable Case of Uneven Distribution of Light dans a Diffraction Grating Spectrum », *Proc. Phys. Soc. London*, vol. 18, n° 1, p. 269-275, 1902, doi: 10.1088/1478-7814/18/1/325.
- [4] D. Kim, « Nanostructure-Based Localized Surface Plasmon Resonance Biosensors », dans *Optical Guided-wave Chemical and Biosensors I*, M. Zourob et A. Lakhtakia, Éd. Berlin, Heidelberg: Springer, 2009, p. 181-207. doi: 10.1007/978-3-540-88242-8_7.
- [5] Lord Rayleigh, « On the Dynamical Theory of Gratings », *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character*, vol. 79, n° 532, p. 399-416, 1907, doi: 10.1098/rspa.1907.0051.
- [6] A. Otto, « Excitation of nonradiative surface plasma waves dans silver by the method of frustrated total reflection », *Z. Physik*, vol. 216, n° 4, p. 398-410, 1968, doi: 10.1007/BF01391532.
- [7] E. Kretschmann et H. Raether, « Notizen: Radiative Decay of Non Radiative Surface Plasmons Excited by Light », *Zeitschrift für Naturforschung A*, vol. 23, 1968, doi: 10.1515/zna-1968-1247.
- [8] B. Liedberg, C. Nylander, et I. Lunström, « Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing », *Sensors and Actuators*, vol. 4, p. 299-304, 1983, doi: 10.1016/0250-6874(83)85036-7.
- [9] M. Boulade, J. Moreau, et T. Livache, « Imagerie par résonance des plasmons de surface : application en microbiologie », *Photoniques*, n° 81, p. 24-27, 2016, doi: 10.1051/photon/20168124.
- [10] H. Šípová et J. Homola, « Surface plasmon resonance sensing of nucleic acids: A review », *Analytica Chimica Acta*, vol. 773, p. 9-23, 2013, doi: 10.1016/j.aca.2012.12.040.
- [11] C. Lenaerts *et al.*, « Integrated prism-free coupled surface plasmon resonance biochemical sensor », dans *Nanophotonics IV*, 2012, vol. 8424, p. 95-103. doi: 10.1117/12.922579.
- [12] C. Lenaerts *et al.*, « Substrate Mode-Integrated SPR Sensor », *Plasmonics*, vol. 8, 2013, doi: 10.1007/s11468-013-9533-y.
- [13] Y. Xue, X. Li, H. Li, et W. Zhang, « Quantifying thiol-gold interactions towards the efficient strength control », *Nature Communications*, vol. 5, p. 4348, 2014, doi: 10.1038/ncomms5348.
- [14] L. H. Dubois et R. G. Nuzzo, « Synthesis, Structure, and Properties of Model Organic Surfaces », *Annual Review of Physical Chemistry*, vol. 43, n° 1, p. 437-463, 1992, doi: 10.1146/annurev.pc.43.100192.002253.

- [15] M. Jalal Uddin *et al.*, « Modeling of self-assembled monolayers (SAMs) of Octadecanethiol and Hexadecanethiol on gold (Au) and silver (Ag) », *Results dans Physics*, vol. 7, p. 2289-2295, 2017, doi: 10.1016/j.rinp.2017.06.055.
- [16] L. Srisombat, A. C. Jamison, et T. R. Lee, « Stability: A key issue for self-assembled monolayers on gold as thin-film coatings and nanoparticle protectants », *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 390, n° 1-3, p. 1-19, 2011, doi: 10.1016/j.colsurfa.2011.09.020.
- [17] E. WIJAYA, « Design and Optimization of Surface Plasmon Resonance (SPR) Biosensors », p. 194, 2012.
- [18] S. Ganesan, « Utilisation de la résonance plasmonique de surface pour la réalisation de capteurs appliqués au domaine phytosanitaire », These de doctorat, Lille, 2020. [En ligne]. Disponible sur: <http://theses.fr/2020LILUI059>
- [19] C. Caucheteur, « Plasmons de surface : principes physiques et applications », p. 17, 2014.
- [20] Y. Ma, « Surface Plasmon Polaritons Based Nanophotonic Devices and their Applications », *Doctoral*, 2015, doi: <https://doi.org/10.21427/D7DC7C>.
- [21] K. Nagata et H. Handa, Éd., *Real-Time Analysis of Biomolecular Interactions*. Tokyo: Springer Japan, 2000. doi: 10.1007/978-4-431-66970-8.
- [22] R. B. M. Schasfoort et A. McWhirter, « Chapter 3:SPR Instrumentation », dans *Handbook of Surface Plasmon Resonance*, 2008, p. 35-80. doi: 10.1039/9781847558220-00035.
- [23] M. Vala, K. Chadt, M. Piliarik, et J. Homola, « High-performance compact SPR sensor for multi-analyte sensing », *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 148, n° 2, p. 544-549, 2010, doi: 10.1016/j.snb.2010.05.067.
- [24] H. Šípová *et al.*, « Portable Surface Plasmon Resonance Biosensor for Detection of Nucleic Acids », *Procedia Engineering*, vol. 25, p. 148-151, 2011, doi: 10.1016/j.proeng.2011.12.037.
- [25] Y. Liu, Q. Liu, S. Chen, F. Cheng, H. Wang, et W. Peng, « Surface Plasmon Resonance Biosensor Based on Smart Phone Platforms », *Scientific Reports*, vol. 5, n° 1, Art. n° 1, 2015, doi: 10.1038/srep12864.
- [26] T. Brulé *et al.*, « A field-deployed surface plasmon resonance (SPR) sensor for RDX quantification dans environmental waters », *Analyst*, vol. 142, n° 12, p. 2161-2168, 2017, doi: 10.1039/C7AN00216E.
- [27] T. J. Palinski, A. Tadimety, G. W. Hunter, et J. X. J. Zhang, « Portable Nanoplasmonic Sensor for Real-Time SARS-CoV-2 RNA Detection », *Meet. Abstr.*, vol. MA2021-01, n° 52, p. 2037, 2021, doi: 10.1149/MA2021-01522037mtgabs.
- [28] E. Maillart, « IMAGERIE PAR RESONANCE DES PLASMONS DE SURFACE POUR L'ANALYSE SIMULTANEE DE MULTIPLES INTERACTIONS BIOMOLECULAIRES EN TEMPS REEL », p. 289, 2004, doi: HAL Id: tel-00006480.
- [29] A. H.-P. Ho, S.-Y. Wu, S.-K. Kong, S. Zeng, et K.-T. Yong, « SPR Biosensors », dans *Handbook of Photonics for Biomedical Engineering*, A. H.-P. Ho, D. Kim, et M. G. Somekh, Éd. Dordrecht: Springer Netherlands, 2017, p. 123-145. doi: 10.1007/978-94-007-5052-4_38.

Chapitre II : Capteur et biocapteur SPR

- [30] J. A. Marquart, « Chapter 4: SPR pages – Getting a Feeling for the Curves », dans *Handbook of Surface Plasmon Resonance*, 2017, p. 106-148. doi: 10.1039/9781788010283-00106.
- [31] R. Karlsson, A. Michaelsson, et L. Mattsson, « Kinetic analysis of monoclonal antibody-antigen interactions with a new biosensor based analytical system », *Journal of Immunological Methods*, vol. 145, n° 1-2, p. 229-240, 1991, doi: 10.1016/0022-1759(91)90331-9.
- [32] « Manual KE-software ». [En ligne]. Disponible sur: <https://people.bath.ac.uk/chsataj/Manual%20KE-software.pdf>
- [33] Ridgeview Instruments AB, « TraceDrawer 1.8 Handbook ». 2016.
- [34] E. Prats-Alfonso et F. Albericio, « Functionalization of gold surfaces: recent developments and applications », *J Mater Sci*, vol. 46, n° 24, p. 7643-7648, 2011, doi: 10.1007/s10853-011-5812-1.
- [35] J. M. Fowler, D. K. Y. Wong, H. B. Halsall, et W. R. Heineman, « CHAPTER 5 - Recent developments dans electrochemical immunoassays and immunosensors », dans *Electrochemical Sensors, Biosensors and their Biomedical Applications*, X. Zhang, H. Ju, et J. Wang, Éd. San Diego: Academic Press, 2008, p. 115-143. doi: 10.1016/B978-012373738-0.50007-6.
- [36] F. Leonardi, « Self-Assembled Monolayers (SAMs) dans Organic Field-Effect Transistors », Thèse de doctorat, alma, 2014. doi: Leonardi, Francesca (2014) Self-Assembled Monolayers (SAMs) dans Organic Field-Effect Transistors, [Dissertation thesis], Alma Mater Studiorum Università di Bologna. Dottorato di ricerca dans Chimica <<http://amsdottorato.unibo.it/view/dottorati/DOT498/>>, 26 Ciclo. DOI 10.6092/unibo/amsdottorato/6461.
- [37] Y. Zhou, C.-W. Chiu, et H. Liang, « Interfacial Structures and Properties of Organic Materials for Biosensors: An Overview », *Sensors*, vol. 12, n° 11, p. 15036-15062, nov. 2012, doi: 10.3390/s121115036.
- [38] J. C. Love, L. A. Estroff, J. K. Kriebel, R. G. Nuzzo, et G. M. Whitesides, « Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology », *Chem. Rev.*, vol. 105, n° 4, p. 1103-1170, 2005, doi: 10.1021/cr0300789.
- [39] J. Denayer, « Monocouches auto-assemblées d'organothiols mono- et bipodes sur le cuivre », UNamur - Université de Namur, 2011. [En ligne]. Disponible sur: <https://dial.uclouvain.be/pr/boreal/object/boreal:89810>
- [40] Ö. Torun, İ. Hakkı Boyacı, E. Temür, et U. Tamer, « Comparison of sensing strategies dans SPR biosensor for rapid and sensitive enumeration of bacteria », *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 37, n° 1, p. 53-60, 2012, doi: 10.1016/j.bios.2012.04.034.
- [41] E. Mauriz, M. C. García-Fernández, et L. M. Lechuga, « Towards the design of universal immunosurfaces for SPR-based assays: A review », *TrAC Trends dans Analytical Chemistry*, vol. 79, p. 191-198, 2016, doi: 10.1016/j.trac.2016.02.006.
- [42] H. Vaisocherová, V. M. Faca, A. D. Taylor, S. Hanash, et S. Jiang, « Comparative study of SPR and ELISA methods based on analysis of CD166/ALCAM levels dans cancer and control

- human sera », *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 24, n° 7, p. 2143-2148, 2009, doi: 10.1016/j.bios.2008.11.015.
- [43] A. C. Marques, P. J. Costa, S. Velho, et M. H. Amaral, « Functionalizing nanoparticles with cancer-targeting antibodies: A comparison of strategies », *Journal of Controlled Release*, vol. 320, p. 180-200, 2020, doi: 10.1016/j.jconrel.2020.01.035.
- [44] G. T. Hermanson, *Bioconjugate techniques*, Third edition. Amsterdam Boston Heidelberg: Academic Press, an imprint of Elsevier, 2013.
- [45] R. A.- Meza, « Functionalization strategies for the development of innovative biochips », phdthesis, Université Grenoble Alpes, 2018. [En ligne]. Disponible sur: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-02006722>
- [46] K. Isozaki *et al.*, « Robust Surface Plasmon Resonance Chips for Repetitive and Accurate Analysis of Lignin–Peptide Interactions », *ACS Omega*, vol. 3, n° 7, p. 7483-7493, 2018, doi: 10.1021/acsomega.8b01161.
- [47] D. Shetty, J. K. Khedkar, K. Min Park, et K. Kim, « Can we beat the biotin–avidin pair?: cucurbit[7]uril-based ultrahigh affinity host–guest complexes and their applications », *Chemical Society Reviews*, vol. 44, n° 23, p. 8747-8761, 2015, doi: 10.1039/C5CS00631G.
- [48] S. Q. Hutsell, R. J. Kimple, D. P. Siderovski, F. S. Willard, et A. J. Kimple, « High affinity immobilization of proteins using biotin- and GST-based coupling strategies », *Methods Mol Biol*, vol. 627, p. 75-90, 2010, doi: 10.1007/978-1-60761-670-2_4.
- [49] M. Leeman, W. M. Albers, R. Bombera, J. Kuncova-Kallio, J. Tuppurainen, et L. Nilsson, « Asymmetric flow field-flow fractionation coupled to surface plasmon resonance detection for analysis of therapeutic proteins dans blood serum », *Anal Bioanal Chem*, vol. 413, n° 1, p. 117-127, janv. 2021, doi: 10.1007/s00216-020-03011-x.

Chap. III. Instrumentation

Dans ce premier chapitre expérimental, nous présentons d'abord les deux bancs de mesure qui fonctionnent sur un principe de lecture du capteur différent.

Le premier fonctionne en interrogation angulaire et le second en interrogation spectrale, ce dernier étant celui utilisé dans l'équipement de terrain développé dans le projet *BIOSENS* : la valisette (de test).

Nous discutons ensuite l'interprétation des résultats bruts issus de la lecture des capteurs et les propriétés de l'analyse d'interactions biomoléculaires qui peuvent en être déduites.

Nous poursuivons avec la présentation des capteurs utilisés lors cette étude ainsi que l'étalonnage des deux bancs expérimentaux.

III.1 Matériels et méthodes

III.1.1 Matériels

III.1.1.1 Interrogation angulaire

Le premier banc de caractérisation utilisé au cours de ce travail (**Figure III. 1**) repose sur une technique d'interrogation angulaire en configuration Kretschmann (cf. § II.1.3.2) et utilise une source laser monochromatique de longueur d'onde 1550 nm. Le faisceau lumineux issu de la fibre monomode est d'abord collimaté, puis polarisé et finalement focalisé sur la face inférieure du capteur déposé sur un prisme hémicylindrique en verre H-ZF1 ($n \approx 1.62$ à 1550 nm). Après réflexion sur le capteur, le faisceau est détecté par une caméra InGaAs. La résonance du plasmon de surface se manifeste par une ligne sombre se situant dans un spot blanc correspondant au faisceau réfléchi (**Figure III. 2**). Le signal récupéré est post-traité par un programme permettant d'ajuster la courbe et de déterminer l'angle de résonance [1].

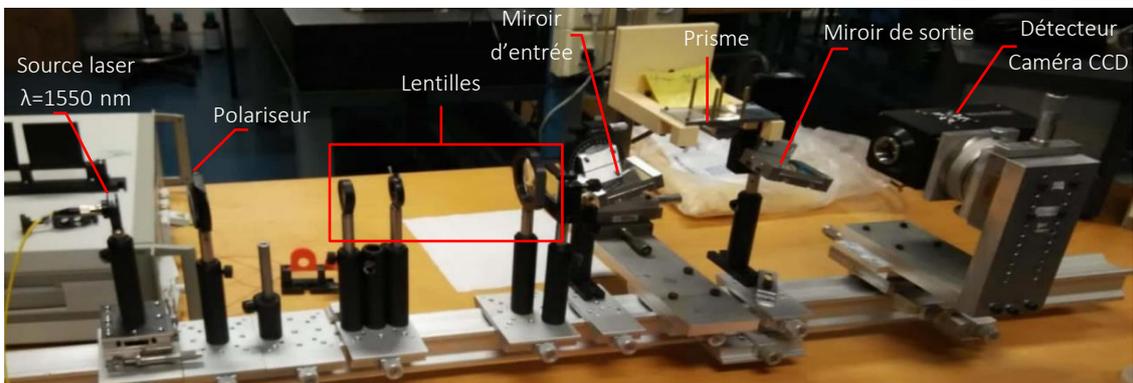


Figure III. 1 : Banc de détection en interrogation angulaire.

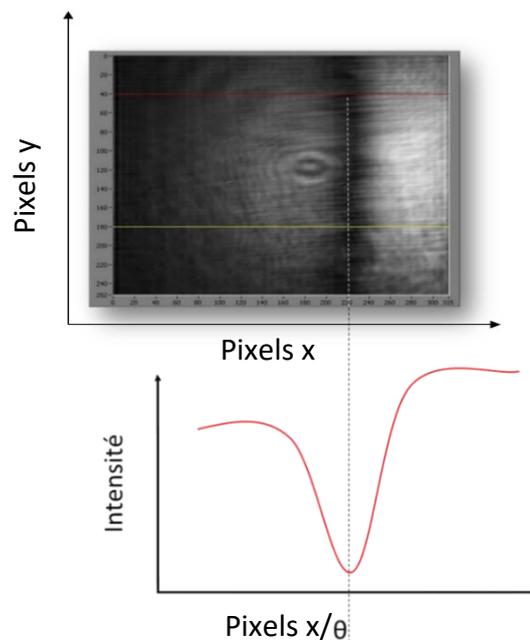


Figure III. 2 : Réponse SPR en interrogation angulaire expérimentale: image de caméra (haut) et profil d'intensité correspondant schématisé (bas).

Chapitre III : Instrumentation

III.1.1.2 Interrogation spectrale

Le prototype du banc de détection utilisant une interrogation spectrale (1 voie de détection) a été développé au laboratoire mais a rapidement été transféré vers le partenaire Multitel du projet BIOSENS afin d'être intégré dans le démonstrateur de l'équipement portable avec 4 voies de détection. Les différentes expérimentations reportées dans ce manuscrit faisant appel à la détection spectrale ont donc été effectuées sur ce démonstrateur dénommé par la suite "valisette" (**Figure III. 3**). Le banc de détection en interrogation spectrale est équipé d'une source lumineuse polychromatique (1) (lampe tungstène) dans la gamme du spectre visible couplée à une fibre optique de 400 μm de diamètre de cœur (THORLABS, M28L01, $\varnothing 400\ \mu\text{m}@0.39\ \text{NA}$). En sortie de fibre, le faisceau traverse un ensemble optique formé d'un extenseur de diamètre de faisceau, d'une lentille collimatrice (2), d'un diviseur de faisceau (permettant d'obtenir 4 faisceaux optiques), d'un polariseur (3) et d'un prisme BK7 à angle droit (4). L'ensemble est intercalé entre deux prismes (5) permettant un alignement linéaire des éléments optiques. En sortie du chemin optique, un ensemble de collimation permet de renvoyer les 4 faisceaux vers quatre fibres optiques (6), chacune d'entre elles alimentant un canal du spectromètre de mesure. Un cinquième canal servant de signal de référence est alimenté par un petit miroir en sortie de la première lentille collimatrice (2) [2].

La valisette comprend aussi quatre mini-pompes péristaltiques (7) qui alimentent chacune un canal microfluidique du capteur. Les canaux sont matérialisés par un capot réalisé en PDMS (*cf.* § IV.1.3) dont l'étanchéité est assurée par clamage par pression sur la surface du capteur.

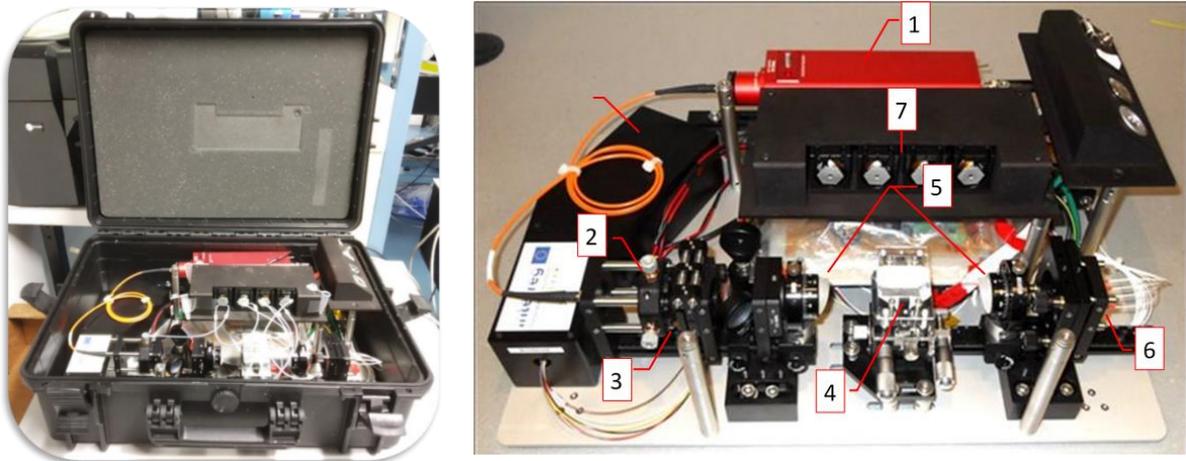


Figure III. 3 : Valisette de test (gauche) et équipement de lecture seul (droite).

La résonance du plasmon de surface se manifeste par une "baisse/ chute de l'intensité de la lumière réfléchi" dans le spectre du faisceau réfléchi (**Figure III. 4**).

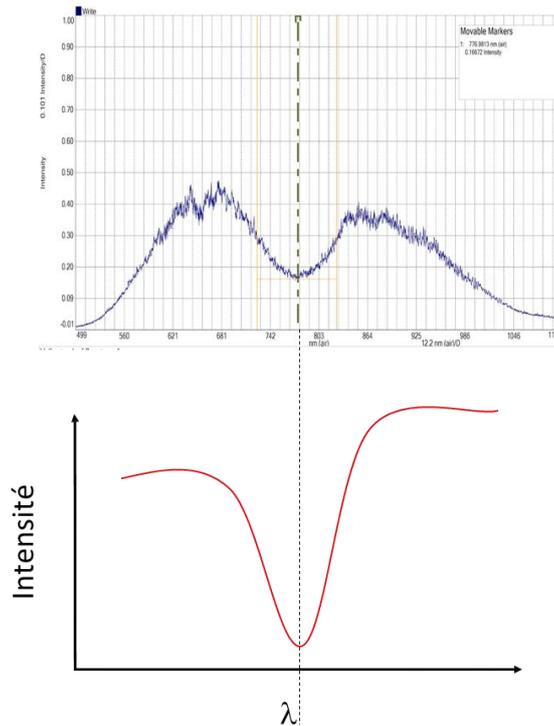


Figure III. 4 : Réponse SPR en interrogation spectrale expérimentale: spectrogramme (haut) et schématique (bas).

III.1.2 Méthodes de suivi du déplacement de la réponse SPR

Deux techniques sont majoritairement implémentées pour le suivi de la variation de la réponse SPR: déplacement du minimum de réflectivité et variation d'intensité:

- déplacement du minimum: l'intégralité de la réponse (cf. Figure III.2 pour l'interrogation angulaire et III.4 pour l'interrogation spectrale) est analysée
- variation d'intensité: on ne s'intéresse ici qu'à l'évolution de l'intensité en un seul point de la réponse SPR, à un angle ou une longueur d'onde fixé. Cette technique est communément appelée SPRi (SPR en intensité).

Dans ce travail, la technique du suivi du déplacement du minimum a principalement été utilisée. Nous présentons ci-dessous les différentes méthodes utilisées pour assurer ce suivi. En dernier lieu, nous présenterons la technique SPRi. Celle-ci a été implémentée, notamment sur le banc en interrogation angulaire, mais pas vraiment utilisée.

III.1.2.1 Déplacement du minimum

Il s'agit d'une technique dans laquelle l'algorithme détecte le minimum d'intensité de la réponse SPR sur le signal "brut", généralement filtré, issu du détecteur, caméra ou spectromètre. Le composant détecteur étant soit une matrice soit une barrette linéaire de détecteurs, le niveau élémentaire de détection est un pixel. En fonction du schéma d'interrogation utilisé, la position angulaire ou spectrale du minimum est alors déterminée (**Figure III. 5**). Comme mentionné plus haut, cette méthode est simple et ne nécessite pas de post-traitement élaboré de la courbe de réponse mais elle est aussi la moins précise.

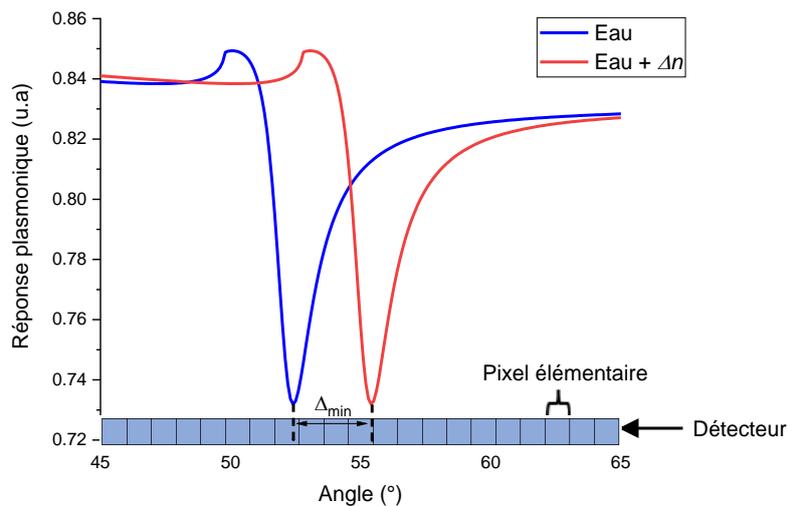


Figure III. 5 : Méthode de suivi du minimum de la réponse SPR (interrogation angulaire).

III.1.2.2 Calcul du centroïde

Cette méthode de suivi schématisée dans la **Figure III. 6** (ici dans le cas d'une interrogation angulaire mais le principe est identique pour une interrogation spectrale) repose sur le calcul du centroïde de la réponse SPR, qui s'apparente au calcul du barycentre de la "baisse/ chute de l'intensité de la lumière réfléchié" observé dans celle-ci. La détermination de ce barycentre amène alors une beaucoup plus grande précision sur la valeur du déplacement de la réponse plasmonique. Il faut néanmoins choisir judicieusement les limites du domaine pris en compte pour le calcul de ce barycentre. Chose étant faite, elle permet de s'adapter assez facilement à tout type de variation d'indice de réfraction (faible, moyenne et forte).

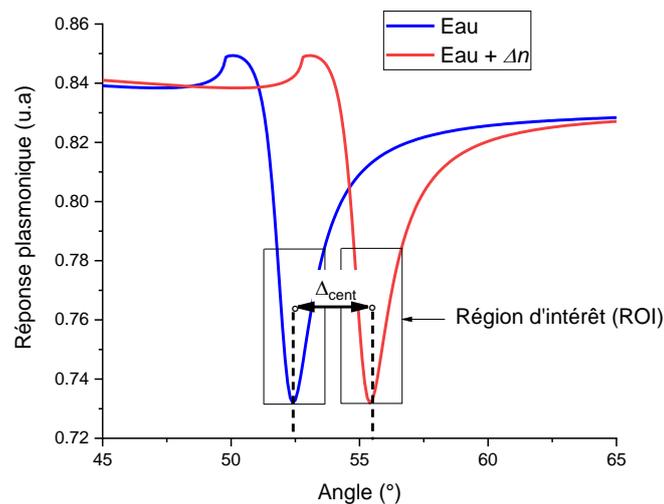


Figure III. 6 : Méthode de suivi par calcul du centroïde (interrogation angulaire).

III.1.2.3 Variation d'intensité

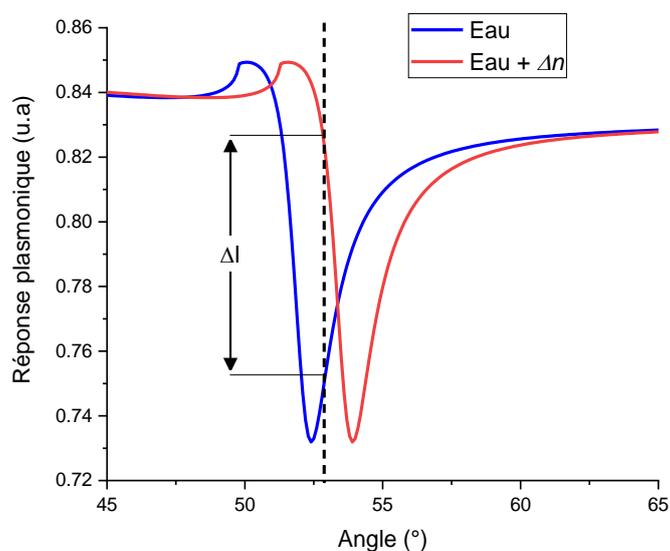


Figure III. 7 : Méthode de suivi de l'intensité (interrogation angulaire)

Cette méthode suit la variation d'intensité à un angle ou longueur d'onde donné (**Figure III. 7**). Elle impose de se fixer un lieu d'observation, angle ou longueur d'onde, et d'en suivre la variation d'intensité en fonction du déplacement de la réponse SPR. La résolution est liée à la résolution en niveau de gris de l'élément détecteur. Elle s'applique bien aux faibles déplacements et est alors d'autant plus précise que la largeur à mi-hauteur de la réponse SPR est faible.

III.1.2.4 Ajustement de courbe

Cette méthode n'en est, en soi, pas réellement une; il s'agit d'un post-traitement des données consistant à continuellement calculer une courbe polynomiale ajustée à la réponse SPR et le déplacement est alors calculé, non plus sur les courbes expérimentales mais sur leur représentation polynomiale. Un calcul de centroïde (ou d'intensité) est alors utilisé pour suivre le déplacement, cette fois sur des courbes "pures". C'est cette technique de suivi qui a été implémentée dans la valisette sur la base d'un calcul de centroïde d'une réponse spectrale.

III.1.3 Performances de l'analyse SPR

Les performances d'une analyse SPR sont principalement caractérisées par quatre paramètres, à savoir, sa sensibilité, sa résolution, sa limite de détection (LOD) et sa gamme dynamique [3]. Seule la détermination théorique de la sensibilité amène des conclusions quant à la conception du capteur. Les autres paramètres font intervenir des caractéristiques de l'ensemble de l'équipement de lecture.

III.1.3.1 Sensibilité

La sensibilité de détection d'un capteur SPR, S , est exprimée par l'Eq. III.1. Elle est définie comme le rapport de la variation du paramètre relatif au schéma d'interrogation utilisé, ΔP , à la variation de l'indice de réfraction, Δn (Figure III. 8) [3–5]. ΔP représente la variation soit de l'intensité du signal (ΔI), soit de l'angle ($\Delta\theta$) ou encore longueur d'onde ($\Delta\lambda$), pour respectivement une interrogation en intensité, angulaire ou spectrale.

$$S = \frac{\Delta P}{\Delta n} \quad \text{Eq. III. 1}$$

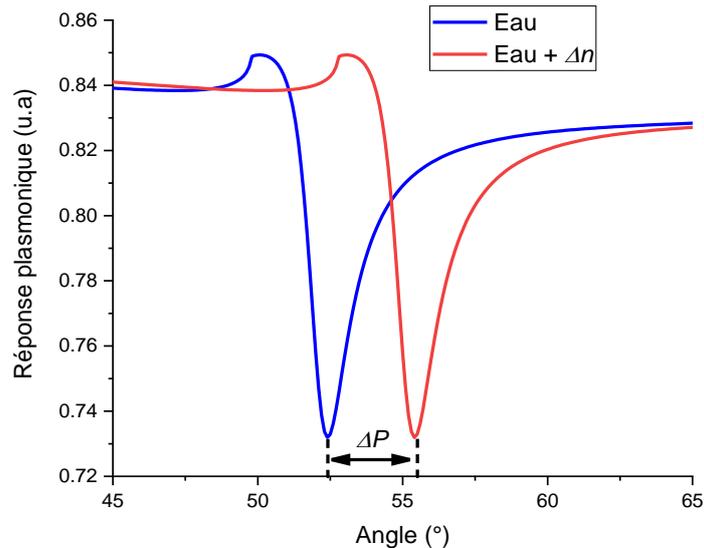


Figure III. 8 : Détermination de la sensibilité.

En pratique, cette valeur est disponible après le traitement des données, i.e. après filtrage de la courbe SPR "brute" et application du traitement retenu, centroïde, ajustement de courbe...

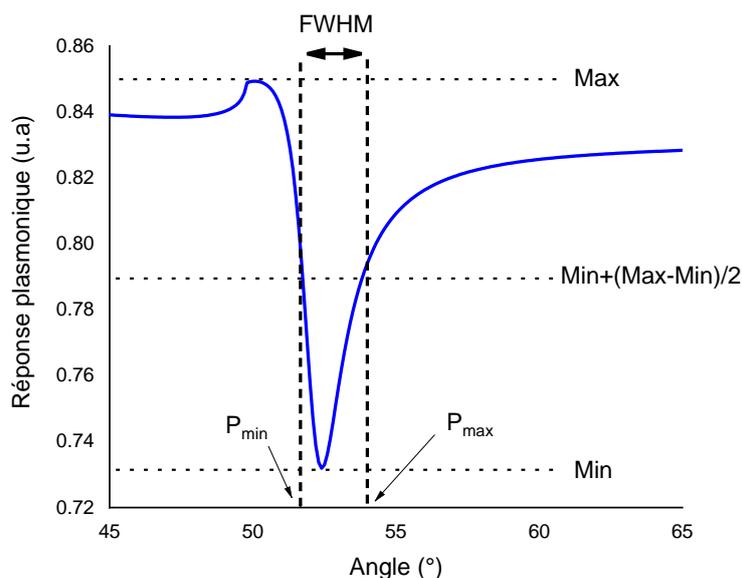


Figure III. 9 : Largeur à mi-hauteur de la réponse SPR (ici dans le cas d'une interrogation angulaire).

Un paramètre complémentaire qui est souvent mentionné est la largeur à mi-hauteur (FWHM, en anglais), tel que son nom l'indique détermine la largeur à la moitié de l'amplitude de la réponse SPR (interrogation angulaire ou spectrale). Cette définition simple est néanmoins quelque peu délicate à interpréter. La valeur du FWHM est facilement accessible sur les courbes de réponse SPR théoriques (*Figure III. 9*) bien que l'on puisse toujours se poser la question d'où se situe la référence du maximum (1 ou maximum de la réponse SPR).

En pratique, l'excursion pleine échelle de la réponse SPR est généralement plus délicate à appréhender, principalement au niveau de son maximum, qui peut alors être lié à des limitations apportées par des éléments constitutifs du système de mesure dans son intégralité comme la surface de la tâche observée en interrogation angulaire ou le spectre de la source large bande ou encore la réponse du spectromètre de mesure en interrogation spectrale. Cette notion de FWHM est néanmoins un bon critère d'appréciation de la finesse de la réponse SPR lorsque l'on optimise théoriquement la valeur de l'épaisseur de la couche plasmonique du capteur, les critères entrant dans sa détermination étant alors beaucoup plus simples à homogénéiser sur les courbes théoriques. La valeur du FWHM s'exprime par l'*Eq. III.2*.

$$FWHM = P_{max} - P_{min} \text{ (voir Figure III. 9)} \quad \text{Eq. III. 2}$$

où P est soit une valeur d'angle ou de longueur d'onde suivant le schéma d'interrogation utilisé. La figure de mérite (FOM) est un paramètre, lui aussi complémentaire, défini comme le rapport entre la sensibilité et la largeur à mi-hauteur de la réponse SPR (*Eq. III.3*).

$$FOM = \frac{S}{FWHM} \quad \text{Eq. III. 3}$$

Ces différents paramètres sont principalement exploités pour l'optimisation théorique de la surface métallique à choisir pour le capteur plasmonique en fonction de son utilisation. Bien qu'ils puissent tout aussi bien être utilisés en pratique, ils sont alors souvent entachés de l'influence de la mise en œuvre expérimentale.

III.1.3.2 Résolution

La résolution est la valeur de la variation d'indice minimale, Δn , qui permet de fournir une valeur détectée différente. Théoriquement, cette valeur n'a pas vraiment de signification, pratiquement elle fait principalement intervenir le traitement des données qui est effectué.

III.1.3.3 Limite de détection (LOD)

La limite de détection est la valeur minimale de la variation d'indice, Δn , qui permet d'obtenir un signal détecté. Elle est donc intimement liée au niveau de bruit du système de lecture, au traitement des données utilisé et au contraste de la réponse. Ce dernier point est d'autant plus important pour les détections basées sur une valeur d'amplitude: interrogation angulaire et en intensité. Habituellement la limite de détection est approximée à trois fois le niveau de bruit [6,7].

III.1.3.4 Dynamique de mesure

La dynamique de mesure est l'intervalle compris entre la limite de détection et la valeur maximale de la variation d'indice pouvant être détectée. Cette limite haute est généralement

Chapitre III : Instrumentation

liée à l'équipement de mesure soit par la déviation angulaire maximale (interrogation angulaire) soit par l'étendue spectrale de la source ou du spectromètre (interrogation spectrale) pouvant être obtenue. Le traitement des données intervient peu, voire pas dans cette valeur, c'est plutôt une limite matérielle.

III.1.4 Capteurs utilisés

La modélisation de la réponse SPR d'un capteur en fonction de sa structure (matériau support, nature et épaisseur de la couche métallique) a été développée au laboratoire depuis plusieurs années [3] et a été reprise récemment [8] pour la conception des capteurs utilisés dans ce travail. Je ne rappellerai ici que les résultats des simulations effectuées permettant de concevoir les capteurs qui seront employés sur chacun des équipements de lecture utilisés (*cf.* § III.1.1):

- l'un utilisant une interrogation angulaire et fonctionnant à une longueur d'onde de 1,55 μ m [3]. Le couplage optique se fait via un prisme en verre H-ZF1, le support du capteur sera donc constitué de ce même verre.
- l'autre (valisette) utilisant une interrogation spectrale dans le domaine visible et proche infra-rouge [8]. Le couplage optique se fait via un prisme en verre BK7, le support du capteur sera donc constitué de ce même verre.

La simulation prend donc en compte le type de support utilisé, verre BK7 ou H-ZF1, l'épaisseur du film d'or réalisant la couche plasmonique et un film intermédiaire en titane de l'ordre de quelques nanomètres servant de couche d'accroche de l'or sur le substrat en verre.

III.1.4.1 Interrogation angulaire

La **Figure III. 10** présente les paramètres caractéristiques - sensibilité, FWHM, FOM et contraste - de la courbe SPR en fonction de l'épaisseur de la couche plasmonique, comprise entre 30 et 50 nm. Il ressort que la sensibilité est globalement indépendante de l'épaisseur. En revanche, la valeur à mi-hauteur est d'autant plus faible que l'épaisseur est importante; d'où conjointement une augmentation de la figure de mérite avec celle du film d'or. Néanmoins, on s'aperçoit que le contraste de la réponse diminue très vite lorsque l'épaisseur du film d'or augmente. Une valeur de film d'or de 35 nm a été choisie en compromis, elle donne une valeur de figure de mérite de l'ordre de 100 mais surtout conserve un contraste supérieur à 95%.

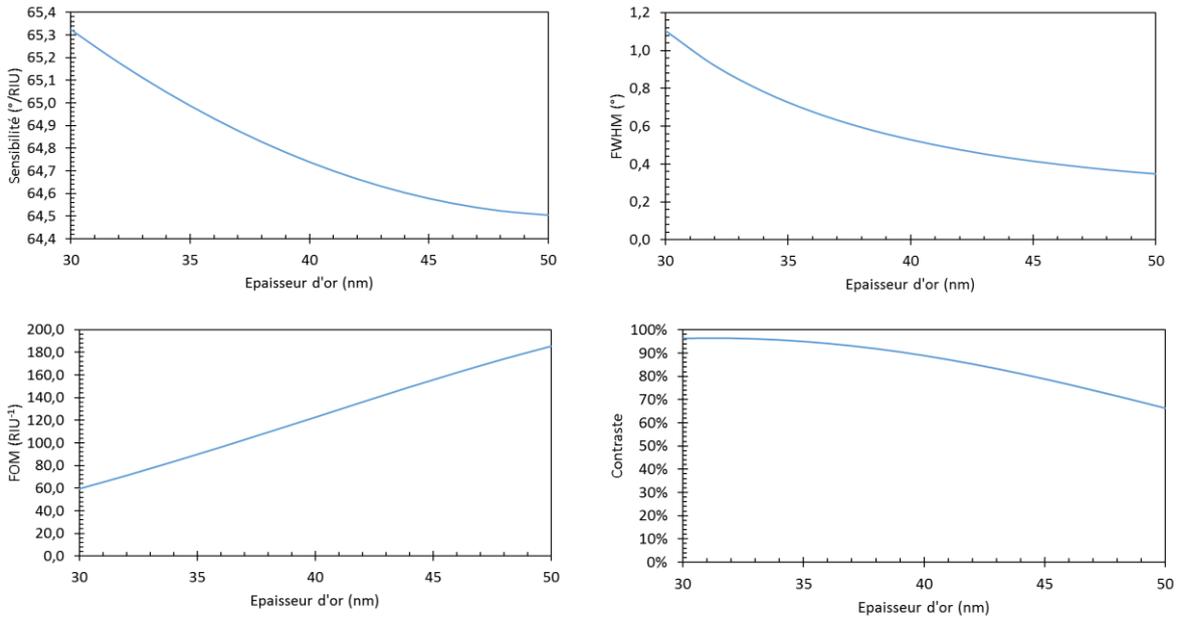


Figure III. 10 : Interrogation angulaire à 1550 nm: sensibilité, FWHM, FOM et contraste d'un capteur sur substrat H-ZF1 en fonction de l'épaisseur du film d'or (couche plasmonique).

III.1.4.2 Interrogation spectrale

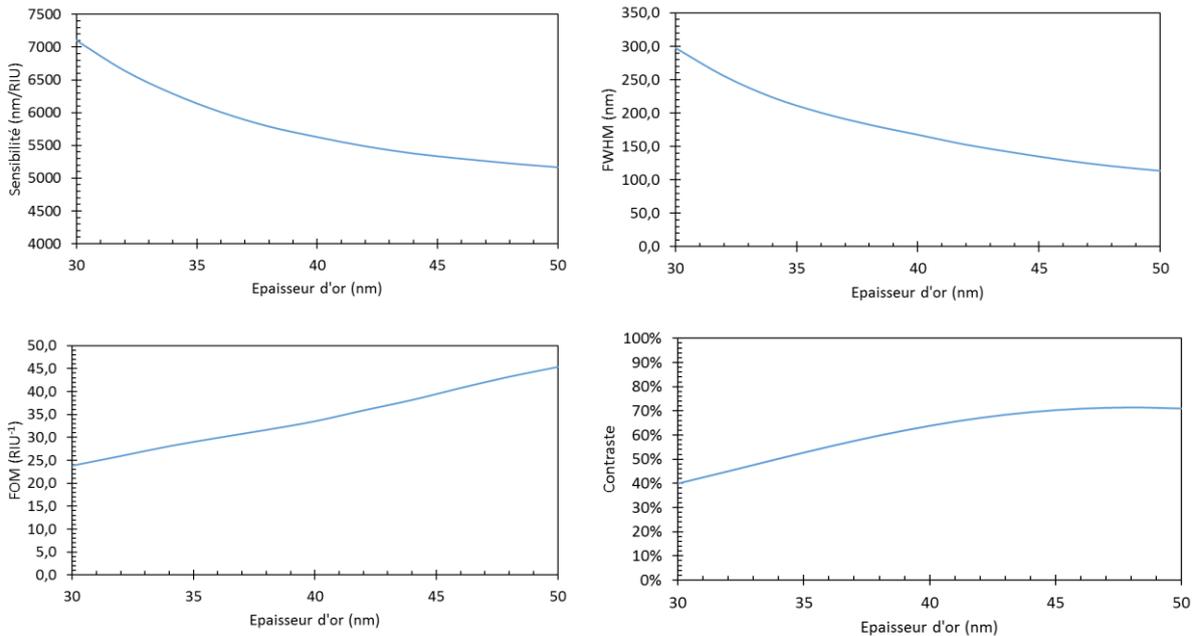


Figure III. 11 : Interrogation spectrale sur la gamme 500-1000nm: sensibilité, FWHM, FOM et contraste d'un capteur sur substrat BK7 en fonction de l'épaisseur du film d'or (couche plasmonique).

La **Figure III. 11** présente les paramètres caractéristiques - sensibilité, FWHM, FOM et contraste de la courbe SPR en fonction de l'épaisseur de la couche plasmonique, comprise entre 30 et 50 nm. On remarque que le contraste est moins marqué que dans l'interrogation angulaire mais l'intensité du signal n'est pas ici porteuse de l'information utile; néanmoins un contraste élevé sera toujours préférable pour le traitement des données. La figure de mérite

Chapitre III : Instrumentation

va donc ici prévaloir et une valeur de film d'or de 48 nm donne la valeur de figure de mérite maximale de l'ordre de 54 en affichant une valeur de contraste elle aussi maximale.

Néanmoins, dans un premier temps, afin de globaliser la fabrication des capteurs, une surface plasmonique identique à celle utilisée pour le banc angulaire, i.e. de 35 nm d'épaisseur a été utilisée (mais cette fois-ci sur support en verre BK-7), la sensibilité des deux capteurs étant théoriquement identique.

Le **Tableau III. I** résume la configuration et les performances théoriques de ces deux capteurs.

| Capteurs | Couche d'accroche | Couche plasmonique | Sensibilité (nm/RIU) | FWHM (nm) | FOM |
|------------------------|-------------------|--------------------|----------------------|-----------|-----|
| Capteur 1 (capteur 35) | 2 nm Ti | 35 nm Au | 6150 | 213 | 29 |
| Capteur 2 (capteur 48) | 2 nm Ti | 48 nm Au | 5230 | 121 | 43 |

Tableau III. I : Paramètres et performances des deux capteurs utilisés pour l'étalonnage du banc spectral « valisette ».

III.1.5 Etalonnage

Les résultats issus des deux bancs de lecture utilisés, en interrogation angulaire et spectrale, sont fournis respectivement en pixel et en longueur d'onde (via une conversion pixel – longueur d'onde incluse dans le spectromètre). Bien que suffisants en soi, ces résultats n'ont vraiment un sens que pour la personne effectuant la mesure et s'avèrent dénués de toute signification lorsqu'il faut en discuter. Il est alors indispensable de convertir les résultats obtenus en unités universellement utilisées, le RIU ou RU. Pour cela le déplacement soit en angle soit en longueur d'onde de la réponse SPR est calibré en utilisant des solutions d'éthylène glycol d'indice optique connu.

III.1.5.1 Calcul de l'indice de réfraction de l'éthylène glycol

L'étalonnage des bancs optiques se fait donc par injection de solutions d'éthylène glycol (EG) (dilution dans de l'eau dé-ionisée) à différentes concentrations (en poids) dont l'indice de réfraction est calculé à l'aide d'un modèle mathématique. Celui-ci a été établi à l'aide d'un logiciel spécialisé (en l'occurrence *DesignExpert* de *StatEase*[®]): à partir de l'indice de réfraction expérimental de solutions d'EG reporté dans la littérature [9], l'*Eq.III.4* est déterminée en fonction des concentrations d'eau et d'EG. L'analyse de variance donne un coefficient de détermination $R^2 = 0,9998$.

$$\begin{aligned} n = & (1,42598 \times [EGlycol]) + (1,33297 \times [Eau]) \\ & + (0,0144768 \times [EGlycol] \times [Eau]) \\ & + (0,0176573 \times [EGlycol] \times [Eau] \times ([EGlycol] - [Eau])) \quad \text{Eq. III. 4} \\ & + (0,00273757 \times [EGlycol] \times [Eau] \\ & \times ([EGlycol] - [Eau])^2) \end{aligned}$$

avec n : indice de la solution composée de *EGlycol*: pourcentage en poids d'éthylène glycol et *Eau*: pourcentage en poids d'eau (= 100% - *EGlycol*).

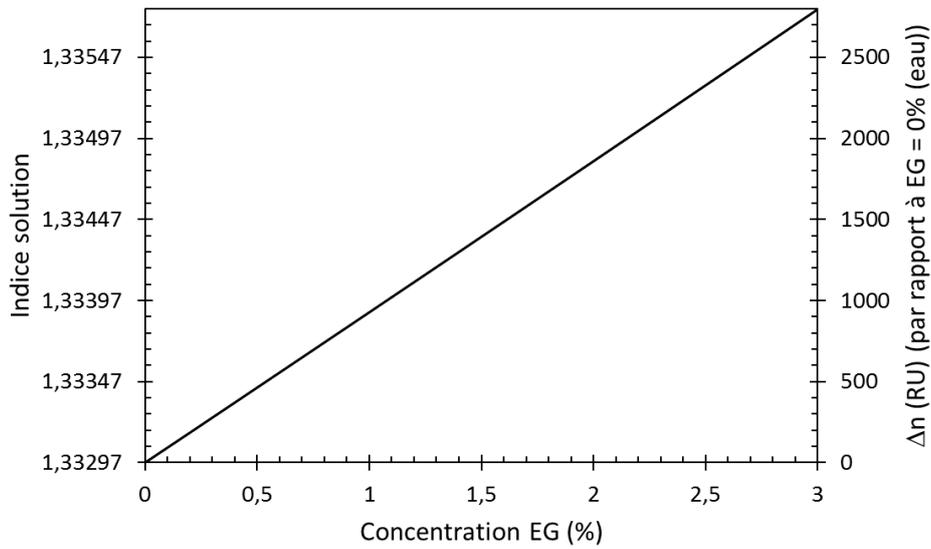


Figure III. 12 : Valeurs théoriques de l'indice de réfraction de solutions d'EG en fonction de la concentration en EG. La variation de cet indice par rapport à celui de l'eau est aussi donnée (en RU) car c'est principalement cette valeur qui est utilisée pour la détermination de la courbe d'étalonnage.

Les variations d'indice que l'on aura à traiter sont faibles et des dilutions très fortes d'EG sont nécessaires pour les obtenir. La **Figure III. 12** représente la valeur de l'indice de réfraction en fonction de la concentration en EG. Il y est aussi représenté l'écart de valeur d'indice, Δn , de ces solutions avec celui de l'eau (en RU). Pour ces fortes dilutions (%EG faible), l'*Eq. III. 4* peut s'approximer par :

$$\Delta n (RU) \approx 93127 \times EGlycol (\% \text{ poids}) \qquad \text{Eq. III. 5}$$

III.1.5.2 Interrogation angulaire

III.1.5.2.1 Sensibilité

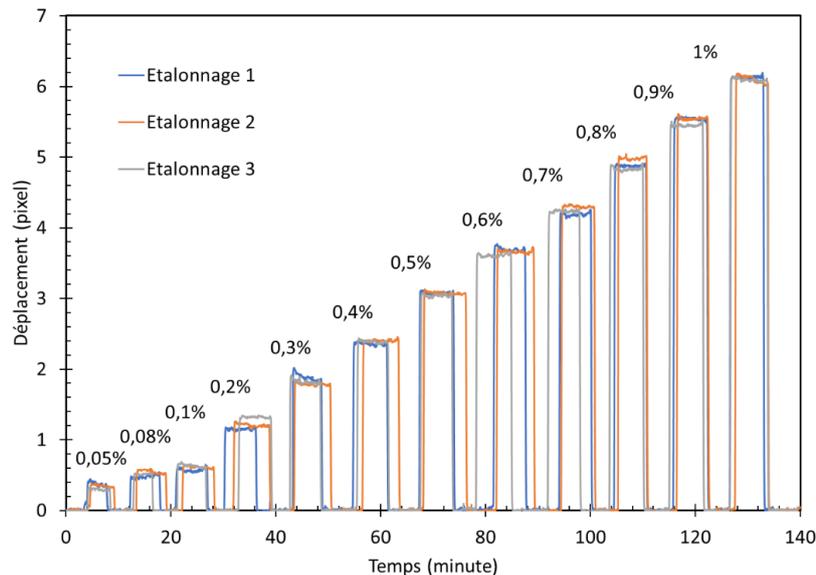


Figure III. 13 : Sensorgramme de solutions d'éthylène glycol à différentes concentrations. Le niveau de base correspond à l'injection d'eau dé-ionisée.

La **Figure III. 13** montre les sensorgrammes collectés lors de trois tests d'étalonnage du banc angulaire avec des solutions d'EG ayant des concentrations en EG de 0,05 à 1%. Un rinçage à l'eau dé-ionisée est effectué entre chaque injection de solution différente d'EG. La ligne de base du sensorgramme représente donc le signal obtenu avec de l'eau dé-ionisée tandis que les différents niveaux hauts représentent ceux obtenus avec les solutions d'EG. L'écart entre ces différents niveaux correspond au déplacement de la courbe de résonance du plasmon après traitement des données, à savoir pour ce banc, filtrage, normalisation et calcul du centroïde.

Sur la **Figure III. 13**, la valeur du déplacement est initialement exprimée en pixels. Une moyenne à la fois temporelle (sur la durée du créneau correspondant à chaque injection) et sur les trois mesures est effectuée pour déterminer la moyenne du déplacement en pixel pour chaque concentration. Le déplacement en pixel obtenu est relié à la concentration injectée (axe horizontal bas de la **Figure III. 14**) et à la variation d'indice correspondante (axe horizontal haut de la **Figure III. 14**) à l'aide de l'*Eq. III.5*. La pente de cette courbe d'étalonnage donne la correspondance entre déplacement (en pixel) et variation d'indice (en RU) (*Eq. III.6*); ce coefficient permettra de convertir les résultats bruts de mesure en RU.

$$\Delta n (RU) \approx 152,6 \times \text{déplacement (pixel)} \quad \text{Eq. III. 6}$$

$$\text{ou } \text{déplacement (pixel)} \approx 6,55E^{-3} \times \Delta n (RU)$$

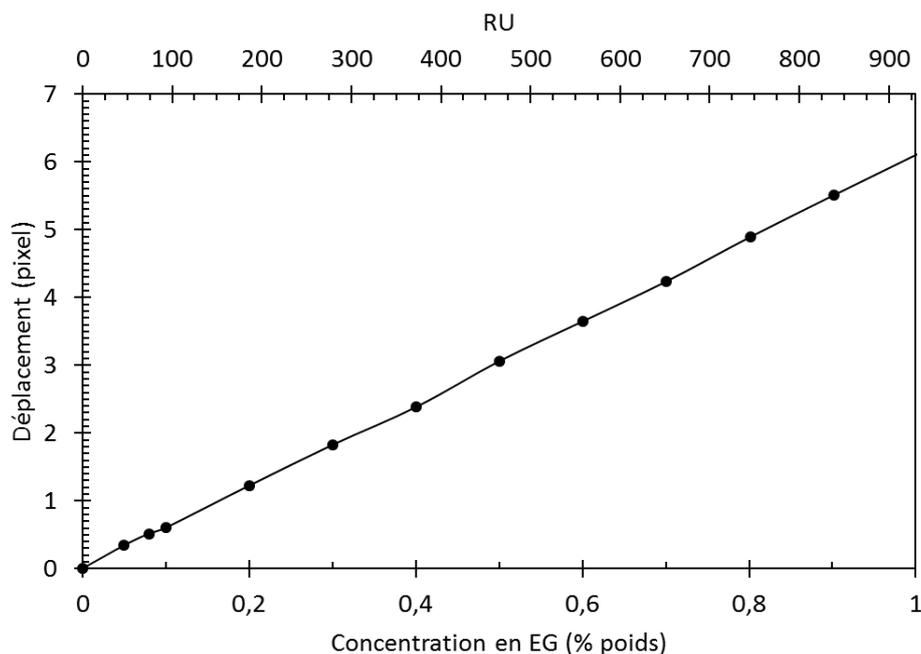


Figure III. 14 : Courbe d'étalonnage du banc de détection en interrogation angulaire.

Il est néanmoins extrêmement difficile de relier cette sensibilité expérimentale à celle prévue théoriquement (voir § III.1.4.1), celle-ci étant exprimée en °/RIU. La variation angulaire est transformée en variation linéaire (en pixel) au niveau de la caméra via les optiques de focalisation mises en jeu ainsi que les longueurs des chemins optiques.

III.1.5.2.2 Résolution

Pratiquement, il est difficile de réaliser de manière fiable des solutions avec des concentrations amenant le très faible écart d'indice de réfraction afin de déterminer la résolution du système. Celle-ci a été déterminée indirectement par la fluctuation du signal détecté alors qu'aucune variation du milieu testé n'est appliquée. Un moyennage sur l'ensemble des valeurs enregistrées lors des injections des différentes solutions reportées en **Figure III. 13** montre une valeur crête-crête de fluctuation de 0,104 pixel, ce qui correspond à 16 RU.

III.1.5.2.3 Limite de détection (LOD)

Identiquement à la résolution, il est difficile d'estimer la limite de détection à partir de solutions d'EG qui nécessiteraient de très fortes dilutions. Celle-ci a été déterminée indirectement par la fluctuation du signal du niveau de base entre les différentes injections (**Figure III. 15**), *i.e.* lorsque le détecteur sonde de l'eau. Un moyennage sur l'ensemble des valeurs enregistrées lors des expérimentations reportées en **Figure III. 13** montre une valeur crête à crête de cette fluctuation de 0,073 pixel. En adoptant le principe énoncé plus haut (§III.1.3.3), la LOD est donc estimée à 0,22 pixel soit 33 RU.

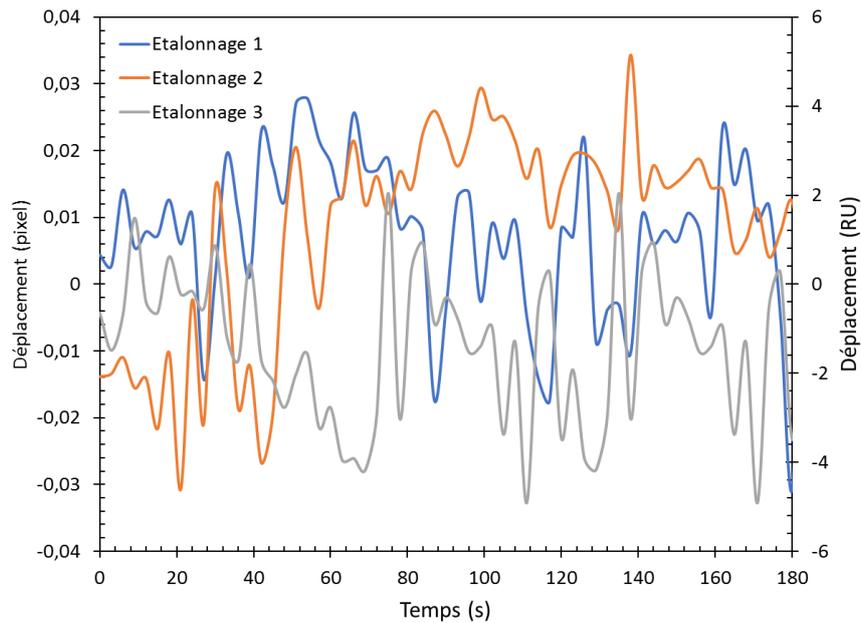


Figure III. 15 : Fluctuations du niveau de base permettant d'estimer la LOD.

III.1.5.2.4 Dynamique de mesure

Celle-ci n'a pas été évaluée mais dans ce schéma d'interrogation, elle est globalement inversement proportionnelle à la sensibilité. Plus le système optique sera dimensionné de manière à augmenter la sensibilité, *i.e.* augmenter la variation angulaire au niveau du capteur pour une certaine valeur de variation d'indice, plus la gamme de variation d'indice pouvant être mesurée sera faible, la taille du capteur étant fixe. Etant donné que nous souhaitons mesurer de faibles variations d'indice, la sensibilité de mesure a été privilégiée au détriment de sa dynamique.

III.1.5.3 Interrogation spectrale (valisette)

Un protocole identique à celui utilisé pour le banc en interrogation angulaire été utilisé pour étalonner le banc en interrogation spectrale de la valisette BIOSENS. L'étalonnage a été fait pour les deux types de capteurs présentés en §III.1.4.2. Seul l'éventail de solutions d'EG a été réduit à 6 valeurs: concentrations de 0,04 %, 0,08 %, 0,15%, 0,2%, 0,6% et 1% d'EG.

III.1.5.3.1 Sensibilité

La **Figure III. 16** représente les trois sensorgrammes d'étalonnage correspondants pour le capteur de 35 nm et 48 nm d'épaisseur de couche métallique

En suivant le même protocole (moyennage) que pour le banc angulaire, les deux courbes d'étalonnage ont pu être déterminées (**Figure III. 17**).

Le coefficient de proportionnalité, est donné par l'**Eq. III.7** pour le capteur de 35 nm d'épaisseur de film métallique:

$$\Delta n (RU) \approx 165,3 \times \text{déplacement} (nm) \quad \text{Eq. III. 7}$$

$$\text{ou } \text{déplacement} (nm) \approx 6,05E^{-3} \times \Delta n (RU) \text{ soit } 6050 \text{ nm/RIU}$$

et par l'**Eq. III.8** pour le capteur de 48 nm d'épaisseur de film métallique:

$$\Delta n (RU) \approx 163,4 \times \text{déplacement (nm)} \quad \text{Eq. III. 8}$$

ou $\text{déplacement (nm)} \approx 6,12E^{-3} \times \Delta n (RU)$ soit 6120 nm/RIU

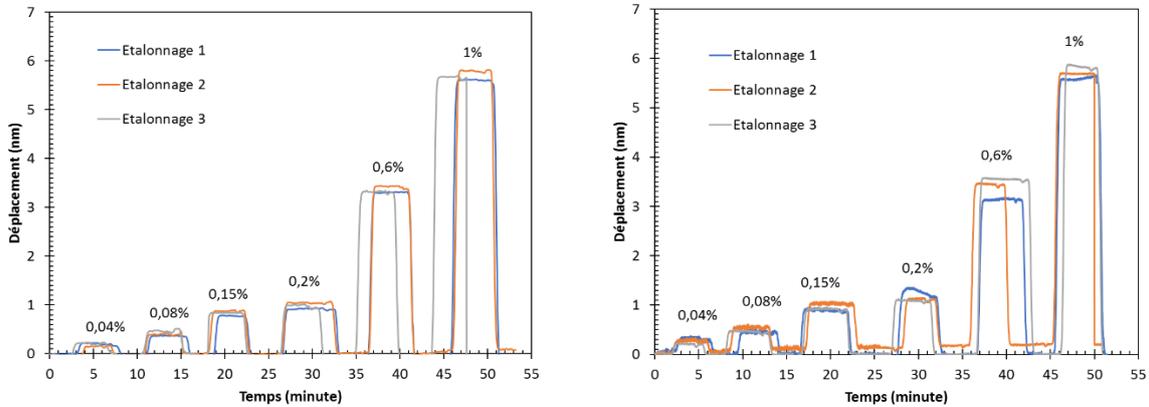


Figure III. 16 : Sensorgrammes de solutions d'éthylène glycol à différentes concentrations. Le niveau de base correspond à l'injection d'eau dé-ionisée pour le capteur avec une couche métallique de 35 nm (gauche) et 48 nm (droite).

Nous obtenons donc une valeur en bon accord avec les prévisions théoriques qui étaient de 6150nm/RIU pour le capteur de 35 nm d'épaisseur de film métallique (cf. **Tableau III. I**). Une valeur plus importante que prévue est observée pour le capteur de 48 nm d'épaisseur de film métallique puisque celle-ci équivaut expérimentalement à celle du capteur de 35 nm alors qu'elle aurait dû se positionner environ 10% en-dessous.

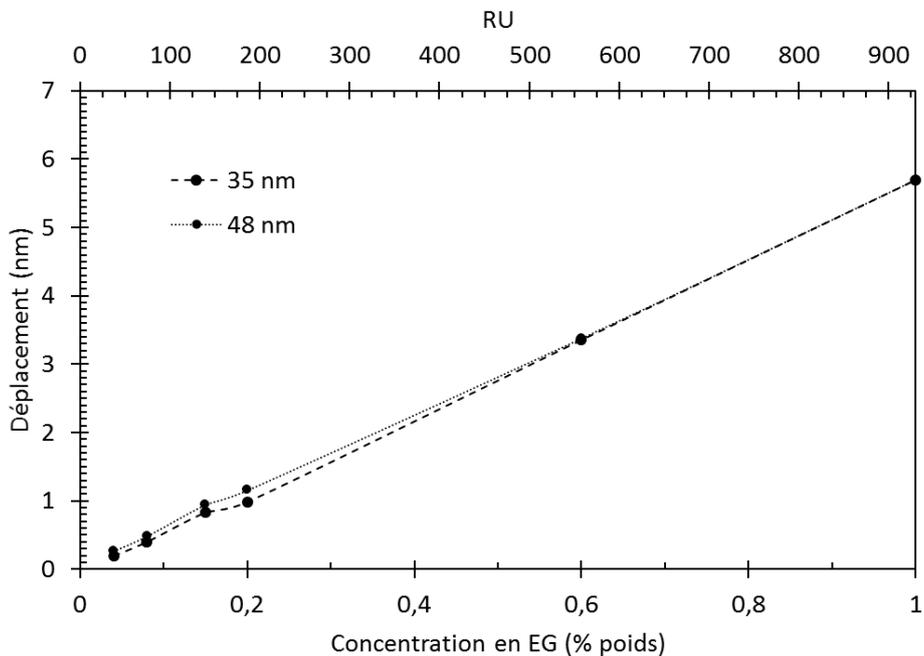


Figure III. 17 : Courbe d'étalonnage du banc de détection en interrogation spectrale (valisette) pour le capteur avec une couche métallique de 35 nm et 48 nm d'épaisseur.

Chapitre III : Instrumentation

III.1.5.3.2 Résolution

La valeur crête-crête de fluctuation a été déterminée à 0,153 nm pour les deux types de capteurs, ce qui donne une résolution de l'ordre de 25 RU quel que soit le capteur.

III.1.5.3.3 Limite de détection (LOD)

Une valeur crête à crête de la fluctuation du niveau de base de 0,144 nm et 0,146 nm a été obtenue pour respectivement le capteur de 35 et 48 nm d'épaisseur de métallisation. La limite de détection correspondante est donc de 0,432 nm et 0.438 nm, valeurs qui donnent toutes deux une limite de détection proche de 72 RU.

III.1.5.3.4 Dynamique de mesure

Ici aussi, la dynamique n'a pas été particulièrement mesurée. Pour ce type d'interrogation, elle est principalement limitée par le spectre d'émission de la source large bande utilisée et/ou la gamme spectrale de mesure du spectromètre. Dans notre cas, c'est plus particulièrement l'allure du spectre d'émission de la source qui limite cette dynamique, son profil, spectral plus ou moins gaussien, diminuant assez rapidement le contraste de la réponse et alors la fidélité de l'ajustement de courbe utilisé.

III.2 Conclusion

Dans ce chapitre nous avons présenté les deux bancs de détection utilisés par la suite, le premier emploie une interrogation angulaire et le second une interrogation spectrale. Le second est le cœur de l'équipement de mesure portable développé au cours du projet BIOSENS, dénommé "valisette". Les deux systèmes ont été étalonnés à l'aide de solutions d'éthylène glycol dont l'indice de réfraction a été calculé *via* un modèle mathématique.

Trois capteurs ont été utilisés lors de l'étalonnage des bancs de mesures et, par la suite, des expérimentations. Leur simulation a permis de définir l'épaisseur de la couche métallique, siège du principe de résonance plasmonique de surface. Leurs caractéristiques ainsi que les performances expérimentales obtenues sur les systèmes de détection sont récapitulées dans le **Tableau III. II**.

Deux principales constatations sur ce tableau récapitulatif:

- l'interrogation angulaire affiche une meilleure résolution et limite de détection que l'interrogation spectrale. Ceci est en accord avec différents résultats de la littérature [10].
- en interrogation spectrale, les deux capteurs ont montré une sensibilité équivalente, ce que ne laissait pas prévoir la théorie. Cette observation est très probablement liée au fait que le procédé de clamping par pression du capot microfluidique peut, dans la configuration mécanique utilisée dans le prototype de valisette, influencer légèrement, de l'ordre du dixième de degré, sur le positionnement du prisme, ce qui est suffisant pour faire varier la valeur de la sensibilité de l'ordre de grandeur observé expérimentalement.

| Interrogation | Angulaire | Spectrale (valisette) | |
|----------------------------------|--------------------|-----------------------|--------------------|
| Source (λ) | 1550 nm | 500-900 nm | |
| Matériau du prisme et capteur | HZF-1 | BK-7 | |
| Couche métallique (plasmonique) | 2 nm Ti + 35 nm Au | 2 nm Ti + 35 nm Au | 2 nm Ti + 48 nm Au |
| Sensibilité | 6550 px/RIU | 6050 nm/RIU | 6120 nm/RIU |
| Résolution (estimation) | 16 RU | 25 RU | 25 RU |
| Limite de détection (estimation) | 33 RU | 72 RU | 72 RU |

Tableau III. II : Récapitulatif des paramètres des capteurs et performances en détection expérimentales obtenues sur les deux systèmes utilisés durant ce travail.

Références

- [1] J. Hottin, E. Wijaya, L. Hay, S. Maricot, M. Bouazaoui, et J.-P. Vilcot, « Comparison of Gold and Silver/Gold Bimetallic Surface for Highly Sensitive Near-infrared SPR Sensor at 1550 nm », *Plasmonics*, vol. 8, n° 2, p. 619-624, 2013, doi: 10.1007/s11468-012-9446-1.
- [2] J. Hastanin *et al.*, « Compact multichannel spectroscopic label-free biosensor platform for plant diseases point-of-care testing (POCT) », dans *Biophotonics dans Point-of-Care*, Online Only, France, 2020, p. 26. doi: 10.1117/12.2553216.
- [3] E. WIJAYA, « Design and Optimization of Surface Plasmon Resonance (SPR) Biosensors », p. 194, 2012.
- [4] S. Gan, Y. Zhao, X. Dai, et Y. Xiang, « Sensitivity enhancement of surface plasmon resonance sensors with 2D franckeite nanosheets », *Results dans Physics*, vol. 13, p. 102320, 2019, doi: 10.1016/j.rinp.2019.102320.
- [5] Q.-Q. Meng, X. Zhao, C.-Y. Lin, S.-J. Chen, Y.-C. Ding, et Z.-Y. Chen, « Figure of Merit Enhancement of a Surface Plasmon Resonance Sensor Using a Low-Refractive-Index Porous Silica Film », *Sensors (Basel)*, vol. 17, n° 8, p. 1846, 2017, doi: 10.3390/s17081846.
- [6] B. A. Prabowo, A. Purwidyantri, et K.-C. Liu, « Surface Plasmon Resonance Optical Sensor: A Review on Light Source Technology », *Biosensors*, vol. 8, n° 3, Art. n° 3, 2018, doi: 10.3390/bios8030080.
- [7] J. Homola, « Surface Plasmon Resonance Sensors for Detection of Chemical and Biological Species », *Chem. Rev.*, vol. 108, n° 2, p. 462-493, 2008, doi: 10.1021/cr068107d.
- [8] S. Ganesan, « Utilisation de la résonance plasmonique de surface pour la réalisation de capteurs appliqués au domaine phytosanitaire », Thèse de doctorat, Lille, 2020. [En ligne]. Disponible sur: <http://theses.fr/2020LILUI059>
- [9] E. T. Fogg, A. N. Hixson, et A. R. Thompson, « Densities and Refractive Indexes for Ethylene Glycol-Water Solutions », *Anal. Chem.*, vol. 27, n° 10, p. 1609-1611, 1955, doi: 10.1021/ac60106a033.
- [10] A. H.-P. Ho, S.-Y. Wu, S.-K. Kong, S. Zeng, et K.-T. Yong, « SPR Biosensors », dans *Handbook of Photonics for Biomedical Engineering*, A. H.-P. Ho, D. Kim, et M. G. Somekh, Éd. Dordrecht: Springer Netherlands, 2017, p. 123-145. doi: 10.1007/978-94-007-5052-4_38.

Chap. IV. Développement de capteurs SPR à microfluidique intégrée

A ce jour, l'analyse SPR se fait généralement en introduisant le capteur plasmonique dans l'équipement qui va en permettre la lecture. Parallèlement, cet équipement comporte un système microfluidique fonctionnant, le plus généralement, par clamage physique, ce qui facilite l'alimentation du capteur avec les solutions *ad hoc*, qu'elles soient de référence, de fonctionnalisation ou contenant les molécules d'intérêt. Les capteurs SPR commerciaux sont généralement disponibles avec une couche de greffage et, avant d'effectuer les tests d'interactions biologiques, les biologistes fonctionnalisent les capteurs sur l'équipement de mesure en fonction de leurs analyses. Par la suite, les capteurs suivent un protocole de régénération afin de les débarrasser des molécules ayant servi aux tests de détection et peuvent alors être réutilisés.

Nous présentons dans ce chapitre la mise en œuvre des capteurs plasmoniques ainsi que le développement de capteurs avec microfluidique intégrée. Ces capteurs ont été utilisés par la suite pour les études de la fonctionnalisation de surface en biomatériaux et la détection des pathogènes ciblés.

IV.1 Matériels et méthodes

IV.1.1 Banc d'interrogation

Les capteurs développés ici ont été expérimentés sur le banc en interrogation angulaire décrit au § III.1.1.1.

IV.1.2 Substrats de verre

Des lames de verre de taille 25x25 mm du même matériau que le prisme, à savoir le H-ZF1, ont été choisies pour la fabrication des capteurs afin d'éviter toute réflexion optique à l'interface prisme-capteur. Il est évident que la technique décrite ci-après peut être utilisée sur n'importe quel substrat en verre, car aucun de ses paramètres n'intervient directement dans le processus de fabrication.

IV.1.3 Le PDMS

Les systèmes microfluidiques à base de polymères utilisant le polydiméthylsiloxane (PDMS) sont de plus en plus employés depuis trois décennies. Ils sont utilisés pour la conception et le développement de Lab-On-Chips, d'appareils de diagnostic de type point-of-care (POCT) et de tout autre type de capteur fluide [1]. Leur technologie de fabrication est maintenant bien connue [2]. Le PDMS est un polymère hybride appartenant à la famille des organosilanes et peut donc être considéré comme le matériau de référence en raison de ses propriétés de biocompatibilité, d'inertie vis-à-vis des matériaux biologiques, de perméabilité, de flexibilité, de non-toxicité après durcissement ou réticulation et de facilité de manipulation. De plus, ce matériau offre également une transparence optique dans le spectre optique visible, ce qui constitue un atout pour le suivi des expériences. En outre, il offre un large éventail de solutions pour un prix abordable [3–5]. Grâce à ses propriétés intrinsèques, ce matériau adhère facilement aux surfaces siliconées comme le silicium ou le verre ou oxydées tels que l'alumine (Al_2O_3). Néanmoins, il est souvent nécessaire de recourir à un traitement au plasma pour en parfaire l'adhérence.

L'élastomère PDMS utilisé ici, le Sylgard™184 ainsi que l'agent de réticulation associé, ont été obtenus auprès de Dow®.

IV.1.4 Produits chimiques

Le (3-Mercaptopropyl) triméthoxysilane (MPTMS), l'acide 11-Mercaptoundecanoïque (11MUA), Le le (3-Aminopropyl)triméthoxysilane (APTMS) et le N-(3-Diméthylaminopropyl)-N'-éthylcarbodiimide (EDC) proviennent de Santi-mannanes (IgM 5B2)a-Aldrich®, Le N-hydroxysuccinimide (NHS) a été obtenu de chez TCI Chemicals®, l'éthanol absolu a été obtenu auprès de Carlo-Erba et les résines photosensibles SU-8 2035 et 2075 ont été achetées chez Kayaku advanced materials™. Tous les réactifs sont de qualité analytique et sont utilisés tels quels, sans purification.

IV.2 Fabrication des capteurs SPR

IV.2.1 Capteurs (surfaces plasmoniques)

La surface du capteur SPR est constituée d'une couche de Ti de 2nm agissant comme une couche d'adhérence et d'une couche métallique d'au de 35 nm qui constitue le film métallique où se propagera l'onde "plasmon". Ces couches métalliques sont déposées par évaporation par faisceau d'électrons sur les lames H-ZF1 de 25x25 mm qui ont été préalablement nettoyées dans une solution "piranha" (75% H₂SO₄ + 25% de solution de peroxyde d'hydrogène (30-35%)) pendant 5 min.

La métallisation se fait sur toute la surface du capteur. Les premières expérimentations de biodétection sur interaction ss-ADN/ss-ADN (cf. §I.4) ont été réalisées selon le principe D-SPR (Droplet-based SPR) [6] qui consiste à déposer une goutte de l'analyte à la surface du biocapteur (**Figure IV. 1**) et d'en suivre l'interaction avec la surface fonctionnalisée. Malheureusement, cette technique n'a pas permis de mener correctement le processus de détection et présentait un manque de reproductibilité. C'est pourquoi, le recours à l'utilisation d'un système microfluidique a été entrepris.

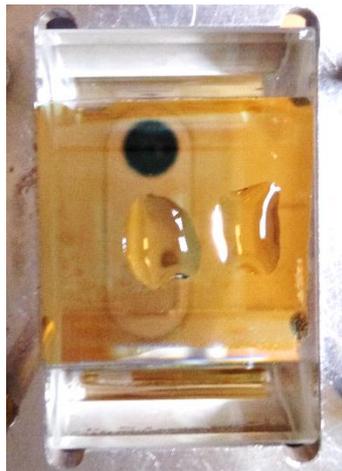


Figure IV. 1: Capteur sous test SPR en goutte (D-SPR).

IV.2.2 Capot PDMS (microfluidique)

La solution polymérique de PDMS est préparée en mélangeant l'élastomère de silicone et son agent de durcissement avec un rapport (v/v) de 10:1 comme recommandé par le fabricant. Ce mélange est versé dans une boîte de Pétri contenant un moule constitué de motifs en résine photosensible SU-8 réalisés sur un wafer de silicium 3 pouces [7,8]. Avant le coulage du PDMS, ce moule est revêtu de Téflon en utilisant un traitement plasma C₄F₈ afin de faciliter le démoulage. Les motifs correspondants au circuit microfluidique sont constitués de 4 microcanaux de dimensions 10 x 1,5 x 0,2 mm (L x l x H). Une fois le moule rempli, le PDMS est réticulé/durci à 70 °C pendant 1 heure. Enfin, le démoulage est réalisé avec une lame de coupe séparant le PDMS de la boîte de Pétri et en retirant à la main le PDMS du moule SU-8.

IV.2.3 Capteurs avec microfluidique clampée et intégrée

À ce stade, les deux parties du capteur, le capteur SPR et le capot microfluidique sont séparés.

Les premiers essais en microfluidique sur le banc en interrogation angulaire s'effectuaient en appliquant par pression le capot PDMS sur la puce plasmonique. Cette technique ne permettait pas d'exercer la même pression sur toute la surface du PDMS, ce qui causait des fuites entre les micro-canaux. De plus, sur les quatre canaux microfluidiques, seulement deux pouvaient être utilisés compte tenu de l'architecture du clamp.

Au sein de la valisette, le capot PDMS est aussi clampé sur le capteur par un dispositif mécanique. Comme mentionné précédemment (cf. § III.2), la force de clamping, sur ce système de lecture, peut amener de très faibles variations de l'angle d'injection et en conséquence de la sensibilité du système de mesure, ce qui ne facilite pas l'obtention de résultats reproductibles. Néanmoins, ce procédé n'a pu être remplacé dans la durée du projet BIOSENS et les mesures effectuées sur la valisette (Chap. V et VI) ont toutes été menées avec une microfluidique clampée sur le capteur.

Afin de remédier aux problèmes liés au clamping du capot PDMS sur le capteur (cf. *Figure IV. 4.a*), nous avons développé un capteur avec microfluidique intégrée. Celui-ci a été testé sur le banc en interrogation angulaire.

IV.3 Fabrication de capteurs SPR avec microfluidique intégrée

IV.3.1 Fabrication par traitement plasma-corona

Les premières expériences en microfluidique intégrée consistaient à utiliser la méthode usuelle employée pour les Lab-on-Chips, à savoir le collage de la fluidique PDMS sur le support en verre des capteurs SPR. De ce fait, la surface du capteur ne pouvait plus être métallisée entièrement et il a fallu structurer la surface métallique sous la forme de lignes d'or symbolisant les 4 canaux de lecture. La lithographie et la technique du lift-off ont été utilisées pour définir les motifs de ces zones de détection. Leur largeur doit être plus petite que celle des canaux fluidiques de manière à ce que le PDMS soit en contact sur toute sa surface avec le verre. Un traitement plasma, appelé traitement corona [9,10] est alors fait sur la surface du capteur et du PDMS. Le traitement plasma corona permet d'activer des groupements silanols (Si-OH) à la surface du substrat de verre et du PDMS *via* une décharge électrique ionisant l'oxygène présent dans l'air, les deux faces activées sont ensuite mises en contact et l'ensemble est mis à 60 °C pendant 1 h (*Figure IV. 2*) pour réticulation.

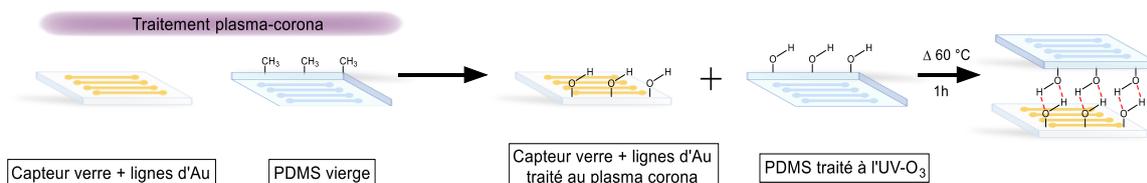


Figure IV. 2: Processus de collage du capot PDMS au capteur SPR par traitement plasma-corona.

Chapitre IV : Développement de capteurs SPR à microfluidique intégrée

De manière assez prévisible, le PDMS s'est avéré se fixer solidement sur le verre (**Figure IV. 3.a**) mais la fine couche d'or de 35 nm, correspondant aux zones de détection SPR, semblait, sous observation à la binoculaire, être endommagée par le traitement au plasma. Ce qui s'est vérifié lors des mesures en interrogation SPR qui ont montré des réponses plasmoniques bruitées résultant de ces dommages (**Figure IV. 3.b**). Ceci limite fortement l'utilité de cette technique de décharge corona par plasma pour une telle utilisation (cf. **Figure IV. 4.b**) et une autre technique de collage a été investiguée.

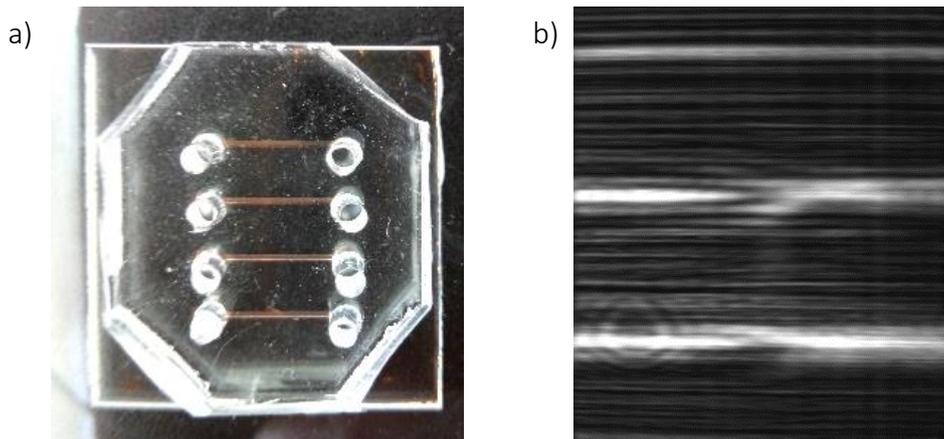


Figure IV. 3: a) Puce microfluidique fabriquée par collage corona, b) Réponse plasmonique de trois canaux de la puce.

IV.3.2 Fabrication par traitement chimique

IV.3.2.1 Collage 11MUA-APTMS

Pour éviter le traitement par plasma, une méthode chimique peut être utilisée pour fixer le PDMS directement sur la surface de l'or. Des monocouches auto-assemblées d'acide 11-mercaptopundécanoïque (11MUA) et d'aminopropyl triméthoxysilane (APTMS) ont été greffées sur des surfaces d'or et de PDMS, respectivement [4]. Les deux monocouches sont ensuite liées par couplage amine en utilisant du 1-Ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide/N-hydroxysuccinimide (EDC/NHS) avant l'adhésion mutuelle (**Figure IV. 4.c**). Cette technique présente une très bonne adhérence du PDMS à l'or et assure donc l'étanchéité des canaux. Par ailleurs, il n'y avait plus besoin de recourir à une lithographie des canaux et le procédé pouvait être appliqué sur un support entièrement métallisé. Mais, par cette méthode, les canaux SPR sont recouverts d'une monocouche de 11MUA qui peut s'avérer gênante pour les étapes de fonctionnalisation biologique ultérieures.

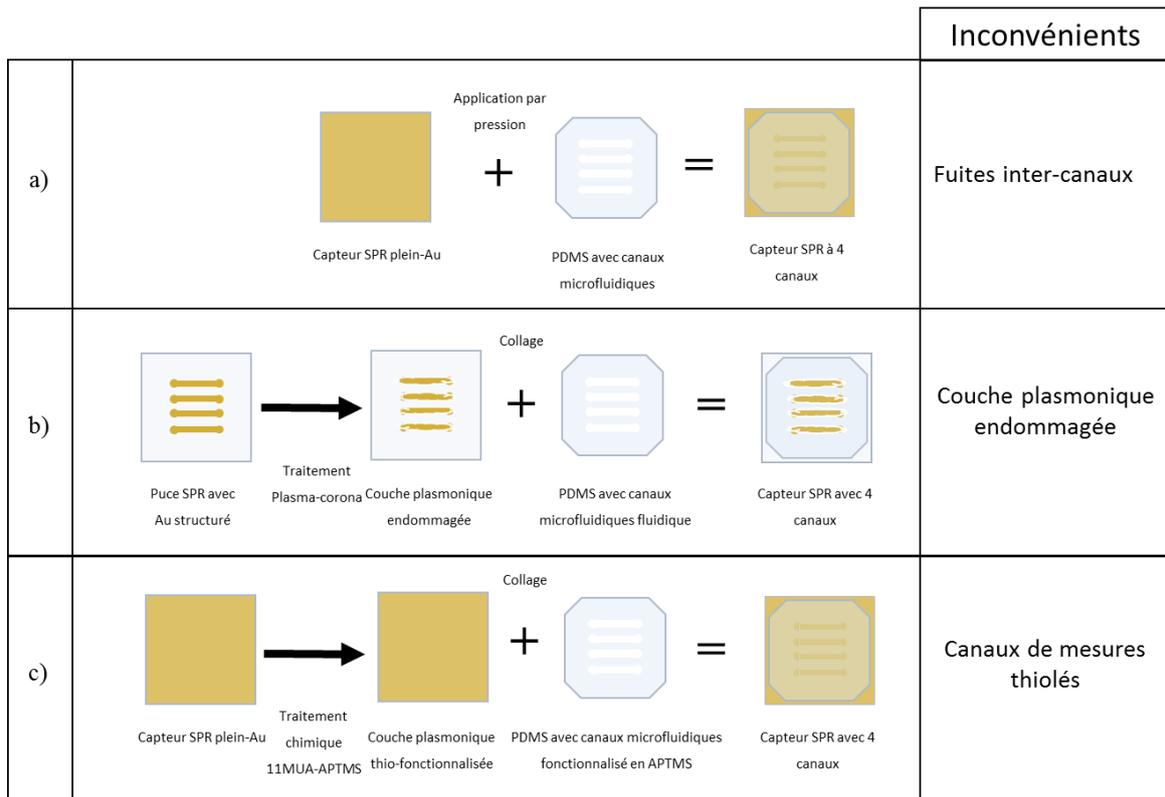


Figure IV. 4: Réalisation de capteurs avec microfluidique appliquée: a) par pression mécanique b) par collage avec préparation "physique" (plasma "corona") (cf. § IV.3.1) c) par collage avec préparation chimique (11MUA-APTMS).

Bien qu'une liste exhaustive des stratégies de liaison entre le PDMS et différentes surfaces pour de multiples applications soit déjà citée dans [4], peu ont été utilisées pour la fabrication de biocapteurs SPR et aucune ne porte sur la stabilité de l'assemblage microfluidique. Une technique rapportée par *Byun et al.* [11] et basée sur le procédé de liaison silane thiolé-or cumulerait les avantages des techniques physiques et chimiques, c'est-à-dire des canaux SPR non endommagés et chimiquement vierges. Cette méthode a donc été exploitée.

IV.4 Fabrication du capteur avec microfluidique intégrée par collage

MPTMS

IV.4.1 Préparation du capot microfluidique en PDMS

Le procédé de fabrication du capot microfluidique en PDMS est inchangé. Le protocole opératoire est celui décrit précédemment dans le § IV.2.2.

IV.4.2 Traitement du capot PDMS pour le collage

Le principe de collage du capot microfluidique est basé sur un procédé d'auto-assemblage utilisant un linker silane-thiolé, le (3-mercaptopropyl) triméthylloxane (MPTMS) (*Figure IV. 5*), en raison de la très grande affinité des molécules thiolées pour l'or. Via le silane, le MPTMS

Chapitre IV : Développement de capteurs SPR à microfluidique intégrée

forme une monocouche auto-assemblée en surface lors du traitement du PDMS. Via la liaison thiol (groupement $-SH$), celui-ci se lie alors de manière covalente à l'or. La forte énergie de liaison Au-S d'environ 298 ± 2 kJ/mol et sa longueur de $2,156 \text{ \AA}$ [12] devraient assurer une bonne étanchéité de la puce fluidique PDMS sur la couche d'or.

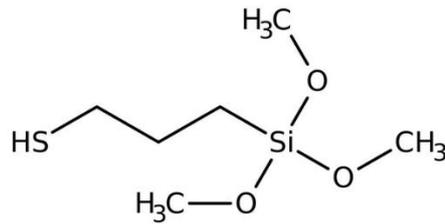


Figure IV. 5 : Molécule MPTMS.

Une préparation de la surface du PDMS est nécessaire avant le traitement au MPTMS. Celle-ci subit d'abord un traitement UV-O₃ pendant 5 minutes afin de générer une fine couche de groupements hydroxyles réactifs avec les silanes [13]. Le capot PDMS est ensuite immergé dans une solution éthanoïque de MPTMS avec un rapport volumique de 50:1 pendant 1 heure. La puce PDMS est finalement rincée trois fois avec de l'éthanol, puis avec de l'eau déionisée afin d'éliminer les molécules de MPTMS non greffées.

IV.4.3 Collage PDMS-Au

Il s'en suit l'étape d'assemblage du capot PDMS traité par le MPTMS sur la surface du capteur SPR entièrement métallisé. Le capot est pressé à la main sur la surface d'or et laissé sous vide pendant 1 heure à $60 \text{ }^\circ\text{C}$. Le chauffage assure un processus de collage plus rapide, puisqu'à température ambiante 24 heures auraient été nécessaires. Un collage homogène et irréversible est ainsi obtenu via la liaison Au-S (*Figure IV. 6*).

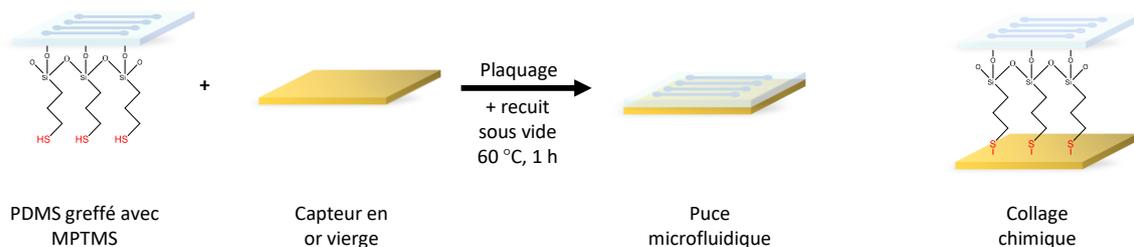


Figure IV. 6 : Processus de collage du PDMS traité au MPTMS sur la surface d'or du capteur SPR (le dessin de droite représente schématiquement le collage par le MPTMS).

La puce SPR avec microfluidique intégrée est illustrée à la *Figure IV. 7*. Dans un premier temps, l'adhérence du PDMS a été simplement vérifiée par traction manuelle. Aucun décollement n'a été observé. Il convient de mentionner qu'une puce PDMS non traitée se serait facilement détachée.



Figure IV. 7 : Aspect final du capteur SPR avec microfluidique intégrée.

Il est à noter que ce même procédé a pu être appliqué avec succès pour le collage du capot PDMS sur:

- des capteurs réalisés sur substrat souple adhésif 3M™ (*Figure IV. 8, gauche*),
- des capteurs SPR utilisant le principe des plasmons localisés et pour lesquels la surface d'or est nanostructurée (*Figure IV. 8, droite*). Malgré la surface non entièrement métallisée, aucune fuite n'a été observée.

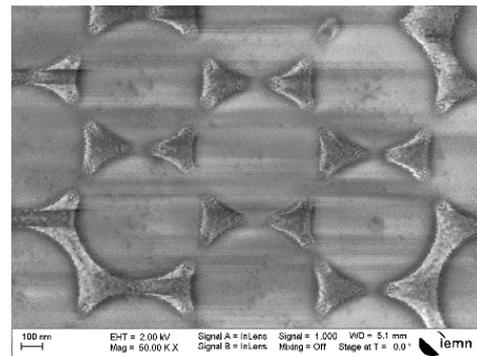
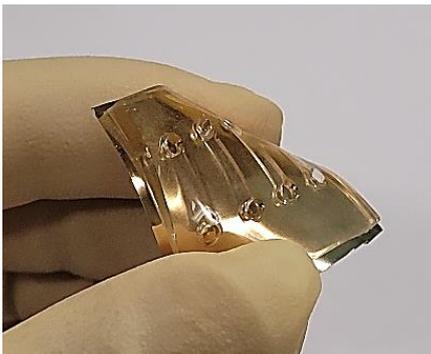
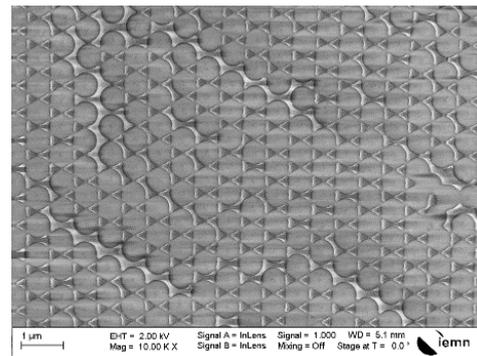
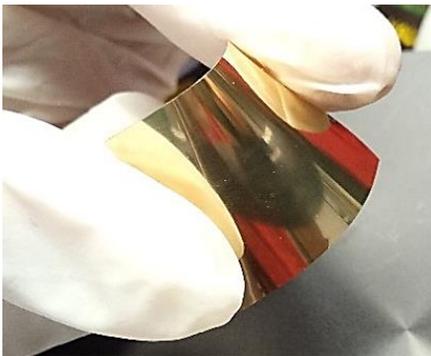


Figure IV. 8 : gauche: Capteur SPR souple (haut) avec microfluidique intégrée (bas), droite: Surface d'un capteur SPR utilisant les plasmons localisés (bas: détail).

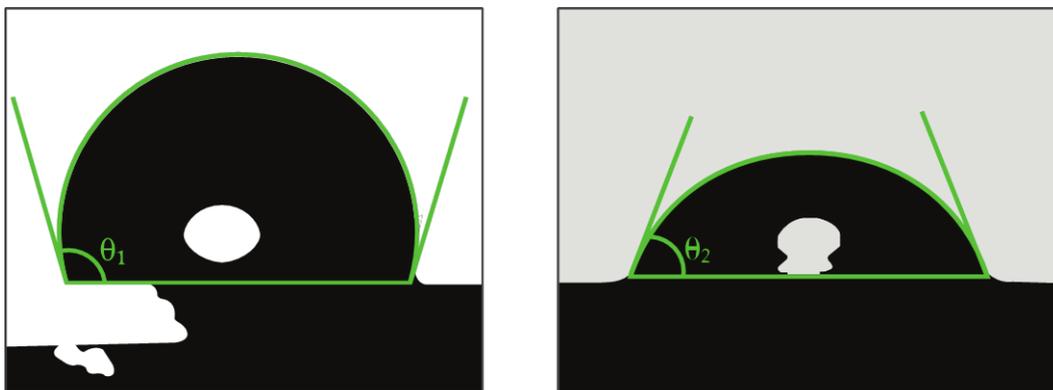
IV.5 Caractérisation de surfaces

Avant l'assemblage, la surface du PDMS a été caractérisée afin d'en valider la modification apportée par le traitement MPTMS. La mesure d'angle de contact (équipement GBX Digidrop)

est utilisée comme technique de base pour caractériser la mouillabilité des surfaces. Comme méthode supplémentaire de caractérisation de surface, la spectroscopie InfraRouge à Transformée de Fourier par Réflexion en configuration Transmission Totale Atténuée (ATR-FTIR en acronyme anglo-saxon) a été employée. Un spectromètre Perkin-Elmer Spectrum GX équipé d'une tête de lecture Specac Golden-g Gate™ ATR munie d'un cristal de germanium a été utilisé. Les surfaces de PDMS après traitement UV-O₃ et après traitement MPTMS ont été analysées. Les mesures ont été effectuées sur le domaine spectral 4000-400 cm⁻¹ en utilisant un moyennage sur 50 mesures successives. Leurs résultats ont ensuite été post-traités à l'aide du logiciel KnowItAll® en appliquant une correction ATR automatisée, suivie d'une correction de la ligne de base et enfin d'une normalisation.

IV.5.1 Mesure de l'angle de contact

L'instrument GBX Digidrop est semi-automatisé et repose sur le traitement d'images d'une goutte de liquide déposée sur une surface solide. La précision de mesure de l'angle de contact est de $\pm 0,07^\circ$. Comme le phénomène de mouillabilité est thermo-dépendant, la température de l'expérience est contrôlée et stabilisée à 20 °C. Une goutte de 2 μ l d'eau déionisée est déposée sur la surface modifiée de l'échantillon de PDMS. L'angle est déterminé en utilisant à la fois le logiciel de l'instrument et ImageJ. La méthode de l'intersection des trois phases est utilisée pour la mesure [14].



PDMS après traitement UV-O₃: $\theta_1 = 102^\circ$

PDMS après traitement MPTMS: $\theta_2 = 74^\circ$

Figure IV. 9 : Mesures d'angle de contact de surface de PDMS traitée à l'UV-O₃ et traitée au MPTMS.

La **Figure IV. 9** montre les images et la détermination de l'angle de contact pour des surfaces de PDMS activées par UV-O₃ et modifiées par MPTMS. Le PDMS traité par UV-O₃ a montré un angle de contact de 102°, ce qui est typique d'une surface hydrophobe, alors que la surface traitée par MPTMS présente un angle de contact de 74°, valeur caractéristique d'une nature plus hydrophile. Cette diminution de l'angle de contact indique la formation d'une monocouche auto-assemblée (SAM) de MPTMS sur la surface du PDMS. Ce résultat est, par ailleurs, en accord avec d'autres études de formation de monocouches de MPTMS sur des surfaces à base de silicium, proposant une monocouche auto-assemblée bien organisée avec un groupement thiol orienté vers le haut [15,16].

IV.5.2 Spectroscopie ATR-FTIR

La **Figure IV. 10** montre les spectres ATR-FTIR et le **Tableau IV. I** l'assignement des bandes IR les plus caractéristiques des surfaces PDMS modifiées par UV-O₃ puis par MPTMS, respectivement.

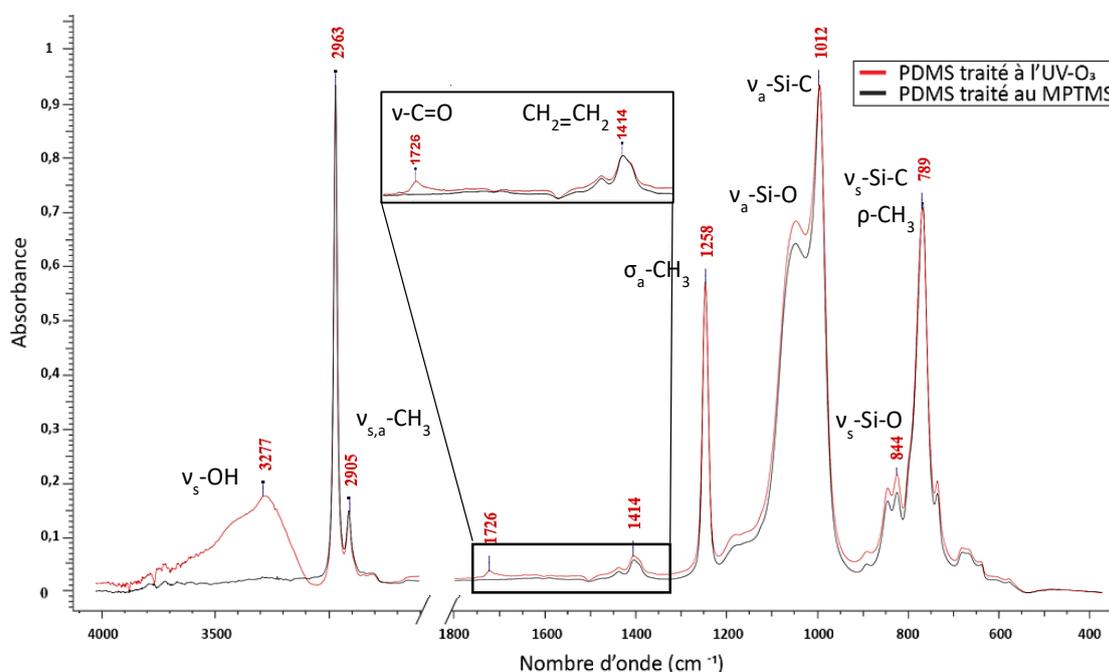


Figure IV. 10 : Spectres ATR-FTIR normalisés de surfaces de PDMS traitées à l'UV-O₃ et au MPTMS.

| Nombre d'onde (cm ⁻¹) | Mode vibrationnel |
|-----------------------------------|---|
| 789 | Rotations planes des groupements CH ₃ ρ-CH ₃ |
| 844 | Vibration d'élongations symétriques ν _s -Si-C |
| 1012 | Vibration d'élongations asymétriques ν _a -Si-O-Si |
| 1258 | Vibration de déformations asymétriques σ _a -CH ₃ |
| 1414 | Vibration de cisaillement CH ₂ =CH ₂ |
| 1726 | Vibration d'élongations ν-C=O |
| 2905, 2963 | Vibration d'élongations symétriques ν _s -CH ₃ et asymétriques ν _a -CH ₃ |
| 3277 | Vibration d'élongations symétriques ν _s -OH |

Tableau IV. I : Attribution des raies des spectres ATR-IR pour les surfaces PDMS traitées par UV-O₃ et MPTMS [14,17–19] .

Le PDMS modifié par MPTMS a montré des pics à 789 cm⁻¹ et 844 cm⁻¹ qui sont attribués aux vibrations planaires des groupements ρ-CH₃, aux vibrations d'élongations ν-Si-C et aux

Chapitre IV : Développement de capteurs SPR à microfluidique intégrée

vibrations d'élongations symétriques du ν -Si-O, respectivement. En outre, des vibrations d'élongations asymétriques ν -Si-C et ν -Si-O sont enregistrées à 1012 cm^{-1} et à 1075 cm^{-1} ; elles sont présentes à l'intérieur de la matrice du PDMS et à sa surface après fixation du MPTMS. La présence de groupements méthyle dans la matrice PDMS a été confirmée par le pic étroit et intense à 1258 cm^{-1} et les pics à 2905 et 2963 cm^{-1} qui correspondent aux modes de vibration d'élongation symétrique et asymétrique $-\text{CH}_3$, respectivement. De plus, une bande à 1414 cm^{-1} est observée, elle correspond aux vibrations de cisaillement $\text{CH}_2=\text{CH}_2$. En plus des pics précédemment identifiés et assimilés aux modes vibratoires typiques, des bandes larges à 1726 cm^{-1} (de faible intensité) et à 3277 cm^{-1} sont observées uniquement sur le spectre PDMS activé par UV- O_3 : elles correspondent respectivement aux vibrations d'élongation du carbonyle et au mode d'étirement symétrique ν -OH [13,17,18,20]. Ce groupement est présent dans la liaison $-\text{Si-OH}$ et est dû à l'exposition de la surface du PDMS au traitement UV- O_3 comme montré dans la **Figure IV. 11**.

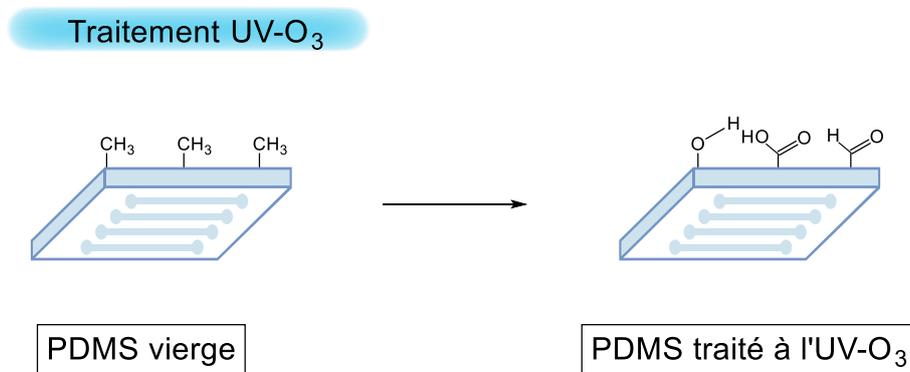
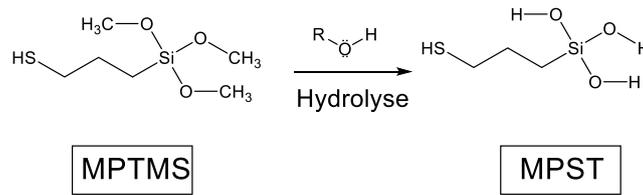


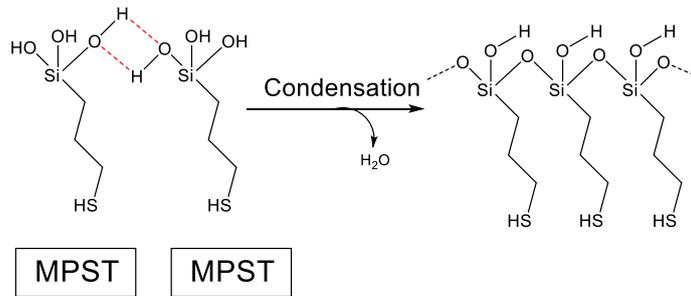
Figure IV. 11 : Modification de la surface du PDMS par UV- O_3 .

En effet, comme l'illustre la **Figure IV. 11**, l'oxydation de surface du PDMS par le traitement UV- O_3 conduit à la formation de groupements silanols en surface [13]. Comme indiqué dans [20], cette transformation se produit sur une certaine profondeur en fonction de la durée du traitement. Néanmoins la présence des groupements $-\text{CH}_3$ à l'intérieur de la matrice PDMS est toujours discernable, comme le confirment les pics de vibration caractéristiques (2905 et 2963 cm^{-1}). Nous suggérons que la formation des groupements éthylène et carbonyle se produit partiellement à la surface du PDMS et n'est qu'une réaction parallèle puisque le traitement UV- O_3 brise la structure du PDMS [13]. La disparition de la large bande autour de 3200 cm^{-1} après modification de la surface par MPTMS confirme l'auto-assemblage du mercaptopropyl silane sur la surface du PDMS (cf. **Figure IV. 12.c**). La disparition conjointe du pic à 1726 cm^{-1} (cf. l'insert de la **Figure IV. 10**) témoigne de la formation de la SAM puisque les molécules de MPTMS forment des liaisons Si-O-Si avec l'oxygène présent à la surface du PDMS, qu'il soit à l'état carbonylé ou hydroxylé.

a.



b.



c.

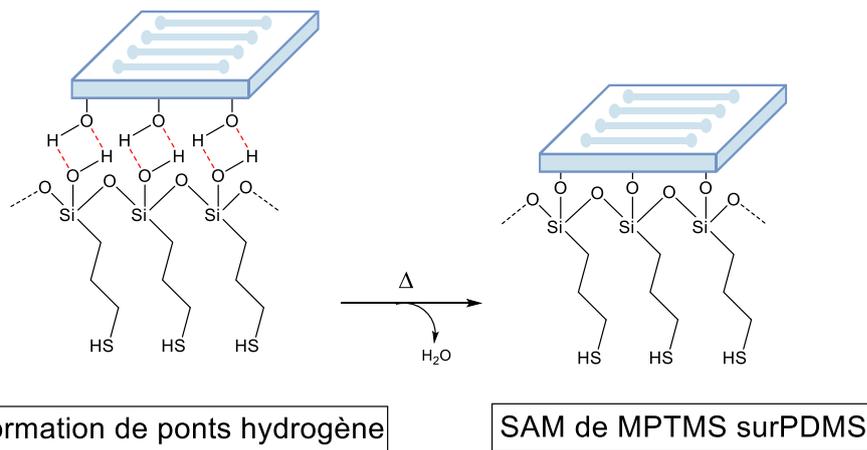


Figure IV. 12 : Mécanisme de l'auto-assemblage du MPTMS sur PDMS [24, 25].

La **Figure IV. 12** schématise l'auto-assemblage du (3-mercaptopropyl) triméthoxysilane sur des surfaces inorganiques. Comme décrit sur la **Figure IV. 12.a.** [19,21], il est généralement proposé que le MPTMS subisse une hydrolyse des alcoxy-silanes, puis les molécules hydrolysées tendent à construire une matrice polymérique en formant des liaisons hydrogène qui conduisent finalement à son greffage sur la surface du PDMS.

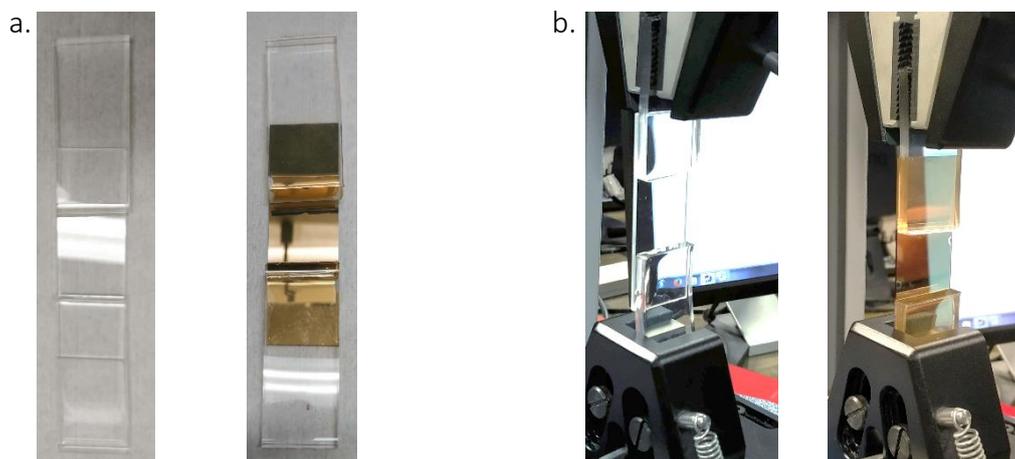
Nous proposons tout de-même un mécanisme de réaction plus détaillé qui peut se produire lors du greffage du triméthoxysilane (3-mercaptopropyl) sur la surface du PDMS. Tout d'abord, la paire d'électrons libres de l'atome d'oxygène présente dans le milieu aqueux attaque le silicium en libérant le groupement méthoxy labile. Une hydrolyse complète du MPTMS conduit à la formation de (3-mercaptopropyl) silanetriol (MPST) (**Figure IV. 12.a.**). Sous la description habituelle de la réaction présentée dans la **Figure IV. 12.b.**, nous supposons que la polycondensation se fait par un mécanisme $\text{S}_{\text{N}}2\text{-Si}$ comme discuté dans [22] et qu'elle est déclenchée par des réactions intermoléculaires entre les groupements silanol par liaisons

Chapitre IV : Développement de capteurs SPR à microfluidique intégrée

hydrogène, ce qui conduit à la formation de l'oligomère MPST. Enfin (*Figure IV. 12.c.*), par le même type de réaction SN_2-Si , l'oligomère MPST préalablement formé s'auto-assemble sur la surface du PDMS; les électrons de l'oxygène du silanol captent le proton des groupements hydroxyle présents à la surface du PDMS traité par UV- O_3 , puis le silicium est attaqué par l'oxygène déprotoné, libérant ainsi des molécules d'eau.

IV.6 Tests mécaniques

Le test de résistance à la traction a été effectué sur un instrument Mecmesin MultiTest 2,5-d pour les échantillons traités par plasma-corona et les échantillons collés chimiquement. Le collage de type corona a été réalisé en traitant à la fois une surface de verre propre et celle du PDMS avec une décharge pendant 2 minutes à l'aide d'un dispositif de traitement corona portable BD-20AC, puis le verre traité et le PDMS ont été alignés et fixés ensemble. L'assemblage a ensuite été maintenu à 80°C pendant toute une nuit pour obtenir un collage maximum. L'échantillon chimiquement lié a été fabriqué selon le procédé mentionné au § IV.4.3. Les échantillons de test sont illustrés dans la *Figure IV. 13.a*. Les substrats en verre sont de dimensions 25x75 mm (ce substrat est métallisé dans le cas du collage chimique) et se voient dotés d'une amorce PDMS collée à chacune de leurs extrémités. La surface de collage est identique dans les deux configurations de collage. Les échantillons ont été fixés par des mors dans l'équipement de mesure de la résistance à la traction afin d'assurer une répartition uniforme de la pression (*Figure IV. 13.b*). La vitesse de traction était de 10 mm/min et les données du tensiomètre ont été enregistrées à l'aide du logiciel intégré à l'équipement de mesure.



*Figure IV. 13 : a) Échantillon collé par plasma-corona (à gauche) et échantillon chimi-collé (à droite).
b) Échantillons sous test de résistance à la traction.*

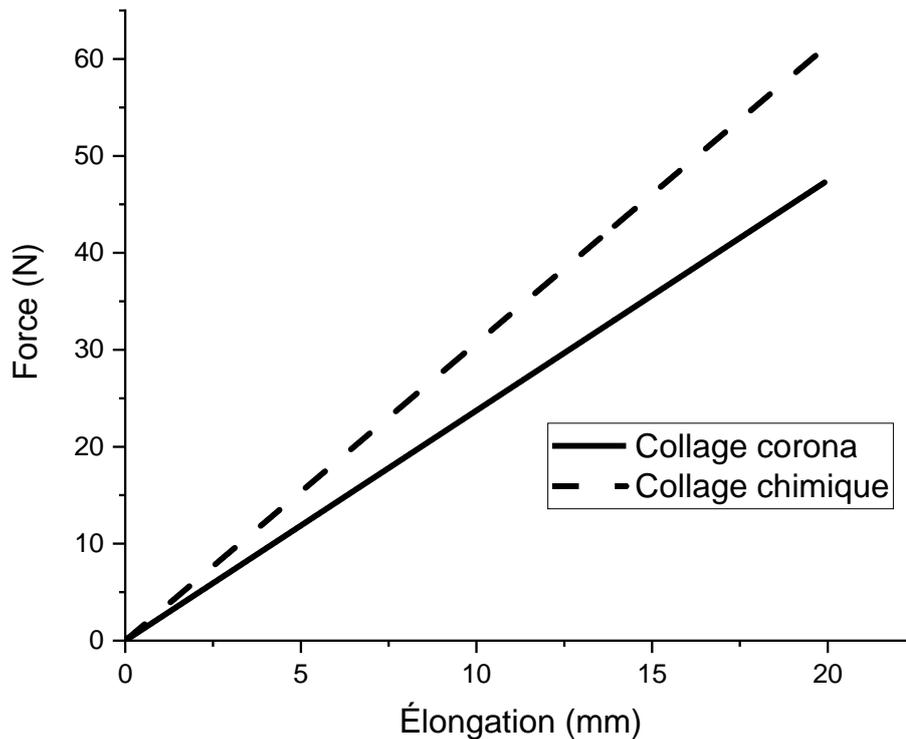


Figure IV. 14 : Courbes de résistance à la traction pour les échantillons de PDMS liés par décharge corona (ligne pleine) et chimiquement (ligne pointillée).

La **Figure IV. 14** montre les courbes de variation de la force en fonction de l'allongement. Les échantillons collés chimiquement et par décharge corona montrent un comportement linéaire sous étirement. Ils présentent également le même allongement à la rupture de 20 mm correspondant à une contrainte $\epsilon = 1,6$ qui est en accord avec les données rapportées par Johnston *et al.* [23]. Cependant, la charge de rupture moyenne (point de rupture) de l'échantillon collé chimiquement est supérieure de 30 %, ce qui indique que ce collage est plus solide que celui effectué par plasma-corona.

IV.7 Test du capteur SPR avec fluide intégré

Le capteur a d'abord été testé par un contrôle visuel en vérifiant la circulation d'une solution colorée par injection continue, puis sur le banc d'essai SPR. Les canaux microfluidiques sont alimentés par un tube tygon de 1/16" OD x 0,51mm ID. Le tube est inséré dans le PDMS au-dessus des réservoirs d'entrée/sortie situés aux deux extrémités de chaque canal microfluidique et scellé avec du PDMS liquide recuit pour éviter toute fuite microfluidique indésirable à ce niveau.

IV.7.1 Test visuel

L'étanchéité du système microfluidique a été testée en injectant une solution d'encre noire dans les quatre canaux microfluidiques en continu pendant 5 minutes à travers un gradient de pression jusqu'à atteindre 1,8 bars à l'aide d'une pompe à pression Elveflow™ OB1, puis en

Chapitre IV : Développement de capteurs SPR à microfluidique intégrée

observant l'état de la puce au microscope optique. Ce processus a été effectué cinq fois sur une même puce et répété sur trois capteurs différents.

La **Figure IV. 15** montre la puce SPR avec microfluidique intégrée pendant et après l'injection d'encre. Les **Figure IV. 15.a** et **.b** montrent le remplissage des canaux pendant le test d'encre, à moitié et à totalité de la longueur des canaux microfluidiques, respectivement. L'observation à l'œil nu des quatre canaux après remplissage ne montre aucune fuite, ni inter-canal ni vers l'extérieur (**Figure IV. 15.c**). Outre les vues statiques présentées ici, aucune fuite n'a été observée pendant toute la durée du test, quel que soit le débit injecté. Une observation sous binoculaire (**Figure IV. 15.d**) a confirmé l'absence de micro-fuites avec une nette délimitation des canaux microfluidiques. Ce résultat confirme que la SAM formée est uniforme et continue.

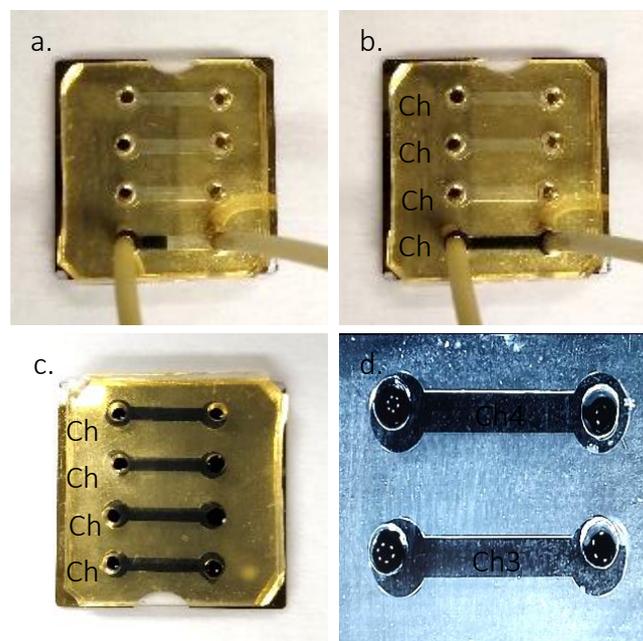


Figure IV. 15 : a) Remplissage d'un canal à moitié, b) remplissage entier d'un canal, c) Remplissage de tous les canaux, d) zoom sous microscope optique sur 2 canaux fluidiques remplis lors du test d'encre noire.

IV.7.2 Test SPR

Comme test fonctionnel mais aussi comme test d'étanchéité, des expériences SPR ont été menées. En raison de la faible profondeur de pénétration intrinsèque (quelques centaines de nanomètres) de l'onde plasmonique, la mesure SPR est également particulièrement bien adaptée pour détecter toute fuite qui pourrait exister à la surface de la puce, *i.e.* pour repérer toute irrégularité dans le processus de collage PDMS-Au. Le banc SPR expérimental d'interrogation angulaire a été utilisé pour cette étude. Le résultat est observé à travers l'image ainsi obtenue de la surface du capteur (*cf.* Figure III. 2). Ici, les fluides injectés sont constitués de solutions d'éthylène glycol. L'expérience fluide a été menée avec les mêmes débits que

ceux utilisés pour le test d'encre. Afin de valider la stabilité du processus de collage, la durée de l'expérience a été prolongée jusqu'à 20 minutes sans qu'aucune fuite ne soit détectée.

La **Figure IV. 16** présente une comparaison des réponses SPR observées sur des puces microfluidiques traitées par plasma-corona (ligne solide) (cf. *Figure IV. 4b*) et par voie chimique (ligne en pointillés) (cf. *Figure IV. 4c*). L'échantillon lié par plasma-corona présente une réponse plasmonique plus large que celui collé chimiquement ; à une valeur d'intensité normalisée de 0,3, les largeurs à mi-hauteur (FWHM) respectives sont de 0,48° et 0,32°. La valeur plus faible de cette largeur pour le composant collé chimiquement atteste de l'innocuité du procédé de collage vis-à-vis de la surface plasmonique améliorant ainsi l'intégrité du signal brut et son post-traitement [24].

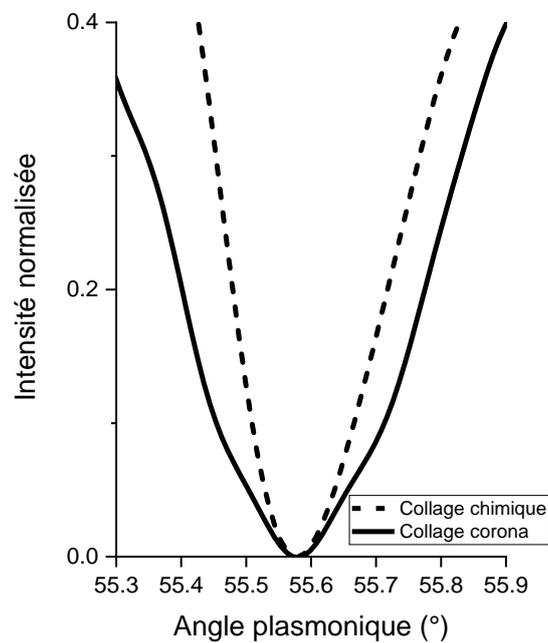


Figure IV. 16 : Réponse plasmonique normalisée pour les deux capteurs avec microfluidique collée par plasma corona et chimiquement.

IV.8 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons décrit le développement d'un procédé de fabrication de capteurs SPR incluant un système microfluidique intégré utilisant un processus d'auto-assemblage par traitement du PDMS au 3-mercaptopropyl triméthylloxane (MPTMS). Ce travail a fait objet d'un article dans une revue à comité de lecture [25].

Pour réaliser le collage, le capot microfluidique en PDMS a été traité à l'UV-O₃, puis au MPTMS avant sa fixation sur la surface d'or du capteur. Une comparaison entre le collage conventionnel par décharge plasma-corona et par voie chimique a été effectuée en utilisant des mesures de résistance à la traction.

Chapitre IV : Développement de capteurs SPR à microfluidique intégrée

Ces résultats ont montré que le collage chimique est plus efficace et résistant que le collage corona. De plus, un test visuel ainsi que des tests SPR ont été menés par injection fluide sous pression et aucune fuite inter-canal n'a été détectée. Un capot microfluidique comportant quatre canaux a été préparé et testé avec succès sur un banc SPR expérimental. Naturellement, cette technique est applicable à des circuits microfluidiques plus complexes.

De tels capteurs SPR avec microfluidique intégrée ouvrent la voie à la conception de capteurs prêts à l'emploi car chaque canal pourrait être fonctionnalisé de manière différente avant utilisation. Ce qui reste encore un grand défi à relever.

Références

- [1] A. B. Azouz, M. Vázquez, et D. Brabazon, « Developments of Laser Fabrication Methods for Lab-on-a-Chip Microfluidic Multisensing Devices », dans *Comprehensive Materials Processing*, Elsevier, 2014, p. 447-458. doi: 10.1016/B978-0-08-096532-1.01317-0.
- [2] D.-S. Wang et S.-K. Fan, « Microfluidic Surface Plasmon Resonance Sensors: From Principles to Point-of-Care Applications », *Sensors*, vol. 16, n° 8, p. 1175, 2016, doi: 10.3390/s16081175.
- [3] A. Nag, S. Feng, N. Afsarimanesh, S. Mukhopadhyay, et J. Kosel, « Development of Novel Gold/PDMS Sensors for Medical Applications », dans *2018 12th International Symposium on Medical Information and Communication Technology (ISMICT)*, Sydney, NSW, 2018, p. 1-5. doi: 10.1109/ISMICT.2018.8573696.
- [4] E. Ouellet, C. W. T. Yang, T. Lin, L. L. Yang, et E. T. Lagally, « Novel Carboxyl-Amine Bonding Methods for Poly(dimethylsiloxane)-Based Devices », *Langmuir*, vol. 26, n° 14, p. 11609-11614, 2010, doi: 10.1021/la1012582.
- [5] J. Casanova-Moreno, J. To, C. W. T. Yang, R. F. B. Turner, D. Bizzotto, et K. C. Cheung, « Fabricating devices with improved adhesion between PDMS and gold-patterned glass », *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 246, p. 904-909, 2017, doi: 10.1016/j.snb.2017.02.109.
- [6] E. Galopin, « Adressage par microfluidique digitale : application à la détection de marqueurs biologiques par plasmon de surface et détection intégrée », These de doctorat, Lille 1, 2007. [En ligne]. Disponible sur: <http://theses.fr/2007LIL10100>
- [7] S. Natarajan, D. A. Chang-Yen, et B. K. Gale, « Large-area, high-aspect-ratio SU-8 molds for the fabrication of PDMS microfluidic devices », *J. Micromech. Microeng.*, vol. 18, n° 4, p. 045021, 2008, doi: 10.1088/0960-1317/18/4/045021.
- [8] Z. Zhang, P. Zhao, G. Xiao, B. R. Watts, et C. Xu, « Sealing SU-8 microfluidic channels using PDMS », *Biomicrofluidics*, vol. 5, n° 4, p. 046503, 2011, doi: 10.1063/1.3659016.
- [9] M. A. Eddings, M. A. Johnson, et B. K. Gale, « Determining the optimal PDMS–PDMS bonding technique for microfluidic devices », *J. Micromech. Microeng.*, vol. 18, n° 6, p. 067001, 2008, doi: 10.1088/0960-1317/18/6/067001.
- [10] J. Wu et N. Y. Lee, « One-step surface modification for irreversible bonding of various plastics with a poly(dimethylsiloxane) elastomer at room temperature », *Lab Chip*, vol. 14, n° 9, p. 1564-1571, 2014, doi: 10.1039/C3LC51324F.
- [11] I. Byun, A. W. Coleman, et B. Kim, « Transfer of thin Au films to polydimethylsiloxane (PDMS) with reliable bonding using (3-mercaptopropyl)trimethoxysilane (MPTMS) as a molecular adhesive », *J. Micromech. Microeng.*, vol. 23, n° 8, p. 085016, 2013, doi: 10.1088/0960-1317/23/8/085016.
- [12] D. L. Kokkin, R. Zhang, T. C. Steimle, I. A. Wyse, B. W. Pearlman, et T. D. Varberg, « Au–S Bonding Revealed from the Characterization of Diatomic Gold Sulfide, AuS », *J. Phys. Chem. A*, vol. 119, n° 48, p. 11659-11667, 2015, doi: 10.1021/acs.jpca.5b08781.
- [13] A. E. Özçam, K. Efimenko, et J. Genzer, « Effect of ultraviolet/ozone treatment on the surface and bulk properties of poly(dimethyl siloxane) and poly(vinylmethyl siloxane) networks », *Polymer*, vol. 55, n° 14, p. 3107-3119, 2014, doi: 10.1016/j.polymer.2014.05.027.
- [14] A. Faghri et Y. Zhang, « 5 - SOLID-LIQUID-VAPOR PHENOMENA AND INTERFACIAL HEAT AND MASS TRANSFER », dans *Transport Phenomena dans Multiphase Systems*, A. Faghri

Chapitre IV : Développement de capteurs SPR à microfluidique intégrée

- et Y. Zhang, Éd. Boston: Academic Press, 2006, p. 331-420. doi: 10.1016/B978-0-12-370610-2.50010-6.
- [15] D. K. Aswal, S. Lenfant, D. Guerin, J. V. Yakhmi, et D. Vuillaume, « Fowler–Nordheim tunnelling and electrically stressed breakdown of 3-mercaptopropyltrimethoxysilane self-assembled monolayers », *Nanotechnology*, vol. 16, n° 12, p. 3064-3068, 2005, doi: 10.1088/0957-4484/16/12/056.
- [16] C.-Y. Chang *et al.*, « Achieving high efficiency and improved stability dans large-area ITO-free perovskite solar cells with thiol-functionalized self-assembled monolayers », *J. Mater. Chem. A*, vol. 4, n° 20, p. 7903-7913, 2016, doi: 10.1039/C6TA02581A.
- [17] M. Mihelčič, A. K. Surca, A. Kreta, et M. Gaberšček, « Spectroscopical and Electrochemical Characterisation of a (3-Mercaptopropyl)trimethoxysilane - Based Protective Coating on Aluminium Alloy », *Croat. Chem. Acta*, p. 7, 2017.
- [18] N. Agrawal, P. S. Low, J. S. J. Tan, E. W. M. Fong, Y. Lai, et Z. Chen, « Durable easy-cleaning and antibacterial cotton fabrics using fluorine-free silane coupling agents and CuO nanoparticles », *Nano Materials Science*, 2019, doi: 10.1016/j.nanoms.2019.09.004.
- [19] B. Arkles, « Tailoring Surfaces with Silanes », *Chemtech*, vol. 7, n° 12, 1977, [En ligne]. Disponible sur: https://www.researchgate.net/publication/276848189_Tailoring_Surfaces_with_Silanes
- [20] Y. Berdichevsky, J. Khandurina, A. Guttman, et Y.-H. Lo, « UV/ozone modification of poly(dimethylsiloxane) microfluidic channels », *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 97, n° 2-3, p. 402-408, 2004, doi: 10.1016/j.snb.2003.09.022.
- [21] G. T. Hermanson, *Bioconjugate techniques*, Third edition. Amsterdam Boston Heidelberg: Academic Press, an imprint of Elsevier, 2013.
- [22] A. Issa et A. Luyt, « Kinetics of Alkoxysilanes and Organoalkoxysilanes Polymerization: A Review », *Polymers*, vol. 11, n° 3, p. 537, 2019, doi: 10.3390/polym11030537.
- [23] I. D. Johnston, D. K. McCluskey, C. K. L. Tan, et M. C. Tracey, « Mechanical characterization of bulk Sylgard 184 for microfluidics and microengineering », *J. Micromech. Microeng.*, vol. 24, n° 3, p. 035017, 2014, doi: 10.1088/0960-1317/24/3/035017.
- [24] B. D. Gupta, A. M. Shrivastav, et S. P. Usha, *Optical Sensors for Biomedical Diagnostics and Environmental Monitoring*, 1^{re} éd. Boca Raton, FL : CRC Press, Taylor & Francis Group, [2017]: CRC Press, 2017. doi: 10.1201/9781315156033.
- [25] M.-T. Bakouche *et al.*, « Leak-free integrated microfluidic channel fabrication for surface plasmon resonance applications », *J. Micromech. Microeng.*, vol. 30, n° 12, p. 125003, 2020, doi: 10.1088/1361-6439/abb991.

Chap. V. Biodétection de *Zymoseptoria tritici*

Dans ce chapitre, nous présentons, d'une part, l'étape de transformation des capteurs plasmoniques en biocapteurs dédiés à la détection du pathogène *Zymoseptoria tritici* et, d'autre part, les expérimentations de biodétection par la technique SPR. La biodétection a été réalisée selon deux stratégies :

- La première est basée sur une interaction ADN-ADN (Oligonucléotide-Oligonucléotide), où le biocapteur développé (capteur d'acides nucléiques) est fonctionnalisé avec des sondes de monobrans nucléiques (ADN), "compl. *Zymo*-SH" qui interagissent avec les monobrans ADN complémentaires, "*Zymo*"spécifiques à une partie du génome du pathogène ciblé.
- La deuxième est basée sur une interaction anticorps-antigène, les capteurs sont fonctionnalisés avec des anticorps comme sondes biologiques (IgG *Zymo*.) qui permettent de détecter des protéines extraites des plantes infectées par le champignon *Zymoseptoria tritici* (protéines *Zymo*.).

Nous exposons ensuite les caractérisations physico-chimiques des biocapteurs développés qui permettent de vérifier et de valider le protocole opératoire de fonctionnalisation de surface en sondes biologiques (sondes compl. *Zymo*-SH).

V.1 Matériels

V.1.1 Système de lecture

L'ensemble des mesures SPR de ce chapitre a été réalisé sur la valisette, donc en interrogation spectrale (cf. § III.1.1.2).

V.1.2 Capteurs

Les capteurs utilisés ont été réalisés sur des substrats en verre BK-7 aux dimensions 25x25 mm compatibles avec le prisme de couplage utilisé dans la valisette. Les deux types de capteurs, présentés au § III.1.4 et se différenciant par l'épaisseur de la couche d'or, ont été utilisés². Par ailleurs, nous avons vu lors de l'étape de calibration (cf. § III.1.5) que leur utilisation dans l'environnement expérimental fournissait des résultats quasiment identiques. Ils ont été préparés suivant le processus décrit dans le chapitre IV.

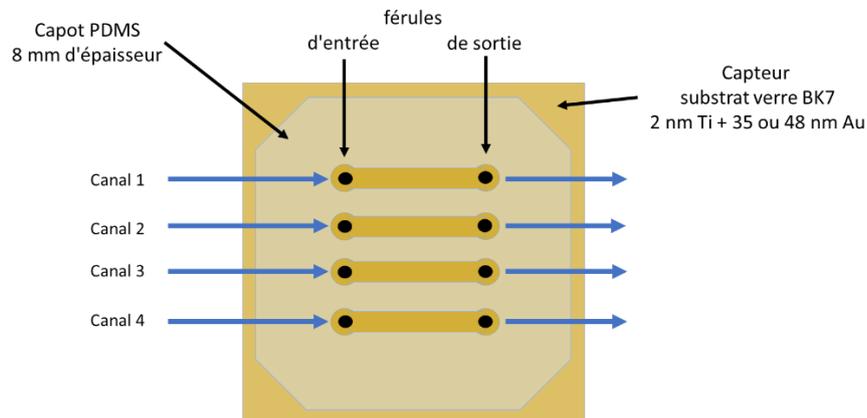


Figure V. 1: Capteur utilisé dans la valisette. La microfluidique est réalisée par un capot en PDMS clampé par pression mécanique sur la surface du capteur.

Dans la valisette, le système microfluidique n'est pas intégré au capteur. Un "capot" microfluidique, identique dans son dessin à celui présenté au chapitre IV, donc présentant 4 canaux microfluidiques distincts, est utilisé. Il est clampé par pression mécanique sur le capteur une fois que celui-ci est placé sur le prisme du banc optique à l'aide d'un liquide d'indice. Il est réalisé en PDMS de 8 mm d'épaisseur pré-poinçonné à 0,05 mm de diamètre (pour former l'entrée et la sortie des canaux microfluidiques) et pré-nettoyé à l'éthanol absolu dans un bain à ultrasons, puis rincé à l'acétone. Huit férules (1 entrée et 1 sortie par canal) (0,025"DE x 0,013"DI) sont implantées dans le capot PDMS et l'entrée de chaque canal est reliée à une micro-pompe péristaltique de débit de l'ordre de 70 $\mu\text{L}/\text{min}$ par un tubage fluide en Tygon 23G (1/16" DE x 0,51mm DI) (**Figure V. 1**).

² Les tests préliminaires (§ IV.2.1) ont exclusivement utilisé des capteurs avec une couche de 35 nm d'or alors que les tests à base d'ADN spécifique au *Zymoseptoria tritici* (§ IV.2.2) ont utilisé les deux types de capteurs (35 et 48 nm d'épaisseur pour le film d'or).

Lors de la synthèse, les sondes T100 ont été greffées avec un thiol (T100-SH) de manière à pouvoir être utilisées directement pour la fonctionnalisation des capteurs. Néanmoins, le thiol est protégé par un thio-alcane relié par un pont disulfure. Cette liaison disulfure doit être cassée afin de pouvoir utiliser le monobrin thiolé pour la fonctionnalisation. Ceci est réalisé en utilisant un réactif, le DiThioThréitol (DTT), suivant le schéma présenté dans la **Figure V. 2**. Les monobrins d'oligonucléotides T100-SH sont dilués dans de l'EDI à 100 μM comme indiqué par le fournisseur. 60 μL d'oligonucléotides sont mis en solution avec 100 μL de DTT de concentration 100 μM en préparant un mélange avec 350 μL d'EDI, et 1890 μL de PBS. Cette solution est mélangée, puis gardée en réaction pendant une durée de 1 h pour être finalement filtrée sur des colonnes NAP-5 de *GE Healthcare*TM. Les colonnes NAP-5 fonctionnent selon le principe de chromatographie à exclusion de taille, les plus grandes molécules (l'ADN) sont récupérées en premier lieu et les plus petites sont retenues plus longtemps dans la matrice polymérique (Dextran). La solution récupérée (filtrat) a une concentration finale de [2,5 μM] en T100-SH⁴.

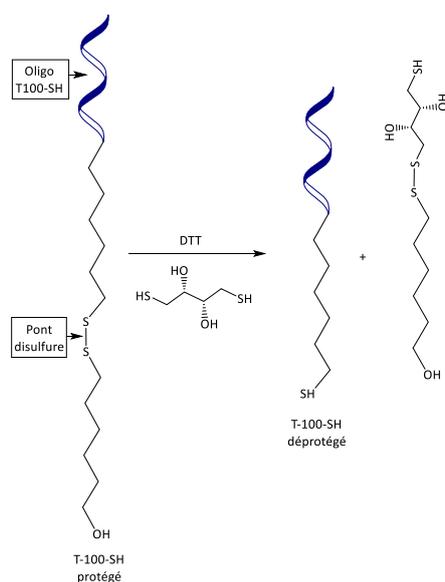


Figure V. 2: Schéma du traitement de "déprotection" de l'ADN T100-SH par traitement au DTT.

Des aliquotes à 2,5 μM de A100 ont aussi été préparées par une solution de 350 μL d'eau DI, 60 μL d'oligonucléotides A100 à 100 μM , et 1890 μL de PBS pour les tests d'interaction auxquels on rajoute 100 μL de DTT avant utilisation.

V.1.4.2 Oligonucléotides relatifs au *Zymoseptoria tritici*

L'ADN du *Zymoseptoria tritici* a été extrait et amplifié par PCR (partenaire CARAH) à partir de prélèvements d'air, de sol et de plante ainsi que d'échantillons provenant des travaux de [1,2] en utilisant le kit d'extraction *DNeasy® Powersoil®* de chez *Qiagen®*. Les travaux bio-informatiques, non publiés à ce jour, de A. Nirsha (partenaire CARAH) ont permis d'identifier

⁴ A noter qu'une solution de 350 μL d'eau DI, 60 μL d'oligonucléotides, 100 μL de DTT et 490 μL de PBS a aussi été utilisée. Le protocole fournit alors un filtrat de concentration [6 μM] en T100-SH.

Chapitre V : Détection de *Zymoseptoria tritici*

une séquence nucléique spécifique (100 bases) au *Zymoseptoria tritici*. Ceci a permis d'obtenir la synthèse, par Eurogentec®, des deux brins complémentaires (*Zymo* et compl. *Zymo*-SH) de cette séquence (Tableau V. II). Identiquement au protocole présenté ci-dessus, les brins d'ADN destinés à être utilisés comme sonde au niveau du capteur (compl. *Zymo*-SH) ont subi une modification thiol-C6 du côté 5' de la chaîne nucléotide, liaison qui est rompue à l'aide du traitement DTT avant l'étape de fonctionnalisation du capteur.

| Échantillon | Séquence ADN |
|--------------------------------|---|
| sonde compl <i>Zymo</i> -SH | 5' ATC-GAC-XXX-GCG-C 3' |
| analyte <i>Zymo</i> | 3' G-CGC-XXX-XXX-XXX-XXX-XXX-XXX-XXX-XXX-XXX-XXX-XXX-XXX-XXX-XXX-XXX-XXX-XXX-GTC-GAT 5' |

Tableau V. II : Monobrans ADN de synthèse relatifs au *Zymoseptoria tritici*.

V.1.5 Molécules biologiques (protéines)

La détection du pathogène *Zymoseptoria tritici* a aussi été réalisée à l'aide d'un système interactionnel ligand-analyte de type anticorps-protéines. Les anticorps utilisés dans cette étude font partie de la famille des immunoglobulines de type G, IgG. Il s'agit d'anticorps polyclonaux d'origine animale, ils reconnaissent les protéines du *zymoseptoria tritici* sans être totalement spécifiques à celui-ci. Nous les nommerons IgG-*Zymo* par la suite. Les anticorps ont été produits chez *Biotem*. Pour ce faire, deux lapins blancs de Nouvelle-Zélande ont été immunisés avec des spores de souches *Zymoseptoria tritici* suivant un protocole de 42 jours, durant lesquels 4 injections ont été réalisées à J0, J7, J14 et J29 (J, pour jour). À terme, les lapins ont été exsanguinés et les anticorps ont été purifiés du sérum par chromatographie d'affinité sur de la protéine A.

Les protéines "*Zymo*" ont été extraites (partenaire CHU Lille) après 21 jours d'incubation (JPI21) de feuilles de blé infectées (partenaires CARAH et ISA). Les feuilles de blé ont été découpées en petits morceaux, puis portées à ébullition dans un mélange d'EDTA/Tampon Tris-HCl à 50 mM et 100 mM respectivement, contenant du dodécylsulfate de sodium (SDS) 2% et 40 mM de β -mercaptoéthanol. La solution préparée a été centrifugée à 4500 tr/min pendant 10 min à 4 °C et les surnageants ont été dialysés en utilisant une solution aqueuse de bicarbonate d'ammonium à 50 mM et lyophilisés pour récupérer les protéines sous forme de poudre (partenaire CHU Lille). C'est ce lyophilisat qui sera utilisé comme base dans les expérimentations du §V. 3.

Deux échantillons de protéines *Zymo* ont pu être testés. Les protéines pures sont de type glycoprotéines et ont une taille de 55 kDa. Tandis que le mélange multi-protéinique contient des protéines de masse moléculaire élevée allant de 90 à 250 kDa.

V.2 Méthodes expérimentales: détection à base d'oligonucléotides

V.2.1 Préparation des capteurs

V.2.1.1 Fonctionnalisation de surface

Deux protocoles de fonctionnalisation ont été utilisés, le plus simple aboutissant à une fonctionnalisation uniforme sur toute la surface du capteur et le second, un peu plus complexe à mettre en œuvre, puisqu'il fait appel à un système microfluidique, visant à assurer une fonctionnalisation différente sur chacun des 4 canaux de mesure.

La fonctionnalisation de la surface des capteurs en ADN a été réalisée en se basant sur les travaux de Hill *et al.* [3] ainsi que de Conde *et al.* [4]. Comme mentionnée plus haut, elle a été effectuée de deux manières différentes:

- soit en "pleine plaque", *i.e.* le capteur est fonctionnalisé uniformément sur toute sa surface,
- soit en "localisé" en utilisant les canaux microfluidiques, chaque canal pouvant alors être fonctionnalisé différemment.

La fonctionnalisation "pleine plaque" schématisée dans la **Figure V. 3** est réalisée par immersion complète du capteur dans la solution. Le capteur, pré-nettoyé sous UV-O₃ pendant 30 minutes, est fonctionnalisé avec les sondes T100-SH ou compl. *Zymo*-SH en l'immergeant durant 16 h, sans agitation (mode statique), dans une solution de tampon phosphate salin (PBS) à une concentration de 170 mM et de pH= 8,1 contenant les oligonucléotides à une concentration de 2,5 μM (*cf.* § IV.1.4). Il est ensuite rincé avec du PBS et de l'eau DI afin de décrocher toutes les molécules n'ayant pas été chimisorbées à la surface.

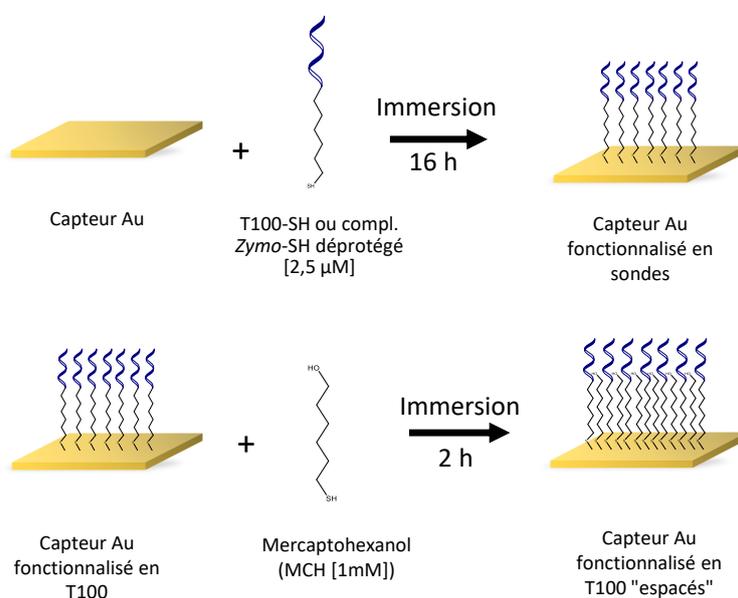


Figure V. 3: Protocole de fonctionnalisation uniforme en T100-SH ou *Zymo*-SH. L'utilisation d'un espaceur (MCH) n'a été effective que pour la fonctionnalisation en T100.

Chapitre V : Détection de *Zymoseptoria tritici*

Pour le test préliminaire (appariement T100-A100), les capteurs sont ensuite immergés pour une durée de 2 h dans un bain de mercaptohexanol (MCH) à 1 mM, jouant le rôle de molécule "espaceur".

Les capteurs sont ensuite stockés dans de l'eau DI jusqu'à utilisation. Les capteurs n'étant pas utilisés directement après leur fonctionnalisation, nous les dénommerons, par la suite, capteurs pré-fonctionnalisés.

Concernant la fonctionnalisation localisée (**Figure V. 4**), la surface du capteur subit seulement le traitement à l'UV-O₃ pendant 30 minutes avant la séquence de fonctionnalisation. Le capot PDMS est alors placé sur le capteur et permet d'injecter la solution de fonctionnalisation, identique ou pas, sur chaque canal. Cette fonctionnalisation étant réalisée juste avant les expérimentations de détection, on ne parle alors pas de pré-fonctionnalisation.

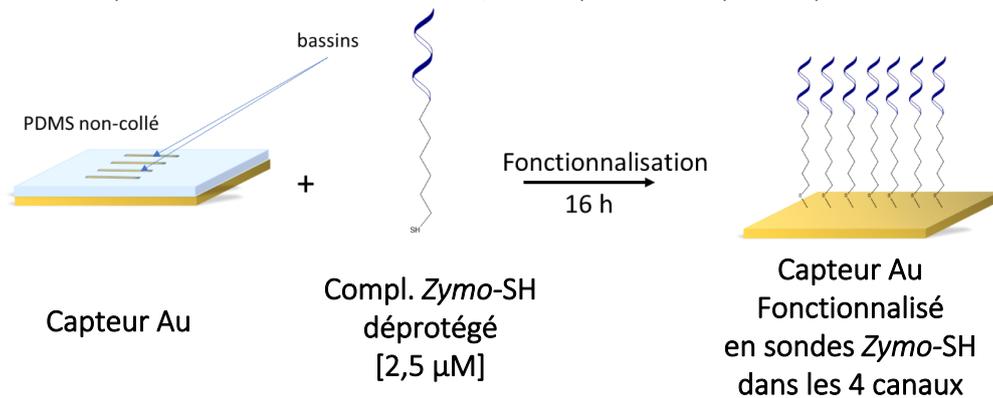


Figure V. 4: Protocole de fonctionnalisation localisée en T100-SH ou compl. Zymo-SH.

La fonctionnalisation localisée a notamment été utilisée pour déterminer l'influence de la concentration respective de molécules "actives" (T100-SH) et "espaceur" (MCH) sur l'efficacité de la fonctionnalisation. Les solutions de fonctionnalisation sont ensuite injectées dans les différents canaux microfluidiques suivant cette répartition:

Canal 1 : Solution tampon contenant des sondes T100-SH à 6 µM (cf. note 3 du § IV.1.4.1).

Canal 2 : Solution tampon contenant 4,5 µM de sondes T100-SH et 0,25 mM de MCH.

Canal 3 : Solution tampon contenant 3 µM de sondes T100-SH et 0,5 mM de MCH.

Canal 4 : Solution tampon contenant 1,5 µM de sondes T100-SH et 0,750 mM de MCH.

Lorsque les solutions de fonctionnalisation ont été injectées dans les canaux microfluidiques, le dispositif est recouvert d'une lame de microscope pour éviter l'évaporation des solutions. Il est laissé ainsi en réaction pendant environ 16 h, dans un mode de fonctionnalisation statique, identiquement au protocole de fonctionnalisation "pleine plaque".

Cette fonctionnalisation localisée permet aussi de valider la possibilité de fonctionnaliser chaque canal indépendamment et donc de mener différents tests avec le même capteur, ce qui n'est pas possible avec une pré-fonctionnalisation uniforme ("pleine plaque").

V.2.1.2 Caractérisation des surfaces fonctionnalisées

Une caractérisation plus fouillée des surfaces des capteurs fonctionnalisés par compl. Zymo-SH a été menée par différentes techniques d'analyse: mesure d'angle de contact, imagerie (AFM), spectroscopie Raman et spectroscopie photoélectronique aux rayons X (XPS).

V.2.1.2.1 Mesure d'angle de contact

Afin d'examiner le mouillage de la surface des capteurs suite au greffage des sondes oligonucléotides compl. *Zymo-SH*, l'angle de contact formé par une gouttelette d'eau déionisée de 2 μL avec cette surface a été mesuré en utilisant le même équipement GBX Digidrop que celui utilisé dans le Chapitre IV (cf. § IV.5.1). La **Figure V. 5** montre les photographies de la goutte déposée sur (i) la surface d'or vierge, l'angle de contact est alors de l'ordre de 66° , (ii) cette même surface après traitement UV- O_3 , l'angle de contact est inférieur à 5° et (iii) la surface fonctionnalisée (protocole "pleine plaque") par les sondes *Zymo-SH*, il est alors de 40° . Cette dernière valeur ainsi que la variation de l'angle de contact indiquent une modification de la mouillabilité de la surface par les monobrin d'ADN. Nos résultats concordent avec ceux rapportés par Singh *et al.* [5]. Toutefois, le caractère hydrophile d'une surface fonctionnalisée par de l'ADN dépend de la nature de l'oligonucléotide, de la concentration des solutions d'immobilisation et du temps de fonctionnalisation, c'est pourquoi d'autres valeurs d'angle de contact sur des surfaces d'Or fonctionnalisées par des monobrin d'ADN peuvent être rapportés [6–8].

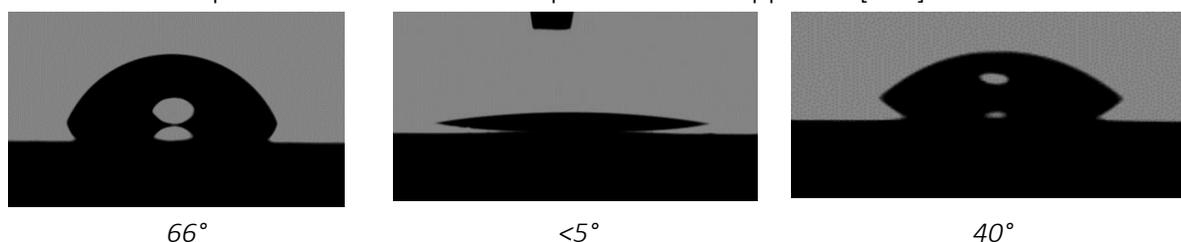


Figure V. 5: Photographie d'une goutte d'eau dé-ionisée déposée sur des surfaces a.) d'Or nu, b.) d'Or traité aux UV- O_3 , c.) d'Or fonctionnalisées par compl. *Zymo-SH*.

V.2.1.2.2 Spectroscopie vibrationnelle Raman

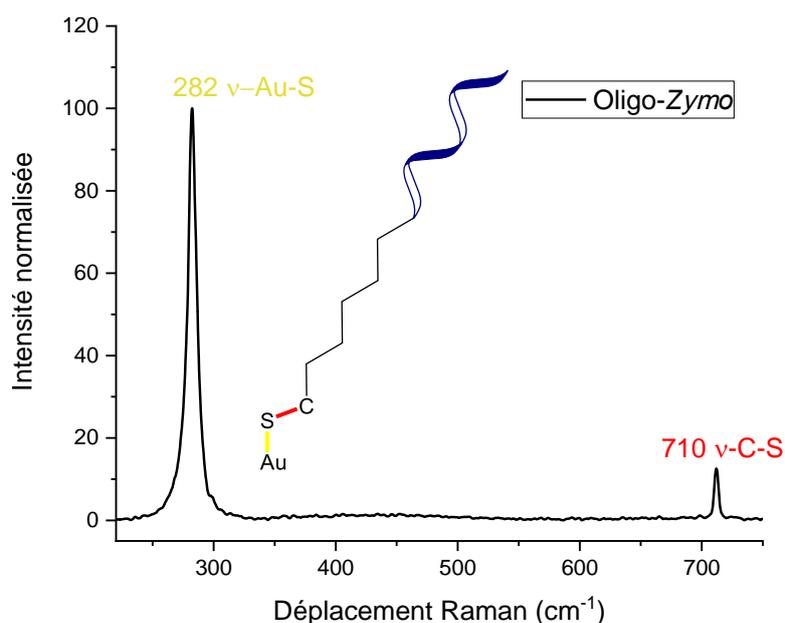


Figure V. 6: Spectre RAMAN de la surface du capteur greffée en oligonucléotide thiolé.

La **Figure V. 6** présente le spectre Raman brut d'une surface greffée avec l'oligonucléotide compl. *Zymo*-SH via la liaison Au-S.

Il présente deux pics distincts, le premier à 282 cm^{-1} correspondant aux vibrations d'élongation de la liaison ν -Au-S qui témoigne du greffage de l'oligonucléotide thiolé par chimisorption et le second à 710 cm^{-1} correspondant aux vibrations d'élongations symétriques de la liaison ν_s -C-S présente dans le bas de l'ossature de la molécule *Zymo*-SH tel que montré en **Figure V. 6** [9–11]. Ce résultat confirme bien la liaison de l'oligonucléotide thiolé en surface du capteur.

V.2.1.2.3 Spectroscopie photoélectronique aux rayons X (XPS)

Le greffage des monobrins d'ADN thiolés (compl. *Zymo*-SH) a aussi été confirmé par spectroscopie de photoélectrons X (XPS), sur un équipement de type Physical Electronics 5600. La **Figure V. 7** montre le spectre XPS d'une surface d'au fonctionnalisée par des monobrins compl. *Zymo*-SH. Il a d'abord été possible d'identifier les pics caractéristiques des niveaux de cœur 4f, 4d et 4p de l'or (constituant la surface de notre capteur) situés respectivement à 84, 334 et 346 eV. L'immobilisation de l'oligonucléotide thiolé a été confirmée par la présence des pics caractéristiques de S 2p, C 1s, N 1s et O 1s présents à 162, 227, 286, 400 et 533 eV respectivement, éléments qui sont présents dans l'ossature de l'ADN.

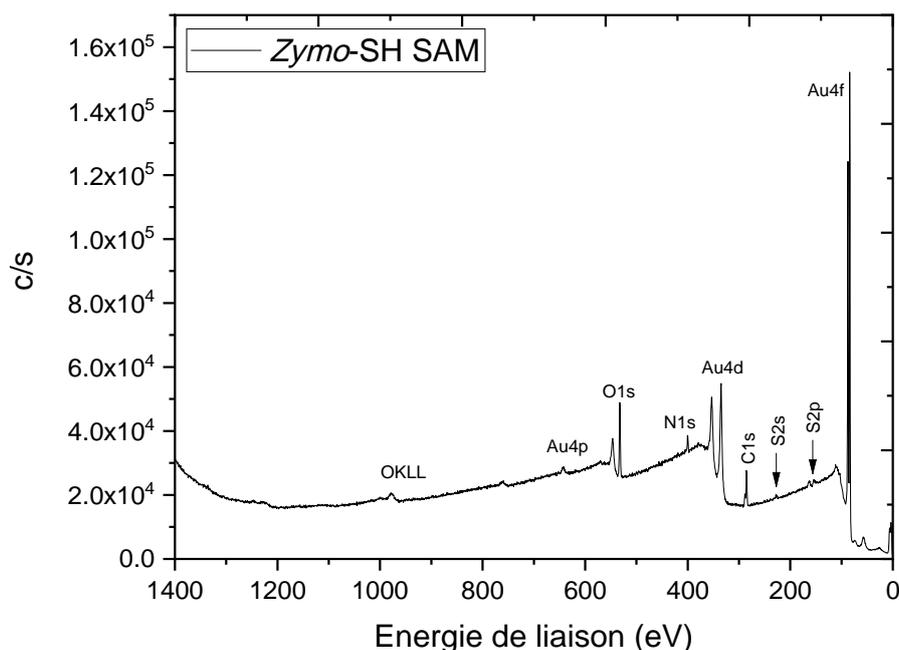


Figure V. 7: Spectre XPS de la surface d'au fonctionnalisée par l'oligonucléotide thiolé compl. *Zymo*-SH.

La **Figure V. 8.a.** présente le spectre XPS à haute résolution des niveaux électroniques 4f de l'or (Au 4f). Il présente deux pics asymétriques à 84 et 88 eV correspondant aux composantes Au $4f_{7/2}$ et Au $4f_{5/2}$, la position de ces deux pics indique que l'état de surface d'or est oxydé suite au greffage du compl. *Zymo*-SH [12].

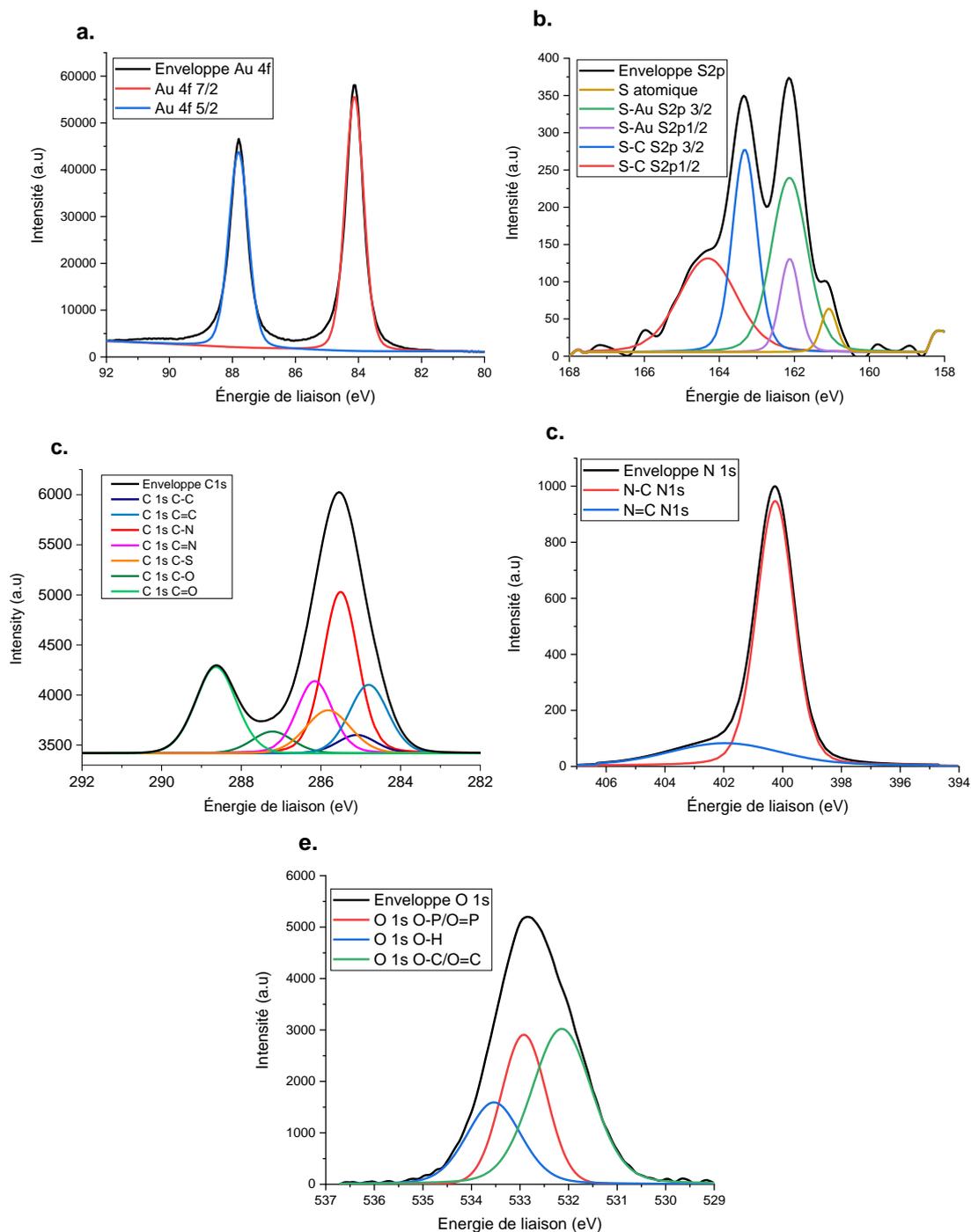


Figure V. 8: Spectres XPS à haute résolution de: a. Au 4f, b. S 2p, c. du C1s, d. N 1s, et O 1s.

Le spectre à haute résolution des niveaux électroniques 2p du soufre (S 2p) est présenté dans la **Figure V. 8.b.**, l'enveloppe spectrale montre une allure complexe à cinq composantes qui peuvent être classées en deux catégories. La première formée d'un triplet, elle concerne les molécules thiolées greffées à la surface d'or, dont deux pics sont assignés aux niveaux de cœur S 2p_{3/2} et S 2p_{1/2} du soufre lié à la surface d'or (S-Au) positionnés à 162 et 163 eV, respectivement, tandis que le pic à 161 eV correspondant au S 2p_{3/2} est très discuté. En effet, la présence du pic à ~161 eV dans un spectre à haute résolution du S 2p est souvent liée à l'adsorption atomique du soufre sur une surface d'or soit par la présence de soufre sous forme

Chapitre V : Détection de *Zymoseptoria tritici*

d'impuretés soit suite au clivage de la liaison C-S des molécules thiolées. Toutefois, nous écartons ces deux hypothèses car l'oligonucléotide utilisé est hautement pur ; de plus, la cassure de la liaison C-S n'a lieu que dans des conditions extrêmes (recuit à haute température, irradiations aux UV ou plasma...) [13–17]. L'explication qui nous semble la plus plausible, basée sur des études théoriques et expérimentales, a été avancée par Jia *et al.* [18,19] qui justifient l'apparition de ce pic à 161 eV par la présence de défauts structuraux sur la surface d'or ou plutôt à la formation de la liaison Au-S sur un site surélevé de la surface. Quant à la deuxième catégorie, elle est composée d'un doublet à 163,3 eV et à 164 eV attribué à l'énergie de liaison S-C $S2p_{3/2}$ et $S2p_{1/2}$ correspondants aux thiols physisorbés à la surface [20,21].

La **Figure V. 8.c** montre le spectre à haute résolution des pics C 1s (niveaux électroniques 1s du carbone), leur déconvolution montre qu'il existe plusieurs environnements chimiques du carbone. En effet, les pics positionnés à 284,8 ; 285,1 ; 285,85 ; 285,5 ; 286,15 ; 287,2 et 288,65 eV peuvent être attribués aux composantes C-C, C=C, C-S, C-N, C=N, C-O, C=O respectivement du C1s présentes dans l'ossature de l'oligonucléotide compl. *Zymo-SH*.

La **Figure V. 8.d** représente le spectre à haute résolution du N 1s à ~400 eV, la déconvolution du pic indique la présence de deux composantes dont les pics sont positionnés à 400,13 et 400,70 eV typiques/spécifiques aux amines présents dans la structure de l'ADN (N-C et N=C) [22–24].

Quant au spectre à haute résolution du O 1s montré dans la **Figure V. 8.e** à ~530 eV, il présente trois composantes dont les pics sont à 532,32 , 532,83 et 533,27 eV qui sont attribués à l'oxygène lié au carbone O-C, O=C et à l'oxygène lié au groupement phosphate, respectivement (P=O/P-O-) [25–29]. Cette dernière composante indique la présence de phosphate à la surface, qui est un élément important dans la constitution de l'ADN. Toutefois, le spectre à haute résolution du P 2p n'a pu être obtenu, car il nécessite un temps d'acquisition beaucoup plus long.

V.2.1.2.4 Microscopie à Force Atomique

L'imagerie par microscopie par force atomique a été réalisée à l'aide d'un équipement du type Nanoscope Dimension 3100 de Digital Instruments en mode sans-contact avec une vitesse de 1 $\mu\text{m/s}$ sur des surfaces de silicium polies métallisées avec de l'or, puis fonctionnalisées.

La surface d'au nu (**Figure V. 9.a**) présente une rugosité de l'ordre de 2,91 nm notamment due à la présence d'impuretés sur la surface d'or. En sélectionnant une surface plus petite (**Figure V. 9.b**) et sans impuretés, la rugosité est de 2,63 nm. Il est difficile à ce stade de savoir si cela est lié à la rugosité initiale du substrat silicium ou à celle du dépôt métallique; c'est très probablement une conjonction des deux. À l'opposé, la surface d'or fonctionnalisée avec les sondes *Zymo-SH* (**Figure V. 9.c**) présente une rugosité moindre, de l'ordre de 0,96 nm avec l'apparition d'une phase continue qui correspondrait à une monocouche organique auto-assemblée bien organisée et continue. Cependant, cette constatation ne concorde pas avec celle d'études publiées montrant que la formation d'une monocouche auto-assemblée sur une surface d'or à faible rugosité résulte en une surface de rugosité supérieure [30,6,31]. Nos résultats semblent plutôt indiquer que la monocouche *Zymo-SH* formée

viendrait, par son agencement, planariser la surface en la transformant ainsi en une surface beaucoup moins rugueuse. Toutefois, les images AFM collectées sont semblables à celles présentées dans l'étude de Pomales *et al.* [32] dans laquelle une SAM d'ADN thiolé a été déposée sur une surface d'or.

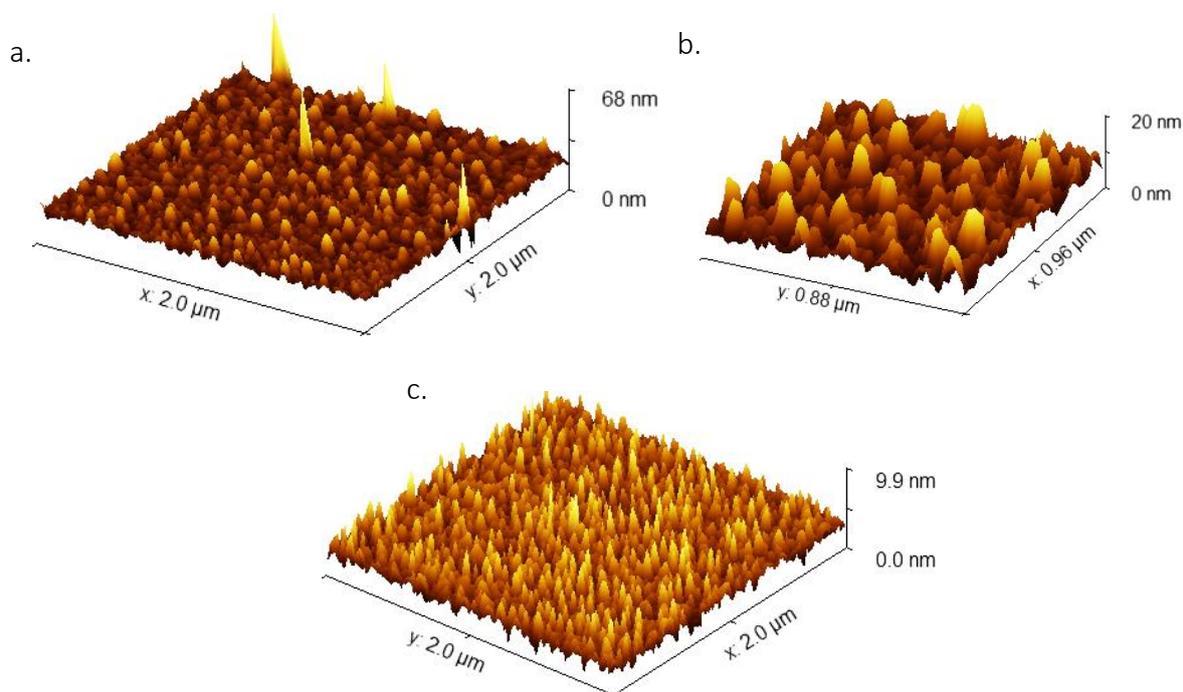


Figure V. 9: Images AFM de : a) surface d'Or vierge b) partie de surface d'Or vierge, c) surface d'Or fonctionnalisée au Zymo-SH.

V.2.1.2.5 Voltampérométrie cyclique

La voltampérométrie cyclique (CV) nous a permis de vérifier la fonctionnalisation de surface par méthode électrochimique en utilisant le potentiostat PalmSens Sensit Smart®, équipé d'électrodes électrochimiques sérigraphiées BVT-AC1. Ces dernières sont dotées d'une électrode de référence en Ag et d'une électrode de travail en Au dont le diamètre est de 2 mm.

Les mesures CV ont été effectuées dans du PBS à 10 mM, avant et après immobilisation des sondes compl. *Zymo*-SH, sur une gamme de tension de [-1 V – 0,6 V] avec une vitesse de balayage de 100 mV/s. L'électrode de travail en or permet d'utiliser le même protocole de greffage de l'oligonucléotide thiolé que celui utilisé pour les capteurs. La **Figure V. 10** montre les voltammogrammes cycliques obtenus sur une surface d'électrode BVT-AC1 fonctionnalisée avec de l'ADN compl. *Zymo*-SH. On constate que les pics du cycle redox sont moins marqués après immobilisation du monobrin ADN sonde (compl. *Zymo*-SH) et encore moins après hybridation du monobrin complémentaire (*Zymo*). Cette chute de la conductivité est due à la formation de la monocouche organique, qui après appariement des deux brins d'ADN, est devenue plus importante. Plus précisément, les brins d'ADN immobilisés et hybridés empêchent le transfert d'électrons à la surface de l'électrode [33–37].

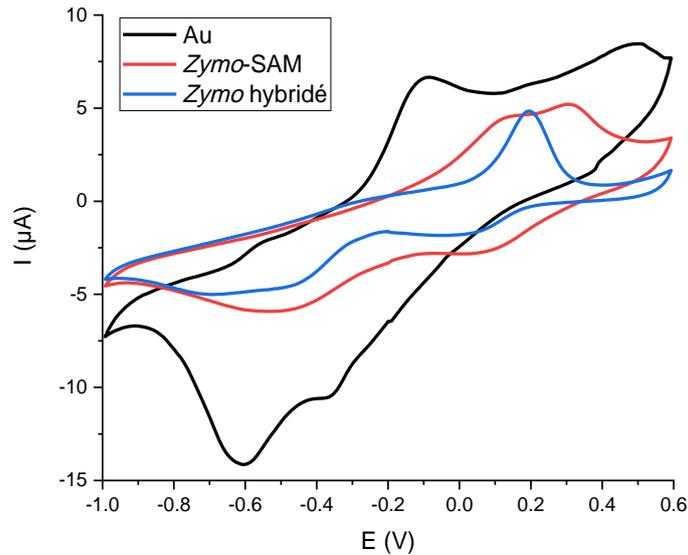


Figure V. 10: Voltammogrammes d'une surface d'or, seule (noir), fonctionnalisée en sondes (compl. Zymo-SH) (rouge) et après l'hybridation avec le monobrin Zymo (bleu).

L'ensemble de ces caractérisations valident bien le greffage de la sonde compl. Zymo-SH à la surface du capteur.

V.2.2 Tests d'appariement préliminaires : séquences Adénine et Thymine

V.2.2.1 Interaction en mode statique et dynamique (fonctionnalisation uniforme)

Cette expérimentation a eu pour but de déterminer si le mode statique (quantité figée d'analytes) ou dynamique (flux continu d'analytes) de l'interaction influait sur son résultat. Le capteur pré-fonctionnalisé (cf. §V.2.1.1 et **Figure V. 3**) a été testé en utilisant un analyte contenant une solution de brins d'oligonucléotides complémentaires A100 injectée sur les canaux 2 et 3. Le canal 1 n'est pas utilisé et le canal 4 sert de référence par injection du tampon PBS seul (**Figure V. 11**).

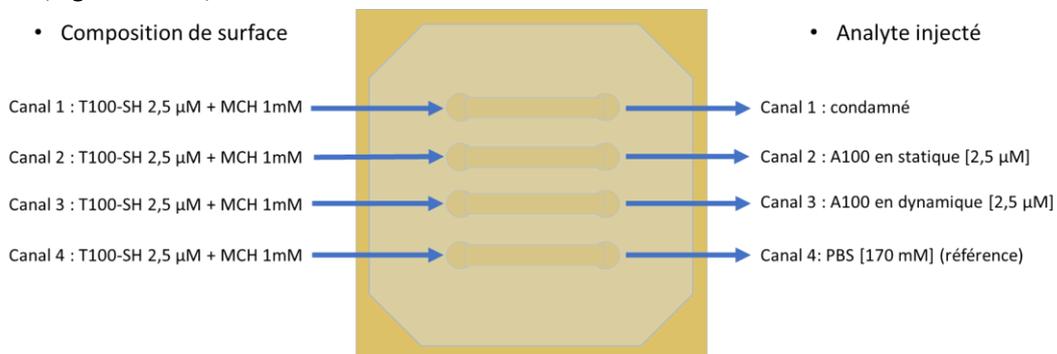


Figure V. 11: Fonctionnalisation uniforme: Schéma récapitulatif indiquant la fonctionnalisation de surface et l'analyte utilisé pour chaque canal.

La **Figure V. 12** illustre les sensorgrammes d'appariement des sondes T100 avec les analytes A100 en mode statique (canal 2) et dynamique (canal 3) ainsi que celui de la référence PBS (canal 4). L'expérimentation a été menée en trois étapes:

- **pendant 10 minutes:** injection de PBS ([170 mM], pH= 8,1) en flux dynamique continu dans les trois canaux pour obtenir une ligne de base correcte et vérifier la stabilité de la réponse.
- **pendant environ 2h15:** injection d'une solution de tampon phosphate salin (PBS) à une concentration de 170 mM et de pH= 8,1 contenant les oligonucléotides A100 à une concentration de 2,5 μ M dans les canaux 2 et 3, alors que le canal 4 reste alimenté par le PBS, correspondant au test positif statique, au test positif dynamique et au test de référence, respectivement.
 - la pompe du canal 2 est stoppée environ à 18 minutes après le début de l'injection pour étudier la différence entre l'interaction moléculaire en statique et en dynamique.
- **fin de cycle (> 30 minutes):** réinjection du PBS dans les canaux 2 et 3 afin d'éliminer les brins d'ADN n'ayant pas réagi avec les sondes et ainsi n'obtenir la réponse liée aux seules interactions. Le canal 4 est remis en mode dynamique.

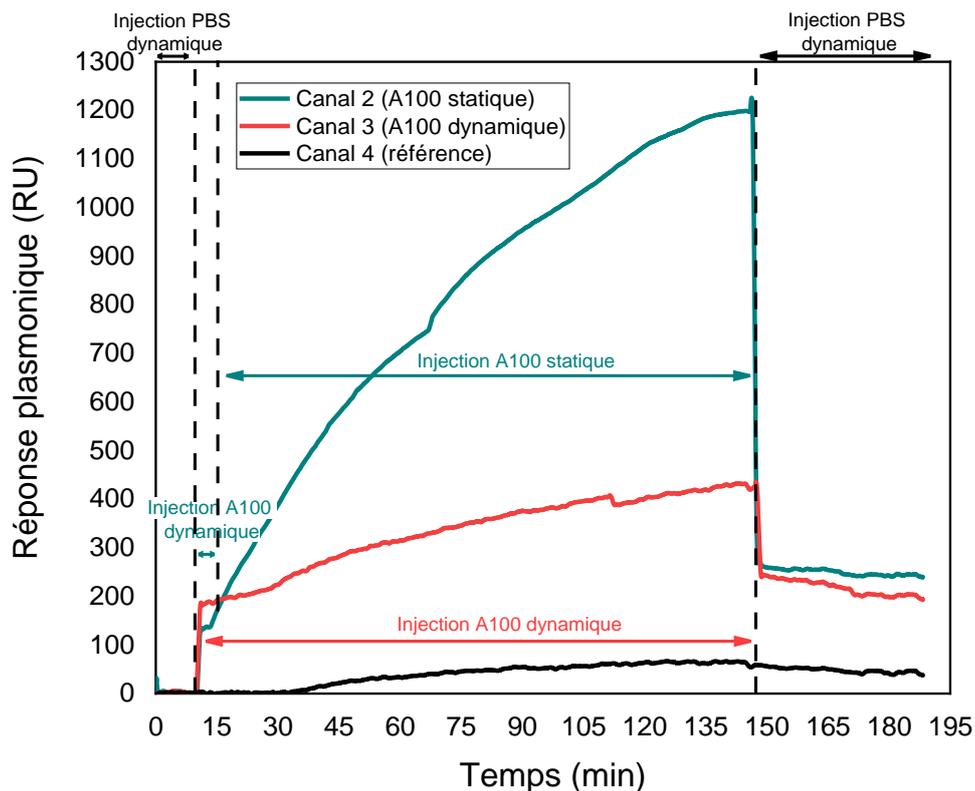


Figure V. 12: Sensorgrammes de l'interaction des sondes T100-SH avec les monobrins complémentaires A100: en mode statique, en mode dynamique et référence PBS.

Dans les canaux 2 et 3, l'injection de la solution contenant les oligonucléotides A100 induit une augmentation de la réponse quasi-instantanée de l'ordre de 140 RU et 190 RU, respectivement. En fin de période d'interaction la réponse atteint 1200 RU et 430 RU pour,

Chapitre V : Détection de *Zymoseptoria tritici*

respectivement, l'interaction en mode statique (canal 2) et dynamique (canal 3). Le sensorgramme du canal 4 (référence) montre clairement une dérive de la réponse pendant ces quelques 2 heures de fonctionnement, dérive qui alors peut aussi s'identifier sur les canaux 2 et 3. Après la période d'interaction, i.e. en début de séquence de rinçage, la réponse se stabilise plus ou moins à 250 RU et 230 RU respectivement sur les canaux 2 et 3. Ce niveau correspond alors à la valeur représentative de la quantité de monobrins A100 appariés avec les sondes T100.

La **Figure V. 13** résume ces résultats sous forme d'histogramme. On peut en déduire que le mode d'interaction statique ou dynamique n'influe pas réellement le résultat final, la variation observée étant de 21 RU, qui est inférieure à la résolution du système (25 RU, cf. **Tableau III. II**).

Ce test préliminaire sur le couple T100-A100 a permis de vérifier que l'appariement de deux monobrins d'ADN complémentaires de longueur modérée (100 paires de bases, environ 62 kDa) peut être mesuré avec la valisette. De plus, la comparaison de deux modes d'interaction, en statique et en dynamique, a montré que les résultats obtenus étaient identiques. La dérive observée pourrait être due à un effet mécanique généré par les pompes péristaltiques qui modifierait très légèrement le positionnement du prisme de couplage vis à vis du faisceau d'entrée ou, plus probablement, à un effet thermique ambiant, le système n'étant pas régulé en température.

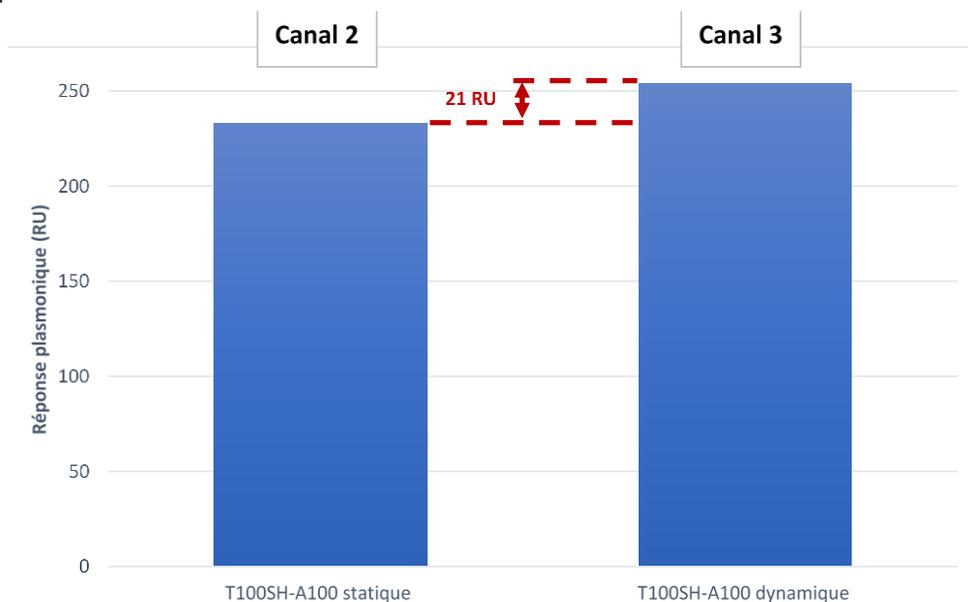


Figure V. 13: Réponse comparative obtenue en mode statique (canal 2) et en mode dynamique (canal 3) sur l'interaction T100-A100.

V.2.2.2 Spécificité de l'interaction et densité des sondes (fonctionnalisation localisée)

V.2.2.2.1 Spécificité de l'interaction et influence de la densité des sondes (1)

Une première expérimentation a été menée pour tester simultanément la spécificité de l'interaction et l'influence de la densité des sondes. Etant donné les résultats obtenus au paragraphe précédent, l'interaction a été faite en mode statique, ce qui a l'avantage de

minimiser la quantité d'analyte nécessaire. Afin de tester l'influence de la densité de sondes, une fonctionnalisation localisée a été réalisée sur les capteurs.

Le canal 1 reçoit une concentration maximale en sonde T100 et recevra un analyte composé de monobrins non-complémentaires GT50. La concentration maximale en T100 sur ce canal a pour but de maximiser toute interaction T100-GT50. La concentration en T100 sur les autres canaux est dégressive et servira à discerner la potentielle influence de la concentration de sondes sur la réponse. Le canal 3 servira dans ce test de canal de référence (analyte PBS).

La fonctionnalisation de chaque canal ainsi que l'analyte y étant injecté sont reportés sur la **Figure V. 14** (à noter que la concentration maximale de sondes T100-SH est ici de 6 μM , elle était de 2,5 μM dans l'expérimentation du paragraphe précédent).

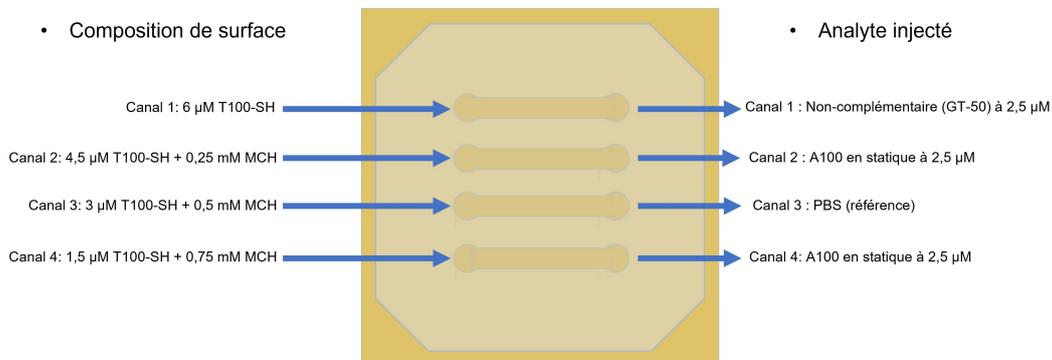


Figure V. 14: Fonctionnalisation localisée: schéma récapitulatif indiquant la fonctionnalisation de surface et l'analyte utilisés pour chaque canal.

La **Figure V. 15** illustre les sensorgrammes d'appariement des sondes T100 avec les analytes GT 50 (canal 1), A100 (canal 2 et 4 avec concentration différente de sondes) et référence PBS (canal 3). L'expérimentation a été menée en cinq étapes, en mode statique sur tous les canaux:

- **pendant 13 minutes**: Injection de PBS ([170 mM], pH= 8,1) en flux continu dans les quatre canaux microfluidiques pour obtenir une ligne de base correcte et vérifier la stabilité de la réponse.

- **pendant 1h20**: Injection d'une quantité suffisante du non-complément GT50 de concentration 2,5 μM dans le canal 1, du complément oligonucléotide A100 2,5 μM dans les canaux 2 et 4 et du PBS dans le canal 3.

- les quatre pompes sont stoppées environ 3 minutes après le début de l'injection L'expérimentation continue en mode statique.

- **pendant 30 minutes**: Réinjection du PBS dans tous les canaux pour procéder au rinçage des surfaces afin d'éliminer les brins d'ADN ne s'étant pas appariés.

- **après ces 30 minutes**: Arrêt des pompes dans le but de vérifier l'évolution de la réponse, en mode statique sans interaction biologique.

- **fin de cycle (environ 10 minutes)**: Redémarrage des pompes pour vérifier le comportement de la réponse en mode dynamique sans interaction biologique.

L'injection de l'analyte contenant les oligonucléotides complémentaires de type A100 induit une augmentation quasi-instantanée de la réponse de l'ordre de, respectivement, 580 et 530

Chapitre V : Détection de *Zymoseptoria tritici*

RU au niveau des canaux 2 (fonctionnalisé avec une solution à 4,5 μM T100-0,25 mM MCH) et 4 (fonctionnalisé avec une solution à 1,5 μM T100-0,75 mM MCH). Une diminution du signal de l'ordre de 100 RU est observée au niveau du canal 1, dans lequel l'analyte non-complémentaire (GT50) a été injecté. Cette variation négative de la réponse pourrait être liée à un indice de réfraction plus faible de la solution contenant les analytes GT50 à 2,5 μM par rapport à celui du PBS référence à 170 mM. Lors du passage en mode statique, la réponse a continué d'augmenter sous forme de dérive dans les quatre canaux microfluidiques jusqu'à atteindre 200 RU, 910 RU, 380 RU et 930 RU, pour les canaux 1 (GT50), 2 (4,5 μM T100-SH), 3 (PBS) et 4 (1,5 μM T100-SH), respectivement. Comme mentionné précédemment, la valisette n'incorporant pas de contrôle de température, cette dérive serait majoritairement liée à l'échauffement de la zone de mesure généré notamment par son éclairage continu par le faisceau optique [38] et par la thermique engendrée par la source blanche. Dès l'injection du PBS destiné au rinçage des zones d'interaction, une chute de la réponse à 500 RU et 460 RU, respectivement dans les canaux 2 et 4, est observée. Ces valeurs correspondent à l'équivalent de la quantité réelle de molécules analytes A100 appariées avec les sondes T100. La diminution de la concentration de sondes T100 dans le canal 4 n'a pas modifié drastiquement la réponse, étant donnée la résolution de la mesure (25 RU). La réponse des canaux 1 (GT50) et 3 (référence PBS), dans lesquels aucune interaction n'a eu lieu, reviennent presque au même niveau initial. Dès le nouvel arrêt des pompes péristaltiques, la dérive de la réponse, jusqu'alors quasiment plate depuis leur remise en route, reprend. Ce phénomène confirmerait bien la dérive en température du milieu de mesure en mode statique. Cette dérive, principalement liée à la température serait très fortement minimisée en mode dynamique par la stabilisation en température liée au flux continu d'analyte.

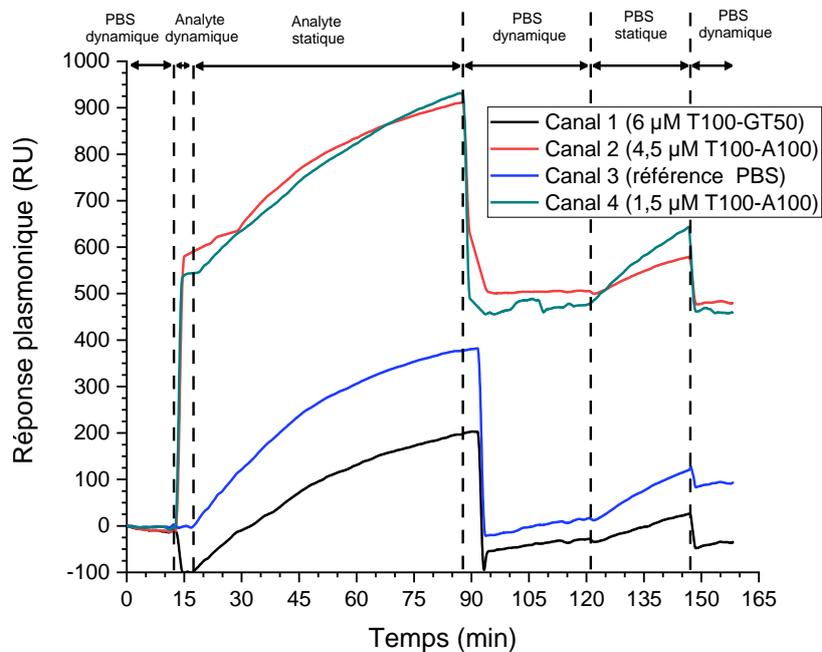


Figure V. 15: Sensorgrammes: spécificité de l'appariement (canal 1) et influence de la densité de sondes T100 (canaux 2 et 4).

Chapitre V : Détection de *Zymoseptoria tritici*

RU au niveau des canaux 2 (fonctionnalisé avec une solution à 75% T100-25% MCH) et 4 (fonctionnalisé avec une solution à 25% T100-75% MCH). Une diminution du signal de l'ordre de 100 RU est observée au niveau du canal 1, dans lequel l'analyte non-complémentaire (GT50) a été injecté. Cette variation négative de la réponse pourrait être liée à un indice de réfraction plus faible de la solution contenant les analytes GT50 à 2,5 μM par rapport à celui du PBS référence à 170 mM. Lors du passage en mode statique, la réponse a continué d'augmenter sous forme de dérive dans les quatre canaux microfluidiques jusqu'à atteindre 200 RU, 910 RU, 380 RU et 930 RU, pour les canaux 1 (GT50), 2 (75% T100-SH), 3 (PBS) et 4 (25% T100-SH), respectivement. Comme mentionné précédemment, la valisette n'incorporant pas de contrôle de température, cette dérive serait majoritairement liée à l'échauffement de la zone de mesure généré notamment par son éclairage continu par le faisceau optique [38] et par la thermique engendrée par la source blanche. Dès l'injection du PBS destiné au rinçage des zones d'interaction, une chute de la réponse à 500 RU et 460 RU, respectivement dans les canaux 2 et 4, est observée. Ces valeurs correspondent à l'équivalent de la quantité réelle de molécules analytes A100 appariées avec les sondes T100. La diminution de la concentration de sondes T100 dans le canal 4 n'a pas modifié drastiquement la réponse, étant donnée la résolution de la mesure (25 RU). La réponse des canaux 1 (GT50) et 3 (référence PBS), dans lesquels aucune interaction n'a eu lieu, reviennent presque au même niveau initial. Dès le nouvel arrêt des pompes péristaltiques, la dérive de la réponse, jusqu'alors quasiment plate depuis leur remise en route, reprend. Ce phénomène confirmerait bien la dérive en température du milieu de mesure en mode statique. Cette dérive, principalement liée à la température serait très fortement minimisée en mode dynamique par la stabilisation en température liée au flux continu d'analyte.

%

Figure V. 15: Sensorgrammes: spécificité de l'appariement (canal 1) et influence de la densité de sondes T100 (canaux 2 et 4).

La non-interaction T100-GT50 a donc été validée et une expérimentation complémentaire est menée sur l'influence de la concentration en sondes sur la réponse.

V.2.2.2.2 Influence de la densité des sondes (2)

Dans l'expérimentation précédente, les canaux 2 et 4 ont été utilisés pour l'interaction sondes-analytes. Le canal 1 n'a pas réagi et le canal 3 a servi de référence, ces deux canaux, a priori, vierges de toutes interactions, vont donc être utilisés ici pour un second test afin de déterminer quelle configuration de chimie de surface serait optimale pour la meilleure interaction T100 /A100. La fonctionnalisation de chaque canal du capteur est donc identique à celle du paragraphe précédent et seule l'analyte A100 est injecté dans les canaux 1 et 3 (*Figure V. 16*).

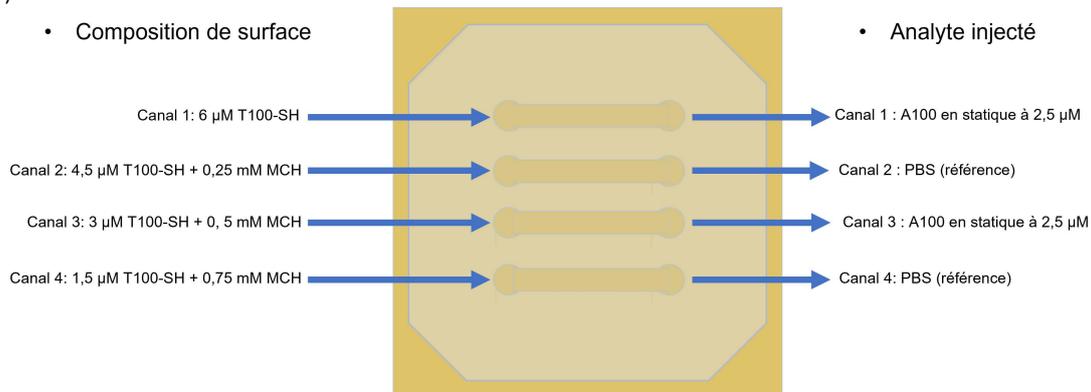


Figure V. 16: Répartition des analytes pour le test complémentaire sur l'influence de la concentration en sondes T100.

La *Figure V. 17* illustre les sensorgrammes d'appariement des sondes T100 avec les analytes A100 (canaux 1 et 3 avec concentration différente de sondes) et les références PBS (canaux 2 et 4). L'expérimentation a été ici ramenée sur trois étapes, identiquement à celle du § IV.2.1.2, en mode statique sur tous les canaux:

- 1- - **pendant 15 minutes:** Injection du PBS (170 mM, pH= 8,1) en flux dynamique continu dans les quatre canaux microfluidiques pour obtenir une ligne de base correcte et vérifier la stabilité du signal plasmonique.
 - 2- - **pendant 55 minutes:** Injection d'une quantité suffisante du complément oligonucléotide A100 à 2,5 µM dans les canaux 1 et 3 et de PBS dans les canaux 2 et 4.
 - les quatre pompes sont stoppées environ 3 minutes après le début de l'injection et l'expérimentation continue en mode statique.
- **fin de cycle (15 minutes):** Réinjection du PBS en flux continu dans les quatre canaux afin d'éliminer les brins d'ADN ne s'étant pas appariés.

L'injection d'une solution contenant les oligonucléotides complémentaires de types A100 de concentration de 2,5 µM au niveau des canaux microfluidiques 1 (6 µM T100) et 3 (3 µM T100) induit une augmentation de la réponse quasi-instantanée de l'ordre de 520 RU et 250 RU respectivement. Identiquement au test précédent, après l'arrêt des pompes, le signal a continué d'augmenter durant 55 min environ sous forme de dérive dans les quatre canaux microfluidiques jusqu'à atteindre environ 600 RU et 400 RU pour les canaux 1 et 3, respectivement. Les canaux références (canaux 2 et 4) ont atteint quant à eux 110 RU et 460

Chapitre V : Détection de *Zymoseptoria tritici*

RU, respectivement, avec un comportement différent, notamment pour le canal 4 dont la réponse semble diverger. Lors du rinçage sous flux de PBS, la réponse des canaux 1 et 3 chute à 510 RU et 250 RU, respectivement, pour se stabiliser ensuite. La réponse des canaux 2 et 4, dans lesquels aucune interaction n'a eu lieu, est quant à elle revenue au niveau initial malgré un comportement différent lors de l'expérimentation.

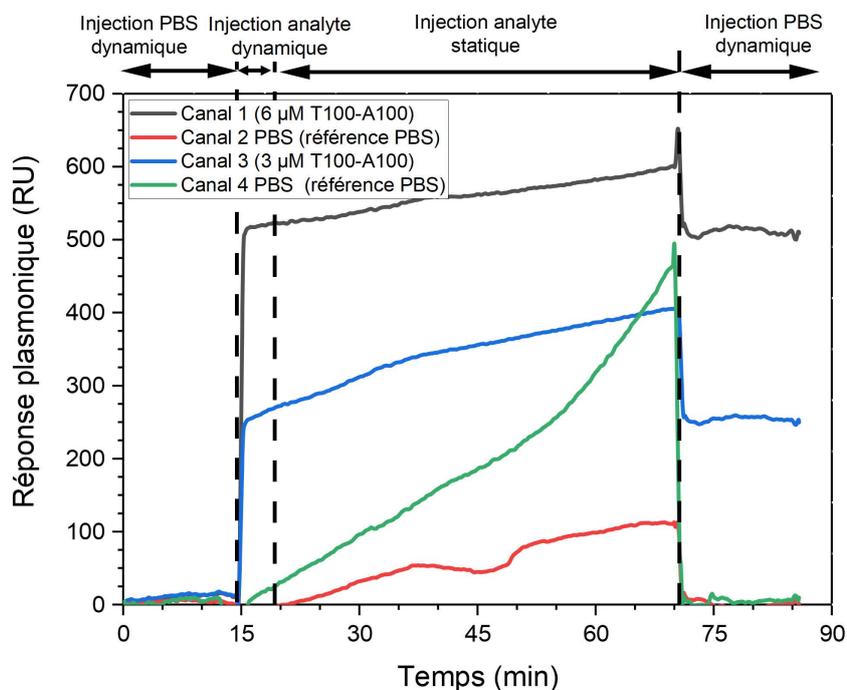


Figure V. 17: Sensorgrammes: influence de la densité de sondes T100 (canaux 1 et 3).

V.2.2.3 Conclusion sur les tests d'appariement T100-A100 sur la valisette

Cette étude a permis:

- de valider la détection de l'appariement de monobrins d'ADN complémentaires T100 - A100,
- de constater qu'un mode statique ou dynamique de présentation de l'analyte donnait le même résultat (§ V.2.2.1).
- d'évaluer différentes configurations de chimie de surface en essayant de structurer la surface fonctionnalisée par l'utilisation d'une molécule espaceur, le mercaptohexanol (MCH).

La **Figure V. 18** résume les résultats obtenus (§ V.2.2.2) en variant les proportions de sondes T100 et de molécules "espaceur". Hormis la réponse incohérente d'un canal, l'amplitude de la réponse diminue avec la proportion de sondes dans la solution de fonctionnalisation mais cette diminution est contenue puisqu'une baisse de l'ordre de 10% est enregistrée pour une concentration en sondes T100 réduite d'un facteur 4. Une analyse plus fine permettrait éventuellement de déterminer le rapport de concentration sonde-espaceur optimal permettant de conserver une réponse maximale tout en diminuant la concentration en sondes, donc le coût, de la fonctionnalisation.

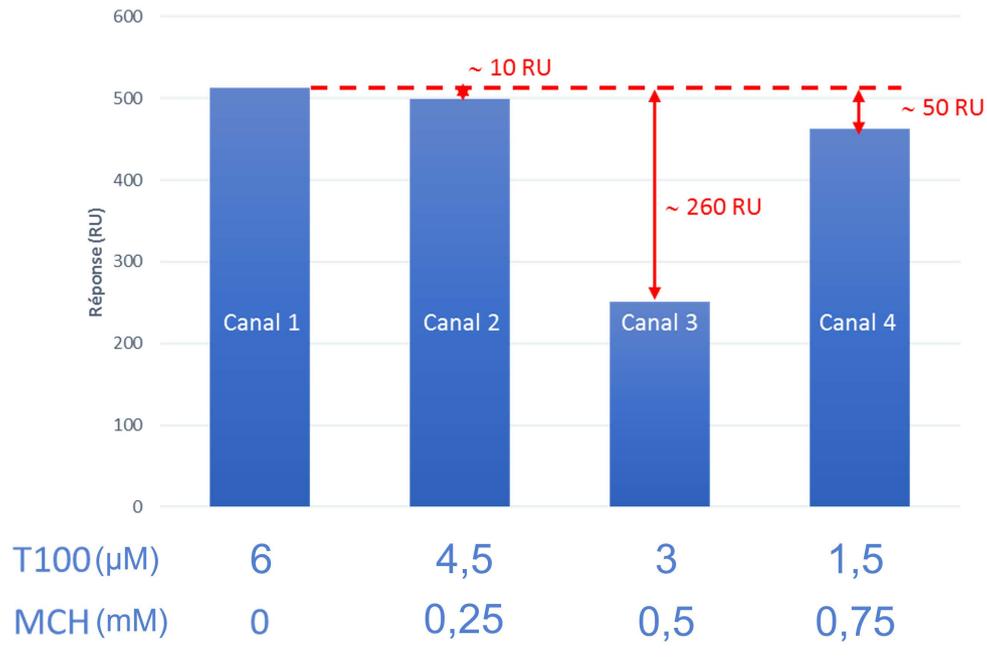


Figure V. 18: Réponses obtenues après rinçage et stabilisation du signal pour les différentes configurations de chimie de surface (pourcentage sonde T100 - espaceur MCH).

De ce fait, une fonctionnalisation de surface covalente à 6 μM de T100-SH nous a permis de détecter une quantité de monobrins complémentaires équivalents à 510 RU alors que des surfaces recouvertes avec 4,5, 3 et 1,5 μM de sondes nous ont permis de détecter l'équivalent de 490, 250 et 460 RU respectivement.

D'après ces résultats, on constate que l'utilisation d'une molécule "espaceur" a permis de détecter plus de quantité d'analytes par rapport à la quantité de sondes immobilisées. Son utilité est donc à considérer et à revérifier.

La réponse du canal 3 ne suit pas celles des autres canaux mais reste cohérente en soi, *i.e.* l'amplitude de la réponse après l'étape de rinçage des canaux au PBS est de l'ordre de celle obtenue dès l'injection de l'analyte.

Au-delà de ces constatations, nous avons pu observer, sur l'ensemble des expérimentations, que la concentration d'analytes utilisée, à savoir de l'ordre de 2,5 μM est trop élevée pour pouvoir suivre la cinétique d'interaction. La réponse "grimpe" immédiatement lors de l'injection de l'analyte à un niveau qui correspond à celui obtenu, *in fine*, après rinçage de la zone d'analyse. Il apparaîtrait donc que l'appariement des monobrins d'ADN soit, dans ces conditions, quasi immédiat et que la réponse obtenue lors des différents temps de réaction ne soit en fait que la dérive de ce signal très probablement liée aux effets thermiques inhérents à la technique de mesure et à l'environnement de la zone de mesure dans la valisette.

V.2.3 Détection de *Zymoseptoria tritici*

Il est à noter que le post-traitement des données au niveau de la valisette a été amélioré entre les expérimentations reportées jusqu'ici et celles qui vont suivre. Ces améliorations portent majoritairement sur le traitement des données brutes et plus directement sur la

Chapitre V : Détection de *Zymoseptoria tritici*

minimisation du bruit relatif à la mesure. La sensibilité donnée en Chapitre II n'est pas impactée. En revanche, la résolution ainsi que la limite de détection du système ont été améliorées sans que l'on ait pour autant relancé l'ensemble du protocole de calibration.

V.2.3.1 Sensibilité de détection

V.2.3.1.1 Injection cyclique d'analyte de concentration identique

Un capteur pré-fonctionnalisé (cf. § IV.2.1.1) a été utilisé. Trois canaux ont été utilisés et ont suivi le même protocole d'interaction. L'expérimentation est réalisée sur sept phases (sensorgrammes correspondants en **Figure V. 19**), en mode dynamique, en alternant l'injection de PBS et de solution contenant le nucléotide *Zymo* à une concentration de 500 nM. -

- **pendant 5 minutes:** Injection de PBS ([170 mM], pH= 8,1) permettant l'acquisition de la ligne de base et d'en vérifier la stabilité.

- **pendant 10 minutes:** Injection de la solution contenant l'oligonucléotide *Zymo*

- **pendant 5 minutes:** rinçage par injection de PBS

- **pendant 10 minutes:** Injection de la solution contenant l'oligonucléotide *Zymo*

- **pendant 5 minutes:** rinçage par injection de PBS

- **pendant 15 minutes:** Injection de la solution contenant l'oligonucléotide *Zymo*

- **fin de cycle:** rinçage par injection de PBS

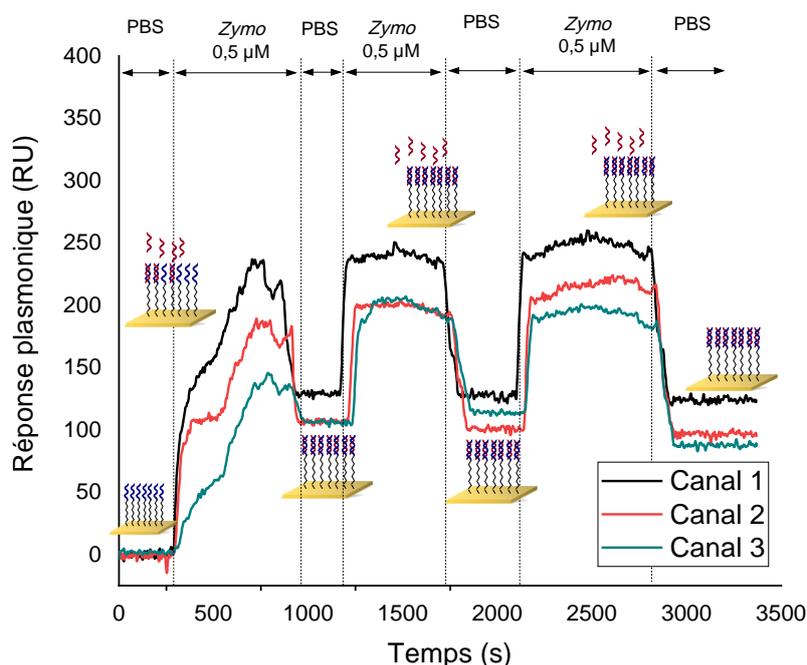


Figure V. 19: Sensorgrammes relatifs à la détection de l'oligonucléotide *Zymo* (injections de concentrations identiques).

L'injection de la solution contenant les oligonucléotides *Zymo* a immédiatement conduit à une augmentation de la réponse à 120, 190 et 250 RU pour les canaux 1, 2 et 3 respectivement. Une modification inexplicée des paramètres expérimentaux (observation d'une courbe de réponse plasmonique déformée) sur cette première période d'injection

a conduit à l'obtention d'un sensorgramme peu exploitable. Le rinçage de la surface avec le tampon PBS a entraîné le retrait des brins d'ADN *Zymo* physisorbés ou n'ayant pas réagi spécifiquement avec les sondes, ce qui se manifeste par une baisse et stabilisation de la réponse à 130 RU pour le canal 1 et 110 RU pour les canaux 2 et 3 bien que leur comportement durant la phase d'interaction ait été différent. Les deuxième et troisième injections d'analyte contenant les oligonucléotides n'ont pas permis de détecter davantage d'appariements. En effet, la réponse obtenue après les rinçages respectifs est au même niveau, à la résolution du système près, qu'avant injection (la réponse des canaux 1 et 2 est exceptionnellement stable), ce qui signifierait qu'aucune sonde ne soit encore disponible pour l'appariement, et que la surface aurait été saturée dès la première injection. Par ailleurs, l'augmentation de la réponse observée pendant les second et troisième cycles d'injection d'analyte *Zymo* ne serait alors pas relative à une interaction biologique, mais plutôt à la modification globale du milieu sondé (PBS -> PBS + *Zymo*), et en particulier de son indice optique. N'oublions pas en effet que la profondeur "d'interrogation" du milieu par l'onde plasmonique est largement plus importante que les quelques dizaines de nanomètres concernés par la fonctionnalisation et que la réponse représente, en plus de la variation d'indice apportée en surface par l'appariement des nucléotides, celle apportée par le fluide porteur. Les différences d'amplitude observées (de l'ordre d'une trentaine de RU) entre les trois sensorgrammes restent dans la gamme de valeur de la résolution estimée du système lors de la phase de calibration (cf. § III.1.32 et Tableau III.II).

De même, ces différences pourraient aussi être reliées à un angle d'injection légèrement différent d'un canal à l'autre (réglage optique au sein de la valisette). Nous avons en effet observé lors des expériences que cette variation d'angle d'incidence peut être causée par le système de clampage mécanique du système microfluidique sur le capteur.

V.2.3.1.2 Injection cyclique d'analyte de concentration différente

Une seconde expérimentation a été menée en utilisant un capteur pré-fonctionnalisé identique à celui de l'expérimentation précédente. Les 3 canaux ont aussi suivi le même protocole. Les sensorgrammes résultants sont présentés dans la **Figure V. 20.a**.

L'expérimentation s'est déroulée, toujours en mode dynamique, par une succession d'injections de solutions contenant le nucléotide *Zymo* (pendant 5 minutes) et de rinçage (pendant 3 minutes) mais cette fois-ci en utilisant des concentrations croissantes en nucléotides: 0,5 μM , 1 μM , 1,5 μM , 2 μM , 2,5 μM et 5 μM . L'utilisation d'un gradient de concentrations a pour but de vérifier la saturation de la surface, c'est-à-dire, de quantifier la quantité maximale d'analyte *Zymo* détectable par une surface fonctionnalisée à 2,5 μM de sondes compl. *Zymo*. Comme on peut en juger, la durée des différentes phases, 13 en l'occurrence, a encore été réduite par rapport à celle des expérimentations précédentes.

Un comportement identique à celui observé lors des deuxième et troisième injections d'analyte de l'expérimentation précédente est observé, *i.e.* une montée brusque de la réponse dès l'injection, suivie d'un plateau relativement stable durant l'injection et une diminution et stabilisation de la réponse dès le rinçage et ceci pour chaque concentration injectée. Néanmoins, une différence majeure apparaît sur la valeur de la réponse obtenue après chaque

séquence de rinçage, car la surface n'apparaît ici saturée qu'à partir de l'injection de Zymo à [2 μM], contrairement à ce qui a été obtenu précédemment, où la surface apparaissait saturée dès la première injection d'une concentration de 0,5 μM de l'analyte Zymo.

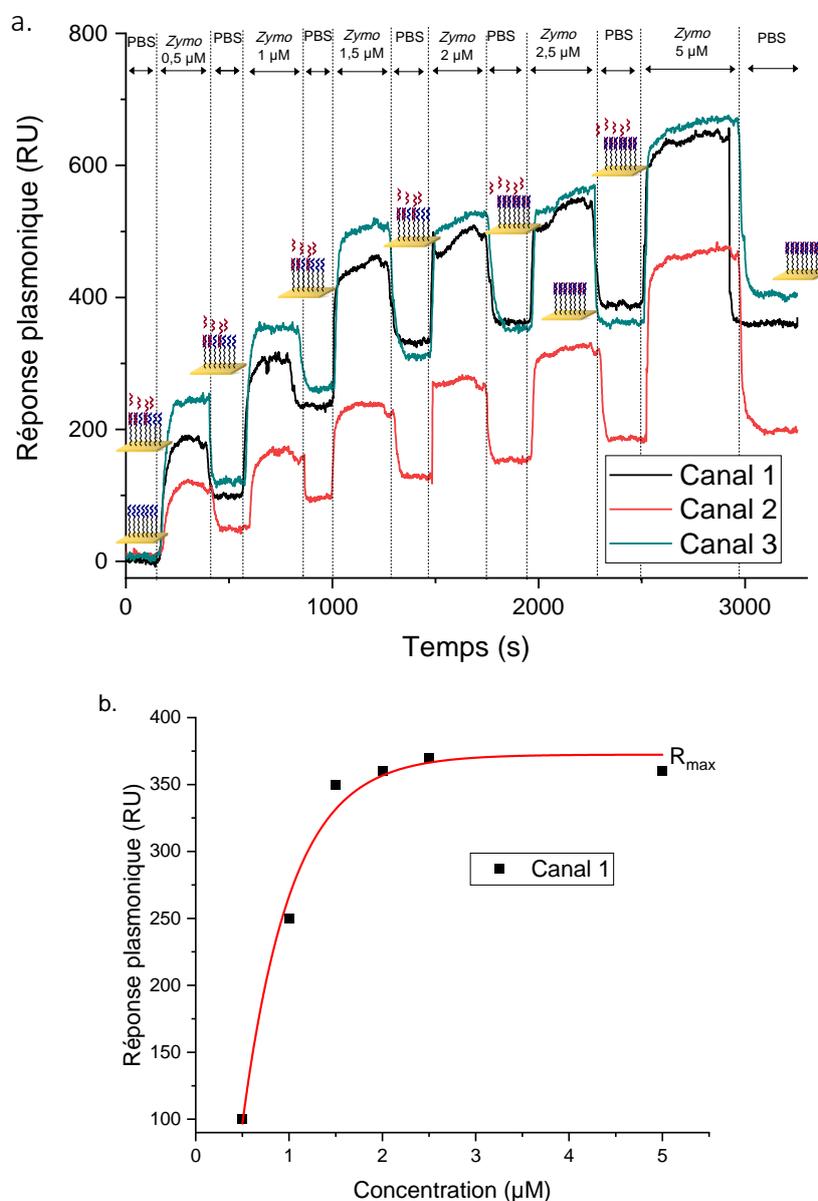


Figure V. 20: a. Sensorgramme du test 2 de la détection nucléotide/Zymo (injections de concentrations différentes). b. Évolution du niveau d'affinité en fonction de la concentration après rinçage au PBS

Le niveau R_{max} , défini comme le niveau de réponse atteint à saturation des ligands présents à la surface, a été déterminé au niveau du canal 1 en traçant la courbe d'évolution de la réponse plasmonique après rinçage en fonction de la concentration comme montré dans la **Figure V. 20.b**. Ce paramètre sera utilisé pour évaluer la cinétique d'interaction compl. Zymo-SH-Zymo. Pour expliquer ce résultat, considérons le couple concentration-temps d'injection et non la seule valeur de la concentration. L'interaction entre les deux monobrans est considérablement

forte et il a été démontré par Li *et al.* [39] que la force ionique du milieu tampon utilisé (calculé à 857,5 mM) favorise l'hybridation des monobrans d'oligonucléotides, mais empêcherait leur déshybridation, en particulier à température ambiante. Ce désappariement des deux monobrans d'ADN ne se produisant pas, ou très peu, lors des périodes de rinçage après injection, le capteur mesure une quantité cumulative d'appariements de monobrans. Dans l'expérience du § V.2.3.1.1, l'injection d'une solution de concentration [0.5 µM] durant 10 minutes mène, *a priori*, à une saturation des sites sondes, avec une réponse autour de 120 RU. Dans cette expérience, l'injection de la même concentration durant 5 minutes mène à une réponse de l'ordre de 60 RU, ce qui est cohérent. Néanmoins, en considérant les résultats précédents, la surface ne serait pas saturée. C'est ce qui est observé lors des injections suivantes ou la réponse obtenue après rinçage augmente continûment pour apparaître ici saturée autour d'une valeur de 180 RU. On s'aperçoit néanmoins que la saturation apparaît lentement, si l'on suit le raisonnement d'un effet cumulatif lié au couple concentration-durée d'injection, la réponse aurait dû atteindre les quelques 180 RU au terme de la seconde injection: [1 µM] durant 5 minutes aurait dû produire une réponse de l'ordre du double, soit 120 RU, de la réponse liée à la première injection ([0,5 µM] durant 5 minutes). Or, il n'en est rien. Il semblerait donc que la capacité de captation d'oligonucléotides d'une surface ayant déjà partiellement réagi est moindre que celle d'une surface vierge [40].

V.2.3.2 Évaluation de la Limite de détection (LOD)

Une fois la détection du monobran oligonucléotide *Zymo* confirmée par les expérimentations précédentes, une étude a été effectuée pour tenter de déterminer la limite de détection. En effet, les résultats précédents ont montré, *via* la cinétique et la saturation des réactions, que nous étions éloignés de la limite de détection.

Des analytes de concentration en analyte *Zymo* de 100 nM, 50 nM, 30 nM et 10 nM ont été injectés en dynamique pendant 270 secondes sur les capteurs (1 capteur par test). Tous les capteurs ont reçu la même fonctionnalisation de surface, uniforme (*cf.* § V.2.1.1). Les sensorgrammes correspondants sont montrés en **Figure V. 21**.

L'ensemble des tests montre l'appariement des monobrans et les concentrations plus faibles en analyte *Zymo* permettent d'observer clairement la cinétique d'appariement que l'on commençait à percevoir pour la concentration de 500 nM utilisée dans l'expérimentation précédente (*cf.* **Figure V. 20.a**). Deux constatations qualitatives peuvent être faites lorsque la concentration de l'analyte devient plus faible:

- la cinétique de l'interaction se ralentit,
- le bruit entache plus facilement les résultats.

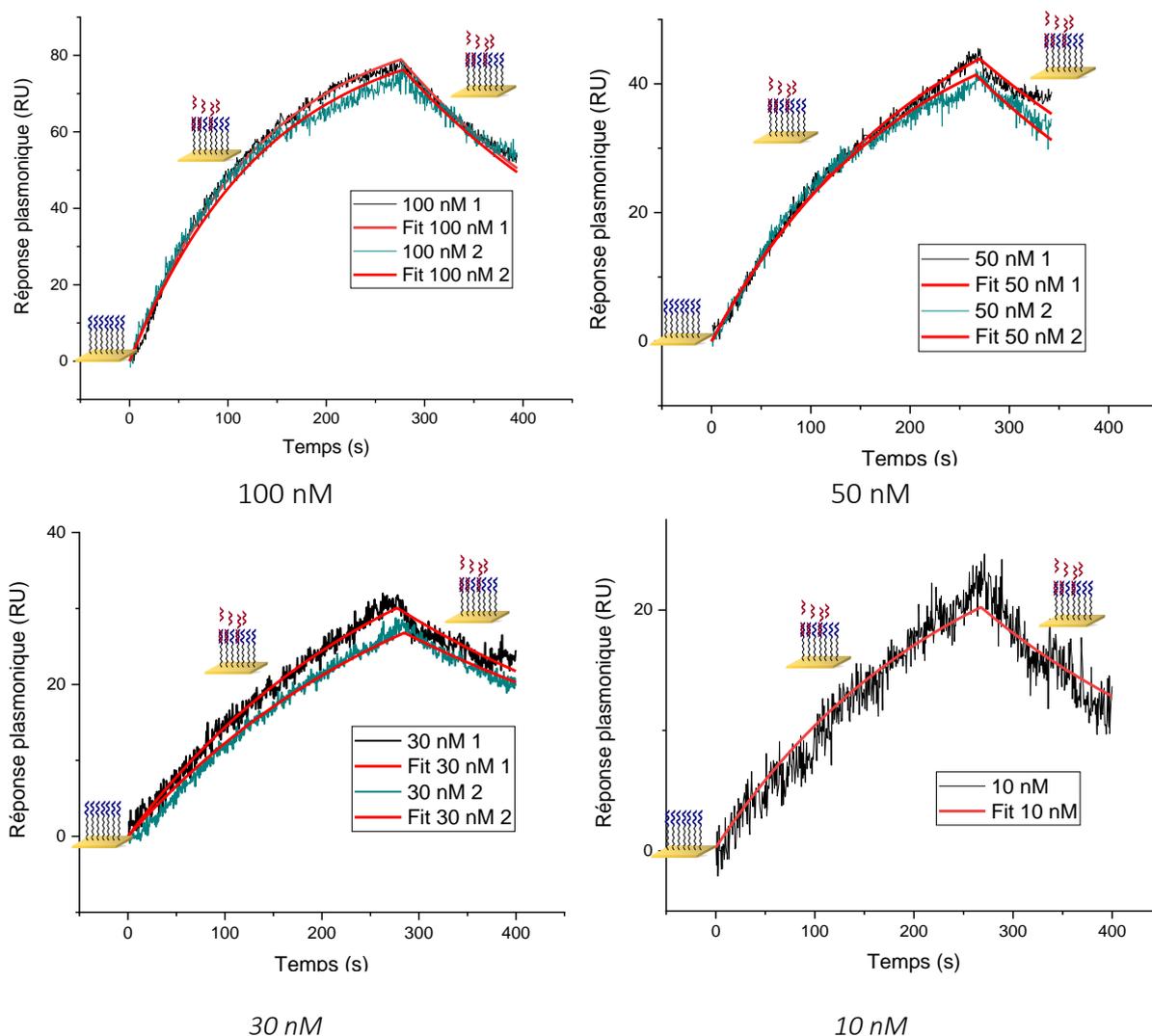


Figure V. 21: Sensorgrammes correspondant à l'injection de concentration différente en analytes Zymo.

V.2.3.3 Étude de la cinétique d'interaction

L'hybridation de deux monobrins d'ADN a été étudiée dans différents travaux. Dans certains, la cinétique d'appariement des deux oligonucléotides a été exposée comme suivant l'isotherme Langmuir 1:1, *i.e.* une sonde interagit avec une seule molécule cible [41,42]. D'autres études, plus récentes, ont démontré que cette interaction suit plutôt un modèle cinétique Langmuir en deux états (two-state Langmuir model), dans lequel une fois les monobrins d'ADN hybridés, le double brin passe à une phase de réarrangement conformationnel [39,43,44]. Une toute récente étude, menée par Vanjur *et al.*, et prenant en compte les répulsions électrostatiques résultant de l'encombrement stérique provenant des monocouches auto-assemblées des sondes nucléiques, propose que la cinétique des interactions entre les deux oligonucléotides ne suit pas le modèle de Langmuir classique [45]. Toutefois, la méthode d'ajustement (fit) peut varier d'un système à un autre, car ces analyses n'ont pas été réalisées avec des molécules individuelles (single-molecule analysis).

En raison de la légère modification du positionnement du prisme pouvant exister lors des différentes mesures, les sensorgrammes obtenus lors de cette étude ont été normalisés pour chaque concentration à la valeur maximale observée sur le canal 1 de chaque capteur, puis ajustés selon l'isotherme classique Langmuir 1:1 en utilisant le logiciel ©GraphPad Prism intégrant l'Eq. II. 7 et l'Eq. II 10 pour le calcul des constantes d'association k_a et de dissociation k_d , respectivement.

Le R_{max} de notre système Compl. *Zymo*-SH – *Zymo*, indispensable pour le calcul des constantes cinétiques a été évalué à partir du sensorgramme du canal 1 présenté dans la **Figure V. 20.a**. Comme montré dans la **Figure V. 20.b.**, R_{max} est observé à 370 RU, valeur à laquelle la surface du capteur semble être saturée.

Le "fit" des réponses nous a permis de valider que la cinétique d'interaction des deux monobrins *Zymo* et compl. *Zymo*-SH suit le modèle classique Langmuir de premier ordre. De plus, nous avons pu en évaluer les constantes d'association (k_a) et de dissociation (k_d). Pour les concentrations de 30, 50 et 100 nM, on enregistre une constante d'association et de dissociation qui convergent vers $k_a = 3,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ et $k_d = 3,2 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, respectivement, ce qui résulte en une constante de dissociation à l'équilibre $K_D = 10^{-7} \text{ M}$ (**Tableau V. III**).

La constante de dissociation à l'équilibre K_D est une mesure de la force de liaison (affinité entre la sonde et la cible) et a été calculée d'après l'Eq. II.2 (cf. § II.1.3.3.1.1) pour chacun des tests de détection. Sa valeur à l'équilibre (théorique) est entre 10^{-8} et 10^{-7} M indiquant une forte affinité entre les deux monobrins. Nos résultats sont donc similaires avec ceux présentés dans la littérature [19,46–48] et obtenus par détection SPR mais avec d'autres séquences d'oligonucléotides ADN. Dans cet échantillon de concentrations injectées, la plus faible (10 nM) ne permet pas de retrouver la tendance affichée par les autres. Nous supposons que cela est dû aux limites de détection de lecture. En effet, comme on peut l'observer sur le sensorgramme, on atteint une réponse maximale après 270 s de l'ordre de 22 RU, inférieure à la résolution et à la limite de détection estimées dans le Chapitre III.

| Concentration (nM) | R_{max} (RU) | $k_a (10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1})$ | $k_d (10^{-3} \text{ s}^{-1})$ | $K_D (10^{-8} \text{ M})$ |
|--------------------|----------------|--|--------------------------------|---------------------------|
| 10 | 370 | 6,69 | 3,5 | 5,23 |
| 30 | 370 | 3 | 2,55 | 8,79 |
| 50 | 370 | 3,07 | 3,33 | 10,8 |
| 100 | 370 | 3,5 | 3,7 | 10,5 |

Tableau V. III : Extraction des paramètres cinétiques à partir des interactions *Zymo* – compl. *Zymo*-SH obtenues sous différentes concentrations d'analytes.

V.3 Méthodes expérimentales: détection à base d'anticorps polyclonaux

V.3.1 Fonctionnalisation de surface

La surface du capteur a d'abord été greffée "pleine plaque" avec des molécules de 11-MUA (cf. §V.1.3) selon le protocole décrit par Ouellet *et al.* [49] en immergeant le capteur dans une solution éthanoïque de 11-MUA à une concentration de 11 mM (**Figure V. 22.a.**).

L'IgG-Zymo a alors été immobilisé de manière localisée en microfluidique. Pour ce faire, la monocouche auto-assemblée de 11-MUA a d'abord été activée pendant 15 minutes à température ambiante avec un mélange équi-volumique d'EDC/NHS à 200 et 50 mM, respectivement (**Figure V. 22.b.**). Ensuite, les anticorps IgG-zymo ont été immobilisés par injection de la solution les contenant, à une concentration de 41,18 µg/mL, dans les canaux microfluidiques pendant 5 minutes (**Figure V. 22.c.**). La **Figure V. 23** présente les sensorgrammes enregistrés lors de cette immobilisation dans trois canaux. Après injection du tampon PBS et obtention d'une ligne de base plane constante, la réponse a augmenté, de manière reproductible, jusqu'à atteindre une valeur de l'ordre de 2000 RU, correspondant à 200 ng/cm² d'anticorps immobilisés [50–52]. Le rinçage de la surface au tampon PBS a conduit à une très faible baisse du signal SPR, de l'ordre de 5%, ce qui s'interprète par l'immobilisation de la quasi-totalité des IgG injectés avec peu de molécules physisorbées en surface.

Un traitement de la surface avec de l'éthanolamine à 1 M est ensuite effectué de manière à désactiver tous les sites actifs libres (n'ayant pas accueillis d'anticorps) (**Figure V. 22.d.**). Pour finir, une passivation de la surface avec du sérum bovin BSA 1% pendant 1 min a été réalisée afin d'éviter toute interaction non-spécifique de la surface avec les protéines injectées (**Figure V. 22.e.**). Entre chacune des étapes décrite ci-dessus, la surface du biocapteur est rincée au PBS.

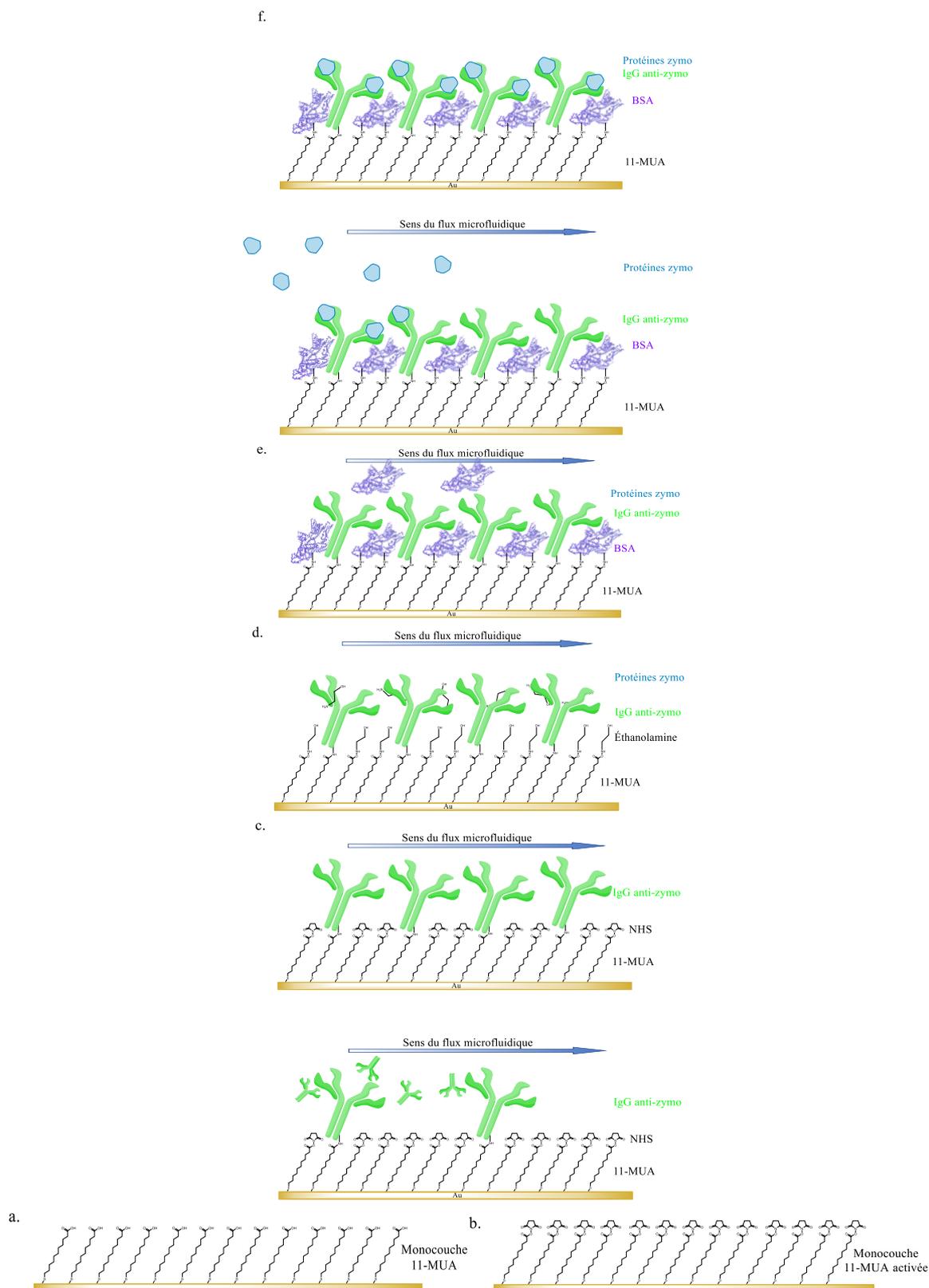


Figure V. 22: Phases de l'étape de la fonctionnalisation de surface: a) greffage d'une monocouche de 11-MUA, b) activation de la monocouche 11-MUA par EDC-NHS, c) fonctionnalisation par l'IgG-Zymo, d) désactivation à l'éthanolamine, e) passivation de la surface par BSA et f) Interaction des sondes IgG anti-Zymo avec l'analyte protéines-Zymo.

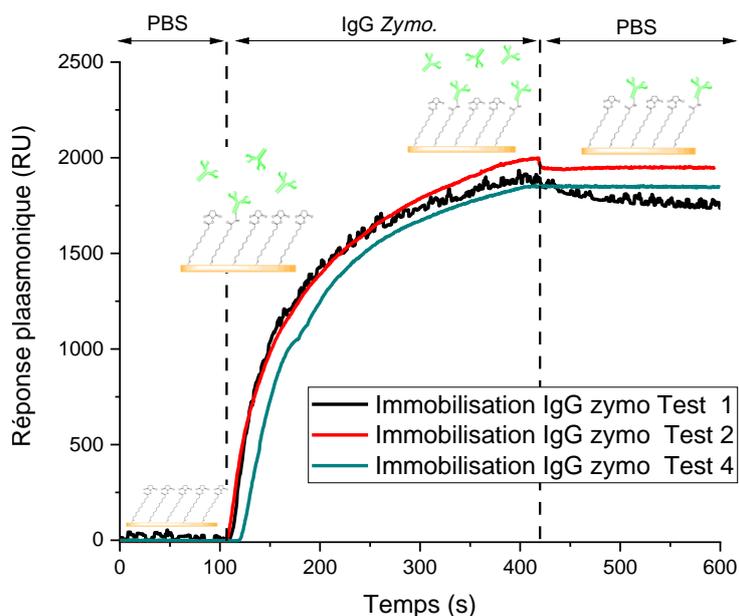


Figure V. 23: Sensorgramme d'immobilisation de l'IgG-zymo.

V.3.2 Caractérisation des surfaces fonctionnalisées

La caractérisation de la surface fonctionnalisée a été réalisée par voltampérométrie cyclique. La surface de l'électrode utilisée avec le potentiomètre Palmsens Sensit smart a été fonctionnalisée de la même manière qu'un capteur plasmonique, le protocole décrit précédemment a donc été reproduit à l'identique.

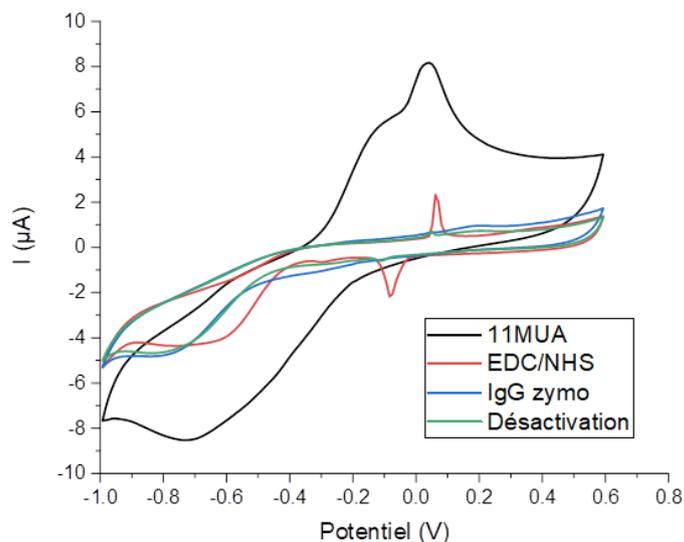


Figure V. 24: Voltammogramme d'une surface fonctionnalisée en IgG-Zymo.

La **Figure V. 24** montre les voltammogrammes résultants lors de la modification de surface des électrodes d'Or avec des anticorps *Zymo*. En premier, on remarque que la différence entre les pics d'oxydation (anodique) et de réduction (cathodique) observée sur la surface d'or de l'électrode est moyenne ce qui correspond à un cycle redox quasi-réversible et une électrode

conductrice. Ensuite, dès que la surface est modifiée par des ligands organiques, l'électrode devient moins conductrice. La conductivité de l'électrode décroît considérablement dès l'activation de la surface à l'EDC/NHS suivie de l'immobilisation de l'IgG-Zymo et de la désactivation de la surface à l'éthanolamine.

V.3.3 Détection des protéines Zymo

Deux types de protéines représentatives de *Zymoseptoria tritici* ont été testées: soit les protéines issues des feuilles de blé infectées spécifiques à l'IgG-Zymo de taille moléculaire de 55 kDa, soit un extrait non-purifié de feuilles de blé infectées depuis 21 jours (JPI21) et qui contient différentes protéines dont la taille moléculaire varie entre 95 et 250 kDa qui pourraient définir différents pathogènes, outre celui de *Zymoseptoria tritici*. Les solutions contenant ces deux types de protéines à une concentration de 20 µg/mL ont été injectées, en mode dynamique, dans les différents canaux fonctionnalisés en IgG-Zymo. L'interaction mAc-Ag est schématisée dans la **Figure V. 22.f**. Les résultats de détection sont présentés dans la **Figure V. 25**.

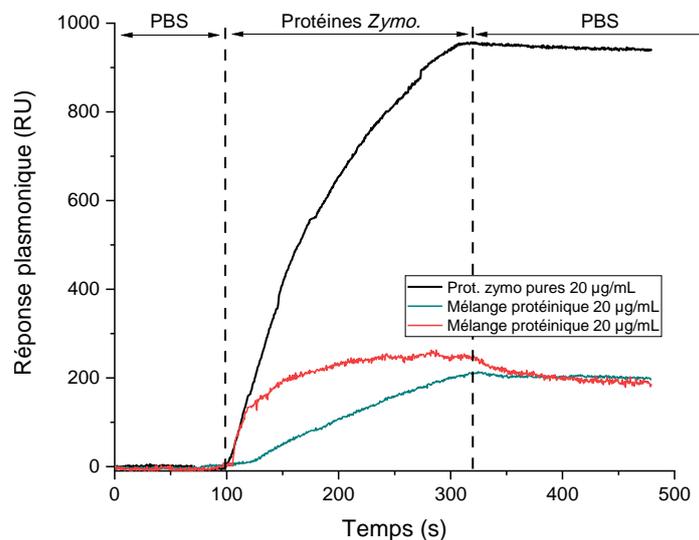


Figure V. 25: Sensorgrammes de détection des protéines Zymo. En noir, La détection d'un mélange de protéines pathogéniques pures. En vert et en rouge des protéines pathogéniques extraites de feuilles après 21 jours d'innoculation.

L'injection de la solution contenant les protéines pures induit une réponse atteignant environ 1000 RU, témoignant de la forte interaction moléculaire non-covalente entre la sonde IgG-zymo et la cible protéinique. Un anticorps ou une protéine étant composé de chaînes peptidiques formées par différents acides-aminés, l'interaction paratope-épitope peut être de type électrostatique dans le cas d'acides aminés chargés positivement ou négativement à pH physiologique (i.e, arginine, histidine, lysine, acide aspartique et acide glutamique). Elle peut également être de type liaisons hydrogène, de type interactions hydrophobiques engageant des chaînes hydrocarbonées, mais aussi de type interactions de type Van der Waals qui impliquent des répulsions de charges électroniques δ^+ ou δ^- . En outre, des interactions de type π - π stacking entre les cycles aromatiques des différents acides aminés cycliques (i.e.

Chapitre V : Détection de *Zymoseptoria tritici*

phénylalanine, tyrosine, tryptophane et proline) (cf. **Tableau V. IV**) [53,54]. En revanche, la réponse obtenue sur les solutions contenant les protéines extraites des feuilles (JPI21) est de plus faible intensité. Cela peut s'expliquer par la présence de protéines étrangères non-reconnues par l'IgG-Zymo et de résidus biomoléculaires qui, respectivement, réduisent la concentration réelle en protéines spécifiques au *Zymoseptoria tritici* et gênent l'interaction paratope-épitope (cible-hôte du système anticorps-protéines). Il n'y a, en effet, rien de surprenant à observer des niveaux de réponse différents lorsque l'on injecte une solution d'analytes purs et une solution de multi-analytes à égale concentration. D'ailleurs, l'étude menée par Homola *et al.* [55] montre que l'utilisation d'une solution multi-analytes (multi-cibles) nécessite une plus forte concentration en analyte d'intérêt que dans une solution pure qui ne contiendrait que la molécule à détecter afin d'atteindre pratiquement la même intensité de la réponse. Les interactions intermoléculaires ayant lieu dans les solutions multi-analytes pourraient être la cause d'un tel effet.

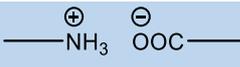
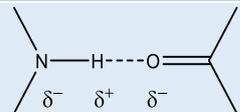
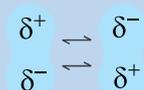
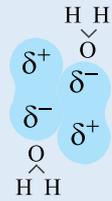
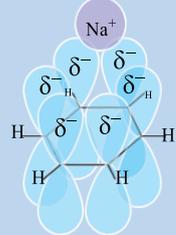
| Type de forces | Origine | Schéma | Exemple d'acides aminés |
|--------------------------|--|--|---|
| Forces électrostatiques | attractions entre charges opposées |  | arginine, histidine, lysine, acide aspartique et acide glutamique |
| Liaisons hydrogène | un atome d'hydrogène partagé entre des atomes électronégatifs |  | tous |
| Forces de Van der Waals | interactions entre dipôles électriques |  | tous |
| Forces hydrophobiques | regroupement de molécules non polaires ou très peu polarisables |  | tous |
| Empilement π - π | interactions attractives non-covalentes entre un cation et un cycle aromatique |  | phénylalanine, tyrosine, tryptophane et proline |

Tableau V. IV: Types de forces de liaison intermoléculaires engagées dans le couple anticorps-antigène à pH physiologique. Adapté de [54].

V.3.3.1 Relation cinétique d'interaction-concentration d'analyte

Une étude de la cinétique des interactions entre la sonde IgG *Zymo* et les protéines *Zymo.* pure a été réalisée à 20 °C. Le fit du sensorgramme (courbe noire **Figure V. 25**) a permis de déterminer une constante d'association k_a de l'ordre de $1,1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ainsi qu'une constante de dissociation k_d de l'ordre de $7,25 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$. La constante de dissociation à l'équilibre K_D est de l'ordre de $6,6 \times 10^{-10} \text{ M}$ (cf. **Tableau V. V**), ce qui témoigne d'une forte affinité entre le paratope de l'IgG *Zymo* et l'épitope des protéines *Zymo.* pures. De plus, ces constantes sont comparables à celles répertoriées pour une interaction anticorps-antigène [56]. Nous rappelons que l'interaction moléculaire est fortement dépendante de la température, ce qui peut induire des variations de ces constantes.

Quant à la détection de l'interaction IgG *Zymo*-protéines *Zymo.* dans le mélange protéinique, nous observons que les deux sensorgrammes présentent une cinétique différente. L'utilisation d'un anticorps polyclonal (PAC) en tant que sonde rend la détection de la protéine *Zymo.* dans l'analyte complexe, puisque le PAC peut interagir avec les autres protéines présentes dans le mélange. De ce fait, les paramètres cinétiques obtenus sont difficilement estimables et incomparables à ceux obtenus sur l'interaction IgG *Zymo*-protéines *Zymo.* pures.

L'utilisation d'un MAc ou une étude complémentaire sur le PAC s'avère être nécessaire pour quantifier les protéines *Zymo* dans un milieu hétérogène.

| Analyte | R_{\max} (RU) | k_a ($10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) | k_d (10^{-5} s^{-1}) | K_D (10^{-10} M) |
|---|-----------------|--|------------------------------------|--------------------------------|
| Protéines <i>Zymo.</i> pures (20 $\mu\text{g/mL}$) | 2266 | 1,1 | 7,25 | 6,6 |

Tableau V. V : Données cinétique d'interaction du couple IgG *Zymo*-protéines *Zymo.* pures

V.3.4 Voltampérométrie cyclique

Une étude complémentaire a été menée en voltampérométrie pour vérifier l'interaction entre le ligand et l'analyte.

La **Figure V. 26** montre le voltammogramme de détection des protéines *Zymo* par des ligands IgG-*Zymo*, résultant ainsi en un cycle redox non-réversible. Comme attendu, le résultat de voltampérométrie est semblable aux réponses enregistrées en post-traitement de la surface des électrodes d'Au, caractérisées par une chute de la conductivité entre une électrode vierge et une électrode fonctionnalisée. Cette chute de conductivité de l'électrode est clairement causée par la présence de matière organique à sa surface. En effet, les molécules organiques immobilisées, en particulier l'IgG-*Zymo.* de taille non-négligeable créent une barrière à la surface de l'électrode qui empêche le transfert d'électrons, ce qui se traduit par une baisse drastique des pics de courant redox [33–37].

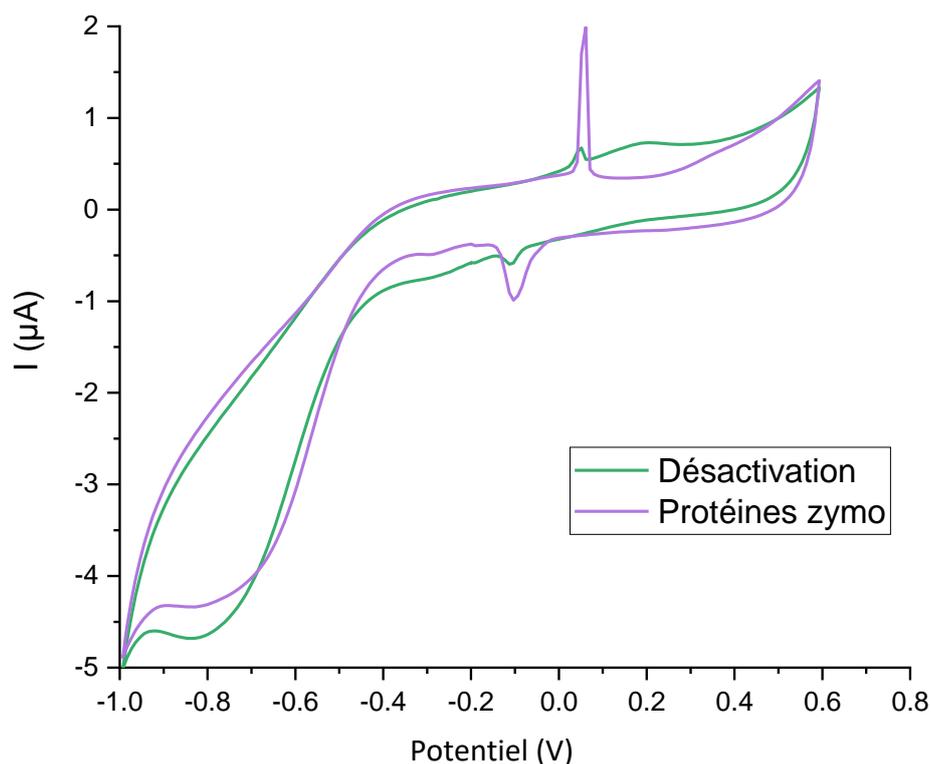


Figure V. 26: Voltammogramme de l'interaction de l'IgG-Zymo-protéines Zymo.

L'apparition des pics intenses à -0,05 et 0,07 V lors de la désactivation de surface à l'éthanolamine et à l'interaction mannanes-5B2 témoigne de l'oxydation de l'électrode de référence (Ag).

V.4 Conclusion

Dans ce chapitre nous avons présenté la démarche et les protocoles opératoires utilisés pour la fonctionnalisation de surface des capteurs plasmoniques les convertissant ainsi en biocapteurs spécifiques envers la pathologie de septoriose causée par le *Zymoseptoria tritici*. La détection biologique a été basée sur :

- une interaction moléculaire entre deux monobrin d'ADN. Le monobrin cible a été identifié par bio-informatique par le partenaire CARAH du projet BIOSENS. Il a ensuite été synthétisé industriellement (*Zymo-SH*). Le monobrin cible (analyte) *Zymo* a de même été synthétisé industriellement.
- une interaction moléculaire anticorps-protéines. La protéine ainsi que l'anticorps ont été identifiés par le partenaire CHU du projet BIOSENS. Des protéines pures mais aussi issues d'échantillons expérimentaux infectés ont été utilisées pour les expérimentations.

Les tests de biodétection nucléaire ont été amorcés par des études préliminaires à l'aide de séquences d'ADN simplifiées, il s'agit des sondes monobrin oligonucléotides (thiolés) T100-SH et de leurs compléments monobrin A100. Cette première étude a permis de valider ce concept de biodétection par oligonucléotides sur la valisette. Les protocoles de fonctionnalisation et d'interaction ont alors été reproduits sur une séquence nucléaire spécifique à une partie du génome du champignon *Zymoseptoria tritici*.

La surface fonctionnalisée en *Zymo*-SH des biocapteurs a été caractérisée premièrement par la mesure de la mouillabilité de la surface en fonction de son état de fonctionnalisation. Ensuite, la spectroscopie vibrationnelle Raman nous a permis d'affirmer le greffage de la sonde oligonucléotide thiolée sur la surface des capteurs par la présence des pics correspondants aux vibrations Au-S et C-S dans le spectre des surfaces fonctionnalisées. De manière additionnelle, la spectroscopie XPS a confirmé l'adsorption de manière covalente de ces mêmes sondes.

La détection de l'oligonucléotide complémentaire (compl. *Zymo*) a été vérifiée et validée sur la valisette développée lors du projet Biosens. Rappelons que le but de ce travail était de valider conjointement le schéma de détection par SPR de l'oligonucléotide cible et ceci sur le banc de détection SPR portable constitué de la valisette. Différentes concentrations ont pu être testées et détectées jusqu'à atteindre une limite de détection de l'ordre de 10 nM en compl. *Zymo*. En outre, La SPR nous a également permis d'évaluer les cinétiques d'interaction *in-situ* entre les deux entités biologiques.

L'immobilisation des sondes à base d'immunoglobulines (IgG-*Zymo*) et leur interaction avec les compléments protéiniques spécifiques à l'anticorps du *Zymoseptoria tritici* de masse molaire allant de 55 à 250 kDa a aussi été validé sur la valisette en utilisant soit des protéines pures soit des protéines extraites de feuilles qui contenaient alors un cocktail protéinique complexe.

Par ailleurs, une petite étude complémentaire utilisant la voltampérométrie cyclique nous a permis de valider le protocole d'immobilisation des sondes de manière covalente sur une surface d'or, et notamment de vérifier l'interaction *Zymo*-SH-compl. *Zymo*.

Références

- [1] A. Siah *et al.*, « Mating type idiomorphs from a French population of the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*: widespread equal distribution and low but distinct levels of molecular polymorphism », *Fungal Biology*, vol. 114, n° 11, p. 980-990, 2010, doi: 10.1016/j.funbio.2010.09.008.
- [2] M. Hassine *et al.*, « Sexual reproduction of *Zymoseptoria tritici* on durum wheat in Tunisia revealed by presence of airborne inoculum, fruiting bodies and high levels of genetic diversity », *Fungal Biology*, vol. 123, n° 10, p. 763-772, 2019, doi: 10.1016/j.funbio.2019.06.006.
- [3] H. D. Hill et C. A. Mirkin, « The bio-barcode assay for the detection of protein and nucleic acid targets using DTT-induced ligand exchange », *Nat Protoc*, vol. 1, n° 1, p. 324-336, 2006, doi: 10.1038/nprot.2006.51.
- [4] J. Conde, G. Doria, J. M. de la Fuente, et P. V. Baptista, « RNA Quantification Using Noble Metal Nanoprobes: Simultaneous Identification of Several Different mRNA Targets Using Color Multiplexing and Application to Cancer Diagnostics », in *Nanoparticles in Biology and Medicine*, vol. 906, M. Soloviev, Éd. Totowa, NJ: Humana Press, 2012, p. 71-87. doi: 10.1007/978-1-61779-953-2_6.
- [5] R. Singh *et al.*, « DNA biosensor for detection of *Neisseria gonorrhoeae* causing sexually transmitted disease », *Journal of Biotechnology*, vol. 150, n° 3, p. 357-365, 2010, doi: 10.1016/j.jbiotec.2010.09.935.
- [6] M. K. Patel, P. R. Solanki, S. Khandelwal, V. V. Agrawal, S. G. Ansari, et B. D. Malhotra, « Self-assembled monolayer based electrochemical nucleic acid sensor for *Vibrio cholerae* detection », *J. Phys.: Conf. Ser.*, vol. 358, p. 012009, 2012, doi: 10.1088/1742-6596/358/1/012009.
- [7] N. Prabhakar *et al.*, « Nucleic acid sensor for M. tuberculosis detection based on surface plasmon resonance », *Analyst*, vol. 133, n° 11, p. 1587-1592, 2008, doi: 10.1039/B808225A.
- [8] C. Ananthanawat, T. Vilaivan, et V. P. Hoven, « Synthesis and immobilization of thiolated pyrrolidiny peptide nucleic acids on gold-coated piezoelectric quartz crystals for the detection of DNA hybridization », *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 137, n° 1, p. 215-221, 2009, doi: 10.1016/j.snb.2008.11.038.
- [9] N. Hassan et R. Holze, « Surface enhanced Raman spectroscopy of self-assembled monolayers of 2-mercaptopyridine on a gold electrode », *Russ J Electrochem*, vol. 48, n° 4, p. 401-411, 2012, doi: 10.1134/S1023193512030056.
- [10] T. Bürgi, « Properties of the gold–sulphur interface: from self-assembled monolayers to clusters », *Nanoscale*, vol. 7, n° 38, p. 15553-15567, 2015, doi: 10.1039/C5NR03497C.
- [11] B. Varnholt, P. Oulevey, S. Luber, C. Kumara, A. Dass, et T. Bürgi, « Structural Information on the Au–S Interface of Thiolate-Protected Gold Clusters: A Raman Spectroscopy Study », *The Journal of Physical Chemistry C*, vol. 118, n° 18, p. 9604-9611, 2014, doi: 10.1021/jp502453q.

- [12] S. Bandyopadhyay, S. Chattopadhyay, et A. Dey, « The protonation state of thiols in self-assembled monolayers on roughened Ag/Au surfaces and nanoparticles », *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 17, n° 38, p. 24866-24873, 2015, doi: 10.1039/C5CP04450B.
- [13] S. Watcharinyanon, C. Puglia, E. Göthelid, J.-E. Bäckvall, E. Moons, et L. S. O. Johansson, « Molecular orientation of thiol-derivatized tetraphenylporphyrin on gold studied by XPS and NEXAFS », *Surface Science*, vol. 603, n° 7, p. 1026-1033, 2009, doi: 10.1016/j.susc.2009.02.022.
- [14] T. Ishida *et al.*, « High Resolution X-ray Photoelectron Spectroscopy Measurements of Octadecanethiol Self-Assembled Monolayers on Au(111) », *Langmuir*, vol. 14, n° 8, p. 2092-2096, 1998, doi: 10.1021/la971104z.
- [15] T. Ishida *et al.*, « High-Resolution X-ray Photoelectron Spectra of Organosulfur Monolayers on Au(111): S(2p) Spectral Dependence on Molecular Species », *Langmuir*, vol. 15, n° 20, p. 6799-6806, 1999, doi: 10.1021/la9810307.
- [16] T. Laiho, J. A. Leiro, et J. Lukkari, « XPS study of irradiation damage and different metal-sulfur bonds in dodecanethiol monolayers on gold and platinum surfaces », *Applied Surface Science*, vol. 212-213, p. 525-529, 2003, doi: 10.1016/S0169-4332(03)00462-8.
- [17] J. Noh, E. Ito, K. Nakajima, J. Kim, H. Lee, et M. Hara, « High-Resolution STM and XPS Studies of Thiophene Self-Assembled Monolayers on Au(111) », vol. 106, n° 29, p. 7139-7141, 2002, doi: 10.1021/jp020482w.
- [18] J. Jia, A. Kara, L. Pasquali, A. Bendounan, F. Sirotti, et V. A. Esaulov, « On sulfur core level binding energies in thiol self-assembly and alternative adsorption sites: An experimental and theoretical study », *J. Chem. Phys.*, vol. 143, n° 10, p. 104702, 2015, doi: 10.1063/1.4929350.
- [19] S. Xu *et al.*, « Real-time reliable determination of binding kinetics of DNA hybridization using a multi-channel graphene biosensor », *Nat Commun*, vol. 8, n° 1, p. 14902, 2017, doi: 10.1038/ncomms14902.
- [20] N. D. Aagaard *et al.*, « Mechanistic Framework for the Formation of Different Sulfur Species by Electron Irradiation of *n*-Dodecanethiol Self-Assembled Monolayers on Au(111) and Au(100) », *J. Phys. Chem. C*, vol. 124, n° 41, p. 22591-22600, 2020, doi: 10.1021/acs.jpcc.0c07106.
- [21] D. G. Castner, K. Hinds, et D. W. Grainger, « X-ray Photoelectron Spectroscopy Sulfur 2p Study of Organic Thiol and Disulfide Binding Interactions with Gold Surfaces », *Langmuir*, vol. 12, n° 21, p. 5083-5086, 1996, doi: 10.1021/la960465w.
- [22] C. Briones, E. Mateo-Marti, C. Gómez-Navarro, V. Parro, E. Román, et J. A. Martín-Gago, « Ordered Self-Assembled Monolayers of Peptide Nucleic Acids with DNA Recognition Capability », *Phys. Rev. Lett.*, vol. 93, n° 20, p. 208103, 2004, doi: 10.1103/PhysRevLett.93.208103.
- [23] C.-Y. Lee, P. Gong, G. M. Harbers, D. W. Grainger, D. G. Castner, et L. J. Gamble, « Surface Coverage and Structure of Mixed DNA/Alkylthiol Monolayers on Gold: Characterization by XPS, NEXAFS, and Fluorescence Intensity Measurements », *Anal. Chem.*, vol. 78, n° 10, p. 3316-3325, 2006, doi: 10.1021/ac052137j.

Chapitre V : Détection de *Zymoseptoria tritici*

- [24] M. Yahaya, « Spectroscopic, microscopic and electrical characterization of nanoscopic polyindole DNA-templated nanomaterials », *IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng.*, vol. 805, p. 012007, 2020, doi: 10.1088/1757-899X/805/1/012007.
- [25] S. Ptasińska, A. Stypczyńska, T. Nixon, N. J. Mason, D. V. Klyachko, et L. Sanche, « X-ray induced damage in DNA monitored by X-ray photoelectron spectroscopy », *J. Chem. Phys.*, vol. 129, n° 6, p. 065102, 2008, doi: 10.1063/1.2961027.
- [26] J. Wittmar, S. Meyer, T. Sieling, J. Kunte, J. Smiatek, et I. Brand, « What Does Ectoine Do to DNA? A Molecular-Scale Picture of Compatible Solute–Biopolymer Interactions », *J. Phys. Chem. B*, vol. 124, n° 37, p. 7999-8011, 2020, doi: 10.1021/acs.jpcc.0c05273.
- [27] M. R. Kesama, S. R. Dugasani, S.-G. Jung, B. Gnapareddy, T. Park, et S. H. Park, « Band gap, dielectric constant, and susceptibility of DNA layers as controlled by vanadium ion concentration », *Nanotechnology*, vol. 31, n° 8, p. 085705, 2019, doi: 10.1088/1361-6528/ab53b0.
- [28] S. R. Dugasani, B. Gnapareddy, M. R. Kesama, et S. H. Park, « Chemical and physical characteristics of hydroxyl group-modified multi-walled carbon nanotube-combined DNA layers », *J. Phys. D: Appl. Phys.*, vol. 52, n° 41, p. 415302, 2019, doi: 10.1088/1361-6463/ab31c6.
- [29] S. Chakraborty *et al.*, « Facile Process for Metallizing DNA in a Multitasking Deep Eutectic Solvent for Ecofriendly C–C Coupling Reaction and Nitrobenzene Reduction », *ACS Sustainable Chem. Eng.*, vol. 7, n° 16, p. 14225-14235, 2019, doi: 10.1021/acssuschemeng.9b03224.
- [30] K. Islam, Y.-C. Jang, R. Chand, S. Jha, H. H. Lee, et Y.-S. Kim, « Microfluidic Biosensor for β -Amyloid(1-42) Detection Using Cyclic Voltammetry », *Journal of nanoscience and nanotechnology*, vol. 11, p. 5657-62, 2011, doi: 10.1166/jnn.2011.4498.
- [31] M. Manzano, S. Viezzi, S. Mazerat, R. S. Marks, et J. Vidic, « Rapid and label-free electrochemical DNA biosensor for detecting hepatitis A virus », *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 100, p. 89-95, 2018, doi: 10.1016/j.bios.2017.08.043.
- [32] G. Sánchez-Pomales, N. E. Rivera-Vélez, et C. R. Cabrera, « DNA-mediated self-assembly of carbon nanotubes on gold », *J. Phys.: Conf. Ser.*, vol. 61, p. 1017-1021, 2007, doi: 10.1088/1742-6596/61/1/201.
- [33] J. Zhang, R. Lao, S. Song, Z. Yan, et C. Fan, « Design of an Oligonucleotide-Incorporated Nonfouling Surface and Its Application in Electrochemical DNA Sensors for Highly Sensitive and Sequence-Specific Detection of Target DNA », *Anal. Chem.*, vol. 80, n° 23, p. 9029-9033, 2008, doi: 10.1021/ac801424y.
- [34] A. Ahmad et E. Moore, « Electrochemical immunosensor modified with self-assembled monolayer of 11-mercaptopundecanoic acid on gold electrodes for detection of benzo[a]pyrene in water », *Analyst*, vol. 137, n° 24, p. 5839-5844, 2012, doi: 10.1039/C2AN35236B.
- [35] M. Braiek *et al.*, « An Electrochemical Immunosensor for Detection of Staphylococcus aureus Bacteria Based on Immobilization of Antibodies on Self-Assembled Monolayers-

- Functionalized Gold Electrode », *Biosensors*, vol. 2, n° 4, Art. n° 4, 2012, doi: 10.3390/bios2040417.
- [36] J. Zakashansky A. *et al.*, « Detection of the SARS-CoV-2 spike protein in saliva with Shrinky-Dink® electrodes », *Anal. Methods*, vol. 13, p. 874-883, 2021, doi: 10.1039/d1ay00041a.
- [37] A. Raziq, A. Kidakova, R. Boroznjak, J. Reut, A. Öpik, et V. Syritski, « Development of a portable MIP-based electrochemical sensor for detection of SARS-CoV-2 antigen », *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 178, p. 113029, 2021, doi: 10.1016/j.bios.2021.113029.
- [38] E. Galopin, « Adressage par microfluidique digitale : application à la détection de marqueurs biologiques par plasmon de surface et détection intégrée », Thèse de doctorat, Lille 1, 2007. [En ligne]. Disponible sur: <http://theses.fr/2007LIL10100>
- [39] M. Li, « Détermination de la constante de dissociation de l'hybridation ADN / ADN aux interfaces solide/liquide par trois techniques différentes: résonance de plasmon de surface, biopuce par mesure de cartographie de fluorescence et par mesure de fluorescence par champ évanescent », Thèse de doctorat, Ecole centrale de Lyon, 2018. [En ligne]. Disponible sur: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-02052875>
- [40] P. Ihalainen *et al.*, « Application of Paper-Supported Printed Gold Electrodes for Impedimetric Immunosensor Development », *Biosensors*, vol. 3, n° 1, Art. n° 1, 2013, doi: 10.3390/bios3010001.
- [41] J. B. Fiche, A. Buhot, R. Calemczuk, et T. Livache, « Temperature Effects on DNA Chip Experiments from Surface Plasmon Resonance Imaging: Isotherms and Melting Curves », *Biophysical Journal*, vol. 92, n° 3, p. 935-946, 2007, doi: 10.1529/biophysj.106.097790.
- [42] J. Fuchs, J.-B. Fiche, A. Buhot, R. Calemczuk, et T. Livache, « Salt Concentration Effects on Equilibrium Melting Curves from DNA Microarrays », *Biophysical Journal*, vol. 99, n° 6, p. 1886-1895, 2010, doi: 10.1016/j.bpj.2010.07.002.
- [43] F. Yang, W. Li, et H. J. L. Jørgensen, « Transcriptional Reprogramming of Wheat and the Hemibiotrophic Pathogen *Septoria tritici* during Two Phases of the Compatible Interaction », *PLoS One*, vol. 8, n° 11, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0081606.
- [44] S. Sass, W. F. M. Stöcklein, A. Klevesath, J. Hurpin, M. Menger, et C. Hille, « Binding affinity data of DNA aptamers for therapeutic anthracyclines from microscale thermophoresis and surface plasmon resonance spectroscopy », *Analyst*, vol. 144, n° 20, p. 6064-6073, 2019, doi: 10.1039/C9AN01247H.
- [45] L. Vanjur, T. Carzaniga, L. Casiraghi, M. Chiari, G. Zanchetta, et M. Buscaglia, « Non-Langmuir Kinetics of DNA Surface Hybridization », *Biophysical Journal*, vol. 119, n° 5, p. 989-1001, 2020, doi: 10.1016/j.bpj.2020.07.016.
- [46] S. Howorka, L. Movileanu, O. Braha, et H. Bayley, « Kinetics of duplex formation for individual DNA strands within a single protein nanopore », *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 98, n° 23, p. 12996-13001, 2001, doi: 10.1073/pnas.231434698.
- [47] N. Giambianco, S. Petralia, S. Conoci, C. Messineo, et G. Marletta, « Ionic strength-controlled hybridization and stability of hybrids of KRAS DNA single-nucleotides: A surface plasmon resonance study », *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 158, p. 41-46, 2017, doi: 10.1016/j.colsurfb.2017.06.021.

Chapitre V : Détection de *Zymoseptoria tritici*

- [48] K. Yazawa et H. Furusawa, « Probing Multiple Binding Modes of DNA Hybridization: A Comparison between Single-Molecule Observations and Ensemble Measurements », *ACS Omega*, vol. 3, n° 2, p. 2084-2092, 2018, doi: 10.1021/acsomega.8b00135.
- [49] E. Ouellet, C. W. T. Yang, T. Lin, L. L. Yang, et E. T. Lagally, « Novel Carboxyl-Amine Bonding Methods for Poly(dimethylsiloxane)-Based Devices », *Langmuir*, vol. 26, n° 14, p. 11609-11614, 2010, doi: 10.1021/la1012582.
- [50] M. Gjorgjevikj, « IL-4 ANALOGUES WITH SITE-SPECIFIC CHEMICAL MODIFICATION AS SCREENING TOOLS FOR FOLDAMERS », Thèse de doctorat, UNIVERSITÄT WÜRZBURG, 2014.
- [51] G. Caljon, S. Hussain, L. Vermeiren, et J. V. D. Abbeele, « Description of a Nanobody-based Competitive Immunoassay to Detect Tsetse Fly Exposure », *PLOS Neglected Tropical Diseases*, vol. 9, n° 2, p. e0003456, 2015, doi: 10.1371/journal.pntd.0003456.
- [52] J. A. Marquart, « Chapter 4: SPRpages – Getting a Feeling for the Curves », in *Handbook of Surface Plasmon Resonance*, 2017, p. 106-148. doi: 10.1039/9781788010283-00106.
- [53] J. Charles A Janeway, P. Travers, M. Walport, et M. J. Shlomchik, « The interaction of the antibody molecule with specific antigen », *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition*, 2001, [En ligne]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27160/>
- [54] R. S. Geha et L. D. Notarangelo, *Case studies in immunology: a clinical companion*, 7th edition. New York London: GS Garland Science, Taylor & Francis Group, 2016.
- [55] J. Homola, H. Vaisocherová, J. Dostálek, et M. Piliarik, « Multi-analyte surface plasmon resonance biosensing », *Methods*, vol. 37, n° 1, p. 26-36, 2005, doi: 10.1016/j.ymeth.2005.05.003.
- [56] S. Hearty, P. Leonard, H. Ma, et R. O’Kennedy, « Measuring Antibody-Antigen Binding Kinetics Using Surface Plasmon Resonance », in *Antibody Engineering: Methods and Protocols*, D. Nevoltris et P. Chames, Éd. New York, NY: Springer, 2018, p. 421-455. doi: 10.1007/978-1-4939-8648-4_22.

Chap. VI. Biodétection de *Candida albicans*

Dans ce chapitre, nous présentons le processus employé pour transformer les capteurs plasmoniques en biocapteurs permettant la détection de *Candida albicans*, levures ubiquitaires responsables de la candidose chez l'êtré-humain.

Nous rappelons que le schéma de détection est basé sur une interaction anticorps anti-mannanes monoclonaux spécifiques (anti-mannanes (IgM 5B2) avec des antigènes (*glucides*) de type mannosides (mannanes) qui sont présents dans la paroi externe des *Candida albicans*. Le but est donc de vérifier la détection de ces mannanes (et non des *Candida albicans* proprement dit) par la sonde anti-mannanes (IgM 5B2). Les deux schémas d'interrogation, angulaire et spectrale, présentés au § III.1.1 ont été utilisés.

Une première partie est consacrée au processus de fonctionnalisation de la surface des capteurs avec des sondes constituées d'anticorps monoclonaux de type anti-mannanes (IgM 5B2) *via* le couplage amine (EDC/NHS). Une étude d'optimisation du temps de greffage en 11MUA est présentée ainsi que la caractérisation physico-chimique des surfaces fonctionnalisées.

La partie suivante présente la détectabilité des analytes mannanes sur le banc à interrogation angulaire ainsi que sur la valisette.

Une dernière partie consiste en la comparaison de la détection obtenue lors des interactions mannanes/anti-mannanes (IgM 5B2) et anti-mannanes (IgM 5B2)/mannanes. En outre, une caractérisation voltampérométrique est présentée dans cette partie.

VI.1 Matériels et méthodes

VI.1.1 Système de lecture

Les mesures SPR de ce chapitre sont divisées en deux parties en fonction du système de lecture utilisé. En effet, la première partie a été réalisée sur le banc en interrogation angulaire (cf. § III.1.1.1), il s'agira des résultats présentés dans le § VI.4.1. Quant à la deuxième partie, les expériences ont été réalisées sur la valisette, donc en interrogation spectrale (cf. § II. 1.1.2), il s'agira des résultats présentés dans le § VI.4.2.

VI.1.2 Capteurs

VI.1.2.1 Mesures réalisées en interrogation angulaire

Les capteurs utilisés ont été réalisés sur des substrats en verre HZF-1 aux dimensions 25 mm x 25 mm compatibles avec le prisme de couplage utilisé sur le banc en interrogation angulaire (cf. § III.1.4.1). Ils ont été préparés suivant le processus présenté dans le chapitre III. Il s'agit de capteurs avec microfluidique intégrée dans lesquels la couche plasmonique a une épaisseur de 35 nm. Le système microfluidique intégré est formé de quatre canaux dont chaque entrée et sortie sont pré-poinçonnées au diamètre (2 mm) des tubes les reliant à la pompe péristaltique utilisée (Gilson Minipuls 2) (*Figure VI .1*).

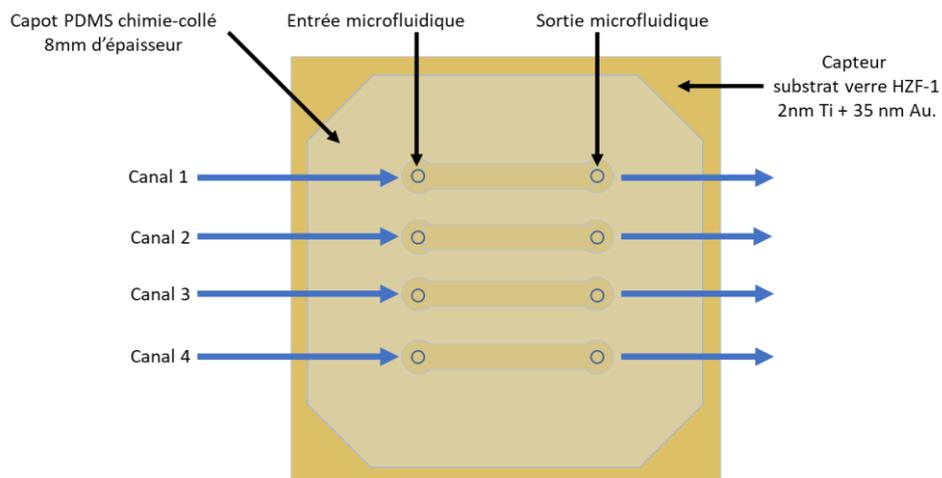


Figure VI .1: Capteur utilisé sur le banc en interrogation angulaire. La microfluidique est réalisée par un capot en PDMS intégré (cf. Chapitre III).

VI.1.2.2 Mesures réalisées en interrogation spectrale (valisette)

Les capteurs SPR utilisés dans cette partie de travail sont globalement identiques à ceux présentés dans le chapitre précédent (cf. § V.1.2). Les différences se résument à :

- un substrat en verre BK-7 (adapté au prisme utilisé sur la valisette)
- une épaisseur du film d'or éventuellement différente (48 au lieu de 35 nm)
- une microfluidique PDMS identique mais clampée sur le capteur (et non intégrée sur celui-ci). L'épaisseur de ce capot microfluidique a été portée à 8 mm de manière à supporter la

Chapitre VI : Biodétection de *Candida albicans*

pression de clampage sans écraser les canaux. Le poinçonnage des entrées/sorties fluidiques a été fait à 0,5 mm, de manière à être adapté aux canalisations fluidiques de la valisette réalisées avec un tubage fluide en Tygon 23G (diamètres extérieur/intérieur: 0,025"(0,64mm) /0,013"(0,34mm)).

VI.1.3 Réactifs chimiques

Le tampon phosphate alcalin (PBS), utilisé comme milieu de référence et de dilution des analytes, est obtenu chez *Sigma-Aldrich*[®].

La molécule thiolée, 11MUA (HS(CH₂)₁₀CO₂H), réalisant la monocouche utilisée pour le greffage des molécules sondes (schéma d'interaction anticorps-antigène) a été fournie par *Sigma-Aldrich*[®].

Le N-Hydroxysuccinimide (NHS) (C₄H₅NO₃) et le 1-ethyl-3-[3-diméthylaminopropyl] carbodiimide hydrochloride (EDC) (C₈H₁₇N₃) utilisés pour l'activation et la stabilisation des surfaces pour l'interaction anticorps/*glucides* et *glucides*/anticorps ont respectivement été obtenus sous forme solide chez *TCI Europe* et *Thermo Scientific*[™].

L'éthanolamine (NH₂CH₂CH₂OH) et le Sérum Bovin Albumine (BSA), utilisés respectivement pour la désactivation des sites de greffage n'ayant pas réagi avec les molécules sondes (schéma d'interaction anticorps-antigène) et la passivation de surface ont été fournis par les partenaires du C.H.U. Lille.

L'eau déionisée (EDI) à 18 MΩ est fournie directement du réseau du laboratoire.

VI.1.4 Anticorps monoclonaux anti-mannanes (IgM 5B2)

Les anticorps monoclonaux 5B2, de type anti-mannanes (IgM 5B2) de poids moléculaire (Mw) ~ 900 kDa, ont été produits *in-vivo* par les partenaires biologistes du C.H.U. de Lille. Ils ont été extraits à partir du liquide d'ascite de « souris nude » ayant été injectées avec des hybridomes 5B2 provenant de rat Lou [1], puis purifiés par précipitation au sulfate d'ammonium à 45% (p/v) suivie d'une étape de chromatographie à échange d'ions [2]. L'interaction anti-mannanes IgM 5B2/mannanes a été validée par test ELISA par les partenaires biologistes du C.H.U. de Lille (*cf.* Annexe).

VI.1.5 Carbohydrates/ glucides (Antigènes)

Les analytes à détecter sont des polysaccharides nommés mannanes de poids moléculaire Mw ~ 16 kDa qui peuvent se retrouver sous forme anomère α et β (*cf.* **Figure VI .2**), et qui sont issus de la paroi externe des *Candida albicans*. Ils ont été extraits par nos partenaires du C.H.U Lille à partir de *Candida albicans* VW 32 cultivés dans des bioréacteurs selon les conditions classiques utilisées pour l'analyse chimique et immunochimique de ces molécules suivant le protocole de Faille *et al.* [3], lui-même basé sur celui de Kocourek et Ballou [4,5].

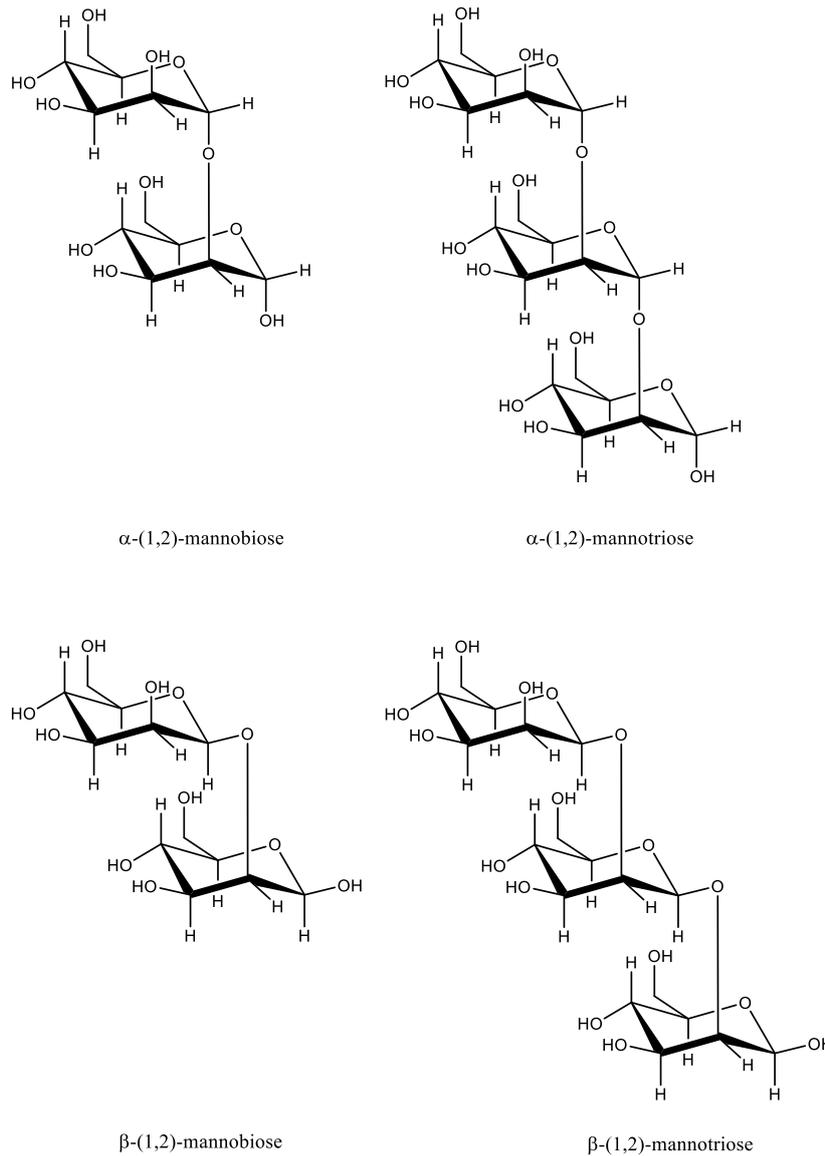


Figure VI.2: Structure chimique des glucides mannanes sous forme anomère α et β .

VI.2 Greffage de la surface

Le protocole de greffage des capteurs est identique à celui utilisé pour les IgG-Zymo (cf. § V.3.1) et consiste toujours en la mise en contact de la surface du capteur avec une solution éthanoïque de 11MUA à une concentration de 11 mM. Bien qu'il n'y ait aucune raison que le procédé de greffage se comporte différemment, la présence des molécules 11MUA en surface a été validée par spectroscopie Raman (Figure VI. 3).

A l'instar du spectre Raman du Zymo-SH présenté dans le précédent chapitre (cf. Figure V. 6), on observe deux pics distincts à 280 cm^{-1} et à 711 cm^{-1} attribués aux vibrations d'élongation de la liaison Au-S formée suite à la chimisorption du 11MUA sur la surface d'or et à la vibration d'élongation de la liaison S-C présente dans l'ossature du 11MUA, respectivement. Bien qu'il n'y ait, à notre connaissance, aucune étude dans la littérature rapportant l'observation de ces déplacements Raman pour une SAM de 11MUA sur une surface d'or, d'autres études utilisant

des molécules thiolées (dont la longueur de la chaîne hydrocarbonée varie) pour la formation de monocouches autoassemblées sur des surfaces métalliques (or et argent) ont rapporté ces déplacements avec un léger décalage qui serait dû à la variation de la chaîne hydrocarbonée ainsi qu'aux conditions expérimentales utilisées [6–8].

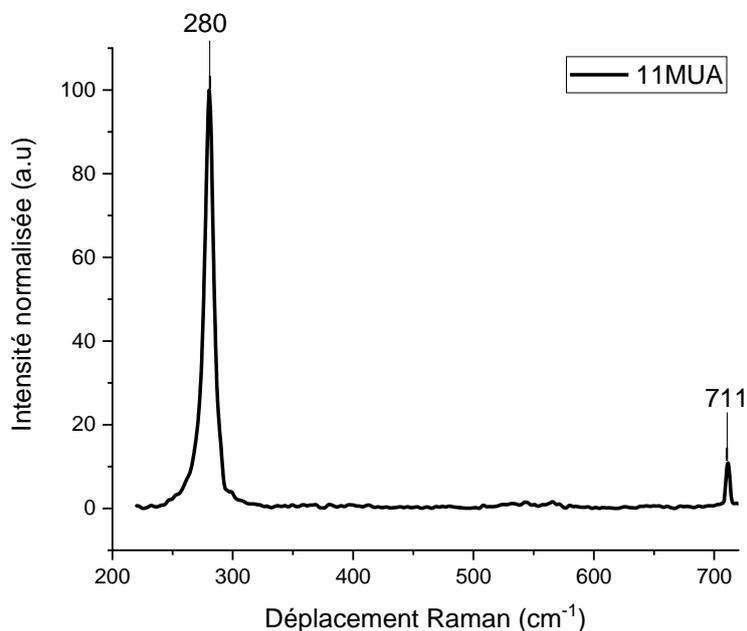


Figure VI. 3: Spectre RAMAN de la monocouche de 11MUA immobilisée sur une surface d'or.

Néanmoins, une optimisation du temps de greffage a été menée prenant en compte la spécificité de liaison des anti-mannanes (IgM 5B2) vis-à-vis des mannanes. Celle-ci sera présentée par la suite car elle met en œuvre les étapes suivantes d'immobilisation des anticorps monoclonaux anti-mannanes (IgM 5B2) et d'interaction des surfaces ainsi fonctionnalisées avec les mannanes.

VI.3 Fonctionnalisation de surface

VI.3.1 Protocole

Le protocole de fonctionnalisation schématisé dans la **Figure VI. 17** ne diffère du précédent (*cf.* § V.3.1) que par l'utilisation des anti-mannanes (IgM 5B2) en lieu et place des IgG-Zymo. Comme mentionné en fin de paragraphe précédent, une optimisation de la durée du greffage a été effectuée. Celle-ci a mis en jeu 4 durées: 4 h, 8 h, 14 h et 20 h, la durée de 20 heures ayant été utilisée précédemment pour la fonctionnalisation en IgG-Zymo. Le résultat global de l'étape de fonctionnalisation de surface étant lié à celui de l'étape de greffage, dont la qualité est dépendante du temps [9], son optimisation s'est faite en considérant un processus d'interaction complet : greffage, fonctionnalisation et interaction. Ce processus a donc pour but de déterminer la durée de greffage optimale qui permet d'immobiliser le plus grand nombre d'anticorps afin que le maximum de sites actifs soient accessibles. Pour réaliser cette détermination, des expérimentations SPR ont été menées sur le banc angulaire.

VI.3.2 Optimisation de la durée du greffage

VI.3.2.1 Greffage des surfaces

Quatre capteurs ont donc été préparés en immergeant chaque capteur dans une solution éthanoïque de 11MUA à une concentration de 11 mM, chacun avec une durée de greffage différente (**Figure VI. 4**).

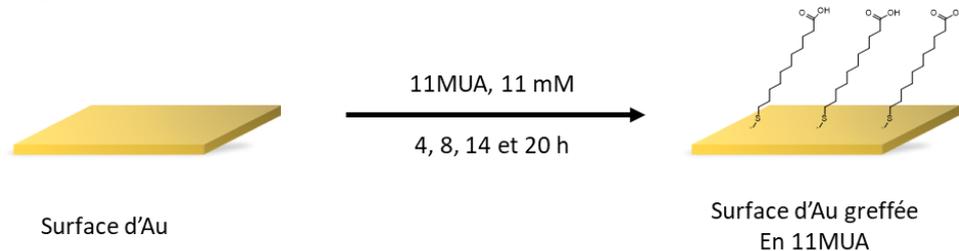


Figure VI. 4: Processus de greffage des surfaces d'Or en 11MUA.

Le temps de greffage optimal en 11MUA est déterminé en quantifiant par SPR les anti-mannanes (IgM 5B2) immobilisés sur les surfaces greffées et activées (EDC-NHS, cf. § V.3.1) (**Figure VI. 5**) puis l'interaction anti-mannanes (IgM 5B2)/mannanes. Ce temps de greffage optimal sera utilisé pour la conduite des expérimentations SPR d'interactions anti-mannanes (IgM 5B2)/mannanes (cf. § VI.4).

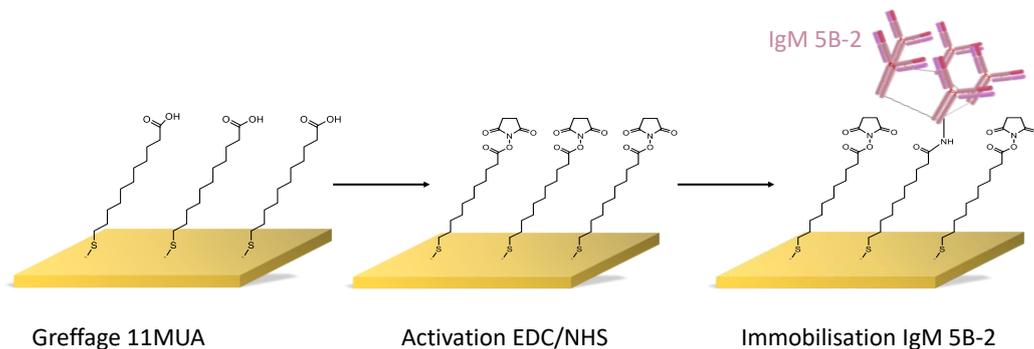


Figure VI. 5 : Étapes principales de l'immobilisation de l'anti-mannanes (IgM 5B2).

VI.3.2.2 Caractérisation du caractère hydrophobe/hydrophile des surfaces greffées

La **Figure VI. 6** présente les photographies ainsi que les valeurs d'angle de contact d'une goutte d'eau formée à la surface des capteurs (greffés en 11MUA pendant 4, 8, 14 et 20h) avant et après chaque modification, à savoir, greffage de 11MUA et leur activation via EDC/NHS. Les surfaces d'or n'étant pas fraîchement préparées, une évolution de l'angle de contact du caractère hydrophobe à l'hydrophile est attendue, conféré par les propriétés hydrophiles de la SAM de 11-MUA et son activation à l'EDC/NHS.

La surface d'Or de l'échantillon amené à être greffé en 4h de 11MUA présente une surface hydrophobe avec un angle de contact de 78°, signe de contamination à l'air (physisorption de molécules hydrophobes) si l'on considère que la surface d'or est de nature hydrophile [10]. À la suite du greffage des 11MUA, l'angle de contact a drastiquement baissé à 20° indiquant que

Chapitre VI : Biodétection de *Candida albicans*

la SAM s'est bien formée, alors que l'activation à l'EDC/NHS est attestée par l'augmentation de l'angle de contact à 32°.

La surface de l'échantillon greffé pendant 8h présente également une nature hydrophobe avec un angle de contact de 64°, attestant aussi d'une possible contamination. La formation de la monocouche de 11MUA en 8h a rendu la surface hydrophile avec un angle de contact de 5°, une fois la surface activée l'angle de contact passe à 35°.

L'échantillon greffé pendant 14h, initialement de nature hydrophobe et présentant un angle de contact de 64°, devient lui aussi hydrophile après traitement avec un angle de contact de 6°. L'activation de cette surface avec l'EDC/NHS a engendré une augmentation de l'angle de contact à 33°.

Quant à la surface du capteur greffé en 20h, elle est passée d'une surface hydrophobe avec un angle de 84° (Au vierge avec une contamination atomique) à une surface hydrophile montrant un angle de contact de 25°, puis à une surface moyennement hydrophile après son activation à l'EDC/NHS, l'angle de contact mesuré étant de 37°.

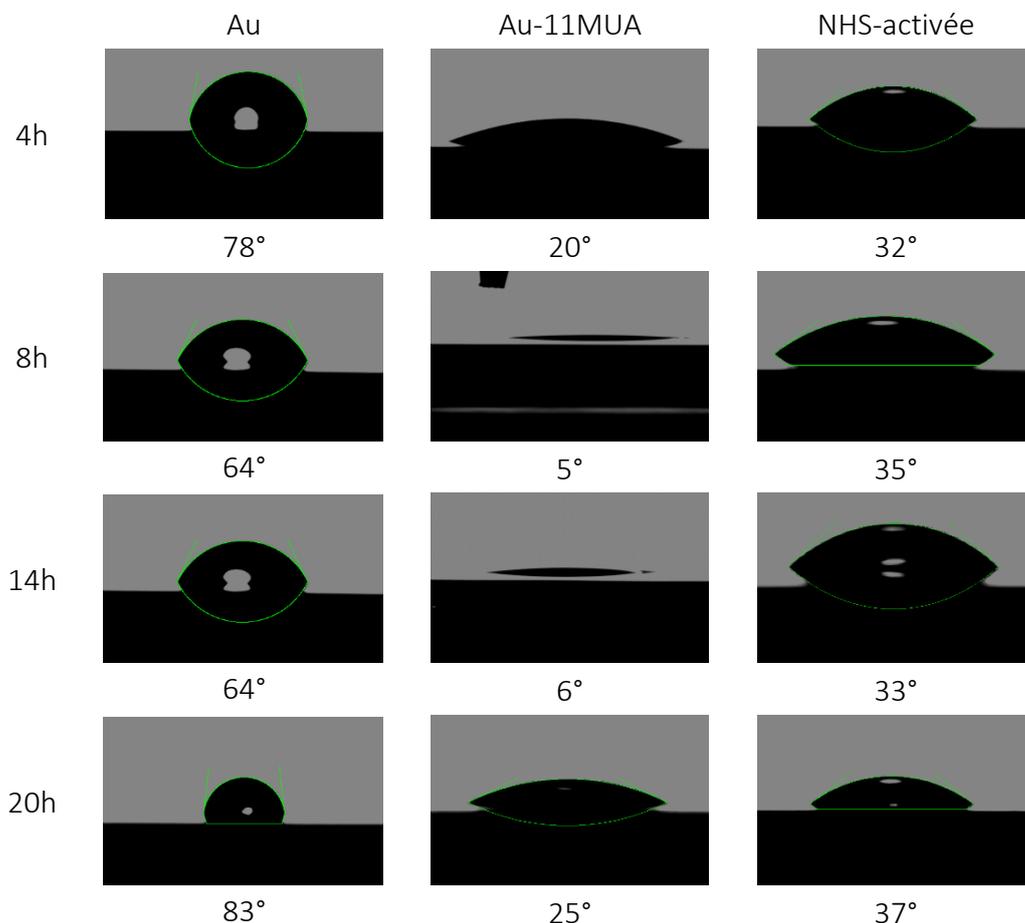


Figure VI. 6 : Photographies d'une goutte d'eau déposée sur des surfaces d'or nu, d'or greffé (temps de greffage de 4 h à 20 h) en 11MUA et d'or greffé en 11MUA puis activée avec la valeur de l'angle de contact correspondant.

L'hydrophobicité de l'or ou du moins de surfaces d'or a été très discutée par les chimistes des interfaces. En effet certaines recherches confèrent à ce matériau noble une nature super-

hydrophile (0° - 10°), tandis que d'autres citent une nature moyennement hydrophobe (60° - 80°). Il en ressort que l'or "frais", i.e. juste après dépôt et dans des conditions opérationnelles les plus contrôlées, est hydrophile alors qu'il ne suffit que d'une petite contamination organique pour qu'il devienne hydrophobe [11]. Cela nous amène à conclure que les surfaces d'or de tous nos substrats ont été contaminées sous atmosphère air.

Le caractère hydrophile de la monocouche de 11MUA ainsi que l'augmentation de l'angle de contact après son activation par le traitement à l'EDC/NHS sont en bon accord avec les résultats des études publiées antérieurement [12–14].

VI.3.2.3 Fonctionnalisation en anti-mannanes (IgM 5B2)

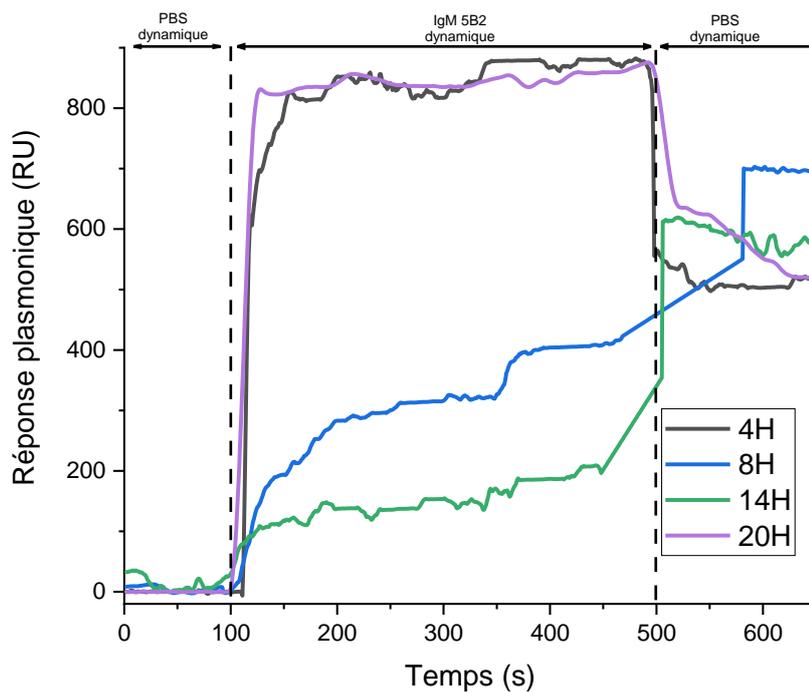


Figure VI. 7: Sensorgrammes d'immobilisation de l'anti-mannanes (IgM 5B2) sur des surfaces d'or greffées en 11MUA pendant 4 h (noir), 8 h (bleu), 14 h (vert) et 20 h (violet)

La **Figure VI. 7** présente les sensorgrammes obtenus lors de l'immobilisation par couplage amine dans le PBS ([10 mM], pH = 7,2) de l'anti-mannanes (IgM 5B2) sur les 4 surfaces d'or greffées pendant des durées différentes (cf. § VI.3.2.1). L'expérimentation a été faite en fluide dynamique et ramenée sur trois étapes :

- **Pendant ~ 3 minutes** : Injection du PBS ([10 mM], pH = 7,2) en flux dynamique continu pour obtenir une ligne de base correcte et vérifier la stabilité de la réponse.
- **Pendant ~ 7 minutes** : Injection en flux continu de l'anti-mannanes (IgM 5B2) à une concentration de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ([555 nM]) (dilution dans PBS ([10 mM], pH = 7,2)).
- **Pendant 3 minutes** : réinjection du PBS en flux
- **Fin de cycle** : désactivation de la surface à l'éthanolamine.

L'injection de l'anti-mannanes, en concentration de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, sur une surface greffée en 11MUA durant 4 heures, puis activée, a permis d'enregistrer une augmentation notable de la

Chapitre VI : Biodétection de *Candida albicans*

réponse se stabilisant autour de 800 RU (niveau d'équilibre: R_{eq}). Ce niveau du signal est induit par la différence des indices de réfraction des solutions injectées ainsi que par l'immobilisation des anticorps [15]. La baisse de la réponse observée lors de l'étape de "rinçage" au PBS est due à l'élimination des anticorps physisorbés, i.e. n'ayant pas formé de liaisons covalentes [16]. Le niveau correspondant à la quantité réelle d'anticorps immobilisés est alors celui atteint après réinjection du PBS, il est de l'ordre de 500 RU environ.

Les tests d'immobilisation effectués sur les capteurs greffés en 11MUA durant 8 et 14 heures présentent une évolution ainsi que des niveaux différents, atteignant 400 RU et 200 RU respectivement. Après rinçage des deux surfaces, on observe des valeurs de réponse au niveau d'équilibre de l'ordre de 700 RU pour 8 h de greffage et de 600 RU pour 14 h, donc plus importantes que celles obtenues durant le processus d'association. Ce comportement est difficilement interprétable et laisse à penser qu'un problème est survenu lors de ces expérimentations. Le niveau obtenu après rinçage n'est en soi pas aberrant mais est difficile à valider.

Le test de greffage pendant 20 h a permis d'observer une réponse de l'ordre de 800 RU à l'injection des anticorps. Après réinjection du PBS, le signal baisse jusqu'à environ 500 RU, soit le même niveau que celui obtenu lors du test de greffage de durée 4 h.

| Position d'ordre | Temps de greffage (heures) | Réponse finale (RU) |
|------------------|----------------------------|---------------------|
| 1 | 8 | 700* |
| 2 | 14 | 600* |
| 3 | 4 | 500 |
| 4 | 20 | ~500 |

Tableau VI. I: Classement des protocoles de greffage (différents par leur durée) en fonction de la réponse enregistrée lors de l'immobilisation de l'anticorps anti-mannanes (IgM 5B2). * indique que cette valeur n'est pas vraiment significative suite à un processus de fonctionnalisation ne s'étant pas déroulé de manière cohérente.

Le **Tableau VI. I** reprend et classe, en fonction de la valeur de la réponse en fin de cycle, les résultats obtenus sur les temps de greffage en 11MUA. Ces résultats nous renseignent sur l'état de surface des biopuces après immobilisation de l'anti-mannanes (IgM 5B2) mais aussi avant puisque le processus d'immobilisation de l'anti-mannanes (IgM 5B2) est identique.

En effet, une réponse SPR plus importante à la suite de la fonctionnalisation de surface impliquerait une plus grande quantité d'anticorps immobilisés et donc une plus grande surface pré-activée en EDC/NHS, donc des groupements -COOH plus accessibles. Même si le temps de greffage plus long donne une SAM plus ordonnée [17], nous estimons qu'un temps de greffage de 12 à 20 h en 11MUA ne serait pas indispensable dans le cas d'un anticorps type anti-mannanes (IgM 5B2) pentamérique. En effet, Si l'on considère sa taille et sa conformation il parviendrait à recouvrir le maximum de surface et de ce fait induirait une gêne stérique (*cf.* Figure VI. 17.d). De plus, contrairement à un IgG qui nécessite une SAM bien ordonnée pour des raisons d'orientation de l'anticorps et d'accessibilité des sites paratopes,

un IgM est immobilisé sous la forme planaire au-dessus de la monocouche thiolée et adopte naturellement la forme dite en « agrafes » à l'approche de l'antigène complémentaire pour que ses sites paratopes soient accessibles (cf. **Figure VI. 13**).

Cependant, il est aussi probable que l'utilisation des capteurs directement après nettoyage au four UV-O₃ soit à l'origine d'une telle incohérence de résultats. En effet, selon *Roupioz et al.*, pour une fonctionnalisation de surface uniforme et reproductible, il est préférable de laisser la surface d'or au repos pendant 24h après nettoyage ozone.

Après immobilisation des paratopes hôtes (anticorps anti-mannanes (IgM 5B2)), nous sommes passés à l'étude des interactions anti-mannanes (IgM 5B2)/mannanes pour déterminer le temps de greffage optimal en 11MUA.

VI.3.2.4 Interaction Anti-mannanes (IgM 5B2)/mannanes

La **Figure VI. 8** présente les sensorgrammes SPR obtenus lors des tests d'interaction anti-mannanes (IgM 5B2)/mannanes. L'expérimentation se déroule sur trois étapes :

- **Pendant 50 secondes** : Injection du PBS ([10 mM], pH= 7,2) en flux dynamique continu pour obtenir une ligne de base correcte et vérifier la stabilité de la réponse.
- **Pendant 200 secondes** : Injection en flux continu de l'analyte constitué de mannanes à une concentration de 1250 µg/ml ([78 µM]) (dilution dans PBS ([10 mM], pH= 7,2)).
- **Fin de cycle** : réinjection du PBS en flux continu dans les différents canaux microfluidiques.

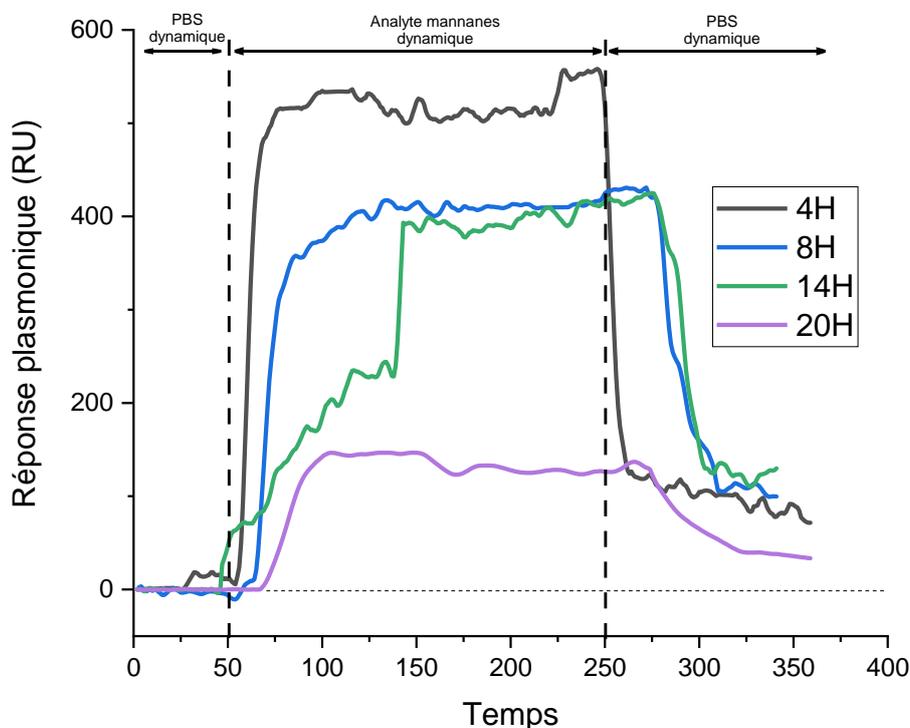


Figure VI. 8: Sensorgrammes d'interaction anti-mannanes (IgM 5B2)/mannanes sur des surfaces greffées en 11MUA pendant 4 h, 8 h, 14 h et 20 h.

Chapitre VI : Biodétection de *Candida albicans*

Le capteur greffé pendant 4 heures a permis d'enregistrer un niveau d'équilibre de la réponse de l'ordre de 550 RU. Les capteurs greffés pendant 8 et 14 heures montrent un niveau d'équilibre équivalent, autour de 420 ± 10 RU et, curieusement, celui greffé en 20 heures, qui donnait une réponse quasiment identique à celui greffé pendant 4 heures à la suite de l'étape de fonctionnalisation, affiche un niveau d'équilibre très différent, autour de 140 RU. Il en ressort que le meilleur résultat est celui obtenu sur le capteur ayant été greffé pendant 4 heures. Bien que les résultats à la suite de l'étape de fonctionnalisation n'aient pu amener une réponse claire sur l'état des capteurs fonctionnalisés pendant 8 et 14 heures, ceux-ci se comportent « correctement » lors du test d'interaction avec les mannanes. Le plus surprenant reste donc le résultat obtenu sur le capteur greffé pendant 20 heures. En estimant avoir activé l'ensemble de la surface des 11MUA par le EDC/NHS puis avoir immobilisé un maximum d'anti-mannanes (IgM 5B2), la masse de molécule sonde (5B2) aurait détecté la même masse de molécule analyte (mannanes), ce qui correspondrait au meilleur résultat obtenu. Théoriquement l'anticorps monoclonal pentamérique possède dix (10) sites actifs pouvant détecter 10 antigènes [18,19], mais selon plusieurs paramètres dont l'organisation de la monocouche autoassemblée, la taille de l'anticorps monoclonal ainsi que sa conformation, son environnement spatial et l'écart entre chaque molécules de 11MUA (~ 5 Å) on verrait ce nombre potentiellement baisser.

Ce faible rendement serait dû aux propriétés intrinsèques du système d'organisation moléculaire (gène stérique en particulier). Rappelons tout de même que l'anticorps monoclonal possède un poids moléculaire de $M_w = 950$ kDa avec 10 sites paratopes et donc génère un grand pouvoir stérique (*cf. Figure VI. 17.d*).

Toutefois, la détermination du nombre d'heures de greffage en 11MUA ne s'est faite ici que sur la base de la quantité d'antigènes détectés. On choisit alors, le greffage de 4h en premier avec une réponse moyenne de ses deux tests donnant 455 RU, puis celui de 8h avec 450 RU, ensuite en 14h de greffage avec 380 RU et enfin vient le greffage en 20h avec une réponse d'interactions biologiques de 120 RU. Cet aspect s'interpréterait par le fait que plus le temps de greffage est court, plus les sites paratopes sont accessibles.

D'après ces résultats (**Tableau VI. II**), nous avons sélectionné comme optimale une durée de greffage en 11MUA de 4 h puisqu'il nous permet de détecter un maximum d'analytes mannanes en minimisant le temps de préparation du biocapteur.

| Position d'ordre | Temps de greffage (heures) | Niveau d'équilibre (RU) |
|------------------|----------------------------|-------------------------|
| 1 | 4 | 550 |
| 2 | 8 | 430 |
| 3 | 14 | 410 |
| 5 | 20 | 140 |

Tableau VI. II : Classement ascendant des temps de greffage en fonction du rapport 5B2/Mannanes (Anticorps/Antigènes) immobilisés-détectés.

VI.3.3 Caractérisation des surfaces fonctionnalisées

VI.3.3.1 ATR-FTIR

La **Figure VI. 9** présente les spectres ATR-FTIR des surfaces d'or greffées en 11MUA, ensuite activées par l'EDC/NHS et finalement fonctionnalisées avec l'anticorps anti-mannanes (IgM 5B2).

La formation de la monocouche de 11MUA (**Figure VI. 9**, spectre du bas (noir)) sur la surface d'or est caractérisée par la présence de pics à 2900 et 2800 cm^{-1} attribués aux vibrations d'élongation asymétriques et symétriques des liaisons $-\text{CH}_2$ qui forment l'ossature de la molécule du 11MUA. La bande à 1737 cm^{-1} est attribuée à l'élongation du carbonyle présent au niveau de la tête fonctionnelle de la molécule 11MUA. Le pic à 1260 cm^{-1} est attribué à la vibration d'élongation des COO^- fonctionnels de la molécule du 11MUA et aux vibrations de déformation asymétrique des $-\text{CH}_2$. Les pics autour de 1100 cm^{-1} sont attribués aux vibrations d'élongation de la liaison C-O [20,21].

Le spectre de la surface activée (**Figure VI. 9**, spectre du haut (rouge)) présente également les mêmes pics. En effet, l'ensemble de la molécule 11MUA est maintenu à la surface, à l'exception du groupement fonctionnel hydroxyl ($-\text{OH}$) qui est substitué par l'ester succinimidyl (NHS). De plus, l'activation de la SAM de 11MUA est confirmée par la présence des deux pics à 1796 et 1826 cm^{-1} ($\nu\text{-C=O}$ NHS sur **Figure VI. 9**), attribués au groupements carbonyles en position ortho du NHS [20,22] (cf. **Figure VI. 9**).

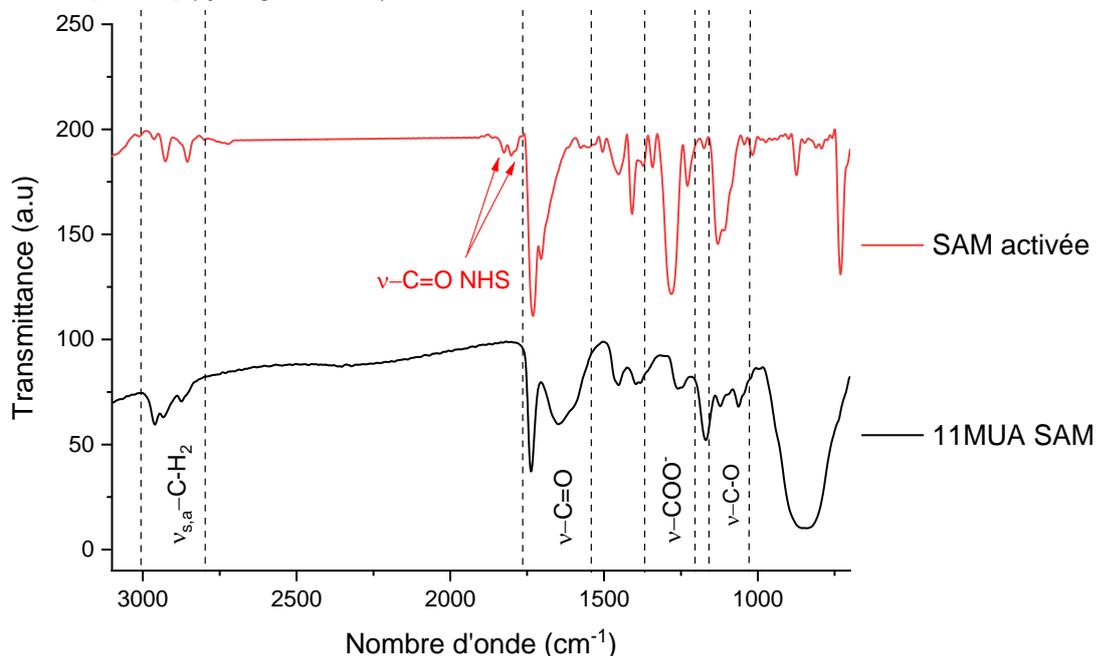


Figure VI. 9: Spectre ATR-FTIR des surfaces d'or modifiées: bas (noir): surface d'or greffée avec une SAM de 11MUA; haut (rouge), SAM de 11MUA activée à l'EDC/NHS.

VI.3.3.2 Spectroscopie XPS

La **Figure VI. 10** présente les spectres XPS de la surface d'or modifiée avec la SAM de 11MUA (en noir), ensuite fonctionnalisée après immobilisation de l'anticorps anti-mannanes

(IgM 5B2) (en bleu). Il nous a été possible d'identifier les pics caractéristiques des niveaux de cœur de l'Au 4f et 4d situés à 84 et 334 eV, respectivement.

Le greffage de la molécule thiolée (11MUA) a été validé par la présence des pics caractéristiques du S 2p, S 2s, C 1s ainsi que celui du O 1s présents à 162, 227, 286 et 533 eV respectivement, éléments qui sont présents dans l'ossature du 11MUA.

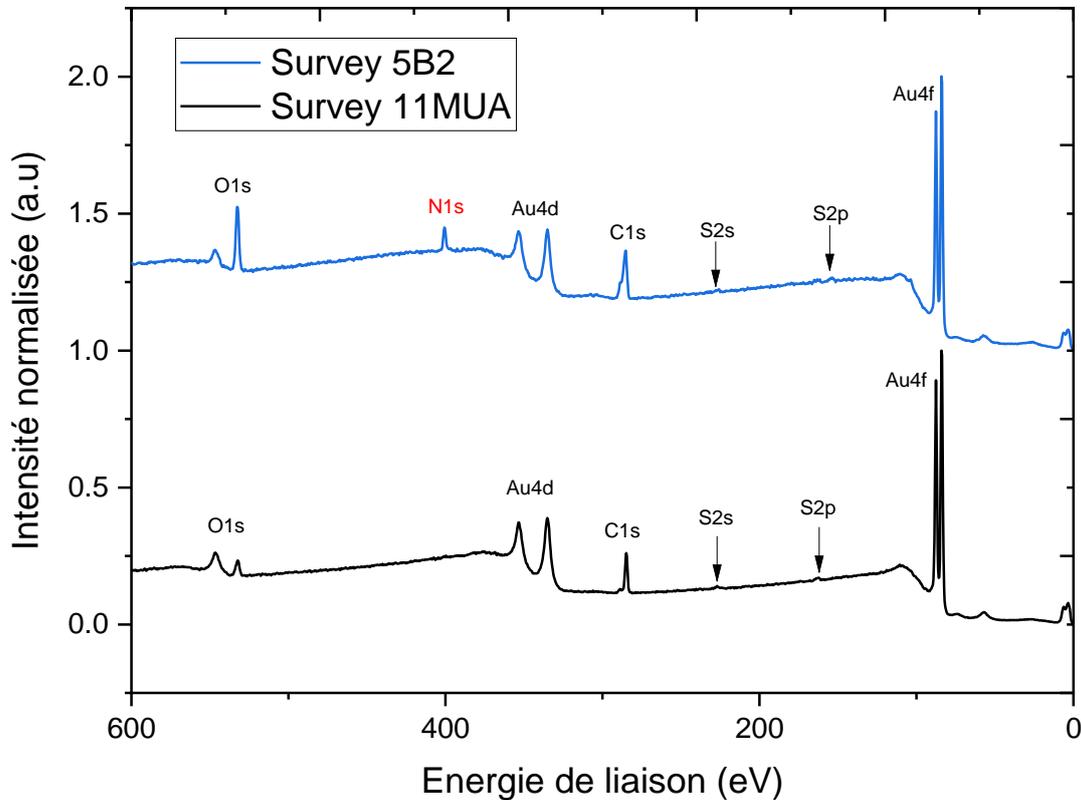


Figure VI. 10: Spectres XPS généraux: bas (noir): SAM de 11MUA formée sur la surface d'or; haut (bleu) surface fonctionnalisée avec l'anticorps anti-mannanes (IgM 5B2).

Les spectres XPS à haute résolution S 2p des surfaces greffées (11MUA) et fonctionnalisées (anti-mannanes (IgM 5B2)) sont présentés sur les **Figure VI. 11.a** et **VI. 11.b** respectivement. Le spectre de la surface greffée présente une enveloppe complexe constituée de deux doublets positionnés à 162 eV-163,2 eV et à 163,3 eV-164,7 eV correspondant aux spectres S 2p des liaisons S-Au et S-C, respectivement. Ce résultat atteste l'immobilisation de la molécule de manière covalente sur la surface d'or. Le spectre S 2p à haute résolution de la surface fonctionnalisée présente une enveloppe à un seul doublet à 163 eV-164,2 eV pouvant correspondre aux spectres S 2p des liaisons S-C et S-S (puisque'ils se superposent) que l'on retrouve dans la structure moléculaire de l'anticorps anti-mannanes (IgM 5B2). En effet, tel que présenté dans le § I.4.2, les chaînes lourdes des anticorps ainsi que les monomères d'un anti-mannanes (IgM 5B2) sont liées par des ponts disulfures S-S eux même liés à la chaîne hydrocarbonée d'un acide aminé soufré tel que la cystéine et/ou la méthionine. Nous présumons que la non-apparition des pics du spectre S 2p de la liaison S-Au serait dû au fait que la technique XPS ne sonde que les quelques 10 nm supérieurs d'une surface [23] alors que la taille de l'anticorps monoclonal (MAc) dépasse cette limite.

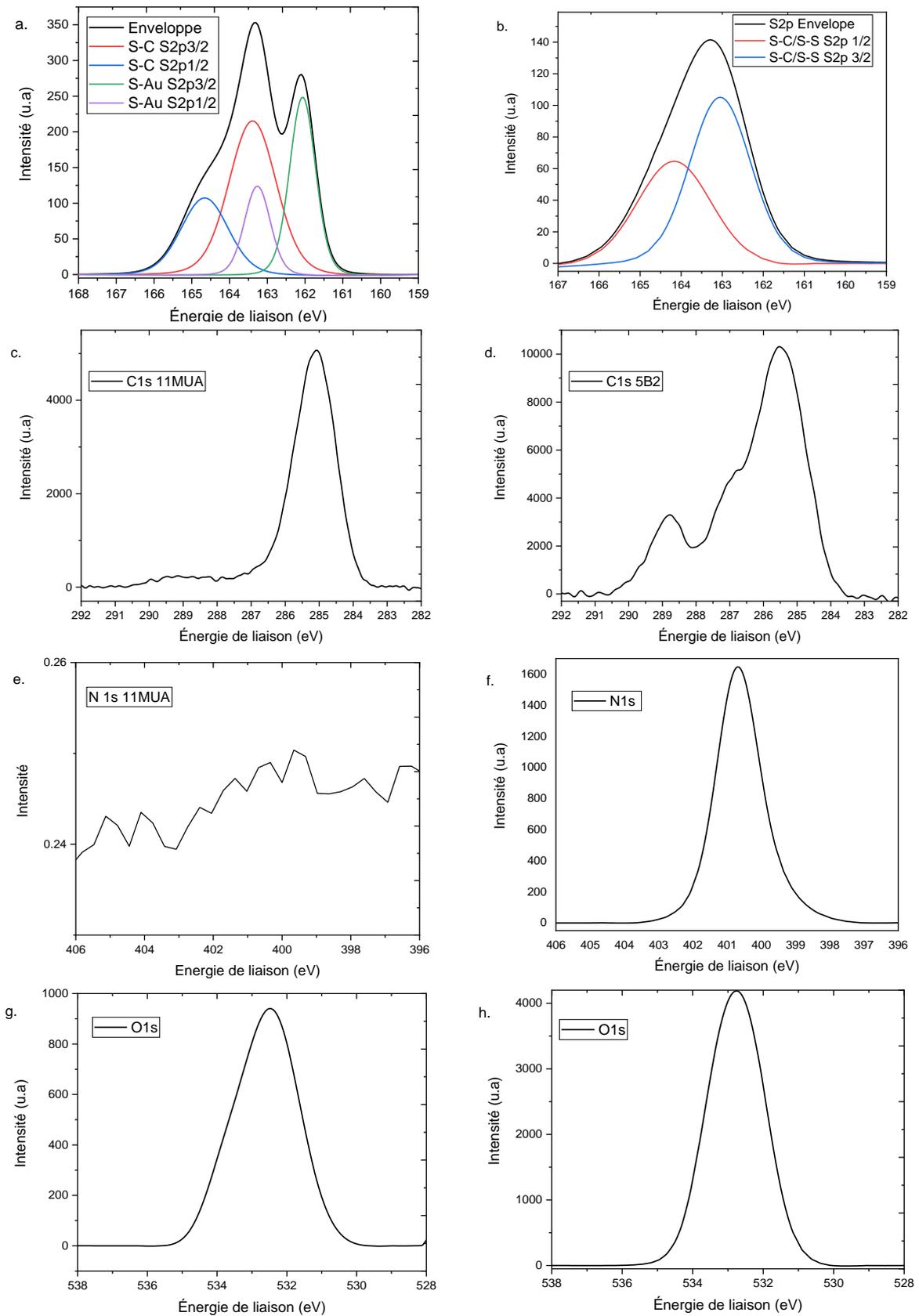


Figure VI. 11: Spectres XPS à haute résolution du S 2p, du C 1s, du N 1s, du et O 1s (de haut en bas) des surfaces greffées (gauche) et fonctionnalisées (droite).

Chapitre VI : Biodétection de *Candida albicans*

Le spectre à haute résolution C 1s de la surface fonctionnalisée (**Figure VI. 11.d**) montre clairement une enveloppe plus complexe que celle observée sur le spectre d'une surface greffée (**Figure VI. 11.c**). En effet, un pic est présent sur les deux spectres à 285 eV attribué aux composantes C-C et C-S présentes dans l'ossature du 11MUA et de l'anti-mannanes (IgM 5B2) auxquelles s'ajoutent les composantes C=C et C=N pour le MAc. On observe surtout la présence d'un épaulement à 287 eV et d'un pic à 288,8 eV attribués aux C 1s impliqués dans les liaisons C-N/C-O et C=O respectivement [24].

La différence flagrante entre les deux surfaces analysées réside dans les spectres à haute résolution N 1s où aucun pic n'est observé dans le cas d'une surface greffée (**Figure VI. 11.e**), car aucun atome d'azote n'est présent dans sa structure moléculaire. *A contrario*, le spectre à haute résolution N 1s de la surface fonctionnalisée (**Figure VI. 11.f**) présente un pic intense à 400,7 eV correspondant aux N 1s de l'azote impliqué dans les liaisons N-C/N=C présentes dans la structure de tous les acides aminés formant l'anticorps anti-mannanes (IgM 5B2) [25]. En outre, la présence de ce pic prouve l'immobilisation de l'anticorps sur la surface du capteur.

Les spectres à haute résolution du O 1s des surfaces d'or greffées et fonctionnalisées sont présentés sur les **Figure VI. 11.g** et **VI. 11.h**, respectivement. Les pics observés à 532,5 eV sur les deux spectres sont attribués aux oxygènes liés au carbone O-C/O=C formant le groupement carboxylique du 11MUA et des acides aminés qui constituent l'anti-mannanes (IgM 5B2). Toutefois, le pic de l'anticorps est plus intense car sa structure moléculaire présente un plus grand nombre d'oxygènes que le 11MUA.

VI.3.3.3 Microscopie AFM

La **Figure VI. 12** présente les images AFM acquises à l'aide du Nanoscope Dimension 3100 de Digital Instruments en mode sans-contact avec une vitesse de déplacement de 1 $\mu\text{m/s}$ sur des surfaces de silicium polies métallisées avec de l'or et greffées en 11MUA (**Figure VI. 12.a**) et fonctionnalisées en anti-mannanes (IgM 5B2) (**Figure VI. 12.b**). Les **Figure VI. 12.c** et **VI. 12.d** représentent une surface fonctionnalisée ayant interagi avec l'analyte (mannanes).

La surface d'or modifiée en 11MUA (**Figure VI. 12.a**) présente une topographie homogène dense de structures alignées avec une rugosité de l'ordre de 0,9 nm. Ces caractéristiques sont typiques d'une surface d'or greffée avec des monocouches auto-assemblées thiolées [26].

L'immobilisation de l'IgM 5B2 a induit des irrégularités de surface avec l'apparition de larges zones moins denses (**Figure VI. 12.b**) et a augmenté la rugosité moyenne de surface à 2 nm sur une surface de 2 μm x 2 μm et à 2,72 nm sur une surface de 0,5 μm x 0,5 μm . L'apparition d'irrégularités globulaires (**Figure VI. 12.b'**) ainsi que l'augmentation de la rugosité témoignent de l'immobilisation de l'anti-mannanes (IgM 5B2) comme cela a été déjà rapporté et décrit dans [16,25,27,28] pour d'autres anti-mannanes (IgM 5B2) et même IgG.

Les **Figure VI. 12.c** et **Figure VI. 12.c'** montrent l'état de surface du biocapteur après interactions 5B2/mannanes. On remarque la formation de crevasses de forme circulaire laissant penser que l'anti-mannanes se positionne dans sa conformation dite en forme « d'agrafes » dès l'interaction avec les mannanes comme suggéré premièrement par Feinstein et Munn [29] puis discuté dans [30,31]. En l'absence de l'antigène, l'anticorps prend une forme

planaire, tandis qu'en présence de celui-ci, les parties Fab de l'anti-mannanes (IgM 5B2) (pentamérique ou hexamérique) s'orientent hors du plan grâce à la flexibilité des régions C μ 2 lui donnant cette conformation dite « en agrafes » qui est notamment induite par l'avidité des anticorps anti-mannanes (IgM 5B2) symbolisée dans la **Figure VI. 13** [32].

Quant à la **Figure VI. 12.d**, elle montre l'existence de deux phases entre une surface sur laquelle il y a eu une interaction 5B2/mannanes et une autre sur laquelle il n'y en a pas eue.

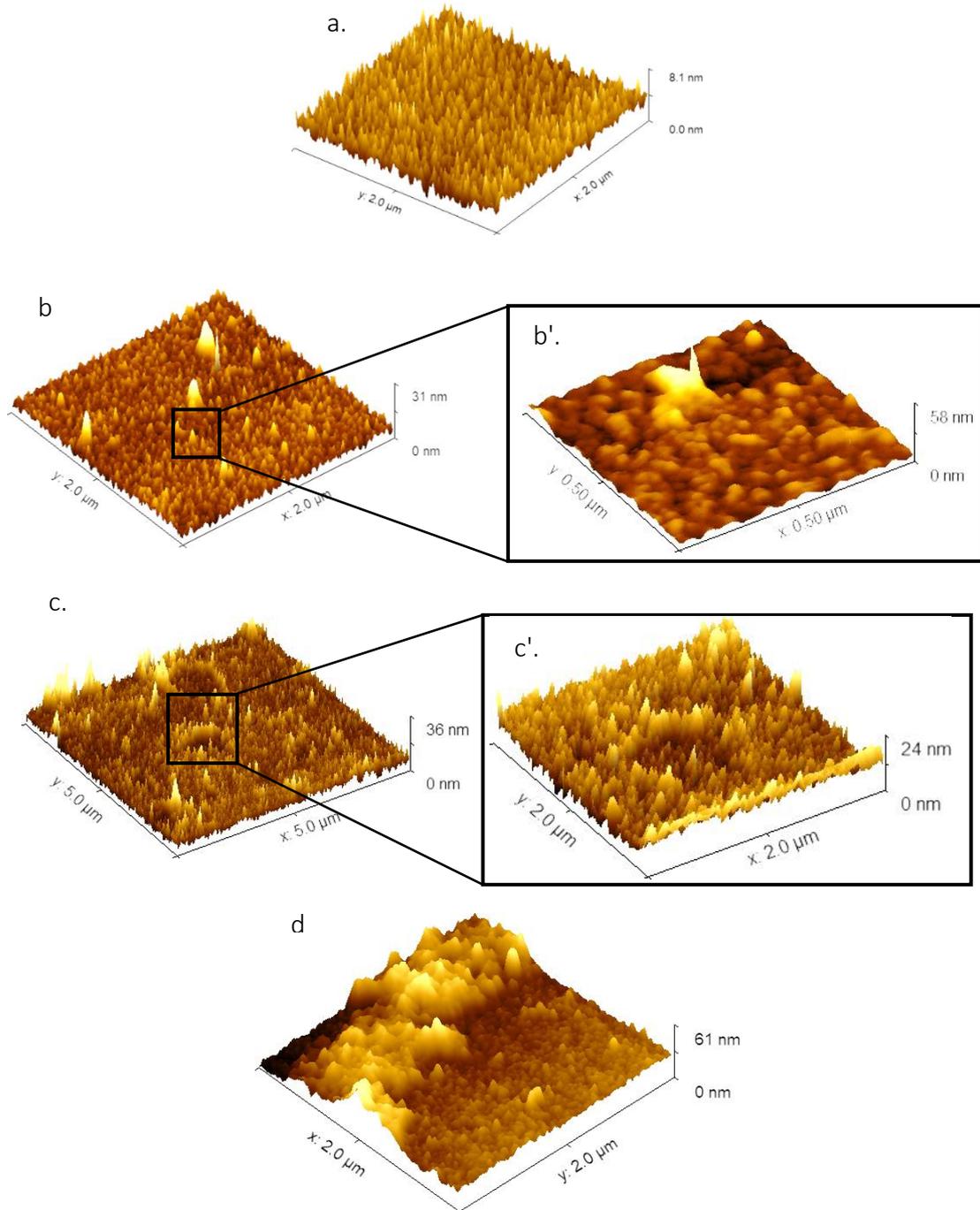


Figure VI. 12: Images AFM d'une surface d'or. a. greffée en 11MUA, b. et b'. fonctionnalisées avec des anti-mannanes (IgM 5B2), c. et c'. après interaction anti-mannanes (IgM 5B2)/mannanes et d. surface biphase anti-mannanes (IgM 5B2) et anti-mannanes (IgM 5B2)/mannanes.

Chapitre VI : Biodétection de *Candida albicans*

Le **Tableau VI. III** résume les valeurs de rugosité RMS déterminées à partir des caractérisations AFM. En ne considérant que les données relatives à une même surface, *i.e.* 2 μm x 2 μm , l'augmentation de la rugosité est perceptible au fur et à mesure des modifications successives de celle-ci.

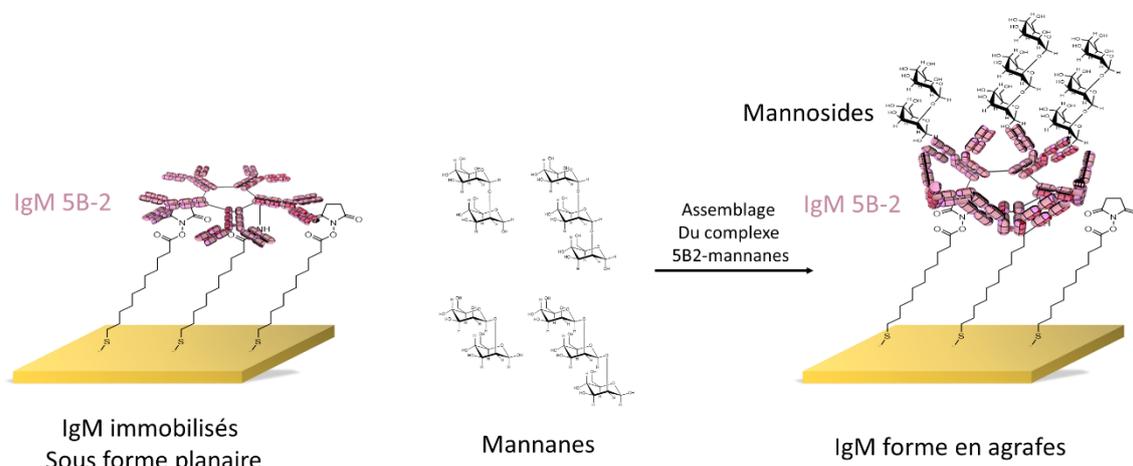


Figure VI. 13: Schéma représentatif de la conformation en agrafes du 5B2 suite à l'interaction avec les mannanes, adapté de [33,34].

| Surface | Rugosité RMS (nm) |
|---|-------------------|
| 11MUA (2 μm x 2 μm) | 0,90 |
| 5B2 (2 μm x 2 μm) | 2,05 |
| 5B2-zoomée (0,5 μm x 0,5 μm) | 2,70 |
| 5B2-Mannanes (5 μm x 5 μm) | 2,80 |
| 5B2-Mannanes zoomée(2 μm x 2 μm) | 3,30 |
| 2 phases (2 μm x 2 μm) | 7,30 |

Tableau VI. III : Rugosité extraites des caractérisations AFM.

L'ensemble de ces caractérisations valident bien le greffage de la sonde *Zymo*-SH à la surface du capteur.

VI.4 Tests d'interaction anti-mannanes (IgM 5B2)/mannanes en SPR

Pour ces expérimentations, les capteurs sont préalablement greffés en 11MUA pendant 4h. Les étapes de fonctionnalisation de la surface et d'interaction biologique sont effectuées à la suite lors de la conduite du test. Les tests ont été menés à la fois sur le banc en interrogation angulaire (*cf.* § VI.4.1) et spectrale (valisette) (*cf.* § VI.4.2).

VI.4.1 Banc en interrogation angulaire

Le test d'interaction anti-mannanes (IgM 5B2)/mannanes a été mené en utilisant des analytes de concentration différente en mannanes (625, 1250 et 2500 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Chaque concentration d'analyte a été injectée sur un canal différent d'un même capteur (**Figure VI. 14**).

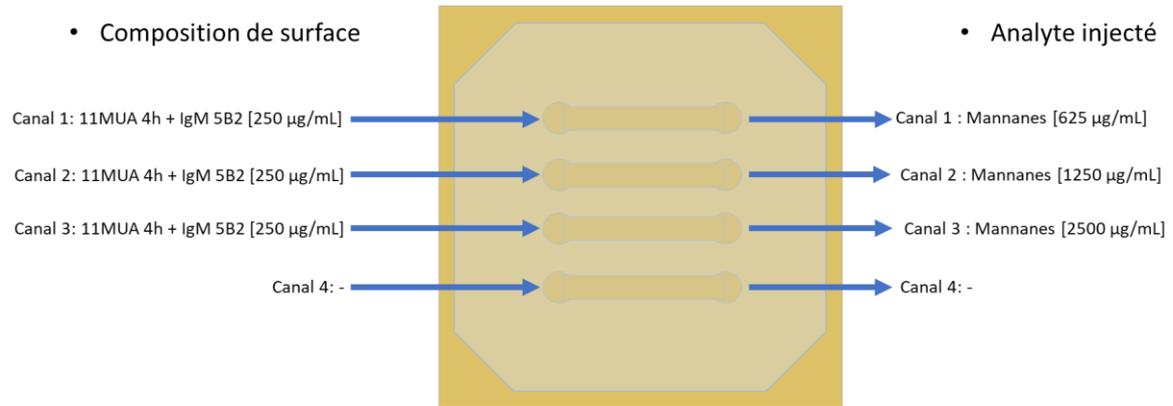


Figure VI. 14: Répartition des analytes pour le test d'interaction anti-mannanes (IgM 5B2)/mannanes sur le banc en interrogation angulaire.

VI.4.1.1 Protocole de test

VI.4.1.1.1 Fonctionnalisation de surface

La **Figure VI. 15** représente les sensorgrammes obtenus à la suite de la fonctionnalisation de surface en microfluidique dynamique. La fonctionnalisation s'est déroulée sur trois étapes:

- **Pendant environ 6 minutes:** Injection du PBS ([10 mM], pH = 7,2) en flux dynamique continu pour obtenir une ligne de base correcte et vérifier la stabilité de la réponse.
- **Pendant 21 minutes:** Injection en flux continu d'une quantité suffisante de sondes anti-mannanes (IgM 5B2) à une concentration de 250 µg/mL ([263 nM]) (dilution dans PBS ([10 mM], pH = 7,2)).
- **Fin de cycle (environ 3 minutes):** réinjection du PBS en flux continu dans les différents canaux microfluidiques.

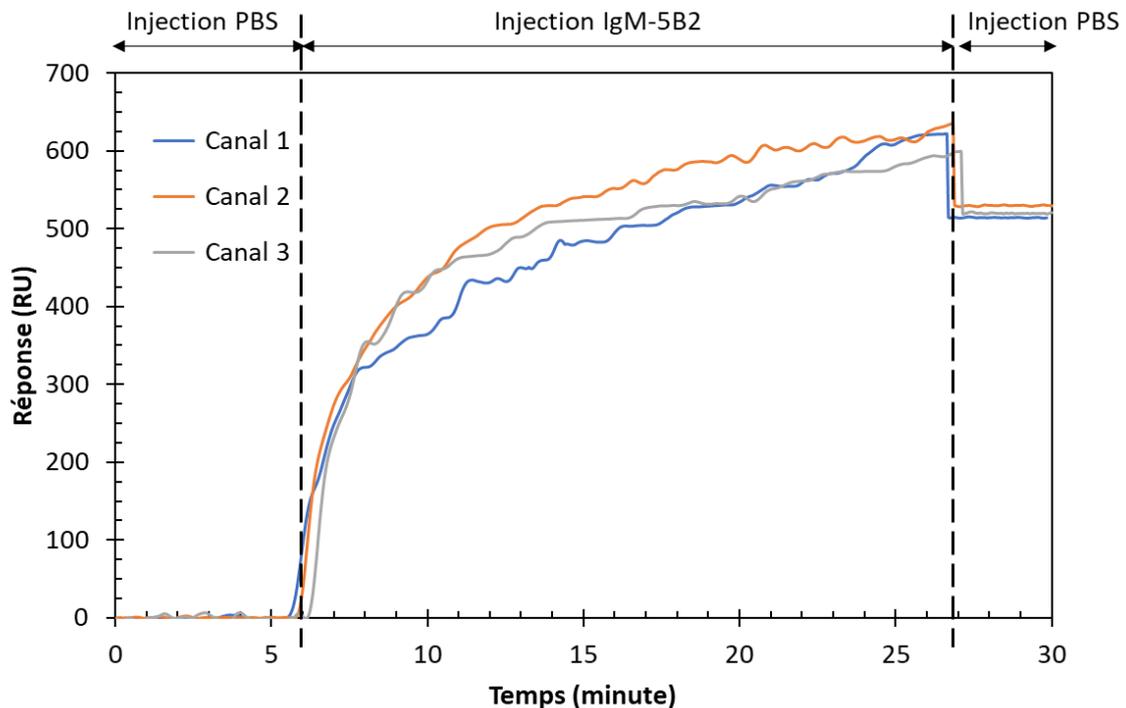


Figure VI. 15: Sensorgrammes d'immobilisation de l'Anti-mannanes (IgM 5B2) pour chaque canal utilisé par la suite (suivi de la fonctionnalisation de surface).

Lors du processus d'immobilisation de l'anti-mannanes (IgM 5B2), le maximum de la réponse est de l'ordre de 610 ± 20 RU en fonction du canal. Après rinçage de la surface au PBS, une baisse de la réponse d'environ 100 RU est observée pour les trois canaux et la réponse moyenne se stabilise autour de 520 ± 10 RU montrant une bonne homogénéité de la fonctionnalisation sur les 3 canaux.

VI.4.1.1.2 Interaction anti-mannanes (IgM 5B2)/mannanes

La **Figure VI. 16** illustre les sensorgrammes obtenus lors du test d'interaction anti-mannanes (IgM 5B2)/mannanes. Chaque canal fonctionnalisé reçoit un analyte de concentration différente en mannanes: 625, 1250 et 2500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. L'expérimentation se déroule en trois phases:

- **Pendant 200 secondes** : Injection du PBS (10 mM, pH= 7,2) en flux dynamique continu pour obtenir une ligne de base correcte et vérifier la stabilité de la réponse.
- **Pendant 500 secondes** : Injection en flux continu d'un analyte de concentration de mannanes différente dans chacun des 3 canaux.
- **Pendant 300 secondes** : réinjection du PBS en flux continu dans les différents canaux microfluidiques.

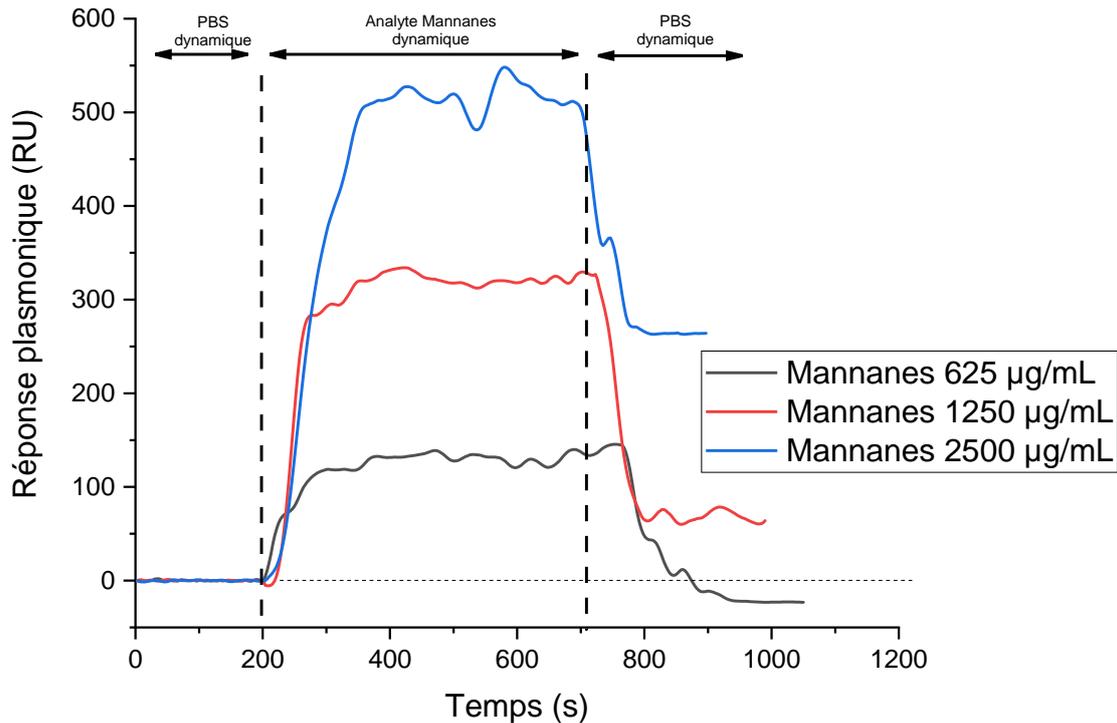


Figure VI. 16: Sensorgrammes correspondant aux tests d'interactions anti-mannanes (IgM 5B2)/mannanes.

L'injection des différents analytes a montré une augmentation rapide de la réponse avant d'atteindre un plateau d'équilibre à 145, 330 et 545 RU pour le canal 1, 2 et 3, respectivement. Le temps nécessaire pour atteindre ce plateau augmente aussi avec la concentration et s'échelonne grossièrement entre 100 et 150 secondes. Cette augmentation progressive de la réponse indique l'association paratope-épitope; le plateau traduit alors l'obtention du régime d'équilibre entre association et dissociation de molécules cibles. Le rinçage au PBS au bout de quelques minutes entraîne la dissociation du complexe anti-mannanes (IgM 5B2)/mannanes. Toutefois, celle-ci n'a pas été totale pour les concentrations les plus élevées de mannanes (1250 et 2500 µg/mL) pour lesquelles respectivement le quart et la moitié de la quantité de mannanes ayant réagi avec les anticorps γ est restée accrochée après lavage au PBS.

Les résultats présentés ici, montrent que la réponse plasmonique n'est pas proportionnelle aux concentrations de l'analyte mannanes injecté. Cela signifierait que le nombre de paratopes accessibles de l'anti-mannanes (IgM 5B2) est aléatoire, phénomène qui s'expliquerait par un arrangement des anticorps régi par plusieurs paramètres et propriétés intrinsèques, dont la gêne stérique.

Chapitre VI : Biodétection de *Candida albicans*

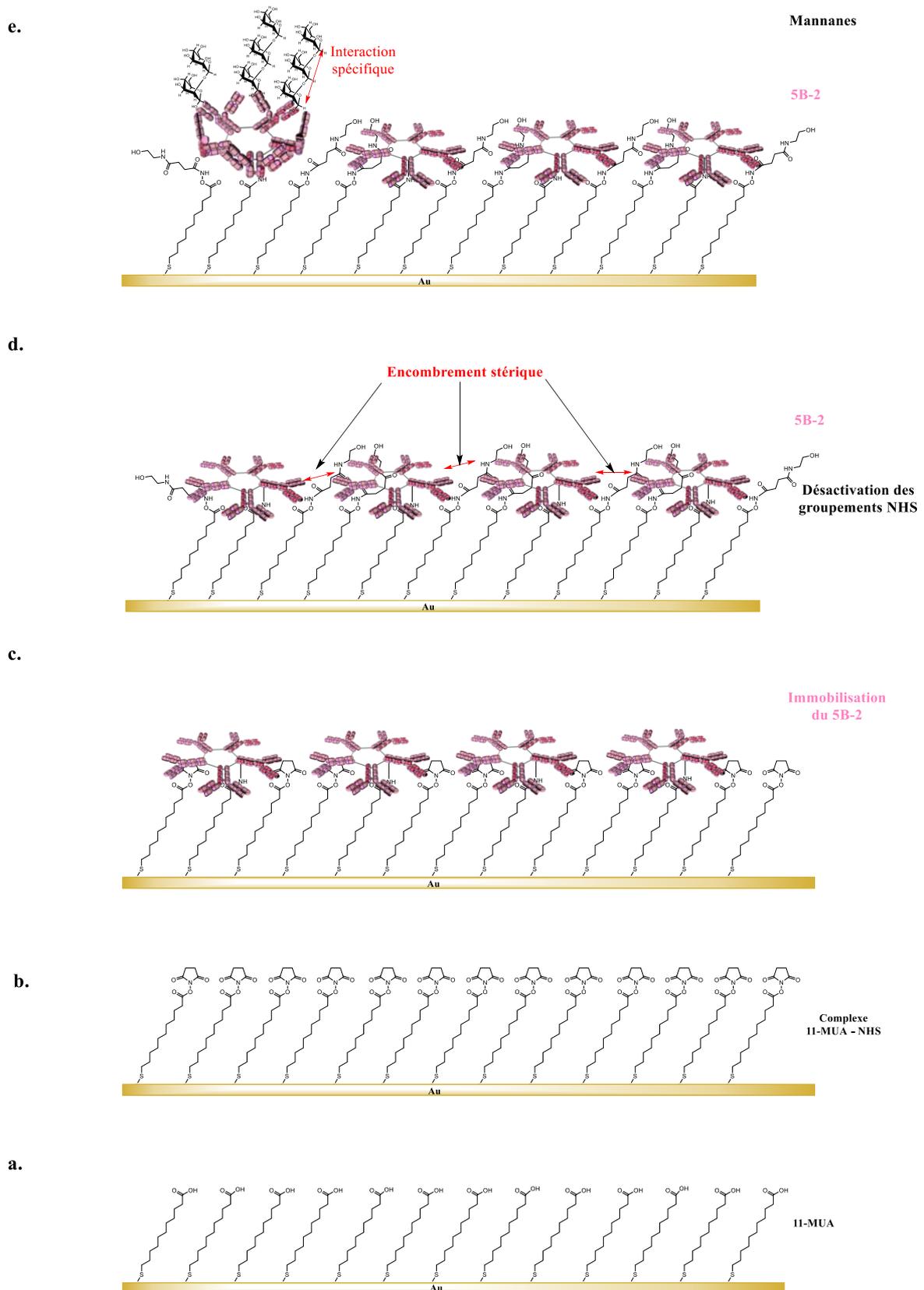


Figure VI. 17: Schéma descriptif des différentes étapes de fonctionnalisation de surface d'au : a. Greffage des 11MUA à la surface d'au ; b. Activation de la surface avec l'EDC/NHS ; c. Immobilisation

de l'anti-mannanes (IgM 5B2) ; d. Désactivation des NHS n'ayant pas réagi ; e. Injection de l'analyte (mannanes).

VI.4.2 Banc en interrogation spectrale (valisette).

Le déroulement de ce test s'est effectué d'une manière légèrement différente de celle utilisée dans le paragraphe précédent: ici deux analytes de concentration différente en mannanes, 10 µg/mL et 625 µg/mL, ont été injectés à la suite dans chaque canal. Les 3 canaux ont donc « vu » la même séquence d'analytes (**Figure VI. 18**).

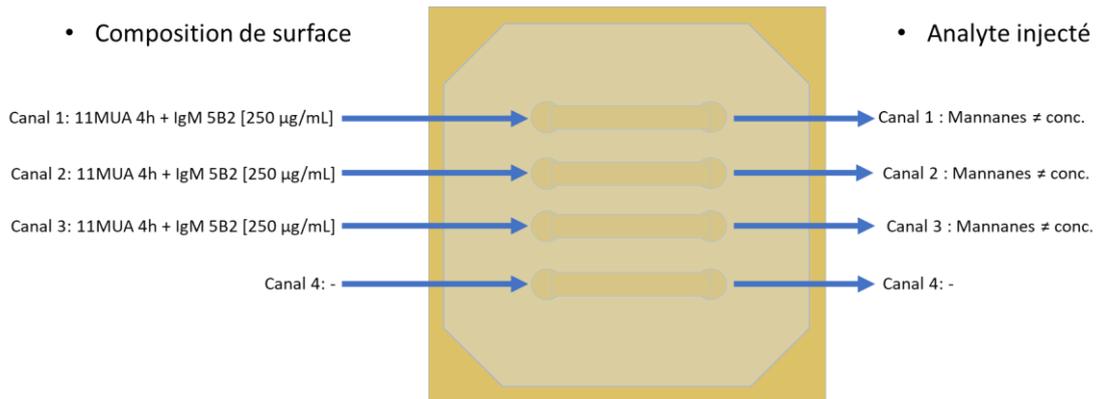


Figure VI. 18: Répartition des analytes pour le test d'interaction anti-mannanes (IgM 5B2)/mannanes sur le banc en interrogation spectrale (valisette).

VI.4.2.1 Protocole de test

VI.4.2.1.1 Fonctionnalisation de surface

Le protocole de fonctionnalisation est identique à celui mené pour l'expérimentation sur le banc en interrogation angulaire (cf. § VI.4.1.1.1).

VI.4.2.1.2 Interaction anti-mannanes (IgM 5B2)/mannanes

La **Figure VI. 19** présente les sensorgrammes d'interaction des sondes anti-mannanes (IgM 5B2) 5B2 avec les analytes mannanes en mode dynamique dans les canaux 1, 2 et 3. L'expérimentation a été menée en cinq phases:

- **Pendant 4 minutes:** injection de PBS ([10 mM], pH = 7,2) en flux dynamique continu dans les trois canaux pour obtenir une ligne de base correcte et vérifier la stabilité de la réponse.
- **Pendant 10 minutes:** injection de l'analyte - tampon phosphate salin (PBS) à une concentration de 10 mM et de pH = 7,2 contenant les mannanes à une concentration de 10 µg/mL (625 nM)- dans les canaux 1, 2 et 3.
- **Pendant 10 minutes :** réinjection du PBS dans les 3 canaux afin d'éliminer les analytes mannanes.
- **Pendant 15 minutes :** Injection de l'analyte - tampon phosphate salin (PBS) à une concentration de 10 mM et de pH = 7,2 contenant les mannanes à une concentration de 625 µg/mL (39 µM)- dans les canaux 1, 2 et 3.

- Pendant 5 minutes : réinjection du PBS dans les canaux 1,2 et 3 afin d'éliminer les mannanes.

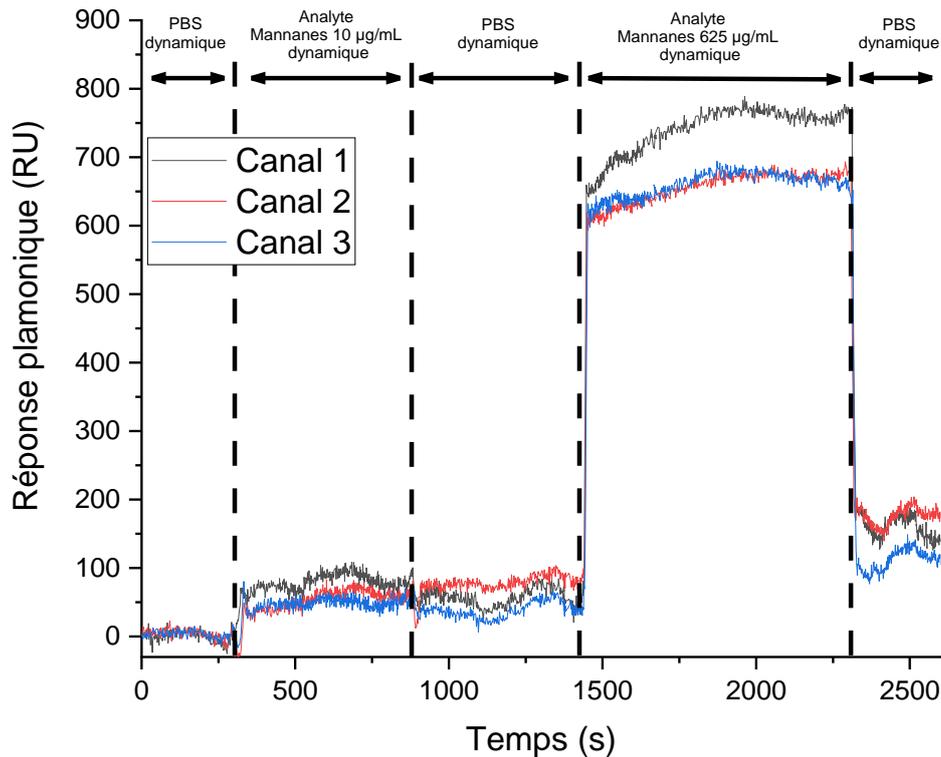


Figure VI. 19: Sensorgrammes d'interactions 5B2-anti-mannanes (IgM 5B2)/mannanes sur la valisette (interrogation spectrale).

L'injection de la solution contenant les mannanes à une concentration de 10 µg/mL ([625 nM]) induit une réponse quasi-instantanée conduisant à un plateau de l'ordre de 80 RU, 60 RU et 50 RU pour les canaux 1, 2 et 3, respectivement.

L'injection de mannanes à une concentration de 625 µg/mL ([39µM]) induit une forte augmentation de la réponse instantanée de l'ordre de 730 RU pour, de 650 RU et de 660, pour les canaux 1, 2 et 3, respectivement. Lors du rinçage, la réponse atteint 160 RU, 170 RU et 110 RU pour les canaux 1, 2 et 3, respectivement.

Cette expérience nous a permis de valider :

- d'une part, la détection des mannanes sur le banc valisette avec une réponse comparable à celle obtenue par nos partenaires du C.H.U Lille sur un équipement de laboratoire (Biacore) [5]
- et d'autre part, une réponse relativement identique d'un canal à l'autre sur un biocapteur multicanal.

VI.5 Caractérisations complémentaires

VI.5.1 SPR: anti-mannanes (IgM 5B2)/mannanes versus mannanes/anti-mannanes (IgM 5B2)

Cette étude a été menée afin d'essayer de comprendre le faible niveau de réponse obtenu lors de l'interaction anti-mannanes (IgM 5B2)/mannanes comparé à celui préalablement obtenu par les collègues du C.H.U. Lille lors de la détermination de l'affinité de l'anticorps anti-mannanes (IgM 5B2) menée sur une interaction inverse, *i.e.* mannanes/anti-mannanes (IgM 5B2). Cette expérimentation a été menée sur la valisette. Les deux interactions ont été menées sur le même capteur mais sur des canaux séparés. L'interaction anti-mannanes (IgM 5B2)/mannanes est la même que celle du paragraphe précédent. Elle a été réitérée ici afin que les deux expérimentations soient comparables.

VI.5.1.1 Interaction Anti-mannanes (IgM 5B2)/mannanes

Le capteur pré-fonctionnalisé (*cf.* § VI.3) a été testé en utilisant un analyte contenant des mannanes injectés sur les canaux 3 et 4. Les canaux 1 et 2 seront utilisés pour le test suivant (*cf.* § VI.5.1.2) (**Figure VI. 20**).

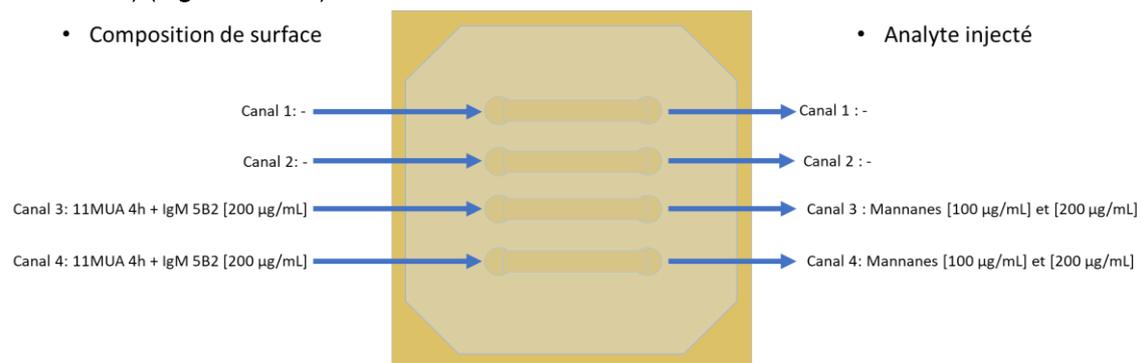


Figure VI. 20: Répartition des analytes pour le test d'interaction anti-mannanes (IgM 5B2)/mannanes.

Les **Figure VI. 21.a** et **VI. 21.b** présentent les sensorgrammes d'interactions des IgM 5B2 avec les analytes mannanes en mode dynamique dans les canaux 3 et 4. Chaque canal a reçu le même flux d'analyte composé de la succession d'un analyte ayant une concentration en mannanes de 100 µg/mL et d'un second avec une concentration de 200 µg/mL. L'expérimentation a été menée en huit phases :

Fonctionnalisation de la surface

- **Pendant 3 minutes:** injection de PBS ([10 mM], pH = 7,2) en flux dynamique continu dans les deux canaux utilisés pour obtenir une ligne de base correcte et vérifier la stabilité de la réponse.
- **Pendant 8 minutes:** injection d'une solution de tampon phosphate salin (PBS) à une concentration de 10 mM et de pH= 7,2 contenant les anticorps 5B2 à une concentration de 200 µg/mL ([210 nM]).

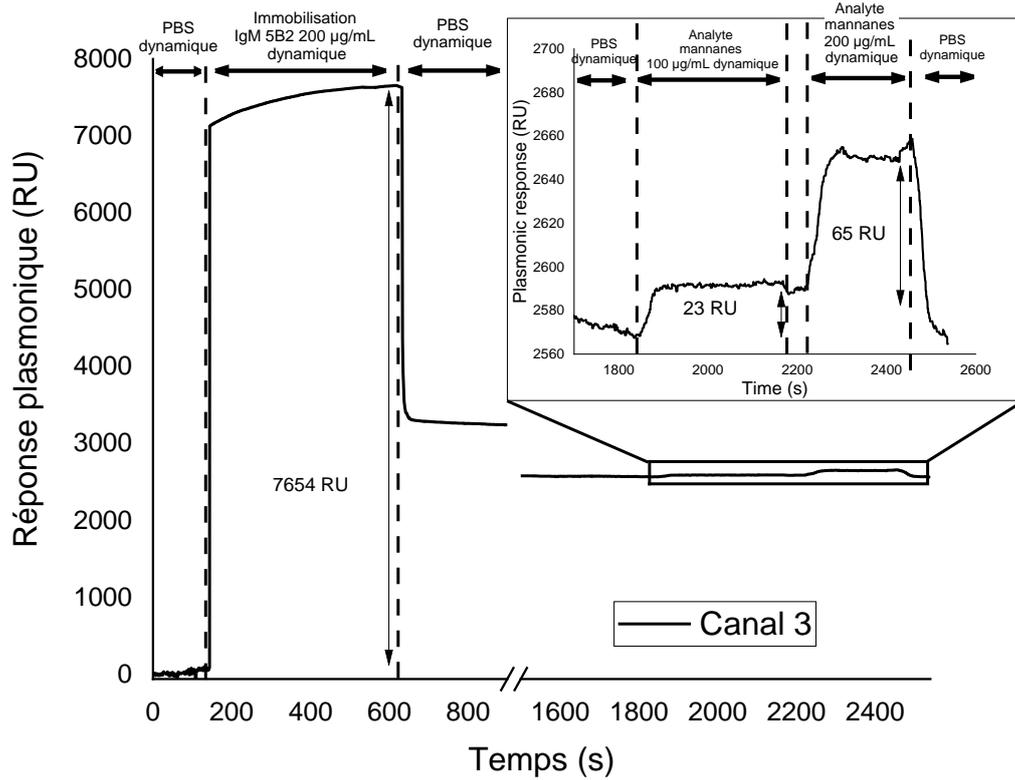
Chapitre VI : Biodétection de *Candida albicans*

- **Pendant 4 minutes** : réinjection du PBS afin d'éliminer les IgM 5B2 n'ayant pas été immobilisés sur la surface greffée.
 - À ce stade, le processus de fonctionnalisation de surface est poursuivi avec la désactivation et la passivation de surface avec de l'éthanolamine à 1M et du BSA à 0,1% (p/p), respectivement.
- **Pendant 4 minutes** : réinjection du PBS dans les canaux 3 et 4 en flux dynamique continu dans les deux canaux pour obtenir une ligne de base correcte et vérifier la stabilité de la réponse.
- **Pendant 5 minutes** : Injection d'une solution de tampon phosphate salin (PBS) à une concentration de 10 mM et de pH = 7,2 contenant les *glucides* mannanes à une concentration de 100 µg/mL ([6,25 µM]).
- **Pendant 1 minute** : réinjection de PBS afin d'éliminer les mannanes n'ayant pas interagi avec les sondes 5B2.
- **Pendant 5 minutes** : injection d'une solution de tampon phosphate salin (PBS) à une concentration de 10 mM et de pH =7,2 contenant des compléments mannanes à une concentration de 200 µg/mL ([12,5 µM]).
- **Fin de cycle** : rinçage des deux canaux avec du PBS à une concentration de 10 mM et de pH =7,2 afin de passer à la phase de **dissociation** des mannanes.

L'injection de la solution contenant 200µg/mL d'anti-mannanes (IgM 5B2) dans le canal 3 et 4 induit une augmentation instantanée de la réponse jusqu'à atteindre une réponse maximale de l'ordre de 7650 RU et 8460 RU, respectivement, indiquant l'immobilisation des anti-mannanes sur la surface de la monocouche de 11MUA activée par l'EDC/NHS. Après rinçage au PBS, le niveau atteint est de l'ordre de 3260 RU et de 4680 RU pour le canal 3 et le canal 4, respectivement. Suite à la désactivation ainsi que la passivation de surface, le niveau du signal a baissé jusqu'à 2570 RU et 3640 RU pour le canal 3 et le canal 4, respectivement. Ce niveau correspond à la quantité réelle d'anti-mannanes (IgM 5B2) immobilisés.

Lors de l'injection de la solution contenant les mannanes, nous observons une augmentation du signal quasi-instantanée pour la concentration de 100 µg/mL ([6,25 µM]) au niveau du canal 3 seulement (aucune augmentation du signal n'est observée au niveau du canal 4) jusqu'à atteindre un plateau de l'ordre de 25 RU. Ensuite, le rinçage des canaux au PBS induit une faible baisse du signal au niveau du canal 3 qui traduirait le fait que tous les analytes présents dans le tampon PBS sont restés attachés aux sondes IgM 5B2. Tandis qu'à l'injection de la solution PBS contenant des mannanes à 200 µg/mL ([12,5 µM]), une augmentation du signal progressive est observée au niveau des deux canaux correspondant à l'association des mannanes jusqu'à atteindre un plateau de l'ordre de 65 RU pour le canal 3 et de l'ordre de 150 RU pour le canal 4. Le rinçage des deux canaux au PBS a conduit à une baisse de la réponse correspondant à la dissociation totale et partielle du couple mannanes/anti-mannanes dans le canal 3 et le canal 4, respectivement.

a.



b.

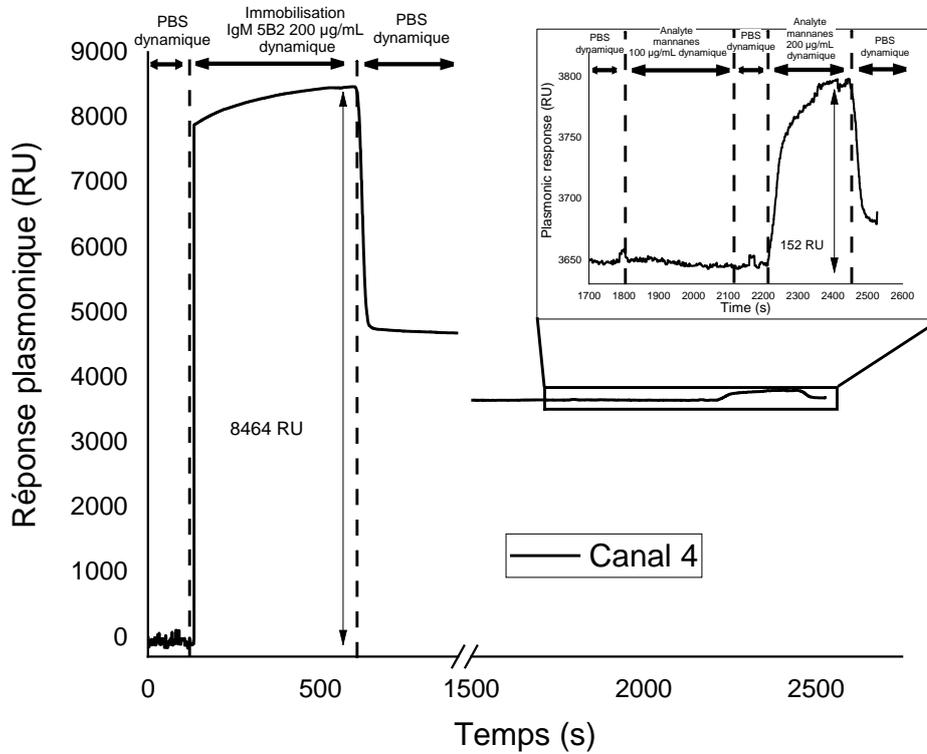


Figure VI. 21: Sensorgrammes d'immobilisation de l'anti-mannanes (IgM 5B2) (200µg/mL) et d'interaction IgM 5B2/mannanes (100 et 200 µg/mL) dans le canal 3 (a) et le canal 4 (b).

VI.5.1.2 Interaction mannanes/anti-mannanes (IgM 5B2)

Etant donné la différence de poids moléculaire entre l'anti-mannanes (IgM 5B2) (≈ 950 kDa) et le mannane (≈ 16 kDa), le schéma d'interaction inverse devrait amener une réponse beaucoup plus significative lors de l'interaction. Dans ce cas, les *glucides* mannanes sont immobilisés sur la surface du capteur et les anticorps anti-mannanes (IgM 5B2) sont injectés comme analyte. Rappelons toutefois que ce schéma réactionnel ne correspond pas à celui qui est utilisé pour la détection du *Candida albicans*, il a juste été expérimenté pour afficher plus fortement la réalité de l'interaction.

Le capteur pré-fonctionnalisé a été testé en utilisant un analyte contenant des anti-mannanes (IgM 5B2) injectés sur les canaux 1 et 2 préalablement fonctionnalisés avec une solution de PBS contenant des anti-mannanes (IgM 5B2) à $200 \mu\text{g/mL}$ (**Figure VI. 22**).

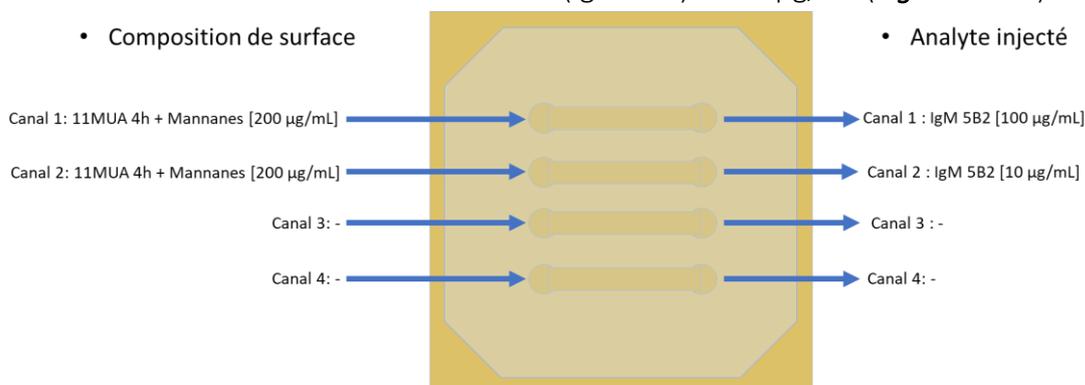


Figure VI. 22: Répartition des analytes pour le test d'interactions mannanes/anti-mannanes.

La **Figure VI. 23** présente les sensorgrammes d'interaction des sondes mannanes avec les analytes anti-mannanes en mode dynamique. L'expérimentation a été menée en cinq phases:

- **Pendant 3 minutes:** injection de PBS ($[10 \text{ mM}]$, $\text{pH} = 7,2$) en flux dynamique continu dans les deux canaux pour obtenir une ligne de base correcte et vérifier sa stabilité.
- **Pendant 12 minutes:** injection d'une solution de tampon phosphate salin (PBS) à une concentration de 10 mM et de $\text{pH} = 7,2$ contenant les mannanes à une concentration de $200 \mu\text{g/mL}$ ($[12,5 \mu\text{M}]$).
- **Pendant 3 minutes :** réinjection du PBS afin d'éliminer les mannanes non-immobilisés sur la surface greffée et ainsi n'obtenir que la réponse liée à l'immobilisation seule.
 - À ce stade, le processus de fonctionnalisation de surface est poursuivi avec la désactivation et la passivation de surface avec de l'éthanolamine à 1M et du BSA à $0,1\%$ (p/p) respectivement.
- **Pendant 3 minutes :** réinjection du PBS en flux dynamique continu dans les deux canaux pour obtenir une ligne de base correcte et vérifier la stabilité de la réponse.
- **Pendant 7 minutes :** Injection d'une solution de tampon phosphate salin (PBS) à une concentration de 10 mM et de $\text{pH} = 7,2$ contenant les anti-mannanes à une concentration de $100 \mu\text{g/mL}$ ($[105 \text{ nM}]$) et à $10 \mu\text{g/mL}$ ($[10,5 \text{ nM}]$) dans les canaux 1 et 2 respectivement.

- **Pendant 5 minutes** : réinjection du PBS pour rincer la surface du canal microfluidique afin d'éliminer les anti-mannanes (IgM 5B2) après assemblage avec les sondes mannanes.

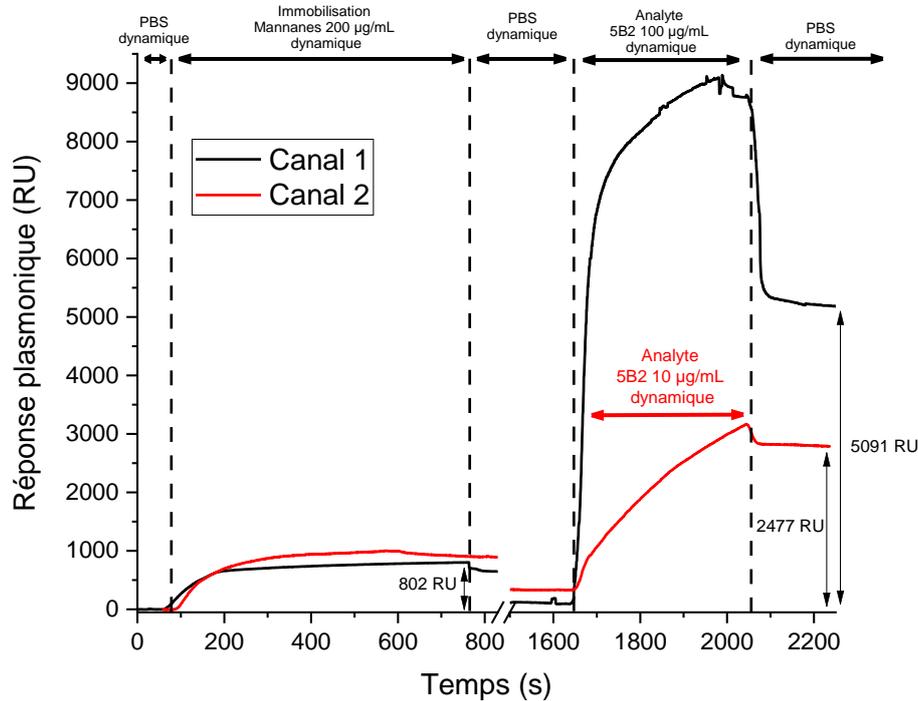


Figure VI. 23: Sensorgrammes d'immobilisation de mannanes (200 µg/mL) et d'interactions des sondes mannanes avec les analytes anti-mannanes (IgM 5B2) (10 et 100 µg/mL).

L'injection de la solution contenant les mannanes induit une augmentation progressive de la réponse jusqu'à un plateau d'équilibre à 800 RU et 1000 RU, respectivement, pour le canal 1 et 2. Après rinçage au PBS, le niveau atteint est de l'ordre de 650 RU et de 900 RU pour le canal 1 et le canal 2, respectivement. Suite à la désactivation ainsi que la passivation de surface, le niveau du signal a baissé jusqu'à 115 et 330 RU pour le canal 1 et le canal 2, respectivement. Ce niveau correspond à la quantité réelle de mannanes immobilisés. Tandis qu'à l'injection de la solution contenant les IgM 5B2, nous observons une augmentation du signal quasi-instantanée pour la concentration de 100 µg/mL ([105 nM]) (canal 1) jusqu'à atteindre un niveau maximal de l'ordre de 9100 RU et une augmentation du signal progressive pour la concentration de 10 µg/mL ([10,5 nM]) (canal 2) jusqu'à atteindre un niveau maximal de l'ordre de 3170 RU (canal 2). Le rinçage des deux canaux au PBS a conduit à une baisse du signal enregistré quasi-instantanée dans les deux canaux pour atteindre des niveaux de 5180 RU et de 2790 RU pour le canal 1 et le canal 2, respectivement. Ceci traduit clairement une grande avidité de l'anticorps vis-à-vis des mannanes immobilisés en surface. En effet, le fait qu'IgM 5B2 (multivalent) puisse se lier spatialement par ses dix ou douze paratopes (sites de liaison) à un nombre équivalent d'épitopes (antigènes) lui confère une force de liaison globale supérieure à celle d'une seule liaison. De plus, la dissociation du complexe anticorps-antigène est régie par ce qu'on appelle la « coopérativité », c'est-à-dire que la dissociation totale n'est effective que lorsque toutes les liaisons paratope-épitope singulières se désunissent simultanément [35,36].

Chapitre VI : Biodétection de *Candida albicans*

Quelle que soit la concentration en anti-mannanes (IgM 5B2), le niveau d'équilibre n'est pas atteint au terme des 7 minutes d'interaction, il est donc difficile de comparer les niveaux à ce stade pour quantifier le taux d'interactions. En revanche, le calcul de la pente de la réponse lors du début de l'interaction reflète très correctement le rapport de concentrations (Tableau VI. IV).

| Canal | Concentration en anti-mannanes (IgM 5B2) ($\mu\text{g/mL}$) | Pente (RU/s) |
|-------|--|--------------|
| 1 | 100 | 139,5 |
| 2 | 10 | 13,8 |

Tableau VI. IV : Pentas du début d'interaction mannanes/anti-mannanes (IgM 5B2).

VI.5.2 Voltampérométrie cyclique

La **Figure VI. 24** montre les voltammogrammes cycliques collectés tout le au long de la modification de la surface d'Au jusqu'à l'interaction avec les mannanes. Dans un premier temps, on remarque que la différence entre le pic d'oxydation (anodique) et de réduction (cathodique) observée sur la surface d'or de l'électrode est moyenne ce qui correspond à un cycle redox quasi-réversible et une électrode conductrice. Ensuite, dès que la surface est modifiée par des ligands organiques, l'électrode devient moins conductrice. La conductivité de l'électrode décroît considérablement dès l'activation de la surface à l'EDC/NHS suivie de l'immobilisation de l'anti-mannanes (IgM 5B2), de la désactivation de la surface à l'éthanolamine et pour finir de la détection des mannanes, résultant ainsi en un cycle redox non-réversible.

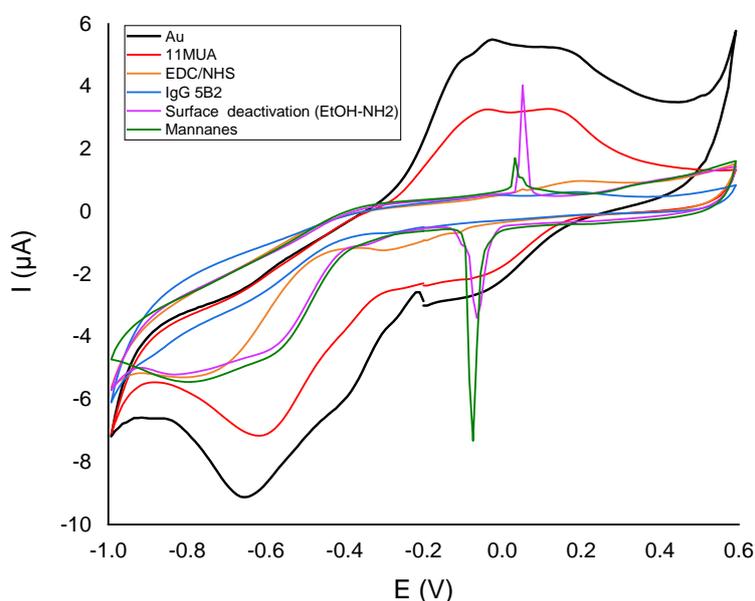


Figure VI. 24: Voltammogrammes correspondant aux étapes successives de greffage (11MUA), activation (EDC/NHS), fonctionnalisation (anti-mannanes (IgM 5B2)), passivation ("surface deactivation") et interaction (mannanes).

La chute de la conductivité de l'électrode est clairement causée par la présence de matière organique à sa surface. En effet, les molécules organiques immobilisées, en particulier l'anti-

mannanes (IgM 5B2), de poids moléculaire élevé (950 kDa), créent une barrière à la surface de l'électrode qui empêche le transfert d'électrons, ce qui se traduit par une baisse drastique des pics de courant redox [33,37,38,32,31].

L'apparition des pics intenses à -0,05 et 0,07 V lors de la désactivation de surface à l'éthanolamine et à l'interaction anti-mannanes /mannanes témoigne de l'oxydation de l'électrode de référence (Ag).

VI.6 Conclusion

Dans ce chapitre nous avons présenté la démarche et les protocoles opératoires utilisés pour la fonctionnalisation de surface des capteurs plasmoniques les convertissant ainsi en biocapteurs spécifiques envers la pathologie de candidose causée par le *Candida albicans*. La détection biologique a été basée sur une interaction moléculaire entre un anticorps de type anti-mannanes (IgM 5B2) et un antigène type glucides (*glucides* mannanes). Les mannanes cibles et les anticorps ont été extraits et développés par les partenaires C.H.U. Lille du projet BIOSENS.

Les tests de biodétection immunologique ont été amorcés sur le banc à interrogation angulaire. Cette première étude a permis de valider le concept de biodétection par anticorps-antigène sur le banc expérimental développé à l'IEMN et d'utiliser les capteurs avec microfluidique intégrée présentés dans le chapitre IV. Les protocoles de fonctionnalisation et d'interaction ont alors été reproduits sur un anti-mannanes (IgM 5B2) monoclonal spécifique aux mannanes, présents dans la couche externe du pathogène *Candida albicans*.

La surface greffée en 11MUA des biocapteurs a été caractérisée d'abord par la mesure de la mouillabilité de la surface en fonction du temps de greffage. Ensuite, la spectroscopie vibrationnelle Infrarouge à transformée de Fourier en mode ATR (ATR-FTIR) nous a permis de valider l'immobilisation de la sonde anti-mannanes (IgM 5B2) par couplage amine sur la surface des capteurs. En effet, nous avons observé les pics correspondant aux vibrations des différentes liaisons présentes dans la structure moléculaire du 11MUA et du NHS dans le spectre ATR-FTIR des surfaces fonctionnalisées. De plus, la spectroscopie vibrationnelle Raman nous a permis de confirmer le greffage de la monocouche de 11MUA par la présence des pics vibrationnels des liaisons Au-S et S-C. De manière additionnelle, la spectroscopie XPS a confirmé l'adsorption de manière covalente de ces mêmes sondes.

La détection de l'analyte mannanes de taille moyenne de ~16 kDa a été vérifiée et validée sur le banc à interrogation angulaire ainsi que sur la valisette en utilisant des sondes anti-mannanes (IgM 5B2) de taille de 900 kDa. A l'instar du travail présenté dans le chapitre précédent, le but de cette étude était de valider sur la valisette le schéma de détection par SPR du complément mannanes. Différentes concentrations ont pu être testées et détectées jusqu'à atteindre une limite de détection de l'ordre de 10 µg/mL correspondant à 625 nM en mannanes.

Par ailleurs, une étude complémentaire utilisant la voltampérométrie cyclique nous a permis de valider le protocole d'immobilisation des sondes de manière covalente sur une surface d'or, et aussi de vérifier l'interaction anti-mannanes (IgM 5B2)/mannanes.

Références

- [1] V. Hopwood, D. Poulain, B. Fortier, G. Evans, et A. Vernes, « A monoclonal antibody to a cell wall component of *Candida albicans*. », *Infection and Immunity*, vol. 54, n° 1, p. 222-227, 1986.
- [2] D. Poulain, D. W. R. Mackenzie, et J. van Cutsem, « Monoclonal antibody-gold silver staining dot assay for the detection of antigenaemia dans candidosis », *Mycoses*, vol. 34, n° 5-6, p. 221-226, 1991, doi: 10.1111/j.1439-0507.1991.tb00647.x.
- [3] C. Faille, D. W. R. Mackenzie, J. C. Michalski, et D. Poulain, « Evaluation of an enzyme immunoassay using neoglycolipids constructed from *Candida albicans* oligomannosides to define the specificity of anti-mannan antibodies », *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 11, n° 5, p. 438-446, 1992, doi: 10.1007/BF01961859.
- [4] J. Kocourek et C. E. Ballou, « Method for Fingerprinting Yeast Cell Wall Mannans », *J Bacteriol*, vol. 100, n° 3, p. 1175-1181, 1969, doi: 10.1128/jb.100.3.1175-1181.1969.
- [5] B. Sendid *et al.*, « Dissection of the anti-*Candida albicans* mannan immune response using synthetic oligomannosides reveals unique properties of β -1,2 mannotriose protective epitopes », *Sci Rep*, vol. 11, n° 1, p. 10825, 2021, doi: 10.1038/s41598-021-90402-4.
- [6] K. V. G. K. Murty, M. Venkataramanan, et T. Pradeep, « Self-assembled Monolayers of 1,4-Benzenedimethanethiol on Polycrystalline Silver and Gold Films: An Investigation of Structure, Stability, Dynamics, and Reactivity », *Langmuir*, vol. 14, n° 19, p. 5446-5456, 1998, doi: 10.1021/la980249i.
- [7] S. I. Cho, E. S. Park, K. Kim, et M. S. Kim, « Spectral correlation dans the adsorption of aliphatic mercaptans on silver and gold surfaces: Raman spectroscopic and computational study », *Journal of Molecular Structure*, vol. 479, n° 1, p. 83-92, 1999, doi: 10.1016/S0022-2860(98)00895-3.
- [8] C. S. Levin, B. G. Janesko, R. Bardhan, G. E. Scuseria, J. D. Hartgerink, et N. J. Halas, « Chain-Length-Dependent Vibrational Resonances dans Alkanethiol Self-Assembled Monolayers Observed on Plasmonic Nanoparticle Substrates », *Nano Letters*, vol. 6, n° 11, p. 2617-2621, 2006, doi: 10.1021/nl062283k.
- [9] J. Denayer, « Monocouches auto-assemblées d'organothiols mono- et bipodes sur le cuivre », Université de Namur, 2011. [En ligne]. Disponible sur: <https://dial.uclouvain.be/pr/boreal/object/boreal:89810>
- [10] J. Lukose, V. Shetty, M. Ballal, S. Chidangil, et R. K. Sinha, « Real-time and rapid detection of Salmonella Typhimurium using an inexpensive lab-built surface plasmon resonance setup », *Laser Phys. Lett.*, vol. 15, n° 7, p. 075701, 2018, doi: 10.1088/1612-202X/aabed8.
- [11] J. R. Gardner et R. Woods, « The hydrophilic nature of gold and platinum », *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, vol. 81, n° 2, p. 285-290, 1977, doi: 10.1016/S0022-0728(77)80024-7.
- [12] S. M. Mendoza, I. Arfaoui, S. Zanarini, F. Paolucci, et P. Rudolf, « Improvements dans the Characterization of the Crystalline Structure of Acid-Terminated Alkanethiol Self-

- Assembled Monolayers on Au(111) », *Langmuir*, vol. 23, n° 2, p. 582-588, 2007, doi: 10.1021/la0605539.
- [13] K. E. Michael, V. N. Vernekar, B. G. Keselowsky, J. C. Meredith, R. A. Latour, et A. J. García, « Adsorption-Induced Conformational Changes dans Fibronectin Due to Interactions with Well-Defined Surface Chemistries », *Langmuir*, vol. 19, n° 19, p. 8033-8040, 2003, doi: 10.1021/la034810a.
- [14] E. Milkani, « Modification of Surfaces for Biological Applications », Worcester polytechnic institute, 2010. [En ligne]. Disponible sur: <https://web.wpi.edu/Pubs/ETD/Available/etd-042910-155211/unrestricted/Milkani.pdf>
- [15] M. Nishimura et K. Ikuta, « Surface Plasmon Resonance Analysis of Antigen-Antibody Interaction », *BIO-PROTOCOL*, vol. 3, n° 24, 2013, doi: 10.21769/BioProtoc.1006.
- [16] B. Holzer *et al.*, « Characterization of Covalently Bound Anti-Human Immunoglobulins on Self-Assembled Monolayer Modified Gold Electrodes », *Adv. Biosys.*, vol. 1, n° 11, p. 1700055, 2017, doi: 10.1002/adbi.201700055.
- [17] Y. Zhou, C.-W. Chiu, et H. Liang, « Interfacial Structures and Properties of Organic Materials for Biosensors: An Overview », *Sensors*, vol. 12, n° 11, p. 15036-15062, 2012, doi: 10.3390/s121115036.
- [18] A. L. Lehninger, D. L. Nelson, et M. M. Cox, *Lehninger principles of biochemistry*, 5th ed. New York: W.H. Freeman, 2008.
- [19] Q. Li *et al.*, « Chemically Self-assembled Antibody Nanorings (CSANs): Design and Characterization of an Anti-CD3 IgM Biomimetic », *J Am Chem Soc*, vol. 132, n° 48, p. 17247-17257, 2010, doi: 10.1021/ja107153a.
- [20] P. Bhadra, M. S. Shajahan, E. Bhattacharya, et A. Chadha, « Studies on varying n-alkanethiol chain lengths on a gold coated surface and their effect on antibody-antigen binding efficiency », *RSC Advances*, vol. 5, n° 98, p. 80480-80487, 2015, doi: 10.1039/C5RA11725A.
- [21] J. Kim, « Investigations of Thiolated Self-Assembled Monolayers on Gold Substrates by FTIR with Specular Reflectance », p. 3.
- [22] A. J. Guiomar, J. T. Guthrie, et S. D. Evans, « Use of Mixed Self-Assembled Monolayers dans a Study of the Effect of the Microenvironment on Immobilized Glucose Oxidase », *Langmuir*, vol. 15, n° 4, p. 1198-1207, 1999, doi: 10.1021/la980974t.
- [23] J. B. Gilbert, M. F. Rubner, et R. E. Cohen, « Depth-profiling X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) analysis of interlayer diffusion dans polyelectrolyte multilayers », *PNAS*, vol. 110, n° 17, p. 6651-6656, 2013, doi: 10.1073/pnas.1222325110.
- [24] P. Srivastava *et al.*, « A versatile approach for the immobilization of amines via copper-free “click” reaction between azido self-assembled monolayer and alkynyl Fischer carbene complex. Application to the detection of staphylococcal enterotoxin A antibody », *Journal of Organometallic Chemistry*, vol. 696, n° 5, p. 1102-1107, 2011, doi: 10.1016/j.jorganchem.2010.11.020.

Chapitre VI : Biodétection de *Candida albicans*

- [25] P. Ihalainen *et al.*, « Application of Paper-Supported Printed Gold Electrodes for Impedimetric Immunosensor Development », *Biosensors*, vol. 3, n° 1, Art. n° 1, 2013, doi: 10.3390/bios3010001.
- [26] S. R. Chinnadayala et S. Cho, « Electrochemical Immunosensor for the Early Detection of Rheumatoid Arthritis Biomarker: Anti-Cyclic Citrullinated Peptide Antibody dans Human Serum Based on Avidin-Biotin System », *Sensors*, vol. 21, n° 1, Art. n° 1, 2021, doi: 10.3390/s21010124.
- [27] F. Darain, K. L. Gan, et S. C. Tjin, « Antibody immobilization on to polystyrene substrate—on-chip immunoassay for horse IgG based on fluorescence », *Biomed Microdevices*, vol. 11, n° 3, p. 653-661, 2009, doi: 10.1007/s10544-008-9275-3.
- [28] K. Wadu-Mesthrige, N. A. Amro, et G.-Y. Liu, « Immobilization of proteins on self-assembled monolayers », *Scanning*, vol. 22, n° 6, p. 380-388, 2000, doi: 10.1002/sca.4950220607.
- [29] A. Feinstein et E. A. Munn, « Conformation of the Free and Antigen-bound IgM Antibody Molecules », *Nature*, vol. 224, n° 5226, p. 1307-1309, 1969, doi: 10.1038/2241307a0.
- [30] D. R. Burton, « Is IgM-like dislocation a common feature of antibody function? », *Immunology Today*, vol. 7, n° 6, p. 165-167, 1986, doi: 10.1016/0167-5699(86)90166-0.
- [31] T. Vorup-Jensen, « Wrong Resemblance? Role of the Immune System dans the Biocompatibility of Nanostructured Materials », dans *Handbook of Harnessing Biomaterials dans Nanomedicine*, 2^e éd., Jenny Stanford Publishing, 2021.
- [32] B. A. Keyt, R. Baliga, A. M. Sinclair, S. F. Carroll, et M. S. Peterson, « Structure, Function, and Therapeutic Use of IgM Antibodies », *Antibodies*, vol. 9, n° 4, p. 53, 2020, doi: 10.3390/antib9040053.
- [33] M. B. Pedersen *et al.*, « Curvature of Synthetic and Natural Surfaces Is an Important Target Feature dans Classical Pathway Complement Activation », *The Journal of Immunology*, vol. 184, n° 4, p. 1931-1945, 2010, doi: 10.4049/jimmunol.0902214.
- [34] M. O'Reilly *et al.*, « Bifunctional CD22 ligands use multimeric immunoglobulins as protein scaffolds dans assembly of immune complexes on B cells. », *Journal of the American Chemical Society*, 2008, doi: 10.1021/ja802008q.
- [35] C. A. Jr. Janeway, P. Travers, M. Walport, et M. J. Shlomchik, *Immunobiology*, 5th éd. Garland Science New York, 2001. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10757/>
- [36] D. Caucheteur, « Nouveau format de banques d'anticorps recombinants humains pour un criblage fonctionnel à grande échelle », Thèse de doctorat, Université de Montpellier, 2018. [En ligne]. Disponible sur: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-02868491>
- [37] S. Cecioni, « Approche multivalente des interactions saccharides - lectines: synthèse de glycoclusters et analyse de la reconnaissance biomoléculaire », Thèse de doctorat, Université Claude Bernard Lyon 1, 2012. [En ligne]. Disponible sur: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00732336>

- [38] T. H. Sharp, A. L. Boyle, C. A. Diebolder, A. Kros, A. J. Koster, et P. Gros, « Insights into IgM-mediated complement activation based on *in situ* structures of IgM-C1-C4b », *PNAS*, vol. 116, n° 24, p. 11900-11905, 2019, doi: 10.1073/pnas.1901841116.

Conclusion générale

Dans ce travail, la chimie de surface a été utilisée pour répondre à deux besoins, très différents, exprimés pour l'utilisation de biocapteurs SPR dans la détection sur le terrain de pathogènes.

Le premier concerne la réalisation d'un capteur SPR à microfluidique intégrée (chapitre IV). Un procédé de fabrication de tels capteurs a été développé avec succès. Il intègre une microfluidique à quatre canaux suivant une stratégie d'auto-assemblage moléculaire par traitement du PDMS au 3-mercaptopropyl triméthylloxane (MPTMS).

Après activation de la surface du capot microfluidique par UV-O₃, une monocouche autoassemblée (SAM) de MPTMS a été greffée sur la surface du polymère qui à son tour a été mise en contact avec la surface d'or du capteur. Le collage est ainsi assuré par la liaison Au-S. Le procédé que nous avons développé a été comparé avec le collage conventionnel basé sur une décharge plasma-corona en utilisant des mesures de résistance à la traction. Les résultats ont montré que le collage chimique était plus efficace et plus résistant que le collage corona. De plus, l'étanchéité des 4 canaux microfluidiques intégrés a été confirmée par test visuel ainsi que des tests SPR en injectant des fluides sous pression allant jusqu'à 1,8 bar. A noter que la conception microfluidique peut être adaptée librement aux besoins des expérimentations et donc à des circuits microfluidiques plus complexes.

L'avantage que présentent de tels capteurs SPR à microfluidique intégrée est de permettre la réalisation d'une conception de capteurs réalisant une multi détection, puisque chaque canal peut être alors fonctionnalisé de manière différente. De ce fait, l'idée de construire un capteur SPR entièrement prêt à l'emploi et à usage unique, en intégrant le bon système microfluidique, reste encore un challenge. La pré-fonctionnalisation des capteurs SPR avant utilisation simplifierait alors grandement le processus d'analyse puisque seules les solutions de référence et les solutions en cours d'étude seraient alors injectées pour effectuer les analyses.

Le second est dédié à la mise en place de protocoles de fonctionnalisation de capteurs et de biodétection appliqués à deux pathogènes fongiques, l'un dans le domaine végétal et l'autre chez l'humain: jusqu'à ce jour, aucune étude par SPR n'avait porté sur la détection de la septoriose du blé causée par le champignon *Zymoseptoria tritici* (chapitre V). La SPR s'est avérée être une méthode de détection adéquate pour pallier les problématiques rencontrées avec les techniques usuelles telles que l'ELISA ou la PCR, à savoir : un gain de temps, une absence de marqueurs biologiques et un suivi en temps réel des interactions. Elle permet aussi d'établir une étude cinétique de l'accroche du couple sonde-ligand.

Dans un premier temps, il a fallu s'approprier les deux systèmes de lecture de capteurs utilisés dans cette étude (Chapitre III) basés respectivement sur un schéma de détection à interrogation angulaire et spectrale (ou valisette). A noter que cette valisette a été fabriquée par le partenaire Multitel du projet BIOSENS comme un équipement de lecture de terrain pour

capteurs SPR. Pour ces deux systèmes de lecture, nous avons décrit la procédure d'étalonnage ainsi que les performances expérimentales obtenues. L'étalonnage du banc de mesure angulaire a été réalisé avec une surface plasmonique de 35 nm d'épaisseur et une série de solutions d'éthylène glycol. Il nous a permis d'enregistrer une sensibilité de l'ordre de 6550 px/RIU avec une résolution et une limite de détection estimées à 16 RU et 33 RU, respectivement. De manière similaire, l'étalonnage du banc spectral nous a permis d'observer une sensibilité de 6050 nm/RIU avec une résolution et une LOD estimées à 25 RU et 72 RU, respectivement, pour le capteur de 35 nm d'épaisseur d'or. De même, une sensibilité de 6120 nm/RIU a été obtenue pour un capteur de 48 nm d'épaisseur d'or avec la même résolution et LOD qu'estimées précédemment.

A la suite (chapitre V), il a été entamé la procédure de conversion des capteurs SPR en biocapteurs dédiés à la détection du *Zymoseptoria tritici* selon deux schémas. Le premier est basé sur une interaction ADN-ADN et le second sur une interaction anticorps IgG-protéine.

La détection à base d'acides nucléiques a été en premier lieu vérifiée sur le banc valisette avec des monobrins d'ADN complémentaires de 100 bases constitués de Thymine pour la sonde (*T100-SH*) et d'Adénine pour l'analyte (*A100*). Les résultats positifs issus de ces tests préliminaires nous ont permis de valider la preuve de concept de détection nucléique sur la valisette.

Après ces résultats très encourageants nous avons poursuivi avec les mêmes protocoles de fonctionnalisation de surface pour préparer les biocapteurs pour la détection du *Zymoseptoria tritici*. La surface a été fonctionnalisée avec une sonde compl. *Zymo-SH* (déterminée par bioinformatique par le partenaire CARAH du projet BIOSENS) correspondant à une partie du génome du champignon. Cette sonde interagit avec l'analyte complémentaire *Zymo*. Les deux monobrins (dont celui, thiolé, de la sonde) sont issus de la synthèse et obtenus commercialement.

La fonctionnalisation des surfaces des capteurs avec les sondes *Zymo-SH* a été validée par les techniques de caractérisation de surface usuelles (angle de contact, spectroscopie vibrationnelle, XPS, AFM et voltampérométrie cyclique). Cela nous a permis de passer à l'étape de détection biologique par SPR en s'étant assuré de la fonctionnalisation effective des capteurs.

Les résultats de détection obtenus ont montré pour la première fois la biodétection du *Zymoseptoria tritici* à base d'ADN par SPR. Les premiers tests ont montré une détectabilité de 500 nM d'oligonucléotide *Zymo* sur trois canaux indépendants. Ensuite, l'injection monocyclique de l'analyte nous a permis d'évaluer le R_{max} à 350 RU. Nous avons donc pu déterminer les constantes d'association k_a et de dissociation k_d du couple compl. *Zymo-SH-Zymo*. La faible constante de dissociation à l'équilibre traduit une forte stabilité du couple *Zymo-SH – Zymo*.

La détection du *Zymoseptoria tritici* par SPR à base d'anticorps IgG et de *protéines-Zymo* a, elle aussi, été vérifiée sur la valisette en utilisant des biocapteurs fonctionnalisés avec des *IgG-Zymo* fournis par les partenaires du C.H.U Lille. Les résultats issus de ces tests ont montré

la détectabilité de protéines *Zymo* pures et de protéines *Zymo* dans un mélange protéinique issu directement d'extraits végétaux. Cependant, aucune étude cinétique n'a pu être effectuée pour l'instant: cette partie expérimentale est amenée à être reproduite pour définir les propriétés cinétiques du couple *IgG-Zymo-protéines-Zymo*.

Dans le dernier chapitre (Chapitre VI), nous avons présenté les travaux réalisés pour la détection de *Candida albicans* suivant un seul schéma de détection, basé sur une interaction anticorps Anti-mannanes (IgM 5B2)-*glucides* (mannanes). Ce schéma de détection a été vérifié sur les deux bancs de lecture, en interrogations angulaire et spectrale.

Les biocapteurs utilisés ont été fonctionnalisés avec les sondes Anti-mannanes (IgM 5B2) 5B2 monoclonaux par couplage amine (EDC/NHS) sur une surface greffée par une monocouche autoassemblée de 11MUA. Le temps de greffage en question a été préalablement optimisé en fonction des réponses plasmoniques enregistrées.

Identiquement aux travaux du chapitre précédent, nous avons validé la modification de surface par les sondes 5B2 par diverses méthodes de caractérisation (mouillabilité, spectroscopie vibrationnelle, AFM, voltampérométrie cyclique) avant de réaliser les tests de détection par SPR.

Les expériences SPR, ont d'abord permis de valider le concept de détection des mannanes sur le banc angulaire en utilisant les capteurs avec microfluidique intégrée présentés dans le chapitre III. La concentration minimale détectée est de 625 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Ensuite, la détection des mannanes a été validée sur la valisette avec une LOD de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

En outre, une étude comparative entre le schéma de détection classique (antigène-anticorps) et celui que nous avons utilisé (anticorps-antigène) a été menée. Même si aucune étude de la cinétique d'interaction n'a pu se faire, une proportionnalité entre la pente de la courbe SPR et la concentration d'analyte injecté a été montrée.

Perspectives

Les perspectives envisageables, en prolongement direct ou indirect de ces travaux, pourraient se décliner suivant 4 axes principaux: deux sont plutôt liés à l'équipement de mesure:

- optimisation du couplage optique entre équipement et capteur,
- adaptation de l'équipement aux capteurs avec microfluidique intégrée,

et deux liés aux protocoles de mesure:

- optimisation des protocoles de fonctionnalisation de surface des capteurs,
- obtention des échantillons de test.

1- Optimisation du couplage optique entre équipement et capteur

Les travaux de cette thèse nous ont permis de situer les problématiques d'élaboration d'un système de lecture SPR de terrain en vue d'une détection de phytopathogènes et de pathogènes humains sur site.

L'étalonnage de la valisette a montré d'excellentes performances en termes de sensibilité, de résolution et de limite de détection. Des problèmes de répétabilité de mesures ont montré que le support mécanique du capteur et/ou de son optique de couplage devait être revu de manière à stabiliser l'ensemble, notamment pour un équipement dédié au terrain.

2- Adaptation des capteurs microfluidiques

Les capteurs avec microfluidique intégrée présentés en chapitre III nous ont permis d'effectuer des mesures multiples avec un seul capteur sur le banc de laboratoire en interrogation angulaire, sans pour autant en altérer les performances. L'avantage ici, est de s'affranchir du système de clampage de la microfluidique sur le capteur employé dans la valisette. En liaison directe avec le point précédent, cette modification constituerait une piste intéressante pour garantir la stabilité du système de lecture tout en fournissant une microfluidique multicanale. De plus, l'utilisation de capteurs SPR avec contrôle de température intégré développés au sein de notre groupe [1] permettrait de mieux maîtriser les effets de température sans pour autant utiliser une enceinte thermostatée. En outre, cela permettrait de contrôler finement le processus d'appariement de l'analyte avec la sonde.

3- Optimisation des protocoles de fonctionnalisation de surface

Les protocoles opératoires utilisés pour la conversion des capteurs en biocapteurs ont été élaborés et développés conjointement avec les partenaires du projet BIOSENS, notamment le C.H.U Lille et CARAH/Materia Nova. Toutefois, ils sont amenés à être optimisés pour permettre d'atteindre un plus grand degré de sensibilité et une meilleure affinité tout en utilisant moins de matière biologique. Cela peut être réalisé par:

- l'ajout d'un espaceur entre les monobrins d'ADN sondes ou les molécules formant la SAM pour la fonctionnalisation de surface basée sur une interaction anticorps-antigène afin d'éviter l'encombrement stériques des macromolécules,

- l'utilisation de la stratégie d'immobilisation basée sur la bioaffinité (i.e. : système Biotine-Avidine), spécifiquement pour les anticorps polyclonaux pour assurer une accroche spécifique, l'orientation des anticorps IgG par de la protéine A ou G pour rendre les sites paratopes accessibles aux antigènes qui représentent la pathologie.

4- Obtention des échantillons de test

Nos différentes expérimentations ont montré que le procédé de traitement des échantillons, de la matière prélevée à l'analyte utilisé sur le capteur, reste un point bloquant pour la réalisation d'un appareil de terrain. Actuellement, la valisette comporte l'équipement de lecture SPR mais nécessite un analyte "prêt à l'emploi". Pour le projet, cette phase du processus a été réalisée en laboratoire, elle nécessiterait donc d'être intégrée à l'équipement de manière à ce que celui-ci soit effectivement totalement autonome. Pour l'instant, cette phase de préparation apparaît néanmoins très dépendante des échantillons prélevés et de ceux à fournir.

Références

- [1] S. Ganesan *et al.*, « Plasmonic Layer as a Localized Temperature Control Element for Surface Plasmonic Resonance-Based Sensors », *Sensors*, vol. 21, n° 6, Art. n° 6, janv. 2021, doi: 10.3390/s21062035.

Annexe

Validation par test Elisa de l'interaction Anti-mannanes (IgM 5B2)/mannane

Le protocole du test ELISA indirect est présenté dans la Figure A. 1 et est réalisé en plusieurs étapes pendant deux jours. Cette étape a été réalisée par le partenaire C.H.U. Lille du projet BIOSENS.

D'abord, une solution tampon bicarbonate contenant les antigènes de types mannanes à 1% a été injectée dans 10 puits d'une plaque de titration et a été incubée à 4°C pendant 20 h. Après lavage des puits au tampon, 100 µL de BSA dilué à 1% dans du PBS ont été ajoutés dans chaque puit afin de saturer la surface fonctionnalisée avec les mannanes précédemment immobilisés durant 15 minutes. Ensuite, un lavage au PBS a été effectué afin d'éliminer les molécules qui ne se sont pas fixées. Le processus a été poursuivi en fixant différentes concentrations [1/100^e-1/1000^e] de l'anticorps Anti-mannanes (IgM 5B2) pendant 20 minutes. Cette étape est suivie de trois lavages avec un mélange équi-volumique PBS-Tween 20⁵. Par la suite, un anticorps secondaire dilué au 1/5000^e a été incubé durant 1h, avec, à la suite, trois lavages au mélange équi-volumique PBS-Tween. Le test est finalisé par la fixation du TetraMethylBenzidine (TMB), substrat de l'enzyme et l'ajout de 100 µL de H₂SO₄ à 0,5 M. La plaque de titration a ensuite été analysée par un spectromètre à une longueur d'onde de 450 nm.

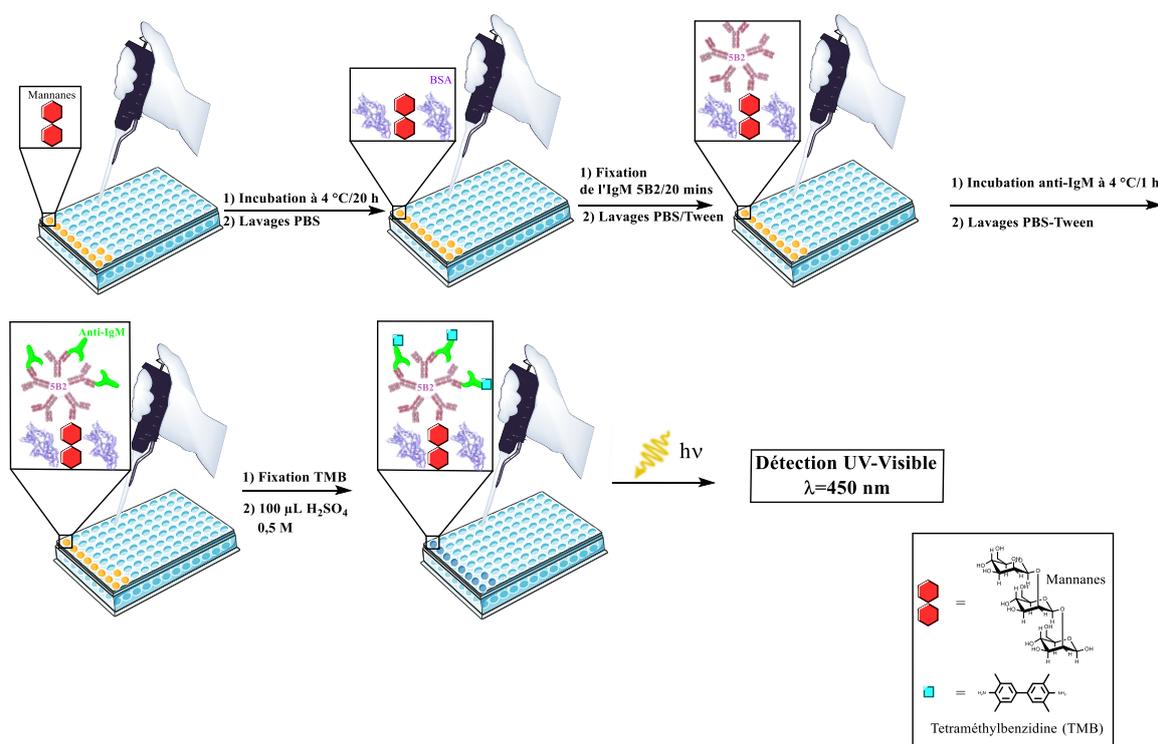


Figure A. 1 : Schéma descriptif du test ELISA

⁵ Tween 20: Agent tensio-actif (surfactant) non-ionique, utilisé dans les tests ELISA pour bloquer les sites actifs vacants.

Le résultat issu du test ELISA pour l'interaction 5B2-Mannanes est présenté dans la **Figure A. 2**, l'anticorps monoclonal 5B2 montre une réactivité spécifique envers les mannanes avec une limite de détection de l'ordre de 400 ng/mL.

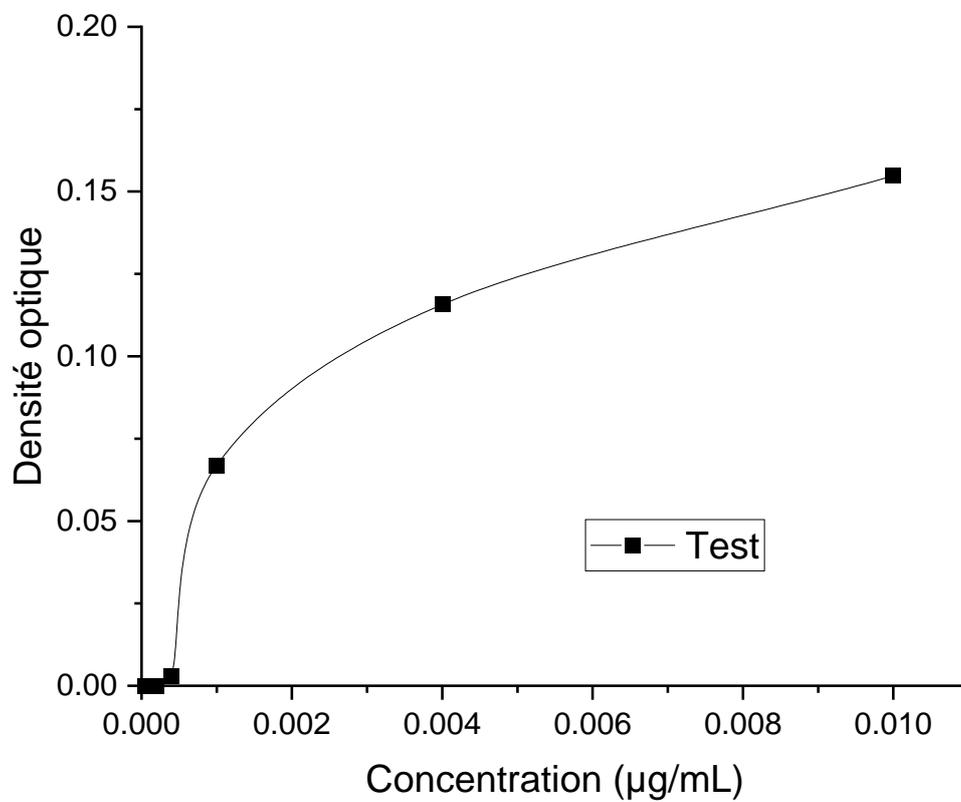


Figure A. 2 : Résultat du test ELISA

Publications et communications

Publications

En tant que premier auteur

M-T Bakouche, S Ganesan, D Guérin, D Hourlier, S. Maricot, J-P, Vilcot, "Leak-free integrated microfluidic channels fabrication for surface plasmon resonance applications", *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 2020, <https://doi.org/10.1088/1361-6439/abb991>

En tant que co-auteur

J Hastanin *et al.*, "Compact multichannel spectroscopic label-free biosensor platform for plant diseases point-of-care testing (POCT)", *Biophotonics in Point-of-Care*. Vol. 11361. International Society for Optics and Photonics, 2020, <https://doi.org/10.1117/12.2553216>

Ganesan, Sivaramakrishnan *et al.* "Plasmonic Layer as a Localized Temperature Control Element for Surface Plasmonic Resonance-Based Sensors". *Sensors* 21, N°6, 2035 <https://doi.org/10.3390/s21062035>

Conférences internationales

En tant que premier auteur

M-T Bakouche, S Ganesan, J-P Vilcot, S Maricot, "Real-time detection of biopathogens and biocontrol agents using Surface Plasmon Resonance imaging (SPRi)", Workshop Franco-Japonais « Photo-active materials with cooperative & synergetic responses » présentation de poster (29 et 30/03/2018, Lille).

M-T Bakouche, K Lecointe, C Dekuijper, D Lanterberg, S Ganesan, S Maricot, B Sendid, J-P Vilcot, M Bouzaoui, IEEE SENSORS FRANCE 2020 International Workshop [En ligne, 26-27/11/2020] Présentation orale « Development of real-time SPR biosensors for the detection of Human and wheat pathogens ».

En tant que co-auteur

J Hastanin, C. Lenaerts, P. Gailly, F. Rabecki, J. Brisbois, K. Fleury-Frenette, S. Ganesan, M-T. Bakouche, S. Maricot and J-P. Vilcot, "Compact plasmonic multichannel spectroscopic sensor platform", Lab-on-a-Chip & Microfluidics Europe 2019 présentation de poster (18 et 19/06/2019, Rotterdam).

Communications orales aux meetings SMARTBIOCONTROL

Symposium SMARTBIOCONTROL, présentation webinaire des principaux résultats SPR obtenus (06/07/2020, En ligne).

Symposium SMARTBIOCONTROL, présentation des méthodes de fonctionnalisation et caractérisations en ADN/anticorps (05/02/2019, Reims)

Webinaire SMARTBIOCONTROL, présentation webinaire nommée "Surface (bio)-functionalization: A main step towards bio-recognition/biosensing" (05/11/2018, En ligne)

Autres communications posters

En tant que premier auteur

M-T Bakouche, S Ganesan, S. Maricot, K Lecointe, B Sendid, J-P, Vilcot, M Bouzaoui, "Antibody surface functionalization for SPR Real-time detection of biopathogens and biocontrol", école d'été thématique *Biosurf*, (03/06/2019, Porquerolles).

En tant que co-auteur

S Ganesan, M-T Bakouche, L Hay, J-P, Vilcot, S. Maricot, "Antibody surface functionalization for SPR Real-time detection of biopathogens and biocontrol", école d'été thématique *Biosurf*, (03/06/2019, Porquerolles).

Résumé

La détection d'éléments biologiques dans des milieux, qu'ils soient simples ou complexes, peut être réalisée par diverses méthodes analytiques telles qu'ELISA, PCR, QCM... . Parmi celles-ci, la méthode optique qui repose sur l'utilisation de biocapteurs à base de résonance plasmonique de surface (SPR) est présentée comme une technique présentant certains avantages: sensibilité, analyses en temps réel et sans marquage.

Les travaux de cette thèse menés dans le cadre du projet Biosens, ont porté sur le développement de biocapteurs SPR sans marqueur biologique pour des applications biomédicales et agricoles. Concernant la mise en œuvre sur le terrain, des capteurs SPR avec microfluidique intégrée ont été développés permettant à terme une utilisation de terrain simplifiée.

Afin de s'assurer la spécificité de détection, ce type de capteurs nécessite une fonctionnalisation de la surface qui est, dans notre cas, basée sur des anticorps ou des fragments d'ADN. Deux pathogènes différentes, appartenant au règne fongique, à savoir *Candida albicans* et *Zymoseptoria tritici*, respectivement dans les domaines médical et agricole, ont été étudiées, détectés et quantifiés.

À cette fin, les ligands d'intérêt ont d'abord été immobilisés sur la surface en or des capteurs SPR par couplage amine pour les anticorps et par liaison covalente directe thiol-or pour les monobriens d'ADN. Ensuite, des études d'interaction biologique avec les antigènes complémentaires respectifs et l'ADN ont été menées en temps réel à l'aide de deux systèmes de lecture SPR développés en laboratoire; le premier, fixe, basé sur une interrogation angulaire et le deuxième, portable, fonctionnant selon la configuration spectrale.

Mots-clés : Biocapteurs, SPR, Fonctionnalisation de surface, puces microfluidiques, anticorps, antigènes, ADN.

Abstract

The detection of biological elements in complex or simple media can be achieved by various analytical methods (ELISA, PCR, QCM...). Among these techniques, one can mention the optical method based on the use of surface plasmon resonance (SPR) biosensors.

The work of this thesis, which is part of the Biosens project, focused on the development of biological label-free SPR biosensors for biomedical and agricultural applications. Towards this aim, SPR sensors with integrated microfluidic circuitry have been developed ultimately allowing a simplified on-site use.

To ensure the detection specificity, this type of sensor requires a surface functionalization which is, in our case, based on either antibodies or DNA fragments. Two different pathogens, belonging to the fungal kingdom, namely *Candida albicans* and *Zymoseptoria tritici*, in the human and vegetal domains, respectively, were studied, detected, and quantified.

To this end, the ligands of interest were first immobilised on the gold surface of the SPR sensors by amine coupling for the antibodies and by direct thiol-gold covalent bonding for the single stranded-DNA. Subsequently, biological interaction studies with the respective complementary antigens and DNA were performed in real time using two lab-made SPR systems; the first, which is fixed and based on angular interrogation and the second, which is portable and operating in spectral configuration scheme.

Keywords: Biosensors, SPR, surface functionalization, microfluidic chips, antigens, antibodies, DNA.