



HAL
open science

Développement d'un biocapteur plasmonique pour la détection en faibles concentrations de miARNs dans le cadre du don d'organes

Coline Beltrami

► **To cite this version:**

Coline Beltrami. Développement d'un biocapteur plasmonique pour la détection en faibles concentrations de miARNs dans le cadre du don d'organes. Santé. Université Paris-Saclay; Université de Sherbrooke (Québec, Canada), 2024. Français. NNT: 2024UPAST196 . tel-04960690

HAL Id: tel-04960690

<https://theses.hal.science/tel-04960690v1>

Submitted on 21 Feb 2025

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.

Développement d'un biocapteur plasmonique pour la détection en faibles concentrations de miARNs dans le cadre du don d'organes

*Plasmonic biosensor development for low-concentration detection of
miRNAs in the context of organ donation*

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
et de l'Université de Sherbrooke

École doctorale n° 575 : Electrical, Optical, Bio-physics and Engineering (EOBE)

Spécialité de doctorat : Physique

Graduate School : Sciences de l'Ingénierie et des Systèmes

Référent : Faculté des sciences d'Orsay

Thèse préparée dans les unités de recherche **Laboratoire Charles Fabry** (*Université Paris-Saclay, Institut d'Optique Graduate School, CNRS*) et **Laboratoire Nanotechnologies Nanosystèmes** (*LN2-IRL3463, CNRS, Université de Sherbrooke, Université Grenoble Alpes, École Centrale de Lyon, INSA Lyon*), sous la direction de **Michael CANVA**, directeur de recherche au CNRS, la co-direction de **Paul CHARETTE**, professeur de l'Université de Sherbrooke, le co-encadrement de **Julien MOREAU**, maître de conférences de l'Université Paris-Saclay, **Laurence CONVERT**, professionnelle de recherche à l'Université de Sherbrooke.

Thèse soutenue à Paris-Saclay le 20 décembre 2024, par

Coline Beltrami

Composition du jury

Membres du jury avec voix délibérative

Thierry LIVACHE

Directeur de recherche EPST, CEA de Grenoble

Nordin FELIDJ

Professeur à l'Université Paris Diderot

Emmanuelle LAURENCEAU

Maître de conférences, Institut des Nanotechnologies de Lyon

Béatrice DAGENS

Directrice de recherche au C2N, Paris-Saclay

Nathalie FAUCHEUX

Professeure à l'université de Sherbrooke, Canada

Jean-François MASSON

Professeur à l'université de Montréal, Canada

Président

Rapporteur & Examineur

Rapportrice & Examinatrice

Examinatrice

Examinatrice

Examineur

Titre : Développement d'un biocapteur plasmonique pour la détection en faible concentration de miARNs dans le cadre du don d'organes.

Mots clés : Biocapteur, Imagerie de la résonance des plasmons de surface, miARN, chimie de surface, amplification du signal, nanoparticules d'or.

Résumé : La surveillance des conditions physiologiques de donneurs d'organes en état de mort cérébrale est cruciale pour prévenir la dégradation des tissus. Ce suivi peut être effectué en observant la réponse inflammatoire (tempête cytokinique) à travers le dosage de miARNs. Ce travail propose d'utiliser l'imagerie par résonance plasmonique de surface (SPRI) combinée à un protocole d'amplification par nanoparticules d'or pour détecter quantitativement des séquences spécifiques de miARNs à très faibles concentrations.

Pour réaliser cet objectif, une fonctionnalisation de la surface d'or de la biopuce a été développée afin d'améliorer l'accessibilité des récepteurs. Ces

récepteurs sous forme d'oligonucléotides ont été modifiés avec des bases LNA pour augmenter leur affinité avec les séquences cibles de microARN. En parallèle, une stratégie d'amplification du signal SPRI par sandwich de nanoparticules d'or a été conçue. Pour cela un protocole de synthèse en une seule étape à température ambiante a été optimisé. Ces nanoparticules sont fonctionnalisées pour être spécifiques vis-à-vis du microARN et très solubles en solution saline.

Ces approches combinées ont conduit à une amplification du signal de plus de deux ordres de grandeur et à une limite de détection de microARN dans la gamme du picomolaire.

Title : Plasmonic biosensor development for low-concentration detection of miRNAs in the context of organ donation.

Keywords : Biosensor, Surface plasmon resonance imaging, miRNA, surface chemistry, signal amplification, gold nanoparticles.

Abstract : Monitoring the physiological conditions of brain-deceased organ donors is crucial to prevent tissue degradation. This can be achieved by following the inflammatory response (i.e. cytokine storm) through specific biomarkers like miRNAs. This work proposes using Surface Plasmon Resonance Imaging (SPRI) combined with a gold nanoparticle amplification protocol to quantitatively detect specific miRNAs sequences at very low concentrations.

To achieve this objective, a chemical functionalization of the biochip's gold surface was developed to improve receptors accessibility.

These receptors are oligonucleotides modified with LNA bases that exhibit high affinity for the target miRNA sequences. In parallel, a strategy for amplifying the SPRI signal using gold nanoparticles was designed. A one-step synthesis protocol at room temperature was optimised. These nanoparticles are functionalised to be specific to the target miRNA and highly soluble in saline solution.

These combined approaches resulted in a signal amplification of over two orders of magnitude and a miRNA detection limit in the picomolar range.

Table des matières

Remerciements	1
Introduction générale	3
I Biodétection et plasmonique	7
I.1 Techniques de détection d'oligonucléotides	8
I.1.1 Techniques de séquençage et d'identification d'oligonucléotides	8
I.1.2 Biocapteurs	10
I.2 L'imagerie par résonance des plasmons de surface.	23
I.2.1 Principes physiques du phénomène de plasmons de surface.	23
I.2.2 Excitation des plasmons de surface	25
I.2.3 Méthode d'imagerie de la résonance des plasmons de surface	27
I.3 Fonctionnalisation de la biopuce	28
I.3.1 Détection en milieu contrôlé	28
I.3.2 Détection en milieu complexe.	30
I.3.3 Détection spécifique de miARNs	32
I.4 Méthode d'amplification du signal SPR	34
I.4.1 Amplification par augmentation de l'indice dans le milieu d'analyse	35
I.4.2 Utilisation de plasmons localisés	41
I.4.3 Combinaison des deux approches : amplification en volume et en surface	44
I.5 Fabrication de nanoparticules d'or fonctionnalisées.	46
I.5.1 Obtention de nanoparticules d'or.	47
I.5.2 Fonctionnalisation des nanoparticules d'or	52
II Système d'imagerie par résonance des plasmons de surface	57
II.1 Instrumentation.	58
II.1.1 Biopuce couplée par un prisme	58
II.1.2 Partie optique.	59
II.1.3 Système de fluidique	62
II.1.4 Régulation thermique	63
II.2 Bancs expérimentaux.	63
II.2.1 Banc angulo-spectral.	64
II.2.2 Banc Horiba.	67
II.2.3 Comparaison des systèmes	69
II.3 Mesure de cinétique d'interaction entre le biorécepteur et l'analyte en SPRI	73
II.3.1 Modèle de cinétique d'interaction du premier ordre	74
II.3.2 Traitement des images et obtention des cinétiques expérimentales	76

III Spécificité de la détection : fonctionnalisation de la biopuce et des nanoparticules d'or	79
III.1 Optimisation de la chimie de surface	80
III.1.1 Chimie cystéamine	80
III.1.2 Chimie MUA/MCH	81
III.1.3 Chimie mixte (Cystéamine/MCH)	82
III.1.4 Étude comparative	83
III.2 Modification du biorécepteur	99
III.2.1 Choix des séquences sondes pour la capture de miARNs	99
III.2.2 Étude expérimentale des sondes LNA	100
III.3 Obtention des nanoparticules d'or	102
III.3.1 Synthèse des nanoparticules d'or	103
III.3.2 Fonctionnalisation des nanoparticules	109
IV Amplification du signal SPRI par méthode sandwich	113
IV.1 Preuve de concept : amplification par la streptavidine	114
IV.1.1 Principe de fonctionnement de la méthode sandwich	114
IV.1.2 Résultats d'amplification expérimentaux	116
IV.2 Amplification du signal grâce à des nanoparticules d'or	119
IV.2.1 Hybridation direct des nanoparticules d'or	119
IV.2.2 Utilisation de nanoparticules d'or en sandwich	126
V Perspectives	137
V.1 Amplification du signal par nanostructuration de la biopuce	138
V.1.1 Simulation du champ plasmonique sur une biopuce nanostructurée	138
V.1.2 Fabrication et caractérisation des biopuces nanostructurées	139
V.1.3 Modification de la couche d'accroche	141
V.2 Hybridation photo-réversible du double brin	142
V.3 Récupération des biopuces par électrochimie	143
Conclusion générale	145
Annexe A : Simulations suivant le modèle de Rouard	151
Annexe B : Calcul des angles interne et externe	153
Annexe C : Protocoles de fonctionnalisation de la surface d'or	155
Annexe D : Protocole d'obtention de nanoparticules d'or fonctionnalisées	161

Remerciements

Pour commencer, je tiens à exprimer ma plus profonde gratitude à mes deux directeurs de thèse, Michael CANVA et Paul CHARETTE, pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce doctorat. Merci de m'avoir accompagnée, guidée et encouragée tout en me laissant la liberté d'explorer et de mettre en œuvre mes idées au cours de ces trois années enrichissantes.

Je souhaite également remercier chaleureusement Patrick GEORGES et Denis MACHON, respectivement directeur du Laboratoire Charles Fabry (LCF) et du Laboratoire Nanotechnologies et Nanosystèmes (LN2), pour leur accueil bienveillant, leur soutien administratif et leur disponibilité tout au long de ces années.

Mes remerciements vont également à Thierry LIVACHE, directeur de recherche au CEA, Nordin FELIDJ, professeur à l'Université Paris Diderot, Emmanuelle LAURENCEAU, maître de conférences à l'INL, Béatrice DAGENS, directrice de recherche au C2N, Nathalie FAUCHEUX, professeure à l'Université de Sherbrooke, et Jean-François MASSON, professeur à l'Université de Montréal, pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant de participer en tant que membres du jury de cette thèse. Leur expertise et leurs conseils ont été très appréciés.

Je remercie Laurence CONVERT, professionnelle de recherche au LN2, pour sa disponibilité constante, son écoute attentive et son aide précieuse tout au long de mon doctorat. Son soutien quotidien a été d'une grande valeur pour mener à bien mes travaux. Un grand merci à Jean-François BRYCHE, chargé de recherche au CNRS, pour son assistance inestimable en salle blanche, ainsi que pour sa disponibilité et sa générosité à échanger, même entre deux réunions. Surtout, je suis extrêmement reconnaissante à Julien MOREAU, maître de conférence à l'IOGS, dont l'aide inconditionnelle même à travers l'Atlantique, la patience et la bienveillance m'ont permis de réaliser cette thèse dans les meilleures conditions et avec des travaux autant aboutis.

J'aimerais ensuite remercier l'ensemble des ingénieurs, techniciens et chercheurs du Laboratoire Charles Fabry (LCF) ainsi que des plateformes partagées du 3IT pour leur aide précieuse et leurs conseils avisés tout au long de ma thèse. Leur expertise et leur disponibilité ont grandement contribué à la réussite de mes travaux. Merci à Walid, Jonathan et Julie pour nos discussions impromptues dans les couloirs, qui ont souvent permis de surmonter de nombreux obstacles au cours de ces dernières années.

Je remercie également tout le personnel administratif du Laboratoire Charles Fabry (LCF) et du Laboratoire Nanotechnologies et Nanosystèmes (LN2) pour leur aide, ainsi que les membres de l'école doctorale EOBÉ pour leur accompagnement tout au long de ces années. Un immense merci aux équipes Biophotonique du LCF et Plasmonique du LN2 pour leur accueil chaleureux et pour les discussions enrichissantes qui ont égayé les pauses repas. Leur sympathie inébranlable et leur convivialité ont été une véritable source d'énergie et de motivation. Merci à Nathalie, Frédéric, Camille, Lionel, Marc, Christophe, Arnaud, Thierry, Guillaume, Pauline, Marion, Marlo, Sarra, Chander², Raphael, Karl, Brad pour les bons moments passés à vos côtés, ce fut un réel plaisir de travailler avec vous.

Je souhaiterais remercier ma famille et mes amis pour leur soutien durant cette thèse. Un grand merci à mes parents et tout particulièrement à ma sœur, Ophélie, pour sa présence constante et son appui infaillible. Également, je remercie ma cousine, Margot, pour son support émotionnel sans faille et

sa bonne humeur, qui ont été d'un grand réconfort. Un grand merci à tous mes amis des deux continents, qui, malgré la distance, sont restés proches et présents à chaque étape de ce parcours.

Enfin, je tiens à remercier toutes les personnes que j'aurais oublié de mentionner, qui ont pu participer de près ou de loin, à la réussite de mon doctorat ces dernières années.

Introduction générale

Contexte

Actuellement, au Canada, la principale source d'organes transplantables provient des patients en état de mort cérébrale [1]. Cependant, même avec l'ajout des dons d'organes de donneurs vivants, l'offre reste insuffisante pour répondre à la demande croissante. Au-delà du nombre limité d'organes disponibles, d'autres facteurs contribuent à ce déséquilibre. En effet, environ 20% des organes potentiellement viables sont perdus en raison de leur dégradation rapide pendant les longues procédures cliniques qui suivent la mort cérébrale [2, 3]. Cette dernière compromet sérieusement la qualité et le nombre d'organes disponibles pour la transplantation, car elle déclenche une réponse inflammatoire intense, appelée tempête cytokinique [4], qui endommage les tissus [5]. Cette dégradation réduit non seulement la quantité d'organes utilisables, mais elle impacte aussi leur qualité : entre 7% et 13% des greffons sont perdus au cours de la première année [6] tandis que 15% à 40% des greffons présentent des dysfonctionnements à court ou long terme chez les receveurs [7, 8].

À l'heure actuelle, le suivi physiologique standard des donneurs en état de mort cérébrale, comme la surveillance de la fréquence cardiaque, du taux d'oxygénation ou de la pression artérielle, est associé à des traitements visant à réduire les effets néfastes de la tempête cytokinique. Parmi ces traitements, on trouve des thérapies hormonales combinées (dopamine, vasopressine), des injections de stéroïdes, voire des antibiotiques à large spectre [9, 10, 11]. Toutefois, ces traitements donnent des résultats mitigés, parfois contradictoires. Une comparaison de plusieurs essais cliniques randomisés a révélé qu'aucun de ces traitements, à l'exception d'une étude ayant montré une amélioration de la fonction hépatique, n'a significativement amélioré la récupération des organes, ni réduit les taux de rejet ou les dysfonctionnements des greffons [12]. Par conséquent, ces interventions sont souvent jugées inefficaces, car elles ne sont ni spécifiques ni adaptées à chaque patient. Cela met en lumière le besoin urgent de développer des traitements plus ciblés contre la tempête cytokinique, permettant de les ajuster en fonction de la progression de l'inflammation et de l'état du donneur.

Projet Epi Storm

Dans le cadre de ce besoin, le projet Epi-Storm prévoit de développer un appareil destiné à être utilisé au chevet des donneurs d'organes pour suivre en temps réel la réaction inflammatoire consécutive à la mort cérébrale. L'innovation de ce dispositif résiderait dans sa capacité à administrer un traitement immunosuppresseur personnalisé et adapté en temps quasi réel, tenant compte des données physiologiques du donneur ainsi que de ses antécédents médicaux. Cette approche permettrait d'augmenter le nombre d'organes disponibles pour la transplantation et, surtout, d'améliorer leur qualité en réduisant la saturation médicamenteuse. Cela favoriserait une meilleure acceptation et un fonctionnement optimal du greffon chez les receveurs. Le processus de don d'organes mobilise des domaines de recherche variés, tels que la médecine, la biologie et les sciences sociales. Il exige des ressources et des compétences diversifiées pour aboutir à des

résultats optimaux. Le projet Epi-Storm regroupe ainsi plusieurs équipes de recherche, intégrant toutes ces disciplines.

Sciences sociales

Un groupe de chercheurs en sciences sociales a pour but de sensibiliser au don d'organes les populations à risque. Au Canada, les maladies chroniques et les défaillances d'organes qui en résultent sont particulièrement fréquentes au sein des populations autochtones, notamment chez les Inuits. Bien que le besoin en organes et en transplantations soit important, ces communautés se montrent souvent réticentes à accepter une donation. L'équipe cherche principalement à recueillir des informations auprès des peuples Inuits, en collaboration avec une infirmière travaillant au sein de ces communautés. Cela permet non seulement de les sensibiliser à la procédure du don d'organes, mais aussi d'adapter la conception et l'implantation du dispositif médical final à leur contexte culturel et environnemental.

Médicale

Cette équipe multidisciplinaire, composée de médecins, biologistes, cliniciens et immunologistes, est responsable du suivi clinique des donneurs d'organes. En analysant régulièrement des prélèvements sanguins, ils ont créé une base de données des différents micro-ARNs (miARNs) corrélés à l'apparition et à l'évolution de la tempête cytokinique [13]. Les miARNs sont de très petits brins d'ARN non codants, mesurant entre 20 et 25 nucléotides, qui jouent un rôle essentiel dans la régulation des gènes et donc la production de protéines. Cette année, Victor Ambros et Gary Ruvkun ont été récompensés par le prix Nobel de médecine pour leur découverte de ces molécules, qui sont fondamentales dans la régulation de la production de protéines chez de nombreux animaux [14, 15]. Un dysfonctionnement de ce processus peut entraîner des maladies graves, telles que le cancer, le diabète, l'auto-immunité, ou encore la tempête cytokinique, dans le contexte de notre projet. L'objectif de ce dernier est donc de suivre en temps réel la concentration de ces biomarqueurs inflammatoires dans le sang des donneurs, afin d'optimiser la gestion du processus de don et de transplantation d'organes.

Mathématiques et informatique

L'optimisation du traitement médical serait réalisée par un algorithme mathématique intelligent. Afin d'estimer la dose optimale d'immunosuppresseur à administrer au donneur, le dispositif de chevet serait couplé avec un algorithme d'apprentissage statistique. Cet algorithme prendra en compte divers facteurs cliniques, tels que le ou les organes à transplanter, les antécédents médicaux du donneur, ainsi que l'évolution en temps réel de la réaction inflammatoire, mesurée par un système de biocapteur. L'objectif est de prédire la dose minimale nécessaire pour atténuer les effets physiologiques de la réaction inflammatoire sur le donneur.

Ingénierie physique et chimique

Cette équipe est responsable du développement du système de détection des marqueurs inflammatoires, à travers la création d'un biocapteur. La technologie choisie pour cette détection est l'imagerie par résonance des plasmons de surface (SPRI), qui offre une analyse spécifique, sensible et quantitative des miARNs dans un temps court et sans marqueur. Cependant, il est essentiel d'optimiser cette technique pour la détection des miARNs à très faibles concentrations, et c'est précisément à ce niveau que mon projet de doctorat intervient.

Projet de doctorat

Mon projet doctoral s'inscrit dans le cadre de l'ingénierie du système de détection, en développant un biocapteur plasmonique et les biopuces associées pour le suivi des marqueurs de la tempête cytokinique. Les fondements de ce projet reposent sur des recherches antérieures menées au LCF (Laboratoire Charles Fabry) sur les biocapteurs à ADN [16, 17, 18, 19, 20, 21]. L'objectif est d'adapter et d'améliorer ces travaux antérieurs pour la détection de miARNs en faibles concentrations, en collaboration avec le laboratoire LN2 (Laboratoire Nanotechnologies et Nanosystèmes) au Canada, proche des porteurs du projet Epi Storm dans une équipe déjà impliquées avec les biocapteurs plasmoniques et la nanofabrication. Dans ce contexte, le développement du biocapteur doit prendre en compte différents critères. Tout d'abord, il doit être capable de détecter de manière quantitative, spécifique et simultanée plusieurs séquences de miARN prédéfinies par l'équipe médicale. De plus, les concentrations visées de ces miARNs étant extrêmement basses, avoisinant la centaine de femtomolaires, il faut trouver un système capable d'atteindre cette limite de détection dans des échantillons biologiques complexes comme le plasma sanguin. Un délai de trois heures est fixé par l'agence de la santé du Québec dans le cadre d'un donneur en mort cérébrale, au minimum une analyse doit être réalisée dans ce laps de temps afin de suivre la réaction inflammatoire chez le patient. Dans un objectif d'implémentation du dispositif directement au chevet du patient, il est primordial de concevoir un appareil pouvant être à la fois miniaturisable et simple d'utilisation par les équipes médicales.

La réalisation du doctorat a eu lieu dans le cadre d'une cotutelle internationale entre le Laboratoire Charles Fabry de l'Université de Paris Saclay et Laboratoire Nanotechnologies et Nanosystèmes, un laboratoire international de recherche (IRL) entre le CNRS et l'université de Sherbrooke (Canada). Cet IRL possède également d'autres tutelles : INSA de Lyon, l'École Centrale de Lyon (ECL) et l'université Grenoble Alpes (UGA). Il est hébergé par l'Institut Interdisciplinaire d'Innovation Technologique (3IT) de l'Université de Sherbrooke.

Ce manuscrit présente les différents travaux réalisés et résultats atteints au cours de cette thèse. La première partie débute par un état de l'art des méthodes de détection des séquences d'oligonucléotides, visant à justifier le choix de la SPRI. Les principes physiques sous-jacents à cette méthode de détection ainsi que son fonctionnement sont ensuite détaillés. Cet état de l'art se conclut par une présentation des diverses méthodes d'amplification du signal SPRI, notamment celles utilisant des nanoparticules d'or pour atteindre la limite de détection. La deuxième partie de ce manuscrit présente les deux instruments de SPRI utilisés durant cette thèse et compare leur performance. Le chapitre suivant se concentre sur l'amélioration de la spécificité de détection dans le cadre de la SPRI pour la détection de miARNs. Cela inclut le développement d'un nouveau protocole de chimie de surface pour optimiser l'affinité avec la cible, ainsi que l'obtention de nanoparticules d'or pour l'amplification du signal. Enfin, le dernier chapitre présente les résultats expérimentaux concernant l'amplification du signal SPRI par la méthode sandwich. Ces résultats sont comparés à un modèle théorique prédictif du facteur d'amplification, permettant d'évaluer l'efficacité de la stratégie adoptée.

Chapitre I

Biodétection et plasmonique

I.1	Techniques de détection d'oligonucléotides	8
I.1.1	Techniques de séquençage et d'identification d'oligonucléotides	8
I.1.2	Biocapteurs	10
I.1.2.1	Transduction par un signal électrique	11
I.1.2.2	Transduction par un signal optique	17
I.2	L'imagerie par résonance des plasmons de surface	23
I.2.1	Principes physiques du phénomène de plasmons de surface	23
I.2.2	Excitation des plasmons de surface	25
I.2.3	Méthode d'imagerie de la résonance des plasmons de surface	27
I.3	Fonctionnalisation de la biopuce	28
I.3.1	Détection en milieu contrôlé	28
I.3.2	Détection en milieu complexe	30
I.3.3	Détection spécifique de miARNs	32
I.4	Méthode d'amplification du signal SPR	34
I.4.1	Amplification par augmentation de l'indice dans le milieu d'analyse	35
I.4.1.1	Utilisation de molécules biologiques	36
I.4.1.2	Utilisation de nanoparticules	38
I.4.2	Utilisation de plasmons localisés	41
I.4.3	Combinaison des deux approches : amplification en volume et en surface	44
I.5	Fabrication de nanoparticules d'or fonctionnalisées	46
I.5.1	Obtention de nanoparticules d'or	47
I.5.1.1	Par voie chimique	47
I.5.1.2	Par voie physique	49
I.5.1.3	Par voie biologique	51
I.5.2	Fonctionnalisation des nanoparticules d'or	52

Dans ce premier chapitre, un état de l'art est réalisé autour des différentes méthodes de détection d'oligonucléotides, transférables à la détection des miARNs, en très faibles concentrations. Pour débiter, un comparatif des techniques de détection actuelles est effectué : techniques dites traditionnelles puis biocapteurs. La deuxième partie se concentre sur l'imagerie par résonance des plasmons de surface (SPRI), qui est la méthode de détection choisie pour ce projet. On commence par définir le phénomène physique de résonance des plasmons de surface, pour finir par décrire leur utilisation pour de la biodétection et les avantages d'utiliser de l'imagerie. Afin d'être spécifique, cette méthode de détection nécessite une étape de fonctionnalisation de surface. Différentes approches sont présentées et explicitées en fonction des besoins : milieu contrôlé ou milieu complexe, ainsi que la détection spécifique d'ARNs. Ensuite, différentes méthodes d'amplification pour la détection de miARN en faibles concentrations sont listées et comparées pour une utilisation compatible avec la SPRI. Notamment, l'utilisation de nanoparticules d'or est mise en avant et ses avantages énumérés. C'est la solution choisie pour ce travail de thèse et la dernière partie de ce chapitre porte sur la fabrication et la fonctionnalisation de ces nanoparticules.

I.1. Techniques de détection d'oligonucléotides

Depuis des décennies, l'étude des chaînes de nucléotides qui forment les brins d'ADN et d'ARN est un sujet majeur de la recherche biologique et médicale. Lors de la division cellulaire, de nombreux défauts peuvent apparaître dans la séquence, tels que des substitutions, des insertions ou des délétions de bases. Ces dommages dans la chaîne, s'ils ne sont pas réparés automatiquement par les cellules, peuvent conduire à des mutations génétiques puis finalement au développement de maladies (par exemple un cancer).

Pour cette raison, grand nombre de scientifiques à travers le monde se sont lancés dans une course à l'amplification et l'identification des bases ADN la plus rapide et la moins onéreuse afin d'étudier l'information biologique contenue dans cette chaîne. Historiquement, la première méthode de détection de la composition des brins d'ADN est le séquençage. Ce dernier est le processus qui consiste à déterminer l'ordre des bases nucléiques A, C, G et T (A, C, G et U pour l'ARN en simple brin) dans l'un des deux brins qui constituent une double hélice d'ADN [22, 23]. Cette technique a permis dans un premier temps l'identification de tout le génome humain, comprenant six milliards de bases, finalisé en 2006. Par la suite, les génomes d'autres agents infectieux, de mammifères et de plantes ont également été séquencés dans leur totalité et sont accessibles sur des bases de données publiques.

Cette partie détaille d'abord toutes les méthodes de séquençage de brin d'ADN ou d'ARN. Puis grâce aux bases de données et à la synthèse de brin d'ADN devenue une technologie de routine, cela a permis le développement de différentes techniques de détection. Dans la suite, les biocapteurs pour la détection de simple brin, au centre de ce manuscrit, sont présentés ainsi que leur évolution corrélée avec l'apparition des nanotechnologies afin de les rendre plus sensibles.

I.1.1. Techniques de séquençage et d'identification d'oligonucléotides

C'est en 1953 que l'article de James Watson et Francis Crick dans la revue *Nature* révolutionne le monde de la biologie et de la médecine [24]. Pour la première fois, la structure hélicoïdale à double hélices de l'acide désoxyribonucléique (ADN) est démontrée et permet par la suite la

compréhension de l'ensemble du système génétique de tous les êtres vivants

Méthodes de séquençage

Les premières méthodes de séquençage apparaissent environ 25 ans après la découverte de l'ADN dans la littérature. Deux techniques sont développées dans le courant des années 70, celle de Maxam-Gilbert [25] et celle de Sanger [26]. La première utilise une méthode chimique dans laquelle les brins d'ADN sont marqués à une extrémité par un élément radioactif puis placés dans des tubes dans lesquels des réactifs viennent cliver spécifiquement après chaque type de base. Les fragments obtenus sont différenciés en fonction de leur taille par migration sur un gel d'acrylamide. Finalement, une lecture par autoradiographie des marqueurs permet de déduire la séquence de l'ADN. La deuxième méthode créée par Sanger apparaît quelques années plus tard et sera nommée la méthode "des fluorophores de quatre couleurs". Elle est basée sur la synthèse du brin d'ADN complémentaire par ADN polymérase. Celle-ci est une enzyme qui vient ajouter des dNTP (dATP, dGTP, dCTP et dTTP pour former la future base) complémentaires et également, de manière aléatoire et inconstante, des ddNTP. Ces derniers sont marqués par des fluorophores différents pour chaque base et arrêtent la polymérisation. La lecture des fluorophores sur les chaînes de tailles différentes permet de déterminer la séquence synthétisée puis par complémentarité la séquence originale. Cette méthode de séquençage est encore aujourd'hui très largement utilisée en laboratoire.

Ces deux techniques nécessitent beaucoup de manipulation des échantillons et des heures de travail en laboratoire avant d'obtenir un résultat. De plus, il est nécessaire d'avoir de grandes quantités de brins à analyser et elles requièrent donc une étape d'amplification par PCR (*polymerase chain reaction*). La PCR, méthode de purification et de clonage, peut également être considérée comme une méthode de séquençage de l'ADN car elle reproduit spécifiquement le complémentaire de la séquence ADN visée. Elle se déroule en trois étapes : la dénaturation (séparation des doubles brins en simple brin), l'hybridation (oligos primaires complémentaires aux régions extérieures de la séquence d'ADN à amplifier se lient à la cible) et l'élongation (synthèse de la séquence complémentaire entre les deux oligos primaires) [27, 28].

D'autres principes de séquençage basés sur la synthèse en temps réel existent. Par exemple, le pyroséquençage [29] utilise une amorce hybridée à l'ADN cible puis des ajouts séquentiels, toujours dans le même ordre et successivement, des différentes bases chacune marquées par un fluorophore différent. Le signal de bioluminescence n'est observé que si la base complémentaire est incorporée. La séquence peut ensuite être déduite de l'ordre d'incorporation des nucléotides qui ont donné un signal. Une autre technique, nommée *cyclic reversible termination* (CRT) [23] utilise le même principe mais les nucléotides complémentaires sont injectés en même temps, et possèdent en plus du fluorophore un groupe protecteur qui arrête la synthèse. Une fois la base déterminée, le fluorophore puis le groupe protecteur sont éliminés par une enzyme et le cycle de synthèse peut recommencer. Ces deux méthodes par synthèse évitent de trop manipuler les échantillons mais reste longue car une amplification est souvent nécessaire et le séquençage se fait base par base.

Le séquençage par l'exonucléase apporte une solution qui n'oblige pas d'amplification et peut se faire en temps réel [30]. La première étape est la transcription du brin d'ADN par incorporation de nucléotides fluorescents à l'aide d'une ADN polymérase. Il est ensuite fixé sur un support puis circule dans un microcapillaire où il est digéré par une exonucléase. Cette dernière libère

séquentiellement les nucléotides fluorescents et permet la lecture en temps réel de la séquence.

Méthodes de détection par le complémentaire

D'autres méthodes traditionnelles par hybridation d'acides nucléiques sur supports solides (membrane de nitrocellulose ou nylon) sont également très référencées dans la littérature. Le dot blot utilise de l'ADN ou ARN spotté directement sur la membrane. C'est une technique moléculaire de transfert d'ADN ou ARN par une sonde ADN marquée (fluorescence, radioactivité) [31]. D'autres dérivés de cette technique, le southern blot (détection d'ADN) et le northern blot (détection d'ARN) diffèrent par le fait que l'échantillon à analyser est transféré du gel de migration à la membrane après une séparation en fonction de la taille des oligonucléotides [32, 33]. Même si ces techniques nécessitent moins de manipulation de l'échantillon, très souvent une amplification reste nécessaire. Le southern et northern blot ont été les premières méthodes impliquant l'utilisation d'un simple brin immobilisé directement sur support solide et non plus en solution. Ces techniques sont les précurseurs des biocapteurs plus récents (détaillés dans la partie suivante) et restent encore aujourd'hui deux techniques très utilisées en laboratoire.

Toutes ces techniques même si efficaces, sont contraignantes sur beaucoup d'aspects : toutes demandent une préparation en amont de l'échantillon (séparation des oligonucléotides de l'échantillon complexe), également une étape d'amplification et/ou de marquage, elles obligent de travailler en laboratoire avec du matériel spécifique et un environnement contrôlé pour éviter les contaminations. De plus, elles ne permettent pas de quantification en concentration ou en nombre des séquences cibles.

I.1.2. Biocapteurs

Comme souligné dans la partie précédente, les méthodes classiques permettent de séquencer des très longues séquences d'ADN mais demandent une étape d'amplification préalable, de traiter l'échantillon en amont et surtout ne donnent pas de quantification des brins d'ADN/ARN présents dans l'échantillon. Lorsque l'on souhaite détecter de courtes séquences d'ADN ou d'ARNs, une autre stratégie est de se tourner vers l'étude des biocapteurs pour s'affranchir de ces inconvénients. Ils sont très bien connus dans la littérature : leur fabrication ainsi que leur utilisation sont bien maîtrisées. Le premier biocapteur a été inventé dans les années soixante par Clark et Lyons afin de mesurer la concentration d'oxygène dissous dans le sang à l'aide d'électrodes [34]. Ils ont l'avantage d'être à la fois sensibles et spécifiques à l'analyte tout en étant facilement réalisables et maniables.

Un biocapteur est défini comme un dispositif capable de mesurer des réactions biologiques ou chimiques en générant un signal proportionnel à la concentration d'un analyte cible. Il peut être décomposé en cinq éléments distincts : l'**analyte** (substance d'intérêt à analyser), le **récepteur biologique ou biorécepteur** (une molécule qui va reconnaître spécifiquement l'analyte), le **transducteur** (élément qui convertit une forme d'énergie sous une autre), l'**électronique** (traite le signal) et enfin l'**affichage** (souvent un ordinateur qui affiche une courbe ou des valeurs numériques) [35]. Dans le cadre de la détection d'oligonucléotides, le principe général est le suivant (figure I.1 ci-dessous) : la première étape est l'immobilisation d'une couche de sondes (oligonucléotides à simple brin agissant comme biorécepteur) sur la surface du transducteur. Cette sonde permet dans une deuxième étape, la reconnaissance de sa cible complémentaire (l'analyte) pour former un complexe à doubles brins en forme d'hélice (hybridation). Finalement,

le transducteur convertit ce signal d'hybridation en un signal mesurable. Cette transduction peut

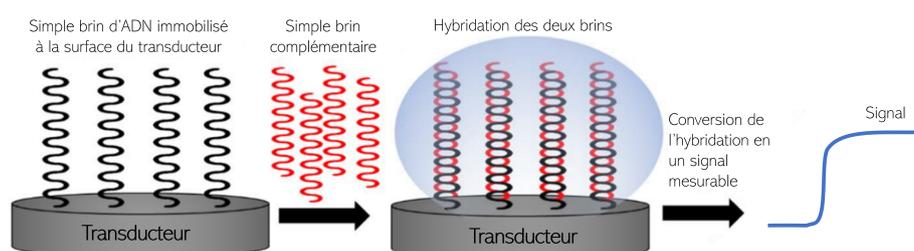


FIGURE I.1 – Schéma de principe illustrant le principe d'un biocapteur pour la détection d'oligonucléotides

avoir lieu suivant différentes méthodes : piézoélectrique [36], acoustique [37], colorimétrique [38], optique [39] ou électrique [40]. Pour la détection d'oligonucléotides, les méthodes les plus couramment utilisées sont la conversion de l'hybridation en un signal optique ou électrique.

I.1.2.1. Transduction par un signal électrique

Un biocapteur électrochimique combine la reconnaissance d'éléments biologiques par un transducteur sous la forme d'une électrode [41]. Beaucoup se basent sur le fait que les interactions biologiques entre deux brins d'ADN en solution peuvent produire ou consommer des ions ou des électrons, ou nécessitent l'utilisation d'un marqueur chimique permettant cette consommation. Cela va conduire à une modification des propriétés électriques de la solution [35]. Ces interactions sont converties en un signal électrique détectable et proportionnel à la concentration de cible en solution. Le principe est le suivant : une sonde monobrin d'acide nucléique est accrochée sur le socle qui permettra la transduction du signal par un courant électrique (une électrode de travail ou des particules en solution), l'hybridation avec le brin complémentaire provoque l'apparition de la réponse électrochimique spécifique d'un marqueur ou d'une réaction chimique. Il existe trois catégories de biocapteurs électrochimique : impédimétriques, ampérométriques et voltamétriques.

Biocapteurs impédimétriques

Ils sont également connus sous le nom de capteurs par spectroscopie d'impédance électrique ; utiles pour déterminer les caractéristiques capacitives et résistives des éléments étudiés. Ce système est basé sur l'excitation de l'environnement par un courant alternatif sinusoïdal de faible amplitude. Ce courant est modulé sur une large gamme de fréquences pour obtenir le spectre d'impédance [42]. Utilisés dans beaucoup de domaines, notamment dans la reconnaissance d'acides nucléiques sur des électrodes de graphène ou d'or poreux, ils ont une gamme de détection allant jusqu'au nanomolaire sans système d'amplification.

Zhao et al. ont réussi en 1999 à mettre en avant la différence de signal reçu si une électrode d'or était fonctionnalisée avec une couche de simples brins ou doubles brins d'ADN [43]. Également, *Gao et al.* ont démontré la possibilité de mettre le monobrin servant de biorécepteur en sandwich entre l'électrode de travail en or et un feuillet de graphène : montrant par spectroscopie d'impédance l'augmentation du signal lors de l'incubation des feuillets sur l'électrode (figure I.2) [44]. Lors de l'hybridation de ce biorécepteur avec la cible complémentaire, le feuillet de

graphène, lié plus faiblement, est relâché en solution générant ainsi une baisse du signal (mesurer par voltamétrie cyclique, principe expliqué dans la section suivante).

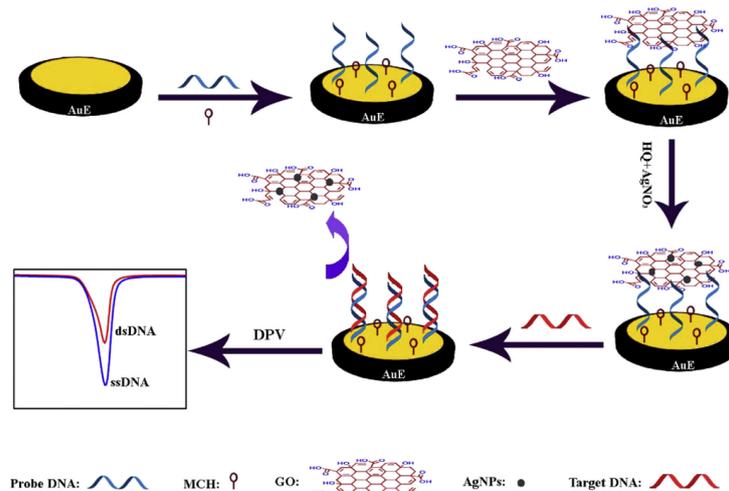


FIGURE I.2 – Figure illustrant le principe de fonctionnement d'un biocapteur électrochimique, couplant une électrode en or et un feuillet de graphène fonctionnalisé, pour la détection de simples brins d'oligonucléotides. Figure de l'article de *Gao et al.* [44]

Utilisant cette fois-ci le graphène comme électrode et des sondes monobrin sous forme d'épingle (figure I.3). *Bonanni et al.* ont réussi à montrer qu'il était possible non seulement de détecter l'hybridation avec le complémentaire mais également de le différencier d'une séquence mutée comprenant une mutation de base au sein de sa séquence [45]. Cette nouvelle électrode a permis de descendre la limite de détection en concentration de simples brins d'ADN à 7 pM et la distinction entre WILD et MUTANT à 82 pM.

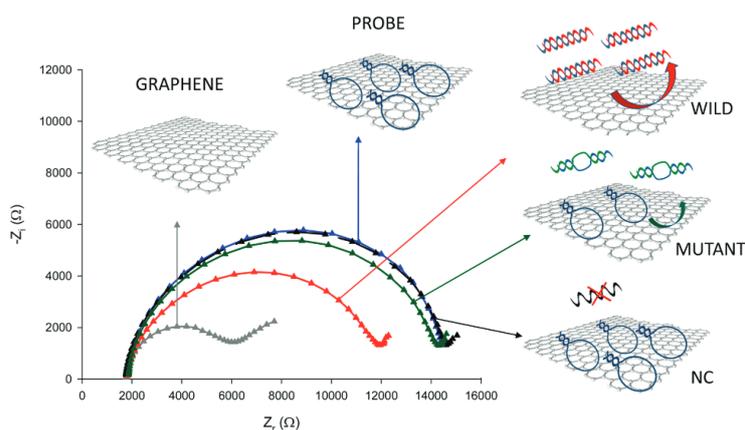


FIGURE I.3 – Principe de fonctionnement d'un biocapteur électrochimique par spectroscopie d'impédance pour la détection de simples brins d'oligonucléotides non mutés (WILD) et mutés d'une base (MUTANT). Figure de l'article de *Bonanni et al.* [45]

Biocapteurs ampérométriques

Ils sont basés sur la mesure du courant en comparant le voltage d'une électrode de travail avec celui d'une électrode de référence [41]. Le courant mesuré à l'électrode de travail est causé par électrolyse, se produisant par oxydation ou u réduction électrochimique. Ce courant d'électrolyse

est limité par le taux de transfert de masse de la molécule vers l'électrode [46]. Ce type de biocapteur électrochimique permet la discrimination à une base près en utilisant une réaction chimique de réduction qui ne peut avoir lieu que si deux sondes sont complètement hybridées sur le brin d'ADN cible [47]. Utilisant un principe similaire, il est connu en ampérométrie que la guanine (base G) dans les chaînes d'oligonucléotides présente un pic d'oxydation à 0,7 V [48]. Wang *et al* ont créé des sondes ADN dans lesquelles les bases de guanine sont remplacées par des inosines oxydables [49]. Ce substitut forme préférentiellement une paire de bases avec la cytosine (base C) et son signal d'oxydation est bien séparé de celui de la guanine. De ce fait, lors d'une expérience en chronoampérométrie (potentiel de l'électrode de travail échelonné et surveillance du courant en fonction du temps) le pic d'oxydation de la guanine est seulement présent lorsque la cible s'est hybridée sur la sonde.

Ce genre de biocapteur électrochimique est également utile pour détecter l'hybridation de brins complémentaires dans des configurations de type « sandwich moléculaire ». Le sandwich moléculaire contient un rapporteur électrochimique permettant soit de donner directement un signal électrochimique (méthylène bleu)[50] ou de permettre l'activation d'une réaction chimique (hydrolyse) libérant des électrons donnant à leur tour un signal mesurable [51]. Ces biocapteurs permettent la détection de mutation à une base près dans des milieux semi-complexe (ajout de BSA (*bovine serum albumine*)) et atteignent une sensibilité de détection de simples brins de l'ordre de quelques picomolaires.

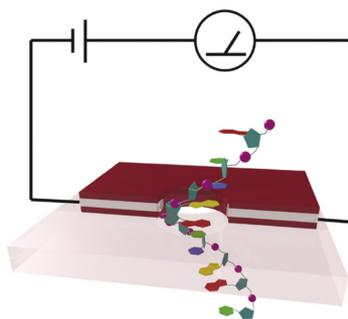


FIGURE I.4 – Schéma de fonctionnement d'un nanopore dans le cadre de la détection et du séquençage de brins d'ADN. L'identification du nucléotide se fait grâce au courant généré lors du passage dans le nanopore. [52]

Une catégorie émergente de biocapteurs électrochimique utilisée dans la détection de brin d'ADN sont les nanopores, leur fonctionnement est schématisé sur la figure I.4. Ils peuvent détecter des modifications, des dommages, ou même des mutations dans la chaîne de nucléotides [22, 23, 53]. Il n'est pas nécessaire d'amplifier l'échantillon au préalable ni d'utiliser des marqueurs. Ils sont très flexibles, devenus peu coûteux et ont de grandes plages de lecture. Leur principe est basé sur le fait que chaque base nucléique génère un courant différent en passant au travers du nanopore fournissant ainsi les informations correspondantes de la séquence [54] et permet l'identification de séquences spécifiques [55]. Ce genre de biocapteur peut être classé dans l'électrochimie du fait du courant mesuré en sortie. Cependant, le nanopore est utilisé en tant qu'électrode (transducteur) et aucun biorécepteur n'est utile ce qui simplifie le processus de détection en enlevant l'étape de chimie de surface. La géométrie demandée et de ce fait le procédé de fabrication reste le point bloquant : les nanopores sont encore un peu grands, de ce fait, plusieurs nucléotides peuvent passer en même temps au travers du trou ce qui complique la détermination de la séquence.

Biocapteurs voltamétriques

Cette méthode mesure le courant ou le potentiel entre deux électrodes (travail et référence), qui à leur tour dépendent des modifications de leur potentiel électrochimique dues à la fixation ou non de la cible sur leur surface. Ces biocapteurs sont basés sur le suivi du courant à mesure que le potentiel varie afin d'obtenir un voltammogramme (ou voltampérogramme) qui suit l'activité d'un rapporteur (lié à la concentration en cibles) en fonction du potentiel de l'électrode de travail [41]. L'expérience consiste à suivre le potentiel redox de marqueurs placés en bout de chaîne de l'acide nucléique servant de biorécepteur (principalement des simples brins d'ADN sous forme d'épingle). L'hybridation va venir modifier l'emplacement du marqueur vis-à-vis de l'électrode et donc l'intensité de sa réponse électrochimique. Les plus mentionnés dans la littérature sont le bleu de méthylène [56, 57] et le ferrocène [58, 59, 60]. Deux configurations de biocapteurs sont possibles : «signal-on» et «signal-off».

Dans le premier cas, lors de l'hybridation, la sonde se déplie et le marqueur redox se retrouve plus proche de la surface de l'électrode (figure I.5). Dans ce cas de figure «signal-on», le signal obtenu est plus fort après hybridation.

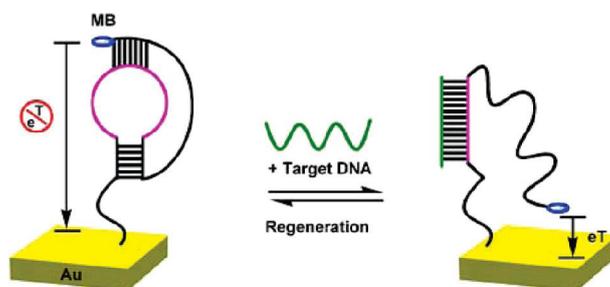


FIGURE I.5 – Figure illustrant le principe de fonctionnement d'un biocapteur électrochimique en configuration «signal-on» pour la détection de simples brins d'oligonucléotides. Figure de l'article de *Xiao et al.* [60]

Inversement, en configuration «signal-off», en l'absence de cible, la structure en épingle de la sonde ADN maintient le marqueur redox à proximité de l'électrode, produisant un courant faradique important. La configuration «signal-off» a permis de baisser la limite de détection d'un ordre de grandeur : passant du nanomolaire à la centaine de picomolaire. L'hybridation avec sa cible complémentaire induit un changement de conformation important dans cette structure d'ADN confinée en surface, ce qui vient modifier considérablement la distance de transfert des électrons entre l'électrode et le marqueur en éloignant ce dernier de la surface (figure I.6). Dans ce cas-ci, le courant mesuré par voltamétrie cyclique après hybridation est plus faible qu'avant la formation du double brin.

Cette méthode d'électrochimie permet comme les autres de détecter des mutations dans la séquence. Plusieurs équipes ont utilisé des sondes modifiées pour gagner en discrimination entre le WILD et la MUTANT : simple brin d'ADN modifiés avec des nanoparticules [61], sondes hybrides ADN/LNA (locked nucleic acid) [62] ou des nanoparticules d'or fonctionnalisées avec de l'ADN [63].

Également, il est possible en électrochimie de venir détecter plusieurs cibles lors d'une même expérience grâce à l'utilisation de plusieurs marqueurs redox. *Wang et al* ont réalisé la détection de trois cibles d'ADN différentes à l'aide de différents marqueurs redox composés de nanoparticules

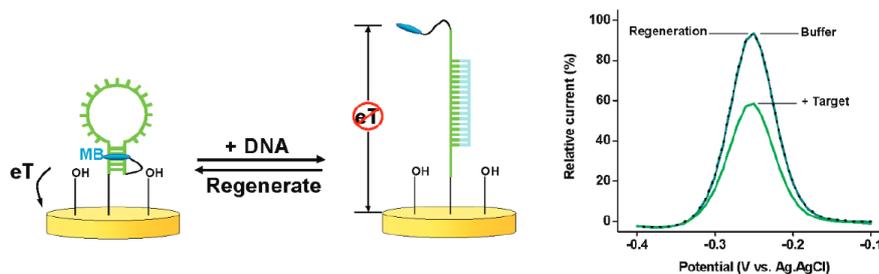


FIGURE I.6 – Figure illustrant le principe de fonctionnement d'un biocapteur électrochimique en configuration «signal-off» pour la détection de simples brins d'oligonucléotides. Figure de l'article de *Lubin et al.* [56]

de semi-conducteurs immobilisés sur une sonde ADN de signalisation [64]. La première étape de leur expérience consiste à hybrider les différentes cibles sur des nanoparticules magnétiques fonctionnalisées avec les complémentaires. Ensuite, d'autres brins accrochés sur les nanoparticules de semi-conducteurs (potentiels redox différents) viennent s'accrocher sur le complexe (par complémentarité avec la partie libre des cibles) (figure I.7). Grâce à cette méthode en sandwich, trois signaux électrochimiques différents sont émis en fonction du marqueur qui s'accroche. De plus, l'intensité de chaque pic est directement reliée à la quantité de cibles qui s'est hybridée.

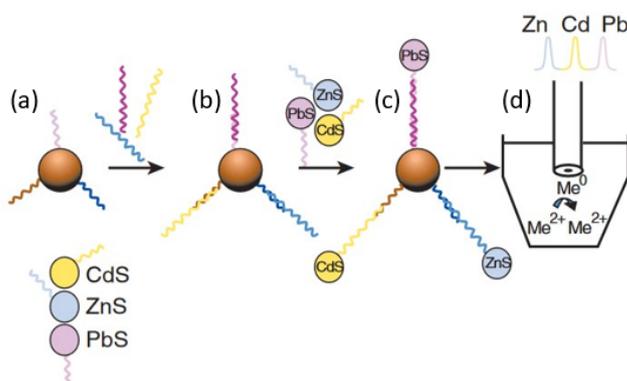


FIGURE I.7 – (a) Nanoparticule magnétique (NPM) fonctionnalisée. (b) Hybridation des cibles ADN sur la NPM. (c) Hybridation en sandwich des NP de semi-conducteurs sur les bases libres de la cible. (d) Lecture électrochimique des différents signaux donnés par les NP de semi-conducteurs en fonction des cibles détectées. Figure de l'article de *Wang et al.* [64]

Une autre technologie émergente qui peut être combinée avec de la détection par électrochimie sont les polymères à empreintes moléculaires (MIP pour *molecularly imprinted polymers*) [65]. Ils sont constitués de matrices artificielles composées de polymères jouant le rôle de zone de concentration et de capture spécifique. Dépendamment de l'analyte (fonctionnalité, forme, charge), ces polymères imprimés en s'y liant subissent des changements dans leurs propriétés : absorbance, conductivité, indice de réfraction ou masse [66]. *You et al.* ont réalisé un biocapteur formé d'une électrode en MIP supportés par des nanotubes de carbone capable de différencier des séquences riches en guanine (base G) des autres (figure I.8).

Cette nouvelle approche permet de ne plus utiliser de marqueurs afin de venir détecter des simples brins d'ADN. Ces MIP comportent de nombreux avantages, notamment une bonne réutilisation

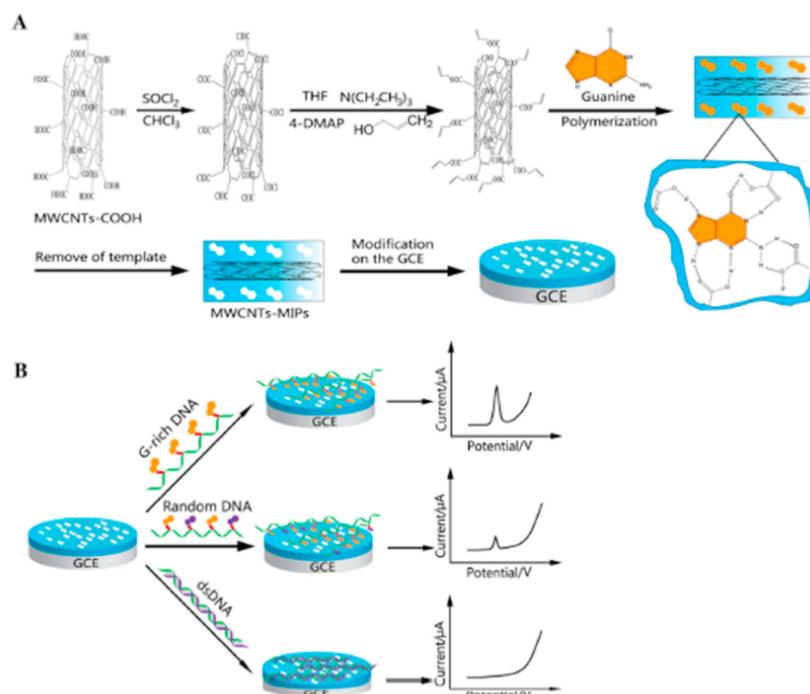


FIGURE I.8 – (a) Illustration du procédé de fabrication des polymères à empreintes moléculaires (MIP). (b) Schéma de fonctionnement des MIP pour la détection d'ADN double brins[65]

grâce à leur forte stabilité thermique (résistant à l'autoclave jusqu'à 120°C), résistance mécanique ainsi que chimique (environnement basique ou acide, utilisation de solvant). Ils sont également très sélectifs en milieu contrôlé comparés à d'autres matrices biologiques. Leur synthèse est simple, directe (peu d'étapes) et devenue peu coûteuse au fur et à mesure des années. Cependant, seul un faible pourcentage ($\approx 10\%$) des sites imprimés ont une bonne sélectivité et affinité [67]. De plus, certaines barrières technologiques restent toujours d'actualité. Par exemple, l'affinité entre le polymère utilisé pour la formation des sites de capture et les bases de l'ADN modèle reste à optimiser afin qu'elle ne soit ni trop forte (ADN resterait bloqué) ni trop faible (empreinte pas assez spécifique). L'analyse en milieu complexe avec ce type de détecteur est également très difficile pour le moment dû à de fortes interactions non spécifiques.

En conclusion, l'électrochimie pour la détection de simples brins d'acides nucléiques est une technique très largement développée et continue de s'améliorer. Plusieurs appareils basés sur cette méthode sont commercialisés. La détection par une méthode électroanalytique permet d'être à la fois sensible et spécifique en y ajoutant la composante de biorecognition ciblée. Cette fusion a permis de rendre ces capteurs peu onéreux du fait de leur facilité de construction. Ils sont également accessibles d'utilisation et facilement miniaturisables. Cependant, pour obtenir une bonne sensibilité de l'ordre du dixième de nanomolaire, des sondes modifiées ou des nanoparticules sont déjà requises afin d'amplifier le signal. De plus, leur fonctionnement permet seulement la détection d'un seul type de molécule cible par électrode. Le multiplexage requiert l'utilisation de différents marqueurs : un pour chaque cible que l'on souhaite détecter ainsi que l'utilisation d'une électrode différente pour chacune.

I.1.2.2. Transduction par un signal optique

La biodétection optique peut se faire suivant deux approches : avec ou sans marqueur. Pour ces derniers le signal est principalement créé par l'interaction entre le transducteur fonctionnalisé et l'élément examiné. Dans le cas de l'utilisation de marqueurs, le signal optique est généré par un élément fluorescent, luminescent ou colorimétrique. Dans la suite, seuls les biocapteurs optiques par fluorescence et sans marqueur grâce à une onde évanescente seront détaillés.

Détection par fluorescence

Cette technique utilise une sonde ADN simple brin immobilisée sur le transducteur et la détection de l'hybridation du brin complémentaire peut être induite de différentes façons grâce à un marqueur fluorescent. Il est possible d'injecter une molécule fluorescente qui s'attache spécifiquement au double brin : historiquement le bromure d'éthidium [68] a été utilisé pour cette application, ainsi que l'acridine orange ou thiazole orange [69] qui sont moins nocifs. Ensuite, il suffit de mesurer l'intensité de la fluorescence par spectroscopie UV-Visible ; elle sera proportionnelle à la quantité de brins hybridés. Cette technique est encore très utilisée en laboratoire, beaucoup d'entreprises vendent des kits de fluorescence pour de la détection spécifique de brins d'ADN : Sigma, Thermo Fischer, Yaesen Biotechnology... Une autre alternative est l'utilisation de sondes ou de cibles marquées par un fluorophore qui s'allument ou gagnent en intensité lors de la formation du complexe [69, 70]. Ces deux types de biodétecteurs sont très efficaces pour des concentrations allant jusqu'au nanomolaire pour de la détection spectroscopique. Cependant, ces marqueurs fluorescents ne sont pas assez lumineux pour de la détection à faibles concentrations et subissent également du photo-blanchiment. Ce phénomène a lieu lorsque le marqueur perd sa particularité d'émettre de la lumière en raison de dommages chimiques ou de modification de liaisons covalentes dans la molécule par les photons absorbés (le passage de l'état excité à l'état stable peut avoir lieu par émission de photons ou par réaction photochimique qui va empêcher son retour à l'état stable : souvent causé par une réaction avec l'oxygène sous forme de radicaux libres). La photostabilité des marqueurs fluorescents est d'importance cruciale, car elle entraîne une perte irréversible de l'émission de lumière, ce qui limite la précision statistique de la détection [71, 72].

Pour palier ce problème, les progrès dans le domaine des nanotechnologies ont ouvert la voie pour une application des nanomatériaux en tant que fluorophores et *quencher* (molécule d'extinction de la fluorescence) [54]. On y retrouve la famille des *quantum dots* (QDs) : nanocristaux inorganiques présentant des propriétés optiques et chimiques uniques, mais une fabrication compliquée, plus performant que des fluorophores organiques classiques [73]. Des QDs de CdTe peuvent servir de marqueur fluorescent pour de la détection d'ADN. *Shen et al.* ont fabriqué des QDs de CdTe entourés de *GSH* dont la fluorescence peut être efficacement inhibée lors de l'ajout de samarium (Sm) dans la solution, devenant des ions Sm^{3+} se liant aux QDs. Ensuite, lors de l'ajout de l'ADN cible, celui-ci a une plus forte affinité avec les ions Sm^{3+} permettant leur dissociation du QD et le retour de la fluorescence [74]. L'intensité de la fluorescence est directement proportionnelle à la quantité de Sm^{3+} dissocié du QD, et donc d'ADN inséré en solution, donnant une limite de détection autour de 10 picomolaires.

Certains QDs peuvent également servir de *quencher* d'autres molécules fluorescentes : ils arrêtent leur émission de lumière. *Loo et al.* ont utilisé des QDs de carbone carboxylique (*cCQD*) afin d'arrêter la fluorescence du FAM (fluorophore très communément utilisé en biologie) greffé en

bout du biorécepteur d'ADN (figure I.9). Le principe de cette détection est basé sur le fait que le biorécepteur simple brin a une grande affinité avec la surface du *cCQD* et vient s'y adsorber. Ensuite, lors de l'ajout du complémentaire ADN en solution, le biorécepteur préfère

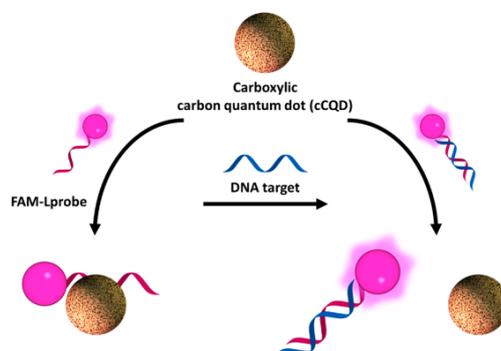


FIGURE I.9 – Illustration du principe de détection de simple brin d'ADN grâce à des *cCQD*s qui inhibent la fluorescence d'une sonde ADN marquée par un fluorophore FAM. Figure de l'article de *Loo et al.* [75]

s'hybrider avec cette cible et se dissocie du *cCQD* : la fluorescence du FAM se retrouve libérée et la solution se colore [75]. Ces *cCQD* permettent la détection de simple brin d'ADN jusqu'à quelques centaines de picomolaire. D'autres QDs en *CdTe* ont été utilisés par *Sun et al.* en tant que sondes ADN fluorescentes, dans des systèmes complexes d'origamis d'ADN, s'allumant lors de l'accrochage de son complémentaire. Cependant, ce système fluorescent est combiné avec de la détection par électrochimie donnant lieu à des biocapteurs électro-chimiluminescents du fait des échanges d'électrons lors du processus de luminescence des QDs qui devient dans ce cas un amplificateur du signal électrochimique permettant d'atteindre une limite de détection de l'ordre de la centaine d'attomolaire [76].

Les nanoparticules métalliques peuvent également servir en tant que fluorophore et *quencher*. Les nanoparticules d'or (AuNPs) sont employées en tant que *quencher* de la fluorescence d'autres molécules. *Ma et al.* les ont utilisées afin de différencier des complexes simple brin et double brins (chacun marqué par un fluorophore organique différent) avec une limite de détection autour de 330 picomolaires (figure I.10) [77].

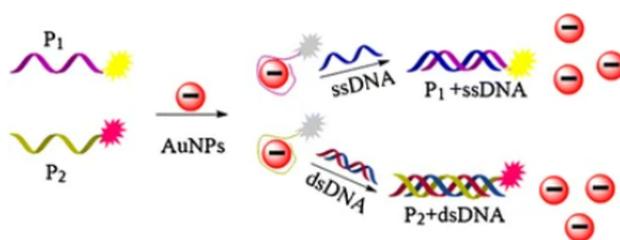


FIGURE I.10 – Illustration du principe de détection de simple brin d'ADN grâce à des AuNPs qui inhibent la fluorescence de sondes ADN marquées par des fluorophores pour différencier des simples brins et des doubles brins. Figure de l'article de *Ma et al.* [77]

Fu et al. ont également utilisé des AuNPs afin d'arrêter la fluorescence de nanoclusters d'argent stabilisés par de l'ADN pour la détection de la salmonelle par son aptamère (courtes

molécules d'ADN ou d'ARN simple brin qui peuvent se lier sélectivement à une cible spécifique : protéines, peptides, glucides, petites molécules, toxines et même des cellules vivantes) [78]. Grâce à l'utilisation de nanoclusters d'argent (AgNCs) comme fluorophores, *Liu et al.* ont réussi à déterminer l'endroit d'une mutation à l'intérieur d'un gène. Leur approche se base sur un phénomène de renforcement de la fluorescence lors du rapprochement de deux AgNCs formant ainsi un dimère de nanoclusters (NCD). Leurs travaux ont montré que l'intensité de la fluorescence est sensible à la distance entre deux AgNCs. Par conséquent, le NCD donne différentes intensités de fluorescence dépendamment de la distance entre le bout de l'ADN (premier AgNC) et la base mutée (deuxième AgNC) : ce signal diminue linéairement en nombre de bases lorsque la base mutée non appariée se déplace progressivement le long de la séquence [79]. Toujours avec des

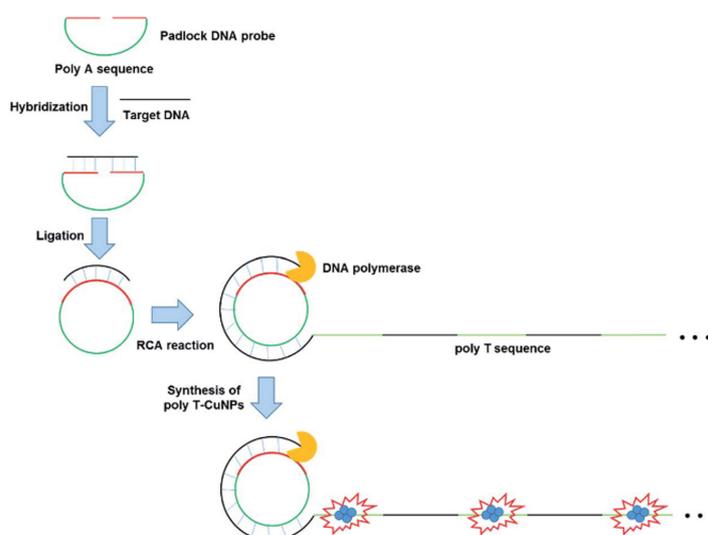


FIGURE I.11 – Illustration du principe de détection de simple brin d'ADN grâce à des CuNPs fluorescents intégrés dans un système de synthèse d'ADN en continu déclenché lors de l'hybridation entre le biorécepteur et la cible. Figure de l'article de *Park et al.* [80]

nanoparticules métalliques, *Park et al.* ont synthétisé des nanoparticules de cuivre fonctionnalisées avec un poly(T), afin de les intégrer dans un système plus complexe de synthèse en continu d'ADN après hybridation avec le simple brin d'ADN cible, faisant baisser la limite de détection dans la dizaine d'attomolaire (figure I.11) [80].

La détection par fluorescence de simples brins d'oligonucléotides continue de se moderniser et de gagner en sensibilité grâce à l'ajout de nanotechnologies permettant de passer au-delà des inconvénients des fluorophores organiques classiques. Cependant, cette méthode de détection reste relativement lente, avec des protocoles complexes ou combinés avec de l'électrochimie lorsque la limite de détection souhaitée est de l'ordre du picomolaire, ou en dessous. Se pose également la faisabilité de ces approches lors du passage d'un milieu contrôlé à l'analyse en milieu complexe.

Détection par ondes évanescentes

Avec cette technique de détection, la reconnaissance biologique et l'interaction subséquente se produisent dans les limites d'une onde évanescente. Au-delà d'un certain angle d'incidence, lorsque la lumière arrive sur l'interface entre son milieu d'entrée et un milieu ambiant d'indice de

réfraction inférieur, elle est entièrement réfléchi : c'est le phénomène de réflexion totale interne. Dans ce cas de figure, un champ électromagnétique, connu sous le nom d'onde évanescente, est généré au niveau de l'interface. Cette onde a la particularité de perdre en intensité de manière exponentielle à mesure qu'elle s'éloigne de l'interface. Sa profondeur de pénétration n'est que de quelques centaines de nanomètres dans le milieu externe.

Une onde évanescente peut être formée grâce au guidage de la lumière dans une fibre optique. Les biocapteurs basés sur cette configuration ont différents avantages : ils sont de petite taille, ils permettent une grande diversité de formes et de géométries du capteur et produisent peu de bruit de mesure [69, 70]. Différents biocapteurs ont été créés en fusionnant la géométrie et facilité d'utilisation des fibres optiques avec la sélectivité des biocapteurs fluorescents mentionnés précédemment [68, 69, 70]. Dans ces systèmes combinés, l'onde évanescente venant de la fibre optique vient exciter les fluorophores immobilisés à sa surface. Cette fluorescence est renvoyée par couplage dans la fibre pour être transmise en sortie au système de détection ou visualisée en direct. Encore une fois, des méthodes de détection sans marqueurs sont à privilégier pour plus de robustesse et moins de manipulation de l'échantillon dans le cas d'analyse d'échantillons biologiques. Suivant ces contraintes, il a été développé des biocapteurs par fibre optique qui permettent une détection directe des perturbations à la surface de la fibre : changement de fréquence, de phase ou d'intensité de la lumière en sortie. En utilisant l'approche de Young et des fentes, des mesures réfractométriques ont permis la détection d'hybridation de brins d'ADN à une concentration minimale de 50 nM [81]. Également, il est possible de détecter la formation de complexes d'acides nucléiques en utilisant une fibre optique microstructurée afin d'avoir un champ évanescent plus important au niveau des microstructures et donc une meilleure sensibilité de détection de l'ordre du nanomolaire [82]. Cette technique permet l'analyse d'échantillons de faible volume (300 μ L) et la possibilité de miniaturiser l'appareil pour le rendre portable. Ces techniques proposent des méthodes de détection sans marqueurs, utilisant des appareils de grande versatilité en termes de taille et de géométrie. Cependant, même avec la mise en place de méthode d'amplification, le seuil de détection ne descend pas en dessous du nanomolaire.

Une autre stratégie de détection d'oligonucléotides mettant en jeu une onde évanescente est la détection par résonance des plasmons de surface (SPR pour *surface plasmon resonance*) schématisée sur la figure I.12.

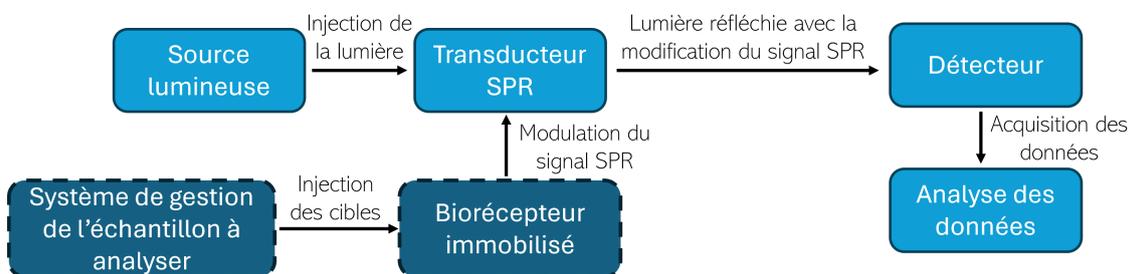


FIGURE I.12 – Diagramme illustrant le principe de fonctionnement d'un biocapteur SPR pour la détection de simples brins d'oligonucléotides

Ces derniers sont des ondes de surface générées à l'interface entre un métal et un diélectrique grâce aux électrons libres présents dans le métal, se couplant avec la lumière incidente. Cette technique permet la détection d'hybridation de brins complémentaires, avec à la fois une grande

sélectivité à une base près dans la séquence [16, 17] et une grande sensibilité dans une gamme qui s'étend du micromolaire au nanomolaire sans amplification du signal [41, 83, 84, 85]. Il est aussi possible de coupler cette approche avec de l'imagerie pour permettre un multiplexage avec la détection simultanée de plusieurs cibles [17]. Afin de baisser la limite de détection intrinsèque du système et passer en dessous du nanomolaire, différentes méthodes d'amplification in situ ou par modification du transducteur sont possibles. Par exemple, il est faisable d'utiliser des nanoparticules [86, 87], une réaction chimique [88], ou même de micro/nano-structurer la surface du transducteur [89] afin d'amplifier le signal de détection.

Dans la catégorie des biocapteurs plasmoniques, on retrouve aussi l'utilisation de nanoparticules (NP) métalliques, le plus souvent fabriquées en or pour des raisons de biocompatibilité lors de la détection d'oligonucléotides. En remplaçant le film d'or utilisé en SPR par une nanoparticule métallique, un autre mode plasmonique peut être excité : un plasmon de surface localisé.

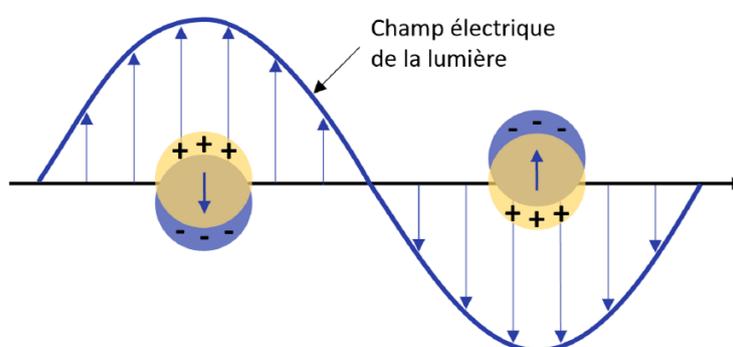


FIGURE I.13 – Illustration du déplacement des nuages d'électrons de particules métalliques sous l'effet du champ électrique de la lumière incidente. [90]

Du fait de leur taille très inférieure à la longueur d'onde d'excitation ($NP \leq 50nm$ dans le visible), tous les électrons du métal dans la particule voient la même phase de l'onde. Dans ce cas, ces électrons libres se déplacent et s'accumulent aux extrémités de la particule sous l'effet du champ électrique de la lumière incidente (figure I.13). Du fait de ce comportement dipolaire, ces nanoparticules peuvent être excitées de manière résonante, on parle alors de la résonance du plasmon de surface localisé (LSPR pour *Localized Surface Plasmon Resonance*). Pour des nanoparticules d'or en solution aqueuse cette résonance se trouve autour de 530 nm. Combinée à l'absorption intrinsèque de l'or dans le vert, cela va donner une couleur rouge à la solution. De la même manière si elles sont déposées en grande quantité sur un substrat, celui-ci apparaîtra rouge clair-rose à l'utilisateur. C'est sur ce principe que plusieurs biocapteurs sont basés.

Taton *et al.* ont développé un biocapteur colorimétrique composé d'une couche d'or sur laquelle est fonctionnalisé un simple brin d'ADN, le complémentaire vient s'y hybrider puis une nanoparticule s'hybride à son tour au bout du duplexe (figure I.14). Pour des fortes concentrations de cibles ($> 1nM$) l'hybridation des nanoparticules d'or suffit à faire changer le substrat vers une couleur rouge clair. Pour des concentrations inférieures, l'équipe a mis au point une méthode d'amplification avec la formation d'une couche d'argent autour des nanoparticules d'or changeant ainsi la couleur vers du gris/noir dépendamment de la concentration en cible ADN. Cette technique d'amplification a permis de baisser la limite de détection à 50 fM [91].

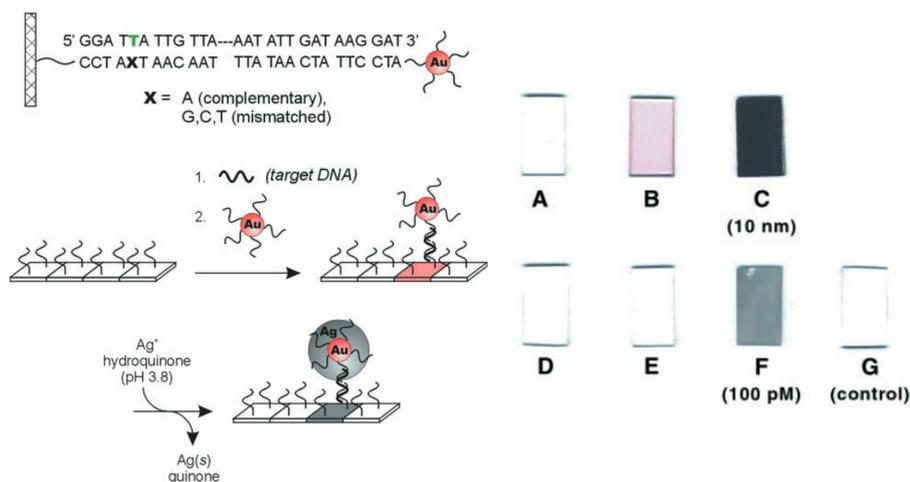


FIGURE I.14 – À gauche : représentation schématique du principe de détection d'oligonucléotides par colorimétrie en utilisant la LSPR de nanoparticules d'or. À droite : résultats colorimétriques avant et après l'étape d'amplification par la formation du couche d'argent autour de la nanoparticule d'or pour différentes concentrations de cibles ADN.

Figure d'origine de *Taton et al.* [91]

Sur un principe très similaire, *Elghanian et al.* ont réalisé un biocapteur colorimétrique utilisant plusieurs nanoparticules d'or : chacune est fonctionnalisée avec une partie complémentaire différente de la cible ADN. Lors de l'hybridation, cette technique entraîne la formation d'agrégats de nanoparticules d'or modifiant ainsi les conditions de résonance et donc la couleur observée de la solution : passant du rouge au bleu/violet lorsque la taille des agrégats augmentent [92].

Dans le cadre de cette thèse, pour répondre aux objectifs du projet Epi Storm qui est la détection multiple de miARNs à très faibles concentrations (≈ 100 femtomolaire), le biocapteur choisi doit être très spécifique, en plus d'être sensible, ainsi que permettre du multiplexage pour la détection en parallèle de plusieurs séquences. Le biocapteur doit également être utilisable dans des conditions de traitement minimal de l'échantillon biologique : analyser du sérum par exemple. Le temps de détection doit être réduit au maximum : on souhaite une mesure quantitative en concentration des miARNs en une heure maximum en comptant les temps d'initialisation et de calibration du biocapteur. Pour répondre à ces critères, une détection sans marqueur et un minimum de manipulation de l'échantillon sont souhaités. De plus, si la sensibilité intrinsèque du système n'est pas suffisante et qu'une étape d'amplification est nécessaire, il faut qu'elle soit rapide et faisable dans le même environnement que l'hybridation pour éviter les contaminations. Également, l'objectif à long terme, serait que l'appareil soit placé au chevet du patient et relié directement à une intraveineuse qui viendrait délivrer le sang à analyser. Pour répondre à ce besoin, le système de détection doit comporter un capteur facile à utiliser et à manipuler dans des conditions de vie réelle en dehors d'un laboratoire.

Afin de répondre à tous ces critères, autant sur le court que sur le long terme, le choix du système de détection s'est tourné vers les biocapteurs SPR, et plus précisément l'imagerie par résonance des plasmons de surface qui selon nos critères remplit au mieux les demandes.

I.2. L'imagerie par résonance des plasmons de surface

Au vu de l'état de l'art précédant, nous avons choisi l'imagerie par résonance des plasmons de surface (SPRI) comme méthode de détection dans le projet Epi-Storm. L'expertise sur le sujet au LCF permet une grande maîtrise de la technique et celle-ci répond à tous nos besoins : détection spécifique et sensible, facilité d'utilisation avec peu de manipulation de l'échantillon (on peut injecter, détecter, amplifier in situ dans le banc SPRI), circuit fermé afin d'éviter les contaminations (chambre fluide étanche et biocompatible, système de fluide imperméable à l'extérieur), détection en un temps court (< 1 heure) sans utilisation de marqueurs, visibilité de l'échantillon avec une caméra pour détecter plusieurs cibles à la fois et possibilité de miniaturiser l'appareil pour une utilisation hors laboratoire au chevet du patient.

Cette partie débutera en introduisant plus en détails la notion de plasmon de surface, ainsi que le phénomène de résonance qui leur ait associé. Par la suite, nous verrons comment tirer profil de cette onde évanescente en imagerie et tout particulièrement dans le domaine de la biodétection.

I.2.1. Principes physiques du phénomène de plasmons de surface

C'est en 1902 que R.W. Wood fait part de la première recherche documentée mentionnant les ondes plasmoniques de surface [93]. Ce dernier a éclairé un réseau de diffraction métallique avec de la lumière blanche et a constaté des anomalies dans le spectre de diffraction sous la forme de bandes sombres étroites. Ce n'est que quelques dizaines d'années plus tard que des travaux théoriques menés par U. Fano ont permis de définir ces anomalies [94] et seulement en 1952 que D. Bohm et D. Pines ont introduit les plasmas d'électrons, qu'ils appelèrent un plasmon, dans un solide métallique pour expliquer les pertes d'énergie [95]. Aujourd'hui, ce type d'excitation est plutôt qualifié de « plasmon de volume ». Le terme de « plasmon de surface » fut présenté par R. Ritchie en 1957 après extension des travaux de D. Bohm et D. Pines aux interfaces métalliques [96]. Puis, c'est seulement dix ans plus tard, qu'Otto et Kretschmann ont chacun reporté la même année comment exciter cette onde de surface suivant des configurations expérimentales simples [97]. Le premier détecteur d'interactions biomoléculaires basé sur l'utilisation de la résonance des plasmons de surface fut réalisé par Liedberg en 1983 pour détecter la liaison entre un antigène et son anticorps complémentaire [98].

Un plasmon de surface propagatif ou *surface plasmon polariton* (SPP) est dû à une excitation optique à l'interface entre un premier milieu possédant une permittivité négative ainsi que des porteurs de charges libres (électrons dans un métal) et un second milieu de permittivité positive (milieu diélectrique). Cette onde de surface est caractérisée par une oscillation collective des charges surfaciques libres du métal. Plus précisément, c'est un mode électromagnétique guidé à l'interface entre deux milieux de permittivité opposée, présentant une fréquence propre [99] et un profil évanescent dans les deux milieux (figure I.15) perpendiculairement à l'interface.

Afin de déterminer mathématiquement les conditions d'apparition des plasmons de surface, définis précédemment comme un mode électromagnétique guidé, il est nécessaire de remonter aux équations de Maxwell qui décrivent la propagation de ce type d'onde. Dans cette partie, seuls les résultats intéressants relatifs à notre cas seront donnés : excitation du plasmon de surface à l'interface entre deux milieux de permittivité opposée. Le détail de ces calculs peut être trouvé dans de nombreux ouvrages [100, 101].

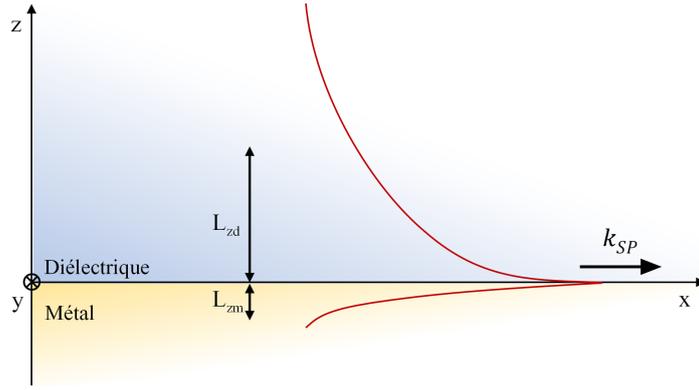


FIGURE I.15 – Profil illustrant l'amplitude de l'onde évanescente des plasmons de surface à l'interface entre un métal et un diélectrique. Le champ évanescent se propage de part et d'autre de l'interface suivant des longueurs de pénétration différentes : $L_{zd} > L_{zm}$

Cette excitation du mode électromagnétique des plasmons de surface ne peut avoir lieu que s'il y a couplage entre la projection sur la surface du vecteur d'onde du faisceau incident, noté k_x , polarisé transverse magnétique (TM), définit pour un angle θ et une longueur d'onde λ donnés, et le vecteur d'onde k_{sp} caractéristique du plasmon de surface. Dans une configuration de couplage par prisme, cela équivaut à dire que $k_{sp} = k_x$. Dans le cas d'un couplage par réseau, $k_{sp} = k_x + \Lambda$ avec Λ le mode du réseau.

D'après les équations de Maxwell et les lois de Snell-Descartes relatives à la propagation de la lumière à l'interface entre deux milieux semi-infinis, ces deux vecteurs d'ondes sont définis comme suit :

$$k_{sp} = \operatorname{Re} \left(\sqrt{\frac{\epsilon_m \times \epsilon_d}{\epsilon_m + \epsilon_d}} \right) \times \frac{\omega}{c} \quad (\text{I.1})$$

$$k_x = \frac{2\pi}{\lambda} \times n \sin \theta \quad (\text{I.2})$$

ω représente la pulsation angulaire et c la célérité de la lumière dans le vide. Dans la première équation, apparaissent également $\epsilon_m(\lambda)$ et $\epsilon_d(\lambda)$, qui sont respectivement les permittivités du métal et du diélectrique de chaque côté de l'interface. Ces grandeurs sont directement reliées à l'indice de réfraction du matériau :

$$n(\lambda) = \sqrt{\epsilon_x(\lambda)} \quad (\text{I.3})$$

La condition d'égalité des vecteurs d'onde et donc d'apparition d'un plasmon de surface, est ainsi réalisée pour un ensemble d'angles d'incidence $\theta(\lambda)$ à travers les dépendances en longueurs d'onde des permittivité des matériaux, en particulier celle du métal.

D'après la définition d'une onde évanescente donnée dans la partie I.1, sa diminution exponentielle perpendiculairement à l'interface (suivant z dans la figure I.15), exprimée en pratique par la profondeur de pénétration L , est très limitée que ce soit dans le métal (L_{zm}) ou dans le diélectrique (L_{zd}). Ces grandeurs correspondent aux distances dans lesquelles environ 90% du champ évanescent est présent. On considère que le plasmon de surface est sensible aux variations du milieu environnant uniquement dans cette épaisseur. D'autre part, les plasmons de surface étant propagatifs le long de l'interface, on peut définir une longueur de propagation du plasmon (L_x) qui est un facteur limitant en terme d'imagerie. Ces trois longueurs sont définies

comme suit :

$$L_x = \frac{c}{2\omega} \cdot \left(\text{Im} \sqrt{\frac{\epsilon_m \times \epsilon_d}{\epsilon_m + \epsilon_d}} \right)^{-1} \quad (\text{I.4})$$

$$L_{zm} = \frac{c}{2\omega} \cdot \left(\text{Im} \sqrt{\frac{\epsilon_m^2}{\epsilon_m + \epsilon_d}} \right)^{-1} \quad (\text{I.5})$$

$$L_{zd} = \frac{c}{2\omega} \cdot \left(\text{Im} \sqrt{\frac{\epsilon_d^2}{\epsilon_m + \epsilon_d}} \right)^{-1} \quad (\text{I.6})$$

Les équations précédentes mettent en avant la dépendance de l'apparition et la propagation du mode guidé avec les indices de réfraction des milieux à l'interface et donc l'importance du choix des matériaux pour générer un plasmon de surface utile pour la détection.

I.2.2. Excitation des plasmons de surface

Comme énoncé précédemment, un plasmon de surface est un mode électromagnétique guidé, excité lorsque certaines conditions d'illumination sont présentes. En pratique, une des méthodes les plus courantes pour exciter des plasmons de surface est celle du couplage d'une source lumineuse en polarisation TM à travers un prisme en exploitant le phénomène de réflexion totale interne et de l'angle critique associé. Il existe deux configurations différentes qui utilisent cette approche : celle d'Otto et celle de Kretschmann [99] présentées dans la figure I.16 suivante.

Ces deux géométries utilisent un prisme, avec un indice de réfraction supérieur à l'indice du milieu à analyser, dans lequel est injectée la lumière. Le prisme permet d'atteindre des angles d'incidence sur l'interface plus élevés que l'angle de réflexion totale, ce qui ne serait pas possible avec une simple lame de verre. Dans le cas de la configuration d'Otto, une des faces du prisme est couverte d'une couche diélectrique, d'indice plus petit ($n_{prisme} > n_{couvrant}$), puis d'une fine couche métallique. Lorsque la lumière incidente traverse le prisme puis arrive avec un angle supérieur à l'angle critique ($\theta > \theta_{critique}$) sur sa surface modifiée, c'est-à-dire que toute la lumière est réfléchie, une onde évanescente est générée à l'interface entre le prisme et le milieu diélectrique couvrant. Cette onde peut ensuite se coupler avec les charges libres du métal à l'interface suivante des deux milieux de permittivité opposée et exciter un plasmon de surface (figure I.16 schéma de droite) dans le cas où les constantes de propagation des deux ondes de surface sont identiques.

La configuration de Kretschmann diffère simplement dans l'arrangement des couches sur la face modifiée du prisme : en premier, une couche métallique nanométrique, puis un milieu diélectrique de plus faible indice que celui du prisme (figure I.16 schéma de gauche). Lorsque la lumière incidente arrive avec $\theta > \theta_{critique}$ sur la surface supérieure du prisme, une onde évanescente est produite et dans les bonnes conditions de couplage, un plasmon de surface peut être excité à l'interface suivante entre le métal et le diélectrique couvrant. En pratique, la configuration de Kretschmann est plus avantageuse que celle d'Otto ; le plasmon qui est sensible au changement d'indice proche de l'interface permet de révéler des perturbations dans le milieu diélectrique externe représentant la solution à analyser.

Expérimentalement, en configuration de Kretschmann, lorsque la lumière polarisée est envoyée à travers le prisme sur la surface recouverte d'une fine couche métallique avec un angle d'incidence supérieur à $\theta_{critique}$, cette couche agit comme un miroir et la lumière est totalement

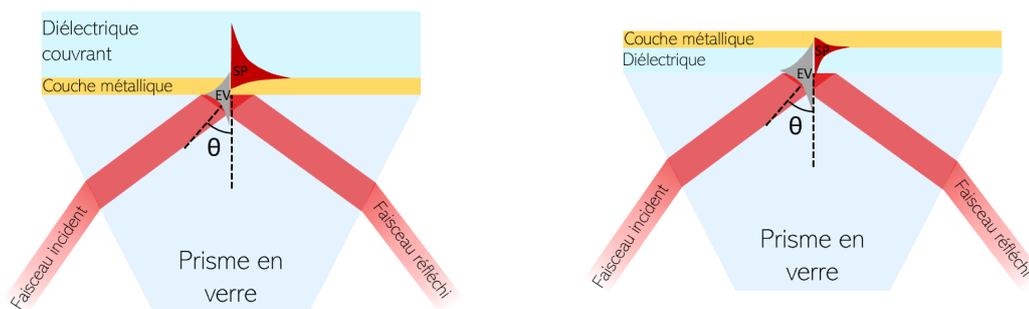


FIGURE I.16 – Représentation schématique de l'excitation des plasmons de surface (SP) par une onde évanescente (EV) grâce à l'utilisation d'un prisme en configuration de Kretschmann (droite) et d'Otto (gauche)

réfléchi. Cependant, lorsque les conditions de couplage sont réunies, on remarque en changeant l'angle d'incidence et en suivant l'évolution de l'intensité lumineuse réfléchi que cette dernière passe par un minimum (figure I.17). Cet angle est appelé l'angle de résonance du plasmon de surface. Les photons polarisés TM interagissent avec les électrons libres du métal induisant un transfert d'énergie et donc une réduction de l'intensité lumineuse réfléchi [97]. Comme discuté précédemment, on remarque sur la figure I.17 que suivant la longueur d'onde d'excitation l'angle de résonance n'est pas le même en raison de la variation de l'indice de l'or avec la longueur d'onde.

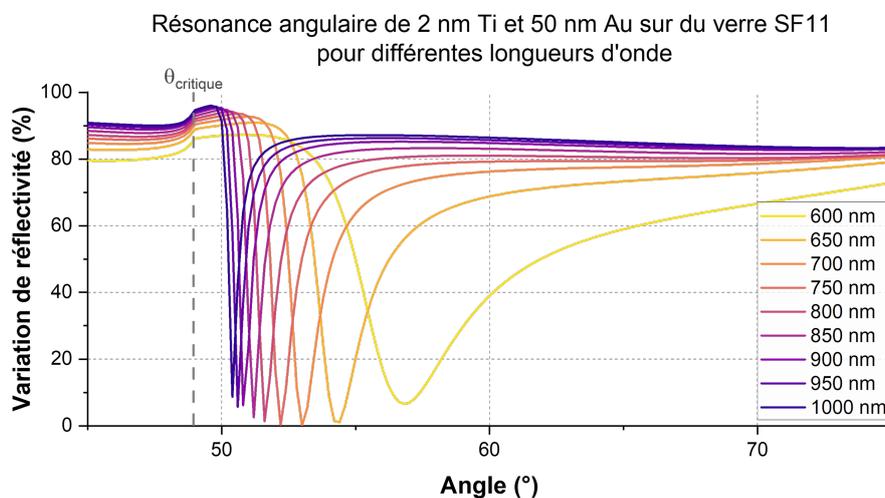


FIGURE I.17 – Simulation numérique suivant le modèle de Rouard [102] de la résonance angulaire d'un plasmon de surface suivant différentes longueurs d'onde dans le cas d'un prisme en verre SF11 ($n = 1,77$) recouvert de 2 nm de titane (couche d'accroche) puis de 50 nm d'or.

Sur cette figure et les suivantes, l'épaisseur d'or choisie est de 50 nm (au-dessus d'une couche d'accroche de 2 nm Ti pour permettre de fixer l'or sur du verre). Cette épaisseur a été choisie à la suite des simulations réalisées avec le modèle de Rouard [102] qui ont permis de valider à nouveau les résultats trouvés lors d'anciens travaux de thèse réalisés par Emmanuel Maillard [103]. Ces simulations peuvent être retrouvées en [Annexe A](#) de ce document.

D'après l'expression du vecteur d'onde du plasmon, celui-ci dépend de la permittivité du milieu diélectrique au-dessus du métal. Le plasmon de surface est donc sensible aux changements d'indice se produisant dans un volume dont l'épaisseur est égale à sa longueur de pénétration (définie dans la partie I.2.1). Cette propriété permet donc l'analyse dans un très faible volume au voisinage de la surface tout en s'affranchissant des perturbations au-delà. Les variations de l'angle de résonance ou de la longueur d'onde permettent de quantifier ces changements et ils peuvent avoir plusieurs origines. Tout d'abord, une variation globale de l'indice de réfraction du milieu diélectrique couvrant provoquera un déplacement angulaire de la résonance du plasmon (détection en volume).

Cela peut également avoir lieu si une couche de molécules se forme sur la surface métallique et que son épaisseur et/ou sa concentration varient au cours du temps, ce qui changera l'indice de réfraction effectif du milieu couvrant (détection de surface). La figure I.18 montre le décalage de la résonance angulaire du plasmon de surface lors de l'ajout d'une monocouche de simples brins d'ADN de 5 nm d'épaisseur (environ 20 bases de longueur) sur la surface d'or. Sur le graphique

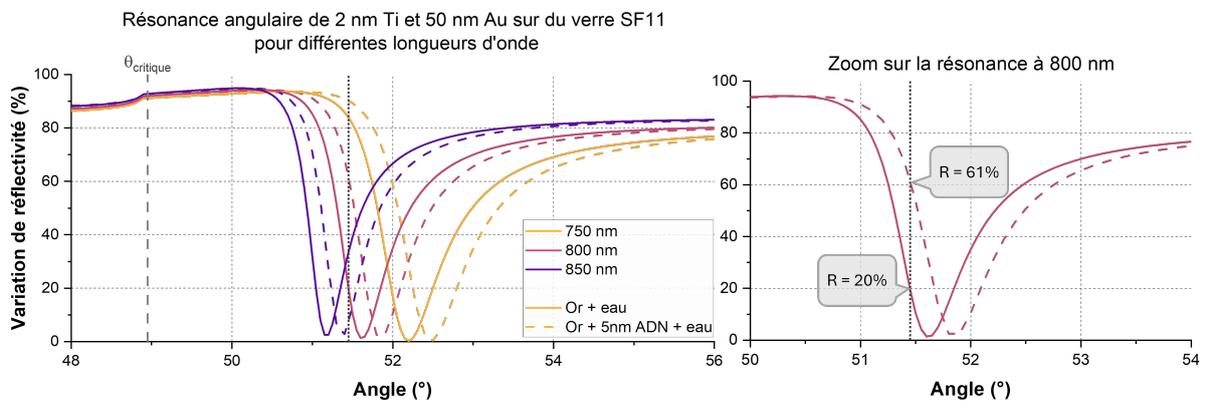


FIGURE I.18 – Simulation numérique suivant le modèle de Rouard [102] du décalage de la résonance angulaire d'un plasmon de surface pour une excitation à différentes longueurs d'onde dans le cas d'un prisme en verre SF11 ($n = 1,77$) recouvert de 2 nm de titane (couche d'accroche) et de 50 nm d'or (ligne en trait plein) puis sur lequel on vient rajouter une couche d'ADN de 5 nm (ligne en trait pointillé).

de droite, si l'on se place à l'angle de pente maximale sur la courbe en trait plein, c'est-à-dire à 51.45° , la valeur de réflectivité est de 20%. En se plaçant au même angle sur la courbe pointillée, on remarque que la valeur de réflectivité passe à 61%. L'ajout d'une monocouche de 5 nm d'ADN sur l'or a décalé la réflectivité de 41%. Ce décalage représente un changement de luminosité très important sur un détecteur optique et confirme que ce mode de détection est très sensible aux changements ayant lieu à l'interface.

I.2.3. Méthode d'imagerie de la résonance des plasmons de surface

Le phénomène de résonance des plasmons de surface (SPR pour *surface plasmon resonance*) est un phénomène dit de « champ proche ». Comme expliqué dans la partie précédente I.2.2, on ne cherche pas à détecter le champ évanescent mais plutôt l'intensité lumineuse réfléchi : la quantité de lumière reçue est d'autant plus importante que le couplage est loin de la résonance. Pour détecter cette intensité lumineuse, plusieurs choix sont envisageables. Dans les débuts de l'utilisation de la SPR pour de la biodétection la lumière réfléchi était enregistrée à l'aide d'un

photo-détecteur ou d'un spectromètre [101]. Dans ces cas de figure, la variation de réflectivité est moyennée sur la surface entière du biocapteur.

Lors de l'adaptation de ce principe en imagerie SPR, on souhaite utiliser un détecteur nous permettant d'imager en continu la surface du capteur. Dans ce cas de figure, une série d'images est enregistrée, sur chacune d'entre elles, chaque pixel correspond à une valeur d'intensité lumineuse sur une zone donnée de la surface. Celle-ci est associée au décalage de la résonance lui-même relié à la variation locale de l'indice de réfraction.

L'image peut être acquise de différentes manières, soit en combinant un monodétecteur et un système de balayage pour l'éclairage [104] soit, plus simplement en utilisant un éclairage plein champ et une caméra. L'utilisation d'une caméra comme détecteur, après un système d'imagerie qui va conjuguer la surface d'or et la caméra, permet une grande flexibilité sur l'acquisition du signal SPR : des balayages en angle ou en longueur d'onde de la résonance du plasmon de surface sont possibles. La première application de l'imagerie SPR avec l'utilisation d'une caméra en configuration de Kretschmann fut réalisée en 1988 par Rothenhäusler et Knoll [105]. Depuis, le nombre de publications faisant référence à ce type de détection n'a fait qu'augmenter pour devenir aujourd'hui une méthode d'imagerie très utilisée en recherche et même commercialisée [97, 106].

Comparé à un système utilisant un photo-détecteur ou un spectromètre, l'utilisation d'une caméra donne une image de la surface du biocapteur. Cela permet l'analyse de multiples zones d'intérêt fonctionnalisées différemment (étude de différentes espèces cibles en même temps : multiplexage), ainsi que l'ajout de contrôle négatif, le tout sur un seul échantillon.

I.3. Fonctionnalisation de la biopuce

L'imagerie par SPR permet d'être très sensible à ce qu'il se passe proche de l'interface dans le milieu diélectrique externe. Mais la spécificité de la détection vient de la fonctionnalisation de surface du biocapteur, plus particulièrement de la surface métallique, appelée la biopuce, en contact avec le milieu couvrant.

Historiquement, du cuivre et de l'aluminium ont été utilisés afin d'exciter des plasmons de surface mais les deux métaux les plus couramment employés sont l'or et l'argent [107]. Même si l'argent donne une résonance plus étroite (meilleure sensibilité de détection due à une pente plus forte), l'or présente un décalage de la résonance plus important lors d'un changement dans l'indice de réfraction effectif à l'interface [99]. De plus, dans le cadre de la biodétection l'utilisation de l'or sera privilégiée pour sa biocompatibilité, sa stabilité chimique, en particulier dans l'eau salée (obligatoire pour étudier des interactions biologiques), et la facilité d'y accrocher des biorécepteurs.

I.3.1. Détection en milieu contrôlé

Les premières apparitions de la SPR pour des applications de biodétection étaient basées sur l'adsorption non spécifique de protéines sur la surface [101] : par exemple les anticorps sont connus pour s'absorber en une monocouche sur des surfaces métalliques [98, 108]. Ils étaient ensuite utilisés afin de détecter l'appariement avec leur antigène complémentaire. Cependant, des limitations à ce type d'attachement des ligands sont reconnues : certaines protéines peuvent subir une dénaturation (due à un changement de conformation) lorsqu'elles sont absorbées directement

sur la surface, l'orientation du ligand n'est pas contrôlée et, de plus, seul un nombre limité sont capables de se lier aussi naturellement et cette liaison n'est généralement pas stable dans le temps (migration aléatoire des protéines sur la surface). Afin d'étendre la gamme d'applications en matière de biodétection et de maximiser la spécificité de la biopuce il est nécessaire de se tourner vers des méthodes de fonctionnalisation de surface plus sophistiquées.

L'utilisation de l'or offre une grande versatilité de chimies de surface grâce à l'interaction très forte entre les atomes d'or et les thiols (groupe chimique $-SH$: soufre-hydrogène) par phénomène de chimisorption. Ces molécules vont venir former une monocouche autoassemblée (SAM pour *self-assembled monolayer*) très stable sur la surface d'or. L'adsorption spontanée de cette monocouche orientée de molécules organiques polyfonctionnelles fut présentée pour la première fois par Nuzzo et Allara en 1983 [109]. La simple immobilisation de cette SAM sur une surface d'or permet de changer les propriétés chimiques de celle-ci en fonction de la longueur de la chaîne alcane (variation de l'épaisseur de la monocouche) et du groupe fonctionnel à son extrémité [110]. La modification de ces paramètres permet de jouer sur le degré d'hydrophobicité [111] de la surface, la vitesse de détérioration des thiols aux UVs [112] et peut même permettre la détection de surfactants en solution par électrochimie [113].

De plus, le large éventail de choix pour le groupe fonctionnel à l'extrémité du thiol permet d'avoir des surfaces plus ou moins sensibles à l'adsorption de protéines ainsi que l'accrochage de différentes molécules par liaison covalente. L'insertion d'une chaîne de polyéthylènes glycols (PEG) [114, 115] ou de tri(poly propylène sulfoxyde) [116] à la suite d'un thiol a démontré des capacités de réduction considérables de l'adsorption non spécifique de protéines sur la surface d'or. Également, terminer la chaîne alcane par des groupes fonctionnels tels que des carboxyles ($-COOH$) ou des amines ($-NH_2$) [117] permet l'accroche d'une grande variété de molécules de façon covalente (anticorps, protéines...) qui peuvent servir de biorécepteurs par la suite.

Dans le cadre de la SPRI, la première fonctionnalisation d'une biopuce en or par une SAM pour de la biodétection a été réalisée dans la fin des années quatre-vingt. Cette technique fut développée pour la compagnie Biacore instruments (fabricant d'appareils d'imagerie SPR) qui a rapidement breveté le protocole de chimie de surface [118]. Ce protocole d'assemblage moléculaire bicouche, s'appuie sur une chaîne de thiol terminée par un groupe hydroxyle ($-OH$) qui s'active ($-O^-$) en solution basique pour venir greffer le polymère dextran. Ce polymère final est composé d'une chaîne chargée négativement permettant l'accrochage covalent de divers ligands (anticorps, théophylline analogue, protéine staphylocoque)[119, 120].

Afin d'avoir plus de versatilité et de contrôle sur la couche moléculaire, il est possible de venir créer d'autres autoassemblages multicouches plus complexes sur une base de thiols. Ces systèmes multicouches sont souvent bâtis sur la protéine de streptavidine, mais ont également été déployés pour d'autres groupes fonctionnels tels que des groupes carboxyle ($-COOH$) ou hydroxyle ($-OH$). La streptavidine est très bien adaptée à un usage multicouches, car elle contient quatre sites de liaison (deux de chaque côté) pour sa molécule complémentaire : la biotine [121]. La première étape d'un tel autoassemblage reste la même qu'énoncée précédemment : chimisorption d'une SAM de thiols sur la surface d'or, seulement le groupe fonctionnel utilisé par la suite est une biotine. Du fait du grand nombre de sites complémentaires présents sur la streptavidine, celle-ci peut se lier en sandwich à la SAM biotinylée d'un côté puis à une autre molécule d'intérêt, elle aussi, biotinylée permettant de créer une liaison forte et stable.

Différentes stratégies peuvent être appliquées pour mettre en place cette technique. La première est l'utilisation de thiols directement biotinylés [120, 122]. Cependant, elle présente quelques désavantages, notamment des problèmes d'encombrement stérique car les molécules de streptavidine sont beaucoup plus grosses que des chaînes alcanes thiolées. Pour répondre à cette limitation, il est possible de mixer des chaînes thiolées avec et sans biotine. L'équipe de *Spinke et al.* a fait des recherches sur la longueur idéale de la chaîne alcane du thiol afin d'éviter les interactions non spécifiques de la streptavidine avec la surface d'or et privilégier seulement l'interaction streptavidine-biotine [120]. Une deuxième méthode pour obtenir une monocouche de streptavidine est l'utilisation de thiols fonctionnalisés avec des dérivés de biotine tel qu'un groupement amine ($-NH_2$) [18]. Ces deux techniques, en plus de leur facilité de réalisation, leur spécificité et stabilité, sont très utilisées dans le domaine de la biodétection car il est très facile de fonctionnaliser avec une biotine une grande variété d'espèces moléculaires (ADN, ARN, anticorps, peptides...) qui peuvent servir de biorécepteurs et permettre une grande spécificité d'interaction avec les molécules cibles.

En résumé, ces différentes techniques permettent une fonctionnalisation rapide, simple et très spécifique de la surface d'or de la biopuce. Cependant, elles rencontrent quelques limitations notamment lorsque le milieu d'analyse devient complexe (sang, salive, plasma...). Dans ce cas de figure, on observe de fortes interactions non spécifiques en surface dues aux autres protéines présentes dans le milieu qui viennent fausser les résultats.

I.3.2. Détection en milieu complexe

Dans le domaine médical, la demande pour réaliser des analyses quantitatives le plus rapidement possible ne cesse de croître. Cependant, un des défis lié à cette demande est la capacité d'analyser des échantillons complexes : sang, urine, plasma... Dans le cadre de la SPRI les milieux complexes contiennent de nombreux éléments biologiques en tout genre (protéines, bactéries...) qui peuvent interagir avec la surface métallique du biocapteur ou créer un changement d'indice conséquent de l'environnement, et donner des signaux non spécifiques introduisant ainsi beaucoup de bruit de mesure voir des faux positifs. Il devient nécessaire de choisir une fonctionnalisation afin d'avoir une surface anti-adsorption très hydrophile qui permettra la détection spécifique des analytes souhaités et non d'autres molécules présentes dans l'échantillon à analyser. Plusieurs molécules ont été reportées dans la littérature qui reste biocompatibles et permettent à la surface d'être très hydrophile et anti-adsorption.

Comme mentionné précédemment dans la sous-partie I.3.1, l'utilisation de PEG est depuis longtemps investiguée [115, 114]. Cette molécule est à la fois hydrophobe (côté vers l'or) et hydrophile par dépendance des liaisons hydrogène avec l'eau (côté libre en surface pour interagir avec l'environnement à analyser). Cette technique de fonctionnalisation est très répandue en imagerie SPR et permet de réduire considérablement les interactions non spécifiques. Historiquement, *Silin et al* ont mesuré par SPR sur une surface fonctionnalisée de PEG, une adsorption inférieure à 0.5 ng/cm^2 soit en dessous du bruit de mesure [123], ce qui correspond à une réduction d'environ 85% de l'adsorption non spécifique de protéines [124]. Cependant, plusieurs limites à cette fonctionnalisation sont mises en avant. Tout d'abord, le problème principal vient de la difficulté de stocker ou de manipuler des PEG à température ambiante, notamment les PEG modifiés avec des terminaisons permettant l'accroche des

molécules suivantes. Les chaînes macromoléculaires qui les composent ont tendance à s'oxyder très rapidement conduisant à la dégradation et finalement l'inefficacité du polymère [101, 125, 126, 127]. Il y a donc un temps très limité entre la fonctionnalisation et l'utilisation de la biopuce (maximum 1 mois) ce qui lui confère une mauvaise robustesse. Également, les PEG sont très bons pour résister l'adsorption non spécifique de protéines, mais cette performance est réduite lors de l'accroche d'autres biomolécules au-dessus et ils ne sont pas complètement anti-adsorption face aux autres composés qui peuvent être présents en milieux complexes.

Une autre approche repose sur l'utilisation de zwitterions afin de répondre à ces limites. Ces molécules possèdent des charges électriques intrinsèques; les rendant polaires. Comme les PEG, elles ont la capacité de rendre la surface très hydrophile, mais avec une capacité anti-adsorption plus étendue. Cela se traduit par un fort pouvoir de résistance à l'adsorption non spécifiques de protéines, mais également à l'adhésion de micro-organismes et la formation de biofilms. Plusieurs catégories de zwitterions sont répertoriées dans la littérature.

Pour commencer, certaines chaînes peptidiques (polymères d'acides aminés) peuvent être considérés comme tels. Un peptide est caractérisé par d'un côté une terminaison amine $-NH_2$ (utile pour venir s'attacher sur un thiol terminé d'un groupement carboxyle $-COOH$) et de l'autre un acide carboxylique (utile pour venir continuer la fonctionnalisation avec une protéine au choix). *Bolduc et al.* ont mené une étude afin de déterminer la séquence d'acides aminés idéale afin qu'elle produise la meilleure résistance aux adsorptions non spécifiques possible tout en étant petite (rester dans la zone de détection du plasmon), polaire et ionique [128]. Ces chaînes présentent une grande résistance à l'adsorption non spécifique de protéines (<0.3 ng/cm²) similaire aux PEG [129]. De plus, des expériences ont été réalisées avec des biopuces fonctionnalisées de zwitterions peptidiques dans du plasma sanguin [126] confirmant un très faible taux d'interactions non spécifiques lors de la détection d'une enzyme (Matrix metalloproteinase-3 (MMP-3)) à faible concentration (12.5 nM) par SPR.

Les polymères zwitterioniques sont une autre catégorie de molécules anti-adsorption. Ils sont caractérisés par le fait qu'ils possèdent le même nombre de cations et d'anions dans leur chaîne. Cela leur confère la particularité d'avoir des moments dipolaires élevés et des groupements fortement chargés. Ces polymères sont hydrophiles en raison de la présence abondante d'ions et sont une très bonne alternative aux PEG pour plus de robustesse. Ils sont faciles d'utilisation lors de la fonctionnalisation de surface et présentent une certaine flexibilité dans la conception : accrochage d'un thiol d'un côté et d'un groupement fonctionnel $-COOH$ final sur lequel il est facile de venir rattacher d'autres molécules [130]. Ils permettent jusqu'à 99% de réduction de l'adsorption non spécifique de protéines [127] et leur utilisation est compatible avec les milieux complexes (sang et plasma humain non dilué) [131]. Leurs limitations actuelles sont principalement dû au fait qu'ils sont encore en voie d'exploration. Il existe très peu de polymères zwitterions disponibles commercialement et le choix de groupes fonctionnels en fin de chaîne reste très limité.

Ces deux approches de fonctionnalisation de l'or permettent d'avoir des surfaces réduisant considérablement les différentes interactions non spécifiques des espèces présentes en milieu complexe. Un autre point essentiel à optimiser est l'interaction entre le ligand et la cible visée. Il est nécessaire de venir immobiliser en surface une sonde qui lui est spécifique et très complémentaire afin de déplacer l'équilibre chimique du côté du duplex, en particulier à très

faible concentration de cible.

I.3.3. Détection spécifique de miARNs

Il existe beaucoup de chimies de surface très différentes pour la détection d'oligonucléotides, reposant toutes sur la forte complémentarité des bases (A/T* (*U pour de l'ARN) et C/G) qui les composent. De nos jours, la synthèse de séquences d'oligonucléotides de toutes tailles et toutes compositions se réalise de manière industrielle à grande échelle et moindre coût. Il est possible de venir greffer en fin de chaîne toute sorte de molécules fonctionnelles qui vont permettre l'accrochage du simple brin (biorécepteur) comme étape finale de la fonctionnalisation de surface (biotine, groupement amine...). Cette dernière étape nécessite le choix du type de ligand, qui sera utilisé comme biorécepteur, que l'on souhaite utiliser pour venir capturer notre cible.

Si l'on suit le principe du biocapteur représenté sur la figure I.1, pour détecter des simples brins de miARNs grâce à l'imagerie SPR, l'utilisation du brin d'ARN complémentaire à cette cible en tant que ligand apparaît comme étant la solution la plus évidente. Cependant, en pratique, il est très difficile d'utiliser un simple brin d'ARN comme sonde afin de détecter son complémentaire. Contrairement à l'ADN, l'ARN est très instable dans l'environnement à température ambiante à cause des ribonucléases (c.à.d. ARNases) [132]. Ces dernières sont des enzymes qui viennent catalyser la dégradation des brins d'ARN en éléments plus petits. Elles sont présentes partout et notamment sur notre peau. Maintenir un environnement sans ARNase est très difficile lors de la manipulation d'ARN [133]. Cependant, il existe d'autres alternatives permettant la détection de simples brins d'ARN tout en contournant ce problème.

La première alternative utilisée fut des ligands composés de bases d'ADN classiques. Les liaisons ADN/ARN restent très spécifiques entre bases complémentaires [134, 135, 136, 137]. Cette technique est pratique si l'on souhaite utiliser ensuite un anticorps capable de reconnaître spécifiquement les complexes ARN/ADN [138] afin d'augmenter la spécificité et la sensibilité de la détection. Cependant, il existe certaines limitations à cette alternative. Notamment, l'hybridation d'un brin d'ADN avec son complémentaire ARN peut activer prématurément l'ARNase et cliver le brin d'ARN rendant la détection impossible. De plus, ces sondes ADN ont tendance à se dégrader rapidement dans les milieux complexes purs (plasma, sang, cellules) [139, 140].

C'est ici que l'utilisation d'analogues d'acides nucléiques rentre en jeu. Ils permettent de surmonter les limites des acides nucléiques naturels et sont tout aussi simple de fabrication par synthèse. Ils ont l'avantage d'accroître la résistance aux dégradations par nucléase, d'améliorer la sélectivité entre bases complémentaires, entraînant une meilleure affinité du complexe et de ses propriétés thermodynamiques (notamment la température de dénaturation, T_m : température à laquelle 50% des oligonucléotides en solution sont sous forme de doubles brins, c.a.d. hybridés). Deux familles principales sont utilisées dans la détection de simples brins de miARNs : les LNA et les PNA.

Locked Nucleic Acid (LNA)

Une base LNA est un monomère d'ARN modifié par une liaison supplémentaire entre l'oxygène 2' et le carbone 4' comme représenté sur la figure I.19 ci-dessous.

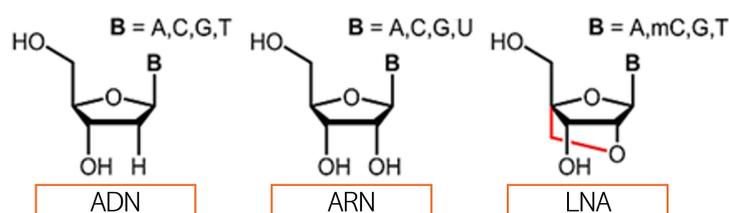


FIGURE I.19 – Représentation schématisée de différents nucléosides, de gauche à droite : nucléoside d'ADN, nucléoside d'ARN, nucléoside de type LNA.

Lors de son hybridation, le complexe formé avec son brin complémentaire est bloqué dans une conformation 3'-endo [141], réduisant la flexibilité conformationnelle du ribose et augmentant l'organisation locale du squelette phosphate, rendant ainsi la structure hélicoïdale entre les deux brins plus compacte et résistante (figure I.20) [142]. Il peut facilement être intégré dans une séquence d'ADN afin de former des sondes hybrides ADN/LNA qui permettent d'augmenter la sensibilité de détection jusqu'à un facteur 10 [143].

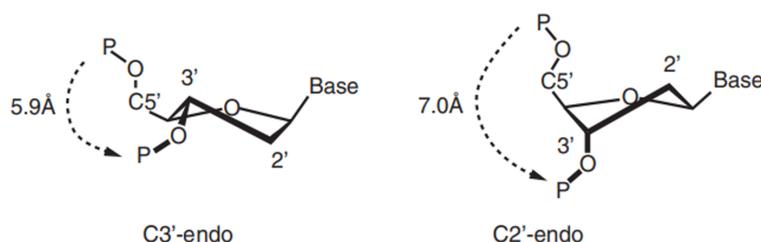


FIGURE I.20 – Représentation schématisée des bases nucléiques suivant leurs différentes conformations : C3'-endo et C2'-endo.

Également, les études structurales montrent que le LNA est un imitateur de l'ARN, comme le montre sa structure sur la figure I.19, réagissant lors de l'hybridation comme un duplexe ARN/ARN le rendant très spécifiques avec son complémentaire. Des études pour vérifier l'impact du nombre de LNA dans la séquence ADN ont été menées afin de savoir où placer les bases LNA (par groupe ou périodiquement) pour obtenir la meilleure sélectivité et sensibilité de détection [139, 140, 144]. Il a été démontré que ces sondes LNA permettent une meilleure tenue en milieu complexe car elles empêchent le clivage par les ARNase [139, 140]. De plus, leur ajout permet une augmentation non négligeable de la température de dénaturation du complexe : +2 à +10°C par monomère LNA ajouté dans la séquence de la sonde ADN lors de l'hybridation avec l'ARN complémentaire [144, 142].

Peptide Nucleic Acid (PNA)

Cet analogue d'acide nucléique a la particularité d'avoir une structure peptidique neutre (comparé à la structure phosphate des ADNs ou ARNs chargée négativement), mais lors de l'hybridation avec son complémentaire elle passe d'un état ionique neutre à négatif. Ce changement de propriétés en surface permet l'adsorption électrostatique spécifique des molécules chargées positivement (polymère fluorescent, cluster de nanoparticules d'argent...) [145] et de rendre la surface hydrophile. Le premier design de ces sondes fut reporté par Nielsen en 1991, dans le but de créer un acide aminé qui reconnaîtrait les bases de l'ADN spécifiquement mais en

remplaçant son squelette désoxyribose phosphate par un squelette polyamide achiral (figure I.21) [146].

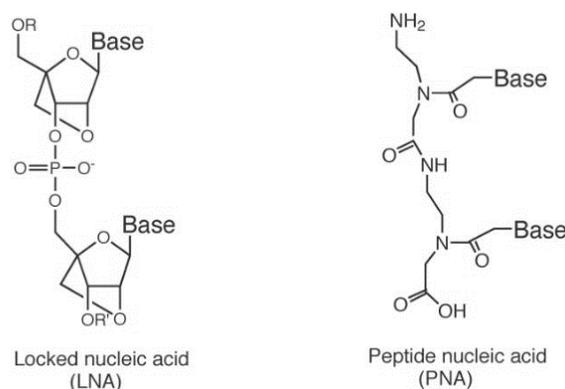


FIGURE I.21 – Représentation schématique des monomères modifiés LNA et PNA ainsi que leur squelette.

Ils ont été créés dans le but d'avoir une attraction électrostatique et une meilleure solubilité aqueuse seulement une fois hybridés. De plus, ils sont également plus stables après hybridation (jusqu'à deux ordres de grandeurs suivant les séquences [147]) avec de l'ADN ou de l'ARN, comparé aux couples ADN/ADN et ADN/ARN, ce qui leur permet d'être de très bonnes sondes lorsque l'on cherche à faire du diagnostic génétique. Comme les LNA, ils sont résistants à la digestion par les nucléases et protéases, très stables en milieu complexe surtout dans les cellules (48 heures comparé à 15 minutes pour des brins d'ARN ou d'ADN standards naturels). Grâce à toutes ces qualités, ils sont de très bons candidats pour des applications antisens et antigènes (hybridation avec un ARN messenger pour inhiber la synthèse de sa protéine ou l'expression du gène correspondant).

Ces deux sondes analogues d'acides aminés naturels présentent donc une bonne résistance en milieu complexe et une meilleure affinité avec des simples brins d'ADN ou d'ARN. Seulement, les sondes PNA sont neutres avant hybridation ce qui réduit leur solubilité dans l'eau et va impacter les propriétés de la surface que l'on souhaite le plus hydrophile possible pour réduire les adsorptions non-spécifiques. Un avantage des modifications LNA est qu'en jouant sur la disposition interne des bases dans des sondes hybrides ADN/LNA, il est possible d'augmenter la T_m , ce qui est intéressant lorsque l'on veut détecter de très faibles concentrations de cibles. Pour de la détection de miARNs en faible concentration par SPRI, l'utilisation de sondes hybrides ADN/LNA apparaît donc comme le meilleur choix.

Cette partie a permis de faire un état de l'art sur les différentes façons de venir fonctionnaliser la surface d'or de la biopuce SPR, que ce soit en milieu contrôlé simple ou milieu complexe. Les miARNs étant des cibles très particulières, il est important de choisir le biorécepteur le plus adapté pour avoir la meilleure affinité avec cette cible.

I.4. Méthode d'amplification du signal SPR

Le choix du protocole de fonctionnalisation de surface permet potentiellement de gagner en spécificité ainsi qu'augmenter l'affinité du complexe (avec le choix du ligand et de la chimie de

surface) et en limite de détection (surface anti-adsorption afin de réduire le bruit de mesure). Cependant, toutes ces implémentations ne permettront pas de venir détecter directement de très faibles concentrations d'oligonucléotides cibles (du picomolaire au femtomolaire : 10^{-12} à 10^{-15} mol/L). De manière générale, sans amplification ou traitement particulier du signal, la limite de détection d'un système SPRI pour des molécules de masse élevée (protéine, oligonucléotides...) est de l'ordre de quelques nanomolaire. Piliarik et Homola ont montré qu'il est possible de prédire par un modèle théorique les performances finales des capteurs SPR ; indépendamment de la méthode d'excitation ou de modulation (angulaire, longueur d'onde ou amplitude de réflectivité) dans les meilleures conditions de bruit de la source de lumière et du détecteur. La résolution

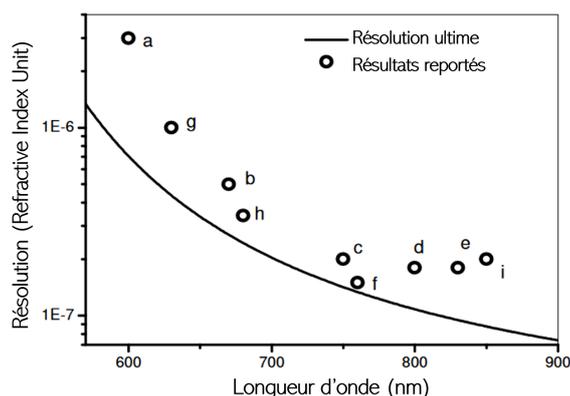


FIGURE I.22 – Résolution minimale théorique d'un capteur SPR tracée en fonction de la longueur d'onde d'excitation et comparée aux meilleurs résultats obtenus dans la littérature. Figure modifiée de l'article de *Piliarik et al.* dans lequel toutes les références de *a* à *i* sont listées [85].

(comparable à la sensibilité) minimale peut être tracée en fonction de la longueur d'onde sur la figure I.22.

Pour passer la limite de détection en dessous du nanomolaire (correspondant environ à 10^{-6} RIU après quelques minutes d'interaction d'un brin d'ADN d'environ 25 bases), il faut rechercher des méthodes d'amplification du signal SPR. Plusieurs stratégies peuvent être envisagées. L'amplification par ajout de masse grâce à des réactions chimiques ou biochimiques à l'interface, ainsi que la structuration de la biopuce pour une amplification par couplage de modes plasmoniques ont été recherchées.

I.4.1. Amplification par augmentation de l'indice dans le milieu d'analyse

L'amplification du signal par méthode « sandwich » est très communément utilisée dans les biocapteurs, notamment en SPR. Elle implique l'utilisation d'une molécule ou d'une nanoparticule venant s'attacher sur la molécule cible, elle-même déjà accrochée au biorécepteur à la surface de la biopuce (voir schéma figure I.23).

Cette molécule sandwich doit être de forte densité pour induire un changement de l'indice effectif et donc un décalage de l'angle de résonance significatif afin d'être perçu par le système SPR. Deux familles de molécules sandwich sont communément décrites dans la littérature : des molécules biologiques à fort poids moléculaire (protéines, anticorps...) et des nanoparticules en tout genre. Dans les prochaines sous-parties, seules les méthodes d'amplification par sandwich réalisées pour la détection de miARNs sont répertoriées.

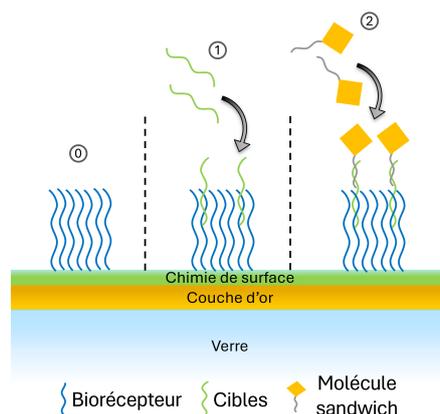


FIGURE I.23 – Représentation schématique de l'amplification par sandwich de la détection d'un oligonucléotide cible. (0) La biopuce a été fonctionnalisée et les biorécepteurs sont immobilisés sur la surface d'or. (1) Les cibles sont envoyées sur la biopuce en très faibles concentrations, en dessous de la limite de détection de l'appareil aucun signal n'est visible. (2) La molécule sandwich est envoyée et vient interagir spécifiquement avec le duplexe cible-sonde, le changement d'indice de réfraction devient alors observable par l'appareil et donne un signal visible.

I.4.1.1. Utilisation de molécules biologiques

Les molécules biologiques utilisées comme molécules sandwich peuvent être de différentes catégories : molécules à fort poids moléculaire, utilisation d'enzymes ou même d'autres oligonucléotides pour déclencher des réactions en chaîne.

Utilisation de molécules à fort poids moléculaire

L'utilisation d'anticorps permet de venir amplifier un signal d'hybridation. Spécifiquement, l'anticorps S9.6 antiDNA :RNA a la particularité de venir se lier sur des duplexes formés entre un brin d'ADN et d'ARN. Dans ce cas précis, une sonde ADN est utilisée afin de se lier avec son complémentaire : l'ARN d'intérêt. Puis, dans un deuxième temps l'anticorps S9.6 est injecté afin de créer un sandwich et d'amplifier le signal optique en sortie. Cette méthode sandwich a permis de gagner deux ordres de grandeur de détection jusqu'à des concentrations de l'ordre de la dizaine de picomolaires de divers miARNs [148, 149, 138].

Une autre catégorie de molécules à fort poids moléculaire qui sont également utilisées comme molécules sandwich sont des protéines, telle que la streptavidine. Comme mentionné dans la partie précédente I.3.1 sur la fonctionnalisation de surface, la streptavidine possède quatre sites de liaison lui permettant d'accueillir spécifiquement des biotines. La liaison streptavidine-biotine est reportée comme étant l'une des liaisons non-covalentes les plus fortes et est très résistante aux changements de son environnement (température, pH...)[150]. Il est très facile de se procurer commercialement des oligonucléotides présentant une biotine sur une de leurs terminaisons. C'est sur ce couple de molécules qu'est basée la méthode sandwich de *Zang et al.*[151]. La première étape reste la même que précédemment avec l'injection des miARNs cibles sur la biopuce dans un appareil SPR Biacore (appareil SPR commercial). Ce micro-ARN vient s'hybrider partiellement sur le biorécepteur laissant plusieurs bases disponibles. Puis, une solution du complexe comprenant la streptavidine et les oligonucléotides biotinylés est préparée dans un tube en dehors de l'appareil. Une fois bien mélangée, cette solution est injectée dans le Biacore. L'oligonucléotide du complexe

est composé des bases complémentaires de la partie du micro-ARN restée libre afin de garantir une liaison spécifique avec celui-ci. Cette méthode d'amplification a permis de gagner un ordre de grandeur sur la limite de détection en moins de 30 minutes d'expérience (14 minutes d'injection de miARNs et 10 minutes d'injection du complexe) donnant une concentration limite détectable de 50 pM.

Réactions enzymatiques

Une méthode d'amplification plus complexe proposée pour la détection de miARNs est l'utilisation d'enzymes afin de faire démarrer des réactions chimiques produisant l'élongation des brins d'ADN ou d'ARN utilisés dans le sandwich. Lorsqu'un ARN vient s'hybrider sur le biorécepteur, son extrémité 3' à l'opposé de la surface du biocapteur se termine par un groupement hydroxyle $-OH$. Ce groupement terminal est propice à l'élongation d'un poly(A) (polyadénylé : grande chaîne de base adénine) à l'aide d'une enzyme polymérase poly(A) et d'ATP dans les bonnes conditions thermodynamiques [143]. Grâce à ce procédé, couplé à une autre réaction chimique produisant un précipité d'oxyde TMB à la surface d'une biopuce SPR, *Aoki et al.* ont réussi à détecter les miARNs-21 à des concentrations de l'ordre du picomolaire. Ces réactions enzymatiques permettent l'élongation du micro-ARN déjà hybridé sur son biorécepteur et de ce fait l'accrochage de n'importe quelle autre molécule ou particule ayant un poly(T) complémentaire. Cependant, même si la réaction de polymérase peut se faire au sein de la chambre fluide d'un système SPR, elle prend en moyenne plusieurs heures et nécessite de changer la solution tampon ainsi que la température de la chambre. L'utilisation de réactions enzymatiques n'est pas propice pour la détection quantitative sur des courtes durées (< 1 heure de temps de détection).

Réaction d'hybridation en chaîne

D'autres séquences d'ADN plus grandes peuvent servir de molécules sandwich afin d'amplifier un signal d'hybridation. Cette méthode est référencée comme étant une réaction d'hybridation en chaîne, reportée pour la première fois par *Dirks et al.* en 2004 [152]. Cette technique fût adaptée au biocapteur pour de la capture en surface plutôt qu'en solution et présente un grand potentiel d'amplification lié à plusieurs avantages : réaction cinétique contrôlée, grande sensibilité et sélectivité dû au fait que seulement des brins d'ADN rentrent en jeu (figure 1.24). Par conséquent, de nombreuses restrictions appliquées aux réactions enzymatiques, telles que le contrôle du pH, de la température, du milieu tampon, peuvent être éliminées et simplifiées la partie amplification. Le principe est le suivant : une sonde ADN en épingle est immobilisée sur la surface du transducteur. En présence de son micro-ARN complémentaire, cette épingle se déplie pour former le duplex sonde-cible. Par la suite, d'autres séquences ADN complémentaires des bases finales de la sonde qui ne sont pas hybridées rentrent en jeu et s'hybrident tour à tour, déclenchant ainsi une réaction d'hybridation en chaîne, produisant des concatamères amplifiant le signal d'hybridation initial. Cette méthode a été utilisée sur des biocapteurs électrochimiques et a permis de baisser significativement la limite de détection de différents miARNs : miARN let-7 jusqu'à 1 pM [154], miARN-21 jusqu'à 11 pM [155]. Cette méthode est très utile avec ce type de biocapteurs électrochimique car les rapporteurs (notamment le méthylène bleu) sont capables de s'insérer dans les doubles brins d'ADN en grande quantité et de donner une amplification du signal très significative. Dans le cadre de la SPR, il faut prendre en compte la limite de la longueur de pénétration du plasmon de surface dans le milieu d'analyse qui est seulement de la centaine de nanomètres, empêchant l'utilisation de molécule d'amplification trop longue.

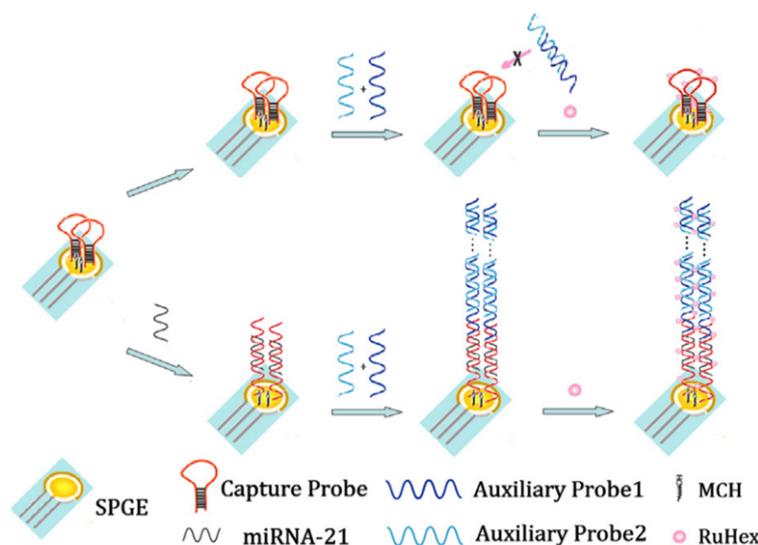


FIGURE I.24 – Représentation schématique de l'amplification par hybridation en chaîne dans le cas d'un biocapteur électrochimique pour la détection du miARN-21. Figure originale de l'article de *Hong et al.*[153]

L'utilisation de molécules biologiques pour amplifier le signal SPR dans le cadre d'une amplification sandwich est une option viable. Cependant, cette approche présente des limitations, car la masse intrinsèque des molécules biologiques ne peut être modifiée, ce qui fixe le facteur d'amplification du signal SPR. Des techniques plus avancées, telles que les réactions enzymatiques ou l'hybridation en chaîne, permettent d'augmenter l'indice du milieu d'analyse et donc le signal SPR de manière plus marquée. Toutefois, ces méthodes nécessitent des temps d'amplification plus longs et génèrent des produits qui s'éloignent de la surface d'or, ce qui peut être sous-optimal en SPR, étant donné que l'intensité du champ électromagnétique est majoritairement confinée dans les premiers 100 nanomètres à l'interface.

I.4.1.2. Utilisation de nanoparticules

Au lieu d'utiliser des molécules biologiques comme molécules sandwich, il est possible d'exploiter des nanoparticules, qui offrent un avantage notable en détection SPR. En effet, leur taille peut être ajustée en fonction des besoins et leur densité est bien plus élevée, ce qui permet d'amplifier considérablement le signal lors de la capture de la cible.

Zhou et al. ont utilisé des nanoparticules de silicium afin d'amplifier le signal SPRI lors de la détection de miARNs [135]. Ces nanoparticules de silicium sont préalablement fonctionnalisées avec un brin d'ADN comportant une modification 5'-phosphorylated permettant la fusion avec le miARN cible par réaction enzymatique. Comme illustré sur la figure I.25 suivante, cet assemblage préparé en dehors du banc, est ensuite injecté dans le système SPRI et vient se lier avec son complémentaire ; une sonde ADN immobilisée en surface de la biopuce. Cette technique d'amplification a permis la détection de miARNs à une concentration de 100 fM dans un échantillon de 500 μ L.

En combinant l'utilisation de nanoparticules d'or (AuNPs) et une réaction enzymatique de polyadénylation, *Fang et al.* ont réussi à baisser la limite de détection de miARNs jusqu'à 10 fM [143]. Les étapes de l'amplification par sandwich sont les suivantes : des sondes hybrides LNA/ADN sont immobilisées en surface d'une biopuce SPR, les miARNs cibles sont injectés sur

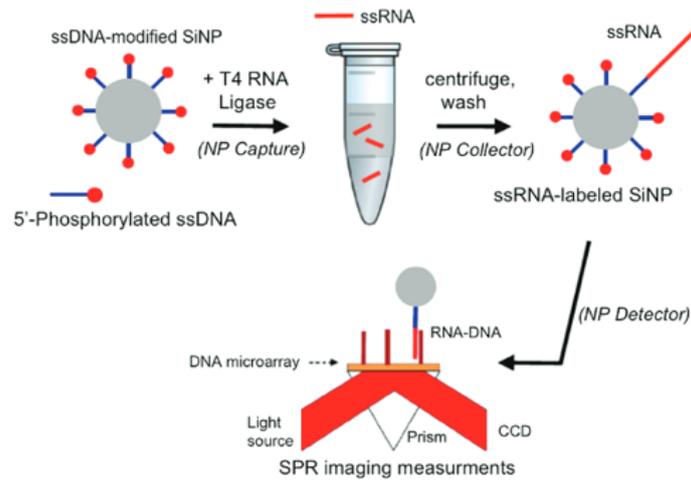


FIGURE I.25 – Représentation schématique de l'amplification du signal SPRI grâce à des nanoparticules de silicium pour la détection de simples brins d'ARN. Figure originale de l'article de Zhou *et al.*[135]

la biopuce puis la polymérisation enzymatique du poly(A) est démarrée. Pour finir, des AuNPs fonctionnalisées avec des poly(T) s'hybrident sur le poly(A) au bout du miARN et permettent d'amplifier le signal SPR (figure I.26).

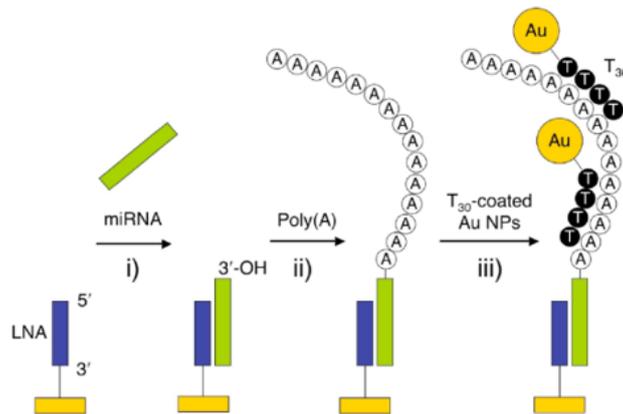


FIGURE I.26 – Représentation schématique de l'amplification du signal SPR grâce à la combinaison d'une polymérisation enzymatique et de nanoparticules d'or pour la détection de miARN. Figure originale de l'article de Fang *et al.*[143]

Toujours par détection SPR, l'équipe de Liu *et al.* a réussi à descendre la limite de détection du miARN-21 jusqu'à 0,6 fM grâce à l'utilisation combinée de nanoparticules d'or (AuNPs) et de nanoparticules d'argent (AgNPs) (figure I.27) [156]. Leur méthode est basée sur le principe classique du sandwich : la biopuce est fonctionnalisée avec des sondes ADN en épingle, puis, les miARNs cibles sont envoyés dans la chambre de fluide suivi des AuNPs fonctionnalisées pour être complémentaires à la partie encore libre de la sonde ADN (construite plus longue que la taille du miARN). Dans un second temps, d'autres longues séquences d'ADN viennent s'hybrider sur celles encore disponibles autour de l'AuNP formant ainsi un "super sandwich ADN". Pour finir, des AgNPs fonctionnalisées avec du CTAB (tensioactif chargeant les nanoparticules

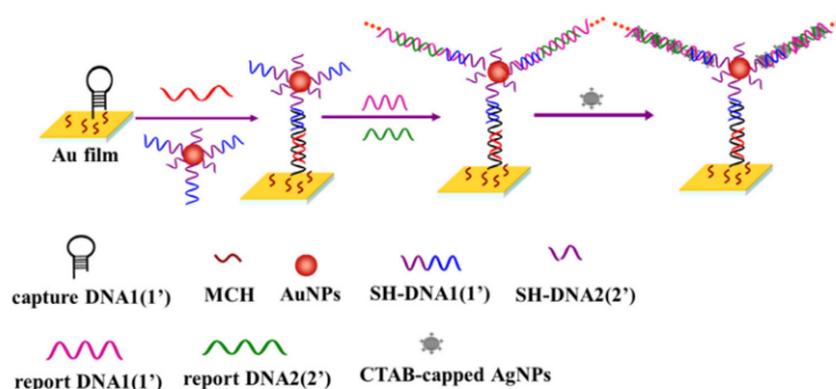


FIGURE I.27 – Représentation schématique de l'amplification du signal SPR grâce à une combinaison de nanoparticules d'or et d'argent dans un super sandwich ADN pour la détection de micro-ARN. Figure originale de l'article de *Liu et al.*[156]

positivement) sont introduites sur la biopuce et viennent se fixer sur le "super sandwich ADN" (chargé négativement) de manière électrostatique.

Une autre équipe a développé un feuillet nanocomposite composé de $MoS_2 - AuNPs$ afin d'augmenter encore le changement d'indice de réfraction générant l'amplification [87]. Le principe d'amplification utilisé est présenté sur la figure I.28 suivante.

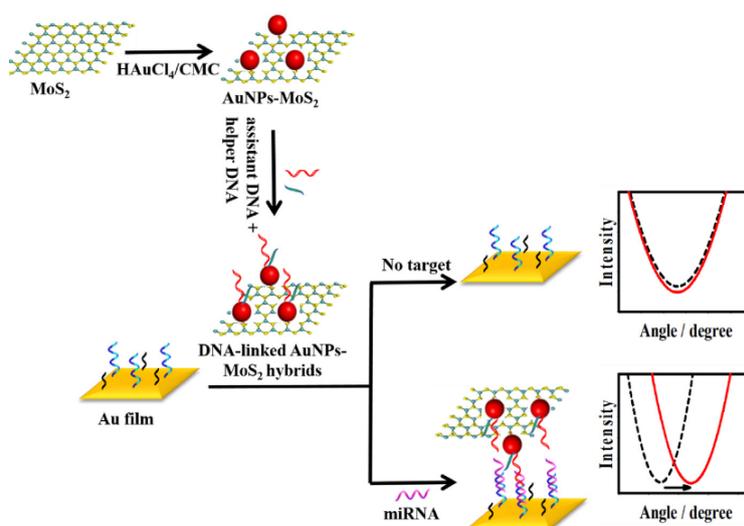


FIGURE I.28 – Représentation schématique de l'amplification du signal SPR grâce à des nanocomposites formés de feuillets de MoS_2 sur lequel se trouvent des nanoparticules d'or pour la détection de micro-ARN. Figure originale de l'article de *Nie et al.*[87]

Toujours dans l'optique d'une amplification par sandwich, un film d'or est fonctionnalisé avec des simples brins d'ADN complémentaires de la cible à détecter (miARN-141), cette dernière est injectée dans le banc SPR à très faible concentration en dessous de la limite de détection. Dans un second temps, des nanocomposites formés de feuillets de MoS_2 sur lequel des nanoparticules d'or ont été synthétisées puis fonctionnalisées sont injectés dans le système pour former un sandwich avec le miARN. Avec ce système d'amplification, une limite de détection de 0,5 fM du miARN-141 a été atteinte.

Une des limites de ces protocoles d'amplification par des nanoparticules est l'adsorption

non spécifique de ces dernières, soit par simple gravité, soit pour des raisons électrostatiques : plus le diamètre de la particule est élevé, plus l'adsorption est importante. Plus récemment, une méthode développée par *Špringer et al.* permet de s'affranchir de cette adsorption non spécifique, toujours pour de la détection de miARNs par SPRI [157]. Elle se base également sur une méthode d'amplification par sandwich dont les différentes étapes sont développées sur la figure I.29. Une

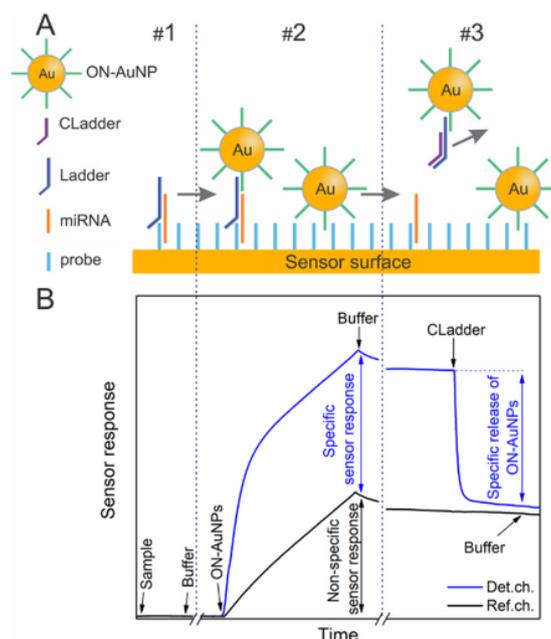


FIGURE I.29 – Représentation schématique de l'amplification du signal SPR grâce à la relâche de nanoparticules d'or pour la détection de micro-ARN. Figure de l'article de *Špringer et al.*[157]

sonde ADN est immobilisée en surface, le miARN cible est injecté dans le système SPRI suivi d'un autre brin d'ADN (ladder) dont seulement une partie de sa séquence est complémentaire avec celle de l'ARN. Ensuite, des AuNPs fonctionnalisées d'un brin d'ADN complémentaire à ladder viennent se fixer sur le complexe, mais également de manière non spécifique sur la surface. Enfin, un brin d'ADN avec une séquence de plus grande affinité (T_m plus élevée) avec la séquence ladder qu'avec le micro-ARN vient arracher le complexe ladder/AuNP de la surface. C'est ce signal négatif, correspondant à toutes les nanoparticules qui se sont décrochées de la cible, qui est proportionnel à la concentration initiale de miARN que l'on souhaite mesurer. On s'affranchit ainsi du signal dû à l'adsorption non spécifique des nanoparticules en surface. Cette méthode d'amplification par relâche des AuNPs a permis de descendre la limite de détection à quelques centaines d'attomolaires, ce qui correspond à une amélioration de deux ordres de grandeur comparée aux méthodes classiques de sandwich par nanoparticules.

I.4.2. Utilisation de plasmons localisés

Dans la partie précédente, différentes méthodes d'amplification basée sur l'augmentation de l'indice de réfraction effectif du milieu d'analyse ont été détaillées et illustrées. Dans le cas de la SPRI, il est également possible de venir jouer sur la géométrie de la couche d'or de la biopuce afin d'amplifier le signal en exaltant directement le signal plasmonique provenant de cette couche d'or.

Il est possible d'agir sur différents paramètres afin d'obtenir des structures variées sur la surface d'or. Elles peuvent être de différentes tailles (micro- ou nanométrique) ou formes, avoir un relief positif ou négatif suivant les effets de champs recherchés. Ces structures métalliques vont permettre l'excitation de plasmons de surface localisés (LSP : localized surface plasmon, voir partie I.1.2.2) différents des plasmons de surface propagatifs (SPP) obtenus sur un film d'or plan (principe détaillé dans la partie I.2.1 précédente).

Ces structures peuvent être réalisées directement sur le substrat diélectrique. *Joshi et al.* ont ainsi réalisé sur un substrat de verre des nanoprismes d'or (35 nm de côté, 8 nm de hauteur) fonctionnalisés avec de simples brins d'ADN. Lors de l'ajout des cibles complémentaires, la longueur d'onde de résonance des nanostructures ($\lambda_{LSPR} = 797\text{nm}$) des prismes se décale. Ce biocapteur a permis de détecter des miARNs dans du plasma sanguin dilué (figure I.30). Ces structures donnent lieu à une détection quatre fois plus sensible (jusqu'à des concentrations de 50 fM) qu'avec la méthode standard de PCR par transcription inverse[136].

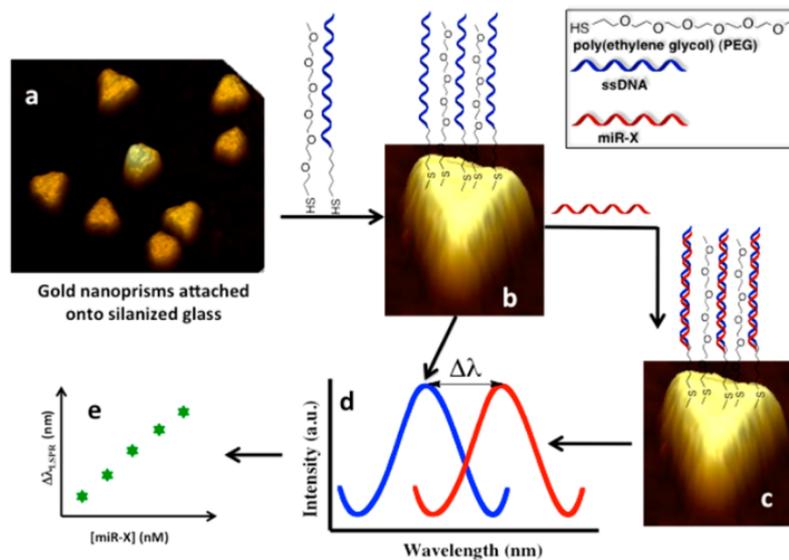


FIGURE I.30 – Représentation schématique des différentes étapes lors de la détection de miARNs avec des nanoprismes d'or sur un substrat de verre en suivant le décalage de la LSPR. Figure originale de l'article de *Joshi et al.*[136]

Différentes formes et tailles de structures à relief positif ont été utilisées afin d'examiner leur impact sur le transport de masse des cibles ainsi que sur les constantes thermodynamiques d'hybridation entre ARN et ADN (constante d'association k_a et de dissociation k_d). Cette étude a été réalisée à l'aide d'un système de SPR en configuration de Kretschmann. Les résultats montrent que les différentes structures n'impactent pas la thermodynamique, seulement le transport de l'analyte à la sonde en fonction du facteur de remplissage des structures sur la surface de la biopuce [158].

Également, des structures suivant un relief négatif sont envisageables. *Frang et al.* ont mis au point un substrat multicouche formé de nanotrous (figure I.31) permettant l'exaltation du signal SERS (*Surface Enhanced Raman Scattering*) de la rhodamine pour la détection de brin d'ADN. La limite de détection atteinte avec cette géométrie de nanotrous est de l'ordre du picomolaire.

Toujours sur un principe de nanostructuration par relief négatif de la couche d'or, *Masud et al.* ont fabriqué par électro-déposition des substrats d'or mésoporeux (figure I.32). Par la suite,

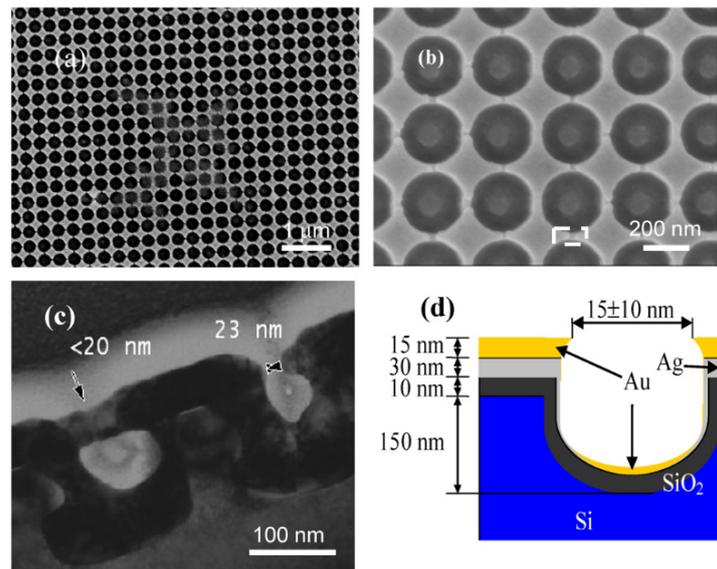


FIGURE I.31 – (a) et (b) Images MEB vue du dessus des nanostructures sous forme de trous. (c) Image TEM en vue en coupe de l'échantillon. (d) Schéma en coupe des différentes couches de matériaux présents pour la fabrication des nanotrous d'or et d'argent sur un substrat de silicium. Figure d'origine de l'article de *Fang et al.*[159]

ce substrat a permis d'atteindre par détection électrochimique une limite de détection de 100 attomolaires du miARN-9-2.

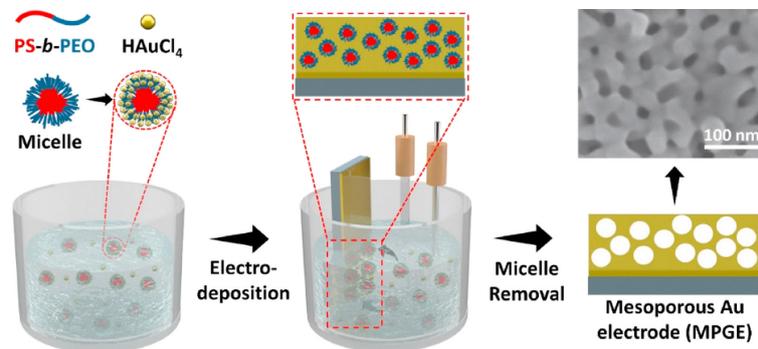


FIGURE I.32 – Représentation schématique de la préparation d'un substrat d'or mésoporeux par électro-déposition à l'aide micelles polymères comme précurseur de la réaction chimique. Figure d'origine de l'article de *Masud et al.*[160]

Tous ces types de nanostructures de la couche métallique peuvent permettre un couplage entre le SPP du film d'or plan et LSP des nanostructures. Ainsi, des études précédentes réalisées dans l'équipe du LCF ont porté sur des nanocylindres d'or disposés sur un film d'or plan afin d'étudier l'effet de leur taille et de leur espacement sur le couplage de ces deux modes plasmoniques en configuration de Kretschmann avec un système de SPR [161]. Les résultats expérimentaux montrent que la résonance couplée est particulièrement intense aux coins supérieurs et inférieurs des cylindres (figure I.33).

En utilisant ce principe de couplage du SPP et des LSP du réseau de nanostructures, *Bryche et al.* ont montré que cette configuration pouvait améliorer la détection plasmonique en se concentrant sur une fonctionnalisation spatialement localisée sur les "points chauds" des

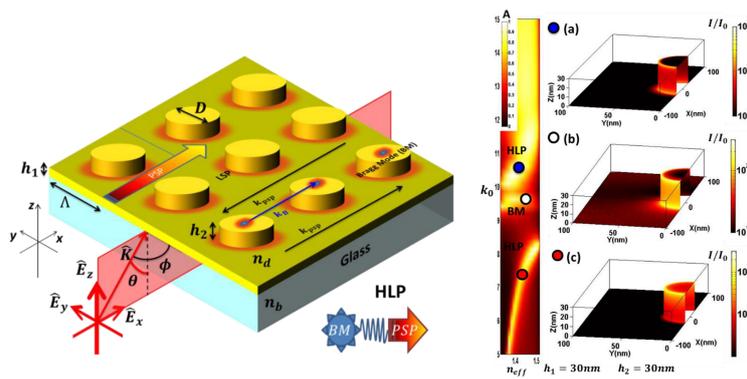


FIGURE I.33 – À gauche : géométrie de la structure étudiée qui consiste en un arrangement périodique de cylindres d'or sur un film d'or plan, le tout déposé sur une lame de verre. À droite : distribution normalisée de l'intensité du champ en échelle logarithmique des différents modes possibles sur une demie-période. Figure d'origine de l'article de *Sarkar et al.*[161]

nanostructures. Ainsi, lorsque les sondes de capture sont immobilisées uniquement dans ces zones où le champ plasmonique est exalté, la réponse plasmonique résultant de l'hybridation de ces sondes avec leur complémentaire est également amplifiée. L'article présente une preuve de concept à travers des mesures SERS, en comparant des substrats nanostructurés de cylindres avec une fonctionnalisation soit localisée, soit homogène de la surface [162].

Même si la plupart de ces géométries de nanostructuration se sont prouvées efficaces pour d'autres types de détection que la SPR, l'amplification plasmonique peut également s'appliquer à tout autre type de détection plasmonique, notamment dans notre cas à la SPRI en venant nanostructurer la biopuce.

I.4.3. Combinaison des deux approches : amplification en volume et en surface

L'excitation de LSP en complément du SPP représente une voie très prometteuse pour l'amplification du signal SPR, car elle n'exige pas de temps d'analyse supplémentaire, contrairement à la méthode sandwich. Cependant, l'amplification du signal par les LSP reste limitée, généralement entre un et deux ordres de grandeur. Pour cette raison, la combinaison de ces deux méthodes d'amplification semble une approche optimale pour abaisser la limite de détection à des niveaux inférieurs à la centaine de femtomolaire dans le cadre de la détection par SPRI. Plusieurs équipes de recherche ont déjà développé des biocapteurs inspirés par cette idée de couplage entre ces deux techniques d'amplification.

Lee et al. ont réalisé une biopuce SPR basée sur un réseau de diffraction renforcé par des nanoparticules d'or (figure I.34). Dans ce système, le réseau est fabriqué de microstructures servant à exciter le mode de SPP sur lesquelles, après hybridation avec le miARN cible, sont absorbées des nanoparticules d'or en sandwich afin de coupler leur LSP et de créer une biocapteur plus sensible. Cette technique permet la détection de miARNs jusqu'à quelques picomolaires en concentration [134].

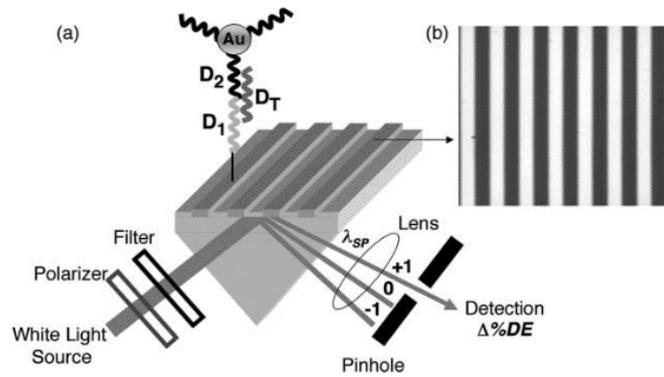


FIGURE I.34 – (a) Représentation schématique de l'expérience de détection sur un système de SPRRI en combinant un réseau de microstructures et des nanoparticules d'or. (b) Image au microscope optique du réseau de diffraction utilisé. Figure d'origine de l'article de *Lee et al.*[134]

Sur un principe très similaire, *Z. Mousavi et al.* ont fabriqué une biopuce SPR avec cette fois un réseau de taille nanométrique. Dans ce cas-ci, le réseau est fabriqué sur un substrat de polycarbonate où seulement les structures qui ressortent sont en or. Entre ces structures nanométriques, le substrat est toujours visible ce qui permet de venir fonctionnaliser spécifiquement les zones d'or où le champ est le plus fort (figure I.35 (c)). Leur protocole

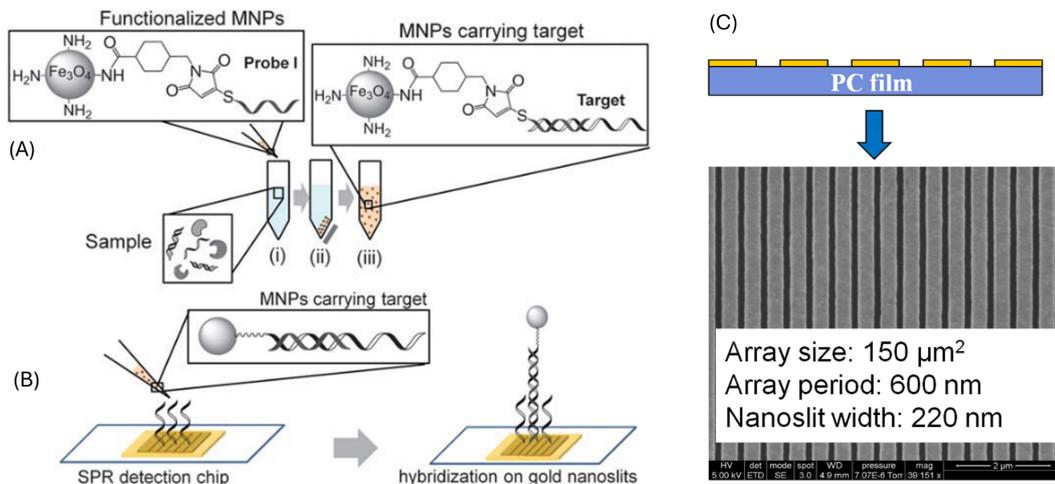


FIGURE I.35 – (A) Représentation schématique de la séparation des miARNs grâce à des nanoparticules magnétiques fonctionnalisées. (B) Illustration de l'étape de détection par SPR sur une biopuce nanostructurée. (C) Schéma et image MEB de la biopuce nanostructurée par lithographie d'impression. Figures d'origine de l'article de *Z. Mousavi et al.*[163]

commence par l'isolation des miARNs en solution en utilisant des nanoparticules magnétiques (MNP) fonctionnalisées. Ensuite, le complexe MNP/miARN est déposé sur la biopuce nanostructurée et la partie restant libre du micro-ARN vient s'hybrider en sandwich sur le biorécepteur immobilisé sur les nanostructures. Cette méthode de détection permet de baisser la limite de détection pour des miARNs jusqu'à 30 femtomolaires [163].

Plus récemment, *Hu et al.* ont fabriqué sur du verre des nanocubes d'or séparés par un polymère amorphe (CYTOP) et fonctionnalisés avec une sonde ADN en épingle. Une

amplification orthogonale du signal (OSA : *orthogonal signal amplification*) est réalisée (figure I.36) [164].

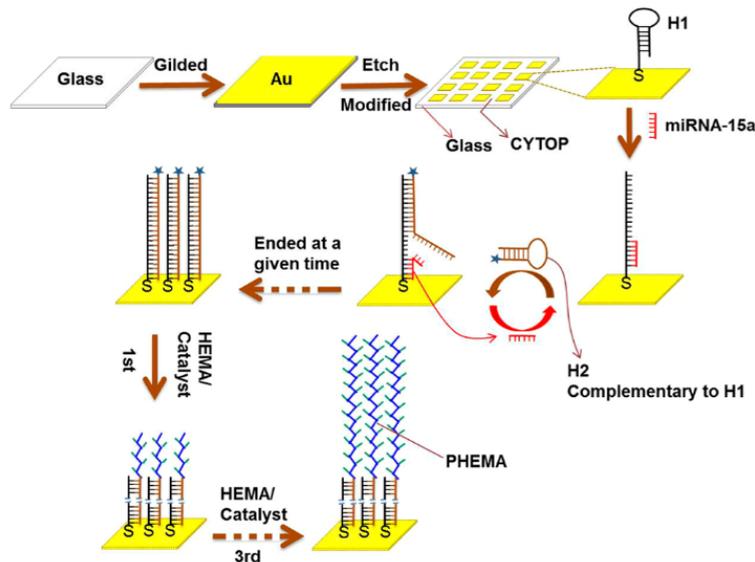


FIGURE I.36 – Représentation schématique de l'amplification orthogonale avec ces différentes étapes successives pour la détection de miARN-15a. Figure d'origine de l'article de *Hu et al.*[164]

Elle démarre par une première étape d'amplification horizontale : hybridation ADN/ADN initiée par l'hybridation du miARN qui permet d'ouvrir la sonde ADN pour l'arrivée d'un plus grand brin d'ADN. L'étape suivante est une amplification verticale : élongation vers le haut du duplex ADN/ADN par polymérisation. Tout cela est réalisé avec un système de SPRI pour la détection du miARN-15a jusqu'à une concentration de 5 fM dans du sérum humain sur une expérience durant plusieurs heures.

En conclusion, l'association de LSP avec le SPP de la biopuce, couplée à une amplification en sandwich, permet d'atteindre des limites de détection très faibles rentrant dans les objectifs du projet. Bien que les méthodes présentées soient souvent longues et nécessitent plusieurs étapes avant d'obtenir une mesure quantitative, il est possible d'imaginer des alternatives plus rapides qui pourraient en optimisant le processus d'amplification par sandwich. Toutefois, le frein majeur reste le coût et la complexité de fabrication des surfaces d'or nanostructurées qui limite fortement la quantité et la répétabilité des substrats disponibles. Or, pour des développements applicatifs tel que celui de ce travail de thèse, un grand nombre de substrats est nécessaire pour optimiser les différentes étapes du protocole.

I.5. Fabrication de nanoparticules d'or fonctionnalisées

Dans la partie précédente, l'utilisation de nanoparticules d'or (AuNPs) est très récurrente pour l'amplification du signal SPR. Tout d'abord, de la même façon que pour la chimie de surface, l'étape d'amplification doit rester biocompatible et ne pas perturber la détection ; dans ce contexte, l'or reste toujours un choix sûr. La fabrication d'AuNPs par voie chimique ou physique sont des procédés connus depuis très longtemps, relativement simple de mise en œuvre et assez rapide. Également, l'affinité des atomes d'or avec les thiols (groupement $-SH$ présenté

dans la partie I.3 précédente) rendent ces nanoparticules fonctionnalisables sans difficulté. Cette partie compare en premiers les différentes manières d'obtenir des nanoparticules d'or sphériques puis comment les fonctionnaliser pour une utilisation d'amplification en SPRI.

I.5.1. Obtention de nanoparticules d'or

C'est en 1857 que Faraday réduit pour la première fois des sels d'or de tétrachloroaurate ($HAuCl_4$) par du phosphore dans du disulfure de carbone et ainsi produit les premières AuNPs par voie chimique. Depuis, la préparation d'AuNPs avec des tailles et des formes variées, mais contrôlées, a attiré une attention considérable de la communauté scientifique au cours du XX^{ème} siècle. Trois méthodes sont classiquement utilisées pour fabriquer des AuNPs : de manière chimique, physique ou plus récemment biologique.

I.5.1.1. Par voie chimique

Les protocoles chimiques de synthèse d'AuNPs sont appelées des procédures "bottom-up". Dans ce cas, la formation des AuNPs se fait à partir de molécules individuelles, voir d'atomes individuels, car elle implique une réaction chimique qui va évoluer en fonction du temps. Cette méthode de réduction chimique comporte deux étapes : la nucléation et la croissance successive. Lorsque ces deux étapes sont réalisées lors du même processus, on parle alors de synthèse in-situ ; dans le cas contraire, le terme de méthode par croissance grâce à l'amorçage d'une petite nanoparticule ($< 10nm$) est utilisé, mais concerne la synthèse de nanoparticules avec des formes plus complexes. Étant donné que seule la synthèse de nanoparticules sphériques ou quasi-sphérique est recherchée, uniquement les synthèses in-situ seront détaillées dans la suite de cette partie.

En général, la synthèse in-situ d'AuNPs comprend deux étapes principales : la réduction des sels d'or à l'aide de divers agents réducteur (borohydrures, aminoboranes, les alcools, certains alcools...) puis la stabilisation des nanoparticules en formation par d'autres molécules chimiques (citrate, ligands soufrés, azotés ou oxygénés, polymères, surfactants...) [165]. Les principales méthodes de synthèse utilisant cette stratégie sont la méthode de Turkevich et de Brust-Schiffrin ainsi que tous leurs dérivés plus récents.

Méthode de Turkevich : citrate en tant que stabilisant et agent réducteur.

Parmi toutes les synthèses d'AuNPs in-situ par réduction de $HAuCl_4$, celles stabilisées au citrate sont considérées comme les plus populaires depuis leur introduction par Turkevich en 1951 [166]. Le protocole est le suivant : la solution de $HAuCl_4$ est portée à ébullition, le citrate trisodique dihydraté est ensuite rapidement ajouté sous forte agitation magnétique dans le ballon (figure I.37). Plus précisément, l'étape initiale de ce processus est l'oxydation du citrate pour donner de l'acétone dicarboxylique. Ensuite, les sels d'or "auric" sont réduits en Au_0 et sels d'or "aurous". Les atomes Au_0 servent enfin de précurseur autour desquels les sels "aurous" viennent s'assembler pour former les AuNPs. Ainsi, dans cette méthode, le réel stabilisateur des AuNPs est l'acétone dicarboxylique plutôt que le citrate lui-même. Après seulement quelques minutes, une suspension colloïdale rouge vin est obtenue avec des AuNPs d'environ 10 à 20 nm en suspension.

En 1973, Frens publie un protocole amélioré de la méthode de Turkevich [167]. En contrôlant le ratio citrate/sels d'or, il est capable d'obtenir une large gamme de taille de nanoparticules entre 15 et 150 nm de diamètre. Cependant, cette méthode connaît également ses limites puisque les

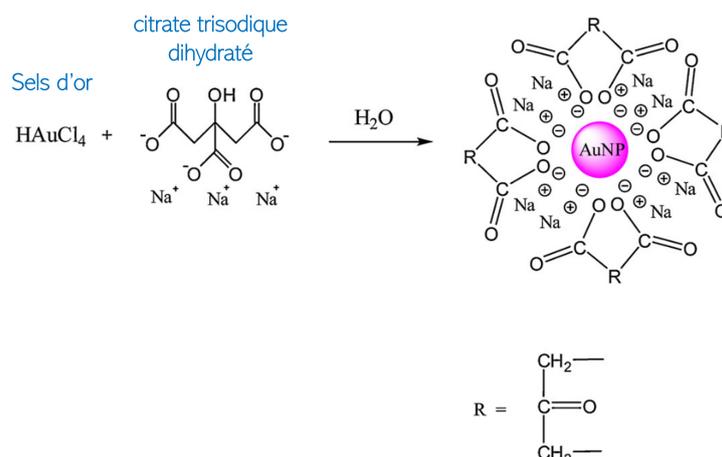


FIGURE I.37 – Étapes de la synthèse des nanoparticules d'or avec la méthode de Turkevich.
Figure d'origine de l'article de *Zhao et al.*[165]

synthèses incluant des nanoparticules au-dessus de 20 nm restent très polydispersées.

Dérivé de la méthode de Turkevich : mélange inversé des réactifs.

Une première modification remarquable de la méthode de Turkevich consiste à inverser l'ordre dans lequel les réactifs sont introduits dans le ballon : ajout de la solution de sels d'or dans la solution de citrate. Cette méthode a permis de produire des AuNPs monodispersées de taille relativement petite (moins de 10 nm) [168].

Dérivé de la méthode de Turkevich : citrate en tant que stabilisant seulement.

Du fait de son faible potentiel réducteur, le citrate peut seulement être utilisé dans ce cas-ci pour des synthèses à haute température. Cependant, c'est un excellent agent stabilisateur qui peut être utilisé à plus basse température avec d'autres agents réducteurs. En 1985, *Slot et Geuze* ont mis au point une nouvelle synthèse en utilisant comme réducteur de l'acide tannique tout en gardant le citrate comme stabilisant, faisant ainsi baisser la température de synthèse à 60°C [169]. Onze ans plus tard, *Brown et al* ont introduit une méthode de synthèse utilisant toujours le citrate comme stabilisateur mais le NaBH_4 comme agent réducteur. Cette fois-ci les AuNPs sont obtenus en ajoutant aux sels d'or dilués un mélange de citrate/ NaBH_4 à température ambiante formant ainsi des nanoparticules de petites tailles autour de 6 nm seulement [170].

Méthode de Brust-Schiffrin : utilisation de ligands thiolés comme stabilisant.

La synthèse d'AuNPs stabilisées par des ligands thiolés fut reportée pour la première fois par *Mulvaney et Giersing* en 1993. Ils ont démontré la possibilité d'utiliser des chaînes alcanes thiolées de différentes longueurs pour stabiliser des AuNPs [171]. C'est une année plus tard, que *Brust et Schiffrin* ont développé la première méthode de synthèse bi-phases in-situ d'AuNPs utilisant des ligands thiolés comme stabilisants et le NaBH_4 comme réducteur qui a rencontré un très grand succès [172]. Cet impact élevé est dû au fait que cette synthèse à plusieurs avantages. Tout d'abord, elle est simple d'exécution et à température ambiante. D'autre part, les AuNPs ont une grande stabilité thermique, aqueuse et dans l'air lorsqu'elles sont fabriquées de cette façon là ; elles résistent à plusieurs cycles de centrifugation sans signe de décomposition ni d'agrégation. Enfin, il est possible de contrôler de très petites tailles ($< 5\text{nm}$) tout en gardant une dispersion étroite et leur fonctionnalisation est rendue plus simple par substitution des ligands. Cette méthode de synthèse a été reprise dans beaucoup de protocoles afin de créer des protocoles plus simples à

une seule phase utilisant d'autres solvants, tels que le méthanol, l'éthanol ou l'eau [165].

Les méthodes par voie chimique ont l'avantage de contrôler assez précisément la taille des nanoparticules souhaitées tout en ayant une dispersion relativement faible. Cependant, ces techniques sont plutôt privilégiées pour fabriquer des AuNPs de petites tailles ($< 50\text{nm}$), au-delà, la dispersion en taille des AuNPs devient trop grande. C'est pour cette gamme de taille que les méthodes par voie physique deviennent intéressantes.

I.5.1.2. Par voie physique

Dans cette partie, on retrouve les protocoles d'obtention d'AuNPs par voie physique. Certains d'entre eux restent des procédés "bottom-up", mais la réaction de synthèse est déclenchée par un phénomène physique, par exemple une irradiation : réduction photochimique de l'acide aurique. Dans la catégorie "bottom-up", on retrouve aussi toutes les méthodes de fabrication par lithographie et dépôt d'or sur des substrats physiques. Également, lorsqu'il s'agit de fabrication par voie physique, certains procédés rentrent dans la catégorie "top-down", ils commencent avec un morceau d'or de taille conséquente, souvent un film ou une boule, suivie d'une procédure de structuration à l'échelle nanométrique au cours de laquelle la majeure partie du morceau d'or est enlevée, permettant d'obtenir des nanoparticules d'or d'une échelle et forme prédéterminée. Ce genre de méthodes sont dites plus "vertes" que les méthodes chimiques, car elles ne requièrent pas l'utilisation de produits chimiques toxiques tels que les réducteurs.

Synthèse photochimique déclenchée par irradiation

Les processus photochimiques ont suscité une attention particulière dans la fabrication de nanoparticules métalliques en raison du contrôle spatial et temporel amélioré qu'offrent ces techniques [165]. Le principe de ce procédé de synthèse consiste à exposer des solutions contenant les précurseurs métalliques à une source lumineuse (lumière visible[173], UV[174] ou rayonnements gamma[175]). Cette étape permet de déclencher la réduction du métal précurseur qui passe de son état Au^{3+} à son état Au^0 , ce dernier forme des centres de nucléation qui se développent et s'agrègent pour former des nanoparticules. Dépendamment de la source utilisée, il faut choisir un réducteur qui absorbe dans les bonnes longueurs d'onde afin de permettre l'initiation de la réaction chimique [176]. Durant la synthèse, la morphologie et la taille des nanoparticules sont principalement contrôlées par le pH du milieu et le temps d'irradiation en plus de la concentration en sel d'or. Des nanoparticules sphériques seront préférentiellement synthétisées dans un milieu basique avec un pH autour de 9 alors que des nanorods auront besoin d'un pH acide autour de 4 [177]. Dans une démarche de trouver des méthodes de synthèse d'AuNPs "plus vertes", l'équipe de *Unal et al.* a réalisé leur synthèse sous lampe UV en utilisant de l'extrait de chou rouge, matière première renouvelable, comme stabilisateur et réducteur de la réaction chimique [174]. À pH 11, ils ont pu produire des AuNPs sphériques uniformes entre 18 et 30 nm de diamètre. Également, *Annadhasan et al.* ont démontré qu'il était possible de réaliser la synthèse d'AuNPs uniquement grâce à la lumière du soleil comme source d'irradiation. Pour se faire, ils ont utilisé le N-cholyl-L-valine (*NaValC*) en tant que réducteur et stabilisant qui a permis la synthèse d'AuNPs à pH 9 après une illumination au soleil de 20 min [173].

Ces méthodes sont avantageuses comparées aux méthodes chimiques classiques présentées dans la partie précédente car elles évitent l'utilisation de produits chimiques nocifs, ne demandent pas de personnels qualifiés de laboratoire et peuvent se réaliser dans des conditions ambiantes

de température et pression. Cependant, le contrôle de la taille et surtout de la dispersion reste moins bien maîtrisé que pour des procédés de chimie classiques.

Utilisation de techniques de lithographie

L'une des techniques "bottom-up" par voie physique les plus utilisées pour fabriquer des AuNPs est la lithographie. Elle peut être de différents types : photolithographie UV, électrolithographie par faisceau d'électrons, lithographie par faisceau d'ions focalisés, lithographie par interférence (utilisée pour réaliser des motifs sans l'utilisation d'un masque). Toutes ces techniques permettent de former des nanostructures de formes multiples avec un contrôle dimensionnel sur une échelle de dizaines de nanomètres. La procédure commence par l'étalement sur le substrat d'une couche sacrificielle puis d'une résine sensible au faisceau incident. Lorsque cette résine est exposée au faisceau, elle se dissocie en segments de polymères plus petits qui peuvent être sélectivement enlevés avec un agent de développement. De cette façon, les motifs inscrits avec le faisceau permettent la formation d'ouvertures à l'échelle nanométrique dans la couche de résine dans lesquelles de l'or peut être déposé. Une fois le dépôt réalisé, le reste de la résine non exposée et l'or qui a été déposé dessus peut être enlevé facilement à l'aide de solvant (souvent de l'acétone). Cette technique de "lift-off", permet de former des nanostructures sur la couche sacrificielle. La dernière étape consiste à dissoudre cette dernière couche afin de relâcher les nanoparticules du substrat [178].

Cette méthode de fabrication présente un avantage évident : une très bonne fidélité de la forme des nanoparticules. En revanche, le coût et la complexité de fabrication sont beaucoup plus importants que les méthodes par voie chimique et les tailles ne descendent pas en dessous de la résolution de la lithographie, soit 10 nm dans le meilleur des cas.

Ablation par laser en milieu liquide (LASiS pour *Laser ablation synthesis in liquid solution*)

L'ablation par laser d'une cible solide dans un milieu liquide est devenue une approche "top-down" considérée comme "verte" de plus en plus populaire pour produire des suspensions colloïdales métalliques. Cependant, cette technique produit généralement des nanoparticules assez grandes (entre 30 et 300 nm) et très dispersées en raison de l'agrégation post-ablation des nanoclusters en solution [179]. Les conditions de la synthèse sont données par, d'une part, par le matériel (matériaux cible, solvant et soluté, température et pression du système) et d'autre part, les paramètres du laser (longueur d'onde, durée, énergie, taux de répétition, nombre d'impulsions et surface du spot sur la cible) (figure I.38).

L'utilisation d'un laser femtoseconde au lieu d'un laser nanoseconde a permis de réduire significativement la taille des nanoparticules obtenues, autour de 2 nm de diamètre, avec une dispersion autour de 1 nm [181]. De la même façon que pour la synthèse photochimique, le pH de la solution joue un rôle très important lors de la synthèse : plus le pH devient acide plus la taille des nanoparticules augmente (passant de 2 nm à 20 nm) ainsi que la dispersion.

Cette méthode de synthèse possède de nombreux avantages, comme la compatibilité avec de nombreux procédés "verts" ne nécessitant pas l'utilisation de produits chimiques toxiques et qui ne produit pas de déchets, elle est également peu coûteuse car elle ne requiert pas de produits consommables. Cependant, comparée à des méthodes plus anciennes, telle que la synthèse chimique, elle ne permet pas encore la production de nanoparticules en grandes quantités et le contrôle de la forme reste très limité. De plus, pour l'application visée par cette thèse, pour

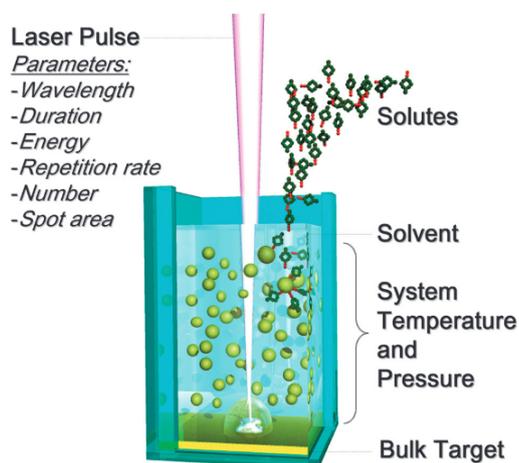


FIGURE I.38 – Représentation schématique du setup expérimental lors de la fabrication de nanoparticules par LASiS. Figures d'origine de l'article de *Amendola et al.*[180]

rester dans une faible dispersion la taille des nanoparticules devient trop petite pour l'amplification souhaitée.

Ainsi, plusieurs méthodes de fabrication de nanoparticules par voie physique existent comme alternatives aux procédés classiques par voie chimique. Cependant, aucune de ces méthodes ne permet d'avoir à la fois un bon contrôle sur la forme et la taille des nanoparticules ainsi qu'une production à bas coût.

I.5.1.3. Par voie biologique

Plus récemment, toujours dans une optique de réussir à fabriquer des nanoparticules dans les conditions les plus écoresponsables (limitation des produits chimiques et des déchets ainsi qu'une utilisation minimale de matériel spécifique très coûteux), certains se sont tournés vers l'exploitation des micro-organismes ou des plantes en tant que site de nanofabrication appropriés. On sait depuis longtemps que les plantes et les micro-organismes sont capables de réduire les ions métalliques à la fois à leur surface et dans divers organes ou tissus éloignés du site de pénétration des ions. Sachant cela, les plantes (en particulier celles qui ont une très forte capacité d'hyperaccumulation et de réduction des ions métalliques) ont été utilisées pour extraire des métaux précieux de terrains dont l'exploitation minière serait économiquement injustifiable, une approche connue sous le nom de *phytomining*. L'étude du processus de bioaccumulation des métaux dans les plantes a révélé que ces métaux sont généralement déposés sous forme de nanoparticules. Sachant cela, de nombreux micro-organismes, tels que des bactéries [182], des champignons [183] ou des levures, ainsi que des plantes [184] ont été étudiés pour la synthèse de nanoparticules métalliques.

Sangaru et al ont comparé la synthèse d'AuNPs générée à partir de champignons (*Cooletitrichum* sp.) et de plantes (feuilles de géranium). Alors que les nanoparticules synthétisées avec le champignon sont principalement sphériques et plutôt polydisperses (entre 20 et 40 nm) une variation intéressante dans la forme des nanoparticules a été observée pour celles synthétisées avec les feuilles de géranium. Dans ce cas-ci, les AuNPs présentaient un mélange de morphologies entre des disques plats polycristallins et des bâtonnets [183].

Sans utiliser les plantes dans leur totalité et donc éviter des étapes d'extraction, d'isolation

et de purification du matériel biologique, il est possible d'utiliser des extraits de plantes afin de réaliser la bioréduction des ions métalliques. Cette approche apporte plus de flexibilité sur la taille et la forme des nanoparticules et permet des synthèses beaucoup plus rapides. *Ghosh et al.* ont réalisé la synthèse d'AuNPs en utilisant de l'extrait de fleurs de *Gnidia glauca* (fleurs d'un arbuste d'Afrique tropicale). La synthèse des AuNPs a pris 20 minutes à une température de 50°C pour former des nanoparticules principalement sphériques autour de 10 nm de diamètre (quelques nano-triangles et nano-hexagones étaient également présents).

Cette nouvelle voie de synthèse de nanoparticules d'or présente une très belle alternative aux synthèses chimiques, encore utilisées en majorité dans l'industrie ainsi que la recherche. Cependant, plusieurs verrous restent à ouvrir afin d'en faire une méthode viable et transposable à de grandes quantités pour rentrer dans les exigences du marché. Les tailles et les formes obtenues sont encore très hétérogènes avec beaucoup de dispersion.

En conclusion, dans cette partie, un grand nombre de techniques de synthèses de nanoparticules ont été répertoriées, en commençant par la classique synthèse par voie chimique, en passant par des procédés plus modernes utilisant des phénomènes physiques ou physico-chimiques pour terminer par une technologie plus récente, mais pas encore tout à fait mature de biosynthèse utilisant des ressources biologiques pour réaliser la synthèse de nanoparticules d'or. Dans le cadre de ce travail, nous avons choisi d'utiliser une synthèse par voie chimique, dérivée de la méthode de Brust-Schiffrin, qui sera décrite dans le chapitre 3.

I.5.2. Fonctionnalisation des nanoparticules d'or

Une fois les nanoparticules synthétisées, il est nécessaire de les fonctionnaliser afin de les rendre spécifique à l'application visée. Dans cette partie, on décrira seulement la fonctionnalisation de nanoparticules obtenues par voie chimique, étant la technique synthèse retenue pour réaliser des petites nanoparticules sphériques ($< 50nm$) peu dispersées en taille et de manière reproductible. Dans ce cas, dépendamment de la méthode choisie (voir partie I.5.1.1), les AuNPs sont plus ou moins stables dans leur solution, le tout appelé suspension colloïdale biphasée : particules solides dispersées dans une phase liquide continue. La phase liquide choisie, la concentration en nanoparticules ainsi que le stabilisant utilisé affectent grandement la stabilité de la suspension colloïdale. Dans la majorité des cas, la phase liquide est de l'eau, la même que celle de la synthèse. Cependant, en fonction de la méthode de synthèse choisie les forces d'interaction dans la solution peuvent être variées et influent sur sa stabilité : interactions faibles de type Van der Waals (entre les NPs ou les NPs et les molécules du solvant) ou électrostatiques (par exemple avec le stabilisant : citrate, surfactant divers...), interactions fortes par chimisorption (ligand thiolés) ou nano-adsorption (polymères sur la surface d'or)[185].

La synthèse d'AuNPs par la méthode de Turkevich, ainsi que tous ses dérivés à base de citrate, produit des nanoparticules stabilisées par des liaisons électrostatiques seulement et engendre beaucoup d'interactions de type Van der Waals au sein de la suspension colloïdale. Dans ce cas-ci, il est nécessaire de fonctionnaliser les nanoparticules afin de les rendre plus stables en solution et leur donner une fonctionnalité finale. Dans le cas de la méthode de Brust-Schiffrin, le stabilisant est déjà une molécule thiolée mais pas forcément celle que l'on souhaite utiliser pour l'application finale, car le choix de cette molécule couplée au thiol influence la stabilité de la synthèse [171]. Le terme d'échange de ligand est alors utilisé lorsque le stabilisant de la synthèse est remplacé par une

autre molécule venant s'adsorber à la surface de la nanoparticule. Les interactions responsables de l'adsorption peuvent être de nature physique (physisorption) ou chimique (chimisorption) selon les forces mises en jeu. La physisorption est généralement faible et réversible (possibilité de changer le ligand plusieurs fois) mais se caractérise par un taux d'adsorption élevé très peu contrôlé qui engendre souvent la formation de multicouches. La chimisorption se produit par le biais d'une liaison covalente (ou presque) entre la nanoparticule et l'espèce en solution, elle implique souvent une étape d'activation. L'adsorption chimique se caractérise par des changements d'énergie relativement élevés et un faible taux d'adsorption, mais très fort et irréversible se limitant à la formation de monocouche. La distinction entre l'adsorption chimique et physique est basée sur leur dépendance à la température : dans le premier cas, l'adsorption généralement augmente avec la température contrairement au deuxième qui a tendance à diminuer. Ce phénomène devient utile pour changer le ligand d'une suspension colloïdale en contrôlant la température. Dépendamment de la fonction souhaitée pour la nanoparticule, le ligand final est choisi afin d'avoir une interaction plus ou moins forte avec la nanoparticule.

Dans le cas de l'utilisation d'AuNPs comme molécules sandwich en SPR, une grande stabilité de la suspension colloïdale et une forte interaction avec le ligand sont recherchés : la chimisorption est alors privilégiée lors de l'échange du ligand. Une méthode très efficace de fonctionnaliser de l'or, déjà mentionnée dans ce manuscrit, est l'utilisation de molécules thiolées (groupement $-SH$ en un bout) formant une monocouche autoassemblée sur le substrat. À la suite de ce groupement, plusieurs catégories de molécules peuvent être greffées : protéines, polymères, oligonucléotides, anticorps... La suite de cette partie détaille quelques méthodes de fonctionnalisation d'AuNPs qui permettent l'ajout d'une séquence d'oligonucléotide libre et hybridable pour une utilisation dans le cas de la méthode sandwich.

Formation d'une monocouche d'oligonucléotides thiolés

Le protocole d'échange de ligand le plus simple et direct, revient à remplacer le stabilisant de la synthèse par des oligonucléotides thiolés. Cela permet d'obtenir directement des nanoparticules fonctionnalisées avec une monocouche d'oligonucléotides de la bonne séquence à leur surface. Cet échange de ligand se réalise à température ambiante dans un solvant spécifique (souvent le toluène) afin de privilégier la bonne réaction d'adsorption. Cette méthode présente toutefois des inconvénients, notamment un risque accru d'agréments irréversibles des nanoparticules, la difficulté de déterminer la quantité exacte de ligand échangé et la possibilité d'une substitution incomplète du ligand, notamment après une synthèse de Brust-Schiffrin. Une approche plus efficace consiste à choisir des synthèses dans lesquelles le stabilisant était faiblement lié tel que le citrate dans des synthèses de type Turkevich [186]. Selon cette méthode, *Javier et al* ont fonctionnalisé des AuNPs commerciales (sphères de 20 nm de diamètre) stabilisées au citrate par des oligonucléotides thiolés [187]. *Strohoff et al.* ont étudié la stabilité des AuNPs en fonction de la séquence qui suit le groupement thiol mettant en lumière que toutes les nanoparticules n'auront pas le même degré de stabilité dépendamment de la composition en base du ligand (A, T, C et G). Afin de laisser la séquence que l'on souhaite utiliser libre, loin de la surface de la nanoparticule pour une hybridation future efficace, il est très fréquent d'utiliser un espaceur sous forme d'un poly(X). Leur étude a révélé que les AuNPs étaient beaucoup plus stables lors de l'utilisation d'un poly(T). De plus, il a été observé que plus la longueur du poly(T) était importante, plus la stabilité des AuNPs augmentait. En d'autres termes, cela signifie que les

AuNPs s'agrègent moins rapidement et dans une moindre mesure [188] .

Cependant, ces nanoparticules sont stables dans leur solvant d'origine. Afin de réussir l'hybridation entre la séquence à la surface de la nanoparticule et son complémentaire, il est nécessaire de passer en milieu salin, perturbant ainsi les charges en solution et provoquant l'agrégation des AuNPs [189]. Afin de palier à ce problème, *Javier et al* ont dilué progressivement la solution obtenue avec du PBS (phosphate buffer saline : solution utilisée pour imiter le corps humain) jusqu'à atteindre une solution de PBS 1x. Cependant, ce genre de solution ne reste pas stable sur plusieurs jours (agrégations et adhésion des AuNPs au tube) et ne représente pas un véritable milieu complexe dans lequel d'autres molécules chargées se retrouvent et perturbent encore plus la suspension colloïdale [187].

Formation d'une couche de protéines

Il est très connu dans la littérature que les protéines s'adsorbent très facilement sur des surfaces métalliques [190], cette caractéristique peut également s'étendre à des nanoparticules métalliques [191]. Ce phénomène peut être utilisé afin de venir attacher sur la surface des AuNPs des protéines qui peuvent servir comme premier bloc dans leur fonctionnalisation et sur lesquelles il est ensuite possible de venir immobiliser des oligonucléotides : par exemple en utilisant la streptavidine et la biotine (principe expliqué dans la partie précédente 1.3.1). C'est sur cette méthode que l'équipe de *D'Agata et al.* a fonctionnalisé des AuNPs stabilisées au citrate, d'abord en réalisant l'adsorption de la streptavidine à la surface puis en ajoutant des oligonucléotides biotinylés [192].

L'utilisation d'une protéine comme première couche autour de la nanoparticule créer une sorte de barrière de protection permettant d'isoler la nanoparticule et de la rendre plus stable face aux changements d'environnement. Cependant, l'adsorption de protéines passe par trois étapes : le transport vers la surface, l'attachement puis l'étalement sur la surface. Cette dernière étape d'étalement peut impliquer la dénaturation de la protéine qui vient se déformer pour adhérer à la surface et ainsi utiliser ces sites de capture : il faut donc être vigilant sur le choix de la protéine. Également, étant dans le cas d'une adsorption non spécifique à la surface (physisorption) la protéine peut avoir tendance à bouger sur la surface, se déplacer, et les liaisons qui en découlent peuvent se retrouver affaiblies.

Encapsulation par des PEG

De la même façon que l'utilisation des protéines, les polymères forment une couche plus épaisse à la surface de la nanoparticule permettant une meilleure stabilité de la suspension colloïdale face aux changements d'environnement. En biologie, les PEG sont des molécules très utilisées pour toutes variétés d'application, ils ne présentent aucune toxicité, sont biocompatibles et bio-inertes, réduisent les adsorptions non spécifiques, tout en ayant une grande stabilité et solubilité dans l'eau [186]. Contrairement aux protéines, leur taille peut être choisie et ils peuvent être greffés d'un thiol afin de créer une monocouche dont l'adsorption chimique cette fois-ci est beaucoup plus forte et stable à la surface des nanoparticules.

Une première stratégie de fonctionnalisation d'AuNPs avec des PEG consiste à créer une monocouche mixte à la surface de la nanoparticule. Les AuNPs généralement utilisées sont stabilisées au citrate, puis un premier échange de ligand a lieu en introduisant des PEG thiolés mais en quantité contrôlée afin de ne pas saturer toute la surface. Dans un second temps, la molécule de choix, dans notre cas des oligonucléotides thiolés, sont introduits afin de remplir les derniers trous de la monocouche [193]. Une autre approche, consiste à choisir de recouvrir

entièrement la nanoparticule avec comme molécule de liaison des PEG thiolés se terminant par un groupement actif qui permet dans un second temps de venir attacher la molécule d'intérêt. Le terme de fonctionnalisation séquentielle est alors utilisé. La chaîne de PEG utilisée comme premier ligand fournit la stabilité nécessaire tandis que le ligand fonctionnel attaché à son autre extrémité libre est facilement disponible pour une interaction biologique [194]. Cette équipe a montré que la formation d'une couche polymère assez épaisse à la surface de la nanoparticule permet de la rendre beaucoup plus stable face aux changements d'environnement, notamment lors du passage de l'eau à une solution saline comme solvant. *Deka et al.* ont réussi à fonctionnaliser des AuNPs avec des oligonucléotides hybridables et les rendre stables jusqu'à une concentration en NaCl de 3 molaires.

Une autre approche récente proposée par *Huang et al.* consiste à utiliser un protocole de synthèse dérivé de Brust-Schiffrin : le réducteur utilisé reste le $NaBH_4$ pour une synthèse à température ambiante, mais les ligands thiolés servant de stabilisateur sont remplacés par un PEG diacide (double terminaison -COOH du polymère) [195]. De cette façon, l'étape de synthèse permet la formation de nanoparticules "pré-fonctionnalisées" qui sont déjà entourées d'une couche de PEG protectrice. Par la suite, des oligonucléotides thiolés sont rajoutés dans la solution précédente et incubés pendant 18 heures afin que la chimisorption des thiols s'organise sur la surface de la nanoparticule entre les chaînes de PEG.

Dans cette partie, différentes stratégies de fonctionnalisation des AuNPs ont été présentées, elles dépendent du degré de stabilité que l'on souhaite dans la suspension colloïdale et de l'utilisation future des nanoparticules. Pour une amplification par sandwich en SPR en milieu salin, une fonctionnalisation robuste face aux changements d'environnement doit être privilégiée. Nous avons donc choisi d'utiliser une couche protectrice de PEG mais avec une étape de fonctionnalisation supplémentaire pour permettre d'y greffer des oligonucléotides. Ceux-ci devant en plus rester accessible pour une future hybridation.

Pour conclure sur ce chapitre, la première partie dédiée à l'étude des différentes méthodes de détection d'oligonucléotides, pouvant être utilisées pour détecter des miARNs, a permis d'identifier la SPRI comme étant la technique la plus adaptée pour ce projet et suivant les compétences déjà présentes au sein des laboratoires. Cette technique permet une détection multiplexée grâce à l'imagerie et on trouve dans la littérature des fonctionnalisations de surface compatibles avec la détection de miARNs. Parmi les différentes méthodes d'amplification du signal qui rendent possible une détection à très faible concentration de cibles ($< 100 fM$), l'utilisation de nanoparticules d'or que l'on peut synthétiser et fonctionnaliser suivant les besoins est la plus intéressante.

Chapitre II

Système d'imagerie par résonance des plasmons de surface

II.1 Instrumentation	58
II.1.1 Biopuce couplée par un prisme	58
II.1.2 Partie optique	59
II.1.3 Système de fluidique	62
II.1.4 Régulation thermique	63
II.2 Bancs expérimentaux	63
II.2.1 Banc angulo-spectral	64
II.2.2 Banc Horiba	67
II.2.3 Comparaison des systèmes	69
II.2.3.1 Mesure du niveau de bruit	69
II.2.3.2 Mesure de réflectivité et de la sensibilité	71
II.2.3.3 Synthèse des caractéristiques des deux systèmes SPRI	73
II.3 Mesure de cinétique d'interaction entre le biorécepteur et l'analyte en SPRI . .	73
II.3.1 Modèle de cinétique d'interaction du premier ordre	74
II.3.2 Traitement des images et obtention des cinétiques expérimentales	76

Dans le chapitre précédent consacré à l'état de l'art, différents types de biocapteurs ont été présentés, avec une attention particulière portée à ceux utilisant la résonance des plasmons de surface qui est la méthode de détection choisie pour ce projet de doctorat. Dans ce chapitre, la réalisation d'un biocapteur par imagerie de la résonance des plasmons de surface est présentée à travers ses différentes composantes : la biopuce, les bras d'illumination et d'imagerie, le système de fluide ainsi que la régulation de la température. Dans une seconde partie, les deux bancs de SPRI utilisés durant cette thèse seront détaillés et leurs performances comparées.

II.1. Instrumentation

L'imagerie par résonance des plasmons de surface utilisée pour les expériences présentées dans ce manuscrit, repose sur l'interrogation en réflectivité. Pour des raisons de facilité de réalisation des biopuces, ainsi que pour des raisons historiques et de disponibilité des équipements au sein des équipes de recherche, le couplage de la lumière incidente avec la couche métallique de la biopuce, est réalisé via un prisme à haut indice de réfraction en configuration de Kretschmann (voir partie I.2.2).

II.1.1. Biopuce couplée par un prisme

Au centre d'un biocapteur SPR se trouve le transducteur, dans notre cas la biopuce, berceau des interactions biomoléculaires que l'on souhaite étudier. Elle est composée d'une lame de verre posée sur le prisme avec de l'huile d'indice, recouverte d'une couche de 2 nm de titane ou de chrome afin de faire adhérer la couche suivante de 50 nm d'or qui est l'épaisseur optimale pour permettre le couplage avec la lumière incidente à travers le prisme et l'excitation du plasmon de surface (voir annexe V.3) en configuration de Kretschmann. Afin de rendre le biocapteur spécifique, il est nécessaire de venir immobiliser à la surface du transducteur un biorécepteur complémentaire de la molécule d'intérêt que l'on cherche à détecter. Pour cela, la face dorée de la biopuce est fonctionnalisée par un protocole de chimie de surface qui sera détaillé dans le chapitre III qui suit.

Dans notre cas, la biopuce étant posée sur un prisme de verre, la continuité d'indice entre le prisme et la face de verre de la biopuce est faite en déposant une goutte d'huile de même indice que le verre, permettant l'excitation du plasmon de surface. L'utilisation d'un prisme pour générer le plasmon de surface nécessite de définir les différents angles d'incidence de la lumière sur le chemin optique du biocapteur. Dans la suite, l'angle d'incidence externe sera celui que

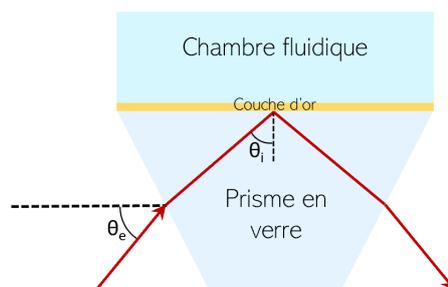


FIGURE II.1 – Représentation schématique des différents angles d'incidence sur le chemin optique. θ_i étant l'angle d'incidence interne et θ_e l'angle d'incidence externe

fait le faisceau lumineux par rapport à la surface du prisme, avant la réfraction dans ce dernier. L'angle interne sera défini comme étant l'angle entre le faisceau à l'intérieur du prisme et la normale à la biopuce posée sur le prisme. La représentation schématique de ces deux angles se trouve sur la figure II.1.

À partir de la loi de Snell-Descartes et de la trigonométrie, on obtient une relation pour relier ces deux angles d'incidence avec l'indice de réfraction du prisme (n_p) et l'angle au sommet du prisme (A_p). L'obtention de cette équation est détaillée en annexe B.1 de ce document.

$$\sin\left(\theta_e - \frac{A_p}{2}\right) = n_p \cdot \cos\left(\frac{A_p}{2} + \theta_i\right) \quad (\text{II.1})$$

II.1.2. Partie optique

Dans le chapitre de l'état de l'art sur la résonance des plasmons de surface (partie I.2.2), l'importance dans le choix du couple longueur d'onde et angle d'excitation a été discuté afin d'être dans les bonnes conditions de couplage pour une sensibilité optimale du biocapteur. Sur un banc expérimental en couplage par prisme, la lumière est envoyée d'un côté et collectée de l'autre côté du prisme. De ce fait, la partie optique du banc de mesure par SPRI peut être divisée en deux sous-éléments : le bras d'illumination et le bras d'imagerie. Ces deux bras doivent être alignés aux mêmes angles afin d'entrer en configuration de couplage et de collecter la lumière réfléchiée vers la caméra imageant l'échantillon.

Bras d'illumination

De ce côté, on retrouve en premier la source de lumière. Elle est définie par plusieurs paramètres : sa longueur d'onde associée à son spectre d'émission et son intensité, sa cohérence spatiale et temporelle ainsi que sa divergence.

Le choix de la longueur d'onde est fait afin d'avoir une bonne sensibilité de détection pour les interactions visées et la résolution spatiale nécessaire, celle-ci étant en partie limitée par la longueur de propagation du plasmon sur le film d'or (équation I.4 du chapitre I). Une bonne sensibilité signifie que l'on est capable de suivre l'interaction de petites molécules en faibles quantités à la surface de la biopuce. Une bonne résolution permet de venir imager une plus grande densité d'informations et d'avoir des zones fonctionnalisées plus petites, mais plus nombreuses dans le but de multiplexer la détection. Le bon compromis entre ces deux paramètres permettant de venir détecter des simples brins d'oligonucléotides de petite taille (≈ 20 bases) a déjà été étudié dans des travaux précédents par Emmanuel Maillart ([103]). Pour une longueur d'onde minimale de $\lambda = 665 \text{ nm}$, en dessous de laquelle l'excitation des plasmons sur l'or est très inefficace, on a donc une résolution latérale de $r_x = 6.8 \mu\text{m}$.

Dans notre cas, en travaillant au-dessus de 700 nm, les zones que l'on souhaite analyser seront de l'ordre de quelques centaines de microns, et donc largement spatialement résolues. De plus, la résolution spatiale dans le cas d'un couplage en configuration de Kretschmann est également essentiellement limitée par les aberrations introduites par l'utilisation du prisme. En terme de sensibilité, plus la longueur d'onde augmente vers l'infrarouge, plus la résonance devient étroite (figure I.17 du chapitre I) et meilleure est supposée la sensibilité. Cependant, la finesse n'est pas la seule caractéristique liée à la longueur d'onde, la hauteur de l'onde évanescente est également proportionnelle à cette dernière selon l'équation I.6. Plus la longueur d'onde est élevée, plus la profondeur du plasmon propagatif dans le milieu couvrant sera grande, ce qui conduit à une

sensibilité plus grande pour des variations d'indice en volume (figure II.2 courbe bleue). Cela n'est pas forcément souhaitable car les dérives thermiques entraînent une variation de l'indice du buffer en volume au dessus de l'or et donc du bruit supplémentaire. Une autre conséquence de cette extension de l'onde évanescente est une diminution de l'intensité proche de la surface, ce qui diminue la détection en surface. Celle-ci stagne au-delà de 700 nm (figure II.2 courbe rose), confirmant que l'utilisation d'une longueur d'onde élevée ne permet pas forcément d'augmenter la sensibilité lors de la détection de molécules biologiques proches de la surface.

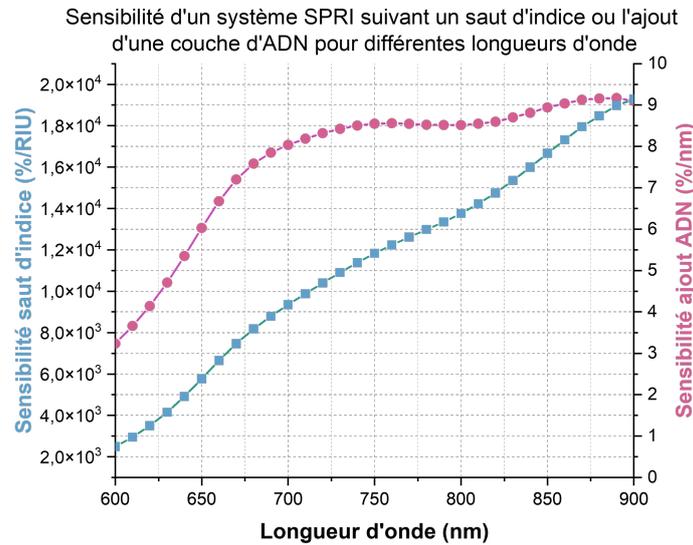


FIGURE II.2 – Simulation de la sensibilité d'un capteur SPR en configuration Kretschmann suivant différentes longueurs d'onde pour un saut d'indice en volume et l'ajout d'une couche moléculaire près de l'interface

Enfin, la longueur d'onde doit être choisie en prenant en compte le rendement quantique de la caméra utilisée, sachant qu'actuellement leur rendement quantique s'effondre au-delà de 800 nm, même avec des caméras CMOS optimisées pour travailler dans le rouge.

Un autre compromis à considérer est la divergence angulaire D_a du faisceau incident. Le faisceau issu de la source n'est pas parfaitement parallèle et donc va éclairer la surface d'or avec une certaine distribution d'angles d'incidence, réduisant la finesse effective de la résonance SPR. Cette divergence angulaire est fixée par le diamètre de la fibre optique d et la focale du collimateur f à son extrémité : $D_a = d/f$. Si cette divergence est plus grande que la finesse de la résonance, l'intérêt de travailler à haute longueur d'onde est perdu. La réduire reviendrait à diminuer le diamètre de la fibre, entraînant une décroissance du nombre de modes s'y propageant, pouvant provoquer des problèmes d'imagerie, ainsi qu'une réduction de la quantité de lumière reçue, augmentant le temps d'acquisition sur la caméra utilisée. Une divergence angulaire inférieure à 1° est typiquement suffisante.

Il faut également prendre en compte la largeur spectrale de la source définie par un intervalle $\Delta\lambda$ autour d'une d'onde centrale λ_0 . On parle de cohérence temporelle si on regarde les phases d'une même onde à deux instants différents et de cohérence spatiale si on regarde cette fois-ci les phases de cette onde à deux endroits différents. La cohérence temporelle est liée à la largeur de bande de la source $\Delta\lambda$. Elle sert à déterminer s'il existe ou non une relation de phase entre les photons et donc des interférences. Elle est caractérisée par ce que l'on appelle la longueur de

cohérence L , elle-même reliée à la largeur de bande $\Delta\lambda$ par la relation suivante :

$$L = \frac{c}{\Delta\nu} = \frac{\lambda_0^2}{\Delta\lambda} \quad (\text{II.2})$$

Comme pour la divergence angulaire, la largeur spectrale va impacter la finesse de la résonance et donc la sensibilité du système. La cohérence temporelle va intervenir surtout dans la partie imagerie : plus la source est monochromatique ($\Delta\lambda$ faible) plus sa longueur de cohérence définie dans l'équation II.2 est élevée, provoquant l'apparition d'interférences qui dégradent la qualité d'imagerie. Une largeur spectrale autour de $\Delta\lambda=20$ nm permet de trouver un compromis pour ne pas perdre en qualité d'imagerie, garder un maximum d'intensité lumineuse à la sortie de la fibre et maximiser la sensibilité du biocapteur, ce qui est facilement atteignable en utilisant une LED ou un monochromateur comme source lumineuse.

Le dernier élément du bras d'illumination est le polariseur permettant d'obtenir les polarisations TE et TM. Le plasmon de surface n'étant excité qu'en polarisation TM, la polarisation TE sert à prendre des images de référence de l'échantillon. Dans cette polarisation, la réflectivité perçue par le détecteur ne dépend pas des espèces déposées sur la surface ou des interactions moléculaires qui y ont lieu. Lors du traitement des données, les images en TM sont divisées par celles en TE afin de s'affranchir de toutes les imperfections dans le système optique : poussières sur les optiques et inhomogénéités d'illumination.

Bras d'imagerie

La lumière arrive en premier par le bras d'illumination décrit dans la section précédente, puis dans les bonnes conditions de couplage λ et θ incident, elle est réfléchiée sur la surface métallique de la biopuce. À la suite de cette réflexion, elle passe dans le bras d'imagerie. Afin que les rayons lumineux soient correctement renvoyés dans celui-ci, il faut qu'il soit aligné suivant le même angle que celui d'illumination avant le prisme. Le bras d'imagerie comprend un objectif, avec un zoom ou non, puis une caméra sur laquelle est imagée la surface de l'échantillon pour suivre les variations de réflectivité sur celle-ci.

Les variations de réflectivité mesurables sont limitées par la dynamique de la caméra. Sachant que le temps d'intégration doit permettre d'acquérir à la fois les images TE où la réflectivité de l'or est maximale et les images TM où la réflectivité est faible. Il faut également tenir compte de la conversion analogique/numérique des données. Cette conversion se fait sur un nombre limité de bits (par exemple 8,12 ou 16 bits) ce qui correspond à un nombre fini de niveaux de gris pour chaque pixel (256, 4096 ou 65 536 respectivement). Plus ce nombre de niveaux est élevé, plus la résolution en réflectivité sera importante. Lors de mesure de cinétique, les paramètres expérimentaux λ et θ sont choisis afin de se placer sur la pente de la résonance plasmonique. C'est autour de cette position que sont mesurées les variations de réflectivité. Typiquement, 12 bits sont suffisants en SPRI pour que l'erreur introduite par la conversion analogique/numérique soit négligeable devant le bruit de mesure. À noter que lors de l'acquisition de spectre de résonance angulaire ou spectrale, des résonances entières sont enregistrées ce qui correspond à des variations de réflectivité très importantes et un nombre de bits inférieur peut donc être suffisant pour ces mesures. Enfin, en SPRI, une caméra refroidie n'est pas nécessaire : le flux incident de photon est très élevé, ce qui permet d'utiliser des temps d'acquisition relativement courts (inférieur à la

seconde). Le bruit thermique se retrouve insignifiant devant le bruit de photon qui devient la principale source de bruit [103].

II

II.1.3. Système de fluidique

Afin de suivre les interactions ayant lieu à la surface de la biopuce, il est nécessaire d'utiliser un système de fluidique. Il peut être stationnaire : l'utilisateur vient déposer une goutte de liquide avec la molécule d'intérêt sur la biopuce, attend la lecture de l'interaction puis retire la goutte pour en remettre une de la solution tampon. Cependant, cette technique n'est pas optimale pour une répartition homogène des solutions à analyser sur la biopuce et génère beaucoup de signal non spécifique. L'homogénéité et la répétabilité des conditions expérimentales sont des points cruciaux lors d'applications complexes et de l'analyse de très faibles concentrations de cibles. Cela facilite à posteriori le traitement et l'interprétation des données expérimentales. Pour ces raisons, un système de fluidique circulant est plus couramment utilisé. Ce système permet d'acheminer de manière optimisée et contrôlée les molécules d'intérêt (cibles) vers les biorécepteurs (sondes) fonctionnalisés à la surface de la biopuce. Un tel système est représenté sur la figure II.3 ci-dessous.

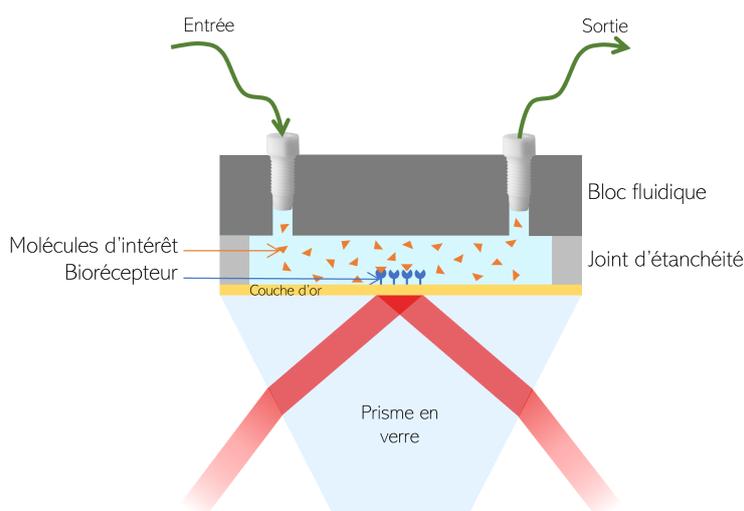


FIGURE II.3 – Représentation schématique d'un système de fluidique sur un banc optique de SPRI couplé avec un prisme

Schématiquement, il comprend un bloc de fluidique dans lequel on trouve les trous d'entrée et de sortie de la fluidique. La chambre fluidique est définie par un joint d'étanchéité, qui peut être en PTFE, PDMS ou tout autre matériau biocompatible. Cette pièce définit les limites du milieu d'analyse. Le système de fluidique comprend généralement d'autres composants qui ne sont pas mentionnés sur la figure II.3, tels qu'une pompe, une boucle d'injection, ou un dégazeur.

On parle souvent d'un système de microfluidique car les volumes utilisés sont relativement faibles (< 1 mL), surtout lors de l'analyse d'échantillons biologiques, les diamètres des tuyaux petits (de la dizaine à la centaine de micromètres) et la vitesse de la fluidique très réduite (entre 20 et 100 microlitres par minute). La taille de la chambre fluidique, déterminée par l'épaisseur du joint d'étanchéité, est de l'ordre de la centaine de micromètres, conduisant à un volume

d'interaction de l'ordre de la dizaine de microlitres. Ces volumes très faibles font que le flux entre l'entrée et la sortie est laminaire. Cet aspect est problématique pour un biocapteur car à faible concentration de cibles injectées, le temps de diffusion des molécules vers la surface du biocapteur, et donc les biorécepteurs, peut être très long et devenir limitant sur le temps de mesure [196, 197].

Tous les éléments du système doivent être biocompatibles afin de ne pas polluer les réactifs et ne pas créer de réactions non contrôlées car les analyses se font en milieu salin (corrosion par exemple). Toutes les surfaces qui doivent rentrer en contact avec les solutions à injecter doivent être inertes vis-à-vis des matières biologiques et des solvants utilisés. Le bloc de fluide est le plus souvent en téflon ou dans un métal oxydé tel que le titane. Il peut être également recouvert d'un film protecteur (par exemple anodisation d'autres métaux) pour augmenter sa biocompatibilité. Les tuyaux rigides et leurs embouts sont en PEEK, les tuyaux souples en Tygon, garantissant un minimum d'interactions avec les éléments biologiques que l'on va faire circuler.

II.1.4. Régulation thermique

Le plasmon de surface est sensible à tous les changements d'indice qui se produisent dans sa longueur de pénétration à l'interface entre le métal et le diélectrique. Or, l'indice de réfraction d'un matériau dépend de la longueur d'onde utilisée, mais également des conditions de pression et température du milieu [198]. Dans le cas de la SPRI, la pression reste constante dans la chambre de fluide mais sa température peut varier : échauffement des composants (caméra, source lumineuse), variations de la température ambiante. Notamment, ce genre de montage expérimental se retrouve souvent enfermé dans une boîte afin d'éviter les pollutions lumineuses, entraînant un échauffement de la cellule fluide en début d'expérience avant que tous les composants arrivent à un équilibre thermique.

Des fluctuations trop importantes de la température de l'eau dans la chambre d'interaction (variations supérieures à 0.1°C typiquement) vont conduire à un bruit de mesure important. Il devient nécessaire d'implémenter un contrôle de la température pour une meilleure reproductibilité des mesures. Un système de régulation de la température peut alors être intégré sur la chambre fluide. Dans ce cas, cette dernière sera réalisée en métal afin de permettre une bonne conductivité thermique. Le système de régulation thermique est souvent un module à effet Peltier régulé par une boucle de rétroaction et un thermocouple placé dans le bloc de fluide le plus proche possible de la chambre. Si le bruit de photon est le facteur de bruit le plus important dans une mesure sur une courte durée (< 1 min), les variations de températures sont la principale source de bruit sur des périodes de temps plus longues [100].

II.2. Bancs expérimentaux

Le doctorat ayant été réalisé en cotutelle entre deux laboratoires, les mesures SPRI présentées dans la suite de ce manuscrit ont été menées sur deux bancs expérimentaux distincts. Le premier au LCF, à Palaiseau, est un appareil de SPRI qui a été construit de toute pièce à travers différentes thèses. Le banc expérimental du LN2 à Sherbrooke est un banc SPRI commercial de l'entreprise Horiba. Dans la suite de ce chapitre, les deux montages expérimentaux sont décrits plus en détails en se basant sur les caractéristiques données dans la partie précédente.

II.2.1. Banc angulo-spectral

Le banc d'imagerie par résonance des plasmons de surface présent au LCF à Palaiseau est représenté sur la figure II.4 ci-dessous.

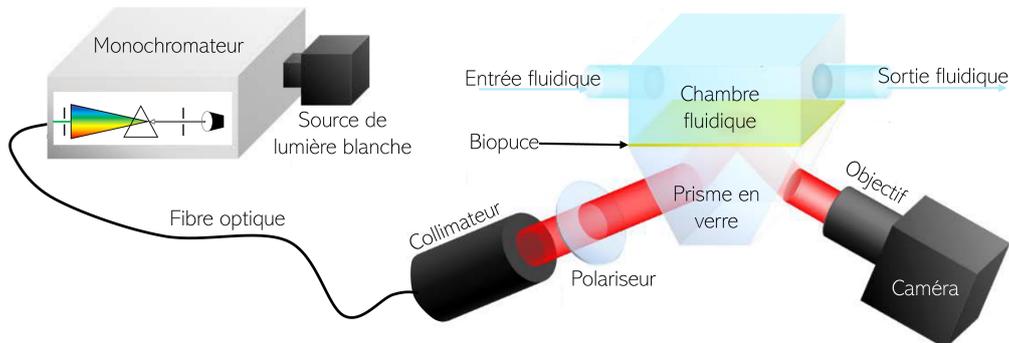


FIGURE II.4 – Schéma du système optique d'illumination de la biopuce couplée par un prisme sur le banc angulo-spectral

Sur cet appareil, la longueur d'onde d'excitation provient d'une lampe halogène combinée à un monochromateur permettant de choisir une longueur d'onde en sortie pouvant aller du visible au proche infrarouge : de 500 nm à environ 900 nm. Les spectres pour différentes longueurs d'onde en sortie du monochromateur sont tracés sur la figure II.5 suivante.

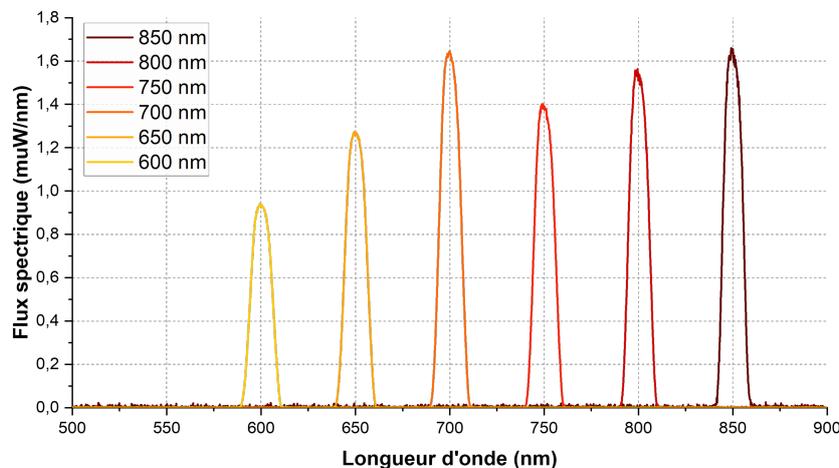


FIGURE II.5 – Spectres de la lumière à différentes longueurs d'onde en sortie du monochromateur servant à exciter le plasmon de surface sur le banc SPRI angulo-spectral

On peut voir sur ces courbes que la largeur spectrale $\Delta\lambda$ vaut environ 10 nm pour tous les spectres tracés entre 600 nm et 850 nm. La lumière en sortie du monochromateur est ensuite transportée par une fibre optique pour arriver sur le bras d'illumination du système SPRI. Elle traverse en premier un collimateur achromatique à miroirs, puis un polariseur, pour enfin traverser le prisme avant d'arriver sur la surface d'or de la biopuce. Comme mentionné dans la partie précédente II.1.2, il est nécessaire de trouver un compromis sur la longueur d'onde d'excitation (entre finesse de la résonance et puissance disponible de la source) et les caractéristiques de la fibre optique et du collimateur. Dans le cas du banc angulo-spectral, une focale du collimateur de $f = 50 \text{ mm}$ et un diamètre de fibre de $d = 400 \mu\text{m}$ ont été choisis. Ce choix résulte en une

divergence angulaire de $D_a = 0,45^\circ$, suffisante pour ne pas dégrader la finesse de la résonance pour une longueur d'onde d'excitation optimale autour de 750 nm. La lumière est ensuite réfléchi sur la surface d'or pour être renvoyée dans le bras d'imagerie. Celui-ci est composé d'un objectif zoom X8 à distance finie puis d'une caméra ORCA-flash4.0IT3 fonctionnant en mode 16 bits avec un nombre de pixels de 2048 x 2048 par image.

Un des avantages de ce banc est de pouvoir choisir la longueur d'onde incidente grâce au monochromateur et d'avoir les deux bras d'illumination et d'imagerie montés sur des plateformes motorisées. Toutes deux sont fixées sur la plateforme fixe du système où se trouve également l'emplacement pour la biopuce au sommet du prisme. Ce système permet un contrôle précis ($\pm 0.1^\circ$) et sur une large plage (entre 40° et 90° par rapport à la perpendiculaire avec la surface d'or) de l'angle d'incidence externe autour de la biopuce. Les deux bras tournent de façon symétrique afin d'être toujours dans les bonnes conditions d'alignement pour collecter un maximum de lumière réfléchi vers la caméra.

Ce genre de système SPRI qui permet des interrogations angulaires et spectrales très larges permet de ne pas être limité dans le choix des matériaux utilisés pour le verre de haut indice ou dans l'angle au sommet du prisme. Lors de la mise en place d'une biopuce sur la surface du prisme, le choix des paramètres expérimentaux de longueur d'onde et d'angle de travail sont dépendants du matériau et de l'angle du prisme choisi (partie 1.2 du chapitre précédent).

L'utilisation du modèle de Rouard [102] permet de réaliser des simulations de la résonance pour chaque biopuce. Lors de l'utilisation de verre SF11 ($n_{SF11} = 1,77$) avec un angle du prisme de 60° , la résonance se trouve autour de 42° en angle externe pour 750 nm de longueur d'onde d'excitation. Dans le cas du verre BK7 ($n_{BK7} = 1,51$), on utilise un prisme d'angle de 42° , plaçant la résonance pour une longueur d'onde d'excitation de 750 nm à un angle externe de 22° . Afin de déterminer le bon couple λ/θ pour la mesure de cinétique, il faut fixer un paramètre expérimental, soit l'angle, soit la longueur d'onde de résonance, puis réaliser un balayage spectral ou angulaire respectivement, de la surface de la biopuce. Une fois les images du balayage enregistrées, elles peuvent être traitées en divisant les images en polarisation TM par celles en polarisation TE et ainsi reconstruire la résonance expérimentale de la biopuce. Le couple λ/θ est ensuite choisi en prenant l'endroit de la résonance ayant la pente la plus forte, soit la dérivée la plus forte (figure II.6).

Il est aussi possible d'acquérir des images en réflectivité bidimensionnelles et d'obtenir une cartographie angulo-spectrale d'un échantillon d'or plan, comme présentée sur la figure II.7. Plusieurs différences peuvent être remarquées en comparant les cartographies angulo-spectrales expérimentale et théorique. D'abord, on remarque que la résonance est décalée d'environ un demi degré vers les angles plus bas sur la cartographie expérimentale par rapport à la théorie. Ce décalage est dû à l'erreur systématique sur la définition du zéro mécanique des bras motorisés d'illumination et d'imagerie. Ensuite, la deuxième différence est la largeur de la résonance lorsque l'on se rapproche des hautes longueurs d'onde : la résonance devient moins contrastée jusqu'à disparaître autour de 850 nm sur la cartographie expérimentale. Ce phénomène s'explique car pour des longueurs d'onde au-dessus de 800 nm, la divergence angulaire de la source de lumière devient plus grande que la finesse de la résonance, ce qui la rend invisible expérimentalement.

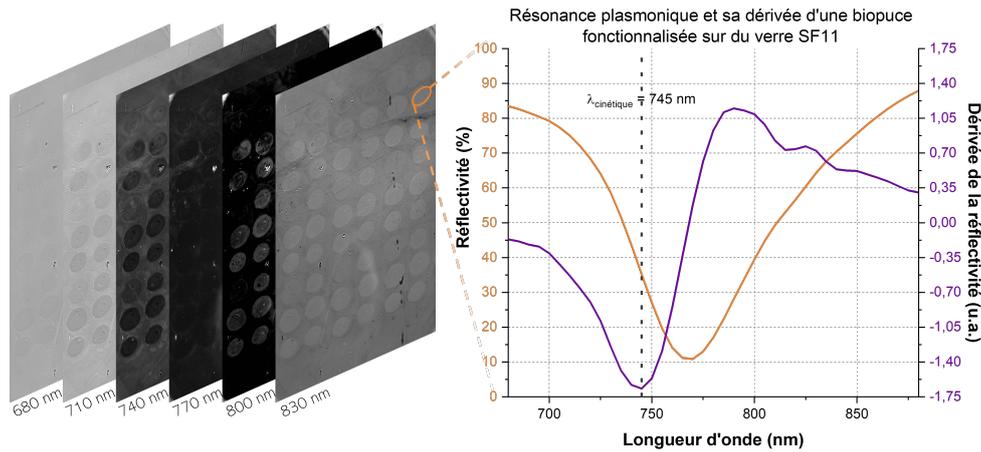


FIGURE II.6 – Mesure expérimentale de la réflectivité renvoyée vers la caméra lors du balayage en longueur d'onde de la surface de la biopuce en SF11 recouverte de 2 nm de titane puis 50 nm d'or. Le tout est posé sur un prisme SF10 avec un angle d'incidence externe de la lumière fixe à 42°. À gauche : images de la biopuce suivant différentes longueurs d'onde d'excitation. À droite : courbe de résonance du plasmon dans un plot fonctionnalisé (courbe orange). Dérivée de la courbe de résonance du plasmon afin de trouver la pente la plus forte pour déterminer la longueur d'onde de cinétique optimale (courbe violette).

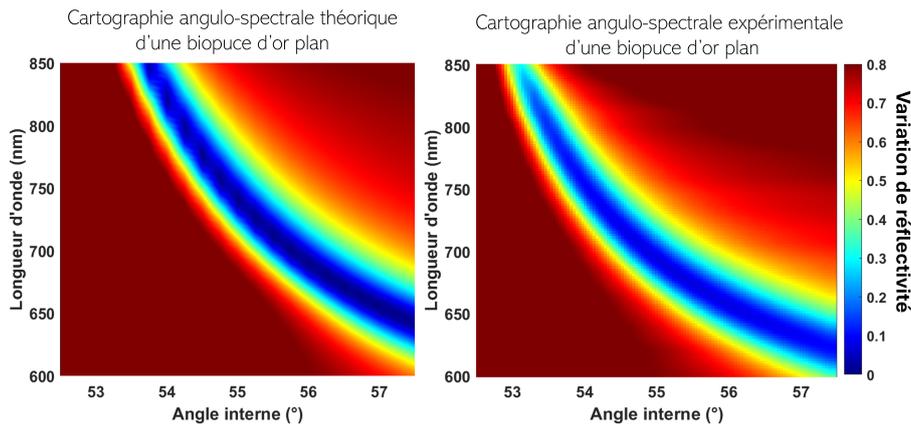


FIGURE II.7 – Cartographies angulo-spectrales théorique (à gauche) et expérimentale (à droite) d'une biopuce d'or plan (2 nm de Ti puis 50 nm d'Au) sur du verre SF10 ($n_{SF10} = 1.77$) avec un prisme d'angle au sommet $A_{prisme} = 60^\circ$ et de l'eau comme milieu diélectrique supérieur.

Enfin, le système angulo-spectral du LCF dispose d'un système de microfluidique circulant. Il utilise une pompe péristaltique afin de faire circuler la solution tampon en continu, le schéma du principe de fonctionnement de ce type de pompe est présenté sur la figure II.8.

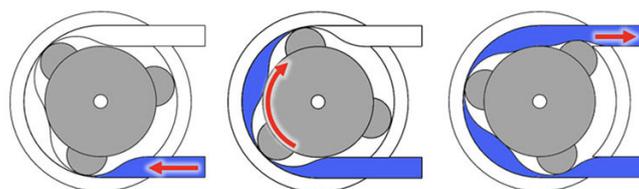


FIGURE II.8 – Schéma du fonctionnement d'une pompe péristaltique. Schéma copié du site dienerprecisionpumps.com

Cette pompe déplace le fluide piégé dans un tube flexible en utilisant des rouleaux externe qui le font circuler de l'entrée à la sortie. De cette façon, le liquide n'entre en contact qu'avec l'intérieur du tube ce qui évite les contaminations lors d'essais biologiques. Juste avant cette pompe, un dégazeur est placé afin d'enlever les éventuelles bulles d'air qui pourraient rentrer dans les tuyaux et se coincer dans la chambre fluïdique. Afin d'injecter les échantillons à analyser dans cette dernière, une vanne d'injection manuelle est placée après la pompe. Le bloc de fluïdique est en titane afin d'être biocompatible et de permettre une bonne conduction thermique. L'étanchéité et la taille de la chambre fluïdique sont déterminées par un joint en mylar. Il s'agit d'une feuille de polymère souple de $80\ \mu\text{m}$ d'épaisseur, dans laquelle une chambre est taillée avec une découpeuse laser afin d'être précis sur les dimensions souhaitées et d'avoir des bords de bonne qualité pour éviter les fuites.

Sur ce système, la régulation thermique est assurée par deux éléments Peltier collés à l'arrière du bloc de fluïdique en titane. Le thermocouple est placé dans un trou usiné sur le côté de cette pièce au plus proche de la chambre fluïdique. La température peut être réglée avec une précision de 0.01°C entre 10°C et 60°C . Il s'agit d'une plage de températures testées expérimentalement, en dessous on aperçoit de la condensation et au dessus des bulles dans la chambre fluïdique. Ces conditions de régulation de température sont largement suffisantes pour l'application visée.

En résumé, ce banc angulo-spectral est très polyvalent, il permet autant l'analyse optique d'échantillons plus complexes (biopuces nanostructurées par exemple) que la mesure de cinétique en temps réel d'interactions entre différentes molécules à la surface d'une biopuce.

II.2.2. Banc Horiba

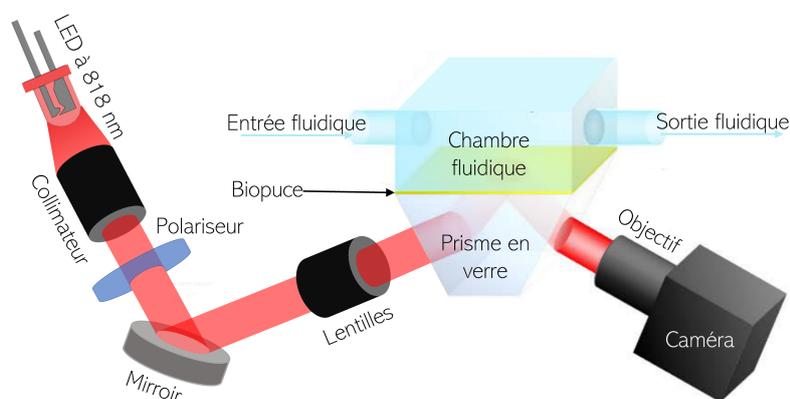


FIGURE II.9 – Schéma du système optique d'illumination de la biopuce couplée par un prisme sur le banc Horiba

L'appareil Horiba au LN2 est également conçu en configuration de Kretschmann par excitation à travers un prisme de haut indice. Tous ses composants sont schématisés sur la figure II.9. La source lumineuse est une LED émettant à 818 nm avec une largeur à mi-hauteur d'environ 32 nm (figure II.10).

Ce système commercial étant réduit en taille et ces composants principalement immobiles, aucune fibre optique n'est utilisée à la sortie de la LED. Cette lumière est directement collimatée avant de passer à travers un polariseur puis d'être réfléchi sur un miroir afin d'être renvoyée

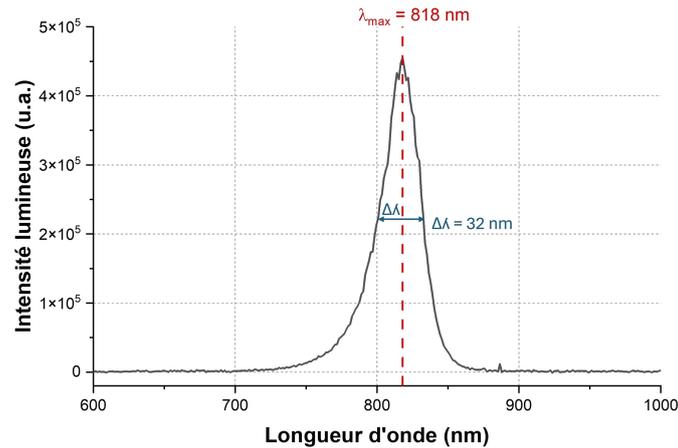


FIGURE II.10 – Spectre d'émission de la LED servant à exciter le plasmon de surface sur le banc SPRI Horiba

sur le prisme après passage dans un réseau de lentilles conjuguant le miroir à la surface de la biopuce. La lumière traversant le prisme est réfléchi sur la surface d'or de la biopuce pour être renvoyée dans le bras d'imagerie immobile. Cette dernière partie comprend de nouveau un réseau de lentilles conjuguant la surface de la biopuce sur une caméra (AVT Dolphin F-145B) permettant d'imager la surface de l'échantillon et de suivre en temps réel les interactions qui y ont lieu. Cette caméra fonctionne en mode 12 bits et génère des images de 1392×1040 pixels.

Dans ce système, les deux bras sont immobiles, seul le miroir peut bouger, limité à une plage de $\pm 5^\circ$ en angle interne avant de perdre le couplage. Cet appareil commercial utilise une seule longueur d'onde d'excitation et un nombre d'angles d'incidence très limité. Il est conçu

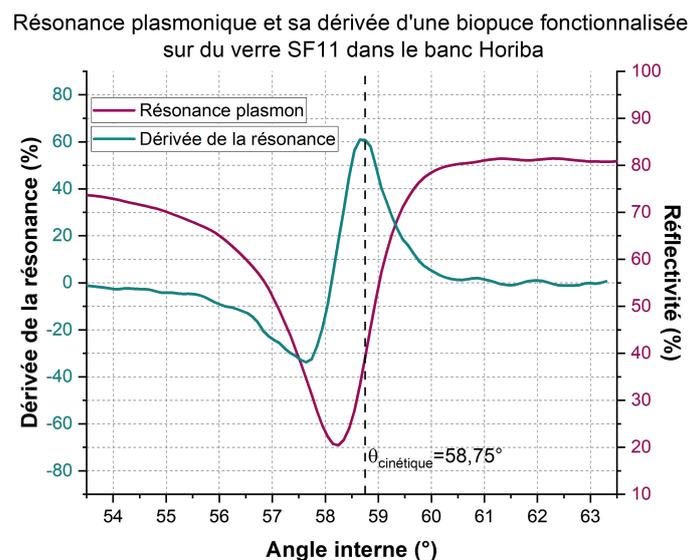


FIGURE II.11 – Mesure expérimentale de la réflectivité renvoyée vers la caméra lors du balayage angulaire : courbe de résonance du plasmon propagatif excité à la surface de la biopuce dans le banc Horiba (courbe violette). Dérivée de la courbe de résonance du plasmon afin de trouver les points d'inflexion les plus forts pour déterminer l'angle de cinétique le plus sensible (courbe bleue).

spécifiquement pour venir exciter un plasmon de surface si le matériau du prisme utilisé est du SF11 avec un indice de réfraction de $n_{SF11} = 1.77$ et un angle au sommet de $A_{prisme} = 32^\circ$. Le balayage angulaire du miroir permet de reconstruire la courbe de résonance du plasmon de surface propagatif excité à la surface de la biopuce (figure II.11, courbe violette).

Ce système SPRI commercial comprend également un système de fluidique circulant. Il est composé d'une pompe pousse-seringue (volume de 1 mL), permettant de faire circuler la solution tampon. Comme l'indique son nom, cette pompe consiste en une seringue qui se remplit du liquide souhaité, puis un piston est actionné, sa vitesse réglée pour s'adapter à la vitesse de fluidique demandée, et pousse le liquide de la seringue dans un premier tube. Ensuite, sur le système de fluidique se trouve une vanne d'injection automatique, elle fonctionne sur le même principe que celle du banc angulo-spectral, mais le changement de position se fait électroniquement. Le bloc de fluidique est en aluminium anodisé pour éviter la corrosion, et l'étanchéité ainsi que la taille de la chambre fluidique sont déterminées par un joint en viton qui s'insère dans une rainure prévue à cet effet dans la face inférieure du bloc de fluidique.

La régulation thermique est aussi assurée par deux éléments Peltier se trouvant sur le dessus du bloc de fluidique en aluminium. Au centre de cette pièce, un trou est percé entre ceux de l'entrée et la sortie de la fluidique afin de venir insérer le thermocouple le plus proche possible de la chambre de fluidique. La température peut être stabilisée entre 15°C et 40°C avec un écart maximum de 16°C de la température ambiante. Ce système permet une régulation de la température avec une précision de 0.01°C , ce qui est largement suffisant pour l'application visée.

Ces deux systèmes de SPRI sont très similaires dans la façon dont ils ont été réalisés : excitation en configuration de Kretschmann à travers un prisme de haut indice, système de fluidique circulant et régulation de la température. Cependant, le banc angulo-spectral permet une flexibilité de mesures beaucoup plus importante, notamment dans le cas d'échantillons plus complexe que de l'or plan sur du verre, lorsque les résonances se retrouvent fortement décalées.

II.2.3. Comparaison des systèmes

Les deux bancs angulo-spectral et Horiba ont été utilisés durant cette thèse. Afin de pouvoir comparer les résultats obtenus avec ces deux systèmes et de vérifier leurs performances il est nécessaire de les calibrer. Pour ce faire, deux manipulations ont été réalisées : une première mesure du niveau de bruit du signal SPR sur des périodes temporelles comparables aux temps d'injection réalisés lors d'expériences, puis des mesures de variation de la réflectivité grâce à des solutions de différents sauts d'indice par rapport à la solution tampon utilisée. La corrélation de ces deux mesures permet de déterminer le niveau de sensibilité intrinsèque à chaque système. Le système angulo-spectral pouvant travailler à différentes longueurs comparé au Horiba, la longueur d'onde de 750 nm a été choisie pour la mesure de performance.

II.2.3.1. Mesure du niveau de bruit

Sur ces deux systèmes, lors d'une mesure de courte durée (< 1 min), étant donné que le flux de photon incident est très élevé, la principale source de bruit est le bruit de photon II.1.2. Sur de longues périodes expérimentales, c'est le bruit thermique qui prend le dessus, en raison des limites des systèmes de régulation en température. Afin de quantifier ce bruit de mesure ainsi que le bruit

de photon, il est nécessaire de réaliser une expérience dans les mêmes conditions expérimentales que lors de la détection d'oligonucléotides. On utilise donc une biopuce fonctionnalisée. Les mesures de SPRI sont réalisées en flux circulant avec un débit similaire à celui qui est utilisé lors d'expériences : autour de $75\mu L/min$. Ensuite, une mesure de variation de réflectivité en fonction du temps est lancée et les images sont enregistrées pendant plusieurs minutes sans que le système ne soit perturbé. Les courbes obtenues pour les deux systèmes sont tracées sur la figure II.12 qui suit.

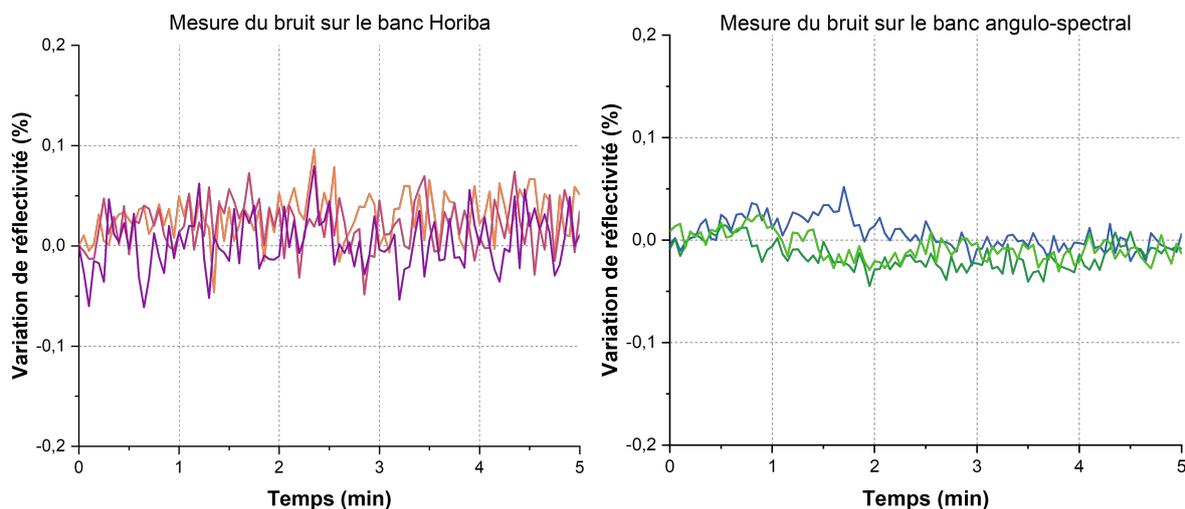


FIGURE II.12 – Mesures expérimentales du bruit sur les deux instruments de SPRI : Horiba à gauche et angulo-spectral à droite.

Les courbes sur ces graphiques correspondent aux signaux de différentes régions d'intérêt (ROI : *region of interest*) sur les images obtenues par la caméra du banc. Ces ROI sont choisies à différents endroits de la biopuce comme pour des mesures d'hybridation d'oligonucléotides, soit, sur les zones fonctionnalisées avec le brin d'ADN sonde, afin de vérifier que le signal est homogène sur l'ensemble de la surface observée. Ensuite, le traitement des images passe par différentes étapes. Tout d'abord la première image est soustraite du film obtenu afin d'obtenir des signaux en variations de réflectivité. Ensuite, cette nouvelle pile d'images est divisée par l'image TE dans la même configuration de longueur d'onde et d'angle afin de s'affranchir des imperfections dans le système optique et obtenir une échelle de réflectivité normalisée. Les ROI sont choisies et la variation de réflectivité est tracée pour chacune d'entre elles en fonction du temps.

En l'absence de dérive thermique ou autres, le signal reste autour d'une valeur moyenne nulle avec un bruit dominé par le bruit de photon. L'amplitude de ce bruit de photon dépend de la quantité de lumière et du nombre de moyennes (temporelle ou spatiale) effectuées. Cependant, ce genre de bruit blanc peut être réduit grâce à un filtre passe-bas afin d'éliminer la composante haute fréquence du bruit sans modifier les cinétiques d'interaction. Sur la figure suivante II.13, les graphiques montrent les signaux de la figure II.12 précédente lissés.

Après application du filtre passe-bas, le bruit restant est un mélange de bruit de photon et de bruit thermique. Le temps d'acquisition choisi pour cette mesure de bruit prend en compte les conditions expérimentales. Une détection quantitative d'oligonucléotides en faible concentration en moins d'une heure est recherchée ; cela doit comprendre le démarrage de l'acquisition, la phase

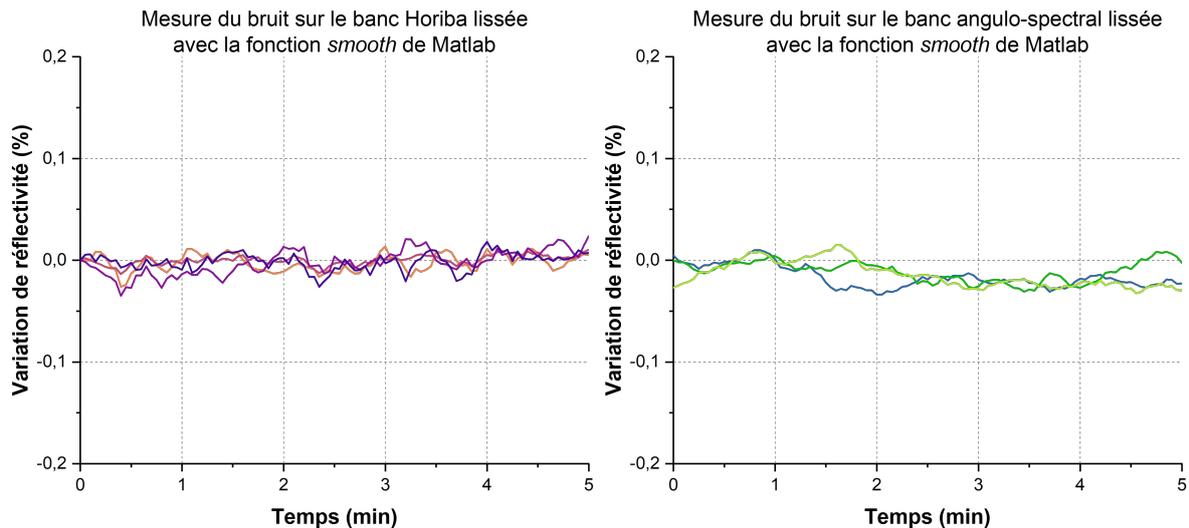


FIGURE II.13 – Mesures expérimentales du bruit, sur différentes ROI, sur les deux instruments de SPRI : Horiba à gauche et angulo-spectral à droite après lissage par une fonction passe-bas.

de calibration ainsi que la phase de détection en deux étapes avec la méthode sandwich. Pour rentrer dans les temps, des durées d'injection autour de 5 minutes sont ciblées.

Pour le banc Horiba, la mesure de bruit se trouve sur le graphique gauche de la figure précédente II.13. Les valeurs de la déviation standard σ_b , de toutes les ROI choisies, chacune représentée par une courbe, sont comprises entre 0,0042% et 0,0081% avec une moyenne de 0,0069%. Afin que le signal soit discernable au-dessus de ce bruit, on considère avoir besoin d'un signal trois fois plus grand que ce bruit, ce qui donne un signal minimum de $S_{min_{Horiba}} = 3 \times \sigma_b = 0,021\%$. Le graphique représentant le bruit de mesure pour le banc angulo-spectral (AS) est celui de droite sur la figure II.13. Les valeurs de la déviation standard de ces courbes sont comprises entre 0,0043% et 0,065% avec une moyenne de 0,0051%. En suivant la même définition que celle donnée au paragraphe précédent, le signal minimum pour être considéré comme détectable est $S_{min_{AS}} = 3 \times \sigma_b = 0,015\%$.

On remarque que le bruit de mesure du banc Horiba est plus fort que sur le banc angulo-spectral, cela peut s'expliquer par des temps d'acquisition et un nombre d'images moyennées différents. Tous ces paramètres peuvent être réglés précisément sur le banc angulo-spectral mais sont prédéterminés et inconnus sur le système commercial Horiba ce qui ne nous permet pas de les changer.

II.2.3.2. Mesure de réflectivité et de la sensibilité

Maintenant que le bruit de mesure est connu, il faut réaliser des mesures de saut d'indice pré-déterminés afin de définir expérimentalement la limite de détection en RIU (*refractive index unit*) des deux systèmes.

Cette mesure est réalisée toujours dans les conditions les plus proches de celles expérimentales pour la détection d'oligonucléotides avec l'utilisation d'une biopuce fonctionnalisée et du système de fluide pour les injections. Dans ce cas-ci, la solution tampon utilisée est de l'eau dans laquelle du sucre est dilué. Une solution mère de saut d'indice connu de 10^{-2} RIU est préparée : ajout de 103,5 mg de sucre dans 1,5 mL, soit une concentration de 6,9 g/L. À partir de cette

solution mère, différentes solutions avec des sauts d'indice compris entre 10^{-3} RIU et 10^{-6} RIU sont préparées par dilutions successives. Ces solutions sont injectées grâce à la vanne dans la chambre fluïdique pendant quelques minutes, un film d'images est enregistré et les changements de réflectivité en temps réel sont suivis. Après traitement des images pour récupérer ces courbes, les différents sauts d'indice en fonction des solutions injectées sont superposés sur un graphique donnant la figure suivante :

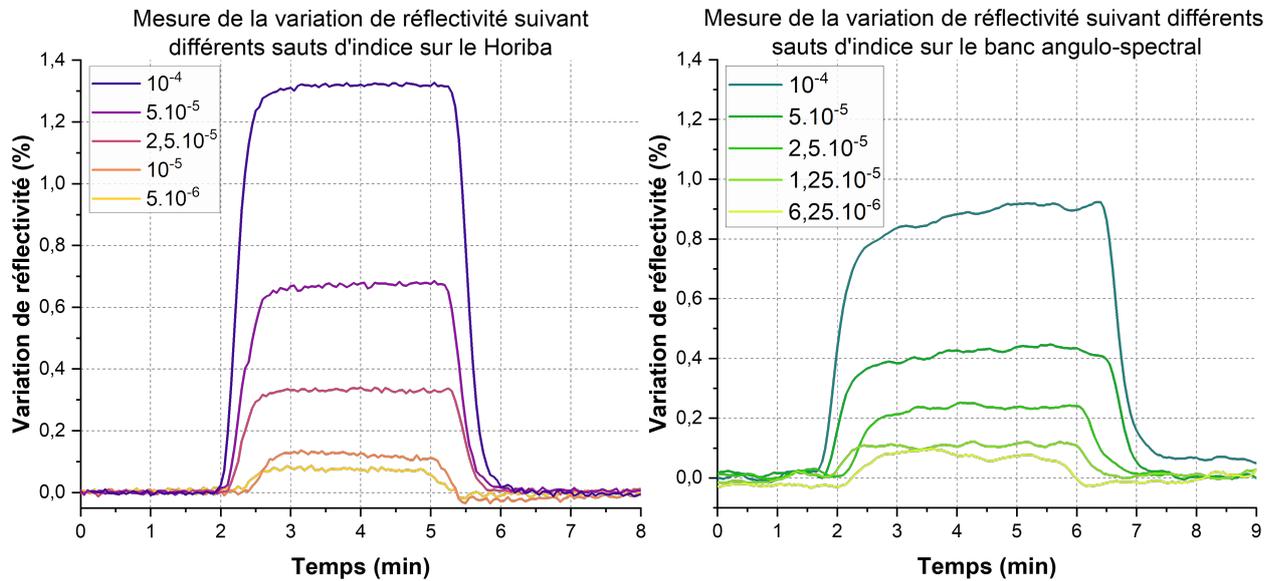


FIGURE II.14 – Mesures expérimentales de différents sauts d'indice sur les deux instruments de SPRI : Horiba à gauche et angulo-spectral à droite.

L'injection d'une solution d'indice différent dans la chambre fluïdique, provoque un changement d'indice en volume, ce qui est perçu comme une variation rapide de réflectivité de l'ordre de quelques secondes. Cette variation de réflectivité a lieu une première fois lorsque le liquide d'indice différent de celui du tampon rentre dans la chambre, puis une deuxième fois (de valeur identique mais opposée) lorsque l'injection est terminée, ce qui signifie le retour de la solution tampon dans la chambre fluïdique à la surface de la biopuce. Sur la figure II.14, les réponses en termes de variation de réflectivité des deux bancs SPRI ne sont pas identiques pour les mêmes valeurs de saut d'indice. Le signal moyen est plus important pour le banc Horiba, qui travaille à plus haute longueur d'onde, ce qui confirme que la résonance est plus fine et donc que les changements d'indice en volume sont perçus avec plus de sensibilité.

Pour chaque saut d'indice, la variation de réflectivité entre la ligne de base moyenne et la valeur moyenne du haut du plateau peut être calculée. Ces valeurs de réflectivité sont tracées en fonction du saut d'indice donnant une relation de proportionnalité comme le montre les graphiques sur la figure II.15. Une droite horizontale représentant le signal minimum détectable pour chaque appareil (S_{min}), déterminée grâce au calcul du bruit précédemment, permet de calculer la sensibilité du banc de SPRI en RIU en prenant l'intersection entre cette droite horizontale et l'ajustement linéaire des valeurs de réflectivité en fonction du saut d'indice.

On remarque que même si la sensibilité en volume est plus forte sur le Horiba (signaux plus importants), le niveau de bruit est plus faible pour le banc angulo-spectral ce qui engendre une limite de détection (LOD : *limit of detection*) en RIU équivalente pour les deux bancs soit

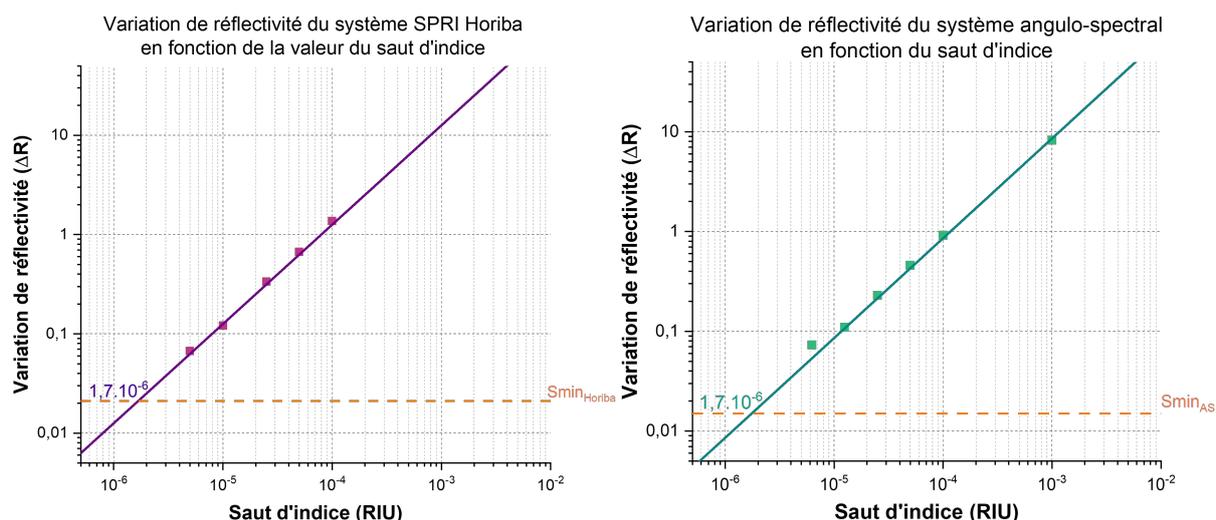


FIGURE II.15 – Valeur de la variation de réflectivité en fonction du saut d'indice sur les deux instruments de SPRI : Horiba à gauche et angulo-spectral à droite.

$LOD = 1,7 \cdot 10^{-6}$ RIU.

II.2.3.3. Synthèse des caractéristiques des deux systèmes SPRI

Caractéristiques expérimentales	Banc Horiba	Banc angulo-spectral
Variabilité angulaire	$\theta_{res} \pm 5^\circ$	$40^\circ < \theta < 90^\circ$
Variabilité spectrale	$\lambda = 818$ nm	500 nm $< \lambda < 900$ nm
Régulation thermique	Oui	Oui
Nombre de bits de la caméra	12 bits	16 bits
Pompe de fluide	Pousse seringue	Péristaltique
Vanne d'injection	Automatique	Manuelle
Niveau de bruit	0,021 ΔR	0,015 ΔR
Limite de détection	$1,7 \cdot 10^{-6}$ RIU	$1,7 \cdot 10^{-6}$ RIU

TABLE II.1 – Tableau récapitulatif des différentes caractéristiques expérimentales des deux instruments SPRI comparés dans cette partie : Horiba et angulo-spectral.

II.3. Mesure de cinétique d'interaction entre le biorécepteur et l'analyte en SPRI

Un des avantages de la SPRI est le suivi en temps réel des interactions entre des espèces biologiques complémentaires, couple sonde/cible ou biorécepteur/analyte, en milieu liquide. Une fois les instruments SPRI présentés dans la partie précédente II.2 et réglés dans les bonnes conditions expérimentales, il est possible d'enregistrer au cours de l'expérience tout un film d'images qui portent les données que l'on souhaite ensuite étudier. Cette dimension temporelle permet d'établir une classification des signatures cinétiques des interactions moléculaires étudiées. Dans la suite de cette partie, le modèle utilisé afin de traiter les résultats des cinétiques d'interaction entre deux brins d'ADN complémentaire est présenté puis le traitement des images afin de récupérer ces cinétiques est détaillé.

II.3.1. Modèle de cinétique d'interaction du premier ordre

L'allure de la cinétique d'hybridation dans le cadre de la SPRI sur support solide entre deux espèces biologiques complémentaires peut être retrouvée mathématiquement [199]. Lors de l'injection des cibles, si l'on considère que l'interaction sonde-cible est régie par la cinétique de la réaction plutôt que par des considérations de transport de masse, deux phénomènes ont lieu dans la chambre de fluide : l'hybridation entre les brins complémentaires (association) et la déshybridation de ce complexe (dissociation). Ces deux éléments ont lieu en parallèle et suivent la loi d'action de masse telles que la vitesse d'association (V_{ass}) et de dissociation (V_{diss}) sont définies selon les équations II.3 et II.4. Dans ces équations, $[C]$ est la concentration en analytes, aussi appelées cibles, $[S]$ la concentration de sondes en surface, $[SC]$ la concentration en duplexes formés, et k_{ass} , k_{diss} les constantes d'association et de dissociation respectivement.

$$V_{ass} = [C] \cdot [S] \cdot k_{ass} \quad (II.3)$$

$$V_{diss} = [SC] \cdot k_{diss} \quad (II.4)$$

Dans le cas de la SPRI, le biorécepteur est attaché à la surface de la biopuce et la cible circule librement au dessus de cette surface. Au cours d'une expérience d'hybridation, la concentration en sonde reste constante et celle de la cible est considérée en excès : la réaction entre les deux brins complémentaire peut être modélisée comme une réaction qui suit un pseudo modèle de cinétique du premier ordre. Durant la phase d'hybridation, le complexe $[SC]$ croît comme une fonction au cours du temps telle que :

$$\frac{d[SC]}{dt} = k_{ass} \cdot [S] \cdot [C] - k_{diss} \cdot [SC] \quad (II.5)$$

Pendant l'interaction, le nombre de sondes diminue au fur et à mesure des associations, ce qui baisse la concentration de sondes libres. Pour une stœchiométrie de 1 :1 (ce qui est le cas pour une hybridation d'ADN), la concentration de sonde libre à l'instant t peut être exprimée comme suit :

$$[S]_t = [S]_0 - [SC] \quad (II.6)$$

En le remplaçant dans l'équation précédente II.5, cela donne la relation suivante :

$$\frac{d[SC]}{dt} = k_{ass} \cdot ([S]_0 - [SC]) \cdot [C] - k_{diss} \cdot [SC] \quad (II.7)$$

Le changement de signal SPR (variation de réflectivité R) est proportionnel au taux de formation du complexe $[SC]$, que l'on peut donc substituer par R . Quand tous les sites sont occupés par les analytes, la valeur de $[SC]$ devient égale à $[S]_0$ pour une stœchiométrie de 1 :1. Donc, l'équation suivante est obtenue à saturation avec $R_{max} = [S]_0$:

$$\frac{dR_t}{dt} = k_{ass} \cdot [C] \cdot (R_{max} - R) - k_{diss} \cdot R \quad (II.8)$$

$\frac{dR_t}{dt}$ est la variation de réflectivité au cours du temps associée à la formation de complexes sur la surface.

En intégrant l'équation différentielle on obtient l'équation de cinétique de premier ordre suivante :

$$R_t = \left(\frac{k_{ass} \cdot [C] \cdot R_{max}}{k_{ass} \cdot [C] + k_{diss}} \right) \cdot (1 - \exp^{-(k_{ass} \cdot [C] + k_{diss}) \cdot t}) \quad (II.9)$$

Suivant ce modèle, deux cas de figure peuvent être mis en avant lors de la détection de cibles : injection à forte et à faible concentration. Dans le premier cas, la courbe de cinétique augmente très rapidement de façon linéaire, puis dans un deuxième temps, cette montée ralentit progressivement avant d'atteindre un plateau et de saturer (R_{max}). Cependant, à faible concentration l'atteinte de ce plateau prend beaucoup plus de temps, jusqu'à plusieurs heures d'injection des cibles : expérimentalement compliqué à réaliser et peu pratique. Sur la même durée, des injections à faible concentration vont seulement rester dans la partie linéaire de l'exponentielle. Ces deux types de courbes sont représentés sur la figure II.16 pour différentes concentrations de cibles injectées (entre 1 et 100 nM) suivant le modèle de cinétique de premier ordre de l'équation II.9. Dans cet exemple, l'interaction est simulée entre un anticorps et son antigène pour les constantes d'association et de dissociation suivantes : $k_{ass} = 3.10^5 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ et $k_{diss} = 5.10^{-4} \text{ s}^{-1}$.

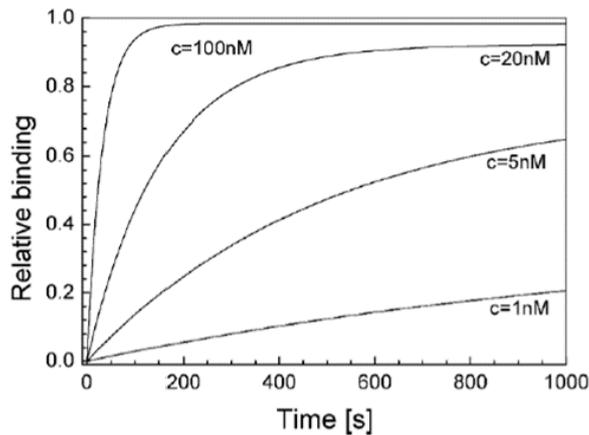


FIGURE II.16 – Cinétiques d'interaction selon le modèle de cinétique du premier ordre entre un antigène et un anticorps pour différentes concentration de cibles. [200]

Dans notre cas, l'affinité entre les simples brins d'ADN complémentaires étant très fortes (température de dénaturation dans du PBS 2x au dessus de 50°), seule la constante d'association k_{ass} entre la sonde et la cible est considérée. La constante de dissociation k_{diss} peut être négligé en comparaison. Ce point sera vérifié expérimentalement au chapitre 3 pour les séquences du projet. Il est alors possible après intégration de reformuler le modèle de cinétique du premier ordre de l'équation comme suit :

$$R_t = R_{max}(1 - \exp^{-k_{ass}[C] \cdot t}) \quad (II.10)$$

Sur des temps d'injection courts, le modèle peut alors être simplifié et la courbe de cinétique peut être ajustée par un modèle linéaire qui suit l'équation suivante :

$$R_t = R_{max}k_{ass}[C] \cdot t \quad (II.11)$$

Plusieurs travaux ont été réalisés afin de montrer que cette méthode d'interprétation des

résultats et l'approximation linéaire permet de garder une quantification précise les concentrations injectées [201, 200, 83]. Cette méthode est d'autant plus utile lorsque l'on cherche à détecter de faibles concentrations de cibles dans des temps de détection très court : deux des objectifs principaux de ce projet de thèse.

Pour déterminer la constante d'association k_{ass} du complexe, il suffit de faire la mesure pour différentes concentrations de cibles $[C]$ et de déterminer pour chacune la pente de la cinétique ΔR ainsi que le maximum de signal R_{max} au niveau du plateau lorsque la cinétique arrive à saturation. En traçant $\frac{\Delta R}{R_{max}} = k_{ass} \cdot [C]$, qui est linéaire en fonction de la concentration de cible injectée, on obtient la constante d'association k_{ass} du complexe étudié.

II.3.2. Traitement des images et obtention des cinétiques expérimentales

Les deux bancs utilisés donnent un film d'images de la surface qui contiennent les informations sur ce qu'il s'est passé lors des différentes étapes de l'expérience : injection, rinçage, régénération (déshybridation du duplexe sonde-cible)... Les zones elliptiques visibles sur ces images (figure II.17) correspondent aux endroits où les sondes ADN ont été déposées (processus détaillé dans la partie III.1 du chapitre suivant sur la fonctionnalisation de surface de la biopuce). Ces zones sont les ROI utilisées lors du traitement des images, afin d'en extraire les informations de l'interaction que l'on souhaite étudier.

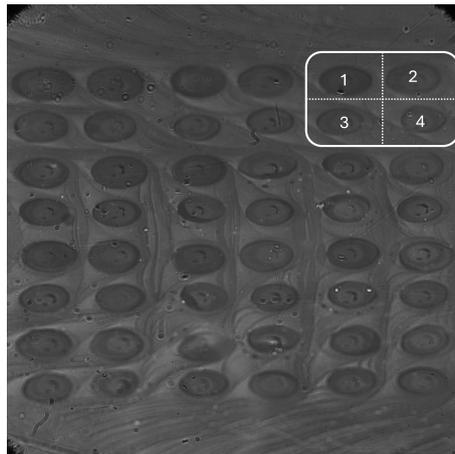


FIGURE II.17 – Image d'une biopuce recouverte de la solution tampon au début d'une mesure de cinétique sur le banc angulo-spectral. Les plots arrangés sous forme d'une matrice géométrique se répétant sont visibles à la surface de la biopuce : arrangement de 12 matrices (3 colonnes et 4 lignes) de 4 plots comprenant chacun une séquence ADN simple brin différente.

Pour des raisons de reproductibilité et de précision de la mesure SPRI, une séquence est déposée plusieurs fois sur la surface : plusieurs ROIs contiennent la même séquence ADN. Toutes ces ROIs d'une même séquence forment une famille et il y a plusieurs séquences sur une même biopuce, soit plusieurs familles. Sur l'image précédente, une matrice contenant quatre séquences différentes a été déposée sur la surface de la biopuce. Cette matrice est répétée trois fois horizontalement et quatre fois verticalement, cela donne 4 familles de séquences d'ADN différentes, chacune composée de 12 ROIs, soit 48 ROIs au total sur la partie imagée de la biopuce. Une de ces familles est une séquence de référence : elle est choisie pour ne pas avoir

d'affinité avec une cible que l'on souhaite détecter. Lors du traitement des données, cette famille de référence peut être soustraite à toutes les autres familles que l'on souhaite étudier afin de s'affranchir de bruits de mesure parasites : bruit électronique, variation de température, saut d'indice...

Le film d'images est traité par un programme Matlab qui a été créé et développé au LCF, puis modifié pour permettre également le traitement des images du banc Horiba. Ce programme permet l'extraction des cinétiques d'interaction expérimentales en fonction du temps, ayant la même allure que celles du graphique II.16 de la partie précédente. Les grandes étapes du traitement des images sont les suivantes : récupération du film d'images, soustraction de la première image afin d'avoir les résultats en variation de réflectivité, division du film d'images par une image TE pour normaliser les données. Ce premier processus récupère la variation de réflectivité sur l'entièreté des images. Les noms des différentes familles des sondes présentes à la surface de la biopuce, leur position ainsi que leur taille (carré de x par x pixels) sont rentrées dans le programme Matlab. Il est également possible à cette étape du traitement de choisir d'utiliser un masque pour extraire le signal sur des ROI de forme quelconque. Après définition des ROIs, le programme peut afficher pour les différentes injections de cible les variations de réflectivité associées à chaque famille de ROIs. Une fois que toutes les familles sont définies et la réponse pour chaque ROI récupérée, on peut choisir de moyenniser les courbes d'une même famille et de soustraire la famille de référence des autres afin de s'affranchir des dérives.

Tous les graphiques qui seront présentés dans la suite de ce manuscrit sont des courbes de cinétique obtenues grâce à ce programme Matlab. Les pentes des cinétiques peuvent ensuite être extraites pour obtenir l'information d'intérêt biologique.

Dans ce chapitre, une présentation large a été faite des deux bancs de SPRI qui ont été utilisés durant cette thèse pour réaliser les différentes mesures expérimentales. Une étude comparative des performances des deux appareils a été réalisée. Cette comparaison a permis de conclure que tous les deux ont la même limite de détection de l'ordre de 10^{-6} RIU, ce qui était attendu au vu de l'état de l'art exposé au chapitre précédent dans la partie I.4 où la limite théorique de la SPR est abordée. Un modèle du premier ordre des cinétiques d'interaction à la surface de la biopuce a été expliqué dans une dernière partie. Cette relation a permis de trouver la meilleure façon la plus rapide de traiter les données expérimentales, avec un programme Matlab sur mesure, et de les interpréter dans un contexte de détection rapide et à faible concentration de cible grâce à l'étude des pentes des cinétiques d'interaction.

Chapitre III

Spécificité de la détection : fonctionnalisation de la biopuce et des nanoparticules d'or

III.1 Optimisation de la chimie de surface	80
III.1.1 Chimie cystéamine	80
III.1.2 Chimie MUA/MCH.	81
III.1.3 Chimie mixte (Cystéamine/MCH).	82
III.1.4 Étude comparative	83
III.1.4.1 Conditions expérimentales des mesures SPRI	83
III.1.4.2 Comparaison de la chimie cystéamine et la chimie MUA	86
III.1.4.3 Comparaison de la chimie cystéamine et la chimie mixte	93
III.1.4.4 Synthèse des résultats de l'étude comparative des chimies de surface	97
III.2 Modification du biorécepteur	99
III.2.1 Choix des séquences sondes pour la capture de miARNs	99
III.2.2 Étude expérimentale des sondes LNA.	100
III.3 Obtention des nanoparticules d'or	102
III.3.1 Synthèse des nanoparticules d'or	103
III.3.2 Fonctionnalisation des nanoparticules	109

La détection par plasmon de surface, grâce à l'absence de marquage, présente de nombreux avantages, mais aussi quelques inconvénients. Parmi ces derniers, on note le manque de spécificité intrinsèque du système de détection ; l'onde évanescente du plasmon de surface est sensible à toutes les espèces moléculaires interagissant avec la surface de la biopuce, sans distinction. Pour remédier à ce problème, il est nécessaire de fonctionnaliser cette surface.

Comme mentionné dans la partie I.3.3, dans le cadre de la biodétection l'utilisation de l'or comme couche métallique est privilégiée pour sa biocompatibilité, sa stabilité chimique et la facilité avec laquelle on peut y fixer des biorécepteurs. Dans cette partie, les différentes modifications apportées au protocole de chimie de surface sont détaillées, puis les changements apportés aux oligonucléotides servant de biorécepteurs pour hybrider spécifiquement des miARNs sont expliqués. Ensuite, la méthode de synthèse choisie pour les nanoparticules d'or (AuNPs) est présentée, suivie du protocole de fonctionnalisation développé sur ces dernières pour être compatible avec la méthode sandwich autour d'un miARNs en milieu salin.

III.1. Optimisation de la chimie de surface

Deux protocoles de chimie de surface pour fonctionnaliser de l'or pour de la biodétection en SPRI sont maîtrisés et utilisés au sein du groupe de Biophotonique au LCF à Paris-Saclay : la chimie cystéamine [18] et la chimie MUA/MCH [202, 203]. Ils ont déjà été validés lors de diverses expériences de biodétection impliquant de l'ADN simple brin [204, 18, 20, 202, 203], cependant chacun d'entre eux présente certaines faiblesses. Pour les minimiser, ces deux protocoles ont été combinés afin d'en retirer les avantages de chacun sans les inconvénients dans un nouveau protocole de fonctionnalisation de surface : la chimie mixte (cystéamine/MCH). Tous les protocoles de fonctionnalisation de surface mentionnés dans la suite de cette partie sont détaillés en [Annexe C](#) de ce document avec les références des produits chimiques utilisés. Pour finir cette partie et quantifier l'efficacité de ce nouveau protocole, une étude comparative du signal SPRI sur des biopuces fonctionnalisées suivant ces trois protocoles de fonctionnalisation a été réalisée.

III.1.1. Chimie cystéamine

La création d'une monocouche de molécules organisée sur une surface d'or est connue et maîtrisée depuis la fin des années 80 [205]. Au cœur de cette technique se trouve le principe de chimisorption ayant lieu entre un atome d'or et de soufre, ce processus a été élaboré plus en détails dans la partie I.3.1 précédente.

Le protocole de chimie cystéamine [18] est basé sur cette technique, la molécule qui forme la monocouche auto-assemblée (*SAM* : *self assembled monolayer*) est le β -mercaptoéthylamine, aussi connu sous le nom de cystéamine, donnant son nom au protocole chimique. Cette molécule est constituée d'une chaîne de deux carbones entourée d'un côté d'un groupement thiol ($-SH$) et de l'autre d'une amine ($-NH_2$). La deuxième étape de ce protocole permet de lier de façon covalente à la SAM la molécule de PDC (1,4 phénylène-diisothiocyanate) sur le groupement amine. Cette molécule, grâce à son cycle benzène, apporte de la rigidité à la structure de la chimie de surface en orientant toutes les chaînes à l'opposé de la surface d'or. Puis de la streptavidine, comportant également un groupement $-NH_2$, est liée de l'autre côté de la molécule de PDC. La streptavidine est une protéine qui possède quatre sites de liaison permettant chacun

d'immobiliser une biotine[121]. Cette liaison chimique, presque instantanée et très forte, permet de venir immobiliser dans une dernière étape des simples brins d'ADN biotinylés agissant comme sonde de capture ou biorécepteur. Ces brins d'ADN biotinylés, disponibles commercialement, sont déposés sous forme d'une matrice organisée de nanogouttes grâce à une imprimante à molécules (ou spotter) (figure III.1). Cette technique permet de venir déposer sur la surface d'or plusieurs sondes, avec chacune une séquence de bases différente. Couplée avec l'imagerie pour la partie détection, cette méthode permet de venir détecter sur une seule biopuce plusieurs cibles lors d'une même analyse (multiplexage de la détection).

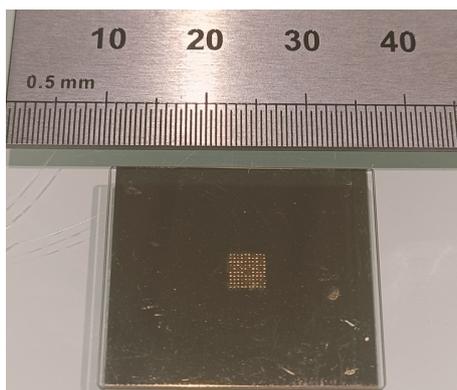


FIGURE III.1 – Photo d'une biopuce SPRI sur laquelle ont été déposées les sondes ADN sous forme de nanogouttes arrangées suivant une matrice géométrique à l'aide d'une imprimante à molécules ou spotter.

Les différentes étapes de ce protocole de chimie cystéamine permettant la fixation covalente des biorécepteurs sous forme de simples brins d'ADN sont schématisées sur la figure III.2 suivante.

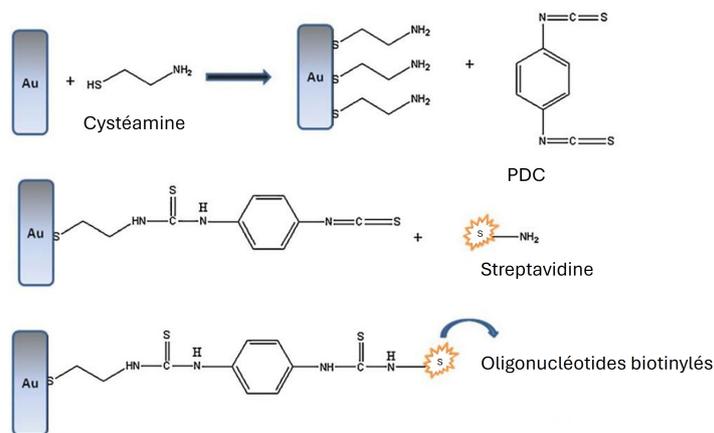


FIGURE III.2 – Schéma des réactions chimiques successives permettant de fixer les sondes ADN mono-brin à la surface de l'or lors du protocole de chimie cystéamine.

III.1.2. Chimie MUA/MCH

De la même façon que le protocole de cystéamine, le protocole de chimie MUA commence par la formation d'une SAM par chimisorption d'atomes de soufre sur la surface d'or. Dans ce protocole, deux types de thiols sont utilisées afin de former cette monocouche : 1-Mercapto-11-undecanoic acid (MUA) et 1-mercapto-6 hexanol (MCH). Les proportions de

ces deux molécules sont 25% et 75% en concentration : 2 mM et 6 mM respectivement [206]. Lors de la formation d'une SAM mixte de deux molécules, le principe général est d'utiliser une molécule non-active et une molécule active. La première est souvent terminée par un alcool ($-OH$) afin de ne pas participer à la suite de la chimie, dans notre cas le MCH. La molécule active participe également à l'élaboration de la SAM tout en ayant le rôle de précurseur pour le reste de la fonctionnalisation. Dans ce protocole, la molécule active est le MUA qui se termine par un groupement fonctionnel carboxyle ($-COOH$).

La formation de SAM composées de deux molécules thiolées et les effets sur la surface d'or ont été abondamment étudiés dans la littérature [207, 208, 205, 209]. Cette technique offre plusieurs avantages comparée à une simple SAM. L'utilisation d'une molécule non-active permet tout d'abord de passiver la surface (groupement alcool $-OH$ très stable chimiquement et non chargé) tout en aidant à former la SAM de manière homogène pour isoler l'or d'adsorptions non spécifiques. Cela réduit également l'encombrement stérique des molécules à la surface de l'or lorsque les étapes suivantes de la fonctionnalisation nécessitent l'ajout d'une plus grosse molécule, comme une protéine : dans notre cas la streptavidine.

Afin de permettre l'absorption chimique du $-NH_2$ de cette protéine, le groupement $-COOH$ du MUA est activé avec un mélange d'EDC/NHS (N-(3-diméthylaminopropyl)-N'ethylcarbodiimide et hydrochloride/N-hydroxysuccinimide) afin de réduire le $-COOH$ en $-COO^-$. À la suite de cette étape d'accroche de la streptavidine, le protocole est similaire au précédent et les sondes biotinylées sont déposées sous la forme d'une matrice de nanogouttes organisées.

Les différentes étapes de la réaction structurelle de ce protocole de chimie MUA/MCH permettant la fixation covalente des sondes ADN simple brin sont schématisées sur la figure III.3 suivante.

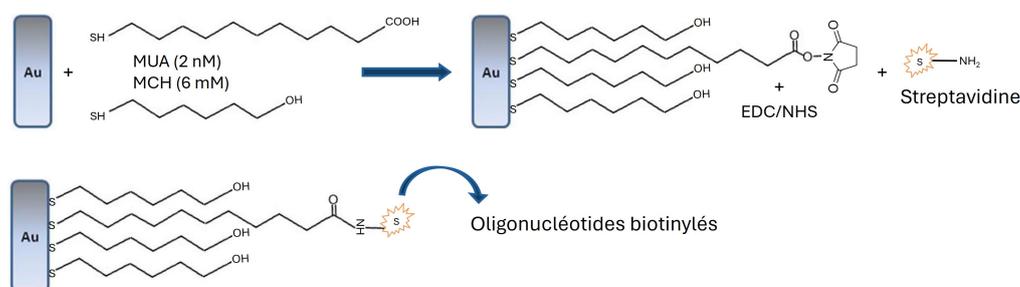


FIGURE III.3 – Schéma des réactions chimiques successives permettant de fixer les sondes ADN mono-brin à la surface de l'or lors du protocole de chimie MUA

III.1.3. Chimie mixte (Cystéamine/MCH)

La chimie mixte a été développée afin de récupérer les avantages des deux chimies précédentes. On souhaite réduire les effets d'encombrement stérique lors de l'ajout de la streptavidine et d'éviter que des groupements fonctionnels à la fin de la molécule thiolée restent non utilisés mais actifs. Pour cela, la formation d'une SAM mixte comme dans le protocole de MUA/MCH est gardée.

Le composé non actif reste le même que pour la chimie MUA : le MCH finissant par un groupement $-OH$. Cependant, l'utilisation de la molécule de cystéamine comme composé actif

permet de retrouver la rigidité de l'empilement moléculaire grâce à sa liaison successive avec la molécule de PDC composée d'un cycle benzène. Les étapes suivantes restent les mêmes que pour la chimie cystéamine avec la liaison chimique de la streptavidine puis l'immobilisation des sondes biotinylées grâce au spotter.

Les différentes étapes de la réaction structurale de ce protocole de chimie mixte (Cystéamine/MCH) permettant la fixation covalente des sondes ADN simple brin sont schématisées sur la figure III.4 suivante.

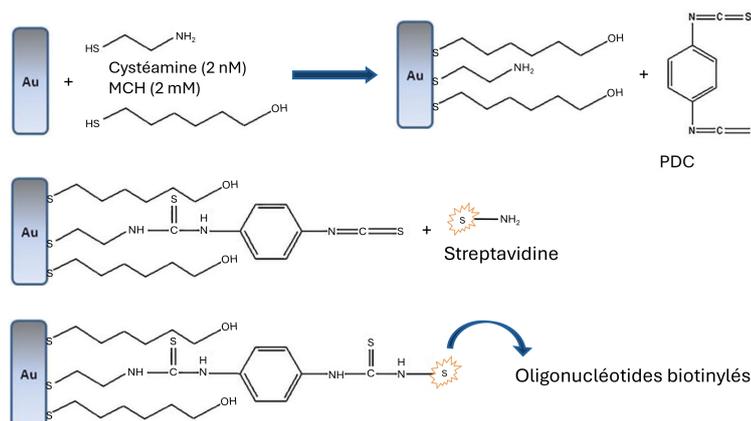


FIGURE III.4 – Schéma des réactions chimiques successives permettant de fixer les sondes ADN mono-brin à la surface de l'or lors du protocole de chimie mixte utilisant une SAM mixte de cystéamine et de MCH à la surface de l'or.

III.1.4. Étude comparative

Pour choisir le protocole de fonctionnalisation de surface le plus adapté, plusieurs biopuces ont été préparées suivant les trois protocoles de chimie présentés dans les parties précédentes en suivant les instructions détaillées en [Annexe C](#). Ensuite, différentes séquences de simple brin d'ADN ont été immobilisées sur la surface d'or sous la forme d'une matrice. Comme décrit dans la partie II.3.2 du chapitre précédent, une fois les biopuces préparées, elles sont installées dans le banc SPRI et les cibles simples brin d'ADN complémentaires sont injectées grâce au système de fluide dans la chambre afin de les faire interagir avec les sondes à la surface.

III.1.4.1. Conditions expérimentales des mesures SPRI

Les conditions expérimentales sont gardées constantes entre les différentes expériences réalisées afin d'avoir des résultats comparables et quantifiables, mais diffèrent légèrement entre le banc angulo-spectral et le Horiba. Elles sont répertoriées dans le tableau ci-dessous III.1 en fonction du banc expérimental utilisé.

Conditions expérimentales	Banc Horiba	Banc angulo-spectral
Solution tampon	PBS 2x	PBS 2x
Température de la chambre	24°C	24°C
Vitesse de la fluide	75 $\mu\text{L}/\text{min}$	75 $\mu\text{L}/\text{min}$
Nombre d'images moyennées	non connu	16 images
Temps d'acquisition	3 secondes	3 secondes
Zone imagée	5 x 5 mm	3 x 3 mm

TABLE III.1 – Conditions expérimentales des deux bancs SPRI pour réaliser les expériences de biodétection présentées dans ce manuscrit.

Les séquences cibles ont été choisies à partir des séquences des miARNs que l'on souhaite détecter dans le projet Epi Storm. Pour simplifier cette étude comparative des chimies seules des séquences ADN ont été utilisées, les miARNs étant plus complexes à manipuler. Les séquences des miARNs ont donc été transcrites en séquences ADN afin de garder un point de comparaison. Les séquences des miARNs et de leur équivalent ADN sont listées dans le tableau III.2 suivant.

Nom du simple brin	Séquence 5'->3'	Nombre de bases
Cible_125a_ARN	UCCUGAGACCCUUAACCUGUGA	24
Cible_125a_ADN	TCCCTGAGACCCTTTAACCTGTGA	24
Cible_423_ARN	UGAGGGGCAGAGAGCGAGACUUU	23
Cible_423_ADN	TGAGGGGCAGAGAGCGAGACTTT	23

TABLE III.2 – Séquences des simples brins de miARNs ainsi que leur équivalent ADN que l'on souhaite détecter par SPRI.

Afin d'avoir une cible ADN de référence, une séquence déjà connue et étudiée lors de travaux précédents sur la mucoviscidose (maladie génétique) a été ajoutée : la séquence dite WT. Sa cinétique d'hybridation est bien connue dans l'équipe et, de plus, le complexe sonde-cible est facilement déshybridable avec des injections d'eau. Ce point est très important afin de ne pas saturer la surface lors d'injections successives de cibles pour les études en concentrations. Les séquences des cibles ADN sont fixées par rapport aux séquences des miARNs, mais les séquences des sondes utilisées pour l'accroche peuvent être optimisées. L'objectif de cette optimisation est d'avoir des T_m assez élevées dans la solution tampon d'hybridation (PBS) pour garantir une bonne affinité, mais qui descendent en dessous de 24°C (température de la chambre pendant l'expérience) dans de l'eau pure afin d'assurer la déshybridation du complexe entre les différentes injections. Les différentes T_m présentées dans la suite de ce manuscrit ont été calculées grâce à l'outil *OligoTool Analyzer* en libre accès sur le site de notre fournisseur canadien d'oligonucléotides IDT. Si l'hybridation entre la sonde et la cible a lieu entre toutes les bases listées dans le tableau III.2 précédent, les T_m dans l'eau sont encore beaucoup trop élevées : $T_{m_{423}}=38,6^\circ\text{C}$ et $T_{m_{125a}}=35,6^\circ\text{C}$. Pour cette raison, le nombre de bases complémentaires à la cible dans la séquence de la sonde a été diminué jusqu'à atteindre ce compromis entre la T_m dans le PBS et celle dans l'eau pure. Pour les séquences 125a et 423, seulement 15 bases sont complémentaires entre la sonde et la cible. Ces séquences ainsi que les T_m dans du PBS et de

l'eau sont répertoriées dans le tableau III.3 qui suit.

Nom de la séquence	Sonde	cible	$T_{m_{PBS}} - T_{m_{EAU}}$
WT	TTCTAATGATGATTA	TAATCATCATTAGAA	44,2°C - 8,8°C
125a_ADN	TCACAGGTAAAGGG	CCCTTTAACCTGTGA	52,8°C - 21,5°C
423_ADN	AAAGTCTCGCTCTCT	AGAGAGCGAGACTTT	56,2°C - 22,9°C

TABLE III.3 – Séquences complémentaires s'hybridant lors l'expérience de biodétection par SPRI ainsi que leurs températures de dénaturation dans du PBS et dans de l'eau.

La régénération des différentes cibles ADN du projet (125a, 423, WT) a été vérifiée expérimentalement à l'aide d'injections successives de cibles à forte concentration (100 nM) avec, entre chaque, une injection d'eau déionisée (DI) pendant 5 minutes. Les signaux SPRI obtenus lors de ces injections successives ont été tracés sur la figure III.5 pour chacune des trois familles étudiées, permettant d'observer l'efficacité du processus de régénération.

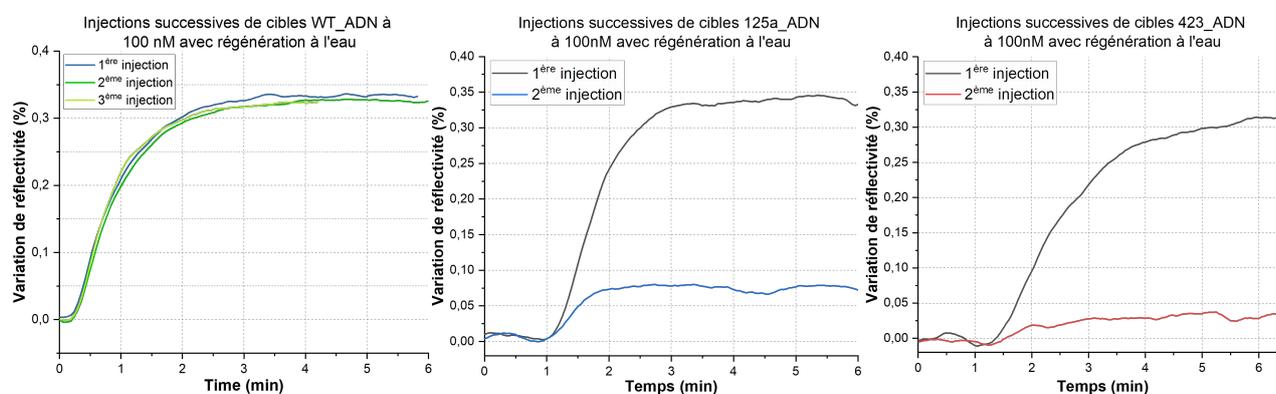


FIGURE III.5 – Cinétiques d'hybridation sur chimie cystéamine entre les brins complémentaires d'une même famille, de gauche à droite : WT, 125a et 423. Les injections successives de cibles sont réalisées à 100 nM avec une étape de régénération entre chaque injection : eau DI pendant 5 minutes.

Le graphique de gauche confirme que les signaux d'hybridation après régénération sont comparables à celui obtenu initialement pour les séquences WT. Cela confirme que les sondes peuvent être hybridées et régénérées plusieurs fois sans perte significative de performance, rendant le protocole reproductible et robuste. Cela est particulièrement important, pour que les signaux SPRI restent linéaires lors de l'injection successive de faibles concentrations. Cependant, pour les séquences 125a et 423, le signal obtenu lors de la deuxième injection après régénération à l'eau DI s'est révélé bien plus faible que le premier. D'après les courbes, on peut estimer que seulement 22% des sondes ADN_125a et 12% des sondes ADN_423 sont de nouveau disponibles après régénération avec de l'eau DI. Cela n'est pas totalement inattendu car les T_m dans l'eau de ces séquences sont à peine inférieure à la température de travail. Afin d'améliorer ce pourcentage de sondes régénérées, plusieurs conditions expérimentales ont été testées, notamment l'utilisation de solutions basiques avec un pH entre 8 et 11, ainsi que le chauffage de la chambre fluide à des températures allant de 30°C à 40°C. Ces essais ont permis d'améliorer la régénération des sondes, mais seulement jusqu'à un pourcentage de 37% pour la séquence 125a. Cependant, ce gain reste insuffisant pour justifier l'usage de ces méthodes, qui provoquent une dégradation

prématurée de la chimie de surface, réduisant ainsi le nombre d'injections possibles sur une biopuce. Le protocole de régénération des duplexes n'a donc pas été modifié et consiste toujours en une injection d'eau DI pendant 5 minutes, même si elle n'offre qu'une régénération partielle des sondes ADN 125a et 423.

Toutes les séquences ADN des sondes et des cibles qui ont été utilisées pour les expériences présentées dans la suite de cette partie sont listées dans le tableau III.4. Dans ce tableau, les bases en gras correspondent aux bases complémentaires dont l'hybridation est suivie en SPRI lors des expériences présentées dans la suite de cette partie (WT, 125a ou 423). Il y a également en italique une séquence dite de calibration présente sur toutes les sondes (sauf la référence). Cette séquence a été imaginée historiquement dans le groupe de biophotonique du LCF pour vérifier la qualité de la chimie de surface et que toutes les sondes présentes sont fonctionnelles. En effet, lors de l'envoi du complémentaire de cette séquence de calibration toutes les sondes, sauf la référence, donnent un signal et ce signal est directement proportionnel à la quantité de sondes actives dans le plot. Également, un espaceur standard TEG, composé d'une chaîne de 16 carbones, est placé entre les bases et la biotine, cette dernière permettant l'immobilisation de la sonde sur la streptavidine.

Nom du simple brin	Séquence 5'->3'	Nombre de bases
Sonde_WT	Biotin-TEG- <i>TTGACCGGTATGCGTTCTAATGATGATTA</i>	27
Cible_WT	<i>TCCATAATCATCATTAGAA</i>	19
Cible_WT_AuNPs	Biotin-TEG- <i>TTATTATTATAATCATCATTAGAA</i>	24
Sonde_125a_ADN	Biotin-TEG- <i>TTGACCGGTATGCGTCACAGGTTAAAGGG</i>	29
Cible_125a_ADN	<i>TCCCTGAGACCCTTAACCTGTGA</i>	24
Sonde_423_ADN	Biotin-TEG- <i>TTGACCGGTATGCGAAAGTCTCGCTCTCT</i>	29
Cible_423_ADN	<i>TGAGGGGCAGAGAGCGAGACTTT</i>	23
Calibration	<i>CGCATAACCGGTCAA</i>	14

TABLE III.4 – Séquences des simples brins d'ADN complémentaires (sonde et cible) utilisés pour réaliser l'étude comparative des protocoles de chimie de surface. Les bases en gras et italique étant les séquences complémentaires dont l'hybridation est suivie lors de la biodétection par SPRI.

III.1.4.2. Comparaison de la chimie cystéamine et la chimie MUA

L'étude comparative des performances des différents protocoles de chimie de surface a commencé en comparant les deux protocoles utilisés initialement au LCF à Paris-Saclay : la chimie cystéamine et la chimie MUA/MCH. Le but de cette comparaison était de savoir quel protocole serait utilisé pour la suite des expériences en comparant leur limite de détection et leur stabilité chimique. Pour ce faire, les sondes mono-brin ont été immobilisées sur la surface de la biopuce à une concentration de 6 μM afin d'avoir une quantité suffisante de sondes en surface sans en avoir en trop qui viendrait déborder et contaminer sur le reste de la biopuce lors de l'injection de la fluide. Quatre sondes ont été immobilisées : la séquence de référence (ZIP) et trois séquences d'ADN dont on dispose du complémentaire (sonde_125a_ADN, sonde_423_ADN, sonde_WT). Cette biopuce est ensuite déposée sur un prisme en verre SF10 avant de placer le

tout dans le banc angulo-spectral. Les conditions expérimentales sont fixées suivant le protocole expliqué dans la partie II.2.1 du chapitre précédent. Lorsque les conditions expérimentales du couplage plasmonique sont établies, la surface de la biopuce apparaît comme sur l'image de la figure III.6.

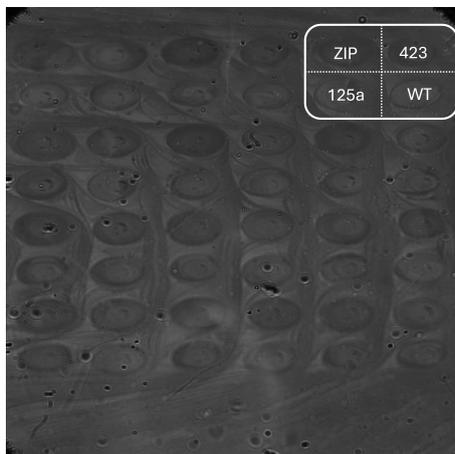


FIGURE III.6 – Image de la surface d’or de la biopuce en SPRI : résonance plasmonique dans une solution tampon de PBS 2x. Les plots sont visibles sur l’image : distinction des matrices spottées avec les sondes ADN (ZIP, sonde_125a_ADN, sonde_423_ADN, sonde_WT).

Des expériences d’hybridation entre brins d’ADN complémentaires pour les séquences de calibration, 125a et 423 ont été menées. Cependant, seules les mesures d’hybridation des séquences de calibration et 125a sont présentées dans la suite de cette étude. Il s’est avéré que la sonde 423 avait une structure secondaire avec une T_m autour de 60°C . Cette T_m étant comparable avec celle de l’hybridation avec la cible complémentaire, rendant impossible les mesures à faible concentration. Une nouvelle séquence pour la sonde 423 a été conçue afin d’éliminer cette structure secondaire, mais nous n’avons pas eu le temps de faire les expériences d’hybridations. Pour la séquence 125a, afin de comparer les différents protocoles de chimie de surface, plusieurs indicateurs doivent être étudiés : la quantité de sondes réellement immobilisée en surface, le signal SPRI dû à des interactions non spécifiques et enfin le signal d’hybridation en % de réflectivité par minute.

Les deux premiers indicateurs sont directement obtenus avec une injection de séquence de calibration à forte concentration (100 nM). Pour déterminer la quantité de sondes immobilisée en surface, il suffit de quantifier les signaux maximum R_{max} de réflectivité qui sont directement proportionnels à cette quantité. Ces signaux SPRI sont tracés sur le graphique de la figure III.7. Le maximum de signal moyen pour l’hybridation de la séquence de calibration sur la sonde 125a vaut $0,64 \pm 0,05\%$ pour la chimie cystéamine et $0,59 \pm 0,06\%$ pour la chimie MUA. L’écart type standard est mesuré sur 10 ROI, soit 10 plots d’une même famille. On observe que la dispersion est assez faible, environ 10% du signal total. La différence entre les valeurs R_{max} pour les deux chimies rentre dans les écarts types de mesure et ne donne pas l’avantage à une chimie en particulier. La mesure du signal non spécifique est également réalisée sur cette injection. Ce signal est défini comme l’écart type à la moyenne des plots de référence, qui sont constitués d’une séquence ADN_ZIP n’ayant aucune complémentarité avec les autres. Il vaut $S_{NS_{cys}} = 0,034\%$ pour la chimie cystéamine et $S_{NS_{MUA}} = 0,047\%$ pour la chimie MUA sur une injection de 7 minutes.

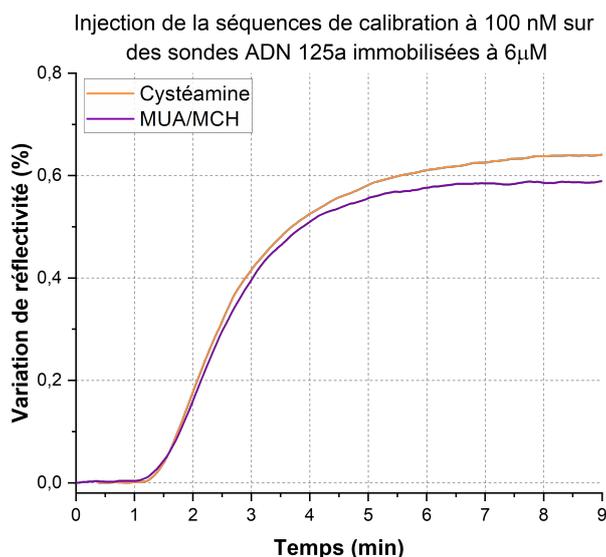


FIGURE III.7 – Mesure de réflectivité moyennée lors de l'injection de la séquence de calibration pour deux protocoles de chimie de surface : chimie cystéamine (violet) et chimie MUA/MCH (orange).

Ensuite, afin de calculer la limite de détection pour chacune des chimies, plusieurs solutions de cibles_125a_ADN à différentes concentrations sont injectées grâce au système de fluide. Entre chaque injection de cibles, une étape de régénération, est réalisée en injectant de l'eau déionisée (DI) ultra-pure pendant 5 minutes. Les images enregistrées lors de la durée de l'expérience sont traitées grâce au programme Matlab. Les étapes du traitement de ces images, l'obtention des courbes de cinétiques ainsi que le calcul des pentes sont expliqués dans la partie II.3.2 du chapitre précédent.

Dans un premier temps, il est nécessaire de vérifier que le modèle de cinétique du premier ordre, où l'on néglige la constante de dissociation, est applicable dans nos expériences. Pour cela, une étape de rinçage de 30 minutes dans la solution tampon est rajoutée entre la fin de l'injection de cibles et la régénération à l'eau. Si le duplexe sonde-cible venait à se dissocier durant cette période de rinçage le signal SPRI baisserait significativement, dans le cas contraire, si le signal reste stable, cela confirme que la constante de dissociation peut être négligée. Les courbes de cinétiques pour cette expérience réalisée sur une chimie cystéamine sont tracées sur la figure III.8. Ces courbes de cinétiques expérimentales confirment que le signal SPRI ne diminue pas lors du rinçage, confirmant que la constante de dissociation est négligeable dans celle d'association. Le modèle de cinétique présenté dans la partie II.3.1 est donc applicable les expériences présentées dans la suite.

Pour les deux chimies de surface à comparer : cystéamine et MUA/MCH, les courbes de cinétique moyennées pour chaque famille de sonde sont tracées et comparées pour les injections de cibles à différentes concentrations. La figure III.9 montre un exemple de cinétiques pour des injections de cibles à 1 et 10 nM. Pour le même temps d'injection, la variation de réflectivité est directement lié à la concentration de cible injectée : plus la concentration est élevée, plus la variation de réflectivité est rapide. Ces courbes de cinétique expérimentales permettent de calculer le coefficient directeur de la partie linéaire de l'exponentielle grâce à un ajustement par une fonction affine. On observe que l'injection de cibles dans la gamme de concentration de la

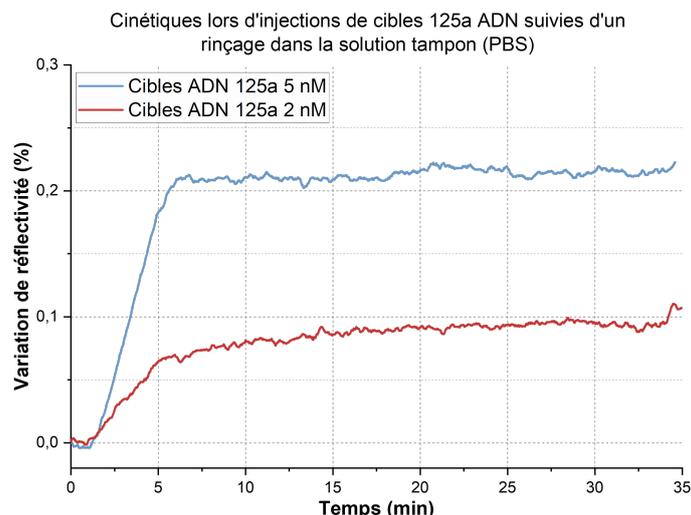


FIGURE III.8 – Variation de réflectivité en fonction du temps lors de l’injection de cibles 125a ADN à différentes concentrations (2 nM et 5 nM) suivies d’un rinçage dans la solution tampon (PBS) afin de suivre l’accrochage puis le décrochage du duplexe sonde-cible.

dizaine de nanomolaire ou moins permet de rester en régime linéaire afin de pouvoir comparer les injections entre elles.

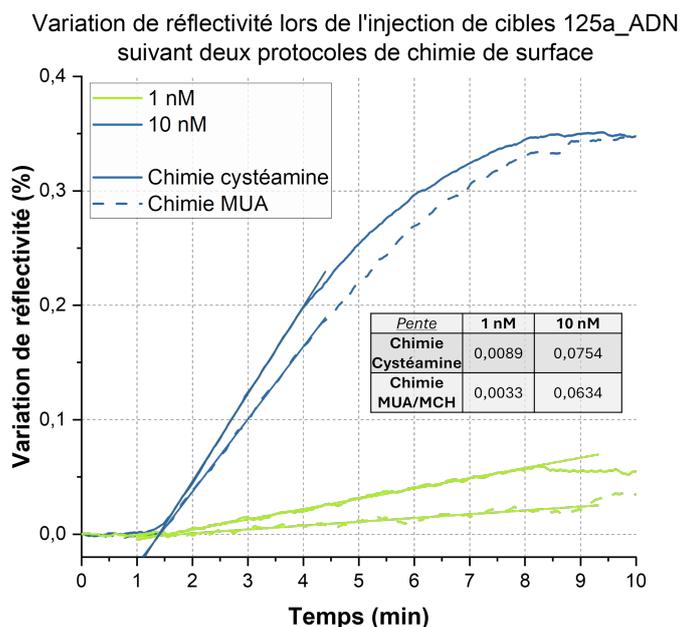


FIGURE III.9 – Mesure de réflectivité pour deux concentrations de cibles ADN 125a suivant deux protocoles de fonctionnalisation différents : chimie cystéamine (trait plein) et chimie MUA/MCH (trait pointillé).

Cette partie linéaire n’est présente que sur un temps court (< 2 minutes) pour l’injection à 10 nM de cibles tandis que, pour l’injection à 1 nM, la cinétique conserve une allure linéaire après les six minutes d’injection. Pour cette dernière concentration, la pente de la cinétique pour la chimie cystéamine est $P_{CYS_{1nM}} = 0,0089 \pm 0.0012\%/min$, alors que celle pour la chimie MUA est de $P_{MUA_{1nM}} = 0,0033 \pm 0.0010\%/min$. Ainsi, la détection de la cible ADN 125a à 1 nM est meilleure d’un facteur $f_{1nM} = 2.7$ en faveur de la chimie cystéamine. Le même raisonnement

s'applique à l'injection à 10 nM, où le rapport des pentes est $f_{10nM} = 1,2$, également en faveur de la chimie cystéamine. Cette différence dans les valeurs du ratio peut être expliquée par la dispersion expérimentale, et il est nécessaire de réaliser d'autres mesures à des concentrations intermédiaires pour obtenir une tendance plus précise quant au gain en efficacité.

Ainsi, les pentes moyennes des cinétiques d'hybridation avec leur écart-type en fonction de la concentration de cibles injectées sont représentées en échelle logarithmique sur le graphique de la figure III.10. Sur ce graphique, le signal SPRI minimal attendu pour être mesurable est tracé en tant que ligne horizontale (en orange pointillée). Cette valeur minimale est dépendante du bruit et donc du système de SPRI utilisé. Elle a été mesurée pour un saut d'indice dans le chapitre précédent à la partie II.2.3 et vaut $S_{min_{AS}} = 0,015 \%$ pour le banc angulo-spectral du LCF. Cependant, dans une expérience d'hybridation, il faut également prendre en compte le temps d'injection. Le signal minimum détectable doit être divisé par le nombre de minutes qui sont utilisées pour l'injection afin d'avoir une valeur comparable. Dans notre cas, pour 5 minutes d'injection, cela donne un pente minimum détectable de $S_{min_{AS_{hybridation}}} = 0,0003 \%/min$.

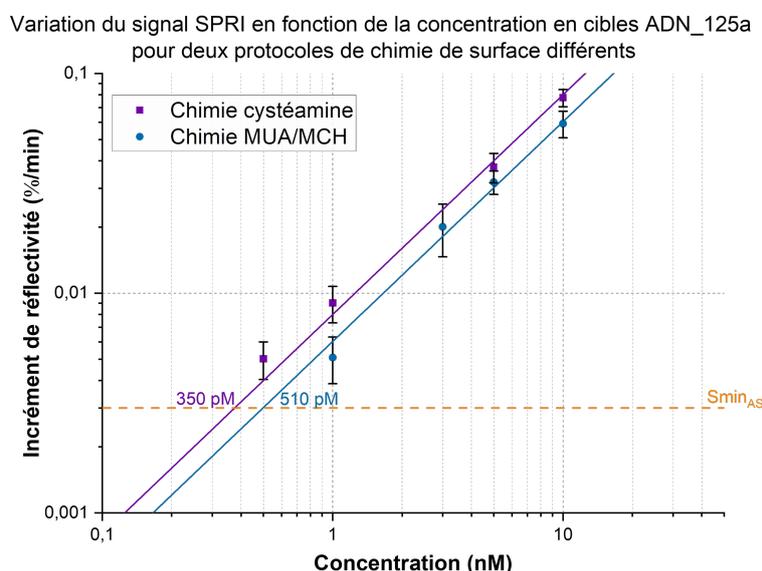


FIGURE III.10 – Graphique de comparaison des limites de détection pour les deux protocoles de chimie initiaux : cystéamine (en bleue) et MUA/MCH (en violet).

La limite de détection en concentration des cible_125a_ADN peut ensuite être déterminée en prenant l'intersection de la régression linéaire sur les valeurs des pentes, avec le signal minimum détectable. La limite de détection pour la chimie cystéamine vaut $LOD_{CYS_{125a}} = 370pM$, légèrement inférieure à celle de la chimie MUA/MCH qui vaut $LOD_{MUA_{125a}} = 510pM$. Cela représente un facteur d'amélioration de la détection de $f = 1,35$ en faveur de la chimie cystéamine, confirmant ainsi une meilleure sensibilité avec ce protocole de fonctionnalisation pour la détection des cibles ADN 125a.

Ces mesures permettent également de calculer la constante d'association entre les brins complémentaires pour ces deux chimies de surface. Ce calcul est réalisé suivant la méthode décrite dans la partie II.3.2 du chapitre précédent : le signal SPRI en $\%/min$ est divisé par R_{max} , puis ces valeurs sont tracées en fonction de la concentration. La valeur du coefficient directeur de l'ajustement linéaire des points correspond à k_{ass} . Plus simplement, le coefficient linéaire de la régression linéaire présentée dans le graphique III.10 est divisé par la valeur maximale du

signal SPRI R_{max} pour une injection à forte concentration de cibles 125a. Cette expérience a été réalisée sur la chimie cystéamine avec un $R_{max_{CYS}}=0,34\pm 0,03\%$, confirmant de nouveau une dispersion d'environ 10% sur la valeur moyenne des ROI au sein d'une même famille. La valeur du signal maximum étant proportionnel au taux de couverture des sondes, il peut être retrouvé pour la chimie MUA grâce à l'injection de calibration présentée dans la figure III.7. La valeur calculée du signal SPRI maximum dans le cas de l'hybridation de la séquence 125a est $R_{max_{MUA}}=0,31\%$. Ainsi les deux constantes d'association pour chaque chimie peuvent être calculées et valent $k_{ass_{CYS}}=0,024 \text{ nM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ et $k_{ass_{MUA}}=0,019 \text{ nM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

En conclusion, cette comparaison confirme que la chimie cystéamine permet une meilleure détection des cibles ADN comparée à la chimie MUA/MCH. La raison principale de cet écart est probablement la meilleure disponibilité des sondes en surface grâce au PDC qui permet une orientation des sondes mieux contrôlée. Ce n'est pas le cas avec la chimie MUA/MCH qui comprend seulement un empilement de chaînes carbonées avant l'attache de la streptavidine et des sondes. On suppose que ces chaînes carbonées ont tendance à s'agglomérer au plus proche de la surface, créant ainsi une mauvaise orientation des sondes ADN.

Afin de vérifier cette théorie, un test de passivation a été mené sur des biopuces avec ces deux chimies de surface. Le test de passivation consiste à injecter dans le banc SPRI des sondes biotinylées sur une biopuce déjà spottée afin de voir si celles-ci peuvent toujours s'accrocher sur la streptavidine laissée libre entre les plots. Les images de différence en fausses couleurs entre le début et la fin de l'injection de passivation pour les deux chimies de surface sont présentées sur la figure III.11 ci-dessous.

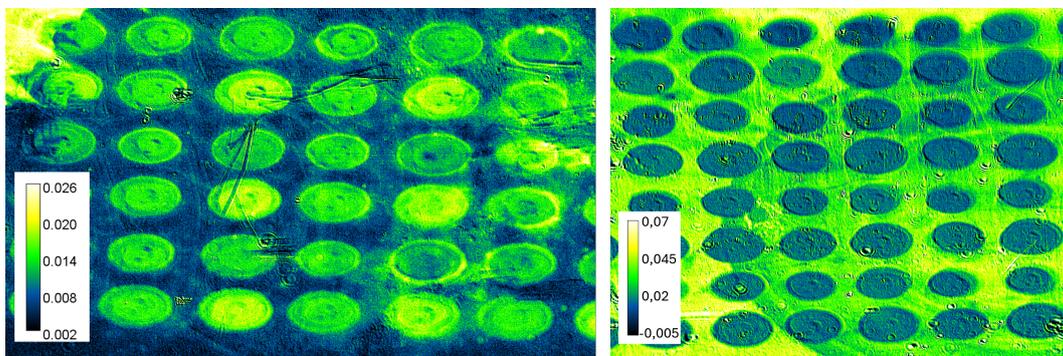


FIGURE III.11 – Images de différence entre le début et la fin de l'injection de passivation pour les deux chimies de surface étudiées : chimie MUA à gauche et cystéamine à droite.

La différence évidente entre ces deux images est l'inversion des couleurs, sur l'image de gauche pour la chimie MUA, les sondes biotinylées se sont accrochées préférentiellement à l'intérieur des zones spottées au contraire de la chimie cystéamine sur l'image de droite où les zones qui ont le plus de signal sont celles autour des plots. À partir de ces images, il est possible comme précédemment de venir extraire la cinétique d'accroche des sondes biotinylées afin de comparer quantitativement les signaux SPRI. Différentes ROI ont été définies à l'intérieur des plots spottés de sondes_125a_ADN et dans les zones entre les plots sans sondes où il reste de streptavidine libre. La variation de réflectivité sur ces deux zones pour les deux chimies de surface est tracée sur le graphique de la figure III.12 qui suit. On retrouve l'inversion de contraste observée sur l'image confirmant une très grande différence d'accroche dans les zones non spottées entre chimie cystéamine et chimie MUA/MCH.

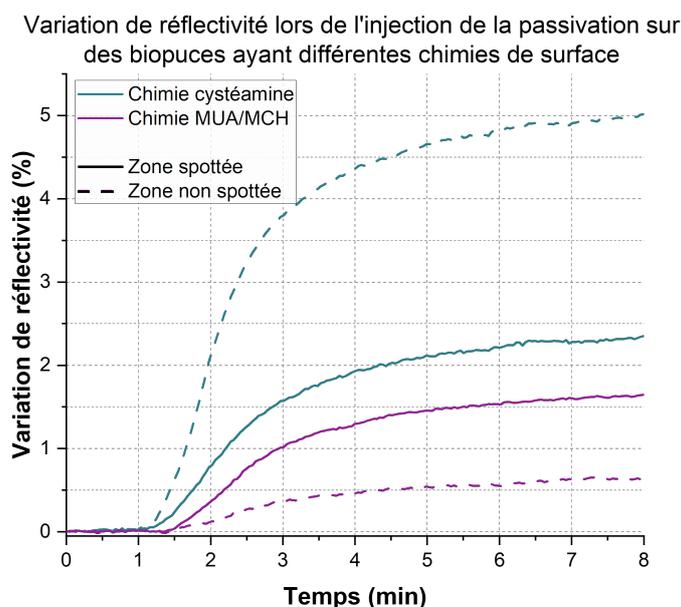


FIGURE III.12 – Variation de réflectivité en fonction du temps lors de l'injection de la solution de passivation sur des biopuces avec différentes fonctionnalisations de surface : chimie cystéamine et MUA/MCH

Plus précisément, à l'intérieur des plots (courbes en trait plein), on mesure un signal moyen pour la chimie cystéamine de $2,3 \pm 0,28\%$ comparé à $1,7 \pm 0,21\%$ pour la chimie MUA. Cette prise de la séquence de passivation biotinylée est due au fait que l'on dépose les sondes à une concentration ($6 \mu\text{m}$) inférieure à la saturation. Il reste donc de la streptavidine libre dans les plots. La différence entre les chimies est bien plus importante dans les zones non spottées (courbes en pointillés) avec un signal moyen de $4,9 \pm 0,38\%$ enregistré pour la chimie cystéamine comparé à $0,6 \pm 0,05\%$ pour la chimie MUA/MCH. Ces deux comparaisons confirment que peu importe la zone analysée, la quantité de sonde de passivation qui s'accroche est inférieure pour la chimie MUA/MCH. Sachant que la streptavidine est la molécule finale sur les deux chimies, et que les signaux de calibration présentés plus haut sont équivalents, impliquant la même quantité de sondes, la seule explication pour cette différence vient probablement de l'accessibilité des sites de capture de la streptavidine au moment de l'expérience. Cela indiquerait que la chimie MUA/MCH rend les sites de capture de la streptavidine moins accessibles, bien que la quantité initialement déposée de cette protéine soit comparable entre les deux méthodes de fonctionnalisation.

Comme évoqué précédemment, dans le cas de la chimie cystéamine, l'assemblage moléculaire a une grande rigidité avec une orientation préférentielle de la streptavidine, et donc des sondes biotinylées, perpendiculairement à la surface d'or. Dans le cadre de la chimie MUA/MCH, la streptavidine est accrochée à la suite de chaînes carbonées. Ces dernières n'étant pas rigides, elles ont tendance à se replier sur elles-mêmes et se réorganiser au plus proche de la surface d'or entraînant avec elles la streptavidine liée en son extrémité. Cette protéine se retrouve alors coincée entre les chaînes carbonées proches de la surface et ses sites de liaison ne sont plus accessibles aux sondes biotinylées. Si les sondes sont immobilisées rapidement après l'accroche de la streptavidine, ce qui est le cas pour celles qui sont spottées, les chaînes carbonées n'ont pas encore eu le temps de se réorganiser, donc un maximum de sondes peut être immobilisées sur la streptavidine. Cependant, les biopuces n'étant pas utilisées directement après dans le banc SPRI

pour les mesures de biodétection, les chaînes carbonées se réorganisent dans ce laps de temps et inhibent la streptavidine justifiant une accroche très faible des sondes biotinylées lors de leur injection. Ce phénomène a aussi lieu dans les zones spottées, bloquant cette fois-ci en plus de la streptavidine, les sondes ADN accrochées et donc une moins bonne limite de détection.

Protocole de chimie	Limite de détection	Signal SPRI maximal	Signal non spécifique	k_{ass} 125a
MUA/MCH	500 pM	0,59±0.06%	0,034%	0,019 nM ⁻¹ .mi ⁻¹
Cystéamine	370 pM	0,64±0.05%	0,047%	0,024 nM ⁻¹ .mi ⁻¹

TABLE III.5 – Tableau résumant les résultats expérimentaux de la comparaison des deux protocoles de chimie de surface MUA/MCH et cystéamine.

La comparaison de ces deux protocoles de chimie de surface a mis en lumière plusieurs éléments qui sont résumés dans le tableau III.5. Tout d'abord, le signal maximal R_{max} lors de l'injection de la séquence de calibration confirme que le taux de couverture pour les deux chimies reste comparable : autant de sondes sont immobilisées sur la surface de la biopuce dans les deux cas. Cependant, le signal SPRI non spécifique est plus élevé et la limite de détection en concentration, ainsi que la constante d'association, sont moins bonnes pour la chimie MUA. Cependant, la chimie MUA/MCH a une SAM mixte qui offre la liberté d'ajuster la densité de groupements fonctionnels et donc de limiter ceux non utilisés, ce qui peut s'avérer crucial pour les expériences avec l'amplification par nanoparticules et dans un milieu complexe. C'est à la suite de ces résultats qu'est venue l'idée de combiner ces deux chimies pour garder leurs avantages respectif en créant la chimie mixte qui utilise la cystéamine et le MCH.

III.1.4.3. Comparaison de la chimie cystéamine et la chimie mixte

Contrairement à la chimie MUA/MCH, la chimie mixte utilisant de la cystéamine et du MCH n'est pas répertoriée dans la littérature. Il a fallu déterminer le ratio optimal entre les deux molécules et comparer les performances de cette chimie avec la cystéamine. Plusieurs ratios de cystéamine/MCH ont été testés lors de la création de la SAM, ils sont répertoriés dans le tableau III.6 suivant.

Concentration en cystéamine	Concentration en MCH	Pourcentage de cystéamine
1 mM	3 mM	25%
2 mM	2 mM	50%
3 mM	1 nM	75%
4 mM	0 mM	100%

TABLE III.6 – Proportion de cystéamine et de MCH dans le protocole de fonctionnalisation de surface suivant la chimie mixte.

Le protocole utilisé pour comparer ces différentes chimies de surface est le même que celui réalisé pour comparer la chimie cystéamine avec la chimie MUA/MCH toujours sur le banc angulo-spectral. Cependant, cette fois-ci la comparaison a été réalisée avec les séquences 125a mais également avec les séquences WT. Ces dernières séquences ont été étudiées lors d'un projet

de thèse antérieur et ont l'avantage d'être complètement régénérables avec de l'eau DI seulement, permettant d'injecter des concentrations plus élevées.

Pour commencer la comparaison des chimies, une injection de la séquence cible de calibration à forte concentration (100 nM) a permis de déterminer le taux d'immobilisation des sondes sur la streptavidine. Les cinétiques d'hybridation de la calibration pour les différentes chimies sont reportées sur les graphiques de la figure III.13 pour les sondes 125a et WT.

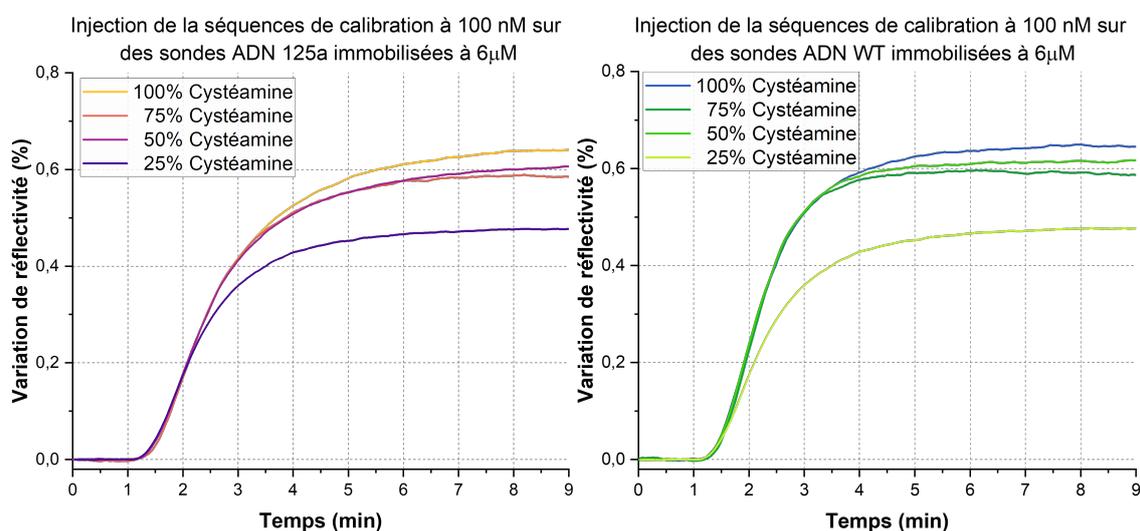


FIGURE III.13 – Mesure de réflectivité lors de l'injection de la séquence de calibration avec les sondes 125a (à gauche) et WT (à droite) pour différentes concentrations de cystéamine dans la chimie mixte.

Ces deux graphiques confirment les mêmes résultats : le signal maximal R_{max} est toujours supérieur pour la chimie cystéamine qui comprend le plus de molécules actives dans la SAM et permet donc l'accroche d'un plus grand nombre de sondes. Le signal R_{max} montre une diminution de 7% pour les chimies mixte à 50% et 75% par rapport à la cystéamine à 100%. Cette différence de signal étant dans l'écart type de mesure, il n'y a pas de différence significative dans la quantité de sondes immobilisées entre ces trois chimies. Une diminution plus significative de 27% du signal pour la chimie mixte à 25% par rapport à la chimie cystéamine est observée. Cette dernière comparaison indique clairement qu'une proportion trop faible de cystéamine dans le mélange conduit à une immobilisation moins efficace des sondes sur la surface, affectant ainsi la densité des sondes disponibles pour la détection.

Pareillement à la comparaison précédente, cette injection a également permis de déterminer le signal non spécifique pour chaque proportion de cystéamine. Ce signal non spécifique est calculé comme étant l'augmentation du signal sur les plots de référence entre le début et la fin de l'injection. Il est à son minimum pour la chimie à 75% de cystéamine avec une valeur de $S_{NS75\%} = 0,025\%$. Il est très similaire pour les trois autres protocoles, pour les ratios de 25%, 50% et 100% avec des valeurs de 0,032%, 0,031% et 0,034% respectivement.

Afin de comparer cette fois-ci les performances à faibles concentrations des différents ratios de cystéamine dans la chimie mixte, des injections à 1 nM de cibles ont été effectuées. Après traitement des images, les courbes de cinétiques pour chaque ratios peuvent être tracées et les pentes pour chacune calculée comme sur la figure III.14.

Cette figure met en avant que la chimie mixte, SAM composée de deux molécules, à n'importe quel ratio, permet une meilleure détection que la chimie cystéamine, qui elle-même était meilleure

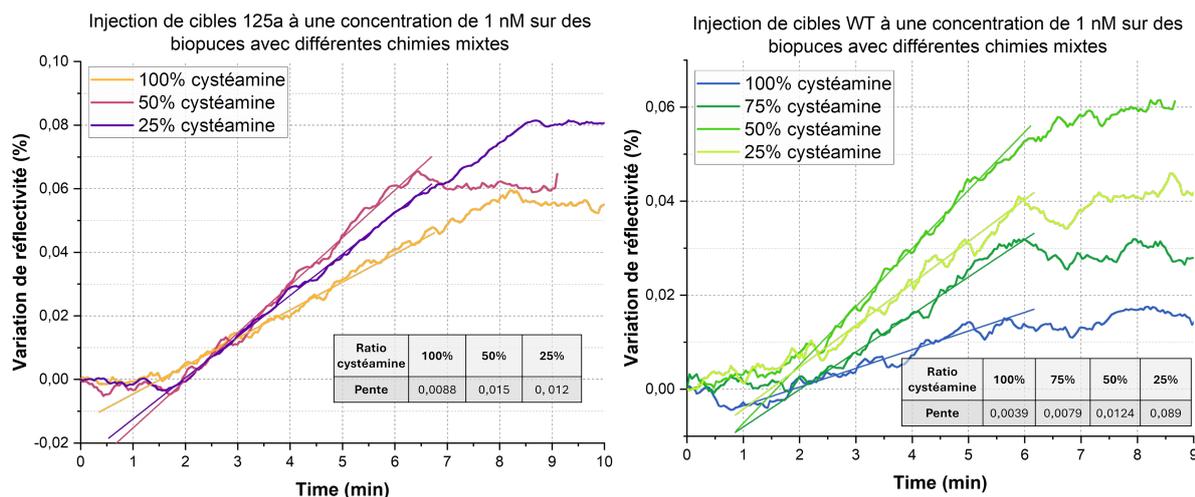


FIGURE III.14 – Cinétiques d'hybridation lors d'une injection de cible à 1 nM pour différents ratios de cystéamine dans la chimie mixte. À gauche : hybridation des séquences 125a ADN. À droite : hybridation des séquences WT ADN.

que la chimie MUA/MCH. On a un optimum pour une chimie mixte à 50% de cystéamine et 50% de MCH.

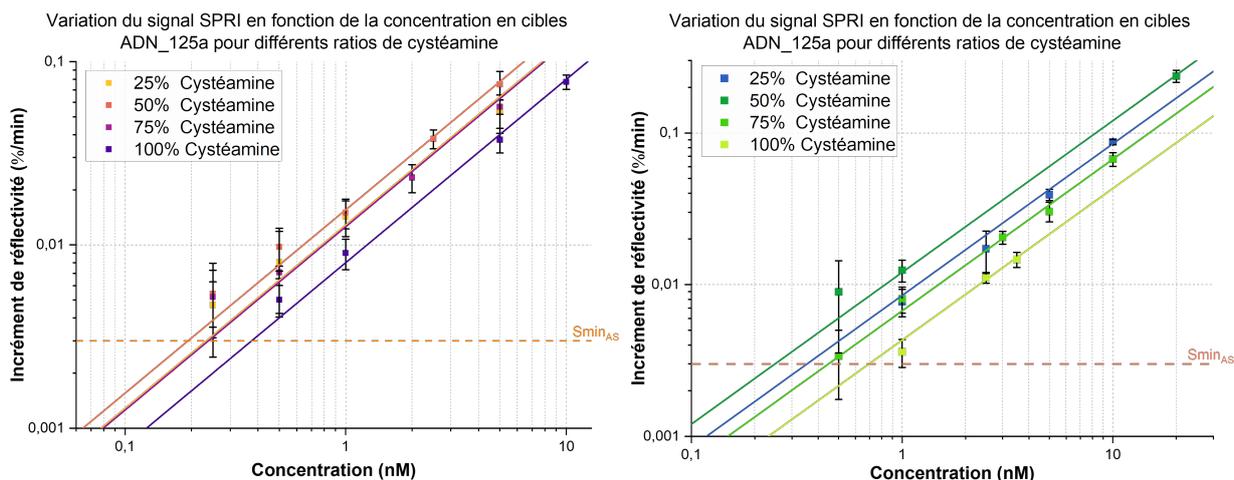


FIGURE III.15 – Graphique comparant les limites de détection lors de l'hybridation de brins d'ADN complémentaires pour différentes proportions de cystéamine dans la chimie mixte. À gauche : hybridation des séquences 125a ADN. À droite : hybridation des séquences WT ADN.

Pour confirmer la tendance, des injections à d'autres concentrations ont été faites et les pentes extraites. La figure III.15 compare le signal SPRI pour toutes les chimies mixtes en fonction de la concentration des deux cibles injectées, WT et 125a. Ces deux graphiques confirment que c'est bien un ratio de 50% entre la molécule de cystéamine et celle de MCH qui apporte le meilleur signal SPRI et donc la plus faible limite de détection. Pour plus de clarté sur le graphique, ces LOD sont répertoriées dans le tableau III.7 et tracées dans le graphique III.16 en fonction de la concentration de cystéamine.

Pour la détection de cibles 125a, la LOD passe de 370 pM à 190 pM entre la chimie mixte à 50% et la chimie cystéamine, soit une amélioration de quasiment un facteur 2. Pour les cibles WT, l'amélioration est encore plus forte : on passe de 700 pM à 250 pM, soit une amélioration

Concentration en cystéamine	Limite de détection cible_125a_ADN	Limite de détection cible_WT
25%	230 pM	350 pM
50%	190 pM	250 pM
75%	240 pM	440 pM
100%	370 pM	700 pM

TABLE III.7 – Limite de détection en concentration de cible ADN 125a et WT en fonction de différents protocoles de fonctionnalisation : chimie cystéamine et mixte.

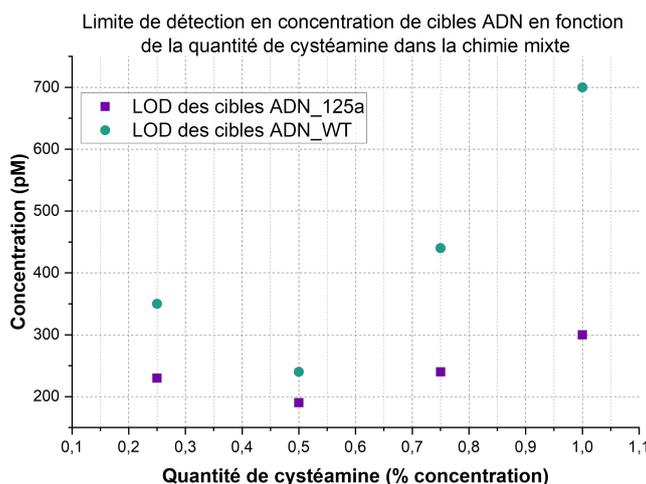


FIGURE III.16 – Comparaison des limites de détection en concentration suivant les différentes chimies de surface en fonction du ratio de cystéamine présente dans la SAM lors de la fonctionnalisation de surface.

d'un facteur $f_{WT} = 2,8$. La différence est probablement liée aux séquences d'oligonucléotides différentes et donc une affinité différente avec la sonde (la température de dénaturation du complexe étant liée à la composition en bases des séquences). Également, les deux sondes sont spottées à la surface à une concentration de $6\mu M$ mais cette concentration n'est pas toujours exacte et contient une part d'erreur : sur la micropipette lors de la préparation des solutions, lors du prélèvement avec l'aiguille du spotter et l'homogénéité de la solution prélevée lorsque l'on travaille avec de si petits volumes. Malgré cette différence, ces résultats concluent de manière homogène que l'utilisation de la chimie mixte permet de faire baisser la limite de détection de simples brins d'ADN en SPRI indépendamment de la séquence de celui-ci dans les mêmes conditions expérimentales.

Comme précédemment, cette comparaison des chimies avec des injections des cibles à différentes concentrations permet également la détermination expérimentale des constantes d'association des complexes ADN cible/sonde pour les sondes 125a et WT. Le signal maximum R_{max} vaut $R_{max_{WT}} = 0,33 \pm 0,03\%$ pour les WT et $R_{max_{125a}} = 0,34 \pm 0,03\%$ pour les 125a dans le cas de la chimie à 100% de cystéamine. Les valeurs des signaux maximum pour les autres chimies de surface sont calculées à partir de la comparaison des signaux maximum lors de l'injection de la calibration réalisée sur toutes les chimies de surface et présentée plus haut dans la figure III.13. Les différentes constantes d'association en fonction de la famille de séquence étudiée et des chimies de surface sont répertoriées dans le tableau III.8. On observe que les constantes d'association

sont maximales pour la chimie mixte 50 %, confirmant l'intérêt de cette fonctionnalisation de surface.

Concentration en cystéamine	R_{max} cible 125a_ADN	k_{ass} 125a $nM^{-1}.mi^{-1}$	R_{max} cible WT	k_{ass} WT $nM^{-1}.mi^{-1}$
25%	0,26%	0,049	0,24%	0,035
50%	0,32%	0,049	0,31%	0,039
75%	0,30%	0,042	0,30%	0,022
100%	0,34%	0,024	0,33%	0,013

TABLE III.8 – Valeur des signaux SPRI maximum R_{max} ainsi que les constantes d'association k_{ass} pour les séquences 125a et WT en fonction de différents ratios de cystéamine dans le protocole de chimie mixte.

III.1.4.4. Synthèse des résultats de l'étude comparative des chimies de surface

La comparaison des performances SPRI pour l'hybridation de simple brin d'ADN implique l'analyse de plusieurs paramètres : le taux de couverture des sondes sur la surface de la biopuce, le signal associé aux interactions non spécifiques, l'accessibilité des sondes pour l'hybridation ainsi que la constante d'affinité entre brins complémentaires. Le premier est directement lié au signal SPRI maximal R_{max} , lorsque les plots sont spottés à la même concentration. Le signal non spécifique peut être calculé comme étant l'écart type de la mesure sur les plots de référence lors d'une injection de cible. Enfin, l'accessibilité des sondes est directement reliée au signal d'hybridation en %/min du complexe sonde-cible. La constante d'association de ce complexe est ensuite calculée comme étant le signal d'hybridation ΔR par rapport au signal maximal R_{max} mesurable pour l'hybridation étudiée. Tous ces paramètres ont été déterminés expérimentalement en SPRI pour les cinq protocoles de chimie de surface comparés dans cette partie : chimie MUA/MCH, chimie cystéamine et chimie mixte à différents ratios (25%, 50% et 75%). Un tableau récapitulatif des résultats ainsi qu'un histogramme des paramètres les plus pertinents sont présentés ci-dessous pour la séquence 125a.

Protocole de chimie	Limite de détection instrumentale	R_{max} calibration	Signal non spécifique	k_{ass} 125a
MUA/MCH	500 pM	0,59%	0,047%	0,019 $nM^{-1}.mi^{-1}$
100% Cystéamine	370 pM	0,64%	0,034%	0,024 $nM^{-1}.mi^{-1}$
75% Cystéamine	240 pM	0,57%	0,025%	0,042 $nM^{-1}.mi^{-1}$
50% Cystéamine	190 pM	0,6%	0,031%	0,049 $nM^{-1}.mi^{-1}$
25% Cystéamine	230 pM	0,47%	0,032%	0,049 $nM^{-1}.mi^{-1}$

TABLE III.9 – Tableau résumant les résultats expérimentaux de la comparaison des cinq protocoles de chimie de surface : MUA/MCH, chimie cystéamine et chimie mixte à différents ratios (25%, 50% et 75%).

La comparaison de tous ces paramètres permet de mettre en évidence que la chimie la plus adaptée à notre utilisation est la chimie mixte à 50% de cystéamine. Elle permet une limite de détection plus basse des cibles lors de leur hybridation, donc une meilleure accessibilité des sondes

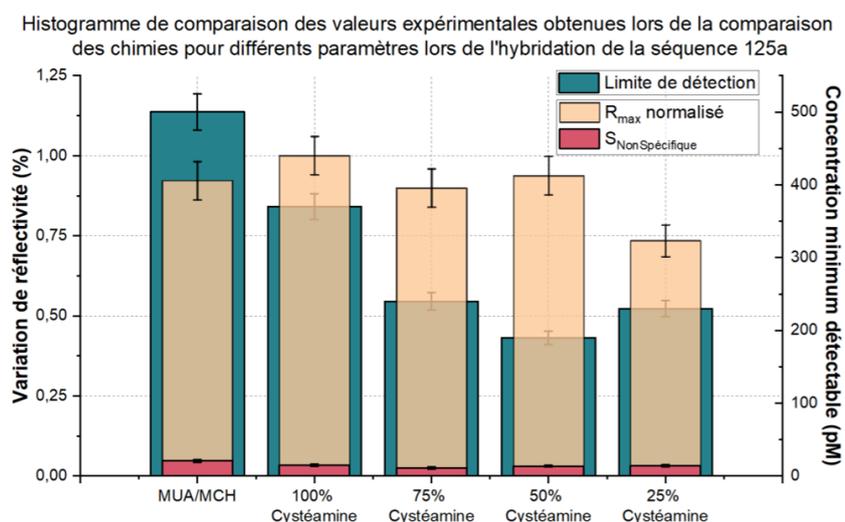


FIGURE III.17 – Histogramme comparant différents paramètres lors la comparaison des protocoles de chimie de surface pour la séquence 125a : la limite de détection en concentration, le signal SPRI maximum normalisé par rapport à la chimie cystéamine et le signal SPRI non spécifique (nombre d'échantillons au total $N=10$, soit $n=2$ par chimie de surface).

tout en gardant une couverture de ces dernières maximale sur la biopuce donnant la constante d'association la plus importante. Également, le signal non spécifique est comparable aux autres chimies permettant de confirmer une détection dans les meilleures conditions expérimentales.

Des essais de répétabilité ont été réalisés sur le banc Horiba à Sherbrooke afin de confirmer que la chimie mixte à 50 % offrait une meilleure limite de détection par rapport à la chimie à base de cystéamine, utilisée auparavant comme référence. Ces essais se sont concentrés uniquement sur l'hybridation de la séquence WT afin d'éviter les problèmes de régénération liés aux autres séquences. Pour chaque chimie, trois biopuces ont été fonctionnalisées. Les pentes moyennes des régressions linéaires du signal SPRI en fonction de la concentration étaient de $R_{cys} = 0.0023 \pm 0.0003 \text{ } \%/min/nM$ pour la chimie cystéamine et de $R_{mixte50} = 0.0053 \pm 0.0004 \text{ } \%/min/nM$ pour la chimie mixte à 50%. Cette comparaison, effectuée sur six échantillons (trois pour chaque protocole de chimie), confirme donc que l'utilisation de la chimie mixte à 50 % améliore significativement la détection de l'hybridation entre séquences complémentaires, avec un gain d'un facteur $f \approx 2,3$ pour la séquence WT même dans un autre laboratoire et avec un instrument SPRI différent.

Pour conclure cette partie, la comparaison des différents procédés de chimie de surface a permis de mettre en avant plusieurs points importants lors du choix du protocole. Même si la chimie MUA/MCH est très référencée dans la littérature, elle ne correspondait pas parfaitement à notre utilisation, notamment dans le cas de l'ajout d'une protéine dans la suite protocole. La chimie cystéamine avec une simple SAM a une meilleure sensibilité de détection que la chimie MUA/MCH pour notre application. Cependant, afin de vérifier que l'utilisation d'une SAM à deux molécules apporte quand même ses avantages, une chimie mixte utilisant la cystéamine et le MCH a été testée. Après comparaison expérimentale des signaux SPRI obtenus pour toutes ces chimies de surface, la chimie mixte s'est retrouvée comme étant celle qui donnait les meilleures performances de détection en SPRI. La proportion optimale entre la cystéamine et le MCH a

également été trouvée en réalisant des biopuces suivant plusieurs ratios (25%, 50% et 75% de cystéamine) et en comparant différents paramètres lors de cinétique d'hybridation d'ADN. Cette dernière étude a permis de définir qu'une proportion de 50% entre la cystéamine et le MCH était optimale et permettait d'offrir la meilleure disponibilité des sondes avec un signal non spécifique dans la moyenne permettant d'abaisser la limite de détection d'un facteur compris entre 2 et 3 comparé à la chimie cystéamine. Sauf indication contraire, c'est donc ce protocole de chimie de surface qui sera réalisé sur les biopuces pour les prochaines expériences de SPRI présentées dans ce manuscrit.

III.2. Modification du biorécepteur

III.2.1. Choix des séquences sondes pour la capture de miARNs

Ce projet de thèse vise à réduire la LOD en SPRI pour la détection de simples brins d'ARN, en particulier des miARNs. Ces miARNs ont été sélectionnés en collaboration avec le groupe de recherche médicale participant au projet Epi Storm. Les deux séquences étudiées sont répertoriées dans le tableau III.10 qui suit. Comme démontré dans la partie précédente, un facteur d'amélioration de la limite de détection en concentration, compris entre 2 et 3, peut être obtenu en optimisant le protocole de chimie de surface et l'accessibilité des sondes. Bien que ces tests aient été réalisés sur des simples brins d'ADN, les résultats sont entièrement transposables à la détection de simples brins d'ARN, puisque le mécanisme d'hybridation reste identique.

Nom du miARNs	Séquence 5'->3'	Nombre de bases
miR-125a-5p	UCCUGAGACCCUUAACUGUGA	24
miR-423-5p	UGAGGGGCAGAGAGCGAGACUUU	23

TABLE III.10 – Séquences de miARNs choisies pour réaliser les tests de détection dans le cadre de cette thèse.

Un deuxième point abordé dans le chapitre I de l'état de l'art, dans la partie I.3.3, concerne le choix du biorécepteur, qui doit être adapté à la cible à détecter. Pour la détection de simples brins d'ADN, cette question ne se pose pas, car la sonde est elle-même constituée d'un simple brin d'ADN complémentaire à la cible. Cependant, dans le cas de la détection d'ARN, la situation est plus complexe. Deux alternatives aux sondes ADN ont été présentées : les bases PNA (*Peptide Nucleic Acid*) et LNA (*Locked Nucleic Acid*). Suivant la littérature et les caractéristiques de ces bases modifiées, toutes deux expliquées dans le chapitre I, l'utilisation de LNA semble la plus appropriée dans notre contexte.

Les sondes utilisées pour la capture des miARNs doivent répondre à plusieurs critères. Tout d'abord, elles doivent être compatibles avec une amplification par méthode sandwich tout en étant suffisamment sélectives pour capturer spécifiquement le miARN ciblé. Ensuite, comme les sondes ADN présentées dans la partie précédente, elles doivent avoir une T_m suffisamment élevée en solution tampon pour assurer une capture maximale à faible concentration, tout en minimisant la déshybridation. Par ailleurs, la T_m doit être plus basse dans l'eau afin de faciliter la déshybridation du complexe miARN-sonde. Un autre critère crucial concerne la disposition et la fréquence des bases LNA dans le brin d'ADN. Plusieurs études rapportées dans la littérature ont montré que l'insertion de bases LNA toutes les trois bases ADN dans la séquence de capture permet

d'améliorer l'affinité de la sonde d'un facteur 10, et qu'au-delà de cette fréquence, l'ajout de bases LNA supplémentaires n'apportait pas d'amélioration significative [210, 211, 144]. C'est donc sur ces différents critères que nous avons choisis les séquences hybrides ADN/LNA afin de fabriquer les sondes LNA pour la capture des miARNs 125a et 423. Les séquences complémentaires utilisées basées sur tous ces critères ainsi que leur T_m associée dans le PBS et l'eau sont listées dans le tableau III.3 suivant. Les bases LNA sont entourées par des alinéas {} et le nombre de bases complémentaires avec l'ARN est réduit afin de baisser suffisamment la T_m dans l'eau et espérer une déshybridation du complexe.

Nom de la séquence	Sonde ADN/LNA	Cible ARN	$T_{m_{PBS}} - T_{m_{EAU}}$
125a_LNA	{T}CA{C}AG{G}TT{A}AA{G}	CUUUAACCUUGUGA	41,5°C - 11°C
423_LNA	{A}AA{G}TC{T}CG{C}TC{T}	AGAGCGAGACUUU	49,5°C - 18,7°C

TABLE III.11 – Séquences complémentaires entre des sondes LNA et la cible ARN s'hybridant lors l'expérience de biodétection par SPRI ainsi que leurs températures de dénaturation dans du PBS et de l'eau.

En prenant en compte toutes ces contraintes, les sondes LNA ont été construites et sont listées dans le tableau III.12. Dans ce même tableau, les séquences des miARNs, la séquence de calibration et les séquences complémentaires codées (en gras ou en italique) sont indiquées. Les bases LNA sont toujours entourées par des alinéas {} et toutes les sondes ont un espaceur TEG entre la biotine, qui permet l'immobilisation de la sonde sur la streptavidine, et le début de la séquence.

Nom du simple brin	Séquence 5'->3'	Nombre de bases
miR-125a-5p	UCCCUGAGACCCU UUAACCUUGUGA	24
miR-423-5p	UGAGGGGCAGAGAGCGAGACUUU	23
Calibration	<i>CGCATACCGGTCAA</i>	14
sonde_125a_ADN	BiotinTEG- <i>TTGACCGGTATGC</i> TCACAGGTAAAG	27
sonde_423_ADN	BiotinTEG- <i>TTGACCGGTATGC</i> AAAGTCTCGCTCT	27
sonde_125a_LNA	BiotinTEG- <i>TTGACCGGTATGC</i> {T}CA{C}AG{G}TT{A}AA{G}	27
sonde_423_LNA	BiotinTEG- <i>TTGACCGGTATGC</i> {A}AA{G}TC{T}CG{C}TC{T}	27

TABLE III.12 – Séquences des miARNs (en gras) et de la séquence de calibration (en italique) ainsi que les sondes hybrides ADN/LNA complémentaires utilisées pour la capture.

Avec ce choix de séquence, seulement 13 bases s'hybrident entre les sondes LNA et les cibles miARNs; mais grâce à l'ajout des bases LNA la température de dénaturation de ces complexes restent au-dessus de 50°C. Également, cette configuration permet de laisser l'extrémité du miARN en 5' libre afin de venir faire une amplification en sandwich grâce à des nanoparticules d'or fonctionnalisées avec le complémentaire de ces bases libres.

III.2.2. Étude expérimentale des sondes LNA

Une fois le choix des séquences réalisé pour les sondes LNA destinées à capturer les miARNs, des tests de détection ont été menés sur le banc Horiba au LN2 afin de quantifier

expérimentalement l'amélioration de la détection. Ces tests visaient à évaluer l'efficacité des sondes LNA par rapport aux sondes ADN traditionnelles, en se basant sur les performances en termes de limite de détection (LOD) pour les miARNs ciblés. Sur la même biopuce, des sondes ADN et LNA sont spottées à la même concentration de $6\mu\text{M}$. Ensuite, le protocole de comparaison reste similaire à celui réalisé lors de la comparaison des chimies : injections de cibles à différentes concentrations, puis calcul de la pente de la cinétique pour chaque injection.

Cette étude expérimentale des signaux d'hybridation en SPRI a été réalisée pour les deux séquences de miARNs cibles, 125a et 423, et leur sonde complémentaire ADN et LNA, répertoriées dans le tableau III.12. Une fois les images traitées et les courbes de cinétiques extraites, les signaux SPRI peuvent être comparés.

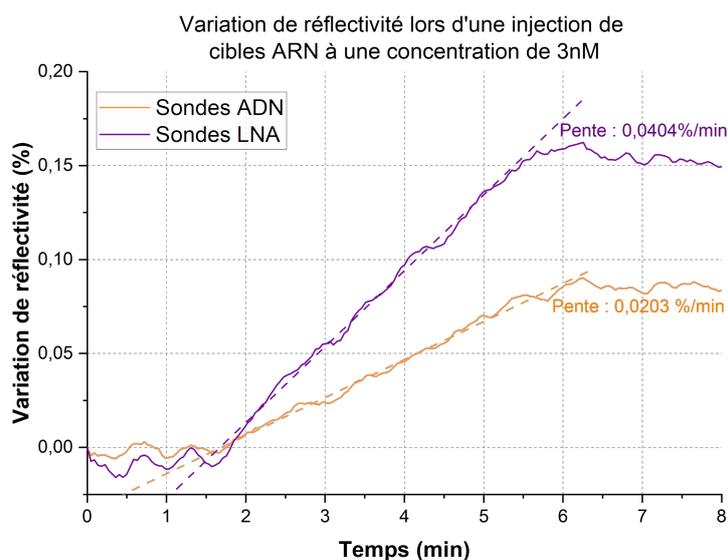


FIGURE III.18 – Cinétiques d'hybridation entre les miARNs 125a cibles injectés à une concentration de 3 nM et les deux types de sondes utilisées : sondes ADN et hybrides LNA/ADN. Les séquences de la cible et sondes sont détaillées dans le tableau III.12.

La figure III.18 compare les signaux d'hybridation entre les deux types de sondes, pour une injection de cibles à une concentration de 3 nM. La pente moyenne des ROI pour ces deux cinétiques vaut : $P_{LNA} = 0,0404 \pm 0,005\%/min$ et $P_{DNA} = 0,0203 \pm 0,002\%/min$, cela confirme que l'utilisation de sondes LNA permet une meilleure détection des miARNs 125a d'un facteur 2. Afin de confirmer cette tendance, des injections à différentes concentrations de cibles sont réalisées avec des temps d'injection de 5 minutes, puis la pente pour chaque cinétique calculée et tracée en fonction de la concentration en cible afin de déterminer la LOD pour chacune des séquences sur la figure III.19 suivante.

Sur ces deux graphiques, une ligne verticale pointillée représentant le signal minimal mesurable est tracée en orange et permet d'obtenir la LOD. Ce signal minimum mesurable lors d'une hybridation sur le banc SPRI Horiba est calculé suivant le niveau de bruit du système déterminé dans le chapitre précédent partie II.2.3 et la durée d'injection, il vaut $S_{min_{Horiba}} = 0,0042\%/min$.

Dans le cas de l'hybridation des séquences 125a, l'ajout de bases LNA dans la sonde ADN a permis d'améliorer la LOD d'un facteur $f_{125a} = 1,5$. Pour l'hybridation des séquences 423, le facteur d'amélioration de l'hybridation monte à $f_{423} = 2$. Cette différence peut encore une fois

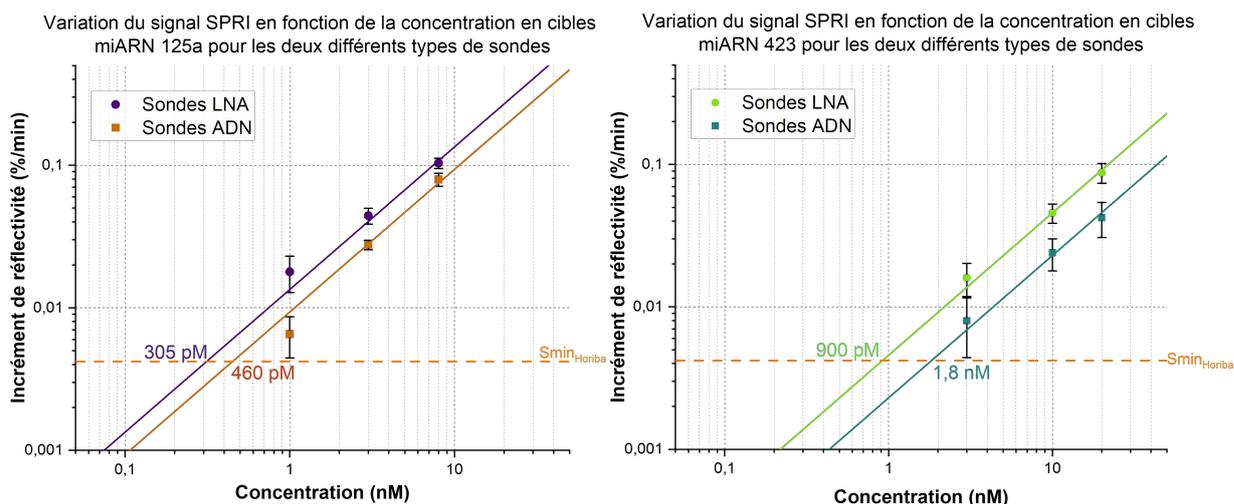


FIGURE III.19 – Comparaison des limites de détection de l'hybridation des miARNs cibles (125a à gauche et 423 à droite) avec les deux types de sondes : ADN et hybrides ADN/LNA.

être liée au fait que les séquences étudiées sont intrinsèquement différentes, mais également à la place des bases LNA dans la séquence de la sonde. Dans le cas de la séquence 423, plus de bases A et T ont été transformées en bases LNA. Sachant que la liaison entre les bases A/T est plus faible que la liaison C/G (2 ponts hydrogène comparé à trois), le fait de modifier ces bases en LNA a permis d'augmenter une affinité entre des bases qui étaient déjà plus faible.

De la même manière que dans la partie précédente, les constantes d'association peuvent être calculées pour les sondes ADN et les sondes LNA. Pour cela une injection à forte concentration de 100 nM de miARN 125a a été réalisée donnant un signal maximal d'hybridation $R_{max_{ADN}}=0,40\%$ et $R_{max_{LNA}}=0,35\%$ montrant que légèrement plus de sondes ADN ont pu être immobilisées sur la surface. En récupérant les coefficients directeurs des régressions linéaires réalisées sur la figure III.19, ceux-ci peuvent être divisés par les R_{max} respectifs pour trouver les constantes d'association : $k_{ass_{ADN}} = 0,023 \text{ nM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ et $k_{ass_{LNA}} = 0,038 \text{ nM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Les valeurs de ces constantes confirment que les sondes LNA sont plus adaptées et permettent une meilleure affinité avec les cibles miARNs.

En résumé, les sondes avec des bases modifiées LNA permettent d'obtenir une capture des miARNs plus importante, attestée par une limite de détection plus faible et une constante d'affinité plus élevée. Dépendamment des séquences, cette amélioration de l'affinité du complexe peut augmenter jusqu'à un facteur 2.

III.3. Obtention des nanoparticules d'or

La modification du protocole de chimie de surface ainsi que l'implantation de bases modifiées dans les sondes a permis d'augmenter l'affinité des duplexes formés avec les miARNs cibles. Cependant, la limite de détection reste des ordres de grandeur trop haute pour les besoins du projet. L'étape suivante du travail a donc été de mettre au point une amplification par sandwich avec des nanoparticules d'or (AuNPs), comme présentée dans l'état de l'art partie I.4.2. Dans la suite de cette partie, la méthode de synthèse ainsi que le protocole de fonctionnalisation choisi pour fabriquer ces AuNPs sont détaillés.

III.3.1. Synthèse des nanoparticules d'or

L'état de l'art a montré différentes méthodes de synthèses d'AuNPs ainsi que leurs avantages et inconvénients. Recherchant une méthode rapide, reproductible et donnant des AuNPs sphériques centrifugeables avec le matériel disponible (maximum 12 000g), la synthèse chimique a été privilégiée.

Le protocole de synthèse choisi est un protocole dérivé de Brust-Schiffrin : le réducteur utilisé est le NaBH_4 pour une synthèse à température ambiante et la molécule stabilisante est un PEG diacide (double terminaison $-\text{COOH}$ du polymère) [212]. Grâce à cette méthode de synthèse, les nanoparticules formées sont "pré-fonctionnalisées" avec une couche de PEG protectrice comprenant des groupements fonctionnels. Cette protection permet d'isoler le noyau métallique de la nanoparticule pour éviter les agglomérations lors de changements d'environnement : passage de l'eau (solution de synthèse) à une solution saline ou à un milieu complexe par exemple.

Ce protocole de synthèse est le plus simplifié possible : il se réalise à température ambiante sans plaque chauffante et les nanoparticules sont synthétisées en 45 minutes. La liste du matériel nécessaire, ainsi que les différents produits chimiques et leur référence chez Sigma Aldrich, sont donnés dans le protocole de synthèse détaillé se trouvant en [Annexe D](#). Ce protocole est schématisé dans la figure III.20 suivante. La première étape est la dilution de la solution mère des sels d'or dans de l'eau DI ultra-pure sous agitation magnétique, donnant une solution jaune pâle dans le ballon. Ensuite, les PEG diacide de masse molaire 600 g/mol, sont rajoutés dans le ballon et la solution est mélangée pendant 15 minutes sous agitation. Enfin, le réducteur NaBH_4 est rajouté à froid dans le ballon goutte à goutte, la solution devient rouge après quelques secondes confirmant la formation d'AuNPs. Une fois la totalité du NaBH_4 versé dans le ballon, la solution est laissée 30 minutes sous agitation magnétique afin de finir la synthèse des AuNPs.

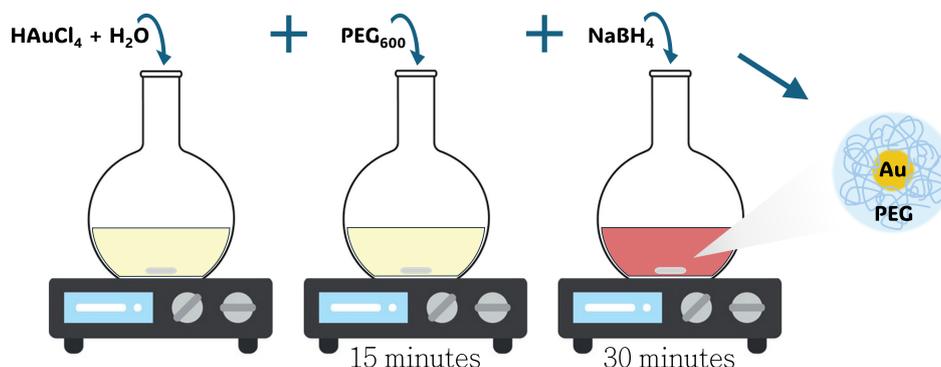


FIGURE III.20 – Représentation schématique des étapes de la synthèse de nanoparticules d'or suivant la méthode dérivée de Brust-Schiffrin.

Cette dernière étape d'ajout du réducteur est la partie la plus critique de la synthèse. Cette solution est préparée à base de cristaux de NaBH_4 dissous dans de l'eau qui se réduisent en créant une solution basique émettant du dihydrogène (H_2). Cette solution doit être stockée au congélateur afin de stopper cette réaction et de pouvoir la rajouter froide dans le ballon. Si cette solution est décongelée plusieurs fois, elle perd sa réactivité et n'est plus assez efficace lors de la synthèse : cela donne des nanoparticules trop petites, non centrifugeables et beaucoup de sels d'or non utilisés, donc un rendement très faible de la synthèse. Si elle est trop concentrée,

une grande partie des sels d'or précipitent sous forme de cristaux grisâtres et les nanoparticules obtenues sont également trop petites. Le dosage du NaBH_4 est donc crucial, et la solution doit être stockée dans de bonnes conditions.

Les AuNPs obtenues sont caractérisées par spectrométrie UV/visible entre 190 nm et 800 nm. Afin d'analyser les spectres obtenus une fois la synthèse réalisée, chaque réactif utilisé pour le protocole de synthèse a été préalablement caractérisé. Les spectres d'absorption des sels d'or, des PEGs et de la solution colloïdale obtenue après synthèse sont tracés sur la figure III.21 suivante.

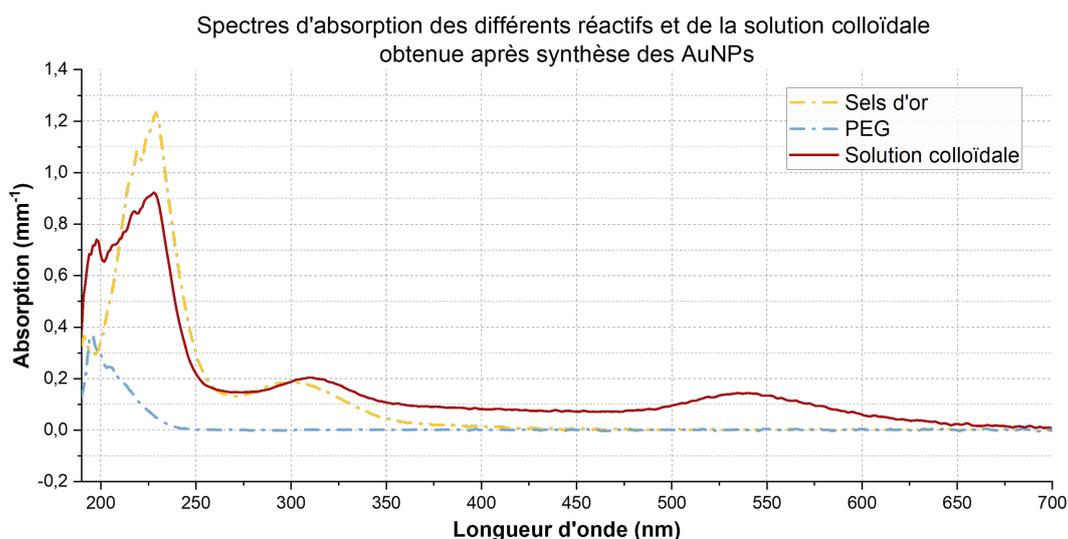


FIGURE III.21 – Spectres d'absorption dans le visible des différents réactifs utilisés lors de la synthèse ainsi que celui de la solution colloïdale obtenue à la suite de la réaction chimique.

Sur cette figure, on remarque que les PEG et les sels d'or absorbent tous les deux dans l'UV. Le spectre de la solution colloïdale obtenue à la suite de la réaction de synthèse présente également ces pics d'absorption caractéristiques des PEG et des sels d'or mais avec en plus un pic autour de 535 nm : il correspond à l'absorption des AuNPs dans le visible qui justifie une couleur rouge de la solution colloïdale puisque l'absorption a lieu dans le vert. Ce phénomène est expliqué plus en détails dans la partie I.1.2.2 de l'état de l'art sur la résonance de plasmons de surface localisés pour des nanoparticules métalliques. La présence de pics d'absorption caractéristiques des sels d'or dans le spectre de la solution colloïdale indique que la réaction n'est pas optimale et que des sels d'or n'ont pas réagi lors de la synthèse. Le pic d'absorption des sels d'or autour de 310 nm a servi pour la suite des essais à optimiser la quantité de réactif afin de maximiser la réduction des sels d'or en AuNPs.

Une première optimisation de la synthèse dans le but de contrôler la taille des AuNPs obtenues afin d'être capable de les centrifuger avec le matériel à disposition a été menée au LCF. La quantité de sels d'or a été variée entre 16 μL et 32 μL (entre 0,36 mM et 0,72 mM en concentration). Les spectres d'absorption dans le domaine du visible de ces différentes solutions sont tracés sur la figure III.22.

Pour chaque synthèse, le maximum d'absorption est indiqué. On remarque que ce maximum se déplace vers les plus hautes longueurs d'onde et vers des absorbances également plus importantes lorsque la quantité de sels d'or augmente. Le déplacement dans les longueurs d'onde plus hautes

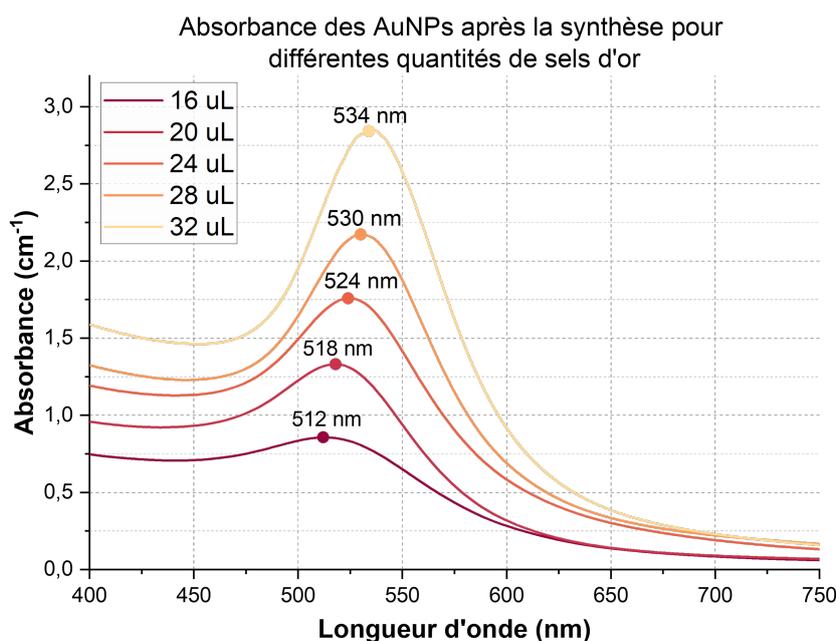


FIGURE III.22 – Spectres d’absorption dans le visible des solutions de nanoparticules d’or suivant différentes quantités de sels d’or lors de la synthèse.

confirme que la taille des nanoparticules et donc leur absorption augmentent. La théorie de Mie permet de modéliser ce type de spectre d’absorption. Il s’agit d’une solution particulière des équations de Maxwell qui décrit la diffusion d’une onde électromagnétique plane par une particule sphérique caractérisée par son diamètre et son indice de réfraction. Ce modèle peut s’appliquer dans notre cas pour la diffusion de la lumière dans une solution colloïdale d’AuNPs. Un code Matlab a été créé afin d’ajuster les spectres expérimentaux avec le modèle de Mie, permettant de calculer le diamètre et la concentration des différentes solutions colloïdales. Ces deux quantités sont répertoriés dans le tableau III.13 qui suit pour les différentes solutions colloïdales réalisées. À noter qu’il a été impossible d’ajuster les données expérimentales avec le spectre d’absorption théorique pour les nanoparticules les plus petites, soit la solution colloïdale réalisées à partir de 16 μL de sels d’or, probablement car dans ce cas, les nanoparticules sont trop petites.

Quantité de sels d'or	Absorbance maximale	Diamètre des nanoparticules	Concentration molaire
20 μL	1,33 à 518 nm	10 nm	10 nM
24 μL	1,76 à 524 nm	22 nm	900 pM
28 μL	2,17 à 530 nm	48 nm	108 pM
32 μL	2,84 à 534 nm	60 nm	78 pM

TABLE III.13 – Caractéristiques des nanoparticules d’or dans les différentes solutions colloïdales synthétisées avec différents volumes de sels d’or. L’absorbance maximale et sa longueur d’onde associées sont déterminées grâce aux spectres d’absorption. Diamètre et concentration molaire des nanoparticules calculés grâce au modèle de Mie.

L’ajustement des spectres d’absorption expérimentaux avec le modèle de Mie permet de confirmer que les diamètres augmentent en fonction de la quantité de sels d’or qui est introduite dans le ballon lors de la synthèse. Dans ce modèle, la valeur maximale du pic d’absorption est

ajustée en fonction du rayon estimé des nanoparticules dans la solution. La précision sur ce maximum lors de l'ajustement du spectre expérimental est de $\pm 0,5$ nm sur le rayon pour des nanoparticules en dessous 15 nm, et de ± 1 nm pour des particules de taille supérieure lorsque la dispersion devient plus importante.

La première solution centrifugeable à 5 000 g pendant seulement 7 minutes est la solution réalisée à partir des 28 μL d'or estimant des nanoparticules de 48 nm de diamètre. Cette première série de synthèses d'AuNPs au LCF ont été transportées à Sherbrooke afin de les visualiser au microscope électronique à balayage (MEB) pour confirmer les tailles déterminées grâce au modèle de Mie. Les AuNPs des synthèses en dessous de 28 μL de sels d'or n'ont pu être imagées en raison de la résolution insuffisante du MEB. Cependant, des tendances ont pu être dégagées pour deux solutions, celles à 28 μL et 32 μL de sels d'or contenant les AuNPs les plus larges, les images MEB correspondantes sont sur la figure III.23. Ces images traitées avec un code Matlab donnent une taille moyenne d'environ 45 nm avec une dispersion très large de ± 10 nm pour les nanoparticules fabriquées à partir de 28 μL de sels d'or. Pour celles réalisées avec 32 μL de sels d'or, les tailles sont encore plus dispersées entre 10 nm et 55 nm et moins sphériques : des facettes apparaissent sur les nanoparticules les plus grosses.

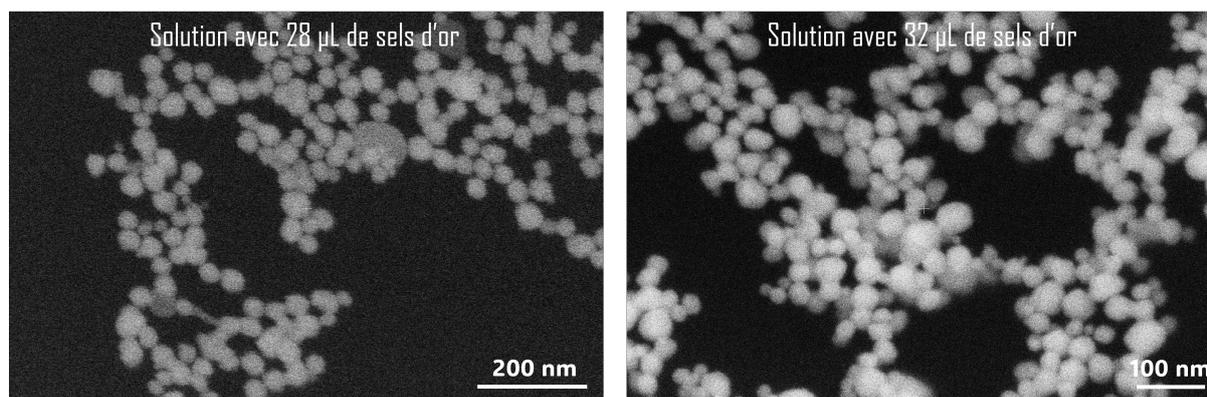


FIGURE III.23 – Images au microscope électronique à balayage de deux solutions différentes de nanoparticules d'or : 28 μL (à gauche) et 32 μL (à droite) de sels d'or.

Ces dispersions assez larges s'expliquent car les solutions, une fois synthétisées, sont restées plusieurs jours à température ambiante avant d'être centrifugées. Ces premières synthèses n'atteignant pas un rendement de 100%, des sels d'or sont non consommés lors de la synthèse et restent présents dans la solution colloïdale. Si la solution n'est pas centrifugée et le surnageant retiré, ces sels d'or continuent de fusionner lentement aux AuNPs déjà présentes donnant ainsi des formes et des tailles de AuNPs de plus en plus dispersées (images MEB d'une solution d'AuNPs non centrifugées laissées plusieurs semaines à température ambiante en annexe sur la figure D.2). Cette étude montre que pour obtenir des AuNPs avec des propriétés optimales, il est nécessaire de suivre certaines étapes clés. Tout d'abord, une centrifugation rapide après la synthèse est indispensable pour améliorer la dispersion des tailles en éliminant les excès de réactifs et les particules trop petites. Ensuite, le protocole de synthèse avec 28 μL de sels d'or a été retenu comme étant le plus efficace pour produire des AuNPs qui sont centrifugeables rapidement à faible vitesse.

Ce protocole de synthèse a été facilement transférable entre le laboratoire de Paris et celui de Sherbrooke après quelques ajustements de la quantité du réactif (référence du NaBH_4 différente

entre les deux pays). Pour les mêmes quantités de sels d'or et de PEG les nanoparticules obtenues sont très similaires en taille entre les deux laboratoires.

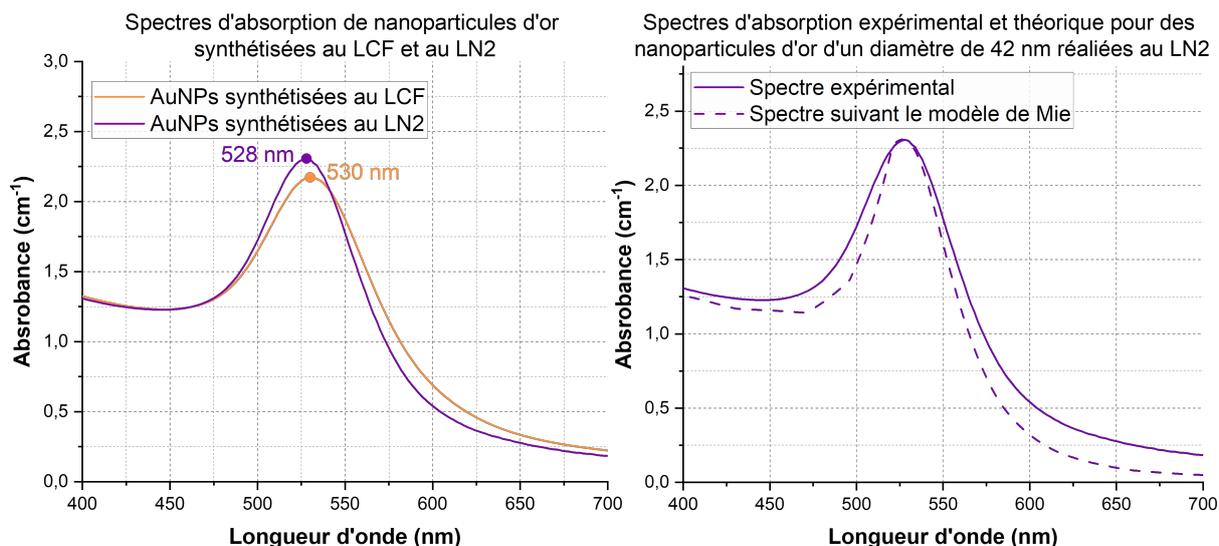


FIGURE III.24 – À gauche : spectres d'absorption dans le visible de nanoparticules d'or réalisées suivant le même protocole de synthèse dans les deux laboratoires de cotutelle. À droite : spectres d'absorption expérimental et théorique suivant le modèle de Mie des nanoparticules réalisées au LN2 à Sherbrooke.

Le graphique de gauche sur la figure III.24 compare l'absorption des solutions colloïdales synthétisées dans les deux laboratoires avec le même protocole. Le pic maximal d'absorption est décalé de 2 nm vers les basses longueurs d'onde, à 528 nm, pour les AuNPs réalisées à Sherbrooke. L'ajustement de ce spectre d'absorption par le modèle de Mie représenté sur le graphique de droite de la figure III.24, donne un diamètre plus petit de ces AuNPs autour de 42 nm comparé au 48 nm donné pour celles du LCF, mais elles restent centrifugeables à 5 000 g après seulement 7 minutes.

Les synthèses réalisées avec ce protocole sont reproductibles et les spectres présentent une longueur d'onde pour le pic d'absorption similaires (figure D.1 en annexe). Afin de diminuer la dispersion en taille, les AuNPs sont centrifugées 12 heures après la synthèse afin d'enlever le surnageant comprenant tous les réactifs n'ayant pas été utilisés. Ces AuNPs ont été imagées au MEB, sur l'image **D** de la figure III.25, une couche organique enveloppant les nanoparticules est visible : c'est la couche de PEG qui encapsule les AuNPs.

Un programme Matlab d'identification de particules sur des images a permis de déterminer le diamètre des AuNPs ainsi que leur distribution en taille dans la solution colloïdale imagée. L'image **C** de la figure III.25 a été utilisée afin de réaliser cette analyse. Les résultats sont représentés sur la figure III.26 sous la forme d'un histogramme des tailles pour 99 AuNPs analysées. Ce programme ne prend pas en compte les nanoparticules qui ont un coefficient de circularité en dessous de 0,7 afin d'évaluer seulement celles qui sont circulaires.

Pour ces AuNPs, le diamètre moyen calculé est de 40,2 nm avec un écart type sur ce diamètre de $\pm 4,2$ nm. Cette mesure confirme un diamètre des nanoparticules proche de celui donné par le modèle de Mie (42 nm) et que la centrifugation 12 heures après la synthèse permet de réduire considérablement la dispersion en taille. La surestimation du diamètre des AuNPs, quelle que soit la solution étudiée par le modèle de Mie, est expliquée car la mesure spectroscopique ne reflète

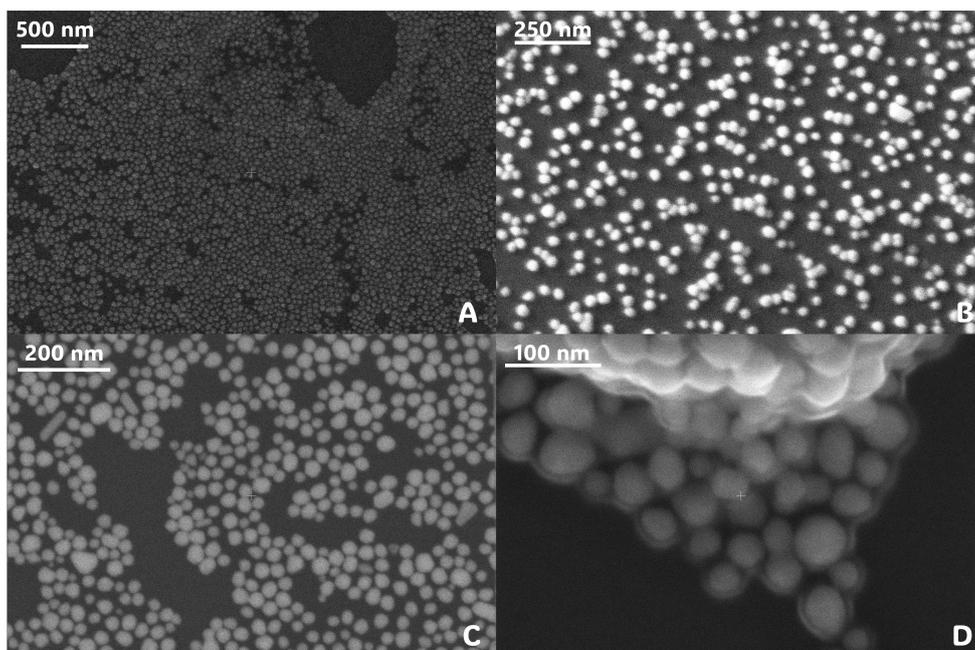


FIGURE III.25 – Images au microscope électronique à balayage des AuNPs réalisées à Sherbrooke au LN2.

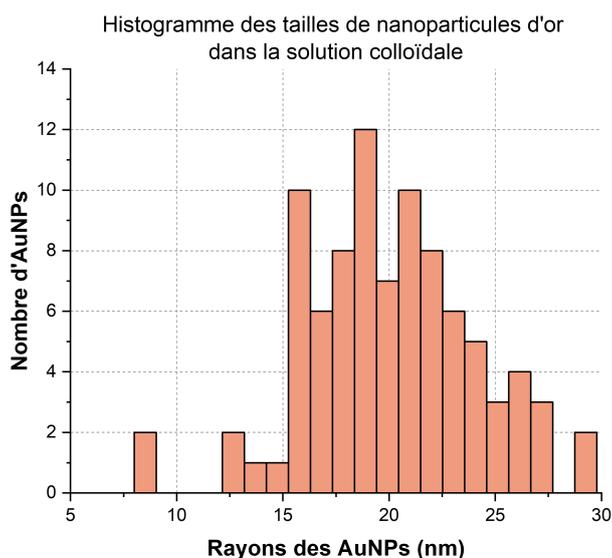


FIGURE III.26 – Histogramme de la distribution des tailles des AuNPs dans une solution colloïdale synthétisée avec 28 μ L d'or et centrifugée 12 heures après la synthèse.

pas seulement l'absorption du cœur métallique, mais également celle de la couche de PEG qui entoure cette sphère métallique, dégageant ainsi un diamètre plus important que le diamètre réel de la particule métallique.

Un autre paramètre qui a été étudié est la stabilité des AuNPs dans le temps. Les premières synthèses étaient stockées à température ambiante à l'abri de la lumière. Des spectres d'absorption ont été réalisés sur plusieurs semaines afin de voir l'évolution de la solution colloïdale dans cet environnement.

Le graphique de gauche sur la figure III.27 affiche les spectres d'une synthèse de nanoparticules entre le jour suivant la synthèse après leur centrifugation jusqu'au jour 77 lorsqu'elles sont laissées

III.3. Obtention des nanoparticules d'or

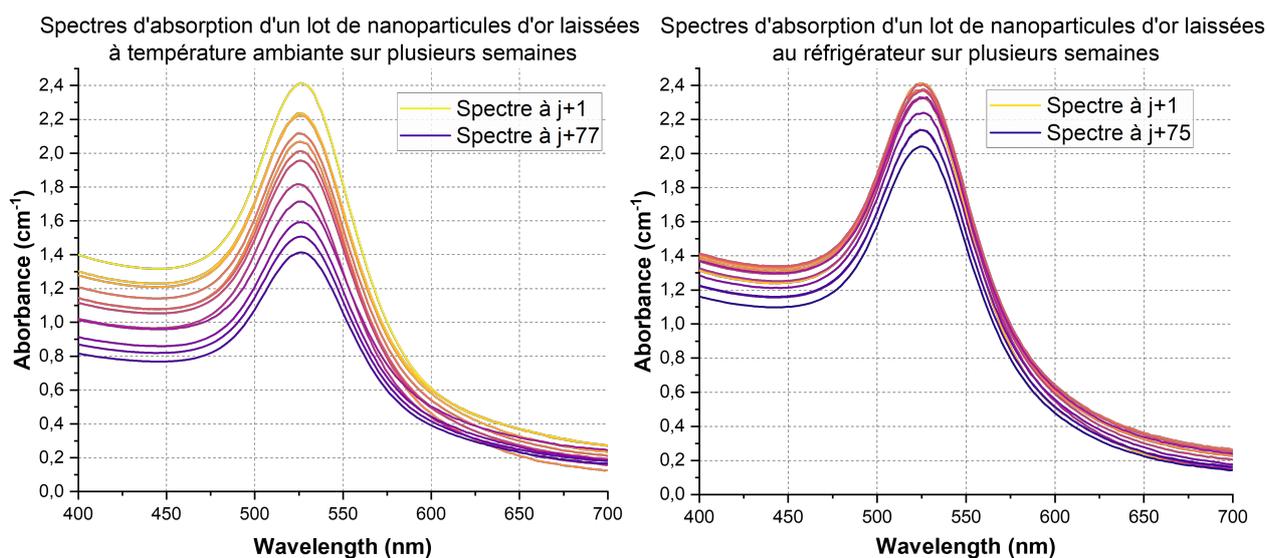


FIGURE III.27 – À gauche : spectres d'absorption dans le visible de nanoparticules d'or laissées à température ambiante après centrifugation pendant plusieurs semaines. À droite : spectres d'absorption dans le visible de nanoparticules d'or laissées réfrigérateur après centrifugation pendant plusieurs semaines.

dans ces conditions. Ce graphique montre que l'absorbance réduit considérablement sur cette période, passant de 2,41 à 1,42 : soit une diminution de 41% de la concentration d'AuNPs dans la solution qui se retrouvent précipitées dans le fond du tube même après resuspension par sonication (dépôt noir visible). Au contraire, le graphique de droite sur cette même figure affiche l'absorbance d'AuNPs réalisées et centrifugées dans les mêmes conditions mais conservées au frigo lors des semaines suivantes. Dans ce cas-ci, l'absorption diminue seulement de 3% après 45 jours, et commencent à diminuer de manière significative après 55 jours pour atteindre une diminution de 15% en 75 jours. Le stockage des AuNPs au réfrigérateur permet donc de les conserver plus longtemps en réduisant le taux de précipitation dans le tube de conservation. Cela permet d'utiliser le même lot d'AuNPs pour réaliser plusieurs expériences d'amplification en SPRI et avoir des résultats comparables qui ne dépendent pas des AuNPs.

En conclusion, le protocole de synthèse développé dans cette partie a permis de fabriquer des AuNPs de façon reproductible, même entre deux laboratoires. Également, le fait qu'elles soient pré-fonctionnalisées grâce à la couche de PEG et leur longue stabilité temporelle au réfrigérateur (plusieurs mois) permet de réaliser des mesures d'amplification en SPRI rapidement et comparable dans les mêmes conditions expérimentales.

III.3.2. Fonctionnalisation des nanoparticules

Les AuNPs fabriquées grâce au protocole expliqué dans la partie précédente sont pré-fonctionnalisées avec des PEG diacide comprenant de chaque côté de la chaîne carbonée un groupe carboxyle $-COOH$. Ce groupement permet une fonctionnalisation rapide des nanoparticules avec des oligonucléotides afin de réaliser l'amplification par sandwich présentée dans l'état de l'art à la partie I.4.2.

Les groupes carboxyles $-COOH$ permettent d'obtenir directement des liaisons covalentes avec des groupements amines $-NH_2$ après leur activation en $-COO^-$ par une solution

d'EDC/NHS. Cette approche a été testée sur nos nanoparticules avec des séquences d'oligonucléotides terminées par une terminaison $-NH_2$. Cependant, les AuNPs obtenues ne sont pas stables et précipitent lorsqu'elles sont transférées de l'eau à du PBS afin de réaliser des mesures d'hybridation in-situ en SPRI. Cette méthode de fonctionnalisation a donc été abandonnée.

Un nouveau protocole de fonctionnalisation a été créé en se basant sur l'état de l'art réalisé dans la partie I.5.2, toutes les étapes ainsi que les produits chimiques utilisés et leur concentration sont détaillés en [Annexe D](#). La fonctionnalisation des AuNPs est l'étape cruciale qui leur confère leur stabilité, notamment lors de changements d'environnements brutaux où la répartition des charges est modifiée : de l'eau au PBS ou même vers des milieux plus complexes (plasma, sang...). Dans le chapitre I, plusieurs méthodes ont été citées, notamment l'utilisation de polymères pour encapsuler les AuNPs ou l'adsorption de grosses protéines pour former une couche protectrice. Les AuNPs utilisées dans ce manuscrit sont déjà enveloppées dans une couche de PEG lors de leur synthèse, mais cela n'étant pas suffisant, l'adsorption supplémentaire d'une protéine sur cette couche de PEG a été rajoutée dans le protocole de fonctionnalisation.

La protéine choisie est la streptavidine, elle a l'avantage d'être également utilisée dans les protocoles de chimie de surface détaillés dans la première partie III.1 de ce chapitre puisqu'elle permet l'accrochage de brins d'ADN biotinylés. De la même manière que lors de l'accroche d'une amine, les groupes carboxyles sont dans un premier temps activés sous leur forme $-COO^-$ avec une solution d'EDC/NHS. Cette étape du protocole de fonctionnalisation est critique : une quantité trop importante de la solution d'activation fait précipiter les AuNPs mais pas assez ne permet pas une bonne activation des carboxyles entraînant une accroche non homogène de la streptavidine. Lorsque cette protéine est rajoutée dans la solution colloïdale, celle-ci passe d'une couleur rouge à une violette : la couche moléculaire autour des nanoparticules est devenue plus grosse, donc leur spectre d'absorption se décale vers les hautes longueurs d'onde. Lors de l'ajout des oligonucléotides biotinylés dans une dernière étape, la couleur de la solution ne change pas énormément visuellement car la molécule rajoutée à la surface de la nanoparticule n'est pas aussi importante qu'une protéine. Les solutions colloïdales avant et après fonctionnalisation ont été caractérisées en spectroscopie et les spectres d'absorption obtenus sont tracés sur la figure III.28 dans le graphique de gauche. Lorsque les AuNPs sont fonctionnalisées, le maximum de l'absorption se retrouve décalé à 534 nm. Ce décalage vers les hautes longueurs d'onde confirme que la taille des nanoparticules augmentent : le spectre d'absorption prend en compte la nouvelle couche de streptavidine ainsi que les oligonucléotides qui sont rajoutés sur la surface de l'AuNP.

La stabilité de ces AuNPs fonctionnalisées a été étudiée sur plusieurs jours lorsqu'elles sont gardées au réfrigérateur, les spectres d'absorption correspondants sont tracés sur le graphique de droite de la même figure III.28. Le maximum d'absorption des AuNPs fonctionnalisées diminue rapidement, celui-ci vaut 2,57 le jour de la fonctionnalisation et baisse à 2,31 soit une baisse de 10% de la concentration en AuNPs seulement 5 jours après. Au dixième jour suivant la fonctionnalisation, l'absorption maximale est de 2,18 ce qui correspond à une diminution de 16% de la concentration d'AuNPs dans la solution colloïdale.

Si les nanoparticules sont très stables sur plusieurs semaines après leur synthèse, elles le sont beaucoup moins une fois fonctionnalisées. Le même lot d'AuNPs fonctionnalisées ne peut donc

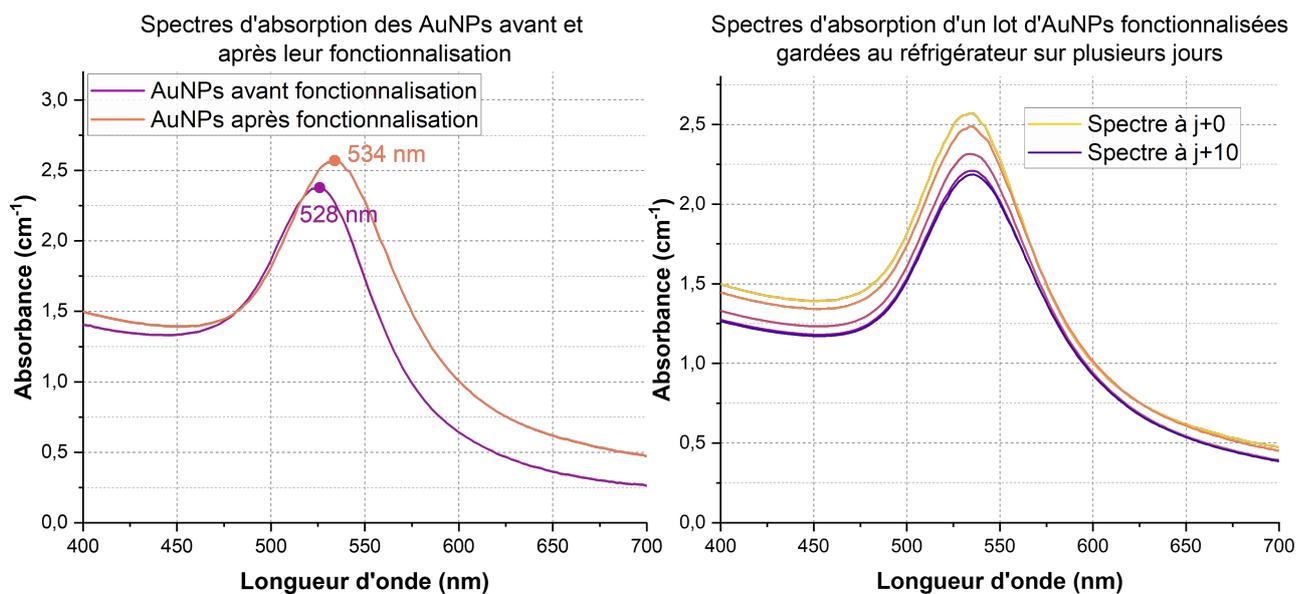


FIGURE III.28 – À gauche : spectres d'absorption dans le visible de nanoparticules d'or avant et après leur fonctionnalisation. À droite : spectres d'absorption dans le visible de nanoparticules d'or laissées au réfrigérateur après fonctionnalisation pendant plusieurs jours.

pas servir sur plusieurs jours pour réaliser des expériences en SPRI. Cependant, le point crucial est que ce nouveau protocole de fonctionnalisation utilisant l'immobilisation de streptavidine sur la couche de PEG permet de les rendre stables dans du PBS ce qui est indispensable pour nos mesures d'hybridation in-situ en SPRI.

Dans ce chapitre, les modifications réalisées afin de rendre la détection spécifique aux miARNs ont été détaillées. Dans une première partie, la chimie de surface a été optimisée afin de rendre les sondes monobrin plus accessibles à l'hybridation, faisant gagner jusqu'à un facteur trois en limite de détection dépendamment des séquences étudiées. La détection de miARNs nécessite l'utilisation de sondes modifiées incluant des bases LNA qui offrent une meilleure affinité du complexe sonde-cible et permettent de gagner un autre facteur deux sur la limite de détection, dépendamment des séquences également. Enfin, l'amplification par la méthode sandwich à l'aide de nanoparticules d'or nécessite aussi que ces dernières soient spécifiques à la séquence de miARN à détecter et qu'elles puissent être utilisables dans les conditions expérimentales d'hybridation. Une méthode de synthèse inspirée de Brust-Schiffrin a été mise en place dans les deux laboratoires et un nouveau protocole de fonctionnalisation a été créé afin de permettre l'utilisation de ces nanoparticules d'or dans un milieu salin.

Chapitre IV

Amplification du signal SPRI par méthode sandwich

IV.1 Preuve de concept : amplification par la streptavidine	114
IV.1.1 Principe de fonctionnement de la méthode sandwich.	114
IV.1.2 Résultats d'amplification expérimentaux.	116
IV.2 Amplification du signal grâce à des nanoparticules d'or	119
IV.2.1 Hybridation direct des nanoparticules d'or.	119
IV.2.1.1 Calcul théorique du facteur d'amplification des AuNPs	119
IV.2.1.2 Détermination de la concentration optimale des sondes	120
IV.2.1.3 Mesure expérimentale du facteur d'amplification des AuNPs	123
IV.2.2 Utilisation de nanoparticules d'or en sandwich	126
IV.2.2.1 Sandwich entre brins d'ADN	126
IV.2.2.2 Sandwich du miARN entre une sonde LNA/ADN et des rajouts ADN	130
IV.2.2.3 Sandwich du miARN entre une sonde et des rajouts hybrides LNA/ADN	132
IV.2.2.4 Problèmes de contamination aux très faibles concentrations	133

La comparaison des différentes chimies de surface ainsi que l'optimisation des sondes ADN et LNA pour la capture des miARNs a permis de déterminer les limites de détection en concentration pour ces deux cibles et leur analogue ADN. Un tableau récapitulatif des LOD pour les cibles ADN et ARN en fonction de la sonde utilisée est présenté ci-dessous.

Nom de la séquence	Cible	Sonde	LOD
125a_ARN	CUUUAACCUUGUGA	{T}CA{C}AG{G}TT{A}AA{G}	305 pM
125a_ADN	CCCTTTAACCTGTGA	TCACAGGTTAAAGGG	190 pM
423_ARN	AGAGCGAGACUUU	{A}AA{G}TC{T}CG{C}TC{T}	900 pM
423_ADN	AGAGAGCGAGACTTT	AAAGTCTCGCTCTCT	700 pM
WT_ADN	TAATCATCATTAGAA	TTCTAATGATGATTA	250 pM

TABLE IV.1 – Récapitulatif des limites de détection en concentration des séquences complémentaires pour les familles 125a, 423 et WT

Sachant que l'objectif du projet Epi Storm est la détection des séquences de miARNs à des concentrations de l'ordre de la centaine de femtomolaire, la détermination de ces LOD confirme que le signal SPRI doit être amplifié d'au moins trois ordres de grandeur. Pour réaliser cette amplification, c'est la méthode sandwich qui a été choisie. Dans ce chapitre, une première preuve de concept de cette méthode d'amplification est réalisée avec un complexe de streptavidine et d'oligonucléotides comme molécule sandwich. Dans une deuxième partie, des nanoparticules d'or sont utilisées afin d'initier un changement d'indice encore plus important et donc une amplification du signal SPRI qui répondrait dans les objectifs.

IV.1. Preuve de concept : amplification par la streptavidine

L'amplification par méthode sandwich n'ayant jamais été étudiée dans aucun des deux laboratoires de la cotutelle, une preuve de concept était nécessaire afin de comprendre le fonctionnement d'une telle méthode et d'étudier la faisabilité de celle-ci avec les séquences du projet. Le principe ainsi que les différentes cinétiques rentrant en jeu sont détaillés dans une première sous-partie puis les résultats expérimentaux de la preuve de principe sont discutés et interprétés.

IV.1.1. Principe de fonctionnement de la méthode sandwich

Dans le chapitre précédent, la détermination des séquences pour les biorécepteurs (ADN ou LNA) a été décidée suivant différents critères. Notamment, l'un d'entre eux était la compatibilité de ces sondes avec la méthode sandwich. Pour cela, seulement une partie de la cible est hybridée sur la sonde en surface de la biopuce : 15 bases pour les ADN et 13 bases pour miARNs (choix expliqué dans la partie III.1.4). Dans la suite de la méthode d'amplification, la molécule sandwich vient s'hybrider par complémentarité avec la partie de la séquence de la cible restée libre après son hybridation avec la sonde comme le montre le schéma de la figure IV.1. La preuve de principe présentée dans cette partie utilise un complexe streptavidine-oligonucléotides biotinylés (CSO) en tant que molécule sandwich. De ce fait, la séquence d'oligonucléotide attachée à la streptavidine, dénommé le rajout, est construite pour être complémentaire et spécifique aux différentes cibles.

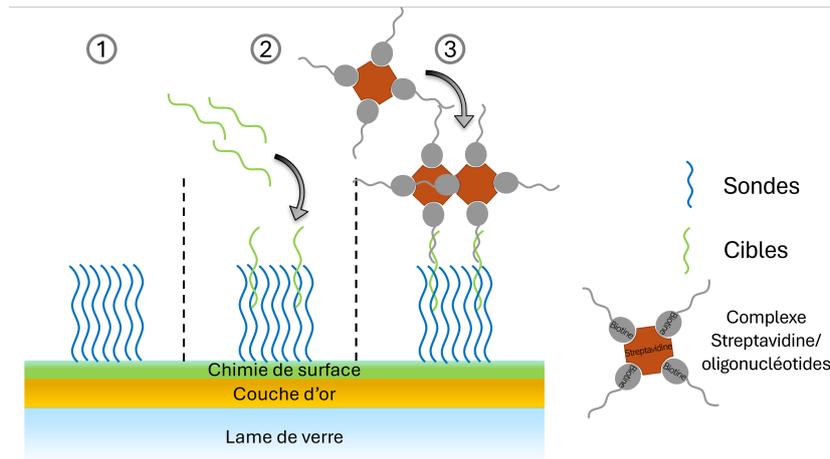


FIGURE IV.1 – Schéma illustrant l’amplification par la méthode sandwich en utilisant un complexe de streptavidine et quatre oligonucléotides biotinylés (CSO) comme molécule d’amplification. (1) Biopuce spottée avec les sondes. (2) Injection des cibles en faible concentration qui s’hybrident partiellement sur les sondes en surface. (3) Injection du CSO qui s’hybride de manière spécifique en sandwich sur la partie restée libre de la cible.

La méthode sandwich implique l’intervention de deux cinétiques successives : une première entre la sonde et la cible d’intérêt, puis une seconde entre la cible et le rajout accroché à la molécule sandwich. Ces deux cinétiques suivent le modèle du premier ordre présenté dans le chapitre II à la partie II.3.1, elles peuvent être prédites pour les deux interactions ayant lieu lors cette expérience :



La première ligne décrit la réaction entre la cible [C] et la sonde [S], puis la deuxième celle entre le duplexe sonde-cible [SC] et la séquence de rajout attachée à la streptavidine ou la nanoparticule [A]. Ces deux réactions sont décrites par les deux équations différentielles suivantes :

$$\begin{aligned}
 \frac{d[SC]}{dt} &= k_1[S]_0[C] \\
 \frac{d[SCA]}{dt} &= k_2[SC]_f[A]
 \end{aligned}
 \tag{IV.2}$$

Où $[SC]_f$ est la quantité de cibles hybridées à l’issue de la première injection. Comme expliqué dans le chapitre précédent, les différentes séquences utilisées pour l’hybridation ont été sélectionnées pour avoir une affinité très élevée afin de rendre la constante d’association très importante devant celle de déshybridation qui devient négligeable et non présente dans les équations IV.2 précédentes. On sait aussi que dans une profondeur inférieure à 100 nm, très proche de l’interface, là où la majorité de l’onde plasmonique est confinée, le signal SPRI peut être considéré comme proportionnel à la masse des éléments rajoutés à cette interface, soit :

$$\begin{aligned}
 \Delta R_1 &\approx m_{ADN}[SC] \\
 \Delta R_2 &\approx m_{CSO}[SCA]
 \end{aligned}
 \tag{IV.3}$$

Les équations différentielles IV.2 peuvent être alors réécrites comme suit :

$$\begin{aligned}\frac{d[\Delta R_1]}{dt} &= k_1 m_{ADN} [S]_0 [C] \\ \frac{d[\Delta R_2]}{dt} &= k_2 m_{CSO} [SC]_f [A]\end{aligned}\quad (IV.4)$$

Pour des concentrations très faibles de cibles injectées pendant une durée $\Delta t_{inj}^{1ère}$ lors de la première réaction, il est possible de linéariser la première équation de IV.2 et d'obtenir $[SC]_f = k_1 [S]_0 [C] \Delta t_{inj}^{1ère}$. En utilisant cette égalité dans la deuxième équation précédente IV.4, on obtient le couple d'équations différentielles suivant :

$$\begin{aligned}\frac{d[\Delta R_1]}{dt} &= k_1 m_{ADN} [S]_0 [C] \\ \frac{d[\Delta R_2]}{dt} &= k_2 m_{CSO} [A] k_1 [S]_0 [C] \Delta t_{inj}^{1ère}\end{aligned}\quad (IV.5)$$

Dans notre cas, à faibles concentrations, le signal SPRI extrait des cinétiques d'hybridation correspond à la pente de cette cinétique, soit un % par minute puisque l'intensité du signal dépend du temps d'injection, à concentration constante. Pour comparer les pentes des deux cinétiques d'hybridation et donc le facteur d'amplification du signal SPRI, le ratio des deux pentes peut être déterminé. Suivant les équations différentielles précédentes, ce ratio vaut :

$$Ampli = \frac{d[\Delta R_2]}{d[\Delta R_1]} = \frac{m_{CSO}}{m_{ADN}} k_2 [A] \Delta t_{inj}^{1ère}\quad (IV.6)$$

L'équation précédente du ratio des pentes nous montre que celui-ci est dépendant de plusieurs paramètres expérimentaux. On retrouve bien le ratio des masses entre la cible à détecter et le complexe d'amplification ainsi que la constante d'hybridation k_2 , de la deuxième interaction. Cependant, ces facteurs ne sont pas les seuls à prendre en compte lors de l'amplification du signal avec la méthode sandwich, deux autres paramètres expérimentaux rentrent en jeu. Le premier est le temps d'injection de la première cible : il dicte la quantité de duplexes disponibles pour former une liaison avec la seconde cible (molécule d'amplification). Le deuxième paramètre important est la quantité d'amplification injectée : il fixe la vitesse de la pente de cette deuxième cinétique.

En résumé, ce modèle de cinétique d'interaction du premier ordre, appliqué à deux interactions successives dans le cadre d'une amplification par sandwich, permet d'analyser les différents paramètres expérimentaux dont dépend le facteur d'amplification. En particulier, contrairement à ce que l'on pourrait croire naïvement, l'amplification dans ce type d'expérience n'est pas simplement égal au ratio des masses. C'est le cas idéal, mais il n'est réalisé que si $k_2 [A] \Delta t_{inj}^{1ère} = 1$. On doit donc injecter le complexe d'amplification à une concentration $[A]$ suffisante par rapport à la constante d'interaction et de la durée d'injection de la cible. Sinon, l'amplification réalisée sera beaucoup plus faible qu'attendue. On verra que ce point s'avère problématique pour l'amplification par des nanoparticules d'or.

IV.1.2. Résultats d'amplification expérimentaux

Les mesures d'amplification par la méthode sandwich avec le CSO ont été réalisées sur le banc angulo-spectral au LCF à Paris Saclay dans les mêmes conditions expérimentales que celles

IV.1. Preuve de concept : amplification par la streptavidine

listées dans le chapitre précédent III.1.4 pour la comparaison des chimies. Pour plus de simplicité, ces mesures ont été réalisées sur les séquences 125a entre brins d'ADN. Les différentes séquences utilisées dans ces expériences d'amplification sont listées dans le tableau IV.2 suivant.

Nom de la séquence	Séquence 5' -> 3'	Nombre de bases
sonde_125a_ADN	Biotin-TEG-TTGACCGGTATGCGTCACAGGTTAAAGGG	29
cible_125a_ADN	<i>TCCCTGAGA</i> CCCTTTAACCTGTGA	24
rajout_125a_ADN	<i>TCTCAGGGA</i> TTATTATTA-TEG-Biotin	18

TABLE IV.2 – Séquences des oligonucléotides utilisés pour réaliser les expériences d'amplification du signal SPRI par le complexe streptavidine/oligonucléotides. Les bases en gras s'hybrident entre la sonde et la cible. Les bases en italique s'hybrident entre la cible et le rajout.

Le protocole expérimental est en plusieurs étapes. En premier, les solutions d'injections sont préparées, cela inclut les solutions de cibles à différentes concentrations et la solution d'amplification. Cette dernière est réalisée à partir d'une solution de 10 nM de streptavidine dans laquelle est rajouté 40 nM d'oligonucléotides biotinylés puisque la streptavidine contient quatre sites de liaison. Une solution de cibles est d'abord injectée, à différentes concentrations, dans le banc SPRI. Puis, la solution d'amplification est introduite à concentration constante afin de pouvoir comparer les pentes des courbes d'amplification en fonction de la concentration des cibles uniquement. Les variations de réflectivité au cours du temps sont extraites des images et présentées sur la figure IV.2.

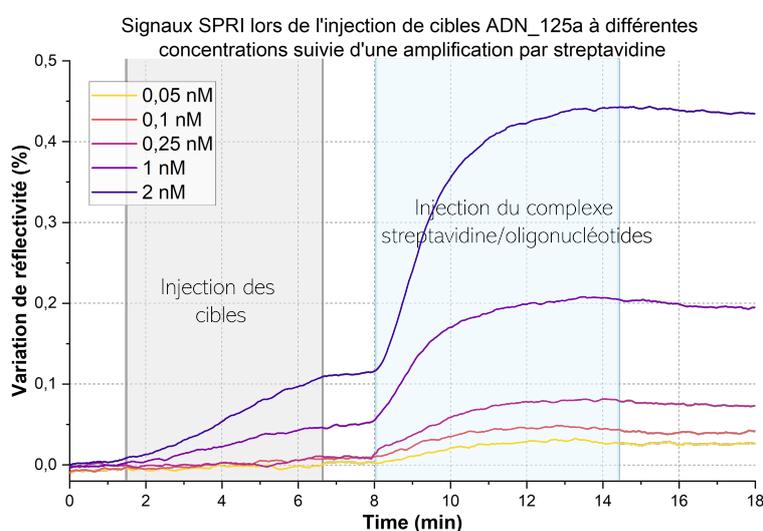
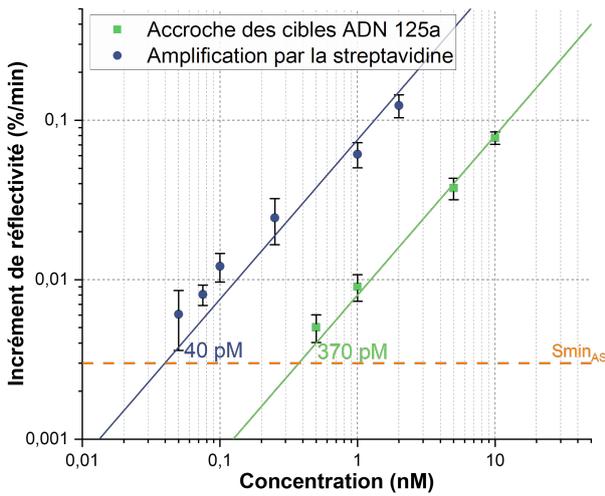


FIGURE IV.2 – Variation de réflectivité au cours du temps lors de la détection de l'hybridation des séquences ADN 125a sur une chimie cystéamine. Ce premier signal d'hybridation est suivi d'un deuxième signal d'amplification par méthode sandwich avec un complexe streptavidine/oligonucléotides venant s'hybrider sur la partie de la cible restée libre.

De la même manière que dans le chapitre précédent, les pentes pour les différentes concentrations de cibles peuvent être calculées pour les deux cinétiques : l'hybridation de la cible sur la sonde et l'hybridation en sandwich du CSO sur la cible. Les différentes valeurs de ces pentes peuvent être rapportées en fonction de la concentration de cibles afin de déterminer les LOD avec et sans l'amplification en sandwich par le CSO comme sur la figure IV.3.

Variation du signal SPRI en fonction de cibles ADN_125a avec et sans l'amplification par la streptavidine sur la chimie cystéamine



Variation du signal SPRI en fonction de cibles ADN_125a avec et sans l'amplification par la streptavidine sur la chimie mixte 25%

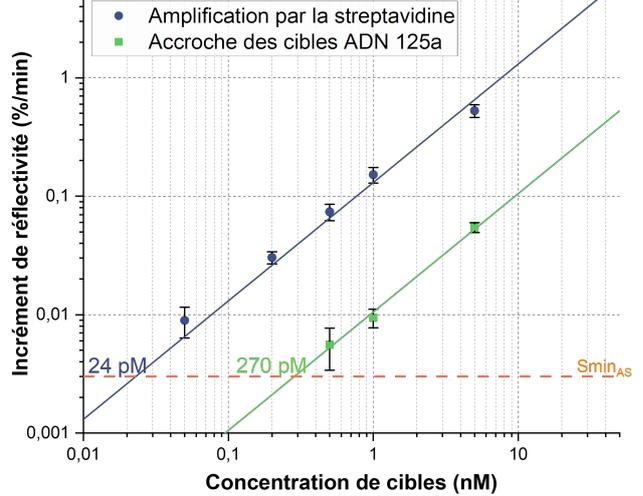


FIGURE IV.3 – Comparaison des limites de détection dans le cas de la détection de cibles ADN 125a avec et sans l'amplification par le complexe streptavidine-oligonucléotides pour deux chimies de surface (cystéamine à gauche et chimie mixte 25% à droite).

Deux biopuces ont été testées : l'une préparée avec une chimie cystéamine et l'autre une chimie mixte à 25%. Dans le cas de la chimie cystéamine, la LOD des cibles ADN 125a passent de 370 pM à 40 pM, signifiant une amplification du signal d'un facteur $A_{CSO} = 9$. Pareillement, un facteur $A_{CSO} = 11$ peut être calculé pour la chimie mixte, soit un facteur moyen d'amplification par le complexe streptavidine/oligonucléotides $A_{CSO} = 10$. En reprenant l'équation IV.6 du ratio des pentes de cinétique, on obtient un facteur d'amplification :

$$A_{CSO} = \frac{m_{CSO}}{m_{ADN}} k_2 [A] \Delta t_{inj}^{1ère} = 10 \quad (IV.7)$$

Cette valeur expérimentale de l'amplification permet d'évaluer la constante de réaction k_2 pour laquelle nous n'avons pas de données expérimentales. Il faut tout d'abord calculer le ratio des masses. Si l'on considère que le poids d'une base ADN est 330 Daltons (Da) [213], la masse d'une cible de 24 bases est 7 920 Da et celle du rajout de 18 bases avec une biotine (250 Da) vaut 6 190 Da. Sachant que la masse de la streptavidine vaut 53 000 Da, le poids du CSO fait un total d'environ 78 kDa. Ainsi, le rapport des masses vaut $\frac{m_{CSO}}{m_{ADN}} \approx 10$, soit l'amplification mesurée. On a donc la cas où :

$$k_2 [A] \Delta t_{inj}^{1ère} = 1 \quad (IV.8)$$

Connaissant le temps d'injection de la première injection, $\Delta t_{inj}^{1ère} = 5$ minutes et la concentration du complexe d'amplification CSO qui est celle de la concentration de la streptavidine, soit 10 nM, on obtient une estimation de la constante d'association pour la deuxième réaction entre la cible et le CSO de $k_2 = 0,02 \text{ nM}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Cette valeur est du même ordre de grandeur que les valeurs trouvées pour la chimie cystéamine lors de l'hybridation de la sonde et la cible pour les familles 125a et WT avec $k_{ass125a} = k_1 = 0,024 \text{ nM}^{-1} \text{ min}^{-1}$ $k_{assWT} = 0,013 \text{ nM}^{-1} \text{ min}^{-1}$ respectivement. Cela indique que la streptavidine n'a pas l'air de perturber l'interaction et que ce modèle permet une bonne estimation des réactions mises en jeu lors d'une amplification sandwich.

Cette preuve de concept avec un complexe streptavidine/oligonucléotide a permis d'obtenir une amplification expérimentale du signal, défini comme le ratio des pentes des cinétiques, d'un ordre de grandeur et de valider un modèle théorique d'amplification.

IV.2. Amplification du signal grâce à des nanoparticules d'or

Afin d'amplifier plus qu'un facteur 10 le signal SPRI, des nanoparticules d'or (AuNPs) sont utilisées dans cette partie pour réaliser le sandwich. Pour cela, l'hybridation directe des AuNPs sur les sondes en surface est étudiée afin de confirmer les protocoles de synthèse et de fonctionnalisation ainsi que d'évaluer le pouvoir amplificateur de ces AuNPs. Ensuite, elles sont utilisées comme sandwich dans différentes configurations, en commençant par un sandwich d'hybridation entre ADN uniquement pour finir par encadrer le miARN cible par des séquences hybrides ADN/LNA.

IV.2.1. Hybridation direct des nanoparticules d'or

Pour vérifier que les nanoparticules ont été correctement fabriquées, nous avons fonctionnalisé ces nanoparticules avec des séquences WT cibles afin de pouvoir les hybrider directement sur les sondes et ainsi permettre un contrôle positif des AuNPs ainsi qu'une quantification de leur signal d'hybridation. Les séquences utilisées lors de ces expériences sont listées dans le tableau IV.3.

Nom de la séquence	Séquence 5'→3'	Nombre de bases
sonde_WT	Biotin-TEG-GACCGGTATGCGTTCTAATGATGATTA	27
cible_WT	TCCATAATCATCATTAGAA	19
cible_WT_AuNP	Biotin-TEG-TTATTATTATAATCATCATTAGAA	24

TABLE IV.3 – Séquences des oligonucléotides utilisés pour réaliser les expériences d'hybridation directe entre les sondes en surface de la biopuce et les nanoparticules d'or. Les bases en gras sont celles qui s'hybrident entre la sonde et la cible.

IV.2.1.1. Calcul théorique du facteur d'amplification des AuNPs

Dans le cas d'une hybridation directe, l'oligonucléotide accroché sur la nanoparticule a exactement la même séquence que la cible ADN. Un espaceur et une biotine en son extrémité permettent l'accroche et l'accessibilité du simple brin sur la surface de la nanoparticule. Cette expérience permet de comparer directement le signal SPRI obtenu pour l'hybridation d'un brin d'ADN cible avec celui obtenu lors de l'hybridation du même brin d'ADN cible accroché à une AuNP. Cette comparaison va nous permettre de mesurer directement le facteur d'amplification résultant de la différence de changement d'indice provoqué par un brin d'ADN ou une AuNP fonctionnalisée.

Lors de l'hybridation directe, on a les deux équations différentielles suivantes :

$$\begin{aligned} \frac{d[\Delta R_{ADN}]}{dt} &= k_1 m_{ADN} [S]_0 [C] \\ \frac{d[\Delta R_{AuNPs}]}{dt} &= k_1 m_{AuNP} [S]_0 [C] \end{aligned} \quad (IV.9)$$

L'hybridation analysée concernent les mêmes séquences. En supposant que la nanoparticule ne perturbe pas significativement l'interaction, les constantes d'association sont donc les mêmes. Les biopuces utilisées sont également les mêmes puisque cette séquence est régénérable à 100% et les concentrations des cibles connues. On a donc un facteur d'amplification simplifié, sans prendre en compte l'impact des indices de réfraction, qui suit la relation suivante :

$$A_{AuNP} = \frac{d[\Delta R_{AuNP}]}{d[\Delta R_{ADN}]} = \frac{m_{AuNPs}}{m_{ADN}} \quad (IV.10)$$

Dans cette configuration, seul le poids de chaque molécule rentre en jeu dans la détermination du facteur d'amplification du signal SPRI. Cela s'explique car dans le cadre de la SPRI, comparer des changements d'indice très proche de l'interface (< 100 nm) là où le champ plasmonique reste le plus concentré, peut être rapporté à comparer directement le changement de densité dans le milieu diélectrique, soit le rapport des masses.

Comme dans la partie précédente, on peut évaluer le poids moléculaire du simple brin d'ADN biotinylé à $m_{ADN} = 6\,520$ Da. Pour la nanoparticule, avec une sphère de 40 nm de diamètre et une densité de l'or égale à $d_{or} = 19,3$ g/cm³) on obtient une masse $m_{AuNP} = 6,5 \cdot 10^{-16}$ g. L'épaisseur et donc la quantité de PEG sur la nanoparticule est en revanche difficilement calculable. Il est par contre possible de calculer le nombre de protéines de streptavidine nécessaire pour recouvrir une sphère de 40 nm de diamètre, soit une surface de $S_{AuNP} = 5 \cdot 10^3$ nm². La taille d'une streptavidine est estimée à 5 nm, soit une surface de 25 nm² sur un support plan, ce qui donnerait 200 protéines par AuNPs et 400 oligonucléotides dans l'hypothèse que deux des quatre sites sont disponibles pour accrocher un oligonucléotide biotinylé le reste étant accroché à la surface. La masse de la nanoparticule fonctionnalisée devient alors $m_{AuNP_{func}} = 6,7 \cdot 10^{-16}$ g. Ce calcul permet de confirmer que l'ajout des molécules de fonctionnalisation influent sur la grosseur globale de la nanoparticule, mais reste négligeable sur son poids. Si l'on remplace la valeur des masses respectives d'un brin d'ADN et d'une AuNP dans l'équation IV.10 on obtient un facteur d'amplification $A_{AuNP} = 61644 \approx 6,2 \cdot 10^4$, soit une amplification théorique entre trois à quatre ordres de grandeur supérieurs à celle obtenue avec une molécule de streptavidine.

IV.2.1.2. Détermination de la concentration optimale des sondes

Afin de réaliser cette amplification par nanoparticules, le premier paramètre étudié a été la concentration de spotting optimale. On souhaite avoir assez de sondes en surface pour permettre une détection sur une large gamme de concentration, mais en évitant les effets d'encombrement stérique liés à la taille beaucoup plus importante de la nanoparticule comparée à la sonde sur laquelle elle vient s'hybrider. Pour cela, des sondes ont été déposées sur la surface de la biopuce avec des concentrations entre $0,1 \mu\text{M}$ et $5 \mu\text{M}$. Ensuite, différentes concentrations d'AuNPs fonctionnalisées ont été envoyées sur la biopuce dans le banc SPRI Horiba à Sherbrooke. Comme précédemment, les différentes courbes de cinétiques ont été extraites du film d'images pour chaque concentration de cibles envoyées en fonction de chaque concentration en sondes. Ces courbes sont tracées sur les graphiques de la figure IV.4 suivante.

Plusieurs observations peuvent être faites sur ces graphiques. Tout d'abord, lors de l'augmentation successive de la concentration d'AuNPs injectées, les signaux SPRI des plots les moins concentrés saturent chacun leur tour. Le premier étant le plot à $0,1 \mu\text{M}$ pour l'injection (B), puis le plot à $1 \mu\text{M}$ pour l'injection (D). Sur cette injection-là, on peut également apercevoir

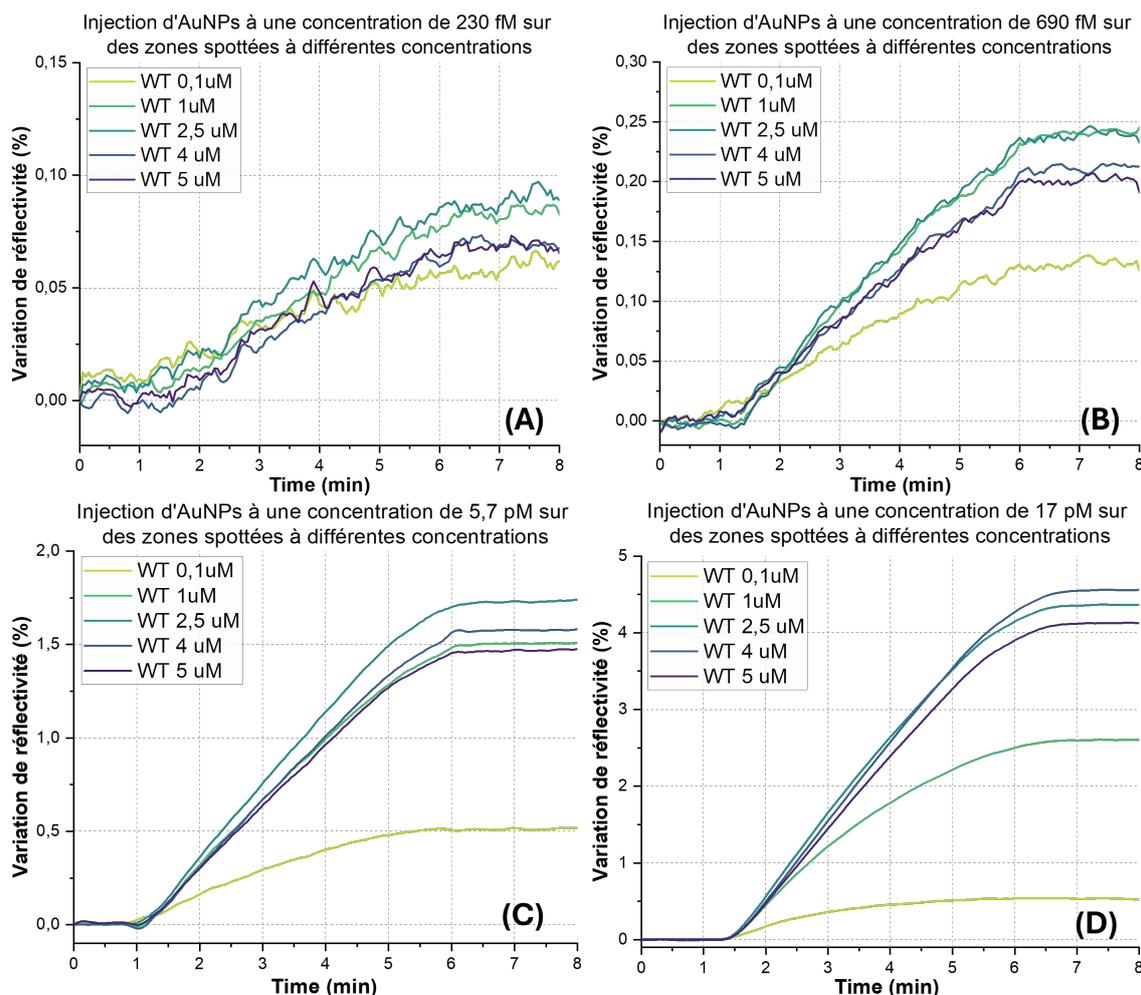


FIGURE IV.4 – Variation de réflectivité au cours du temps lors de l'injection d'AuNPs fonctionnalisées. Chaque graphique de A à D correspond à une injection d'AuNPs à une concentration fixe, entre 230 fM et 17 pM respectivement et chaque cinétique correspond à une concentration différente de sondes immobilisées sur la biopuce : entre 0,1 μ M et 5 μ M.

que le plot suivant à 2,5 μ M commence à perdre son allure linéaire comparée aux deux autres à plus fortes concentrations. Cette comparaison confirme encore une fois que la quantité de sondes immobilisées en surface est directement proportionnelle au signal SPRI maximum R_{max} obtenu pour une même injection. On observe sur ces quatre graphiques qu'en comparant les courbes dans un régime toujours linéaire, le plot le plus concentré à 5 μ M reste toujours celui qui a la pente la plus faible. Cette observation laisse supposer que ce plot subit des effets d'encombrement stérique réduisant la vitesse de la cinétique.

Afin de vérifier cette hypothèse, il est possible d'estimer la distance typique entre les sondes, à partir de la concentration déposée. La taille de l'aiguille utilisée pour déposer les nanogouttes sur la surface d'or est de 500 μ m et on estime que c'est également le diamètre du plot. Suivant des mesures d'angles de contact déjà réalisés dans la littérature, l'angle de contact d'une goutte d'eau sur une surface fonctionnalisée avec de la streptavidine pour un pH de 7 vaut $\alpha=20^\circ$ [214]. Connaissant cet angle et en considérant que la forme de la goutte déposée est une calotte sphérique, le volume de cette goutte vaut $V_{goutte} = \pi \times R^3 \left(\frac{2}{3} + \frac{\cos(\alpha^3)}{3} - \cos(\alpha) \right)$. L'application numérique de cette formule donne un volume de $V_{goutte} = 1,8.10^{-13} m^3$. Avec la concentration

des sondes immobilisées, on peut remonter au nombre de sondes qui se retrouvent accrochées sur une surface circulaire de diamètre $500\mu\text{m}$ et donc l'espacement moyen entre deux sondes. Ces différentes grandeurs sont synthétisées dans le tableau IV.4 ci-dessous.

Concentration en sondes	Quantité de sondes dans la goutte	Espacement entre les sondes
0,1 μM	$2,9 \cdot 10^5$ oligos	26 nm
1 μM	$2,9 \cdot 10^6$ oligos	8 nm
2,5 μM	$7,3 \cdot 10^6$ oligos	5 nm
4 μM	$1,2 \cdot 10^7$ oligos	4 nm
5 μM	$1,5 \cdot 10^7$ oligos	3,5 nm

TABLE IV.4 – Tableau récapitulatif de la quantité de sondes dans une goutte déposée par le spotter ainsi que l'espacement moyen obtenu sur la surface de la biopuce entre deux sondes.

L'espacement entre les sondes calculé grâce à ces estimations montre que dans le cas le plus faiblement concentré les sondes sont à une distance du même ordre de grandeur que la taille de la nanoparticule, dans ce cas-ci aucun encombrement stérique ne rentre en compte. Pour les autres concentrations, l'espacement se réduit considérablement, mais aucun effet d'encombrement stérique n'est vraiment visible sur les signaux SPRI supposant que l'espaceur au bout de l'oligonucléotide sur la nanoparticule permet un assez grand degré de liberté à la nanoparticule et n'empêche pas l'hybridation sur une sonde voisine. Cependant, pour les deux familles de plots les plus concentrés, l'espacement se réduit jusqu'à aller vers la limite qui est le diamètre d'un double brin d'ADN, soit 3 nm. Dans ce cas-là, il est possible d'imaginer que les degrés de liberté de la nanoparticule ne sont plus assez importants pour permettre l'hybridation de la sonde voisine, sachant que sans cette nanoparticule l'espace est très réduit, même pour réussir à faire passer un simple brin seul.

Ces mesures à différentes concentrations d'AuNPs ont servi un deuxième objectif : déterminer expérimentalement le signal non-spécifique en fonction de la concentration d'AuNPs injectées. Cette mesure est effectuée de la même manière que dans le chapitre précédent en prenant l'écart type autour du signal SPRI moyen sur les plots de référence. Cette mesure de signal non spécifique est tracée en fonction de la concentration en AuNPs sur la figure IV.5. Ce signal est déterminé à la fin des cinq minutes d'injection, puis divisé par ce temps d'injection pour être comparé à un signal SPRI en $\%/min$. Sur ce graphique en échelle logarithmique, on peut voir que dès l'injection de quelques centaines de femtolaires d'AuNPs le signal non spécifique devient plus important que le bruit instrumental $S_{min_{Horiba}}$ et devient le paramètre limitant dans l'étape d'amplification.

Cette comparaison des concentrations de sondes en surface a donc permis d'obtenir une borne supérieure et inférieure sur la concentration de spotting pour maximiser la détection de cibles sur une large gamme de concentration, tout en limitant l'encombrement stérique des AuNPs lors de leur hybridation. Ainsi, pour les expériences qui suivent la concentration de sondes en surface choisie est $3\mu\text{M}$. Il apparaît également que la fonctionnalisation choisie pour les nanoparticules, conduit à un signal non spécifique non négligeable si l'on augmente leur concentration. Or l'étude théorique du facteur d'amplification a montré qu'il était nécessaire d'injecter le complexe d'amplification à une concentration suffisante par rapport à la constance d'interaction pour

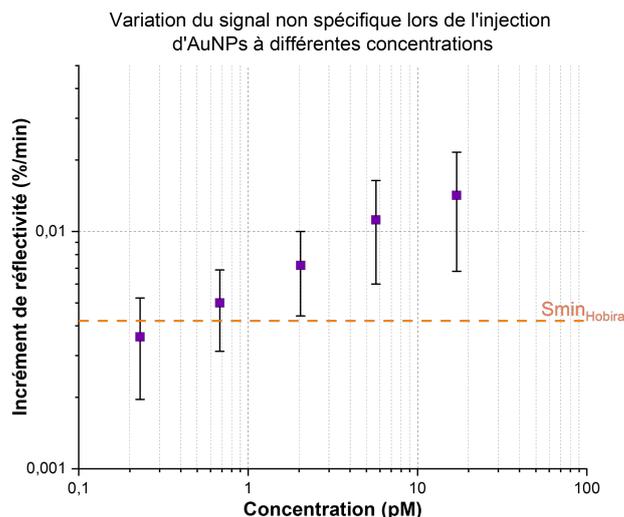


FIGURE IV.5 – Variation du signal non spécifique en SPRI lors d’injection d’AuNPs à différentes concentrations.

profiter au maximum du ratio des masses. Un compromis va donc être nécessaire comme nous le verrons dans la partie suivante.

IV.2.1.3. Mesure expérimentale du facteur d’amplification des AuNPs

Dans un premier temps, on étudie l’amplification directe par les AuNPs afin de voir si l’on retrouve le rapport des masses calculé dans la partie précédente. Les séquences WT sont très adaptées à cette comparaison, car elles sont régénérables à 100% avec une injection d’eau DI qui permet de dissocier le complexe sonde-cible. Cette comparaison est réalisée en injectant sur la même biopuce différentes concentrations de cibles ADN ainsi que différentes concentrations d’AuNPs fonctionnalisées. Les cinétiques obtenues sont tracées sur la figure IV.6 qui suit.

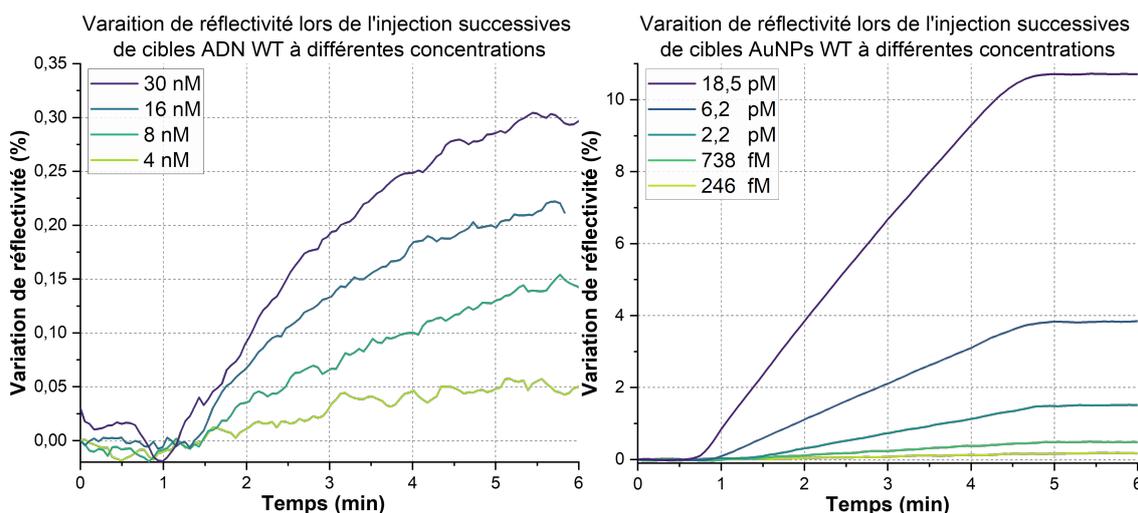


FIGURE IV.6 – Variation de réflectivité lors d’injections de cibles à différentes concentrations sur un biopuce fonctionnalisées avec 3 μ M de sondes WT. À gauche : injections de cibles ADN WT. À droite : injections d’AuNPs fonctionnalisées avec des cibles ADN WT.

Comme dans le chapitre précédent, il est possible de déterminer le coefficient directeur de la partie linéaire de chaque cinétique pour chacune des injections réalisées. Ces coefficients sont

ensuite regroupés dans un graphique fonction de la concentration en cible injectée pour donner la figure IV.7

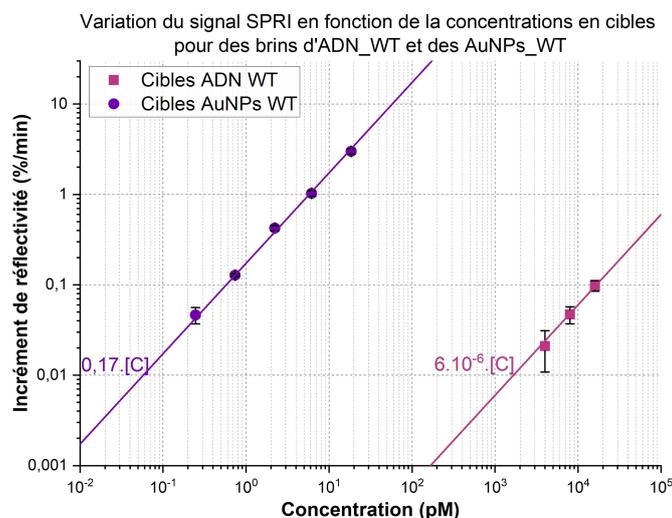


FIGURE IV.7 – Variation de la pente des cinétiques en fonction de différentes concentrations de cibles injectées pour des simples brins d’ADN et des AuNPs fonctionnalisées avec le simple brin d’ADN.

On extrait de ce graphique le rapport entre les coefficients directeurs des régressions linéaires. Ces coefficients sont $0,17 \text{ \%} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{pM}^{-1}$ pour les AuNPs et $6 \cdot 10^{-6} \text{ \%} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{pM}^{-1}$ pour l’hybridation ADN seule. Le rapport d’amplification obtenu est donc $A_{WT} = 28892 \approx 2,9 \cdot 10^4$. Le même protocole expérimental a été réalisé pour différentes chimies de surface ainsi qu’avec différents lots de synthèse de nanoparticules, les facteurs d’amplification associés à ces expériences sont listés dans le tableau IV.5.

Chimie de surface	Lot d’AuNPs	Facteur d’amplification
Chimie cystéamine	numéro 24	$28985 \approx 2,9 \cdot 10^4$
	numéro 25	$30031 \approx 3 \cdot 10^4$
	numéro 26	$32060 \approx 3,2 \cdot 10^4$
Chimie mixte	numéro 24	$28892 \approx 2,9 \cdot 10^4$
	numéro 25	$29896 \approx 3 \cdot 10^4$

TABLE IV.5 – Tableau récapitulatif des facteurs d’amplification du signal SPRI pour différents lots de nanoparticules et pour différentes chimies de surface.

La valeur moyenne de tous ces facteurs d’amplification vaut $A_{AuNP} = 30773 \approx 3,1 \cdot 10^4$ avec un écart type de $\sigma_A = 3000$. Cet écart type de $\pm 10\%$ s’explique par la variation des diamètres, et donc des masses, des AuNPs synthétisées. Il est important de rappeler que le diamètre moyen et la concentration des AuNPs dans la solution colloïdale sont déterminés par un ajustement du modèle de Mie aux spectres d’absorption. Ce modèle présenté dans la partie III.3 est imprécis à ± 1 nm sur le rayon de la nanoparticule lors de l’ajustement de la position du maximum d’absorption. Cette variation de taille des nanoparticules entre les lots entraîne une différence de masse, et par conséquent une variation du facteur d’amplification, pouvant aller jusqu’à 15%, ce qui justifie l’écart mesuré expérimentalement pour différents lots d’AuNPs.

Cette expérience de comparaison du signal SPRI entre des AuNPs et des cibles ADN WT a également été réalisée sur le banc angulo-spectral au LCF et un facteur d'amplification $A_{AuNP_{\text{expérimental}}} = 29815 \approx 3.10^4$ a été mesuré, confirmant que ce facteur d'amplification n'est pas dépendant de l'instrumentation. Ce facteur d'amplification peut être comparé la valeur théorique calculée plus haut qui vaut $A_{AuNP_{\text{théorique}}} \approx 6.10^4$. On retrouve bien l'ordre de grandeur attendu, mais il y a un écart d'un facteur deux entre la mesure expérimentale et le calcul théorique du facteur d'amplification. Une explication possible pourrait être liée à la taille non négligeable des AuNPs par rapport au profil évanescents du plasmon de surface comme représenté sur la figure IV.8. Il a été calculé grâce au modèle de Rouard [102] suivant les conditions expérimentales du banc Horiba avec une longueur d'onde d'excitation de 818 nm, un prisme en verre SF10, une couche d'or de 50 nm (précédée de 2 nm de titane) et avec comme milieu diélectrique supérieur de l'eau en se plaçant à l'angle de cinétique sur la pente de la résonance.

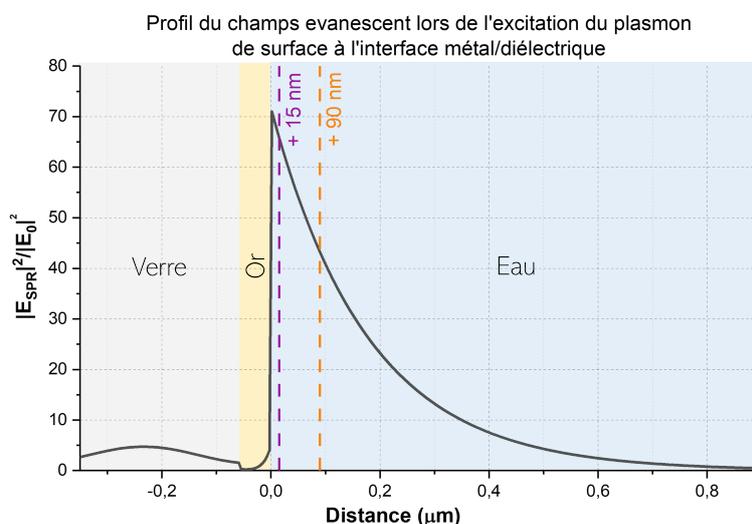


FIGURE IV.8 – Profil de l'intensité relative du champ plasmonique par rapport au champ incident lors du passage de la lumière à travers les différentes interfaces : verre/or et or/diélectrique.

Si l'on regarde les différentes épaisseurs d'espèces chimiques présentes à l'interface, la couche de chimie de surface est estimée à 5 nm dans le cas de la chimie mixte. Le duplexe ADN/ADN a une hauteur de 10 nm ce qui place la cible à une hauteur totale de 15 nm au-dessus de la surface d'or. Lorsque l'hybridation se fait avec la nanoparticule, cette hauteur passe à 90 nm en prenant en compte toutes les couches moléculaires qui couvre l'AuNP (PEG, streptavidine et oligonucléotides). Pour ces deux profondeurs, les valeurs de l'intensité relative du champ par rapport au champ incident sont $I_{15nm}=67$ et $I_{90nm}=43$. On a donc une diminution du signal SPRI d'un facteur $\Delta I=1,56$ entre les deux configurations simplement pour une question de distance à l'interface. À cela, s'ajoute également l'effet de la nanoparticules d'or elle-même sur le plasmon généré dans le film d'or qui est un couplage électromagnétique complexe à quantifier, mais qui peut dégrader la finesse de la résonance et donc sa sensibilité. Également, le modèle présenté est très simplifié, il ne prend pas en compte que l'indice de réfraction de l'or est très différent de celui de molécules biologiques, seulement les masses sont comparées alors que le plasmon de surface est sensible aux changements d'indice. Toutes ces raisons peuvent expliquer le facteur deux entre l'amplification mesurée et celle attendue.

En conclusion, l'hybridation directe des AuNPs avec la séquence cible WT a permis de déterminer expérimentalement le facteur d'amplification d'une AuNP par rapport à un simple brin d'ADN. Le modèle théorique correspond bien à la valeur expérimentale obtenue, bien qu'un écart d'un facteur deux soit observé. De plus, ces expériences ont démontré l'intérêt d'utiliser les AuNPs par hybridation directe, grâce à la grande reproductibilité des résultats, permettant de les employer comme contrôle positif pour la quantité d'AuNPs correctement fonctionnalisées, en comparant les signaux SPRI obtenus lors de cette hybridation directe.

IV.2.2. Utilisation de nanoparticules d'or en sandwich

La partie précédente a permis de calculer expérimentalement un facteur d'amplification des AuNPs de $A_{AuNP_{\text{expérimental}}} \approx 3.10^4$ proche de celui estimé théoriquement à $A_{AuNP_{\text{théorique}}} \approx 6.10^4$ ainsi que d'estimer en fonction de la concentration injectée le signal SPRI non spécifique lié aux AuNPs. Cette partie reprend l'utilisation de la méthode sandwich afin d'amplifier le signal SPRI d'une première cible en utilisant cette fois-ci des AuNPs fonctionnalisées. Les premiers essais ont été réalisés avec seulement des séquences ADN afin de simplifier les interactions, puis les sondes ont été changées pour passer à de la détection de miARNs pour enfin finir par faire un sandwich de ces cibles entre des brins hybrides ADN/LNA.

IV.2.2.1. Sandwich entre brins d'ADN

Dans cette première partie, la preuve de concept de la méthode sandwich réalisée dans la partie IV.1 précédente avec un complexe de streptavidine et d'oligonucléotides est remplacée par des AuNPs afin d'augmenter le facteur d'amplification du signal SPRI. Les séquences utilisées sont listées dans le tableau IV.6 ci-dessous.

Nom de la séquence	Séquence 5'->3'	Nombre de bases
sonde_125a_ADN	Biotin-TEG-TTGACCGGTATGCGTCACAGGTTAAAGGG	29
cible_125a_ADN	<i>TCCCTGAGA</i> CCCTTAACTGTGA	24
rajout_125a_ADN	<i>TCTCAGGGA</i> TTATTATTA-TEG-Biotin	18

TABLE IV.6 – Séquences des ADN utilisés pour réaliser les expériences d'amplification du signal SPRI par des AuNPs fonctionnalisées. Les bases en gras sont celles qui s'hybrident entre la sonde et la cible et les bases en italiques celles qui s'hybrident entre la cible et le rajout, ce dernier attaché à l'AuNP.

Différentes solutions de cibles ADN 125a à faibles concentrations sont préparées ainsi qu'une solution d'amplification d'AuNPs de concentration 25 pM. L'expérience commence par une injection de calibration à forte concentration pour vérifier la présence et le taux de couverture des sondes ADN déposées sur la surface. La cible 125a est ensuite injectée, à la concentration la plus faible, puis les AuNPs qui viennent s'hybrider en sandwich sur la cible et amplifier le premier signal non visible, se trouvant en dessous du seuil de détection de l'appareil. On décroche ensuite les AuNPs et une partie des cibles grâce à une injection d'eau pure et on passe à la concentration de cible suivante. Les variations de réflectivité expérimentales sont tracées en fonction du temps sur la figure IV.9 pour les différentes concentrations de cibles injectées. À des concentrations de cibles aussi faibles, les cinétiques avant amplification ne sont pas mesurables.

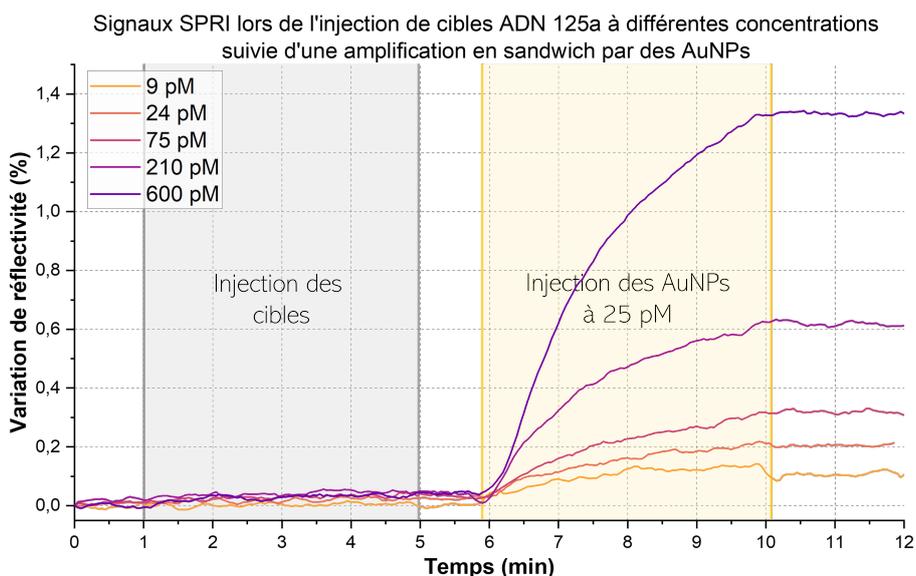


FIGURE IV.9 – Variation de réflectivité lors d'injections de cibles à différentes concentrations suivies de l'injection d'AuNPs pour amplifier le signal par la méthode sandwich.

Comme précédemment, les coefficients directeurs des différentes courbes de cinétiques pour la partie amplification sont calculés et tracés en fonction de la concentration de cibles injectées en échelle logarithmique sur la figure IV.10. Il a été ajouté pour comparaison les points de cinétique pour l'injection de cible ADN 125a à forte concentrations ($> 1 \text{ nM}$), qui sont visibles sans amplification, mesurées dans les expériences précédentes. Sur ce graphique, deux ajustements du signal d'amplification des AuNPs ont été réalisés : linéaire (courbe bleue en trait plein) et affine (courbe bleue en trait pointillé). Cette comparaison permet de montrer que ce signal ne suit plus une régression linéaire contrairement à l'hybridation directe des cibles (courbe en violet). Cette différence est due au signal non spécifique lors de l'injection des AuNPs, même peu concentrées, qui n'est plus négligeable et se retrouve supérieur à la limite instrumentale (ligne horizontale en orange pointillé). Ce signal non spécifique est donc déterminé comme étant l'ordonnée à l'origine de l'ajustement affine, soit $S_{nonspé} = 0,068 \text{ \%/min}$. Afin de déterminer le

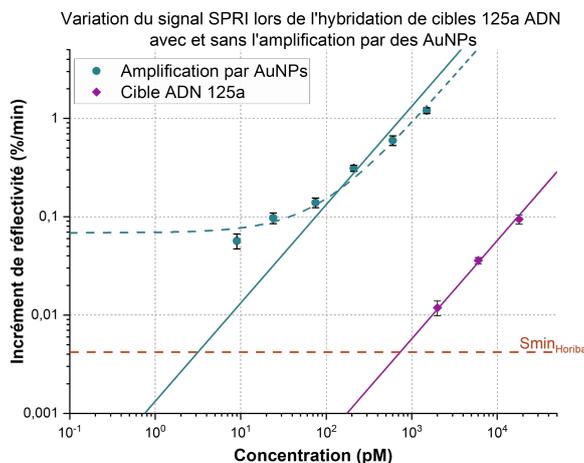


FIGURE IV.10 – Mesure de la pente des cinétiques en fonction de la concentration de cibles injectée avec et sans amplification par des AuNPs en utilisant la méthode sandwich.

facteur d'amplification des AuNPs en sandwich, la pente de la régression linéaire des cibles ADN

est comparée avec celle de l'ajustement affine des signaux d'amplification donnant le facteur d'amplification $A_{Sand-AuNP_{exp}} \approx 1,66.10^2$.

Cette expérience a été réalisée sur d'autres biopuces fonctionnalisées de la même manière et en utilisant le même lot d'AuNPs afin de confirmer les résultats. Les graphiques de variation du signal SPRI en fonction de la concentration de cibles injectées sont tracés sur la figure IV.11. Les trois biopuces utilisées lors de ces expériences ont été fonctionnalisées en même temps, mais utilisées à j+1, j+2 et j+6 pour la biodétection.

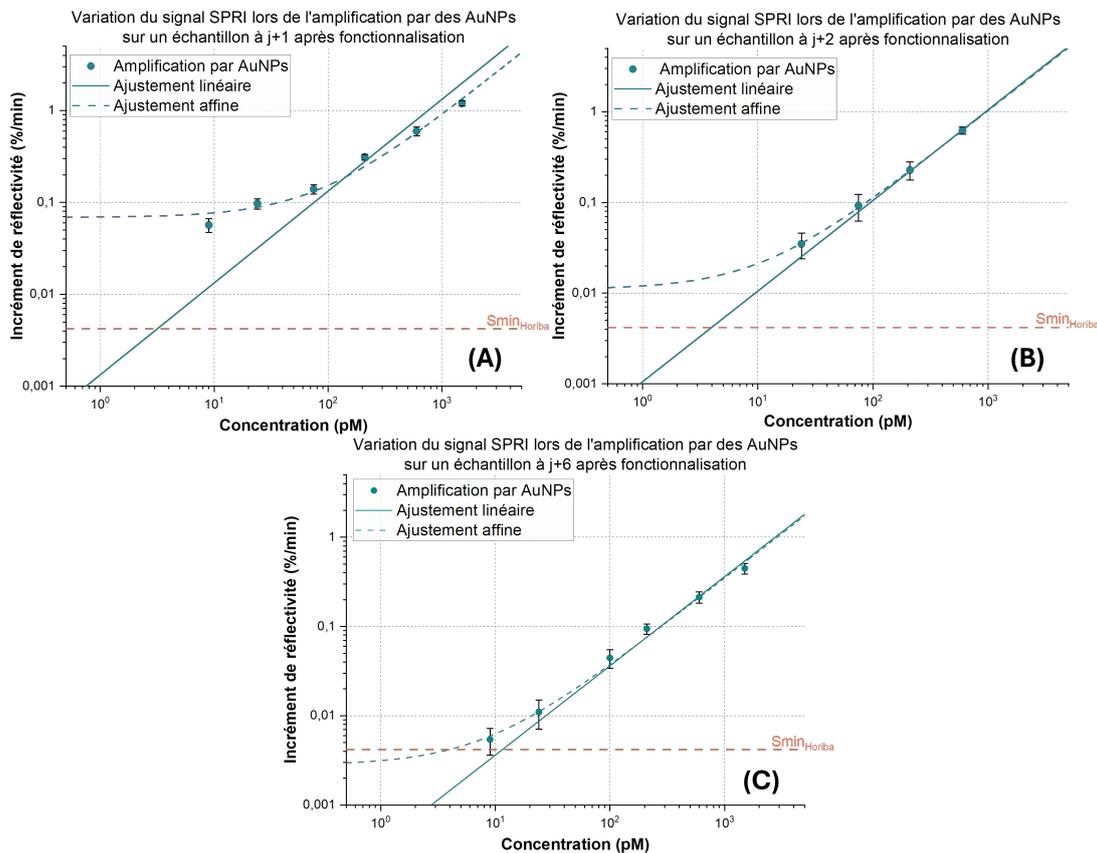


FIGURE IV.11 – Variation du signal SPRI en fonction de la concentration de cibles injectée avec amplification par des AuNPs en utilisant la méthode sandwich pour des biopuces utilisées à différents intervalles de jours après leur fonctionnalisation.

Pour toutes ces expériences, on remarque qu'un ajustement affine est effectivement plus représentatif des résultats obtenus et permet en plus de quantifier le signal non spécifiques lié aux AuNPs. Les valeurs de ces signaux non spécifiques pour les trois échantillons sont listés dans le tableau IV.7 qui suit. Il est clair que ce signal non spécifique diminue considérablement avec le délais entre la fonctionnalisation de la surface d'or et l'utilisation de la biopuce. Cette diminution s'explique par une baisse d'activité de la streptavidine au cours du temps, même lors du stockage des échantillons au frigo. La couche de streptavidine sert à venir immobiliser les sondes biotinylées mais permet également l'adsorption non spécifique de toutes autres molécules en solution [215] et en particulier avec la streptavidine qui recouvre également les nanoparticules. Ainsi, plus l'activité de cette protéine va diminuer à la surface de la biopuce plus le signal non spécifique lors de l'injection des AuNPs va se réduire.

Concernant les pentes des cinétiques et le facteur d'amplification, ceux-ci sont comparés

dans le tableau IV.7 avec une baisse surprenante de 63% pour l'échantillon à j+6 par rapport à l'échantillon à j+1. La première cause possible pourrait être une dégradation des séquences ADN déposées à la surface de la biopuce. Toutefois, le signal maximal R_{max} mesuré lors de l'injection de la séquence de calibration est très similaire entre l'échantillon à j+1 et celui à j+6 ($R_{max_{j+1}}=0,28\%$ pour le premier échantillon et $R_{max_{j+6}}=0,26\%$ pour le troisième), ce qui indique que les plots n'ont pas été dégradés. Une seconde cause beaucoup plus probable est une différence de concentration des AuNPs injectées. En effet, la solution mère de nanoparticules est la même pour les trois expériences, mais pour des raisons de stabilité, on fonctionnalise les nanoparticules le jour même de l'expérience. Cependant, une certaine quantité est perdue par précipitation lors de cette opération. Pour vérifier cela, une partie des AuNPs a été fonctionnalisée avec des séquences WT pour s'hybrider directement sur les sondes correspondantes. Ce signal peut être comparé et corrélé avec la quantité d'AuNPs qui a survécu à la fonctionnalisation. En comparant ces signaux qui sont donnés dans le même tableau, on remarque une diminution de quasiment un facteur 2 du signal, confirmant cette hypothèse. À noter que cette diminution de la concentration des AuNPs à j+6 ne peut expliquer à elle seule la baisse très importante du signal non spécifique qui vient bien de la diminution d'activité de la streptavidine.

Graphique	Jours après la chimie	Signal non spécifique	Coefficient directeur	Signal des AuNPs _{WT}	Facteur d'amplification
A	j+1	0,068	$9,5 \cdot 10^{-4}$	4,36%/min	$168 \approx 1,7 \cdot 10^2$
B	j+2	0,011	$10,2 \cdot 10^{-4}$		$176 \approx 1,8 \cdot 10^2$
C	j+6	0,0028	$3,5 \cdot 10^{-4}$	2,33%/min	$(0,6 \cdot 10^2)$

TABLE IV.7 – Tableau récapitulatif des résultats expérimentaux d'amplification par la méthode sandwich à l'aide d'AuNPs.

Si on met de côté l'expérience à j+6 en raison du problème de concentration des nanoparticules, le facteur d'amplification moyen vaut $A_{Sand-AuNP_{exp}} \approx 1,72 \cdot 10^2$. Avec le modèle de Mie, les AuNPs utilisées ont un diamètre estimé de 44 nm et une concentration d'injection de 25 pM.

Ce facteur d'amplification expérimental peut être comparé au facteur d'amplification théorique calculé à partir du modèle de cinétique présenté dans la partie IV.1.1 précédente. Pour rappel, ce modèle définit le facteur d'amplification comme étant :

$$Ampli = \frac{d[\Delta R_2]}{d[\Delta R_1]} = \frac{m_{CSO}}{m_{ADN}} k_2 [A] \Delta t_{inj}^{1ère} \quad (IV.11)$$

On sait que la constante d'association k_2 a été déterminée pour les mêmes séquences 125a dans le cadre de l'amplification par la streptavidine, et sa valeur est $k_2=0,02 \text{ nM}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Le rapport des masses pour des AuNPs de 44 nm de diamètre comparé à un rajout 125a ADN simple brin vaut $\frac{m_{AuNP}}{m_{ADN}}=8,2 \cdot 10^4$. Avec toutes ces données, le facteur d'amplification théorique est calculé comme étant $A_{Sand-AuNP_{thé}} \approx 1,64 \cdot 10^2$. Cette valeur théorique suivant le modèle de cinétique est très proche de la valeur expérimentale moyenne $A_{Sand-AuNP_{exp}} \approx 1,72 \cdot 10^2$, confirmant une nouvelle fois la validité du modèle.

Ces expériences d'amplification par la méthode sandwich utilisant des brins d'ADN pour la séquence 125a ont révélé plusieurs observations et points critiques concernant l'amplification

avec des AuNPs. Tout d'abord, on remarque un signal non spécifique important qui devient limitant à faible concentration de cibles. Toutefois, ce signal est fortement réduit lorsque les biopuces sont utilisées plusieurs jours après la fonctionnalisation de la surface, probablement en raison d'une baisse de l'activité de la streptavidine qui recouvre l'ensemble de la surface de la biopuce et que l'on suppose être le site d'adsorption non spécifique des AuNPs. Malgré cela, la comparaison des résultats expérimentaux avec notre modèle théorique montre un très bon accord et souligne que le facteur limitant dans ces expériences est la concentration injectée des AuNPs. Cependant, une augmentation de cette concentration d'injection entraînerait une hausse du signal non spécifique, sans nécessairement améliorer la limite de détection. À terme, il serait donc nécessaire de mettre au point un protocole de passivation des biopuces et des AuNPs plus efficace, en sachant que les deux sont recouverts de streptavidine, pour dépasser cette limite.

IV.2.2.2. Sandwich du miARN entre une sonde LNA/ADN et des rajouts ADN

L'objectif final de ce projet de thèse étant la détection de miARN à faible concentration, la cible a été remplacée dans la méthode sandwich précédente par le miARN 125a, tandis que la sonde ADN a été substituée par une sonde LNA afin d'augmenter l'affinité du complexe. Les séquences utilisées sont listées dans le tableau IV.8 ci-dessous. Dans ce dernier, les séquences de même style de police sont complémentaires et les bases entre accolades {} sont des bases modifiées LNA.

Nom de la séquence	Séquence 5'->3'	Nombre de bases
sonde_125a_LNA	Biotin-TEG-TTGACCGGTATGCG{T}CA{C}AG{G}TT{A}AA{G}	27
cible_125a_ARN	<i>TCCCTGAGACC CTTAACCTGTGA</i>	24
rajout_125a_ADN	<i>GGTCTCAGGGA</i> TTATTATTA-TEG-Biotin	20

TABLE IV.8 – Séquences des oligonucléotides utilisés pour réaliser les expériences d'amplification du signal SPRI lors de l'hybridation des miARNs par des AuNPs fonctionnalisées. Les bases en gras sont celles qui s'hybrident entre la sonde et la cible et les bases en italiques celles qui s'hybrident entre la cible et le rajout, ce dernier attaché à l'AuNP.

Le protocole expérimental utilisé reste identique à celui appliqué dans la section précédente pour l'amplification des cibles ADN 125a. Les cibles miARNs 125a sont d'abord introduites dans la chambre, suivies des AuNPs à concentration constante pour réaliser l'amplification en sandwich. Deux concentrations d'AuNPs issues du même lot ont été comparées lors de l'étape d'amplification afin d'évaluer l'impact de ce paramètre sur le facteur d'amplification final. Les courbes de cinétiques obtenues pour ces expériences sont représentées sur la figure IV.12 : le graphique de gauche montre les courbes d'amplification avec 8,3 pM d'AuNPs lors de la deuxième injection, tandis que celui de droite présente les résultats avec 25 pM d'AuNPs.

Les différents coefficients directeurs de la partie linéaire de chacune des courbes de cinétiques ont été calculés et reportés en fonction de la concentration des cibles sur le graphique de la figure IV.13.

Pour quantifier le gain en limite de détection, nous avons également injecté les miARNs à plus fortes concentrations (> 1nM) afin de mesurer la cinétique sans amplification, les pentes de ces cinétiques sont également représentées sur ce graphique. L'ajustement des données est

IV.2. Amplification du signal grâce à des nanoparticules d'or

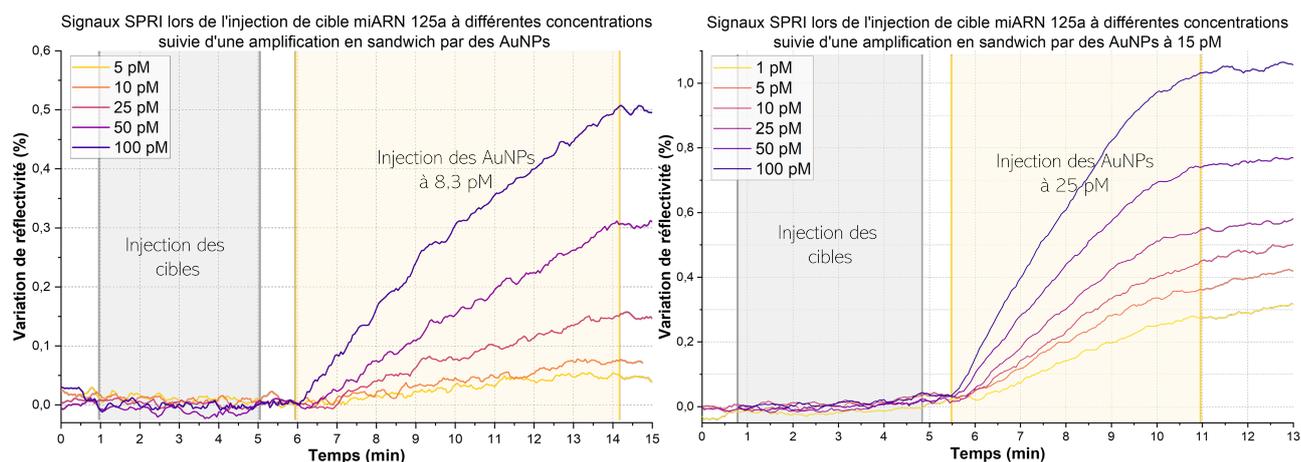


FIGURE IV.12 – Variation de réflectivité lors d'injections de cibles à différentes concentrations suivies de l'injection d'AuNPs pour amplifier le signal par la méthode sandwich. À gauche : utilisation d'une solution d'AuNPs à 8,3 pM pour l'étape d'amplification. À droite : utilisation d'une solution d'AuNPs à 25 pM pour l'étape d'amplification.

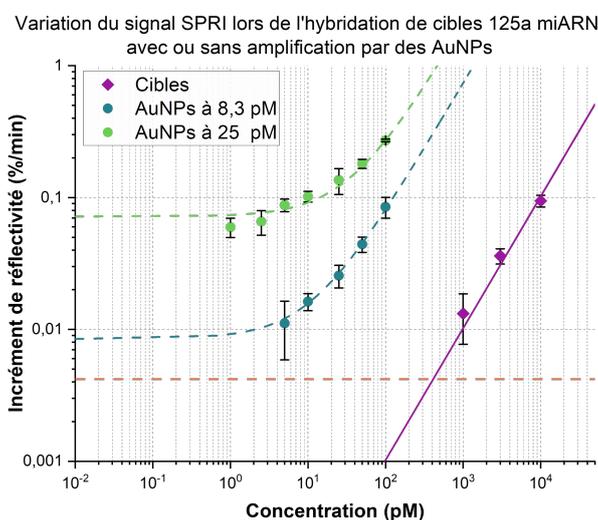


FIGURE IV.13 – Variation du signal SPRI en fonction de la concentration de cibles miARNs 125a injectées avec et sans amplification par des AuNPs en utilisant la méthode sandwich.

réalisé avec un simple modèle linéaire pour l'accroche directe des cibles miARNs 125a et avec un modèle affine pour l'amplification par AuNPs à cause du signal non spécifique qu'elles entraînent. Les expériences d'amplification ont été réalisées à 13 jours d'intervalle, mais la fonctionnalisation des biopuces n'a pas été effectuée en même temps. Étant donné que la durée écoulée entre la fonctionnalisation et l'utilisation des échantillons n'est pas connue, il n'a pas été possible de corrélérer directement le signal non spécifique des deux expériences.

Le tableau IV.9 compare pour ces deux expériences les facteurs d'amplification en supposant que les constantes d'association de la cible miARN et la cible ADN sont similaires avec leur sonde respective. Comme attendu, celui-ci est directement proportionnel à la concentration d'AuNPs injectée, soit un gain d'environ un facteur 3 est calculé. Dans ce tableau, les LOD en concentration des miARNs sont également comparées dans deux cas : en prenant en compte le signal non spécifique et dans un cas idéal où le signal non spécifique serait inférieur à la limite instrumentale, par exemple avec une meilleure passivation. Si le signal non spécifique est pris en compte, la limite

de détection est équivalente pour les deux concentrations d'AuNPs entre 6 et 8 pM. Dans le cas idéal, en prenant l'intersection entre la régression linéaire et la limite instrumentale, la LOD passe à 3,5 pM lors de l'injection moins concentrée d'AuNPs à 8,3 pM et passe en dessous du picomolaire, à 850 fM lors d'injection d'AuNPs à 25 pM.

Concentration AuNPs	Coefficient directeur	Facteur d'amplification	LOD avec non spécifique	LOD sans non spécifique
8,3 pM	$7,2 \cdot 10^{-4}$	$72 \approx 0,7 \cdot 10^2$	8 pM	3,5 pM
25 pM	$21 \cdot 10^{-4}$	$207 \approx 2,1 \cdot 10^2$	6 pM	850 fM

TABLE IV.9 – Tableau récapitulatif des résultats expérimentaux d'amplification par la méthode sandwich à l'aide d'AuNPs.

Cette comparaison confirme qu'il est nécessaire d'injecter les AuNPs à de fortes concentrations afin d'avoir le meilleur signal d'amplification possible. Même si nous sommes actuellement limité par le signal non spécifique de cette injection, la limite de détection des miARNs descend jusqu'à quelques picomolaires. Avec une meilleure passivation pour réduire ce signal parasite, une limite sous le picomolaire pour la détection des séquences du projet Epi Storm semble atteignable.

IV.2.2.3. Sandwich du miARN entre une sonde et des rajouts hybrides LNA/ADN

Dans la partie précédente, il a été démontré que, pour augmenter le signal d'amplification de la capture des miARNs, il est possible de jouer sur la concentration injectée d'AuNPs. Cependant, l'équilibre avec le signal non spécifique généré par cette augmentation reste fragile et complexe. Un autre paramètre influençant le facteur d'amplification est la constante d'association entre la cible miARN et le rajout immobilisé sur l'AuNP.

Dans le chapitre précédent, les sondes ADN ont été remplacées par des sondes hybrides ADN/LNA dans le but d'améliorer l'affinité avec la cible et, ainsi, d'augmenter la constante d'association du duplexe. De la même manière, des bases modifiées LNA peuvent être intégrées dans la séquence du rajout pour augmenter la constante d'association k_2 . Pour sélectionner quelles bases modifier dans la séquence du rajout, il est essentiel de maintenir une hybridation réversible, avec une faible température de fusion T_m dans l'eau, afin de permettre le détachement facile de l'AuNP du sandwich. Le point de comparaison utilisé est le rajout ADN qui se détache très bien du duplexe sonde-cible durant l'étape de régénération à l'eau. Les deux séquences de rajouts, avec et sans bases LNA, sont données dans le tableau IV.10 ci-dessous.

Nom de la séquence	Séquence 5'->3'	$T_{mPBS} - T_{mEAU}$
rajout_125a_ADN	GGTCTCAGGGA TTATTATTA-TEG-Biotin	35,6°C - 4,7°C
rajout_125a_LNA	G{T}CT{C}AGGGA TTATTATTA-TEG-Biotin	39,6°C - 7,9°C

TABLE IV.10 – Séquences des rajouts ADN et LNA utilisés pour l'hybridation de la cible miARN en sandwich avec l'AuNP.

Une première comparaison entre les deux types de séquences de rajout a été réalisée sur le banc du LCF. La cible a été injectée à une concentration de 50 pM, suivie de l'injection

d'AuNPs issues du même lot et fonctionnalisées simultanément, mais portant soit des rajouts ADN, soit des rajouts LNA. Ces AuNPs ont été injectées à la même concentration de 10 pM dans la chambre de fluïdique. Les courbes de cinétiques correspondant à ces deux amplifications sont représentées sur le graphique de la figure IV.14.

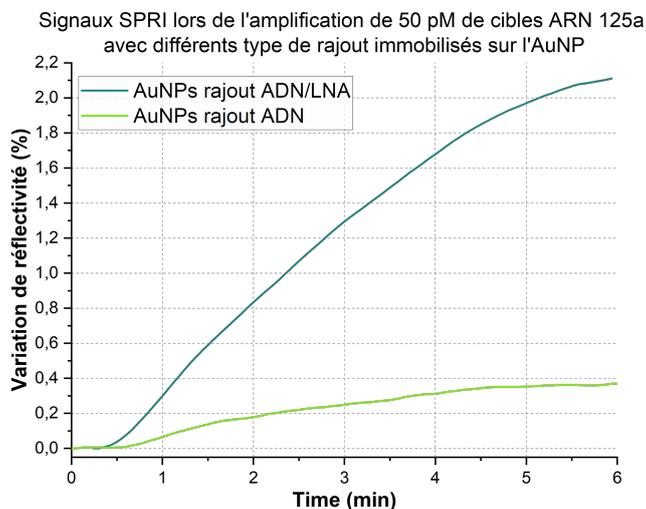


FIGURE IV.14 – Variation de réflectivité lors d'injections de même concentration d'AuNPs mais fonctionnalisées avec des rajouts différents : séquence ADN ou séquence hybride ADN/LNA.

Ce graphique montre clairement que l'incorporation de bases LNA dans le rajout immobilisé sur les AuNPs améliore très significativement l'affinité d'hybridation avec la cible. Les coefficients directeurs de la partie linéaire de ces deux courbes de cinétiques ont été déterminés, avec des valeurs de $C_{rajoutADN}=0,15$ %/min et $C_{rajoutLNA}=0,60$ %/min. Cette comparaison confirme que l'insertion de bases modifiées dans la séquence de rajout permet d'augmenter l'amplification des AuNPs d'un facteur quatre, soit une constante d'association k_2 augmentée d'un facteur 4 également.

IV.2.2.4. Problèmes de contamination aux très faibles concentrations

Malheureusement, aucune autre expérience comparative n'a pu être menée. Nous nous sommes heurtés, que ce soit au LCF ou au LN2, à des problèmes de contamination par les miARNs, suite aux injections de cibles miARNs à fortes concentrations (> 1 nM) lors des expériences décrites plus haut de comparaison des sondes ADN et LNA.

Cette contamination se manifeste par un signal important sur les plots de sondes 125a lors de l'injection d'AuNPs en début d'expérience alors qu'aucune cible 125a n'a été injectée précédemment (courbe rose sur la figure IV.15). Cette contamination n'était pas observée sur aucun des deux bancs SPRI lors des premiers essais réalisés à faibles concentrations (courbe orange sur la figure IV.15). Il est important de noter que ce signal de contamination en début d'expérience est parfaitement spécifique : il n'est observé que sur les plots 125a. C'est donc un phénomène distinct du signal non spécifique discuté plus haut. Ce problème est surprenant, car a priori, l'ARN est connu pour être très fragile et rapidement dégradé par les ARNases présentent dans l'environnement. Toutefois, dans notre cas, il s'agit de miARN qui sont peut-être plus stables grâce à leur faible nombre de bases [216, 217]. À noter que malgré une ré-évaluation

complète de nos protocoles, nous n'avons pas identifié d'erreurs évidentes dans la préparation des solutions ou des échantillons qui pourrait expliquer cette contamination.

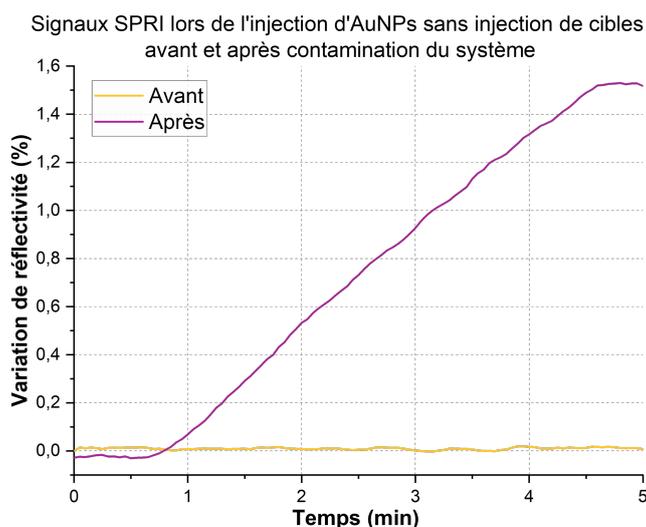


FIGURE IV.15 – Comparaison du signal de contamination mesuré lors de l'injection d'une même concentration d'AuNPs fonctionnalisées, sans aucune injection préalable de cibles miARNs, avant et après la contamination du système SPRI.

La chambre et le système de fluide du banc au LCF sont relativement faciles à démonter. En revanche, sur le banc Horiba, ces éléments sont liés au système de thermorégulation, ce qui complique considérablement le démontage. Pour éviter de devoir tout démonter après chaque expérience, plusieurs stratégies ont été testées afin de décontaminer le système de fluide du Horiba. Dans un premier temps, des solutions de nettoyage classiques pour des systèmes SPRI ont été employées. L'utilisation de détergents comme le SDS a été tentée pour nettoyer les tuyaux, mais cela s'est avéré insuffisant pour éliminer la contamination. Ensuite, des solutions acides et basiques ont été intégrées au protocole de nettoyage. Divers acides, tels que l'acide chlorhydrique à 100 mM, l'acide acétique à 30 %, ou encore l'acide uréique à 50 mM, ont été injectés dans les tuyaux et la chambre pendant plusieurs heures, voire une nuit complète, mais sans succès. Pour la solution basique, de l'hydroxyde de sodium à une concentration de 100 mM a également été testé sur plusieurs heures, mais là encore, sans succès.

Notre dernier recours a été d'utiliser de l'ARNase. Cependant, si les acides et les bases changent le pH et donc les interactions électrostatiques dans le parcours du fluide, pouvant ainsi décrocher l'ARN, l'ARNase a un effet de décomposition de l'ARN, il faut donc être sûr de l'enlever complètement afin de pouvoir réaliser de nouvelles expériences sans risquer les solutions de cibles injectées.

Une solution à 10% en concentration a été envoyée dans le système de fluide pendant une nuit avec un très faible débit pour maximiser les interactions. Cette méthode a donné le résultat le plus flagrant avec une diminution du signal d'un facteur 5, mais n'enlevant pas cette contamination complètement comme le montre les courbes de la figure IV.16 ci-dessus.

Cette dernière partie sur l'amplification de cibles ADN ou ARN en sandwich par des AuNPs a permis de confirmer la méthode d'amplification et le modèle théorique présenté précédemment. Dans le cadre de la détection de miARNs, nous avons réussi à améliorer la LOD d'un facteur jusqu'à 200. Toutefois, ce gain reste limité par le compromis entre la concentration d'AuNPs

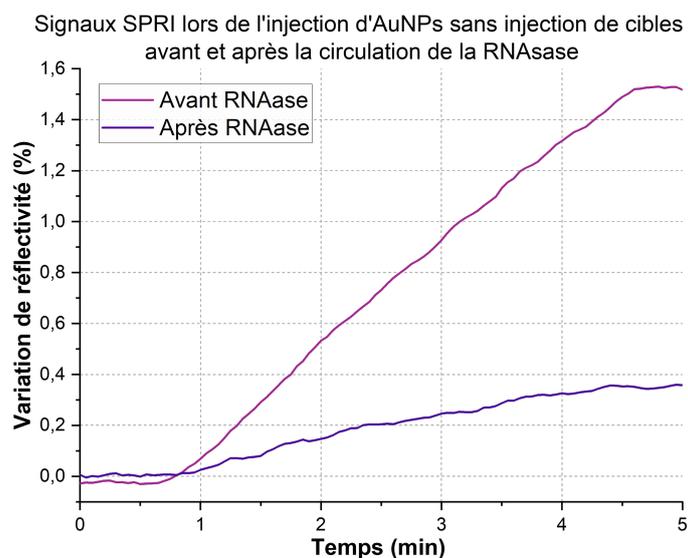


FIGURE IV.16 – Graphique de la variation de réflectivité lors d'injections de même concentration d'AuNPs fonctionnalisées avant et après la circulation de RNase dans le système de fluide du système SPRI.

injectée et le signal non spécifique généré, affectant négativement le rapport signal/bruit. Également, l'ajout de bases LNA dans la séquence sur l'AuNP permet d'augmenter la constante d'association avec la cible miARN, offrant un gain supplémentaire d'un facteur quatre dans l'étape d'amplification. Cependant, aucune série de mesures n'a pu valider ce résultat préliminaire en raison d'une contamination des systèmes SPRI.

Suite à l'optimisation de la spécificité de la détection, ce dernier chapitre présente les résultats expérimentaux pour la détection de cibles en faibles concentrations. Dans un premier temps, une preuve de concept de l'amplification par sandwich est réalisée avec de la streptavidine, permettant de valider le modèle de prédiction du facteur d'amplification. Ensuite, les AuNPs sont utilisées en hybridation directe et leur pouvoir amplificateur déterminé. Enfin, elles sont intégrées dans le sandwich et permettent une amplification de plus de deux ordres de grandeur pour la détection des miARNs 125a, avec une concentration minimale détectable de quelques picomolaires. Toutefois, cette méthode est actuellement limitée par le signal non spécifique des AuNPs lors de leur injection. L'atteinte de l'objectif d'une LOD autour de la centaine de femtomolaires semble néanmoins réalisable grâce à une meilleure passivation, qui permettrait de réduire ce signal non spécifique et de revenir à un régime linéaire où le bruit instrumental devient la limite principale.

Chapitre V

Perspectives

V.1	Amplification du signal par nanostructuration de la biopuce	138
V.1.1	Simulation du champ plasmonique sur une biopuce nanostructurée	138
V.1.2	Fabrication et caractérisation des biopuces nanostructurées.	139
V.1.3	Modification de la couche d'accroche	141
V.2	Hybridation photo-réversible du double brin	142
V.3	Récupération des biopuces par électrochimie	143

Plusieurs recherches parallèles ont été menées au cours de cette thèse. Bien qu'elles n'aient pas complètement abouti, des résultats préliminaires sont présentés dans ce chapitre en tant que perspectives du projet. Tout d'abord, dans le chapitre de l'état de l'art, l'amplification du signal SPR par structuration de la biopuce a été mentionnée comme une méthode prometteuse. Plusieurs essais ont été effectués et sont présentés dans la première partie de ce chapitre. Ensuite, une méthode photochimique est décrite permettant de déshybrider les duplexes sonde-cible indépendamment de la séquence analysée. Enfin, un processus d'électrochimie a été développé pour nettoyer les biopuces SPRI de leur chimie de surface, permettant ainsi de réutiliser les échantillons, dans le but de réduire les déchets et les coûts associés à leur fabrication.

V.1. Amplification du signal par nanostructuration de la biopuce

L'amplification du signal SPRI par augmentation de l'indice dans le milieu d'analyse, par la méthode sandwich présentée dans le chapitre précédent, était l'une des approches sélectionnées. En parallèle, une amplification du signal par nanostructuration de la couche d'or de la biopuce a également été explorée. Des simulations ont été menées pour déterminer la géométrie optimale, suivies d'essais de fabrication afin de tester cette approche.

V.1.1. Simulation du champ plasmonique sur une biopuce nanostructurée

Avant d'entamer la fabrication des biopuces nanostructurées, il est essentiel de simuler la réponse plasmonique des échantillons en fonction de différentes géométries afin d'identifier les configurations les plus prometteuses. Cela implique, dans un premier temps, de réaliser des simulations de nappes angulo-spectrales pour vérifier que les structures résonnent dans les plages adéquates de longueurs d'onde et d'angles.

Sur du verre SF11, l'empilement des couches est le suivant : un film de 30 nm d'or est recouvert de 30 nm de silice qui est gravé selon des motifs nanométriques. Les cavités résultantes sont ensuite remplies par une couche supplémentaire de 30 nm d'or, créant ainsi des structures d'or enterrées dans la silice, avec uniquement leur surface exposée pour la fonctionnalisation.

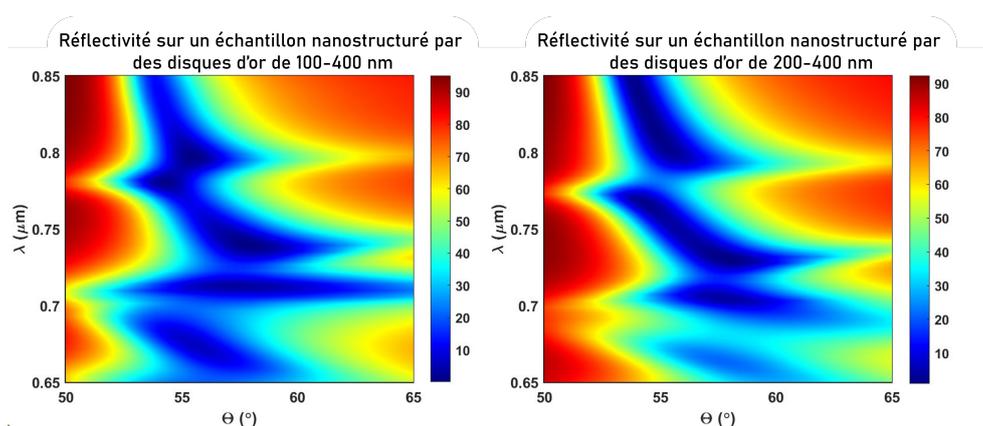


FIGURE V.1 – Simulations des nappes angulo-spectrales pour des échantillons nanostructurés de disques d'or enterrés dans de la silice de 30 nm d'épaisseur sur un film de 30 nm d'or. À gauche : géométrie des cylindres de 100 nm de diamètre et 400 nm de période. À droite : géométrie des cylindres de 200 nm de diamètre et 400 nm de période.

Deux géométries ont été identifiées comme les plus prometteuses dans cette configuration :

des disques d'or de 100 nm ou 200 nm de diamètre, espacés de 400 nm sur le substrat d'or. La simulation de ces deux nappes grâce au code SimPhotonics du LCF (<https://hal.science/hal-04093350>) est présentée sur la figure V.1 ci-dessous.

Ces nappes sont très différentes de celle présentée pour un échantillon d'or plan dans le chapitre II de ce manuscrit à la figure II.7. Des divisions de la résonance sont visibles sur les nappes d'échantillons nanostructurés contrairement à une résonance continue sur un échantillon d'or plan. Ce phénomène s'explique par l'interaction des résonances localisées des nanostructures avec celle du plasmon propagatif du film d'or. Le couplage entre ces modes génère des phénomènes d'anti-croisement dont la position dépend de la taille des nanostructures. À partir de ces nappes, on peut déterminer quels seront les angles et longueurs d'ondes les plus propices pour réaliser la détection par SPRI en se plaçant dans des résonances étroites. Ensuite, le profil de l'intensité du champ plasmonique par rapport au champ incident, équivalent au facteur d'amplification du signal grâce aux nanostructures, peut être simulé pour un angle et une longueur d'onde d'excitation autour de la nanostructure comme sur les représentations de la figure V.2.

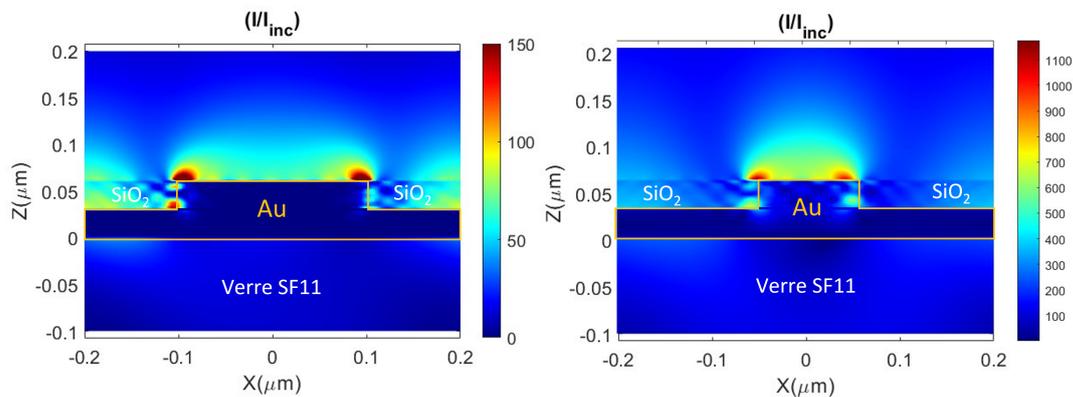


FIGURE V.2 – Simulations de l'amplification du champ évanescent autour de la nanostructure d'or enterrées dans la silice pour une longueur d'onde de 750 nm et un angle interne de 56°. À gauche : géométrie des cylindres de 200 nm de diamètre et 400 nm de période. À droite : géométrie des cylindres de 100 nm de diamètre et 400 nm de période.

Cette figure montre l'amplification simulée du champ évanescent autour de nanostructures avec les deux géométries pour une longueur d'onde de 750 nm et un angle de 56°. Cette comparaison montre que le champ évanescent est bien exalté sur le dessus des nanostructures là où les sondes sont immobilisées et les interactions biologiques ont lieu. Une amplification entre un à deux ordres de grandeur est attendue suivant ces deux géométries de cylindres.

V.1.2. Fabrication et caractérisation des biopuces nanostructurées

La fabrication des biopuces nanostructurées est réalisée dans les salles blanches du 3IT à Sherbrooke. Le protocole détaillé de fabrication, utilisant la méthode du "lift-off", est illustré dans la figure V.3 ci-dessous.

Le processus commence par le dépôt sous vide des différentes couches. Étant donné que l'or n'adhère pas naturellement au verre ou à la silice (SiO_2), une très fine couche de titane est intercalée entre ces matériaux afin d'assurer une bonne adhérence entre les couches de cet empilement. Une couche de résine est déposée puis exposée à un faisceau d'électrons afin de

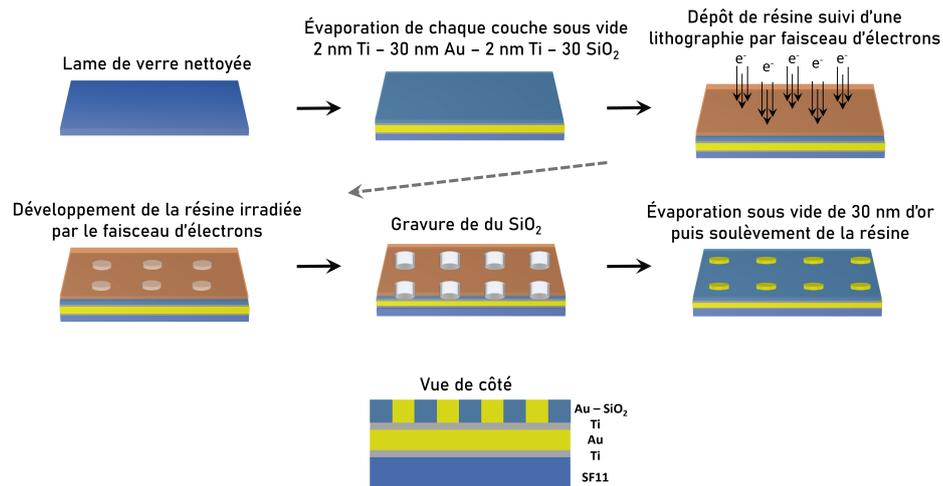


FIGURE V.3 – Représentation schématique des étapes de fabrication des biopuces nanostructurées avec des cylindres d'or enterrés dans de la silice par méthode "lift-off".

définir les motifs nanométriques souhaités. Les zones exposées de la résine sont ensuite dissoutes, créant des cavités dans lesquelles de l'or est déposé, recouvrant également le reste de l'échantillon. Enfin, la résine restante est retirée par dissolution, emportant avec elle l'or déposé en dehors des cavités, laissant ainsi un échantillon prêt à être fonctionnalisé.

Les échantillons fabriqués par ce procédé ont été imagés au MEB afin de valider les formes et les tailles des nanostructures ainsi que la répétabilité du motif. Ces images sont présentées dans la figure V.4 suivante. L'image (C) de plus petit grossissement confirme que la géométrie du réseau entre les nanostructures est bien respectée et les images (A) et (B) montrent que la taille des nanostructures est aussi celle attendue. Cependant, on voit sur l'image (B) très clairement des billes d'or sur les bords supérieurs des cylindres qui peuvent perturber la réponse plasmonique des nanostructures.

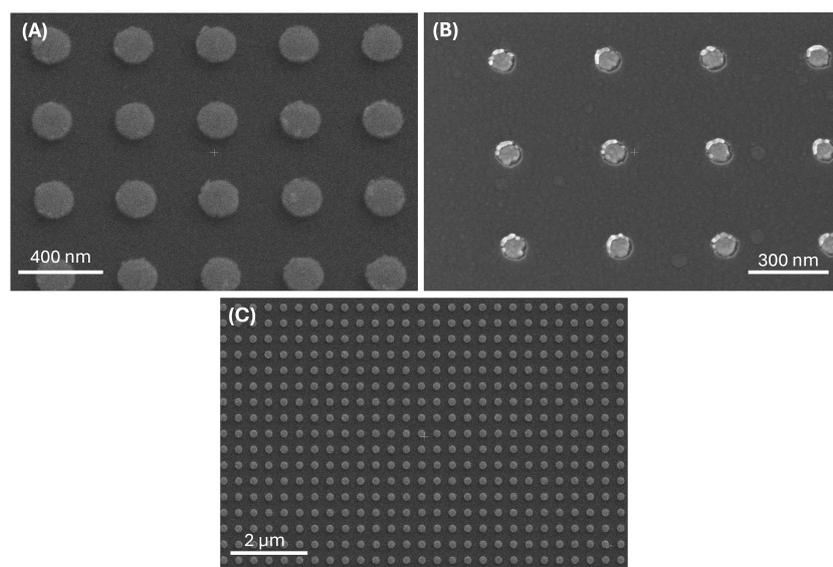


FIGURE V.4 – Images au microscope électronique à balayage des échantillons nanostructurés. (A) et (C) Images à différents grossissements de cylindres de 200 nm de diamètre par 400 nm de distance. (B) Cylindres de 100 nm de diamètre par 400 nm de distance.

L'échantillon avec les structures cylindriques de 200 nm de diamètre et 400 nm de distance a été rapporté au LCF à Paris Saclay afin d'être imagé par SPRI et de réaliser une nappe angulo-spectrale expérimentale afin d'analyser la réponse plasmonique de ces structures. Le résultat de cette mesure expérimentale est présenté sur la figure V.5. Malheureusement cette nappe angulo-spectrale expérimentale montre des résonances très peu marquées et larges comparées à la nappe théorique de la figure V.1 ce qui rend son utilisation pour de la biodétection difficile.

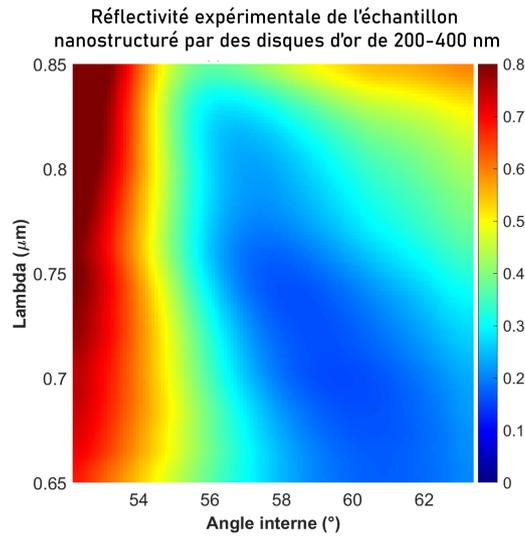


FIGURE V.5 – Nappe angulo-spectrale expérimentale en configuration de Kretschmann sur un échantillon en SF11 nanostructuré par des cylindres d'or de 200 nm de diamètre séparés par 400 nm.

Néanmoins, cet échantillon disposait d'une surface plane en or de 60 nm, exploitable pour un premier essai de chimie de surface suivant la chimie cystéamine, dans le but de vérifier la faisabilité de la fonctionnalisation sur un échantillon nanostructuré. Les résultats obtenus montrent que l'or a bien été fonctionnalisé dans les zones nanostructurées, mais également sur la silice. Or, l'objectif étant de capturer les cibles uniquement sur les zones de fort champ, c'est-à-dire le dessus des cylindres d'or, il est impératif d'éviter la fonctionnalisation des parties recouvertes de silice. Cette fonctionnalisation indifférenciée entre l'or et la silice est principalement due à l'utilisation de la streptavidine, qui se fixe de manière non spécifique, bien que moins intensément, sur la silice et pas uniquement de façon covalente sur le PDC fixé à l'or. Il sera donc nécessaire dans le futur de passiver correctement la surface de silice grâce des PEG munis d'un groupement de silane de grande affinité avec la silice.

V.1.3. Modification de la couche d'accroche

La partie précédente a montré que nous étions capables de fabriquer des biopuces nanostructurées selon les paramètres géométriques attendus, mais que les résultats expérimentaux restaient encore éloignés des simulations. Une des causes possibles de cette différence est l'utilisation du titane comme couche d'accroche. Bien que ce métal soit ajouté en très faible épaisseur, il absorbe une partie de l'énergie lumineuse incidente. Des simulations ont déjà montré que la première couche d'accroche, si son épaisseur est de 5 nm ou moins, a un impact faible

sur la résonance plasmonique d'une couche d'or plane. Cependant, le modèle utilisé dans la partie précédente pour simuler la réponse des biopuces nanostructurées ne prend pas en compte la deuxième couche ajoutée sur l'or avant le dépôt de silice. De nouvelles simulations ont été réalisées en prenant en compte cette seconde couche d'accroche avec comme matériau du titane ou diélectrique, l' Al_2O_3 . Les résultats de ces simulations pour les différents empilements sont comparés au cas idéal sans couche d'accroche dans la figure V.6.

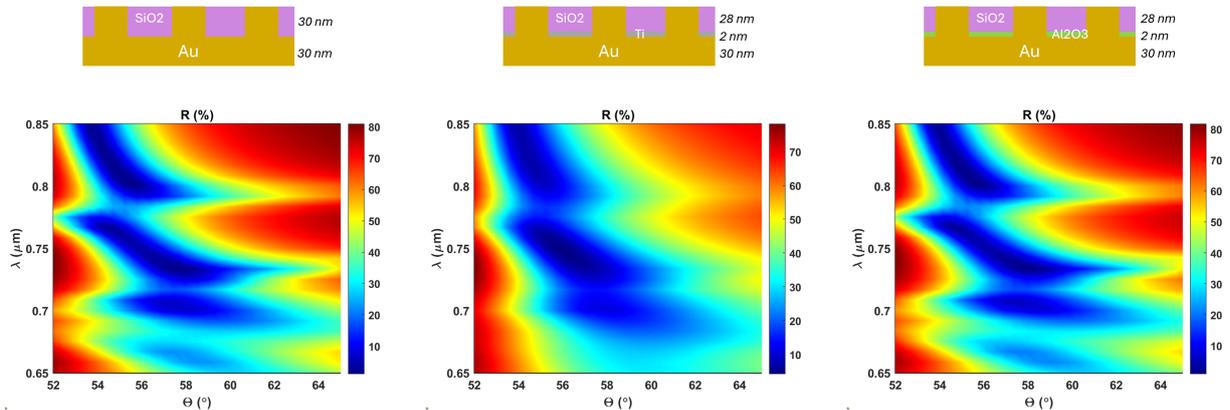


FIGURE V.6 – Nappes angulo-spectrales simulées pour trois empilements différents de matériaux pour réaliser les biopuces nanostructurées.

Ces nappes angulo-spectrales théoriques confirment que l'ajout d'une couche de titane, même aussi fine que 2 nm, élargit considérablement la résonance, rappelant ainsi la nappe expérimentale présentée dans la partie précédente. En revanche, le remplacement de cette couche d'accroche métallique par un diélectrique tel que l' Al_2O_3 permet de maintenir une résonance similaire, tout en restant étroite, sans provoquer de décalage angulaire ou spectral.

Des premiers échantillons utilisant l' Al_2O_3 comme couche d'accroche sont en cours de fabrication dans les salles blanches du 3IT à Sherbrooke suivant le même procédé de fabrication par "lift-off".

V.2. Hybridation photo-réversible du double brin

Pouvoir effectuer plusieurs injections sur une même biopuce est crucial, en particulier dans un cadre de recherche expérimentale où la préparation des échantillons requiert près de deux jours de travail. La déshybridation de deux brins d'oligonucléotides complémentaires dépend principalement de la composition en bases de la séquence, et donc de la température de dénaturation (T_m) du duplexe. Plus la T_m est élevée, plus il sera difficile de séparer les brins une fois une fois formé. Différentes méthodes sont couramment utilisées pour déshybrider les brins complémentaires, telles que la variation du pH, la diminution de la salinité, ou encore l'augmentation de la température. Toutefois, les séquences ciblées dans le cadre du projet Epi Storm n'ont jamais pu être efficacement séparées, même en optimisant ces paramètres à leurs limites expérimentales. Lorsque la température est trop élevée, des bulles se forment, et la chimie de surface se dégrade plus rapidement. Un phénomène similaire de dégradation est observé avec l'augmentation du pH. Une méthode différente ne nécessitant pas le changement du milieu d'analyse a été recherchée afin d'offrir une meilleure régénération de la biopuce.

Dans la littérature, des nombreux travaux sur la séparation de duplexes d'oligonucléotides grâce à une méthode optique ont été explorés au début des années 2000. Cette méthode est basée sur l'insertion de molécules d'azobenzène dans le squelette phosphate d'un des deux brins complémentaires. Cette molécule constituée de deux cycles benzène relié par une double liaison

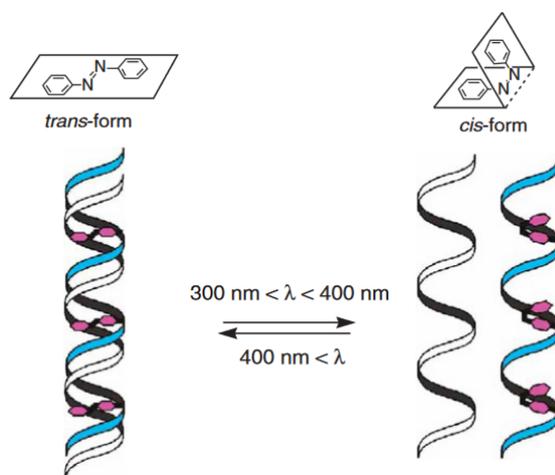


FIGURE V.7 – Représentation schématique du changement de conformation de la molécule d'azobenzène et son impact sur l'hybridation de brins d'ADN complémentaires.

azote (figure V.7) à la particularité de changer de conformation en fonction de la longueur d'onde à laquelle ils sont exposés. Lorsqu'ils sont illuminés dans le visible ($\lambda > 400 \text{ nm}$), ils adoptent la conformation N-trans, puis passent en conformation N-cis pour des longueurs d'onde inférieures à 400 nm [218]. Ces molécules une fois intégrées dans le brin d'ADN permettent de réaliser un "interrupteur optique" qui, suivant leur conformation, favorise ou défavorise la capture de la molécule d'intérêt comme illustré sur la figure V.7. Cette méthode optique permettrait de moduler la réponse spécifique du biocapteur et ainsi d'améliorer la limite de détection tout en étant indépendante du milieu d'analyse.

Dans la littérature, les azobenzènes ont initialement été utilisés pour suivre des hybridations photo-réversibles en solution [218], avec des adaptations à différentes longueurs d'onde d'excitation en modifiant les groupes fonctionnels entourant l'azobenzène [219]. Plus récemment, cette approche a également été appliquée en surface pour ajuster l'angle entre deux brins d'ADN recouverts de nanoparticules d'or, permettant ainsi d'étudier la réponse plasmonique du système en fonction de sa configuration [220].

Des molécules d'azobenzène intégrées dans la sonde permettraient la déshybridation du duplex avec la cible et, dans le cadre de la méthode sandwich, pour détacher l'AuNP. Cette technique permettrait de quantifier le signal SPRI correspondant au détachement des AuNPs, en éliminant ainsi l'influence du signal non spécifique généré lors de leur injection, en se concentrant uniquement sur la variation négative observée au moment de leur libération directement proportionnel à la concentration de cibles injectées.

V.3. Récupération des biopuces par électrochimie

Les biopuces utilisées lors des expériences de biodétection SPRI sont actuellement à usage unique. Une fois l'expérience terminée, elles sont mises de côté avant d'être jetées, bien que le

recyclage de ces substrats de verre recouverts de différentes couches de matériaux reste encore à déterminer. Dans une démarche visant à réduire les coûts et l'impact des déchets, notamment pour les biopuces nanostructurées, une méthode de nettoyage permettant de conserver les couches métalliques tout en retirant la chimie de surface a été recherchée.

Plusieurs techniques sont référencées dans la littérature pour décrocher les thiols d'une surface d'or. Étant donné la robustesse de cette liaison, il est nécessaire d'utiliser des plasmas d'hydrogène ou d'oxygène à haute puissance [221]. Cependant, ces procédés ont pour inconvénient de détériorer la rugosité de surface de l'or, ce qui compromet la prochaine fonctionnalisation de surface qui est très dépendante de la rugosité de l'or.

Une méthode alternative par électrochimie a été développée pour retirer la chimie de surface des biopuces SPRI. Couramment utilisée sur des électrodes d'or de petite taille, cette technique implique deux grandes étapes : d'abord, un nettoyage dans une solution basique d'hydroxyde de sodium (NaOH), suivi d'une oxydoréduction de la couche d'or dans une solution d'acide sulfurique (H_2SO_4). Le bain en solution basique permet la désorption des thiols, suivie en temps réel par voltamétrie cyclique. Ensuite, le bain acide provoque l'oxydoréduction des premières couches atomiques d'or, également surveillée par voltamétrie cyclique. Le pic d'oxydation aide à déterminer la surface active de l'échantillon et à évaluer sa dégradation progressive au fil des cycles de nettoyage. Cette technique s'est prouvée très efficace sur des électrodes d'or, mais à notre connaissance, n'a jamais été testée sur des couches nanométriques d'or.

Des premiers tests ont été effectués au LN2 à Sherbrooke sur des biopuces SPRI déjà utilisées, dans le but de vérifier la compatibilité de la méthode électrochimique avec ce type d'échantillons. La solution de NaOH, qui n'endommage pas la surface d'or, a été maintenue à une concentration de 0,5 M. En revanche, la solution acide d' H_2SO_4 , qui provoquait des soulèvements de l'or, a vu sa concentration réduite d'un facteur dix, passant à 0,05 M, afin de procéder à l'oxydoréduction de la couche d'or sans endommager l'échantillon. Les graphiques obtenus par voltamétrie cyclique lors de ces deux cycles de nettoyage sont représentés sur la figure V.8 suivante.

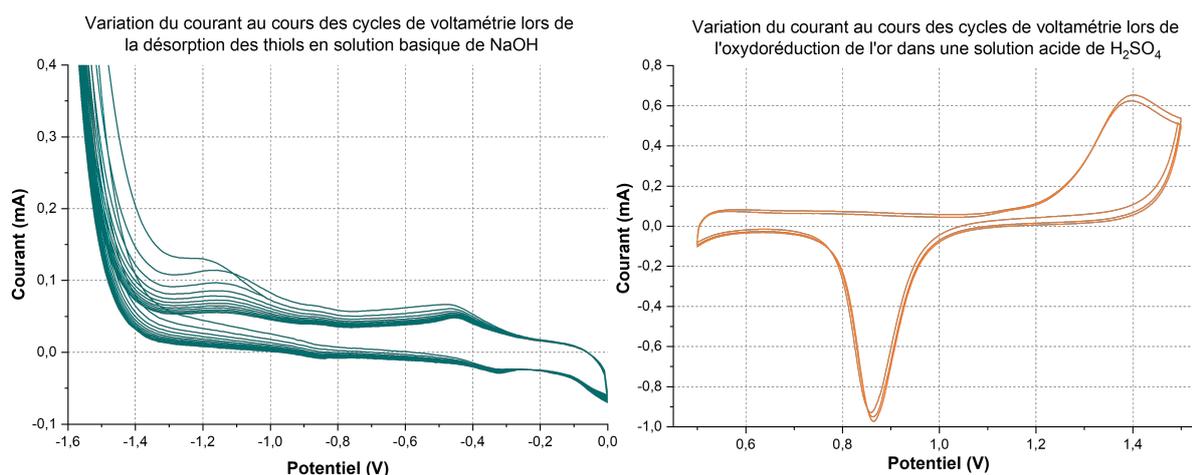


FIGURE V.8 – Graphique de variation du courant lors de cycles de voltamétrie pour le nettoyage électrochimique. À gauche : voltamétrie cyclique lors de l'étape du nettoyage basique. À droite : voltamétrie cyclique lors de l'étape du nettoyage acide.

Le graphique de gauche illustre la variation du courant au fur et à mesure des cycles de voltamétrie dans la solution basique. On observe un pic autour de -1.1 V, caractéristique de la

présence de thiols sur le substrat. Ce pic diminue progressivement à mesure que le nombre de cycles augmente, ce qui confirme la désorption progressive des molécules de thiols de la surface d'or. Il faut effectuer au moins 300 cycles de voltamétrie pour s'assurer que la majorité des thiols sont détachés du substrat. Le second graphique de droite montre la variation du courant pendant les cycles de voltamétrie dans la solution d'acide. Deux pics caractéristiques y apparaissent : le premier à 1.4 V correspond à l'oxydation de la couche d'or, tandis que le second, à -0.85 V, représente sa réduction successive. L'aire sous la courbe du pic d'oxydation est directement liée à la surface active de l'échantillon, ce qui permet de surveiller la dégradation de la surface d'or au fil des cycles de nettoyage.

Ce nettoyage électrochimique a été réalisé avec succès sur une dizaine d'échantillons, sans dégradation visible, ni à l'œil nu ni au microscope électronique à balayage (MEB). La rugosité moyenne (R_a), mesurée par microscopie à force atomique (AFM), est restée inférieure à 1 nm. De plus, une analyse par spectroscopie à dispersion d'énergie (EDX) au MEB a confirmé l'absence d'atomes de soufre, et donc de thiols, sur la surface d'or. Les essais se sont arrêtés à ce stade, mais il serait nécessaire de vérifier si les échantillons peuvent être à nouveau fonctionnalisés et si les signaux d'hybridation obtenus par mesure SPRI ne sont pas réduits par rapport à leur première utilisation. L'objectif final est de déterminer si les biopuces SPRI peuvent être recyclées grâce à ce protocole et combien de cycles de nettoyage électrochimique elles peuvent subir avant d'être trop endommagées pour une réutilisation.

Conclusion générale et perspectives

Ce manuscrit décrit les travaux de nature multidisciplinaire menés dans le cadre de cette thèse, visant à développer un biocapteur plasmonique pour la détection de miARNs en très faibles concentrations. Ce doctorat s'inscrit dans le cadre du projet québécois Epi Storm lié au don d'organes, où les avancées scientifiques et technologiques des différentes équipes se rejoignent pour améliorer le suivi et la gestion des donneurs en mort cérébrale, pour contribuer à une meilleure qualité des greffons pour les receveurs. Dans ce contexte, le développement du biocapteur devait répondre à plusieurs critères essentiels. Tout d'abord, il fallait permettre la détection quantitative, spécifique et simultanée de plusieurs séquences de miARNs prédéfinies par l'équipe médicale. De plus, les concentrations visées de ces miARNs sont extrêmement basses, avoisinant la centaine de femtomolaires, et la détection devait s'effectuer dans des échantillons biologiques complexes comme le plasma sanguin. Les analyses devaient également être rapides, avec un délai maximum d'une heure, afin de suivre en temps quasi-réel la réaction inflammatoire chez les patients en état de mort cérébrale. Il était également primordial de concevoir un dispositif pouvant être directement implanté au chevet du patient. Cela implique que le biocapteur pourra être à la fois miniaturisable et simple d'utilisation par les équipes médicales.

Le premier chapitre a commencé par dresser un vaste état de l'art des différentes méthodes de détection des oligonucléotides afin de justifier le choix de l'imagerie par résonance plasmonique de surface (SPRI) pour répondre aux critères évoqués précédemment. Cette technique de biodétection, ainsi que les principes physiques sur lesquels elle est basée, ont été détaillés dans une seconde partie. La SPRI nécessitant une étape de fonctionnalisation pour la rendre spécifique, divers protocoles de chimie de surface sur des substrats d'or ont été explorés, tant pour des milieux contrôlés que complexes. Afin de dépasser la limite de détection intrinsèque de cette méthode, plusieurs stratégies d'amplification du signal SPRI ont été examinées et comparées pour la détection de miARNs. L'utilisation de nanoparticules d'or dans une approche d'amplification par sandwich a été identifiée comme la plus prometteuse pour les ordres de grandeur d'amplification visés. Le chapitre se termine donc par une revue bibliographique sur la fabrication et la fonctionnalisation de ces nanoparticules. Ce chapitre permet de confirmer les différentes stratégies qui seront utilisées pour réaliser le biocapteur en commençant par le choix de la méthode de détection en passant par son optimisation pour la capture des cibles pour finir par établir une stratégie d'amplification du signal le tout compatible avec les objectifs du projet.

Le chapitre deux aborde en détails la partie optique et instrumentale du biocapteur. La première section présente les composants essentiels à la réalisation d'un système SPRI, en mettant en avant les éléments critiques pour optimiser la détection. Étant donné que la thèse a été réalisée en cotutelle, la deuxième partie de ce chapitre est consacrée à la description des deux bancs SPRI utilisés au sein des laboratoires partenaires. Ensuite, une comparaison de leurs performances respectives en termes de bruit et de limite de détection est réalisée permettant de conclure que ces appareils sont semblables et que les résultats expérimentaux obtenus seront comparables. Pour finir, la dernière partie du chapitre présente le traitement des images et le principe des mesures de

cinétique lors des interactions entre le biorécepteur et l'analyte en SPRI. Un modèle de cinétique du premier ordre est présenté afin de permettre d'analyser facilement les résultats expérimentaux en se concentrant sur l'extraction des pentes des courbes de cinétiques. Ce deuxième chapitre permet de détailler le fonctionnement de la SPRI en exposant les différents paramètres cruciaux pour la biodétection, tout en définissant les limites inhérentes à cette méthode.

La détection par SPRI n'étant pas intrinsèquement spécifique, une étape de fonctionnalisation de la surface d'or de la biopuce est nécessaire. Le chapitre trois présente tout d'abord deux protocoles de chimie de surface couramment utilisés au LCF à Paris Saclay, qui ont été combinés pour développer un nouveau protocole appelé chimie mixte. Cette chimie conserve la rigidité de la chimie cystéamine, ce qui permet d'orienter les biorécepteurs de manière optimale afin d'améliorer l'hybridation avec la cible. Elle intègre également une SAM à deux thiols issue de la chimie MUA/MCH, permettant une meilleure isolation de la surface d'or en évitant de laisser des groupements fonctionnels non utilisés. Ces trois protocoles ont finalement été comparés en termes de performances SPRI lors de la biodétection de brins simples d'ADN. La chimie mixte avec un ratio équivalent de cystéamine et MCH s'est révélée être la plus performante offrant le LOD la plus basse tout en maintenant une couverture maximale des sondes et un niveau de signal non spécifique similaire aux autres protocoles. Les cibles étant des miARNs, la deuxième partie de ce chapitre est consacrée à l'intégration de bases LNA dans la séquence de la sonde. Ces bases modifiées, offrant une meilleure affinité avec les miARNs, ont permis une augmentation significative de l'affinité du complexe, entraînant une réduction de la LOD jusqu'à un facteur deux selon la séquence cible étudiée. Ce chapitre se conclut par une section sur la fabrication des AuNPs dans le cadre d'une amplification en sandwich autour des miARNs. Tout d'abord, le protocole de synthèse en une étape, à température ambiante, est décrit. La reproductibilité des AuNPs obtenues est démontrée à travers différentes synthèses réalisées dans plusieurs laboratoires, ainsi que leur stabilité après centrifugation qui a été évaluée sur plusieurs mois. La taille des AuNPs a ensuite été estimée par un modèle de Mie puis confirmée par des images MEB. Enfin, le protocole de fonctionnalisation des AuNPs, développé pour le sandwich et assurant leur solubilité en solution saline, est détaillé. Ce chapitre fournit les outils nécessaires pour une détection spécifique et optimale des miARNs, tant au niveau de leur fixation sur la biopuce que durant l'étape d'amplification.

Après l'optimisation de l'instrumentation et de la spécificité de la détection, le chapitre quatre présente les résultats expérimentaux liés à l'amplification du signal SPRI par la méthode sandwich. La première partie repose sur une preuve de concept utilisant un complexe streptavidine/oligonucléotides pour l'amplification. Cette preuve de principe permet d'établir et de valider un modèle prédictif du facteur d'amplification en fonction de la molécule sandwich employée. Les résultats expérimentaux montrent une amplification d'un ordre de grandeur conforme au modèle théorique. Dans une deuxième partie, les AuNPs sont utilisées pour amplifier le signal. Elles sont d'abord utilisées en hybridation directe sur les sondes, afin d'évaluer leur potentiel amplificateur et de déterminer la concentration optimale de spotting, permettant une large gamme de détection sans risque d'encombrement stérique. Un facteur d'amplification prévu de trois à quatre ordres de grandeur a été confirmé expérimentalement. Ensuite, les AuNPs sont utilisées en sandwich avec des cibles ADN puis miARN. Les facteurs d'amplification obtenus, autour de deux ordres de grandeur, sont conformes aux prévisions théoriques, et permettent

d'atteindre une limite de détection de l'ordre du picomolaire pour le miARN 125a. Cependant, cette amplification demeure relativement faible par rapport aux attentes pour des particules de cette taille. Ce résultat s'explique par la faible concentration d'AuNPs injectée durant l'étape d'amplification, un facteur clé pour maximiser le signal, mais qui devient problématique en raison du signal non spécifique généré par les AuNPs lors de leur injection. Un autre facteur influençant l'amplification est la constante d'association lors de la deuxième interaction entre le miARN et la nanoparticule. Pour augmenter cette constante, des bases LNA ont été intégrées dans la séquence fonctionnalisée sur les AuNPs afin d'améliorer l'affinité avec la cible. Un premier essai de cette modification a montré une augmentation du signal par un facteur quatre. Cependant, aucune étude en concentration n'a pu être menée à bien en raison d'une contamination des systèmes par les miARNs, générant des signaux sur les zones fonctionnalisées avant même le début des injections de cibles. Plusieurs stratégies de décontamination ont été testées sans succès jusqu'à présent.

Ces travaux de thèse ont permis de réduire la limite de détection des miARNs du projet Epi Storm en SPRI jusqu'à quelques picomolaires grâce à l'optimisation de la capture des cibles et à l'utilisation d'un sandwich avec des AuNPs. Cependant, plusieurs points bloquants ont été identifiés. Le compromis entre la concentration des AuNPs et la réduction du signal non spécifique limite significativement la capacité d'amplification de cette méthode. Pour surmonter cet obstacle, il est nécessaire d'améliorer la passivation de la streptavidine, à la fois sur la surface de la biopuce et sur les nanoparticules. La réduction du signal non spécifique des AuNPs en dessous de la limite instrumentale permettrait de conserver une relation linéaire du signal SPRI en fonction de la concentration de cibles et d'atteindre l'objectif de la centaine de femtomolaire. Également, d'autres voies d'amplification ont été évoquées dans l'état de l'art, notamment l'utilisation de biopuce nanostructurée. Cette approche a été étudiée en parallèle dans cette thèse, avec des résultats préliminaires présentés en ???. Plusieurs lots de substrats nanostructurés ont été fabriqués par lift-off et caractérisés en SPRI. Cependant, une divergence notable a été observée entre les nappes angulo-spectrales théoriques et expérimentales des biopuces, due à l'utilisation du titane comme couche d'accroche, perturbant la propagation de la lumière et l'excitation des modes plasmoniques. Pour résoudre ce problème, des premiers échantillons utilisant une couche d'accroche diélectrique en Al_2O_3 sont actuellement en cours de fabrication. Également, des tests de fonctionnalisation de biopuces nanostructurées ont révélé que la chimie mixte ne permettait pas d'obtenir une fonctionnalisation sélective entre l'or et la silice. Cette absence de différenciation est probablement encore due à l'utilisation de la streptavidine, qui a tendance à s'adsorber sur toutes les surfaces disponibles. Pour pallier à ce problème, il sera nécessaire de passiver la surface de silice à l'aide de silanes, afin d'éviter l'adsorption non spécifique de la streptavidine.

Un autre problème soulevé dans ce manuscrit est l'importante affinité des séquences cibles du projet Epi Storm, rendant difficile leur régénération et empêchant des mesures successives sur une large gamme de concentrations. Une stratégie prometteuse pour déshybrider le complexe de manière photochimique est détaillée dans la deuxième partie de l'???. Cette approche consiste à insérer des molécules d'azobenzène dans le squelette phosphate de la sonde ADN. L'azobenzène a la particularité de changer de conformation en fonction de la longueur d'onde d'irradiation choisie : en dessous de 400 nm, il se replie sur lui-même par isomérisation, provoquant la dissociation du complexe. Des oligonucléotides modifiés avec des azobenzènes suivant la séquence

WT ont été commandés, et une lampe UV est en cours d'installation sur le système de SPRI au LN2 de Sherbrooke pour commencer les essais de dés hybridation par UV.

Un autre objectif exploré parallèlement aux travaux principaux concerne le recyclage des biopuces SPRI. Actuellement, ces biopuces sont à usage unique : elles sont jetées après leur utilisation sur le banc SPRI. Toutefois, même si les quantités sont minimales, les substrats contiennent des métaux précieux et, dans le cas des échantillons nanostructurés, leur fabrication nécessite de nombreuses heures en salle blanche ainsi que l'utilisation d'équipements coûteux. Le recyclage de ces substrats, permettant de retirer la chimie de surface pour les réutiliser, représenterait un avantage environnemental et économique. Pour cela, un protocole de recyclage électrochimique, inspiré de celui utilisé pour des électrodes d'or cylindriques, est détaillé dans la troisième partie de l'???. Ce protocole permet de suivre en continu la désorption des thiols de la surface d'or et de vérifier la surface active de l'échantillon afin de s'assurer qu'elle n'a pas été endommagée. Cette méthode de recyclage a été optimisée pour fonctionner sur les couches nanométriques d'or des biopuces SPRI et validée sur une dizaine d'échantillons. Des essais de re-fonctionnalisation devront ensuite être réalisés sur ces substrats recyclés, et leur performance SPRI devra être évaluée.

Toutes ces perspectives ouvrent des voies prometteuses pour continuer à améliorer la sensibilité de la SPRI tout en intégrant des considérations environnementales et économiques.

Annexe A

Simulations suivant le modèle de Rouard

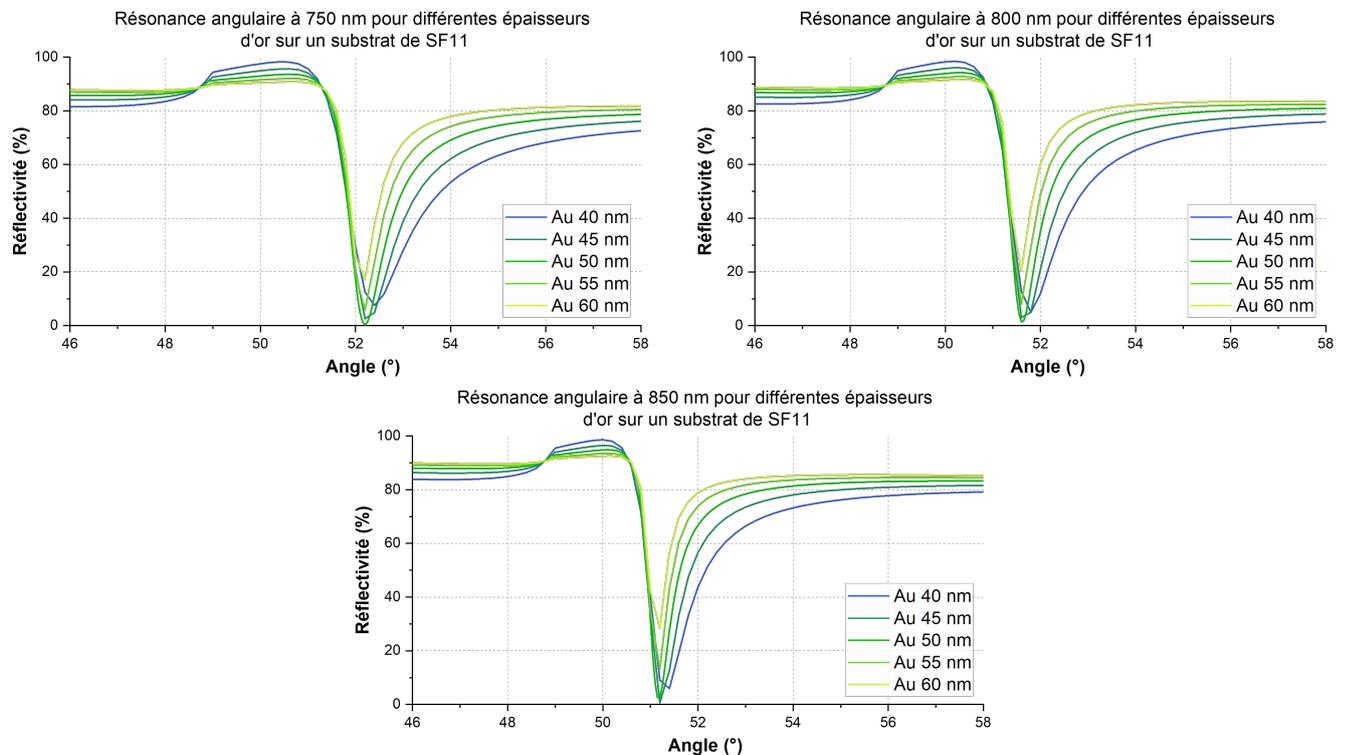


FIGURE A.1 – Simulation numérique suivant le modèle de Rouard [102] de la résonance angulaire d'un plasmon de surface pour une excitation à 750 nm, 800 nm et 850 nm et pour différentes épaisseurs d'or. La résonance a lieu en configuration de Kretschmann avec un prisme en verre SF11 ($n = 1,77$) recouvert de 2 nm de titane (couche d'accroche) avant la couche d'or (de 40 nm à 60 nm)

Ces différents graphiques montrent la résonance en fonction de l'épaisseur d'or sur la biopuce (entre 40 et 60 nm). Les trois graphiques sont simulés pour des conditions d'excitation en longueur d'onde différentes : 750 nm, 800 nm et 850 nm. Pour chacun de ces graphiques, la finesse de la résonance à mi-hauteur ainsi que sa valeur minimale sont tracées en fonction de la longueur d'onde sur le graphique A.2 suivant. Cette comparaison entre la finesse et le minimum de la résonance permet de confirmer qu'une épaisseur de 50 nm est l'épaisseur optimale pour travailler dans une gamme de longueur d'onde entre 750 nm et 850 nm.

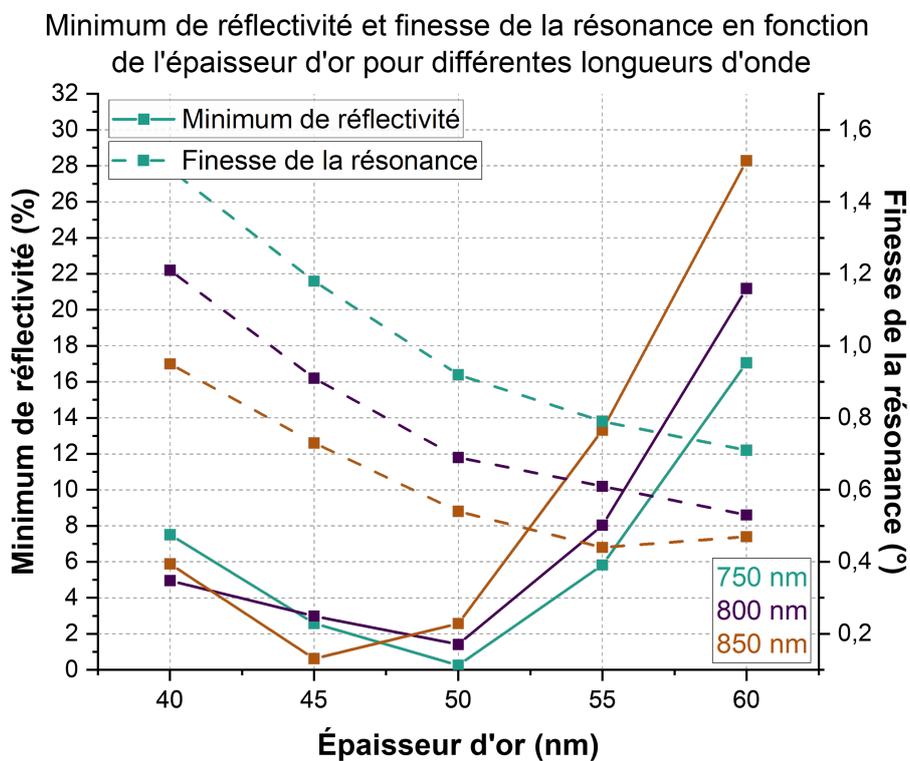


FIGURE A.2 – Finesse et valeur minimale de la résonance plasmonique pour différente longueur d'onde (750 nm, 800 nm, 850 nm) en fonction de l'épaisseur d'or.

Annexe B

Calcul des angles interne et externe

À partir de la loi de Snell-Descartes et de relations de trigonométrie, il est possible de retrouver la relation entre les angles d'incidence interne et externe de la lumière.

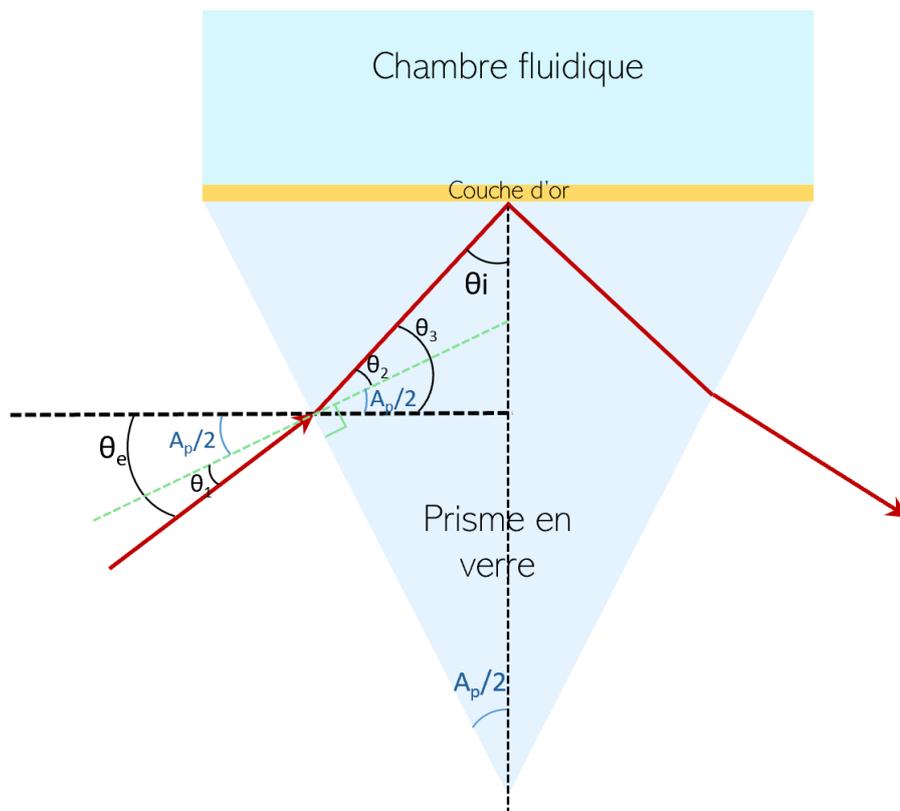


FIGURE B.1 – Figure représentant les différents angles d'incidence de la lumière en configuration de Kretschmann grâce à un prisme à haut indice

Grâce à la loi de Snell-Descartes, il est possible d'écrire la relation suivante :

$$n_1 \times \sin \theta_1 = n_2 \times \sin \theta_2 \quad (1)$$

Avec $n_1 = 1$ et $n_2 = n_p$

$$\sin \theta_1 = n_p \times \sin \theta_2 \quad (2)$$

Il est possible de poser aussi des relations entre les différents angles de la figure B.1 :

$$\theta_1 = \theta_e - \frac{A_p}{2} \text{ et } \theta_2 = \theta_3 - \frac{A_p}{2} \quad (3)$$

Cela revient à écrire l'équation 2 de la façon suivante :

$$\sin\left(\theta_e - \frac{A_p}{2}\right) = n_p \times \sin\left(\theta_3 - \frac{A_p}{2}\right) \quad (4)$$

Également sur la figure, on peut voir que $\theta_3 = \frac{\pi}{2} - \theta_i$ que l'on peut également remplacer dans la ligne précédente 4 :

$$\sin\left(\theta_e - \frac{A_p}{2}\right) = n_p \times \sin\left(\frac{\pi}{2} - \theta_i - \frac{A_p}{2}\right) = n_p \times \sin\left(\frac{\pi}{2} - \left(\theta_i + \frac{A_p}{2}\right)\right) \quad (5)$$

Avec $\sin\left(\frac{\pi}{2} - a\right) = \cos(a)$ on arrive à la relation voulue :

$$\sin\left(\theta_e - \frac{A_p}{2}\right) = n_p \times \cos\left(\theta_i + \frac{A_p}{2}\right) \quad (6)$$

Annexe C

Protocoles de fonctionnalisation de la surface d'or

C.1. Produits chimiques

Molécules thiolées :

- β -mercaptoethylamine (*Cystéamine*) (Sigma Aldrich ref : 30070-10G)
- 1-mercapto-6 hexanol (*MCH*) (Sigma Aldrich ref : 451088-5ml)
- 1-Mercapto-11-undecanoic acid (*MUA*) (Sigma Aldrich ref : 450561-5G)

Autres molécules :

- 1,4-phenylenediisothiocyanate (*PDC*) (Sigma Aldrich ref : 258555-5G)
- Streptavidine (salt free) (Sigma Aldrich ref : S4762-1MG)
- N-hydroxysuccinimide (*NHS*) (Sigma Aldrich ref : 130672-5G)
- N-(3-dimethylaminopropyl)-N'ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) (Sigma Aldrich ref : E7750-1G)

Solvants :

- Ethanol (Normapur 99%)
- Dimethylformamide (*DMF*) (Sigma- Aldrich ref : D4551-500ML)
- Pyridine (Sigma Aldrich ref : 360570-100ML)

C.2. Remarques importantes

- Toujours utiliser de l'eau déionisée ultra-pure
- Toujours utiliser de l'éthanol le plus pur possible (> 99% de pureté) qui contient le moins d'eau possible
- Pour les différentes phases de rinçage, utiliser des bains plutôt que des rinçages à la pissette pour ne pas laisser des traces sur les lames dorées
- Ne jamais sécher les lames après un bain de solvant, toujours finir par un rinçage à l'eau ultra-pure avant le séchage
- Pour sécher les lames, les poser à la verticale et utiliser un pistolet d'azote pour délicatement faire glisser les gouttes sur le papier absorbant en dessous. Si un pistolet d'azote n'est pas disponible ne pas utiliser d'air comprimé (souvent pas assez filtré), utiliser à la place une pissette vide pour faire glisser les gouttes.

C.3. Nettoyage des lames de verre avec dépôt d'or

1. Nettoyage des lames d'or au plasma O_2 : 100 watts pendant 5 minutes.
2. Nettoyage peroxyde d'oxygène (H_2O_2) : verser dans une éprouvette 15 mL d'eau ultra-pure et 5 mL de H_2O_2 à 30%. Placer les lames d'or dans un bécher, les recouvrir avec la solution d' H_2O_2 et placer sur une plaque chauffante à 70°C pendant 10 minutes. La formation des petites bulles devrait apparaître sur la surface d'or.
3. Éteindre le chauffage, retirer le bécher de la plaque chauffante. Attendre 5 minutes que le mélange baisse en température et rincer les lames dans un bain d'eau ultra-pure.
4. Pendant ce temps, remplir un deuxième contenant avec de l'éthanol. Faire passer les lames de l'eau à l'éthanol, les laisser pendant au moins 1h pour éliminer les derniers résidus organiques et éliminer l'activation de la surface par le plasma O_2 . Ce bain sert également de bain de transition pour la prochaine étape.

C.4. Chimie Cystéamine

1. Prendre le flacon de cystéamine du réfrigérateur (4°C)
2. Verser 30 mL d'éthanol dans un bécher.
3. Sur une balance de précision, peser 4.5 mg de cystéamine. Les ajouter dans le bécher d'éthanol ; solution à une concentration finale de 2 mM. Mélanger jusqu'à dissolution complète des cristaux de cystéamine.
4. Récupérer le contenant avec l'éthanol et les lames d'or. Transférer les lames d'or dans le bécher avec le mélange éthanol/cystéamine. Si le bécher n'est pas adapté à faire tenir les lames à la verticale, faire attention à mettre les lames avec la couche d'or vers le haut.
5. Fermer hermétiquement le récipient avec du parafilm et le recouvrir avec du papier d'aluminium afin d'éviter l'oxydation des thiols.
6. Laisser les lames dans la solution pendant au moins 12h (une nuit).
7. Refermer le flacon de cystéamine sous azote (boîte à gants ou pistolet d'azote) pour éviter que les cristaux prennent l'humidité. Le fermer hermétiquement avec du parafilm, le couvrir de papier d'aluminium et le ranger au réfrigérateur.
8. Après les 12h pour la formation de la SAM, rincer les lames dans un bain d'éthanol puis dans un bain d'eau
9. s un bain d'eau
10. Sécher les lames en les posant à la verticale et utiliser un pistolet d'azote pour faire glisser les gouttes d'eau sur le papier absorbant.
11. Dans un bécher, mélanger 22.5 mL de solvant DMF et 2.5 mL de pyridine puis mélanger pour homogénéiser le mélange
12. Sur une balance de précision, peser 100 mg de PDC puis les ajouter au mélange précédent. Remuer jusqu'à dissolution complète des cristaux (la solution devient jaunâtre).
13. Récupérer les lames sèches et les déposer dans la solution de DMF/Pyridine/PDC. Si le bécher n'est pas adapté à faire tenir les lames à la verticale, faire attention à les mettre avec la couche d'or vers le haut.
14. Fermer hermétiquement le récipient avec du parafilm et le recouvrir avec du papier

d'aluminium. Laisser les lames réagir dans la solution pendant 2h.

15. Récupérer les lames puis les transférer en premier dans un bain de DMF puis dans un bain d'eau avant de les sécher à l'aide d'un pistolet d'azote.

16. Pendant les bains de rinçage, sortir la streptavidine du congélateur (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Une fois décongelé, mélanger la solution à l'aide d'un vortex mixeur.

17. Déposer environ 20 μL de la solution de streptavidine sur la surface d'or de chaque lame. Recouvrir chacune de ces dernières avec une lamelle préalablement nettoyée au pistolet d'eau ultra-pure puis séchée à l'azote.

18. Recouvrir d'aluminium puis laisser agir 40 minutes.

19. Verser de l'eau sur les lames et lamelles afin de décoller ces dernières délicatement. Placer les lames dorées dans un bain d'eau avant de les sécher avec un pistolet d'azote.

20. Les lames d'or sont maintenant prêtes pour l'immobilisation des sondes biotinylées par spotting.

C.5. Chimie MUA

1. Prendre le flacon de MUA et de MCH du réfrigérateur (4°C)

2. Verser 30 mL d'éthanol dans un bécher.

3. Sur une balance de précision, peser 13 mg de MUA. Les ajouter dans le bécher d'éthanol ; solution à une concentration finale de 2 mM de MUA. Mélanger jusqu'à dissolution complète des cristaux.

4. Avec une micro-pipette, prélever 25 μL de MCH et les ajouter à la solution précédente d'éthanol/MUA ; solution à une concentration finale de 6 mM de MCH. Mélanger pour homogénéiser le solution.

5. Récupérer le contenant avec l'éthanol et les lames d'or. Transférer les lames d'or dans le bécher avec le mélange éthanol/MUA/MCH. Si le bécher n'est pas adapté à faire tenir les lames à la verticale, faire attention à mettre les lames avec la couche d'or vers le haut.

6. Fermer hermétiquement le récipient avec du parafilm et le recouvrir avec du papier d'aluminium afin d'éviter l'oxydation des thiols.

7. Laisser les lames dans la solution pendant au moins 3h.

8. Fermer les flacons de thiols hermétiquement avec parafilm, les couvrir de papier d'aluminium et les ranger au réfrigérateur.

9. Après les 3h dans la solution de thiols pour former la SAM, rincer les lames dans un bain d'éthanol puis dans un bain d'eau.

10. Sécher les lames en les posant à la verticale et utiliser un pistolet d'azote pour faire glisser les gouttes d'eau sur le papier absorbant.

11. Préparer un Eppendorf avec 200 μL d'eau ultra-pure.

12. Préparer la solution d'activation : sur une balance de précision, peser 2.6 mg de NHS et 1.15 mg d'EDC puis les ajouter dans l'Eppendorf. Mélanger au vortex mixeur jusqu'à dissolution complète des cristaux.

13. Déposer environ 30 μl de la solution de NHS/EDC sur chaque lame d'or. Recouvrir chacune

d'entre elles avec une lamelle (nettoyage préalable de la lamelle avec de l'eau ultra-pure puis séchée avec l'azote), faire attention à ne pas laisser de bulles. Laisser réagir 2h environ.

14. Afin de décoller délicatement les lames d'or des lamelles, les faire tremper dans un bécher d'eau ultra-pure.

15. Rincer ensuite les lames dorées dans un bain d'eau ultra-pure.

16. Sécher les lames dorées en les posant à la verticale et utiliser un pistolet d'azote pour faire glisser les gouttes d'eau sur le papier absorbant.

17. Pendant le bain de rinçage, sortir la streptavidine du congélateur (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Une fois décongelée, mélanger la solution à l'aide d'un vortex mixeur.

18. Déposer environ 20 μL de la solution de streptavidine sur la surface d'or de chaque lame. Recouvrir chacune de ces dernières avec une lamelle préalablement nettoyée au pistolet d'eau ultra-pure puis séchée à l'azote.

19. Recouvrir d'aluminium puis laisser agir 40 minutes.

20. Verser de l'eau sur les lames et lamelles afin de décoller ces dernières délicatement. Placer les lames dorées dans un bain d'eau avant de les sécher avec un pistolet d'azote.

21. Les lames d'or sont maintenant prêtes pour l'immobilisation des sondes biotinylées par spotting.

C.6. Chimie mixte

1. Prendre le flacon de cystéamine et de MCH du réfrigérateur (4°C)

2. Verser 30 mL d'éthanol dans un bécher.

3. Sur une balance de précision, peser 4.5 mg de cystéamine. Les ajouter dans le bécher d'éthanol; solution à une concentration finale de 2 mM de cystéamine. Mélanger jusqu'à dissolution complète des cristaux de cystéamine.

4. Avec une micro-pipette, prélever 8.3 μL de MCH et les ajouter à la solution précédente d'éthanol/cystéamine pour obtenir une solution à une concentration finale de 2 mM de MCH. Mélanger pour homogénéiser la solution.

5. Récupérer le contenant avec l'éthanol et les lames d'or. Transférer les lames d'or dans le bécher avec le mélange éthanol/cystéamine/MCH. Si le bécher n'est pas adapté à faire tenir les lames à la verticale, faire attention à mettre les lames avec la couche d'or vers le haut.

6. Fermer hermétiquement le récipient avec du parafilm et le recouvrir avec du papier d'aluminium afin d'éviter l'oxydation des thiols.

7. Laisser les lames dans la solution pendant environ 12h (pendant une nuit).

8. Refermer le flacon de cystéamine sous azote (boîte à gants ou pistolet d'azote) pour éviter que les cristaux prennent l'humidité. Fermer les flacons de thiols hermétiquement avec parafilm, les couvrir de papier d'aluminium et les ranger au réfrigérateur.

9. Après les 12h pour la formation de la SAM, rincer les lames dans un bain d'éthanol puis dans un bain d'eau.

10. Sécher les lames en les posant à la verticale et utiliser un pistolet d'azote pour faire glisser les gouttes d'eau sur le papier absorbant.

11. Dans un bécher, mélanger 22.5 mL de solvant DMF et 2.5 mL de pyridine puis mélanger pour homogénéiser le mélange
12. Sur une balance de précision, peser 100 mg de PDC puis les ajouter au mélange précédent. Remuer jusqu'à dissolution complète des cristaux (la solution devient jaunâtre).
13. Récupérer les lames sèches et les déposer dans la solution de DMF/Pyridine/PDC. Si le bécher n'est pas adapté à faire tenir les lames à la verticale, faire attention à les mettre avec la couche d'or vers le haut.
14. Fermer hermétiquement le récipient avec du parafilm et le recouvrir avec du papier d'aluminium. Laisser les lames réagir dans la solution pendant 2h.
15. Récupérer les lames puis les transférer en premier dans un bain de DMF puis dans un bain d'eau avant de les sécher à l'aide d'un pistolet d'azote.
16. Pendant les bains de rinçage, sortir la streptavidine du congélateur (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Une fois décongelé, mélanger la solution à l'aide d'un vortex mixeur.
17. Déposer environ 20 μL de la solution de streptavidine sur la surface d'or de chaque lame. Recouvrir chacune de ces dernières avec une lamelle préalablement nettoyée au pistolet d'eau ultra-pure puis séchée à l'azote.
18. Recouvrir d'aluminium puis laisser agir 40 minutes.
19. Verser de l'eau sur les lames et lamelles afin de décoller ces dernières délicatement. Placer les lames dorées dans un bain d'eau avant de les sécher avec un pistolet d'azote.
20. Les lames d'or sont maintenant prêtes pour l'immobilisation des sondes biotinylées par spotting.

Annexe D

Protocole d'obtention de nanoparticules d'or fonctionnalisées

D.1. Matériel

D.1.1. Produits chimiques

- Chlorure d'or(III) trihydrate ($H AuCl_4$) (Sigma Aldrich ref : 520918-1G)
- PEG 600 (Sigma Aldrich ref : 407038-250ML)
- Sodium Borohydrure ($NaBH_4$) (Sigma Aldrich ref : 71320-25G)
- Streptavidine (salt free) (Sigma Aldrich ref : S4762-1MG)
- N-hydroxysuccinimide (*NHS*) (Sigma Aldrich ref : 130672-5G)
- N-(3-diméthylaminopropyl)-N'éthylcarbodiimide hydrochloride (EDC) (Sigma Aldrich ref : E7750-1G)

D.1.2. Autres

- Eau déionisée (DI) ultra-pure
- Ballon à fond plat de 50 mL
- Plaque d'agitation magnétique
- Petit agitateur magnétique
- Streptavidine (salt free) (Sigma Aldrich ref : S4762-1MG)
- N-hydroxysuccinimide (*NHS*) (Sigma Aldrich ref : 130672-5G)
- N-(3-diméthylaminopropyl)-N'éthylcarbodiimide hydrochloride (EDC) (Sigma Aldrich ref : E7750-1G)

D.2. Préparation des solutions

- **$H AuCl_4$** : prendre le flacon de sels d'or (1 g) et y ajouter 10 mL d'eau ultrapure. La solution prend une couleur jaune très prononcée avec une concentration de 100 g/L soit 0,25 mol/L. Laisser la solution dans le frigo dans un contenant à l'abri de la lumière entourée par de l'aluminium.
- **$NaBH_4$** : réaliser la solution du réactif en mélangeant 1 mg de $NaBH_4$ dans 10 mL d'eau ultrapure (concentration de 2 mM). Conserver la solution au congélateur dans des tubes de petits formats (< 15 mL) afin de ne pas les décongeler trop de fois : la solution devient de moins en moins active à température ambiante.
- **EDC/NHS** : réaliser la solution d'activation en pesant 10 mg d'EDC (concentration de 69 mM) et 2,5 mg de NHS (concentration de 29 mM) à diluer dans 750 μ L d'eau ultrapure
- **Streptavidine** : prendre le flacon de streptavidine et rajouter 4 mL d'eau DI ultra-pure dedans afin d'avoir une solution concentration 250 μ g/mL.

D.3. Protocole de synthèse des nanoparticules d'or

1. Prendre un ballon à fond plat propre (préalablement nettoyé à l'aqua regia) de 50 mL, le placer sur l'agitateur magnétique et y ajouter le barreau aimanté. Mettre 9 mL d'eau dans le ballon et allumé l'agitateur
2. Sortir la solution de sels d'or du frigo, mettre 28 μL dans le ballon (après dilution concentration de 0,7 nM) et laisser la solution se diluer. Mettre de l'aluminium sur le ballon pour éviter l'oxydation des sels d'or.
3. Pendant ce temps, peser sur une balance de précision 140 mg de PEG 600 puis y rajouter 1 mL d'eau DI ultrapure. Bien mélanger au vortex pendant au moins 30 secondes : voir le vortex se former confirme l'homogénéisation de la solution.
4. Rajouter la solution de PEG dans le ballon et laisser sur l'agitateur magnétique 10-15 minutes.
5. Pendant ce temps, sortir la solution de NaBH_4 du congèle. Une fois décongelé ajouter 2 mL de cette solution encore très froide dans le ballon goutte à goutte. La solution doit devenir rouge-violette presque instantanément.
6. Laisser sur l'agitateur magnétique pendant 30 minutes afin de laisser le temps aux nanoparticules de se former.
7. Récupérer les nanoparticules (≈ 40 nm à 50 nm de diamètre) avec une micropipette en récupérant toutes les gouttes au fond du ballon et les conserver dans un tube Eppendorf en plastique (pas de verre).

D.4. Fonctionnalisation des nanoparticules d'or

1. Prélever quelques millilitres de solution de nanoparticules à 200 pM dans des tubes Eppendorf. Exemple : 1,5 mL de solution de nanoparticules
2. Centrifuger les solutions à 5 000g pendant 7 minutes (à adapter plus vite et/ou plus longtemps suivant la tailles des nanoparticules synthétisées à la première étape) afin de faire tomber les nanoparticules au fond du tube.
3. Récupérer le surnageant petit à petit à l'aide de micropipettes. Faire très attention à ne pas prélever les nanoparticules dans le fond du tube.
4. Rediluer les nanoparticules dans 2x moins de volume que le volume initial afin de doubler leur concentration pour la suite de la fonctionnalisation, vortexer pour bien les mélanger. Exemple : rajouter 750 μL d'eau DI ultrapure dans le tube.
5. Activer les nanoparticules recouvertes de PEG-COOH avec la solution composée d'EDC/NHS. Vortexer puis attendre 15 minutes le temps que l'activation fasse effet. Exemple : rajouter 10 μL de la solution d'activation dans la solution avec les nanoparticules de l'étape 4.
6. Ajouter la streptavidine (concentration 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ou 4.2 $\mu\text{mol}/\text{L}$) à la solution de nanoparticules activées, un changement de couleur du rouge au violet est visible immédiatement vortexer puis attendre 30 minutes. Exemple : rajouter 30 μL de la solution de streptavidine à la solution de l'étape 5.
7. Ajouter les oligonucléotides biotinylés en prélevant dans la solution mère du fournisseur à la concentration de 100 μM vortexer, puis attendre 30 min avant utilisation. Exemple : rajouter 7 μL de la solution d'ADN à 100 μM dans la solution de nanoparticules de l'étape 6.

D.5. Spectres d'absorption des nanoparticules d'or

Plusieurs synthèses de nanoparticules d'or ont été réalisées au LN2 à Sherbrooke suivant le même protocole décrit dans la partie précédente V.3. Ces synthèses sont caractérisées grâce à un spectromètre UV-visible. Les différents spectres obtenus sont tracés sur la figure suivante. La différence du maximum d'absorption sur ces spectres dépend de la quantité d'eau rajoutée dans la solution après la centrifugation.

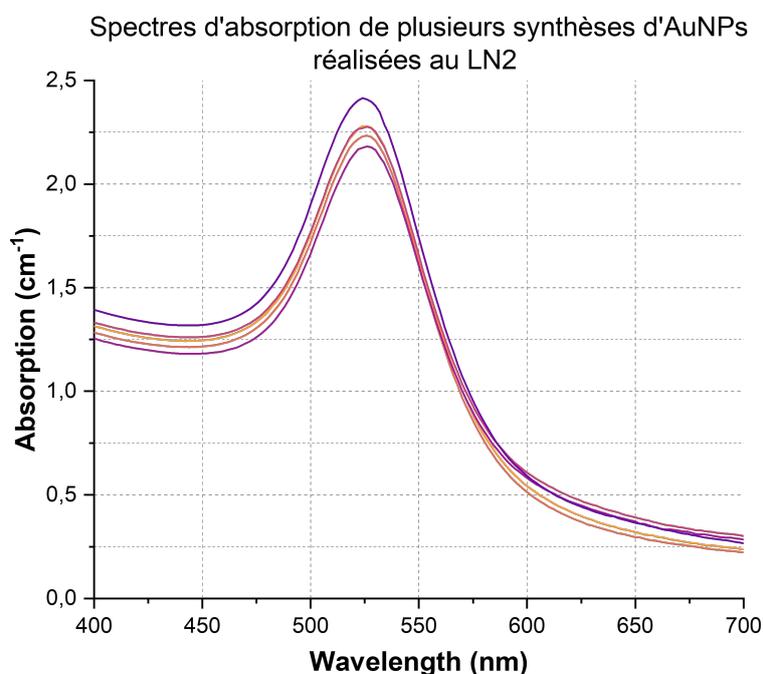


FIGURE D.1 – Spectres d'absorption des solutions colloïdales de nanoparticules d'or réalisées suivant le même protocole de synthèse.

D.6. Images MEB de nanoparticules d'or non centrifugées après la synthèse

Une synthèse de nanoparticules avec $32\mu\text{L}$ d'or a été réalisée suivant le protocole détaillé de la partie V.3. Après la synthèse, les nanoparticules n'ont pas été centrifugées et laissées à température ambiante. Elles ont ensuite été imagées au MEB 5 mois plus tard, ces images sont présentées sur la figure suivante.

Sur ces images, on peut voir que les formes des nanoparticules varient énormément : sphérique, bâtonnet, différentes formes de polyèdres... Les tailles sont également très dispersées, les sphères restent de taille petite ($< 50\text{nm}$) mais lorsque la forme devient plus compliquée la taille augmente jusqu'à quelques centaines de nanomètres. Ces formes sont obtenues aléatoirement par les sels d'or qui restent présents en solution et qui utilisent les sphères réalisées lors de la synthèse initiale comme précurseur de croissance pour réaliser des nanoparticules de formes plus complexes.

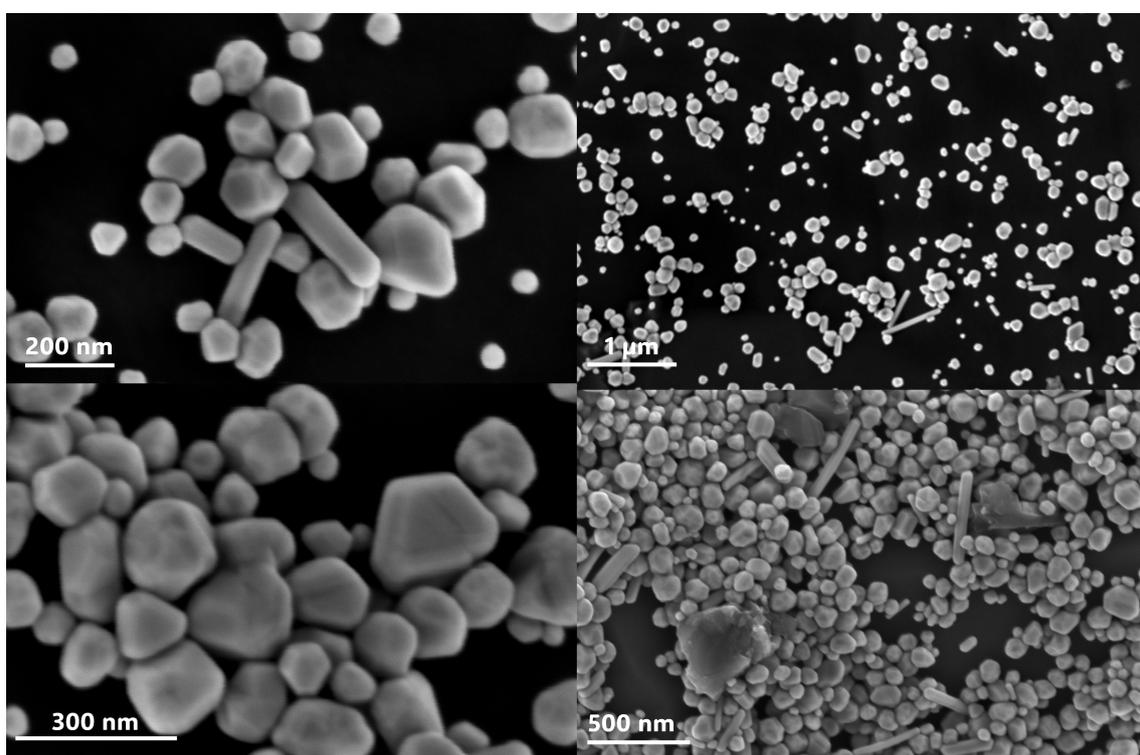


FIGURE D.2 – Images MEB d'une solution de nanoparticules non centrifugées après synthèse.

Bibliographie

- [1] *Statistiques sommaires relatives aux transplantations, aux listes d'attente et aux donneurs* | ICIS.
- [2] V. R. SHAH. "Aggressive Management of Multiorgan Donor". en. In : *Transplantation Proceedings* 40.4 (mai 2008), p. 1087-1090. ISSN : 0041-1345. DOI : [10 . 1016 / j . transproceed.2008.03.029](https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2008.03.029).
- [3] L MASCIA, I MASTROMAURO, S VIBERTI, M VINCENZI et M ZANELLO. "Management to optimize organ procurement in brain dead donors". en. In : *MINERVA ANESTESIOLOGICA* 75.3 (2009), p. 9.
- [4] S. WEISS, K. KOTSCH, M. FRANCUSKI, A. REUTZEL-SELKE, L. MANTOUVALOU, R. KLEMZ, O. KUECUEK, S. JONAS, C. WESSLAU, F. ULRICH, A. PASCHER, H.-D. VOLK, S. G. TULLIUS, P. NEUHAUS et J. PRATSCHKE. "Brain death activates donor organs and is associated with a worse I/R injury after liver transplantation". eng. In : *American Journal of Transplantation : Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 7.6 (juin 2007), p. 1584-1593. ISSN : 1600-6135. DOI : [10 . 1111 / j . 1600-6143 . 2007 . 01799 . x](https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2007.01799.x).
- [5] Ryan P. WATTS, Ogilvie THOM et John F. FRASER. "Inflammatory Signalling Associated with Brain Dead Organ Donation : From Brain Injury to Brain Stem Death and Posttransplant Ischaemia Reperfusion Injury". In : *Journal of Transplantation* 2013 (2013), p. 521369. ISSN : 2090-0007. DOI : [10 . 1155 / 2013 / 521369](https://doi.org/10.1155/2013/521369).
- [6] Farid FOROUTAN, Erik Loewen FRIESEN, Kathryn Elizabeth CLARK, Shahrzad MOTAGHI, Roman ZYLA, Yung LEE, Rakhshan KAMRAN, Emir ALI, Mitch DE SNOO, Ani ORCHANIAN-CHEFF, Christine RIBIC, Darin J. TRELEAVEN, Gordon GUYATT et Maureen O. MEADE. "Risk Factors for 1-Year Graft Loss After Kidney Transplantation : Systematic Review and Meta-Analysis". en. In : *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 14.11 (nov. 2019), p. 1642-1650. ISSN : 1555-9041, 1555-905X. DOI : [10 . 2215 / CJN . 05560519](https://doi.org/10.2215/CJN.05560519).
- [7] Mondher OUNISSI, Mejda CHERIF, Taieb Ben ABDALLAH, Mongi BACHA, Hafedh HEDRI, Ezzedine ABDERRAHIM, Rym GOUCHA, Adel KHEDER, Riadh Ben SLAMA, Amine DEROUICHE, Mohamed CHEBIL, Rafika BARDI, Imen SFAR et Yosr GORGI. "Risk factors and consequences of delayed graft function". en. In : *Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation* 24.2 (mars 2013). Company : Medknow Publications and Media Pvt. Ltd. Distributor : Medknow Publications and Media Pvt. Ltd. Institution : Medknow Publications and Media Pvt. Ltd. Label : Medknow Publications and Media Pvt. Ltd. Publisher : Medknow Publications, p. 243. ISSN : 1319-2442. DOI : [10 . 4103 / 1319 - 2442 . 109564](https://doi.org/10.4103/1319-2442.109564).

- [8] H. M. WADEI, D. D. LEE, K. P. CROOME, M. L. MAI, E. GOLAN, R. BROTMAN, A. P. KEAVENY et C. B. TANER. “Early Allograft Dysfunction After Liver Transplantation Is Associated With Short- and Long-Term Kidney Function Impairment”. en. In : *American Journal of Transplantation* 16.3 (2016). _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/ajt.13527>, p. 850-859. ISSN : 1600-6143. DOI : [10.1111/ajt.13527](https://doi.org/10.1111/ajt.13527).
- [9] Ian M. BALL, Laura HORNBY, Bram ROCHWERG, Matthew J. WEISS, Clay GILLRIE, Michaël CHASSÉ, Frederick D’ARAGON, Maureen O. MEADE, Karim SOLIMAN, Aadil ALI, Samantha ARORA, John BASMAJI, J. Gordon BOYD, Bernard CANTIN, Prosanto CHAUDHURY, Marcelo CYPEL, Darren FREED, Anne Julie FRENETTE, Pam HRUSKA, Constantine J. KARVELLAS, Sean KEENAN, Andreas KRAMER, Demetrios James KUTSOGIANNIS, Dale LIEN, Patrick LUKE, Meagan MAHONEY, Jeffrey M. SINGH, Lindsay C. WILSON, Alissa WRIGHT, Jeffrey ZALTZMAN et Sam D. SHEMIE. “Management of the neurologically deceased organ donor : A Canadian clinical practice guideline”. en. In : *CMAJ* 192.14 (avr. 2020). Publisher : CMAJ Section : Guideline, E361-E369. ISSN : 0820-3946, 1488-2329. DOI : [10.1503/cmaj.190631](https://doi.org/10.1503/cmaj.190631).
- [10] Sam D. SHEMIE, Heather ROSS, Joe PAGLIARELLO, Andrew J. BAKER, Paul D. GREIG, Tracy BRAND, Sandra COCKFIELD, Shaf KESHAVJEE, Peter NICKERSON, Vivek RAO, Cameron GUEST, Kimberly YOUNG et Christopher DOIG. “Organ donor management in Canada : recommendations of the forum on Medical Management to Optimize Donor Organ Potential”. en. In : *CMAJ* 174.6 (mars 2006). Publisher : CMAJ Section : Supplement, S13-S30. ISSN : 0820-3946, 1488-2329. DOI : [10.1503/cmaj.045131](https://doi.org/10.1503/cmaj.045131).
- [11] D. M. FOLLETTE, S. M. RUDICH et W. D. BABCOCK. “Improved oxygenation and increased lung donor recovery with high-dose steroid administration after brain death”. eng. In : *The Journal of Heart and Lung Transplantation : The Official Publication of the International Society for Heart Transplantation* 17.4 (avr. 1998), p. 423-429. ISSN : 1053-2498.
- [12] Frederick D’ARAGON, Emilie BELLEY-CÔTÉ, Arnav AGARWAL, Anne Julie FRENETTE, Francois LAMONTAGNE, Gordon GUYATT, Sonny DHANANI et Maureen MEADE. “Effect of corticosteroid administration on neurologically deceased organ donors and transplant recipients : A systematic review and meta-analysis”. In : *BMJ Open* 7 (juin 2017), e014436. DOI : [10.1136/bmjopen-2016-014436](https://doi.org/10.1136/bmjopen-2016-014436).
- [13] Andrée-Anne CLÉMENT, Daphnée LAMARCHE, Marie-Hélène MASSE, Cécilia LÉGARÉ, Lee-Hwa TAI, Laurence FLEURY DELAND, Marie-Claude BATTISTA, Luigi BOUCHARD et Frédérick D’ARAGON. “Time-course full profiling of circulating miRNAs in neurologically deceased organ donors : a proof of concept study to understand the onset of the cytokine storm”. en. In : *Epigenetics* (mai 2022), p. 1-16. ISSN : 1559-2294, 1559-2308. DOI : [10.1080/15592294.2022.2076048](https://doi.org/10.1080/15592294.2022.2076048).
- [14] R. C. LEE, R. L. FEINBAUM et V. AMBROS. “The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*”. eng. In : *Cell* 75.5 (déc. 1993), p. 843-854. ISSN : 0092-8674. DOI : [10.1016/0092-8674\(93\)90529-y](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90529-y).

- [15] B. WIGHTMAN, I. HA et G. RUVKUN. "Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*". eng. In : *Cell* 75.5 (déc. 1993), p. 855-862. ISSN : 0092-8674. DOI : [10.1016/0092-8674\(93\)90530-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90530-4).
- [16] Jérôme HOTTIN, Julien MOREAU, Alain BELLEMAIN et Michael CANVA. "Biochip data normalization using multifunctional probes". en. In : *The Analyst* 137.13 (2012), p. 3119. ISSN : 0003-2654, 1364-5528. DOI : [10.1039/c2an35120j](https://doi.org/10.1039/c2an35120j).
- [17] Jérôme HOTTIN, Julien MOREAU, Gisèle ROGER, Jolanda SPADAVECCHIA, Marie-Claude MILLOT, Michel GOOSSENS et Michael CANVA. "Plasmonic DNA : Towards Genetic Diagnosis Chips". en. In : *Plasmonics* 2.4 (oct. 2007), p. 201-215. ISSN : 1557-1955, 1557-1963. DOI : [10.1007/s11468-007-9039-6](https://doi.org/10.1007/s11468-007-9039-6).
- [18] Jolanda SPADAVECCHIA, Julien MOREAU, Jérôme HOTTIN et Michael CANVA. "New cysteamine based functionalization for biochip applications". en. In : *Sensors and Actuators B : Chemical* 143.1 (déc. 2009), p. 139-143. ISSN : 09254005. DOI : [10.1016/j.snb.2009.09.007](https://doi.org/10.1016/j.snb.2009.09.007).
- [19] Nathalie BASSIL. "Système de biopuce optique en temps réel : application au diagnostic génétique". fr. Thèse de doct. 2005.
- [20] Nathalie BASSIL, Emmanuel MAILLART, Michael CANVA, Yves LÉVY, Marie-Claude MILLOT, Serge PISSARD, Rémy NARWA et Michel GOOSSENS. "One hundred spots parallel monitoring of DNA interactions by SPR imaging of polymer-functionalized surfaces applied to the detection of cystic fibrosis mutations". en. In : *Sensors and Actuators B : Chemical* 94.3 (oct. 2003), p. 313-323. ISSN : 09254005. DOI : [10.1016/S0925-4005\(03\)00462-3](https://doi.org/10.1016/S0925-4005(03)00462-3).
- [21] Jérôme HOTTIN. "Caractéristiques Optiques et Dynamiques d'Interactions Biomoléculaires de Surface - Application aux biopuces à ADN". en. Thèse de doct. 2009.
- [22] University of UTAH. "New sequencing method uses nanopores to detect DNA damage". en. In : (2012).
- [23] J. LAMORIL, N. AMEZIANE, J.-C. DEYBACH, P. BOUIZEGARÈNE et M. BOGARD. "Les techniques de séquençage de l'ADN : une révolution en marche. Première partie". In : *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée* 23.5 (oct. 2008), p. 260-279. ISSN : 0923-2532. DOI : [10.1016/j.immbio.2008.07.016](https://doi.org/10.1016/j.immbio.2008.07.016).
- [24] J. D. WATSON et F. H. C. CRICK. "Molecular Structure of Nucleic Acids : A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid". en. In : *Nature* 171.4356 (avr. 1953). Publisher : Nature Publishing Group, p. 737-738. ISSN : 1476-4687. DOI : [10.1038/171737a0](https://doi.org/10.1038/171737a0).
- [25] Walter GILBERT et Allan MAXAM. "The Nucleotide Sequence of the *lac* Operator". In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70.12 Pt 1-2 (déc. 1973), p. 3581-3584. ISSN : 0027-8424.
- [26] F. SANGER, S. NICKLEN et A. R. COULSON. "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors". In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74.12 (déc. 1977), p. 5463-5467. ISSN : 0027-8424.

- [27] Karim KADRI. "Polymerase Chain Reaction (PCR) : Principle and Applications". en. In : *Synthetic Biology - New Interdisciplinary Science*. Sous la dir. de Madan L. NAGPAL, Oana-Maria BOLDURA, Cornel BALȚĂ et Shymaa ENANY. IntechOpen, fév. 2020. ISBN : 978-1-78984-089-6 978-1-78984-090-2. DOI : [10.5772/intechopen.86491](https://doi.org/10.5772/intechopen.86491).
- [28] Mohini JOSHI et J. D. DESHPANDE. "POLYMERASE CHAIN REACTION : METHODS, PRINCIPLES AND APPLICATION". en. In : *International Journal of Biomedical Research* 2.1 (oct. 2011), p. 81-97. ISSN : 0976-9633. DOI : [10.7439/ijbr.v2i1.83](https://doi.org/10.7439/ijbr.v2i1.83).
- [29] M. RONAGHI, M. UHLÉN et P. NYRÉN. "A sequencing method based on real-time pyrophosphate". eng. In : *Science (New York, N.Y.)* 281.5375 (juill. 1998), p. 363, 365. ISSN : 0036-8075. DOI : [10.1126/science.281.5375.363](https://doi.org/10.1126/science.281.5375.363).
- [30] Hagan BAYLEY. "Sequencing single molecules of DNA". en. In : *Current Opinion in Chemical Biology*. Model systems / Biopolymers 10.6 (déc. 2006), p. 628-637. ISSN : 1367-5931. DOI : [10.1016/j.cbpa.2006.10.040](https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.10.040).
- [31] Barbara RÜGER. "Dot, Southern, and Northern Blots". en. In : *Nonradioactive Analysis of Biomolecules*. Sous la dir. de Christoph KESSLER. Springer Lab Manuals. Berlin, Heidelberg : Springer, 2000, p. 443-463. ISBN : 978-3-642-57206-7. DOI : [10.1007/978-3-642-57206-7_38](https://doi.org/10.1007/978-3-642-57206-7_38).
- [32] Paolo A. SABELLI. "Northern Blot Analysis". en. In : *Molecular Biomethods Handbook*. Sous la dir. de Ralph RAPLEY et John M. WALKER. Springer Protocols Handbooks. Totowa, NJ : Humana Press, 1998, p. 89-93. ISBN : 978-1-59259-642-3. DOI : [10.1007/978-1-59259-642-3_9](https://doi.org/10.1007/978-1-59259-642-3_9).
- [33] Richard A. KROCZEK. "Southern and Northern analysis". en. In : *Journal of Chromatography B : Biomedical Sciences and Applications* 618.1-2 (août 1993), p. 133-145. ISSN : 03784347. DOI : [10.1016/0378-4347\(93\)80031-X](https://doi.org/10.1016/0378-4347(93)80031-X).
- [34] Leland C. CLARK JR. "Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery". In : 102.1 (1962), p. 29-45. DOI : <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1962.tb13623.x>.
- [35] Hamed KHARRATI-KOOPAEE, Vahideh REZAEI, Ali ESMAILIZADEH et Fatemeh SABAHI. "DNA Biosensors Techniques and Their Applications in Food Safety, Environmental Protection and Biomedical Research : A mini-review". En. In : *Journal of Cell and Developmental Biology* 3.1 (2020). Number : 1 Publisher : Scholars.Direct. DOI : [10.36959/596/446](https://doi.org/10.36959/596/446).
- [36] N. A. KARASEVA et T. N. ERMOLAEVA. "A piezoelectric immunosensor for chloramphenicol detection in food". In : *Talanta* 93 (mai 2012), p. 44-48. ISSN : 0039-9140. DOI : [10.1016/j.talanta.2011.12.047](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.12.047).
- [37] Yukichi Horiguchi, Seigo Miyachi et Yukio Nagasaki. "High-Performance Surface Acoustic Wave Immunosensing System on a PEG/Aptamer Hybridized Surface". In : *Langmuir* 29.24 (juin 2013). Publisher : American Chemical Society, p. 7369-7376. ISSN : 0743-7463. DOI : [10.1021/la304548m](https://doi.org/10.1021/la304548m).

- [38] Gulilat GEBEYEHU, Prasad Y. RAO, Patricia SOOCHAN, D.A. SIMMS et Leonard KLEVAN. "Novel biotinylated nucleotide - analogs for labeling and colorimetric detection of DNA". In : *Nucleic Acids Research* 15.11 (juin 1987), p. 4513-4534. ISSN : 0305-1048. DOI : [10.1093/nar/15.11.4513](https://doi.org/10.1093/nar/15.11.4513).
- [39] Andrew C. HATCH, Jeffrey S. FISHER, Armando R. TOVAR, Albert T. HSIEH, Robert LIN, Stephen L. PENTONEY, David L. YANG et Abraham P. LEE. "1-Million droplet array with wide-field fluorescence imaging for digital PCR". en. In : *Lab on a Chip* 11.22 (oct. 2011). Publisher : The Royal Society of Chemistry, p. 3838-3845. ISSN : 1473-0189. DOI : [10.1039/C1LC20561G](https://doi.org/10.1039/C1LC20561G).
- [40] Joseph WANG. "Nanoparticle-based electrochemical DNA detection". In : *Analytica Chimica Acta*. ANALYTICAL HORIZONS - An International Symposium celebrating the publication of Volume 500 of Analytica Chimica Acta 500.1 (déc. 2003), p. 247-257. ISSN : 0003-2670. DOI : [10.1016/S0003-2670\(03\)00725-6](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(03)00725-6).
- [41] Seyed SAMAD HOSSEINI, Asiyeh JEBELLI, Somayeh VANDGHANOONI, Ali JAHANBAN-ESFAHLAN, Behzad BARADARAN, Mohammad AMINI, Negar BIDAR, Miguel de la GUARDIA, Ahad MOKHTARZADEH et Morteza ESKANDANI. "Perspectives and trends in advanced DNA biosensors for the recognition of single nucleotide polymorphisms". en. In : *Chemical Engineering Journal* 441 (août 2022), p. 135988. ISSN : 1385-8947. DOI : [10.1016/j.cej.2022.135988](https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.135988).
- [42] Tina MAVRIČ, Metka BENČINA, Roghayeh IMANI, Ita JUNKAR, Matjaz VALANT, Veronika KRALJ-IGLIČ et Aleš IGLIČ. "Chapter Three - Electrochemical Biosensor Based on TiO₂ Nanomaterials for Cancer Diagnostics". en. In : *Advances in Biomembranes and Lipid Self-Assembly*. Sous la dir. d'Aleš IGLIČ, Michael RAPPOLT et Ana J. GARCÍA-SÁEZ. T. 27. Academic Press, jan. 2018, p. 63-105. DOI : [10.1016/bs.abl.2017.12.003](https://doi.org/10.1016/bs.abl.2017.12.003).
- [43] Jian-Guo GUAN, Yu-Qing MIAO et Qing-Jie ZHANG. "Impedimetric biosensors". en. In : *Journal of Bioscience and Bioengineering* 97.4 (jan. 2004), p. 219-226. ISSN : 1389-1723. DOI : [10.1016/S1389-1723\(04\)70195-4](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(04)70195-4).
- [44] Ningning GAO, Feng GAO, Suyu HE, Qionghua ZHU, Jiafu HUANG, Hidekazu TANAKA et Qingxiang WANG. "Graphene oxide directed in-situ deposition of electroactive silver nanoparticles and its electrochemical sensing application for DNA analysis". en. In : *Analytica Chimica Acta* 951 (jan. 2017), p. 58-67. ISSN : 0003-2670. DOI : [10.1016/j.aca.2016.11.033](https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.11.033).
- [45] Alessandra BONANNI et Martin PUMERA. "Graphene Platform for Hairpin-DNA-Based Impedimetric Genosensing". en. In : *ACS Nano* 5.3 (mars 2011), p. 2356-2361. ISSN : 1936-0851, 1936-086X. DOI : [10.1021/nm200091p](https://doi.org/10.1021/nm200091p).
- [46] Peter KISSINGER et William R. HEINEMAN, éd. *Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry, Revised and Expanded*. English. 2nd edition. New York : CRC Press, jan. 1996. ISBN : 978-0-8247-9445-3.

- [47] Gang LIU, Ruojun LAO, Li XU, Qin XU, Lanying LI, Min ZHANG, Shiping SONG et Chunhai FAN. "Single-nucleotide polymorphism genotyping using a novel multiplexed electrochemical biosensor with nonfouling surface". en. In : *Biosensors and Bioelectronics* 42 (avr. 2013), p. 516-521. ISSN : 0956-5663. DOI : [10.1016/j.bios.2012.11.005](https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.11.005).
- [48] Elena E. FERAPONTOVA. "Basic concepts and recent advances in electrochemical analysis of nucleic acids". en. In : *Current Opinion in Electrochemistry* 5.1 (oct. 2017), p. 218-225. ISSN : 24519103. DOI : [10.1016/j.coelec.2017.09.026](https://doi.org/10.1016/j.coelec.2017.09.026).
- [49] Joseph WANG, Gustavo RIVAS, Joao Roberto FERNANDES, Jose Luis LOPEZ PAZ, Mian JIANG et Russel WAYMIRE. "Indicator-free electrochemical DNA hybridization biosensor". en. In : *Analytica Chimica Acta* 375.3 (nov. 1998), p. 197-203. ISSN : 00032670. DOI : [10.1016/S0003-2670\(98\)00503-0](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(98)00503-0).
- [50] Ezat HAMIDI-ASL, Jahan Bakhsh RAOOF, Reza OJANI, Seyed Mahdi GOLABI et Mohammad Saeid HEJAZI. "A new peptide nucleotide acid biosensor for electrochemical detection of single nucleotide polymorphism in duplex DNA via triplex structure formation". en. In : *Journal of the Iranian Chemical Society* 10.6 (déc. 2013), p. 1075-1083. ISSN : 1735-2428. DOI : [10.1007/s13738-013-0254-0](https://doi.org/10.1007/s13738-013-0254-0).
- [51] Ying WAN, Ruojun LAO, Gang LIU, Shiping SONG, Lihua WANG, Di LI et Chunhai FAN. "Multiplexed Electrochemical DNA Sensor for Single-Nucleotide Polymorphism Typing by Using Oligonucleotide-Incorporated Nonfouling Surfaces". In : *The Journal of Physical Chemistry B* 114.19 (mai 2010). Publisher : American Chemical Society, p. 6703-6706. ISSN : 1520-6106. DOI : [10.1021/jp100871u](https://doi.org/10.1021/jp100871u).
- [52] Declan RYAN, Maryam RAHIMI, John LUND, Ranjana MEHTA et Babak A. PARVIZ. "Toward nanoscale genome sequencing". en. In : *Trends in Biotechnology* 25.9 (sept. 2007), p. 385-389. ISSN : 0167-7799. DOI : [10.1016/j.tibtech.2007.07.001](https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2007.07.001).
- [53] Alessio MARCOZZI, Myrthe JAGER, Martin ELFERINK, Roy STRAVER, Joost H. van GINKEL, Boris PELTENBURG, Li-Ting CHEN, Ivo RENKENS, Joyce van KUIK, Chris TERHAARD, Remco de BREE, Lot A. DEVRIESE, Stefan M. WILLEMS, Wigard P. KLOOSTERMAN et Jeroen de RIDDER. "Accurate detection of circulating tumor DNA using nanopore consensus sequencing". In : *NPJ Genomic Medicine* (déc. 2021), p. 106. ISSN : 2056-7944.
- [54] Weiye BAO, Jiayi CHEN, Shuze PENG et Bian HE. "Recent Advances in DNA Biosensors". In : *2021 3rd International Academic Exchange Conference on Science and Technology Innovation (IAECST)*. Déc. 2021, p. 1096-1101. DOI : [10.1109/IAECST54258.2021.9695697](https://doi.org/10.1109/IAECST54258.2021.9695697).
- [55] Osama K. ZAHID, Fanny WANG, Jan A. RUZICKA, Ethan W. TAYLOR et Adam R. HALL. "Sequence-specific recognition of microRNAs and other short nucleic acids with solid-state nanopores". In : *Nano letters* 16.3 (mars 2016), p. 2033-2039. ISSN : 1530-6984. DOI : [10.1021/acs.nanolett.6b00001](https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.6b00001).

- [56] Arica A. LUBIN et Kevin W. PLAXCO. "Folding-Based Electrochemical Biosensors : The Case for Responsive Nucleic Acid Architectures". In : *Accounts of Chemical Research* 43.4 (avr. 2010). Publisher : American Chemical Society, p. 496-505. ISSN : 0001-4842. DOI : [10.1021/ar900165x](https://doi.org/10.1021/ar900165x).
- [57] Yi XIAO, Rebecca Y. LAI et Kevin W. PLAXCO. "Preparation of electrode-immobilized, redox-modified oligonucleotides for electrochemical DNA and aptamer-based sensing". en. In : *Nature Protocols* 2.11 (nov. 2007). Number : 11 Publisher : Nature Publishing Group, p. 2875-2880. ISSN : 1750-2799. DOI : [10.1038/nprot.2007.413](https://doi.org/10.1038/nprot.2007.413).
- [58] Chunhai FAN, Kevin W. PLAXCO et Alan J. HEEGER. "Electrochemical interrogation of conformational changes as a reagentless method for the sequence-specific detection of DNA". en. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100.16 (août 2003), p. 9134-9137. ISSN : 0027-8424, 1091-6490. DOI : [10.1073/pnas.1633515100](https://doi.org/10.1073/pnas.1633515100).
- [59] Chad E. IMMOOS, Stephen J. LEE et Mark W. GRINSTAFF. "Conformationally Gated Electrochemical Gene Detection". en. In : *ChemBioChem* 5.8 (2004). _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/cbic.200400045>, p. 1100-1103. ISSN : 1439-7633. DOI : [10.1002/cbic.200400045](https://doi.org/10.1002/cbic.200400045).
- [60] Yi XIAO, Xiaogang QU, Kevin W. PLAXCO et Alan J. HEEGER. "Label-Free Electrochemical Detection of DNA in Blood Serum via Target-Induced Resolution of an Electrode-Bound DNA Pseudoknot". In : *Journal of the American Chemical Society* 129.39 (oct. 2007). Publisher : American Chemical Society, p. 11896-11897. ISSN : 0002-7863. DOI : [10.1021/ja074218y](https://doi.org/10.1021/ja074218y).
- [61] Abdolkarim ABBASPOUR et Abolhassan NOORI. "Electrochemical detection of individual single nucleotide polymorphisms using monobase-modified apoferritin-encapsulated nanoparticles". en. In : *Biosensors and Bioelectronics* 37.1 (août 2012), p. 11-18. ISSN : 0956-5663. DOI : [10.1016/j.bios.2012.04.017](https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.04.017).
- [62] Zhong Feng GAO, Yu LING, Lu LU, Ning Yu CHEN, Hong Qun LUO et Nian Bing LI. "Detection of Single-Nucleotide Polymorphisms Using an ON-OFF Switching of Regenerated Biosensor Based on a Locked Nucleic Acid-Integrated and Toehold-Mediated Strand Displacement Reaction". In : *Analytical Chemistry* 86.5 (mars 2014). Publisher : American Chemical Society, p. 2543-2548. ISSN : 0003-2700. DOI : [10.1021/ac500362z](https://doi.org/10.1021/ac500362z).
- [63] Kagan KERMAN, Masato SAITO, Yasutaka MORITA, Yuzuru TAKAMURA, Mehmet OZSOZ et Eiichi TAMIYA. "Electrochemical Coding of Single-Nucleotide Polymorphisms By Monobase-Modified Gold Nanoparticles". In : *Analytical Chemistry* 76.7 (avr. 2004). Publisher : American Chemical Society, p. 1877-1884. ISSN : 0003-2700. DOI : [10.1021/ac0351872](https://doi.org/10.1021/ac0351872).
- [64] Joseph WANG, Guodong LIU et Arben MERKOÇI. "Electrochemical Coding Technology for Simultaneous Detection of Multiple DNA Targets". In : *Journal of the American Chemical Society* 125.11 (mars 2003). Publisher : American Chemical Society, p. 3214-3215. ISSN : 0002-7863. DOI : [10.1021/ja029668z](https://doi.org/10.1021/ja029668z).

- [65] Noman NAWAZ, Nor Kartini ABU BAKAR, Habibun Nabi MUHAMMAD EKRAMUL MAHMUD et Nazzatush Shimar JAMALUDIN. "Molecularly imprinted polymers-based DNA biosensors". en. In : *Analytical Biochemistry* 630 (oct. 2021), p. 114328. ISSN : 0003-2697. DOI : [10.1016/j.ab.2021.114328](https://doi.org/10.1016/j.ab.2021.114328).
- [66] Zihni Onur UYGUN, Hilmiye Deniz ERTUGRUL UYGUN, Nihal ERMIS et Erhan CANBAY. "Molecularly Imprinted Sensors — New Sensing Technologies". en. In : *Biosensors - Micro and Nanoscale Applications*. Sous la dir. de Toonika RINKEN. InTech, sept. 2015. ISBN : 978-953-51-2173-2. DOI : [10.5772/60781](https://doi.org/10.5772/60781).
- [67] Yagang ZHANG. "Molecularly imprinted polymers-new insights and strategies". English. ISBN : 9781109753653. Ph.D. United States – South Carolina : University of South Carolina, 2010.
- [68] Junhui ZHAI, Hong CUI et Ruifu YANG. "DNA based biosensors". en. In : *Biotechnology Advances* 15.1 (jan. 1997), p. 43-58. ISSN : 0734-9750. DOI : [10.1016/S0734-9750\(97\)00003-7](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(97)00003-7).
- [69] Yi-Ming WANG, Xiao-Feng PANG et Yu-Yu ZHANG. "Recent advances in fiber-optic DNA biosensors". en. In : *Journal of Biomedical Science and Engineering* 02.05 (sept. 2009). Number : 05 Publisher : Scientific Research Publishing, p. 312. DOI : [10.4236/jbise.2009.25046](https://doi.org/10.4236/jbise.2009.25046).
- [70] Xiaojing LIU et Weihong TAN. "A Fiber-Optic Evanescent Wave DNA Biosensor Based on Novel Molecular Beacons". en. In : *Analytical Chemistry* 71.22 (nov. 1999), p. 5054-5059. ISSN : 0003-2700, 1520-6882. DOI : [10.1021/ac990561c](https://doi.org/10.1021/ac990561c).
- [71] C. EGGELING, J. WIDENGREN, R. RIGLER et C. A. M. SEIDEL. "Photobleaching of Fluorescent Dyes under Conditions Used for Single-Molecule Detection : Evidence of Two-Step Photolysis". In : *Analytical Chemistry* 70.13 (juill. 1998). Publisher : American Chemical Society, p. 2651-2659. ISSN : 0003-2700. DOI : [10.1021/ac980027p](https://doi.org/10.1021/ac980027p).
- [72] Jerker WIDENGREN et Rudolf RIGLER. "Mechanisms of photobleaching investigated by fluorescence correlation spectroscopy". en. In : *Bioimaging* 4.3 (1996). _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/1361-6374%28199609%294%3A3%3C149%3A%3A%3A%3C149-157%3E3.0.CO;2-D>. p. 149-157. ISSN : 1361-6374. DOI : [10.1002/1361-6374\(199609\)4:3<149::AID-BI05>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/1361-6374(199609)4:3<149::AID-BI05>3.0.CO;2-D).
- [73] Ute RESCH-GENGER, Markus GRABOLLE, Sara CAVALIERE-JARICOT, Roland NITSCHKE et Thomas NANN. "Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels". en. In : *Nature Methods* 5.9 (sept. 2008). Publisher : Nature Publishing Group, p. 763-775. ISSN : 1548-7105. DOI : [10.1038/nmeth.1248](https://doi.org/10.1038/nmeth.1248).
- [74] Yizhong SHEN, Shaopu LIU, Jidong YANG, Linlin WANG, Xuanping TAN et Youqiu HE. "A novel and sensitive turn-on fluorescent biosensor for the DNA detection using Sm³⁺-modulated glutathione-capped CdTe quantum dots". en. In : *Sensors and Actuators B : Chemical* 199 (août 2014), p. 389-397. ISSN : 0925-4005. DOI : [10.1016/j.snb.2014.04.014](https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.04.014).

- [75] Adeline Huiling LOO, Zdenek SOFER, Daniel BOUŠA, Pavel ULBRICH, Alessandra BONANNI et Martin PUMERA. “Carboxylic Carbon Quantum Dots as a Fluorescent Sensing Platform for DNA Detection”. en. In : *ACS Applied Materials & Interfaces* 8.3 (jan. 2016), p. 1951-1957. ISSN : 1944-8244, 1944-8252. DOI : [10.1021/acsami.5b10160](https://doi.org/10.1021/acsami.5b10160).
- [76] Man-Fei SUN, Jia-Li LIU, Ya-Qin CHAI, Jin ZHANG, Ying TANG et Ruo YUAN. “Three-Dimensional Cadmium Telluride Quantum Dots–DNA Nanorectification as a Highly Efficient Electrochemiluminescent Emitter for Ultrasensitive Detection of MicroRNA from Cancer Cells”. In : *Analytical Chemistry* 91.12 (juin 2019). Publisher : American Chemical Society, p. 7765-7773. ISSN : 0003-2700. DOI : [10.1021/acs.analchem.9b01185](https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b01185).
- [77] Haiyan MA, Zongbing LI, Ning XUE, Zhiyuan CHENG et Xiangmin MIAO. “A gold nanoparticle based fluorescent probe for simultaneous recognition of single-stranded DNA and double-stranded DNA”. en. In : *Microchimica Acta* 185.2 (jan. 2018), p. 93. ISSN : 1436-5073. DOI : [10.1007/s00604-017-2633-1](https://doi.org/10.1007/s00604-017-2633-1).
- [78] Shiqian FU, Xinyan YANG, Lidong PANG, Shasha CHENG, Danliangmin SONG, Xue QIN, Chaoxin MAN et Yujun JIANG. “A Novel Fluorescence Aptasensor Based on Magnetic Beads/Gold Nanoparticles/DNA-Stabilized Silver Nanoclusters for Detection of Salmonella Typhimurium”. en. In : *Foods* 11.4 (fév. 2022), p. 595. ISSN : 2304-8158. DOI : [10.3390/foods11040595](https://doi.org/10.3390/foods11040595).
- [79] Jie LIU, Yuexiang LU, Lu FENG, Song WANG, Shixi ZHANG, Xuwei ZHU, Linfeng SHENG, Sichun ZHANG et Xinrong ZHANG. “Pinpoint the Positions of Single Nucleotide Polymorphisms by a Nanocluster Dimer”. In : *Analytical Chemistry* 89.4 (fév. 2017). Publisher : American Chemical Society, p. 2622-2627. ISSN : 0003-2700. DOI : [10.1021/acs.analchem.6b04981](https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b04981).
- [80] Kwan Woo PARK, Chang Yeol LEE, Bhagwan S. BATULE, Ki Soo PARK et Hyun Gyu PARK. “Ultrasensitive DNA detection based on target-triggered rolling circle amplification and fluorescent poly(thymine)-templated copper nanoparticles”. en. In : *RSC Advances* 8.4 (2018), p. 1958-1962. ISSN : 2046-2069. DOI : [10.1039/C7RA11071E](https://doi.org/10.1039/C7RA11071E).
- [81] David HRADETZKY, Claas MUELLER et Holger REINECKE. “Interferometric label-free biomolecular detection system”. en. In : *Journal of Optics A : Pure and Applied Optics* 8.7 (juill. 2006), S360-S364. ISSN : 1464-4258, 1741-3567. DOI : [10.1088/1464-4258/8/7/S11](https://doi.org/10.1088/1464-4258/8/7/S11).
- [82] Lars RINDORF, Poul Erik HØIBY, Jesper Bo JENSEN, Lars Hagsholm PEDERSEN, Ole BANG et Oliver GESCHKE. “Towards biochips using microstructured optical fiber sensors”. en. In : *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 385.8 (juin 2006), p. 1370. ISSN : 1618-2650. DOI : [10.1007/s00216-006-0480-8](https://doi.org/10.1007/s00216-006-0480-8).
- [83] Fabrice BARDIN, Alain BELLEMAIN, Gisèle ROGER et Michael CANVA. “Surface plasmon resonance spectro-imaging sensor for biomolecular surface interaction characterization”. en. In : *Biosensors and Bioelectronics* 24.7 (mars 2009), p. 2100-2105. ISSN : 09565663. DOI : [10.1016/j.bios.2008.10.023](https://doi.org/10.1016/j.bios.2008.10.023).

- [84] Alexandra SEREDA. “Imagerie multi-spectrale par résonance des plasmons de surface : développement et applications”. Thèse de doct.
- [85] Marek PILIARIK et Jiří HOMOLA. “Surface plasmon resonance (SPR) sensors : approaching their limits?” en. In : *Optics Express* 17.19 (sept. 2009), p. 16505. ISSN : 1094-4087. DOI : [10.1364/OE.17.016505](https://doi.org/10.1364/OE.17.016505).
- [86] Yuan LI, Alastair W. WARK, Hye Jin LEE et Robert M. CORN. “Single-Nucleotide Polymorphism Genotyping by Nanoparticle-Enhanced Surface Plasmon Resonance Imaging Measurements of Surface Ligation Reactions”. In : *Analytical Chemistry* 78.9 (mai 2006). Publisher : American Chemical Society, p. 3158-3164. ISSN : 0003-2700. DOI : [10.1021/ac0600151](https://doi.org/10.1021/ac0600151).
- [87] Wenyan NIE, Qing WANG, Xiaohai YANG, Hua ZHANG, Zhiping LI, Lei GAO, Yan ZHENG, Xiaofeng LIU et Kemin WANG. “High sensitivity surface plasmon resonance biosensor for detection of microRNA based on gold nanoparticles-decorated molybdenum sulfide”. en. In : *Analytica Chimica Acta* 993 (nov. 2017), p. 55-62. ISSN : 00032670. DOI : [10.1016/j.aca.2017.09.015](https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.09.015).
- [88] Hiroshi AOKI, Robert M. CORN et Brandon MATTHEWS. “MicroRNA detection on microsensor arrays by SPR imaging measurements with enzymatic signal enhancement”. en. In : *Biosensors and Bioelectronics* 142 (oct. 2019), p. 111565. ISSN : 09565663. DOI : [10.1016/j.bios.2019.111565](https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111565).
- [89] Frederic A. BANVILLE, Julien MOREAU, Mitradeep SARKAR, Mondher BESBES, Michael CANVA et Paul G. CHARETTE. “Spatial resolution versus contrast trade-off enhancement in high-resolution surface plasmon resonance imaging (SPRI) by metal surface nanostructure design”. en. In : *Optics Express* 26.8 (avr. 2018), p. 10616. ISSN : 1094-4087. DOI : [10.1364/OE.26.010616](https://doi.org/10.1364/OE.26.010616).
- [90] Marlo VEGA. “Étude expérimentale et théorique des effets photo-thermiques ultra-rapides dans des réseaux de nanoparticules - application au contrôle local de la chimie de surface”. fr. Thèse de doct. Université Paris-Saclay; Université de Sherbrooke, juill. 2024.
- [91] T. Andrew TATON, Chad A. MIRKIN et Robert L. LETSINGER. “Scanometric DNA Array Detection with Nanoparticle Probes”. en. In : *Science* 289.5485 (sept. 2000), p. 1757-1760. ISSN : 0036-8075, 1095-9203. DOI : [10.1126/science.289.5485.1757](https://doi.org/10.1126/science.289.5485.1757).
- [92] Robert ELGHANIAN, James J. STORHOFF, Robert C. MUCIC, Robert L. LETSINGER et Chad A. MIRKIN. “Selective Colorimetric Detection of Polynucleotides Based on the Distance-Dependent Optical Properties of Gold Nanoparticles”. en. In : *Science* 277.5329 (août 1997), p. 1078-1081. ISSN : 0036-8075, 1095-9203. DOI : [10.1126/science.277.5329.1078](https://doi.org/10.1126/science.277.5329.1078).
- [93] R. W. WOOD. “On a Remarkable Case of Uneven Distribution of Light in a Diffraction Grating Spectrum”. In : *Proceedings of the Physical Society of London* 18 (juin 1902). ADS Bibcode : 1902PPSL...18..269W, p. 269-275. ISSN : 0370-1328. DOI : [10.1088/1478-7814/18/1/325](https://doi.org/10.1088/1478-7814/18/1/325).

- [94] U. FANO. “The Theory of Anomalous Diffraction Gratings and of Quasi-Stationary Waves on Metallic Surfaces (Sommerfeld’s Waves)”. en. In : *Journal of the Optical Society of America* 31.3 (mars 1941), p. 213. ISSN : 0030-3941. DOI : [10.1364/JOSA.31.000213](https://doi.org/10.1364/JOSA.31.000213).
- [95] R.K. WANGSNES. *Electromagnetic Fields, 2nd Edition* | Wiley. en-gb. 1986.
- [96] R. H. RITCHIE. “Plasma Losses by Fast Electrons in Thin Films”. In : *Physical Review* 106.5 (juin 1957). Publisher : American Physical Society, p. 874-881. DOI : [10.1103/PhysRev.106.874](https://doi.org/10.1103/PhysRev.106.874).
- [97] Richard B. M. SCHASFOORT et Anna J. TUDOS, éd. *Handbook of Surface Plasmon Resonance*. English. 1 edition. Cambridge, UK : Royal Society of Chemistry, mars 2008. ISBN : 978-0-85404-267-8.
- [98] Bo LIEDBERG, Claes NYLANDER et Ingemar LUNSTRÖM. “Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing”. en. In : *Sensors and Actuators* 4 (jan. 1983), p. 299-304. ISSN : 0250-6874. DOI : [10.1016/0250-6874\(83\)85036-7](https://doi.org/10.1016/0250-6874(83)85036-7).
- [99] Christophe CAUCHETEUR. “Plasmons de surface : principes physiques et applications”. fr. In : (2014), p. 17.
- [100] Lionel LARTIGUE. “Développement et validation d’un système in-situ d’imagerie par résonance de plasmons de surface pour le dosage d’éléments métalliques en eau douce et en milieu marin”. fr. Thèse de doct. Université de Paris Saclay, 2023.
- [101] Jiri HOMOLA. *Surface Plasmon Resonance Based Sensors*. 1^{re} éd. Springer Series on Chemical Sensors and Biosensors 4. Springer, oct. 2006. ISBN : 978-3-540-33918-2.
- [102] Pierre LECARUYER, Emmanuel MAILLART, Michael CANVA et Jannick ROLLAND. “Generalization of the Rouard method to an absorbing thin-film stack and application to surface plasmon resonance”. EN. In : *Applied Optics* 45.33 (nov. 2006). Publisher : Optica Publishing Group, p. 8419-8423. ISSN : 2155-3165. DOI : [10.1364/AO.45.008419](https://doi.org/10.1364/AO.45.008419).
- [103] Emmanuel MAILLART. “IMAGERIE PAR RESONANCE DES PLASMONS DE SURFACE POUR L’ANALYSE SIMULTANEE DE MULTIPLES INTERACTIONS BIOMOLECULAIRES EN TEMPS REEL”. en. Thèse de doct. 2004.
- [104] Hiroshi KANO et Wolfgang KNOLL. “A scanning microscope employing localized surface-plasmon-polaritons as a sensing probe”. In : *Optics Communications* 182.1 (août 2000), p. 11-15. ISSN : 0030-4018. DOI : [10.1016/S0030-4018\(00\)00794-X](https://doi.org/10.1016/S0030-4018(00)00794-X).
- [105] Benno ROTHENHÄUSLER et Wolfgang KNOLL. “Surface-plasmon microscopy”. en. In : *Nature* 332.6165 (avr. 1988). Number : 6165 Publisher : Nature Publishing Group, p. 615-617. ISSN : 1476-4687. DOI : [10.1038/332615a0](https://doi.org/10.1038/332615a0).
- [106] Hoang Hiep NGUYEN, Jeho PARK, Sebyung KANG et Moonil KIM. “Surface Plasmon Resonance : A Versatile Technique for Biosensor Applications”. In : *Sensors (Basel, Switzerland)* 15.5 (mai 2015), p. 10481-10510. ISSN : 1424-8220. DOI : [10.3390/s150510481](https://doi.org/10.3390/s150510481).

- [107] Anuj K. SHARMA et B. D. GUPTA. "On the performance of different bimetallic combinations in surface plasmon resonance based fiber optic sensors". en. In : *Journal of Applied Physics* 101.9 (mai 2007), p. 093111. ISSN : 0021-8979, 1089-7550. DOI : [10.1063/1.2721779](https://doi.org/10.1063/1.2721779).
- [108] P. B. DANIELS, J. K. DEACON, M. J. EDDOWES et D. G. PEDLEY. "Surface plasmon resonance applied to immunosensing". en. In : *Sensors and Actuators* 15.1 (sept. 1988), p. 11-18. ISSN : 0250-6874. DOI : [10.1016/0250-6874\(88\)85013-3](https://doi.org/10.1016/0250-6874(88)85013-3).
- [109] Ralph G. NUZZO et David L. ALLARA. "Adsorption of bifunctional organic disulfides on gold surfaces". en. In : *Journal of the American Chemical Society* 105.13 (juin 1983), p. 4481-4483. ISSN : 0002-7863, 1520-5126. DOI : [10.1021/ja00351a063](https://doi.org/10.1021/ja00351a063).
- [110] Amit KUMAR, Hans A. BIEBUYCK et George M. WHITESIDES. "Patterning Self-Assembled Monolayers : Applications in Materials Science". en. In : *Langmuir* 10.5 (mai 1994), p. 1498-1511. ISSN : 0743-7463, 1520-5827. DOI : [10.1021/1a00017a030](https://doi.org/10.1021/1a00017a030).
- [111] Paul E. LAIBINIS, Ralph G. NUZZO et George M. WHITESIDES. "Structure of monolayers formed by coadsorption of two n-alkanethiols of different chain lengths on gold and its relation to wetting". In : *The Journal of Physical Chemistry* 96.12 (juin 1992). Publisher : American Chemical Society, p. 5097-5105. ISSN : 0022-3654. DOI : [10.1021/j100191a065](https://doi.org/10.1021/j100191a065).
- [112] Suk-Wah TAM-CHANG, Hans A. BIEBUYCK, George M. WHITESIDES, Nooh JEON et Ralph G. NUZZO. "Self-Assembled Monolayers on Gold Generated from Alkanethiols with the Structure RNHCOCH₂SH". In : *Langmuir* 11.11 (nov. 1995). Publisher : American Chemical Society, p. 4371-4382. ISSN : 0743-7463. DOI : [10.1021/1a00011a033](https://doi.org/10.1021/1a00011a033).
- [113] Tetsuo KAWAGUCHI, Yuji YAMAUCHI, Hatsuo MAEDA et Hidenobu OHMORI. "Gold Electrode Modified with a Self-Assembled Monolayer of Thiols as an Electrochemical Detector for Ionic Surfactants". In : *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 41.9 (1993), p. 1601-1603. DOI : [10.1248/cpb.41.1601](https://doi.org/10.1248/cpb.41.1601).
- [114] Kevin L. PRIME et George M. WHITESIDES. "Adsorption of proteins onto surfaces containing end-attached oligo(ethylene oxide) : a model system using self-assembled monolayers". en. In : *Journal of the American Chemical Society* 115.23 (nov. 1993), p. 10714-10721. ISSN : 0002-7863, 1520-5126. DOI : [10.1021/ja00076a032](https://doi.org/10.1021/ja00076a032).
- [115] Gabriel P. LOPEZ, Hans A. BIEBUYCK, Ralph HARTE, Amit KUMAR et George M. WHITESIDES. "Fabrication and imaging of two-dimensional patterns of proteins adsorbed on self-assembled monolayers by scanning electron microscopy". en. In : *Journal of the American Chemical Society* 115.23 (nov. 1993), p. 10774-10781. ISSN : 0002-7863, 1520-5126. DOI : [10.1021/ja00076a038](https://doi.org/10.1021/ja00076a038).
- [116] Li DENG, Milan MRKSICH et George M. WHITESIDES. "Self-Assembled Monolayers of Alkanethiolates Presenting Tri(propylene sulfoxide) Groups Resist the Adsorption of Protein". In : *Journal of the American Chemical Society* 118.21 (jan. 1996). Publisher : American Chemical Society, p. 5136-5137. ISSN : 0002-7863. DOI : [10.1021/ja960461d](https://doi.org/10.1021/ja960461d).

- [117] Xiaoxi CHEN, Rosaria FERRIGNO, Jerry YANG et George M. WHITESIDES. "Redox Properties of Cytochrome *c* Adsorbed on Self-Assembled Monolayers : A Probe for Protein Conformation and Orientation". en. In : *Langmuir* 18.18 (sept. 2002), p. 7009-7015. ISSN : 0743-7463, 1520-5827. DOI : [10.1021/la0204794](https://doi.org/10.1021/la0204794).
- [118] Jan BERGSTRÖM, Stefan LÖFÅS et Bo JOHNSSON. "Sensing surfaces capable of selective biomolecular interactions, to be used in biosensor systems". WO1990005303A1. Mai 1990.
- [119] Stefan LÖFÅS et Bo JOHNSSON. "A novel hydrogel matrix on gold surfaces in surface plasmon resonance sensors for fast and efficient covalent immobilization of ligands". en. In : *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 21 (1990), p. 1526-1528. ISSN : 0022-4936. DOI : [10.1039/C39900001526](https://doi.org/10.1039/C39900001526).
- [120] J. SPINKE, M. LILEY, E.-J. SCHMITT, H.-J. GUDER, L. ANGERMAIER et W. KNOLL. "Molecular recognition at self-assembled monolayers : Optimization of surface functionalization". In : *The Journal of Chemical Physics* 99.9 (nov. 1993), p. 7012-7019. ISSN : 0021-9606. DOI : [10.1063/1.465447](https://doi.org/10.1063/1.465447).
- [121] Martín GONZÁLEZ, Luis A. BAGATOLLI, Izaskun ECHABE, Jose L. R. ARRONDO, Carlos E. ARGARAÑA, Charles R. CANTOR et Gerardo D. FIDELIO. "Interaction of Biotin with Streptavidin : THERMOSTABILITY AND CONFORMATIONAL CHANGES UPON BINDING*". en. In : *Journal of Biological Chemistry* 272.17 (avr. 1997), p. 11288-11294. ISSN : 0021-9258. DOI : [10.1074/jbc.272.17.11288](https://doi.org/10.1074/jbc.272.17.11288).
- [122] Michael MECKLENBURG, Bengt DANIELSSON et Fredrick WINQVIST. "Broad specificity affinity arrays : a qualitative approach to complex sample discrimination". en. US20050164274A1. Juill. 2005.
- [123] Vitalii SILIN, Howard WEETALL et David J. VANDERAH. "SPR Studies of the Nonspecific Adsorption Kinetics of Human IgG and BSA on Gold Surfaces Modified by Self-Assembled Monolayers (SAMs)". en. In : *Journal of Colloid and Interface Science* 185.1 (jan. 1997), p. 94-103. ISSN : 0021-9797. DOI : [10.1006/jcis.1996.4586](https://doi.org/10.1006/jcis.1996.4586).
- [124] Pascale BLOND, Alice MATTIUZZI, Hennie VALKENIER, Ludovic TROIAN-GAUTIER, Jean-François BERGAMINI, Thomas DONEUX, Erik GOORMAGHTIGH, Vincent RAUSSENS et Ivan JABIN. "Grafting of Oligo(ethylene glycol)-Functionalized Calix[4]arene-Tetradiazonium Salts for Antifouling Germanium and Gold Surfaces". eng. In : *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* 34.21 (mai 2018), p. 6021-6027. ISSN : 1520-5827. DOI : [10.1021/acs.langmuir.8b00464](https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b00464).
- [125] P. HARDER, M. GRUNZE, R. DAHINT, G. M. WHITESIDES et P. E. LAIBINIS. "Molecular Conformation in Oligo(ethylene glycol)-Terminated Self-Assembled Monolayers on Gold and Silver Surfaces Determines Their Ability To Resist Protein Adsorption". In : *The Journal of Physical Chemistry B* 102.2 (jan. 1998). Publisher : American Chemical Society, p. 426-436. ISSN : 1520-6106. DOI : [10.1021/jp972635z](https://doi.org/10.1021/jp972635z).

- [126] Olivier R. BOLDUC, Joelle N. PELLETIER et Jean-François MASSON. "SPR Biosensing in Crude Serum Using Ultralow Fouling Binary Patterned Peptide SAM". In : *Analytical Chemistry* 82.9 (mai 2010). Publisher : American Chemical Society, p. 3699-3706. ISSN : 0003-2700. DOI : [10.1021/ac100035s](https://doi.org/10.1021/ac100035s).
- [127] Liuchun ZHENG, Harihara S. SUNDARAM, Zhiyong WEI, Chuncheng LI et Zhefan YUAN. "Applications of zwitterionic polymers". en. In : *Reactive and Functional Polymers* 118 (sept. 2017), p. 51-61. ISSN : 13815148. DOI : [10.1016/j.reactfunctpolym.2017.07.006](https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2017.07.006).
- [128] Olivier R. BOLDUC et Jean-François MASSON. "Monolayers of 3-Mercaptopropyl-amino Acid to Reduce the Nonspecific Adsorption of Serum Proteins on the Surface of Biosensors". In : *Langmuir* 24.20 (oct. 2008). Publisher : American Chemical Society, p. 12085-12091. ISSN : 0743-7463. DOI : [10.1021/la801861q](https://doi.org/10.1021/la801861q).
- [129] Shengfu CHEN, Zhiqiang CAO et Shaoyi JIANG. "Ultra-low fouling peptide surfaces derived from natural amino acids". en. In : *Biomaterials* 30.29 (oct. 2009), p. 5892-5896. ISSN : 0142-9612. DOI : [10.1016/j.biomaterials.2009.07.001](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.07.001).
- [130] R. Erik HOLMLIN, Xiaoxi CHEN, Robert G. CHAPMAN, Shuichi TAKAYAMA et George M. WHITESIDES. "Zwitterionic SAMs that Resist Nonspecific Adsorption of Protein from Aqueous Buffer". In : *Langmuir* 17.9 (mai 2001). Publisher : American Chemical Society, p. 2841-2850. ISSN : 0743-7463. DOI : [10.1021/la0015258](https://doi.org/10.1021/la0015258).
- [131] Norman D. BRAULT, Changlu GAO, Hong XUE, Marek PILIARIK, Jiří HOMOLA, Shaoyi JIANG et Qiuming YU. "Ultra-low fouling and functionalizable zwitterionic coatings grafted onto SiO₂ via a biomimetic adhesive group for sensing and detection in complex media". en. In : *Biosensors and Bioelectronics* 25.10 (juin 2010), p. 2276-2282. ISSN : 0956-5663. DOI : [10.1016/j.bios.2010.03.012](https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.03.012).
- [132] Simone FLEIGE et Michael W PFAFFL. "RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance". en. In : *Molecular Aspects of Medicine* (2006).
- [133] Laura G. CARRASCOSA, César S. HUERTAS et Laura M. LECHUGA. "Prospects of optical biosensors for emerging label-free RNA analysis". en. In : *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 80 (2016), p. 177-189. ISSN : 0165-9936. DOI : [10.1016/j.trac.2016.02.018](https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.02.018).
- [134] Hye Jin LEE, Alastair W. WARK et Robert M. CORN. "Enhanced bioaffinity sensing using surface plasmons, surface enzyme reactions, nanoparticles and diffraction gratings". en. In : *Analyst* 133.5 (avr. 2008). Publisher : The Royal Society of Chemistry, p. 596-601. ISSN : 1364-5528. DOI : [10.1039/B718713K](https://doi.org/10.1039/B718713K).
- [135] Wen-Juan ZHOU, Yulin CHEN et Robert M. CORN. "Ultrasensitive Microarray Detection of Short RNA Sequences with Enzymatically Modified Nanoparticles and Surface Plasmon Resonance Imaging Measurements". In : *Analytical Chemistry* 83.10 (mai 2011). Publisher : American Chemical Society, p. 3897-3902. ISSN : 0003-2700. DOI : [10.1021/ac200422u](https://doi.org/10.1021/ac200422u).

- [136] Gayatri K. JOSHI, Samantha DEITZ-MCELYEA, Merrell JOHNSON, Sonali MALI, Murray KORC et Rajesh SARDAR. "Highly Specific Plasmonic Biosensors for Ultrasensitive MicroRNA Detection in Plasma from Pancreatic Cancer Patients". In : *Nano Letters* 14.12 (déc. 2014). Publisher : American Chemical Society, p. 6955-6963. ISSN : 1530-6984. DOI : [10.1021/nl503220s](https://doi.org/10.1021/nl503220s).
- [137] Bryce P. NELSON, Mark R. LILES, Kendra B. FREDERICK, Robert M. CORN et Robert M. GOODMAN. "Label-free detection of 16S ribosomal RNA hybridization on reusable DNA arrays using surface plasmon resonance imaging". en. In : *Environmental Microbiology* 4.11 (2002). _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1046/j.1462-2920.2002.00350.x>, p. 735-743. ISSN : 1462-2920. DOI : [10.1046/j.1462-2920.2002.00350.x](https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2002.00350.x).
- [138] Hana ŠÍPOVÁ, Shile ZHANG, Aimée M. DUDLEY, David GALAS, Kai WANG et Jiří HOMOLA. "Surface Plasmon Resonance Biosensor for Rapid Label-Free Detection of Microribonucleic Acid at Subfemtomole Level". en. In : *Analytical Chemistry* 82.24 (déc. 2010), p. 10110-10115. ISSN : 0003-2700, 1520-6882. DOI : [10.1021/ac102131s](https://doi.org/10.1021/ac102131s).
- [139] J. KURRECK. "Design of antisense oligonucleotides stabilized by locked nucleic acids". en. In : *Nucleic Acids Research* 30.9 (mai 2002), p. 1911-1918. ISSN : 13624962. DOI : [10.1093/nar/30.9.1911](https://doi.org/10.1093/nar/30.9.1911).
- [140] Claes WAHLESTEDT, Peter SALMI, Liam GOOD, Johanna KELA, Thomas JOHNSSON, Tomas HÖKFELT, Christian BROBERGER, Frank PORRECA, Josephine LAI, Kunkun REN, Michael OSSISOV, Alexei KOSHKIN, Nana JAKOBSEN, Jan SKOUV, Henrik OERUM, Mogens Havsteen JACOBSEN et Jesper WENGEL. "Potent and nontoxic antisense oligonucleotides containing locked nucleic acids". In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97.10 (mai 2000). Publisher : Proceedings of the National Academy of Sciences, p. 5633-5638. DOI : [10.1073/pnas.97.10.5633](https://doi.org/10.1073/pnas.97.10.5633).
- [141] Harleen KAUR, Amit ARORA, Jesper WENGEL et Souvik MAITI. "Thermodynamic, Counterion, and Hydration Effects for the Incorporation of Locked Nucleic Acid Nucleotides into DNA Duplexes". en. In : *Biochemistry* 45.23 (juin 2006), p. 7347-7355. ISSN : 0006-2960, 1520-4995. DOI : [10.1021/bi060307w](https://doi.org/10.1021/bi060307w).
- [142] Dwaine A BRAASCH et David R COREY. "Locked nucleic acid (LNA) : fine-tuning the recognition of DNA and RNA". en. In : *Chemistry & Biology* 8.1 (jan. 2001), p. 1-7. ISSN : 10745521. DOI : [10.1016/S1074-5521\(00\)00058-2](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(00)00058-2).
- [143] Shiping FANG, Hye Jin LEE, Alastair W. WARK et Robert M. CORN. "Attomole Microarray Detection of MicroRNAs by Nanoparticle-Amplified SPR Imaging Measurements of Surface Polyadenylation Reactions". In : *Journal of the American Chemical Society* 128.43 (nov. 2006). Publisher : American Chemical Society, p. 14044-14046. ISSN : 0002-7863. DOI : [10.1021/ja065223p](https://doi.org/10.1021/ja065223p).
- [144] A. VALOCZI. "Sensitive and specific detection of microRNAs by northern blot analysis using LNA-modified oligonucleotide probes". en. In : *Nucleic Acids Research* 32.22 (déc. 2004), e175-e175. ISSN : 1362-4962. DOI : [10.1093/nar/gnh171](https://doi.org/10.1093/nar/gnh171).

- [145] Hyou-Arm JOUNG, Nae-Rym LEE, Seok Ki LEE, Junhyoung AHN, Yong Beom SHIN, Ho-Suk CHOI, Chang-Soo LEE, Sanghyo KIM et Min-Gon KIM. "High sensitivity detection of 16s rRNA using peptide nucleic acid probes and a surface plasmon resonance biosensor". en. In : *Analytica Chimica Acta* 630.2 (déc. 2008), p. 168-173. ISSN : 0003-2670. DOI : [10.1016/j.aca.2008.10.001](https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.10.001).
- [146] Peter E. NIELSEN, Michael EGHOLM, Rolf H. BERG et Ole BUCHARDT. "Sequence-Selective Recognition of DNA by Strand Displacement with a Thymine-Substituted Polyamide". In : *Science* 254.5037 (déc. 1991). Publisher : American Association for the Advancement of Science, p. 1497-1500. DOI : [10.1126/science.1962210](https://doi.org/10.1126/science.1962210).
- [147] Mohammad S. HASHEMZADEH. "Peptide nucleic acid (PNA) as a novel tool in the detection and treatment of biological threatening diseases". en. In : *Romanian Journal of Military Medicine* 124.1 (jan. 2021), p. 54-60. ISSN : 12225126, 25012312. DOI : [10.55453/rjmm.2021.124.1.7](https://doi.org/10.55453/rjmm.2021.124.1.7).
- [148] Abraham J. QAVI, Jared T. KINDT, Martin A. GLEESON et Ryan C. BAILEY. "Anti-DNA:RNA Antibodies and Silicon Photonic Microring Resonators : Increased Sensitivity for Multiplexed microRNA Detection". en. In : *Analytical Chemistry* 83.15 (août 2011), p. 5949-5956. ISSN : 0003-2700, 1520-6882. DOI : [10.1021/ac201340s](https://doi.org/10.1021/ac201340s).
- [149] Z. HU. "An antibody-based microarray assay for small RNA detection". en. In : *Nucleic Acids Research* 34.7 (avr. 2006), e52-e52. ISSN : 0305-1048, 1362-4962. DOI : [10.1093/nar/gkl142](https://doi.org/10.1093/nar/gkl142).
- [150] Keleabetswe L. MPYE, Samantha GILDENHUYS, Salerwe MOSEBI et DEPARTMENT OF LIFE AND CONSUMER SCIENCES, COLLEGE OF AGRICULTURE AND ENVIRONMENTAL SCIENCES, UNIVERSITY OF SOUTH AFRICA, PRIVATE BAG X6, FLORIDA, ROODEPOORT, SOUTH AFRICA, 1710. "The effects of temperature on streptavidin-biotin binding using affinity isothermal titration calorimetry". en. In : *AIMS Biophysics* 7.4 (2020), p. 236-247. ISSN : 2377-9098. DOI : [10.3934/biophy.2020018](https://doi.org/10.3934/biophy.2020018).
- [151] Decai ZHANG, Yurong YAN, Wei CHENG, Wei ZHANG, Yahui LI, Huangxian JU et Shijia DING. "Streptavidin-enhanced surface plasmon resonance biosensor for highly sensitive and specific detection of microRNA". en. In : *Microchimica Acta* 180.5 (avr. 2013), p. 397-403. ISSN : 1436-5073. DOI : [10.1007/s00604-013-0945-3](https://doi.org/10.1007/s00604-013-0945-3).
- [152] Robert M. DIRKS et Niles A. PIERCE. "Triggered amplification by hybridization chain reaction". In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101.43 (oct. 2004). Publisher : Proceedings of the National Academy of Sciences, p. 15275-15278. DOI : [10.1073/pnas.0407024101](https://doi.org/10.1073/pnas.0407024101).
- [153] Cheng-Yi HONG, Xian CHEN, Ting LIU, Juan LI, Huang-Hao YANG, Jing-Hua CHEN et Guo-Nan CHEN. "Ultrasensitive electrochemical detection of cancer-associated circulating microRNA in serum samples based on DNA concatamers". en. In : *Biosensors and Bioelectronics* 50 (2013), p. 132-136. ISSN : 0956-5663. DOI : [10.1016/j.bios.2013.06.040](https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.06.040).

- [154] Ting HOU, Wei LI, Xiaojuan LIU et Feng LI. “Label-Free and Enzyme-Free Homogeneous Electrochemical Biosensing Strategy Based on Hybridization Chain Reaction : A Facile, Sensitive, and Highly Specific MicroRNA Assay”. In : *Analytical Chemistry* 87.22 (nov. 2015). Publisher : American Chemical Society, p. 11368-11374. ISSN : 0003-2700. DOI : [10.1021/acs.analchem.5b02790](https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b02790).
- [155] Meijuan LIANG, Min PAN, Jialing HU, Fuan WANG et Xiaoqing LIU. “Electrochemical Biosensor for MicroRNA Detection Based on Cascade Hybridization Chain Reaction”. In : *ChemElectroChem* 5 (mars 2018). DOI : [10.1002/ce1c.201800255](https://doi.org/10.1002/ce1c.201800255).
- [156] Rongjuan LIU, Qing WANG, Qing LI, Xiaohai YANG, Kemin WANG et Wenyan NIE. “Surface plasmon resonance biosensor for sensitive detection of microRNA and cancer cell using multiple signal amplification strategy”. en. In : *Biosensors and Bioelectronics* 87 (jan. 2017), p. 433-438. ISSN : 09565663. DOI : [10.1016/j.bios.2016.08.090](https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.08.090).
- [157] Tomáš ŠPRINGER, Zdeněk KREJČÍK et Jiří HOMOLA. “Detecting attomolar concentrations of microRNA related to myelodysplastic syndromes in blood plasma using a novel sandwich assay with nanoparticle release”. en. In : *Biosensors and Bioelectronics* 194 (déc. 2021), p. 113613. ISSN : 09565663. DOI : [10.1016/j.bios.2021.113613](https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113613).
- [158] N. Scott LYNN, Tomáš ŠPRINGER, Jiří SLABÝ, Barbora ŠPAČKOVÁ, Michaela GRÁFOVÁ, Maria Laura ERMINI et Jiří HOMOLA. “Analyte transport to micro- and nano-plasmonic structures”. en. In : *Lab on a Chip* 19.24 (déc. 2019). Publisher : The Royal Society of Chemistry, p. 4117-4127. ISSN : 1473-0189. DOI : [10.1039/C9LC00699K](https://doi.org/10.1039/C9LC00699K).
- [159] Cheng FANG, Ajay AGARWAL, Kavitha Devi BUDDHARAJU, Nizamudin Mohamed KHALID, Shaik Mohamed SALIM, Effendi WIDJAJA, Marc V. GARLAND, Narayanan BALASUBRAMANIAN et Dim-Lee KWONG. “DNA detection using nanostructured SERS substrates with Rhodamine B as Raman label”. In : *Biosensors and Bioelectronics* 24.2 (oct. 2008), p. 216-221. ISSN : 0956-5663. DOI : [10.1016/j.bios.2008.03.032](https://doi.org/10.1016/j.bios.2008.03.032).
- [160] Mostafa Kamal MASUD, Jongbeom NA, Tzu-En LIN, Victor MALGRAS, Anant PREET, Abu Ali IBN SINA, Kathleen WOOD, Mutasim BILLAH, Jeonghun KIM, Jungmok YOU, Kenya KANI, Andrew E. WHITTEN, Carlos SALOMON, Nam-Trung NGUYEN, Muhammad J. A. SHIDDIKY, Matt TRAU, Md Shahriar A. HOSSAIN et Yusuke YAMAUCHI. “Nanostructured mesoporous gold biosensor for microRNA detection at attomolar level”. In : *Biosensors and Bioelectronics* 168 (nov. 2020), p. 112429. ISSN : 0956-5663. DOI : [10.1016/j.bios.2020.112429](https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112429).
- [161] Mitradeep SARKAR, Mondher BESBES, Julien MOREAU, Jean-François BRYCHE, Aurore OLIVÉRO, Grégory BARBILLON, Anne-Lise COUTROT, Bernard BARTENLIAN et Michael CANVA. “Hybrid Plasmonic Mode by Resonant Coupling of Localized Plasmons to Propagating Plasmons in a Kretschmann Configuration”. In : *ACS Photonics* (jan. 2015). ISSN : 2330-4022. DOI : [10.1021/PH500351B](https://doi.org/10.1021/PH500351B).
- [162] Jean-François BRYCHE, Marlo VEGA, Agnès TEMPEZ, Thibault BRULÉ, Thomas CARLIER, Julien MOREAU, Marc CHAIGNEAU, Paul G. CHARETTE et Michael CANVA. “Spatially-Localized Functionalization on Nanostructured Surfaces for Enhanced

- Plasmonic Sensing Efficacy”. en. In : *Nanomaterials* 12.20 (oct. 2022), p. 3586. ISSN : 2079-4991. DOI : [10.3390/nano12203586](https://doi.org/10.3390/nano12203586).
- [163] Mansoureh Z. MOUSAVI, Huai-Yi CHEN, Shu-Han WU, Shih-Wei PENG, Kuang-Li LEE, Pei-Kuen WEI et Ji-Yen CHENG. “Magnetic nanoparticle -enhanced SPR on gold nanoslits for ultra-sensitive, label-free detection of nucleic acid biomarkers”. en. In : *Analyst* 138.9 (2013). Publisher : Royal Society of Chemistry, p. 2740-2748. DOI : [10.1039/C3AN36655C](https://doi.org/10.1039/C3AN36655C).
- [164] Feichi HU, Jiying XU et Yi CHEN. “Surface Plasmon Resonance Imaging Detection of Sub-femtomolar MicroRNA”. In : *Analytical Chemistry* 89.18 (sept. 2017). Publisher : American Chemical Society, p. 10071-10077. ISSN : 0003-2700. DOI : [10.1021/acs.analchem.7b02838](https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b02838).
- [165] Pengxiang ZHAO, Na LI et Didier ASTRUC. “State of the art in gold nanoparticle synthesis”. In : *Coordination Chemistry Reviews* 257.3 (fév. 2013), p. 638-665. ISSN : 0010-8545. DOI : [10.1016/j.ccr.2012.09.002](https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.09.002).
- [166] John TURKEVICH, Peter Cooper STEVENSON et James HILLIER. “A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold”. en. In : *Discussions of the Faraday Society* 11 (1951), p. 55. ISSN : 0366-9033. DOI : [10.1039/df9511100055](https://doi.org/10.1039/df9511100055).
- [167] G. FRENS. “Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions”. en. In : *Nature Physical Science* 241.105 (jan. 1973), p. 20-22. ISSN : 0300-8746, 2058-1106. DOI : [10.1038/physci241020a0](https://doi.org/10.1038/physci241020a0).
- [168] Sankar Kalidas SIVARAMAN, Sanjeev KUMAR et Venugopal SANTHANAM. “Monodisperse sub-10nm gold nanoparticles by reversing the order of addition in Turkevich method – The role of chloroauric acid”. en. In : *Journal of Colloid and Interface Science* 361.2 (sept. 2011), p. 543-547. ISSN : 00219797. DOI : [10.1016/j.jcis.2011.06.015](https://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.06.015).
- [169] J. W. SLOT et H. J. GEUZE. “A new method of preparing gold probes for multiple-labeling cytochemistry”. eng. In : *European Journal of Cell Biology* 38.1 (juill. 1985), p. 87-93. ISSN : 0171-9335.
- [170] Kenneth R. BROWN, Audrey P. FOX et Michael J. NATAN. “Morphology-Dependent Electrochemistry of Cytochrome *c* at Au Colloid-Modified SnO₂ Electrodes”. en. In : *Journal of the American Chemical Society* 118.5 (jan. 1996), p. 1154-1157. ISSN : 0002-7863, 1520-5126. DOI : [10.1021/ja952951w](https://doi.org/10.1021/ja952951w).
- [171] Michael GIERSIG et Paul MULVANEY. “Preparation of ordered colloid monolayers by electrophoretic deposition”. en. In : *Langmuir* 9.12 (déc. 1993), p. 3408-3413. ISSN : 0743-7463, 1520-5827. DOI : [10.1021/la00036a014](https://doi.org/10.1021/la00036a014).
- [172] Mathias BRUST, Meryll WALKER, Donald BETHELL, David J. SCHIFFRIN et Robin WHYMAN. “Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase Liquid-Liquid system”. en. In : *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 0.7 (1994), p. 801-802. ISSN : 0022-4936. DOI : [10.1039/C39940000801](https://doi.org/10.1039/C39940000801).

- [173] M. ANNADHASAN, J. KASTHURI et N. RAJENDIRAN. "Green synthesis of gold nanoparticles under sunlight irradiation and their colorimetric detection of Ni²⁺ and Co²⁺ ions". en. In : *RSC Advances* 5.15 (2015), p. 11458-11468. ISSN : 2046-2069. DOI : [10.1039/C4RA14034F](https://doi.org/10.1039/C4RA14034F).
- [174] Ilay Sema UNAL, Ayse DEMIRBAS, Irem ONAL, Nilay ILDIZ et Ismail OCSOY. "One step preparation of stable gold nanoparticle using red cabbage extracts under UV light and its catalytic activity". en. In : *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 204 (mars 2020), p. 111800. ISSN : 10111344. DOI : [10.1016/j.jphotobiol.2020.111800](https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111800).
- [175] Phan Ha Nu DIEM, Doan Thi Thu THAO, Dang Van PHU, Nguyen Ngoc DUY, Hoang Thi Dong QUY, Tran Thai HOA et Nguyen Quoc HIEN. "Synthesis of Gold Nanoparticles Stabilized in Dextran Solution by Gamma Co-60 Ray Irradiation and Preparation of Gold Nanoparticles/Dextran Powder". en. In : *Journal of Chemistry* 2017.1 (2017). _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1155/2017/6836375>, p. 6836375. ISSN : 2090-9071. DOI : [10.1155/2017/6836375](https://doi.org/10.1155/2017/6836375).
- [176] Nicole JARA, Nataly S. MILÁN, Ashiqur RAHMAN, Lynda MOUHEB, Daria C. BOFFITO, Clayton JEFFRYES et Si Amar DAHOUMANE. "Photochemical Synthesis of Gold and Silver Nanoparticles—A Review". en. In : *Molecules* 26.15 (juill. 2021), p. 4585. ISSN : 1420-3049. DOI : [10.3390/molecules26154585](https://doi.org/10.3390/molecules26154585).
- [177] Jing CHENG, Lan GE, Bin XIONG et Yan HE. "Investigation of pH Effect on Gold Nanorod Synthesis". en. In : *Journal of the Chinese Chemical Society* 58.6 (2011). _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/jccs.201190128>, p. 822-827. ISSN : 2192-6549. DOI : [10.1002/jccs.201190128](https://doi.org/10.1002/jccs.201190128).
- [178] Timothy J. MERKEL, Kevin P. HERLIHY, Janine NUNES, Ryan M. ORGEL, Jason P. ROLLAND et Joseph M. DESIMONE. "Scalable, Shape-Specific, Top-Down Fabrication Methods for the Synthesis of Engineered Colloidal Particles". In : *Langmuir* 26.16 (août 2010). Publisher : American Chemical Society, p. 13086-13096. ISSN : 0743-7463. DOI : [10.1021/1a903890h](https://doi.org/10.1021/1a903890h).
- [179] Jean-Philippe SYLVESTRE, Andrei V. KABASHIN, Edward SACHER, Michel MEUNIER et John H. T. LUONG. "Stabilization and Size Control of Gold Nanoparticles during Laser Ablation in Aqueous Cyclodextrins". In : *Journal of the American Chemical Society* 126.23 (juin 2004). Publisher : American Chemical Society, p. 7176-7177. ISSN : 0002-7863. DOI : [10.1021/ja048678s](https://doi.org/10.1021/ja048678s).
- [180] Vincenzo AMENDOLA et Moreno MENEGHETTI. "What controls the composition and the structure of nanomaterials generated by laser ablation in liquid solution?" en. In : *Physical Chemistry Chemical Physics* 15.9 (fév. 2013). Publisher : The Royal Society of Chemistry, p. 3027-3046. ISSN : 1463-9084. DOI : [10.1039/C2CP42895D](https://doi.org/10.1039/C2CP42895D).
- [181] Kamal ABDERRAFI, Raul GARCIA-CALZADA, M. GONGALSKY, Isaac SUAREZ, Rafael ABARGUES LÓPEZ, Victor TIMOSHENKO, Rafael IBANEZ et J. MARTNEZ-PASTOR. "Silicon Nanocrystals Produced by Nanosecond Laser Ablation in an Organic Liquid". In : *J. Phys. Chem. C* 115 (fév. 2011), p. 5147.

- [182] Luciana PEREIRA, Farrakh MEHBOOB, Alfons J. M. STAMS, Manuel M. MOTA, Huub H. M. RIJNAARTS et M. Madalena ALVES. “Metallic nanoparticles : microbial synthesis and unique properties for biotechnological applications, bioavailability and biotransformation”. In : *Critical Reviews in Biotechnology* 35.1 (jan. 2015). Publisher : Taylor & Francis _eprint : <https://doi.org/10.3109/07388551.2013.819484>, p. 114-128. ISSN : 0738-8551. DOI : [10.3109/07388551.2013.819484](https://doi.org/10.3109/07388551.2013.819484).
- [183] Shiv Shankar SANGARU, Absar AHMAD, Renu PASRICHA et Murali SASTRY. “Bioreduction of chloroaurate ions by Geranium leaves and its endophytic fungus yields gold nanoparticles of different shapes”. In : *Journal of Materials Chemistry* 13 (juill. 2003), p. 1822-1826. DOI : [10.1039/B303808B](https://doi.org/10.1039/B303808B).
- [184] Syed BAKER, Devaraju RAKSHITH, Kumara Shanthamma KAVITHA, Parthasarathy SANTOSH, Holalu Umapathy KAVITHA, Yashavantha RAO et Sreedharamurthy SATISH. “Plants : Emerging as Nanofactories towards Facile Route in Synthesis of Nanoparticles”. In : *BioImpacts : BI* 3.3 (2013), p. 111-117. ISSN : 2228-5652. DOI : [10.5681/bi.2013.012](https://doi.org/10.5681/bi.2013.012).
- [185] Wilhelm R. GLOMM. “Functionalized Gold Nanoparticles for Applications in Bionanotechnology”. In : *Journal of Dispersion Science and Technology* 26.3 (mai 2005). Publisher : Taylor & Francis _eprint : <https://doi.org/10.1081/DIS-200052457>, p. 389-414. ISSN : 0193-2691. DOI : [10.1081/DIS-200052457](https://doi.org/10.1081/DIS-200052457).
- [186] James R NICOL, Dorian DIXON et Jonathan A COULTER. “Gold Nanoparticle Surface Functionalization : A Necessary Requirement in the Development of Novel Nanotherapeutics”. In : *Nanomedicine* 10.8 (avr. 2015). Publisher : Taylor & Francis _eprint : <https://doi.org/10.2217/nnm.14.219>, p. 1315-1326. ISSN : 1743-5889. DOI : [10.2217/nnm.14.219](https://doi.org/10.2217/nnm.14.219).
- [187] David J. JAVIER, Nitin NITIN, Matthew LEVY, Andrew ELLINGTON et Rebecca RICHARDS-KORTUM. “Aptamer-Targeted Gold Nanoparticles As Molecular-Specific Contrast Agents for Reflectance Imaging”. In : *Bioconjugate Chemistry* 19.6 (juin 2008). Publisher : American Chemical Society, p. 1309-1312. ISSN : 1043-1802. DOI : [10.1021/bc8001248](https://doi.org/10.1021/bc8001248).
- [188] James J. STORHOFF, Robert ELGHANIAN, Chad A. MIRKIN et Robert L. LETSINGER. “Sequence-Dependent Stability of DNA-Modified Gold Nanoparticles”. en. In : *Langmuir* 18.17 (août 2002), p. 6666-6670. ISSN : 0743-7463, 1520-5827. DOI : [10.1021/la0202428](https://doi.org/10.1021/la0202428).
- [189] Shangfeng DU, Kevin KENDALL, Panteha TOLOUEINIA, Yasamin MEHRABADI, Gaurav GUPTA et Jill NEWTON. “Aggregation and adhesion of gold nanoparticles in phosphate buffered saline”. en. In : *Journal of Nanoparticle Research* 14.3 (mars 2012), p. 758. ISSN : 1388-0764, 1572-896X. DOI : [10.1007/s11051-012-0758-z](https://doi.org/10.1007/s11051-012-0758-z).
- [190] D. F. WILLIAMS, I. N. ASKILL et R. SMITH. “Protein adsorption and desorption phenomena on clean metal surfaces”. en. In : *Journal of Biomedical Materials Research* 19.3 (1985). _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/jbm.820190312>, p. 313-320. ISSN : 1097-4636. DOI : [10.1002/jbm.820190312](https://doi.org/10.1002/jbm.820190312).

- [191] Morteza MAHMOUDI, Iseult LYNCH, Mohammad Reza EJTEHADI, Marco P. MONOPOLI, Francesca Baldelli BOMBELLI et Sophie LAURENT. "ProteinNanoparticle Interactions : Opportunities and Challenges". en. In : *Chemical Reviews* 111.9 (sept. 2011), p. 5610-5637. ISSN : 0009-2665, 1520-6890. DOI : [10.1021/cr100440g](https://doi.org/10.1021/cr100440g).
- [192] Roberta D'AGATA, Pasquale PALLADINO et Giuseppe SPOTO. "Streptavidin-coated gold nanoparticles : critical role of oligonucleotides on stability and fractal aggregation". In : *Beilstein Journal of Nanotechnology* 8 (jan. 2017), p. 1-11. ISSN : 2190-4286. DOI : [10.3762/bjnano.8.1](https://doi.org/10.3762/bjnano.8.1).
- [193] Jashmini DEKA, Rostislav MĚCH, Luca IANESELLI, Heinz AMENITSCH, Fernando CACHO-NERIN, Pietro PARISSÉ et Loredana CASALIS. "Surface Passivation Improves the Synthesis of Highly Stable and Specific DNA-Functionalized Gold Nanoparticles with Variable DNA Density". In : *ACS Applied Materials & Interfaces* 7.12 (avr. 2015). Publisher : American Chemical Society, p. 7033-7040. ISSN : 1944-8244. DOI : [10.1021/acsami.5b01191](https://doi.org/10.1021/acsami.5b01191).
- [194] José Alberto ZAMORA-JUSTO, Paulina ABRICA-GONZÁLEZ, Guillermo Rocaél VÁZQUEZ-MARTÍNEZ, Alejandro MUÑOZ-DIOSDADO, José Abraham BALDERAS-LÓPEZ et Miguel IBÁÑEZ-HERNÁNDEZ. "Polyethylene Glycol-Coated Gold Nanoparticles as DNA and Atorvastatin Delivery Systems and Cytotoxicity Evaluation". en. In : *Journal of Nanomaterials* 2019.1 (2019). _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1155/2019/5982047>, p. 5982047. ISSN : 1687-4129. DOI : [10.1155/2019/5982047](https://doi.org/10.1155/2019/5982047).
- [195] Jiaoqi HUANG, Yang ZHANG, Zhongquan LIN, Wei LIU, Xueping CHEN, Yu LIU, Huiyan TIAN, Qiqian LIU, Raymond GILLIBERT, Jolanda SPADAVECCHIA, Nadia DJAKER, Marc Lamy de la CHAPELLE, Yang XIANG et Weiling FU. "Femtomolar detection of nucleic acid based on functionalized gold nanoparticles". en. In : *Nanophotonics* 8.9 (sept. 2019). Publisher : De Gruyter, p. 1495-1503. ISSN : 2192-8614. DOI : [10.1515/nanoph-2019-0050](https://doi.org/10.1515/nanoph-2019-0050).
- [196] Todd M SQUIRES, Robert J MESSINGER et Scott R MANALIS. "Making it stick : convection, reaction and diffusion in surface-based biosensors". en. In : *Nature Biotechnology* 26.4 (avr. 2008), p. 417-426. ISSN : 1087-0156, 1546-1696. DOI : [10.1038/nbt1388](https://doi.org/10.1038/nbt1388).
- [197] Jean CACHEUX, Marie BRUT, Aurélien BANCAUD, Pierre CORDELIER et Thierry LEÏCHLÉ. "Spatial Analysis of Nanofluidic-Embedded Biosensors for Wash-Free Single-Nucleotide Difference Discrimination". en. In : *ACS Sensors* 3.3 (mars 2018), p. 606-611. ISSN : 2379-3694, 2379-3694. DOI : [10.1021/acssensors.7b00667](https://doi.org/10.1021/acssensors.7b00667).
- [198] Roy M. WAXLER et G.W. CLEEK. "The effect of temperature and pressure on the refractive index of some oxide glasses". en. In : *Journal of Research of the National Bureau of Standards Section A : Physics and Chemistry* 77A.6 (nov. 1973), p. 755. ISSN : 0022-4332. DOI : [10.6028/jres.077A.046](https://doi.org/10.6028/jres.077A.046).

- [199] Daniel J. O'SHANNESY et Donald J. WINZOR. "Interpretation of Deviations from Pseudo-First-Order Kinetic Behavior in the Characterization of Ligand Binding by Biosensor Technology". en. In : *Analytical Biochemistry* 236.2 (mai 1996), p. 275-283. ISSN : 00032697. DOI : [10.1006/abio.1996.0167](https://doi.org/10.1006/abio.1996.0167).
- [200] Jiří HOMOLA. "Present and future of surface plasmon resonance biosensors". en. In : *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 377.3 (oct. 2003), p. 528-539. ISSN : 1618-2650. DOI : [10.1007/s00216-003-2101-0](https://doi.org/10.1007/s00216-003-2101-0).
- [201] Paul R. EDWARDS et Robin J. LEATHERBARROW. "Determination of Association Rate Constants by an Optical Biosensor Using Initial Rate Analysis". en. In : *Analytical Biochemistry* 246.1 (mars 1997), p. 1-6. ISSN : 0003-2697. DOI : [10.1006/abio.1996.9922](https://doi.org/10.1006/abio.1996.9922).
- [202] Yonghai SONG, Lingli WAN, Yu WANG, Sucai ZHAO, Haoqing HOU et Li WANG. "Electron transfer and electrocatalytics of cytochrome *c* and horseradish peroxidase on DNA modified electrode". In : *Bioelectrochemistry* 85 (juin 2012), p. 29-35. ISSN : 1567-5394. DOI : [10.1016/j.bioelechem.2011.11.007](https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2011.11.007).
- [203] Huanwen HAN, Norhayati Binti SABANI, Kazuyuki NOBUSAWA, Fumie TAKEI, Kazuhiko NAKATANI et Ichiro YAMASHITA. "On-Demand Ligand-Base DNA Sensor with Electrochemical Impedance Spectroscopy". In : *Analytical Chemistry* 95.26 (juill. 2023). Publisher : American Chemical Society, p. 9729-9733. ISSN : 0003-2700. DOI : [10.1021/acs.analchem.3c01126](https://doi.org/10.1021/acs.analchem.3c01126).
- [204] Ilaria MANNELLI, Laure LECERF, Mohamed GUERROUACHE, Michel GOOSSENS, Marie-Claude MILLOT et Michael CANVA. "DNA immobilisation procedures for surface plasmon resonance imaging (SPRI) based microarray systems". en. In : *Biosensors and Bioelectronics* 22.6 (jan. 2007), p. 803-809. ISSN : 0956-5663. DOI : [10.1016/j.bios.2006.02.022](https://doi.org/10.1016/j.bios.2006.02.022).
- [205] Colin D. BAIN, Joe EVALL et George M. WHITESIDES. "Formation of monolayers by the coadsorption of thiols on gold : variation in the head group, tail group, and solvent". In : *Journal of the American Chemical Society* 111.18 (août 1989). Publisher : American Chemical Society, p. 7155-7164. ISSN : 0002-7863. DOI : [10.1021/ja00200a039](https://doi.org/10.1021/ja00200a039).
- [206] B GE et F LISDAT. "Superoxide sensor based on cytochrome *c* immobilized on mixed-thiol SAM with a new calibration method". en. In : *Analytica Chimica Acta* 454.1 (mars 2002), p. 53-64. ISSN : 0003-2670. DOI : [10.1016/S0003-2670\(01\)01545-8](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)01545-8).
- [207] Elisabeth BRIAND, Michèle SALMAIN, Jean-Marie HERRY, Hubert PERROT, Chantal COMPÈRE et Claire-Marie PRADIER. "Building of an immunosensor : How can the composition and structure of the thiol attachment layer affect the immunosensor efficiency?" en. In : *Biosensors and Bioelectronics*. Selected Papers from Synthetic Receptors 2005 22.3 (sept. 2006), p. 440-448. ISSN : 0956-5663. DOI : [10.1016/j.bios.2006.05.018](https://doi.org/10.1016/j.bios.2006.05.018).

- [208] A. Jorge GUIOMAR, James T. GUTHRIE et Stephen D. EVANS. "Use of Mixed Self-Assembled Monolayers in a Study of the Effect of the Microenvironment on Immobilized Glucose Oxidase". en. In : *Langmuir* 15.4 (fév. 1999), p. 1198-1207. ISSN : 0743-7463, 1520-5827. DOI : [10.1021/1a980974t](https://doi.org/10.1021/1a980974t).
- [209] Colin D. BAIN, E. Barry TROUGHTON, Yu Tai TAO, Joseph EVALL, George M. WHITESIDES et Ralph G. NUZZO. "Formation of monolayer films by the spontaneous assembly of organic thiols from solution onto gold". In : *Journal of the American Chemical Society* 111.1 (jan. 1989). Publisher : American Chemical Society, p. 321-335. ISSN : 0002-7863. DOI : [10.1021/ja00183a049](https://doi.org/10.1021/ja00183a049).
- [210] RUNE THOMSEN, PETER STEIN NIELSEN et TORBEN HEICK JENSEN. "Dramatically improved RNA in situ hybridization signals using LNA-modified probes". In : *RNA* 11.11 (nov. 2005), p. 1745-1748. ISSN : 1355-8382. DOI : [10.1261/rna.2139705](https://doi.org/10.1261/rna.2139705).
- [211] Sakari KAUPPINEN, Birte VESTER et Jesper WENGEL. "Locked nucleic acid (LNA) : High affinity targeting of RNA for diagnostics and therapeutics". en. In : *Drug Discovery Today : Technologies* 2.3 (sept. 2005), p. 287-290. ISSN : 1740-6749. DOI : [10.1016/j.ddtec.2005.08.012](https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2005.08.012).
- [212] Jolanda SPADAVECCHIA, Dania MOVIA, Caroline MOORE, Ciaran MANUS MAGUIRE, Hanane MOUSTAOU, Sandra CASALE, Yuri VOLKOV et Adriele PRINA-MELLO. "Targeted polyethylene glycol gold nanoparticles for the treatment of pancreatic cancer : from synthesis to proof-of-concept in vitro studies". en. In : *International Journal of Nanomedicine* (fév. 2016), p. 791. ISSN : 1178-2013. DOI : [10.2147/IJN.S97476](https://doi.org/10.2147/IJN.S97476).
- [213] Frank H. STEPHENSON. "2 - Solutions, Mixtures, and Media". In : *Calculations for Molecular Biology and Biotechnology*. Sous la dir. de Frank H. STEPHENSON. Burlington : Academic Press, jan. 2003, p. 18-41. ISBN : 978-0-12-665751-7. DOI : [10.1016/B978-012665751-7/50043-3](https://doi.org/10.1016/B978-012665751-7/50043-3).
- [214] Carel Jan van OSS, Rossman F. GIESE, Paul M. BRONSON, Aristides DOCOSLIS, Paul EDWARDS et William T. RUYECHAN. "Macroscopic-scale surface properties of streptavidin and their influence on aspecific interactions between streptavidin and dissolved biopolymers". In : *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces* 30.1 (juill. 2003), p. 25-36. ISSN : 0927-7765. DOI : [10.1016/S0927-7765\(03\)00025-0](https://doi.org/10.1016/S0927-7765(03)00025-0).
- [215] Robert NORTON, Michael HEUZENROEDER et Paul A MANNING. "Non-Specific Serum Binding to Streptavidin in a Biotinylated Peptide Based Enzyme Immunoassay". In : *Journal of Immunoassay* 17.3 (août 1996). Publisher : Taylor & Francis _eprint : <https://doi.org/10.1080/01971529608005788>, p. 195-204. ISSN : 0197-1522. DOI : [10.1080/01971529608005788](https://doi.org/10.1080/01971529608005788).
- [216] Zhuo ZHANG, Yong-Wen QIN, Gary BREWER et Qing JING. "MicroRNA degradation and turnover : regulating the regulators". en. In : *Wiley interdisciplinary reviews. RNA* 3.4 (mars 2012), p. 593. DOI : [10.1002/wrna.1114](https://doi.org/10.1002/wrna.1114).
- [217] Jacob O'BRIEN, Heyam HAYDER, Yara ZAYED et Chun PENG. "Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation". en. In : *Frontiers in Endocrinology* 9 (août 2018), p. 402. ISSN : 1664-2392. DOI : [10.3389/fendo.2018.00402](https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00402).

- [218] Hiroyuki ASANUMA, Xingguo LIANG, Hidenori NISHIOKA, Daijiro MATSUNAGA, Mingzhe LIU et Makoto KOMIYAMA. "Synthesis of azobenzene-tethered DNA for reversible photo-regulation of DNA functions : hybridization and transcription". en. In : *Nature Protocols* 2.1 (jan. 2007). Number : 1 Publisher : Nature Publishing Group, p. 203-212. ISSN : 1750-2799. DOI : [10.1038/nprot.2006.465](https://doi.org/10.1038/nprot.2006.465).
- [219] Hiroyuki ASANUMA, Teruchika ISHIKAWA, Yuuhei YAMANO, Keiji MURAYAMA et Xingguo LIANG. "cis-On/trans-Off of DNA Hybridization with Alkylthio-azobenzene on L-Threoninol Responding to Visible Light". en. In : *ChemPhotoChem* 3.6 (2019). _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/cptc.201900060>, p. 418-424. ISSN : 2367-0932. DOI : [10.1002/cptc.201900060](https://doi.org/10.1002/cptc.201900060).
- [220] Anton KUZYSK, Yangyang YANG, Xiaoyang DUAN, Simon STOLL, Alexander O. GOVOROV, Hiroshi SUGIYAMA, Masayuki ENDO et Na LIU. "A light-driven three-dimensional plasmonic nanosystem that translates molecular motion into reversible chiroptical function". en. In : *Nature Communications* 7.1 (fév. 2016). Number : 1 Publisher : Nature Publishing Group, p. 10591. ISSN : 2041-1723. DOI : [10.1038/ncomms10591](https://doi.org/10.1038/ncomms10591).
- [221] Kevin RAIBER, Andreas TERFORT, Carsten BENNDORF, Norman KRINGS et Hans-Henning STREHBLOW. "Removal of self-assembled monolayers of alkanethiolates on gold by plasma cleaning". en. In : *Surface Science* 595.1-3 (déc. 2005), p. 56-63. ISSN : 00396028. DOI : [10.1016/j.susc.2005.07.038](https://doi.org/10.1016/j.susc.2005.07.038).