SPIM

Thèse de Doctorat

école doctorale **sciences pour l'ingénieur et microtechniques**

UFC UNIVERSITÉ DE FRANCHE-COMTÉ

Développement d'une plateforme pour l'analyse sur puce d'un biomarqueur par couplage des technologies de résonance des plasmons de surface et de spectrométrie de masse (Plateforme SUPRA-MS)

FABIEN REMY-MARTIN

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE FRANCHE COMTÉ

Délivré par :

L'UFR DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DE L'UNIVERISTÉ DE FRANCHE COMTÉ

Discipline ou spécialité :

Sciences pour l'ingénieur

Présentée et soutenue par :

Fabien Rémy-Martin

Soutenue le : Jeudi 4 juillet 2013

TITRE :

Développement d'une plateforme pour l'analyse sur puce d'un biomarqueur par couplage des technologies de résonance des plasmons de surface et de spectrométrie de masse (Plateforme SUPRA-MS)

JURY

Wilfrid BOIREAU	Carole CHAIX
Patrick DUCOROY	Chiraz FRYDMAN
Thérèse LEBLOIS	Thierry LIVACHE

Ecole doctorale :

Sciences pour l'ingénieur et microtechnique

Unité de recherche :

FEMTO-ST / MN2S / MIMU

Directeur(s) de Thèse :

Wilfrid BOIREAU et Thérèse LEBLOIS

Rapporteurs :

Carole CHAIX et Thierry LIVACHE

Résumé

L'approche analytique d'interrogation sur puce par spectrométrie de masse est une technique particulièrement bien adaptée à l'analyse multiplexée requise pour la recherche de biomarqueurs dans le diagnostic moderne. L'objectif a été de contribuer aux développements technologiques et méthodologiques d'une plateforme d'analyse baptisée SUPRA-MS (Imagerie par Résonance des Plasmons de Surface en array combinée à la Spectrométrie de Masse). Des puces d'or compatibles avec la SPRi et la MS ont été conçues et réalisées à l'aide des techniques de dépôt sous vide. Une étude originale couplant la SPRi avec l'AFM a permis d'établir une relation entre le signal SPR mesuré et la quantité réelle de protéines fixées sur des puces nanostructurées. Nous avons ensuite développé une procédure d'immobilisation en format array (16 à 96 spots) par liaison covalente en monocouche des anticorps spécifiques, dirigés contre un biomarqueur du cancer du sein (LAG3) pour une analyse multiplexée d'échantillons biologiques. Du plasma humain contenant 300 ng/mL de LAG3 est injecté à la surface de la puce. L'injection est suivie en temps réel par SPRi et conduit à une capture du biomarqueur à l'échelle de la femtomole par spots. Un traitement collectif des spots par spray pour la digestion in situ des protéines et le dépôt de matrice en vue d'une interrogation MS en MALDI-TOF a été mis au point par l'équipe du Dr Patrick Ducoroy (CLIPP-CHU Dijon). Les résultats MS obtenues ont permis 100 % d'identification du biomarqueur. Cette technologie sans marquages spécifiques est particulièrement bien adaptée à la caractérisation fine des biomarqueurs et à la discrimination de variants protéiques.

Mots-clés: biomarqueurs, protéomique, couplage SPR - MS, sans marquage, variant protéique, microarrays, analyses multiplexées, échantillons biologiques

Summary

The analytic approach of interrogation on chip by mass spectrometry is a suitable technique to multiplexed analysis required for biomarker research in modern diagnosis. The aim was to contribute to the technological and methodological developments of analysis platform called SUPRA-MS (Surface Plasmon Resonance in Array coupled to Mass Spectrometry) whose goal is to provide additional data to assay on the target protein by mass spectrometry. At first, gold chips compatible with SPRi and MS were designed and fabricated using vacuum deposition techniques. An original study coupling SPRi with AFM has established a relationship between the SPR signal measured and the real amount of proteins bound to nanostructured chips. We developed an immobilization procedure in array format (spots 16-96) by covalent monolayer of specific antibodies directed against the protein LAG3, a biomarker of breast cancer for multiplex analysis of human biological samples (plasma). Human plasma containing 300 ng/mL of LAG3 is injected to the chip surface. The injection is monitored in real time by SPRi and leads to the biomarker capture at the femtomole scale. After the biosensing step, a collective treatment of spots by spray for in situ protein digestion and matrix deposition in view of a MS analysis was developed by Dr. Patrick Ducoroy's team (CLIPP-CHU Dijon). The MS and MS-MS analysis by MALDI-TOF was developed to analyze all spots automatically and determine their peptide mapping leading to 100% of the biomarker identification. This technology does not require the use of specific markers, is suitable to the biomarkers characterization and discrimination of protein variants.

Keywords: biomarkers, proteomic, SPR-MS coupling, label free, protein variant, microarrays, multiplex analysis, biological samples

Remerciements

Je remercie tout d'abord les membres du jury, Thierry Livache et Carole Chaix pour m'avoir fait l'honneur de juger mon travail en tant que rapporteur, ainsi que Chiraz Frydman et Patrick Ducoroy qui ont accepté de participer à ce jury. L'intérêt que vous portez à mon travail me touche particulièrement.

Je remercie également Michel De Labachelerie, directeur de l'institut Femto-ST, pour m'avoir permis d'effectuer ma thèse dans ce laboratoire.

Je tenais à remercier tout particulièrement ma directrice de thèse, Thérèse Leblois et mon co directeur Wilfrid Boireau.

"Thérèse, tu dois rêver à des journées de 40 heures, mais malgré tes journées bien remplies tu as toujours su me consacrer du temps. Ta patience (et dieu sait qu'il en a fallu pour corriger le manuscrit) et ton expérience tant dans le milieu des microtechniques que dans la vie du scientifique font que c'était un réel plaisir de travailler avec toi".

"Wilfrid, mon mentor de la biopuce, tes connaissances dans le domaine sont impressionnantes et ton plaisir à les partager m'ont été une aide précieuse à l'avancement de ma thèse. Tu as toujours été disponible pour m'aider à surmonter les nombreux obstacles qui ont jalonné mon chemin. Je voulais te remercier pour ta sympathie qui crée une ambiance conviviale au sein de l'équipe. On s'y sent très vite chez soi et accepté par tous les collègues. Les petites réunions d'équipe et les sorties à Amsterdam vont me manquer..."

Je tiens à exprimer ma gratitude à la société Horiba-Scientific et tout particulièrement à Didier-Luc Brunet et Chiraz Frydman pour avoir financé mon travail de thèse. J'ai été très heureux d'avoir été suivi par Sophie Bellon qui malgré la distance a toujours été disponible. Je remercie aussi Karen Mercier, Emmanuel Maillart et Géraldine Mellizi ainsi que l'ensemble de l'équipe pour leurs conseils et expertises sur la technologie SPRi. Je remercie chaleureusement Chiraz pour la confiance qu'elle m'a accordée, sa sympathie et sa disponibilité malgré son emploi du temps bien chargé.

Mes remerciements s'adressent tout particulièrement à Patrick Ducoroy et à toute son équipe de massistes de l'IFR SANTE STICE de Dijon qu'il dirige, sans qui cette thèse n'aurait jamais vu le jour. Je remercie Géraldine Lucchi qui a procédé dans un premier temps à l'analyse de mes échantillons puis qui a très vite été relayé par son jeune Padawan Marven

El Osta. Cela a été un réel plaisir de travailler avec vous. Je remercie encore une fois Patrick pour ses conseils, ses remarques toujours constructives et sa bonne humeur qui nous ont permis de mener à bien ce projet.

Mes remerciements vont aussi à toutes les personnes avec qui j'ai pu travailler de près ou de loin. Je remercie Céline Eli Caille pour ses conseils et sa formation très complète sur l'AFM, ainsi qu'Eric Lesniewska de l'ICB de Dijon pour m'avoir fait découvrir les joies du PEAK Force.

Je remercie également Rabah Zeggari pour m'avoir fournis en puce d'or d'excellente qualité même s'il fallait parfois un peu marchander :-). Je te remercie pour ta rigueur de travail et ton soutient d'ancien doctorant.

Je remercie bien évidement les acteurs principaux du laboratoire de protéomique de Femto-ST. Alain, sous tes airs de râleur, tu es toujours prêt à donner un coup de main, nos petites compétitions de spotting nous aurons permis de rechercher l'excellence tout en s'amusant. Il y a ensuite la mascote de l'équipe, Benoit, toujours partant pour une bataille de pissette d'eau, tes petits pas de course devant les fenêtres du labo me feront toujours rire.

Je n'oublierai pas de remercier tous les stagiaires, doctorant, post-doctorant, enseignant-chercheur ou chargés de recherche avec qui j'ai pu partager de bons moments. Spéciale dédicace à Alex, Guillaume, Alexia, Vivien, Simon, Ludovic, Stéphanie, Karine et Khaled.

Je remercie enfin mes parents qui m'ont toujours soutenu dans mes études.

SOMMAIRE

SOMMAIRE 9

INTRODUCTION 15

I. CONTEXTE 19

I.1. Biodétection 19

I.1.1 Biomarqueurs 19

I.1.1.1 Définition 19

I.1.1.2 Types de biomarqueurs 20

I.1.1.3 Les biomarqueurs protéiques 21

I.1.1.4 Validation des biomarqueurs 23

I.1.2 Structure d'une protéine 24

I.1.3 Dosage des protéines 25

I.1.3.1 Stratégies 28

I.1.3.2 Interface biospécifique 29

I.1.3.2.1 Biorécepteurs naturels 29

a) Biorécepteurs naturels catalytiques 29

b) Biorécepteurs naturels d'affinité 30

I.1.3.2.2 Biorécepteurs de synthèse 34

a) Biorécepteurs synthétiques catalytiques 34

b) Biorécepteurs synthétiques d'affinité 34

I.1.3.3 Les modes d'immobilisation des biorécepteurs 36

I.1.3.3.1 Adsorption physique ou chimique 37

I.1.3.3.2 L'encapsulation 37

I.1.3.3.3 Immobilisation par liaison covalente 37

I.1.3.4 Les éléments de transductions 39

I.1.3.5 Technique d'immunoassay 41

I.1.3.6 Détection directe par résonance des plasmons de surface 43

I.2. Etude des modifications qualitatives 45

I.2.1 Définition des variants protéiques 45
I.2.2 Stratégies pour la caractérisation des biomarqueurs 46
I.2.2.1 Approche protéomique 46
I.2.2.2 La spectrométrie de masse 46
I.2.2.2.1 Préparation de l'échantillon 48
I.2.2.2.2 Source d'ionisation en phase liquide 48
a) LC-ESI-MS 48
b) Suivi et quantification par MRM 49
I.2.2.2.3 Source d'ionisation en phase solide 49
a) Source MALDI 49
b) Source SELDI 50
I.2.3 Sélection de cibles par biocapteurs et identification par MS 51
I.2.3.1 Analyse « off chip » 52
I.2.3.2 Analyse « On chip » 54
I.2.4 Les besoins d'une nouvelle plateforme d'analyse 57
I.3. Objectifs et organisation de la thèse 58
II. DEVELOPPEMENT D'UN BIOCAPTEUR 61
II.1. Imagerie par résonance des plasmons de surface 61
II.1.1 Historique 61
II.1.2 Les plasmons de surface 62
II.1.3 Principe de la SPRi 63
II.2. Aspect théorique et expérimental 69
II.2.1 Conception de la puce d'or 69
II.2.1.1 Dimension et type de verre 69
II.2.2 Dépôt et états de surface variables 72
II.2.2.1 Dépôt par pulvérisation cathodique magnétron 73
II.2.2.2 Dépôt par EBPVD : Electron Beam Physical vapeur deposition 74
II.2.2.3 Réponse plasmon et topographie 75
II.2.3 Optimisation instrumentale: couplage puce / prisme 77
II.3. Conversion de ΔR en taux de recouvrement surfacique Γ 79

II.3.1 Aspect théorique 79
II.3.2 Calibration de l'appareil par mesure de la sensibilité Sp,r 83
II.3.3 Vérification expérimentale de la corrélation ΔR / taux de recouvrement Γ ... 85
II.3.3.1 Elaboration de substrats spécifiques 86
II.3.3.2 Méthode d'immobilisation des anticorps 88
II.3.3.3 Méthode de greffage par SPRi 89
II.3.3.4 Analyse par microscopie à force atomique 91
II.3.3.4.1 Principe de l'AFM 92
II.3.3.4.2 Dénombrement par AFM 94
II.3.3.5 Comparaison des résultats AFM / SPRi 98
Conclusion 100
III. SPECTROMETRIE DE MASSE (MS) SUR PUCE 103
III.1. MALDI TOF 103
III.1.1 La source MALDI 103
III.1.2 L'analyseur TOF 104
III.1.3 La fragmentation en MALDI-TOF-TOF 107
III.2. Mise en place des procédures spécifiques pour notre application 109
III.2.1 Prétraitement MS 111
III.2.1.1 Réduction et digestion sur puce 111
III.2.1.2 Matrice d'ionisation 113
III.2.1.3 Technologie de spray par Imageprep 113
III.2.2 Analyse MS sur puce 114
III.2.3 Optimisation des procédures de prétraitement MS 116
III.2.3.1 Dépôt automatique de matrice 116
III.2.3.2 Digestion MS sur puce 117
III.2.3.3 Bilan 119
III.2.4 Couplage SPRi-MS: analyse MS de RSA greffé par SPRi 119
III.2.4.1 Génération d'échantillon par SPRi 119
III.2.4.2 Prétraitement et analyse MS 120
Conclusion 121
IV. VALIDATION DE LA SUPRA-MS 123

IV.1. Réalisation de la biopuce 123
IV.1.1 Choix d'un modèle biologique 124
IV.1.1.1 Modèle de capture: couple anticorps/antigène 124
IV.1.1.2 Modèle de contrôle 125
IV.1.2 Architecture de l'interface de bioreconnaissance 125
IV.1.2.1 Formation de la SAM 125
IV.1.2.2 Composition de la SAM 127
IV.1.2.3 Protocole de fonctionnalisation de l'or 129
IV.1.2.4 Activation des groupements carboxyles 130
IV.1.3 Elaboration d'une biopuce pour analyse multiplexée 132
IV.1.3.1 Techniques de spotting 132
IV.1.3.2 Contraintes de spotting 133
IV.1.3.3 Comportement d'une goutte sur une surface 134
IV.1.3.4 Mouillabilité de la surface 137
IV.1.3.5 Développement d'un spotter 139
IV.1.3.6 Préparation de la biopuce et protocole SPRi 141
IV.1.3.7 Choix de la chimie d'activation 142
IV.1.3.8 Tampon d'immobilisation 144
IV.1.3.9 Activation ultrasonore 145
IV.1.3.10 Durée d'immobilisation 149
IV.1.3.11 Concentration en anticorps pour immobilisation 149
IV.1.3.12 Rinçage des spots 152
IV.1.3.13 Blocage de la surface 153
IV.1.3.14 Architecture finale de la biopuce 154
IV.2. Résultats en milieu idéal 154
IV.2.1 Cinétique 154
IV.2.2 Gamme dynamique du biocapteur 156
IV.2.3 Limite de détection de LAG-3 en PBS 157
IV.2.4 Analyse MS et MS-MS 158
IV.2.4.1 Capture de LAG-3 en tampon idéal pour analyse MS 158
IV.2.4.2 Analyse MS et MS-MS 159
IV.2.4.3 Limite d'identification MS 162
IV.2.4.4 Limite de détection 162
IV.3. Validation de la SURPA-MS en milieu complexe 163

IV.3.1 Capture de LAG-3 en plasma humain 163
IV.3.2 Limite de détection SPRi de LAG-3 en plasma humain 164
IV.3.3 Analyse MS et MS-MS 165
IV.3.3.1 Analyse MS et MS-MS 165
IV.3.3.2 Limite d'identification de LAG-3 en plasma 166
IV.3.3.3 Limite de détection de LAG-3 en plasma 167
IV.3.4 Bilan 168
IV.4. Miniaturisation des spots pour multiplexage à moyenne densité 169
IV.4.1 Spotter fluidique: CFM 169
IV.4.2 Optimisation des procédures 171
IV.4.3 Résultats MS 172
IV.4.3.1 Imagerie MS 172
IV.4.3.1 Analyse MS en automatique 174
IV.4.4 Bilan 175
IV.5. Application de la SUPRA-MS à une application biologique 176
IV.5.1 Capture des isoformes en PBS 177
IV.5.2 Capture des isoformes en lysat de cellules neuronales 177
IV.5.3 Analyse MS 179
IV.5.4 Bilan 180
Conclusion 180
CONCLUSION GENERALE 183
PERSPECTIVES 185
Liste des abréviations et anglicismes 187
ANNEXE 1 191
ANNEXE 2 192
ANNEXE 3 194
ANNEXE 4 195
ANNEXE 5 196
ANNEXE 6 197
Références 201

INTRODUCTION

Ces travaux se sont déroulés dans le cadre d'une thèse CIFRE issue d'une collaboration entre l'institut FEMTO-ST (Franche-Comté Electronique, Mécanique, Thermique et Optique - Sciences et Technologies) et la société HORIBA-Scientific. Inscrit dans une approche interdisciplinaire, ce projet de thèse s'est appuyé sur les savoirs faire et compétences de la plateforme de protéomique CLIPP (CLinical and Innovation Proteomic Platform) en matière de mise au point de puces à protéines pour le suivi de molécules (FEMTO-ST, Besançon) et de la recherche de biomarqueurs par spectrométrie de masse (IFR SANTÉ STIC, Dijon). Les compétences dans le domaine de la SPR (Résonance des Plamons de Surface) ainsi que le soutien technique et instrumental de la société HORIBA-Scientific spécialisée dans l'équipement de mesure et d'analyse, dont l'instrument d'imagerie SPR, ont permis de mener à bien ces travaux.

La recherche de protéines bioindicatrices de pathologie humaine est un point clef pour le dépistage et le diagnostic médical. De nombreuses techniques existent pour le dosage de ces protéines qui repose principalement sur la spécificité d'un ligand d'affinité pour sa cible biologique. Cette reconnaissance doit, de plus, s'effectuer au sein d'un fluide biologique complexe, source d'interactions non spécifiques. Les domaines de la recherche et du développement génèrent de très nombreux candidats biomarqueurs mais très peu franchissent la barrière de la validation clinique. Le développement de nouveaux instruments et méthodes sont un réel challenge pour l'analyse de ces candidats biomarqueurs au delà de leur dosage et ainsi procéder à leur analyses fines.

Nous proposons de valider le concept de capture, de détection et d'identification d'un biomarqueur potentiel du cancer du sein (LAG-3, Lymphocyte Activation Gene 3) en plasma humain non déplété au travers d'une plateforme d'analyse que l'on dénommera SUrface Plasmon Resonance in Array coupled with Mass Spectrometry (SUPRA-MS).

Dans le premier chapitre, nous replaçons notre étude dans le contexte actuel du dosage de biomarqueurs protéiques ainsi que les limitations inhérentes aux techniques actuelles en particulier des tests ELISA considérés comme "gold standard". Nous présentons les dernières évolutions en termes de biodétection des protéines d'intérêt regroupées dans le domaine de la protéomique. Nous montrons que l'imagerie par résonance des plasmons de surface (SPRi) est particulièrement bien adaptée pour le multiplexage du suivi de protéines dans un échantillon biologique. La visualisation en temps réel des interactions en microarray permet de

développer, d'optimiser et d'élaborer des immunopuces afin de proposer une capture spécifique d'une cible biologique en milieu complexe tout en maîtrisant les interactions non spécifiques. Nous montrons qu'il existe plusieures stratégies de couplage de la SPR avec la spectrométrie de masse (MS) permettant la détection et l'identification des protéines capturées validant ainsi la spécificité de la biodétection de l'immunopuce et permettant une caractérisation des biomarqueurs capturés.

Le second chapitre s'attache plus particulièrement au développement du biocapteur à base d'imagerie par résonance des plasmons de surface. Après avoir rappelé le principe de fonctionnement des capteurs SPR, nous exposons les choix technologiques nécessaires à l'élaboration des puces d'or pour leur compatibilité avec l'instrumentation HORIBA-Scientific et l'analyse MS. L'environnement technologique de FEMTO-ST et de la centrale MIMENTO nous a permis d'éprouver différentes techniques de dépôt de couches minces dans le but de réaliser des puces d'or à bas coût aux caractéristiques plasmoniques optimisées. Nous abordons également un point fondamental qui consiste à vérifier empiriquement que les données SPR obtenues macroscopiquement reflètent avec exactitude les phénomènes macromoléculaires se produisant en 2D à la surface de la biopuce. Ceci a pu être obtenu au travers d'un couplage innovant des puces SPRi avec la microscopie à force atomique (AFM).

Le troisième chapitre présente les travaux collaboratifs avec les massistes de l'IFR SANTÉ STIC pour la mise au point des étapes de prétraitements chimiques et biochimiques des éléments biologiques sur une puce en vue de leur analyse MS et MS-MS. Nous décrivons la stratégie et les optimisations mises en œuvre pour procéder à la réduction, la digestion et au dépôt de matrice directement sur la puce SPRi. Des biopuces spécifiques, présentant des quantités maîtrisées de protéines, permettent de valider les étapes de prétraitement et d'analyse MS. Un support adapté au format des puces et un programme informatique sont réalisés afin de procéder à une analyse automatique par MS des biopuces. Toutes les analyses MS sont réalisées par l'équipe de massistes de Dijon.

Dans le dernier chapitre, nous présentons les différentes étapes d'élaboration de l'immunopuce. L'architecture de l'immunopuce repose sur une stratégie optimisée de greffage des anticorps sur une monocouche auto assemblée (SAM) et sur un format de biopuce présentant 16 spots d'anticorps. Nous exposons les performances de capture de la protéine

LAG-3 au nanomolaire en milieu idéal puis en plasma humain en amont d'une analyse complémentaire par MS et MS-MS à l'échelle de la femtomole dans le but de caractériser l'ensemble des protéines qui ont contribué au signal SPRi. Enfin, nous évaluons le transfert de technologie de la SUPRA-MS du macro au microarray (passage de 16 à 96 spots) par utilisation d'un système de greffage en voie fluidique pour le spotting d'une moyenne densité de spots (2 x 48 spots). Nous exposons les avancées liées à cette technologie et conclurons.

I. CONTEXTE

I.1. Biodétection

I.1.1 Biomarqueurs

I.1.1.1 Définition

Le terme biomarqueur est utilisé principalement dans deux domaines bien distincts, dans le domaine de l'écologie où il permet d'évaluer l'état de santé d'un environnement ou d'un écosystème et dans le domaine médical. En médecine, un biomarqueur, suivant la définition du NIH (National Institute of Health), est *« une caractéristique mesurée objectivement (c'est-à-dire avec une précision et une reproductibilité suffisantes) et évaluée comme indicateur de processus physiologique ou pathologique, ou de l'action des médicaments »* [1].

Le biomarqueur est l'un des nombreux paramètres indicateurs de pathologie pouvant être exploités pour le suivi et le diagnostic, au même titre que la température corporelle, le pH, la pression artérielle etc. Les biomarqueurs peuvent être des cellules spécifiques, des particules biologiques, des molécules ou des macromolécules (protéines, enzyme…). Ils interviennent à différents stades dans le domaine biomédical et le NIH en propose une classification (Tableau 1).

Dénomination	Définition
Marqueur diagnostique	Marqueur permettant l'identification d'une maladie.
Marqueur pronostique	Marqueur permettant de déterminer le stade ou l'évolution d'une pathologie indépendamment du choix du traitement administré.
Marqueur prédictif	Marqueur permettant de prévoir les bienfaits (efficacité) ou les méfaits (toxicité) d'un traitement.

Tableau 1 : Classification des biomarqueurs selon le National Institute of Heath [2].

La majorité des biomarqueurs sont utilisés en recherche (R&D) où ils permettent de différencier les stades d'une maladie ou d'en connaître le mécanisme, de découvrir de nouveaux médicaments les utilisant comme cibles. Ils contribuent également au développement préclinique et clinique de nouveaux traitements indiquant ainsi leur efficacité et leur toxicité. Seule une très faible proportion de ces biomarqueurs sont utilisés dans le cadre de la prévention pour identifier et calculer un risque ou une prédisposition pathologique,

pour le diagnostic d'une maladie dans une population et enfin pour orienter un traitement et assurer un suivi thérapeutique en adaptant, en conséquence, la prise en charge [1].

I.1.1.2 Types de biomarqueurs

Depuis plus d'un siècle, les biomarqueurs intéressent la communauté scientifique. En effet, dès 1848, Henry Bence-Jones a découvert qu'une chaine légère d'immunoglobuline (protéine de Bence-Jones) était éliminée dans les urines en cas de myélome et de maladie de Waldenström, ce qui contribuera au diagnostic et au suivi de l'évolution de la maladie par son dosage [3]. De nos jours, les biomarqueurs sont décelables à travers différents champs d'investigation tels que les domaines de la génomique, la transcriptomique, la protéomique, la métabolomique ou encore la cellomique (Figure 1).

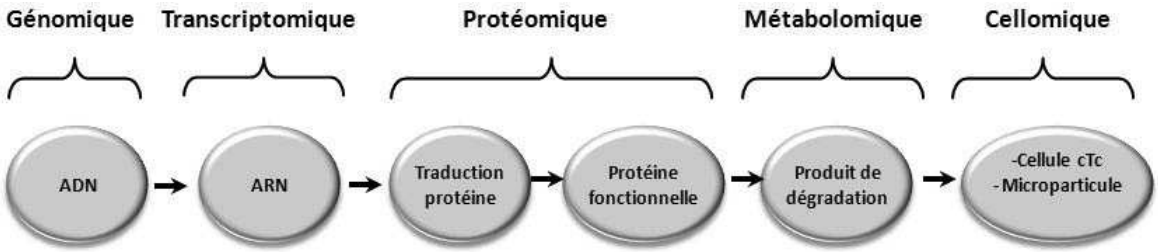


Figure 1 : Les différents éléments cellulaires pouvant être à l'origine des biomarqueurs. D'après [4]

Un biomarqueur génomique peut être une mesure de l'expression, de la fonction ou de la régulation d'un gène. Il s'agit de caractériser l'acide désoxyribonucléique (ADN) par la méthylation, les polymorphismes mononucléotiques etc. La modification épigénétique d'acides nucléiques et des protéines associées jouent un rôle important dans la carcinogenèse [5,6]. Par exemple, le degré de méthylation dans des tissus du cancer de la prostate et du poumon, chez les personnes atteintes, est directement impliqué dans la sévérité des lésions [6,7].

Un biomarqueur transcriptomique est le fruit d'une caractérisation de l'acide ribonucléique (ARN) qui repose sur le séquençage d'ARN et la mesure des niveaux d'expression et la concentration des ARN messagers (ARNm). Plusieurs techniques existent, permettant d'avoir accès à ces informations, en particulier celle de la Réaction en Chaîne par Polymérase (PCR), celle des puces à ADN [8] ou encore celle du séquençage systématique de tous les ARNm [9] par technique SAGE (Serial Analysis of Gene Expression).

Un biomarqueur protéomique découle de l'étude d'une protéine d'une cellule, d'un organe, d'un tissu ou d'un organisme à un moment donné. L'analyse protéomique est définie comme l'analyse quantitative des protéines, elle fait appel à de nombreuses techniques dont les techniques d'électrophorèse, de biopuces à protéine et de spectrométrie de masse [10]. Ce domaine sera largement développé au cours de ce manuscrit.

Un biomarqueur métabolomique quant à lui est issu de l'étude des métabolites (sucres, acides aminés, enzymes, etc.) présents dans une cellule, un organe ou un organisme. Grâce à la connaissance de la quantité en métabolites, il est possible de cibler des enzymes dont l'activité ou l'expression sont modifiées par un cancer [11,12].

La cellomique est un terme relativement récent, née de l'étude du protéome issu de cellules vivantes [13]. Aujourd'hui, la cellomique consiste à étudier les éléments chimiques et moléculaires exprimés par les cellules en lien avec une pathologie [14].

I.1.1.3 Les biomarqueurs protéiques

Le nombre de biomarqueurs pertinents autorisés par les autorités de santé pour une utilisation en médecine clinique est encore faible. La disponibilité de biomarqueurs découle d'une longue phase de recherche et de développement puis de validation clinique. En règle générale, un biomarqueur est déjà présent chez le sujet sain en faible concentration et son taux peut varier suivant les individus. Les biomarqueurs seront libérés par les cellules malades d'une tumeur spécifique et son taux augmentera. Un seuil précis permettra de valider le diagnostic ou l'évolution de la maladie. Cependant, une très faible proportion de biomarqueurs pourra être utilisée tout au long de la prise en charge d'un patient. Nous proposons en annexe 1 une liste non exhaustive des principaux marqueurs tumoraux autorisés et utilisés en routine dans les laboratoires cliniques ainsi qu'un schéma (Figure 2) représentant la concentration et la limite de détection de différents marqueurs dans le plasma [15].

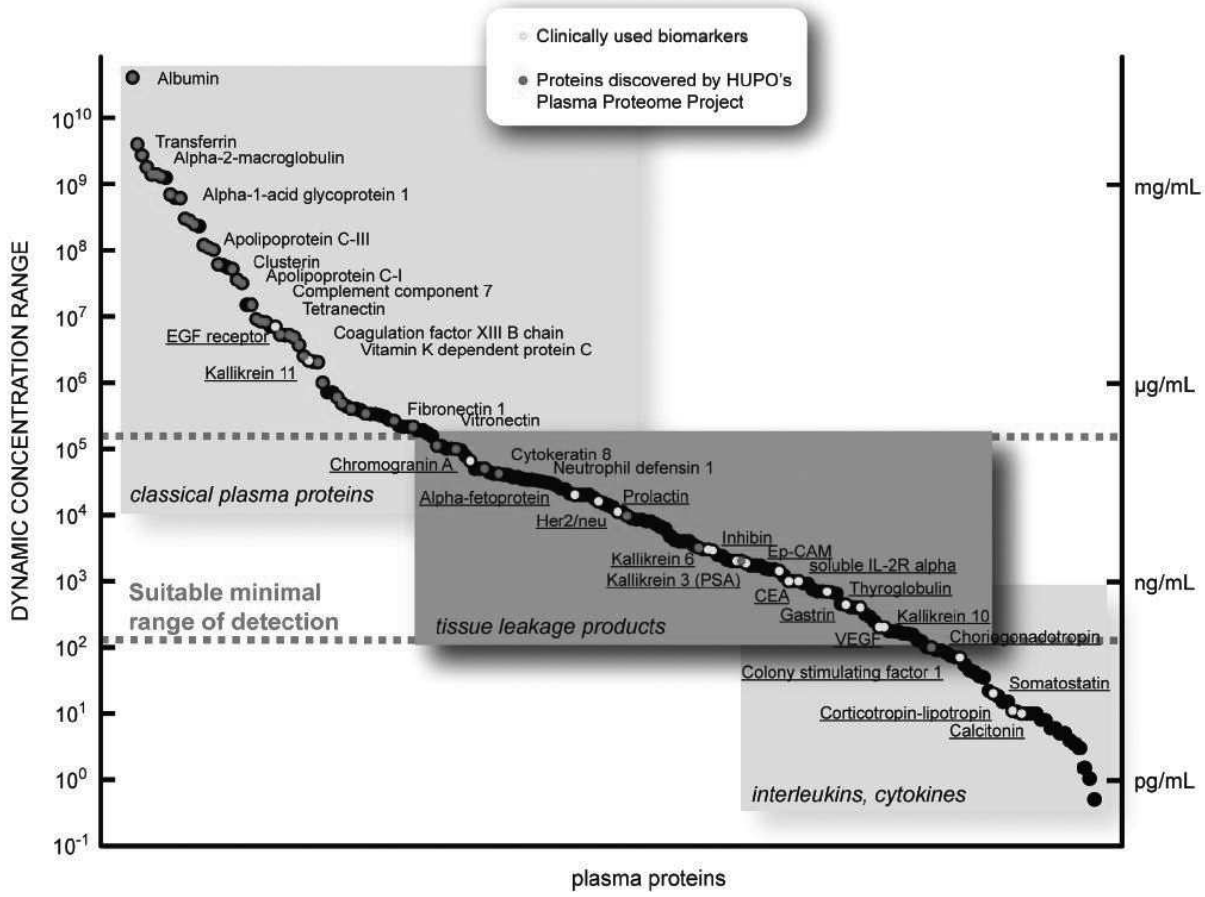


Figure 2 : Plage dynamique [15] de la concentration plasmatique des protéines ainsi que ses trois catégories. Les points en rouge indiquent les protéines identifiées par le projet HUPO et les points jaunes, les biomarqueurs actuellement utilisés dans le milieu clinique. La zone limite de détection pour le criblage de biomarqueurs dans le plasma est représentée en pointillé.

A titre d'exemple, le cancer de la prostate est responsable de 10 000 décès par an et représente 25 % des nouveaux cas de cancers découverts chez l'homme soit 40 000 nouveaux cas par an. Son dépistage par dosage de la PSA (Antigène spécifique de la prostate) a été largement promu dans les années 1990, mais est aujourd'hui contesté [16]. En effet, la prostate produit cet antigène indiquant son activité, et dont le taux normal dans le sang ne doit pas dépasser 4 ng/mL. Une valeur de PSA supérieure à 10 ng/mL ou comprise entre 4 et 10 ng/ml, conduisant à la réalisation d'une biopsie prostatique pour confirmer le diagnostic, ne permet de détecter que 70 % des cancers. Le simple dosage du PSA n'est donc pas fiable à 100 % et nécessite le dosage de différentes formes de PSA (libre et complexe) afin d'améliorer les performances du test [17,18]. De plus, le dosage plasmatique de différentes isoformes du PSA permet de diminuer de 50 % le nombre de biopsies et préfigure le test diagnostique sur un panel de biomarqueurs [18].

La complexité physiopathologique du cancer mais également de beaucoup d'autres maladies, requiert la découverte d'une multitude de biomarqueurs spécifiques, à la fois pour le diagnostic mais également pour le suivi thérapeutique. De plus, un biomarqueur oncologique est souvent la signature de cancers de différents organes comme par exemple l'Antigène Carcino-Embryonnaire (ACE) qui est caractéristique du cancer du colon et de la thyroïde ou encore le marqueur du carcinome épidermoïde (SCC) qui est issu des cellules tumorales du col utérin ou de l'œsophage.

Bien que les biomarqueurs individuels soient importants pour plusieurs types de cancers, le suivi d'un panel de biomarqueurs (trois à cinq) peut améliorer les performances des tests [[19]]. La recherche de panel de biomarqueur protéique pour augmenter la spécificité des tests est un objet d'étude depuis plusieurs années.

Ainsi, dans le cas du cancer de la prostate, l'association du dosage de la thyomosine beta15 (Tbeta15) à celui de la PSA, accroît le pouvoir de prédiction grâce à une plus grande spécificité et sensibilité que le simple dosage de la PSA [[20]].

Dans le cas du cancer de l'ovaire, un panel de six marqueurs est utilisé (la leptine, la prolactine, l'ostéopontine, le facteur de croissance analogue à l'insuline II, le facteur d'inhibition et le CA-125) ce qui permet une augmentation de la sensibilité de 150% comparé au dosage du CA-125 unique [[21]].

I.1.1.4 Validation des biomarqueurs

Le nombre de marqueurs biologiques validés dans le domaine du cancer est encore faible, et de longues études sont effectuées dans le but de valider de nouveaux marqueurs. En 2006, Polanski et Anderson [[19]] ont fournit une liste comprenant 1261 protéines exprimées en relation avec le développement du cancer. Parmi ces protéines, seulement neuf biomarqueurs ont été validés comme spécifiques de certains types de cancer, c'est pourquoi la recherche pour la découverte de biomarqueurs ne doit cesser.

Les candidats biomarqueurs sont identifiés par l'analyse statistique d'une corrélation entre la présence d'un marqueur biologique (protéine, ADN, ARN, métabolite…) et l'état physiologique observé de l'individu (symptômes d'une maladie). Leur pertinence clinique doit être démontrée. La validation d'un biomarqueur est un processus long et complexe. Des tests effectués sur un large effectif de patients sont nécessaires pour identifier le biomarqueur et son lien avec la pathologie, valider le biomarqueur identifié avec un événement clinique précis puis développer et valider, en pratique de routine, le test de dosage du biomarqueur [[22]].

I.1.2 Structure d'une protéine

Il existe 20 acides aminés différents qui peuvent composer la protéine. L'ordre dans lequel les acides aminés s'enchaînent est codé par le génome et constitue la structure primaire de la protéine. Lorsque la chaîne est composée d'acides aminés ayant une fonction biologique, on parle alors de protéine. Pour des assemblages de plus petite taille, nous parlerons de polypeptides. La structure secondaire d'une protéine est relative au premier niveau de compaction des protéines : deux structures sont observées : les hélices α (alpha) et les feuillets β (bêta) (Figure 3).

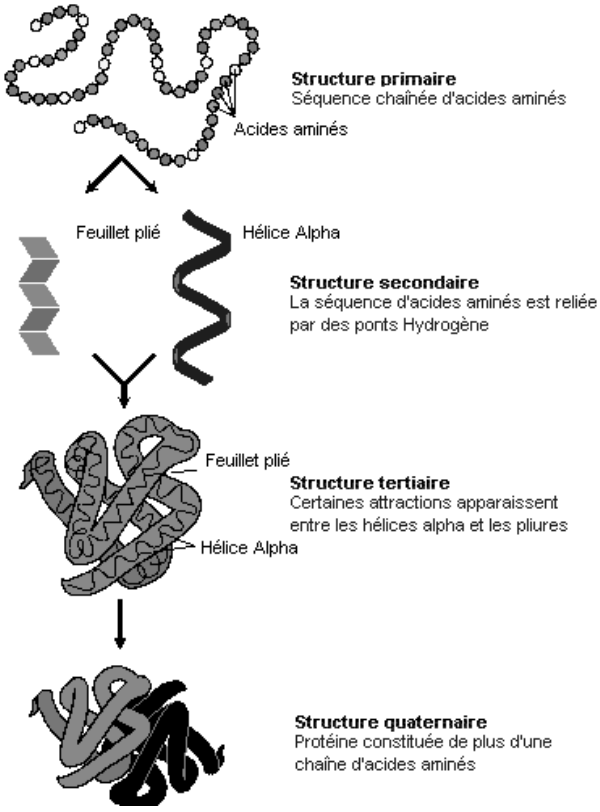


Figure 3 : Schéma simplifié de la structure d'une protéine [23]

La structure tertiaire est obtenue par la compaction des structures secondaires entre elles. La structure quaternaire correspond à l'assemblage de plusieurs structures tertiaires entre elles. La fonction d'une protéine dépend de sa structure tridimensionnelle composée d'acides aminés agencés les uns par rapport aux autres. Les protéines ont un rôle structurel, de mobilité, de catalyse, de régulation ou encore d'expression.

I.1.3 Dosage des protéines

D'un point de vue général, le dosage consiste à déterminer la quantité de matière ou la concentration d'un analyte présent dans un échantillon simple ou complexe. En immunologie comme en biochimie, l'analyte est un biomarqueur lorsqu'il est apparenté à une pathologie. Sa détection et sa quantification dans un échantillon biologique (sang, plasma, urine, extrait cellulaire…) sont nécessaires afin d'identifier une pathologie et d'évaluer son stade de développement. Le dosage est également une étape incontournable de la recherche clinique afin de comprendre des mécanismes biochimiques et immunologiques. De très nombreuses méthodes de dosage existent, elles se scindent en deux catégories.

La première approche concerne les techniques avec marquage, les principales sont les méthodes immuno-enzymologiques, utilisant un marqueur coloré, bioluminescent, fluorescent et les méthodes radio immunologiques. Elles sont très largement utilisées en routine dans les laboratoires cliniques et de recherche pour leur robustesse, leur sensibilité et leur facilité d'utilisation. Ces techniques nécessitent un couplage à une méthode de lecture spécifique du type de marqueur utilisé. Ainsi par comparaison à une gamme standard, le dosage de l'analyte est possible.

La seconde approche, consiste à mesurer par biodétection sans marquage c'est-à-dire sans l'ajout d'un marqueur dans l'échantillon à analyser ou sur la cible déjà capturée. Il existe de très nombreux procédés basés sur des principes optiques, physiques et électrochimiques.

Depuis quelques décennies, la communauté scientifique éprouve un fort engouement pour les méthodes de biodétection sans marquage, car celles-ci présentent l'avantage du suivi en temps réel de l'interaction par l'intermédiaire de l'élément de mesure de l'interaction moléculaire. L'absence d'une révélation par ajout d'un substrat ou d'une amplification par un anticorps marqué permet une mesure plus rapide. Quelle que soit la méthode utilisée, ces techniques de dosage sont toutes basées sur le principe du biocapteur (Figure 4). Le biocapteur est composé d'une surface biospécifique dépendante de l'entité à doser et d'un transducteur qui va transformer le phénomène biologique ou biochimique du système en un signal mesurable (électrique, optique etc.). Ce transducteur est basé sur différentes technologies. On peut citer les microbalances à quartz (QCM), l'interférométrie ou encore la résonance des plasmons de surface (SPR) que l'on développera au chapitre II.

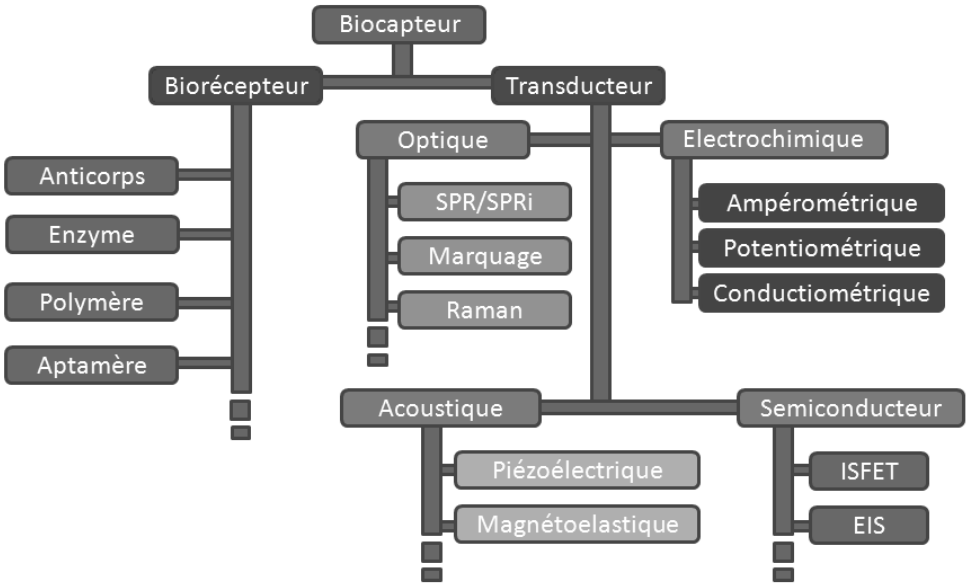


Figure 4 : Classification des biocapteurs en fonction de leur biorécepteur et leur mode de transduction

Dans le cas d'un test diagnostic ou de dépistage, les performances du test sont dépendantes de la technique utilisée et de la pathologie à identifier ou à surveiller. Bien souvent, le biomarqueur est déjà présent chez le sujet sain mais sa concentration varie suivant une loi gaussienne d'un individu à l'autre (Figure 5). Les sujets réellement malades peuvent être représentés en fonction de leur concentration en biomarqueur observée. En règle générale, il y a un fort risque que les panels de sujets sains et malades se recoupent. La qualité du test est représentée par deux paramètres exprimés en %, la sensibilité et la spécificité. La sensibilité est le pourcentage des patients déclarés malades dans une population vraiment atteinte par la maladie. La spécificité est la proportion des personnes qui seront déclarées non malades dans une population non atteinte. Le choix du seuil à partir duquel on peut déclarer un individu malade va interférer de façon directe sur les critères de sensibilité et de spécificité. Les deux erreurs les plus évidentes lors d'un diagnostic est le risque de ne pas déclarer malade un patient qui en réalité l'est (faux négatif) et de déclarer malade un patient qui ne l'est pas (faux positif).

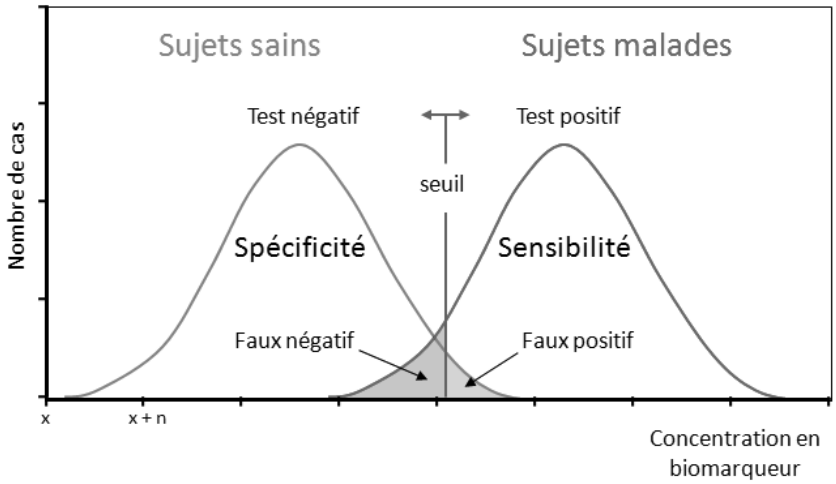


Figure 5: Critères de performance les plus courants d'un test diagnostique

De plus les performances d'un test peuvent être caractérisées par ses critères analytiques : sa spécificité, sa sensibilité, sa répétabilité, sa reproductibilité, sa linéarité, ses limites de détection et de quantification, sa robustesse et enfin sa justesse [24] et sont définies dans le tableau 2. Tous ces paramètres font qu'un test peut être validé ou non à l'usage clinique. Au vu du nombre de techniques existantes, seules les plus utilisées seront décrites.

Critères	Définitions
Spécificité	Aptitude à mesurer l'analyte désiré, et seulement celui-ci, en présence d'autres molécules dont la structure est proche.
Sensibilité	Aptitude d'une méthode à différencier les signaux fournis par deux échantillons de concentration voisine.
Répétabilité	Étroitesse de l'accord entre les résultats de tests (dosages) successifs du même échantillon (patient), tests effectués avec l'application de la totalité des mêmes conditions de mesure.
Reproductibilité	Étroitesse de l'accord entre les résultats de tests (dosages) du même échantillon (patient), tests effectués en faisant varier les conditions de mesure.
Linéarité	La variation de la concentration mesurée est proportionnelle à la variation de la concentration d'analyte réel. Si le capteur est parfaitement linéaire, la caractéristique est une droite sur l'ensemble de la gamme dynamique.

Limite de détection (LOD)	Plus petite quantité d'analyte dont on puisse dire avec un niveau de confiance donné qu'il est présent dans l'échantillon.
Limite de quantification (LOQ)	Plus petite quantité d'analyte qui peut être quantifiée avec un niveau de confiance donné.
Robustesse	Capacité du test à ne pas être modifié par une petite modification dans les données ou dans les paramètres du modèle choisi pour l'estimation.
Justesse	Faculté du test à donner des résultats dont la moyenne est proche de la valeur vraie.

Tableau 2 : Définition des critères de performance d'un capteur

I.1.3.1 Stratégies

Les méthodes de dosage peuvent être regroupées en deux catégories. La première est dite en phase liquide (ou homogène) où les réactions et les complexes binaires ou ternaires se produisent en solution. En phase liquide, la difficulté est de maîtriser la séparation physique des complexes des anticorps ou des antigènes en excès. A titre d'exemple, la première technique confrontée à ce problème est la technique de dosage radio-immunologique utilisée pour les dosages d'anticorps, d'enzymes, d'hormones, etc. Mise au point dans les années 1960 par les américains Solomon Berson et Rosalyn Yalow [25], cette technique consiste à marquer les molécules cibles d'intérêts par des isotopes radioactifs (^{125}I, tritium 3H…). L'une des techniques, dite par compétition, consiste à mettre en présence dans la solution à doser, une molécule marquée (Ag*) de même nature que la molécule à doser (Ag) et son anticorps (Ac). Ag* et Ac sont apportés en quantité constante ; Ag et Ag* se fixent à l'anticorps, la quantité d'Ag* fixée à l'anticorps est inversement proportionnelle à la quantité d'Ag présente dans le milieu (équation I.1). Après séparation des complexes, on mesure l'émission de rayons gamma ou beta grâce à un compteur à scintillation et la quantification se fait par comparaison à une courbe standard préalablement établie avec des concentrations d'Ag connues. Néanmoins, le marqueur ne doit pas modifier l'affinité de l'interaction (Ag*-Ac) et la séparation par précipitation et centrifugation des formes libres et liées doit être robuste.

$$Ag^* + Ac + Ag \rightleftharpoons (Ag^*\text{-}Ac) + (Ag\text{-}Ac) \qquad (I.1)$$

La seconde méthode concerne les techniques dites en phase solide sur lequel est fixé un biorécepteur. Pour cela, il existe une grande variété de géométries de phases solides pouvant

être planes, sphériques ou même très complexes. Du métal aux matériaux de synthèse en passant par les oxydes, ces supports sont de compositions très diverses et couvrent une large gamme de matériaux. De plus, chacun des matériaux peut présenter des structures variées pouvant influencer leurs propriétés de surface. Le support idéal doit présenter une haute capacité de fixation des récepteurs tout en leur conférant une stabilité au cours de l'analyse et en préservant leur conformation afin de garantir leur fonctionnalité. Pour cela, le taux de ligand fixé dépendra de la phase solide et de la stratégie d'immobilisation. Les molécules peuvent être immobilisées à la surface selon différentes architectures. L'architecture 2D consiste à immobiliser les biorécepteurs en monocouche sur le support contrairement à la chimie 3D qui permet d'augmenter le pouvoir de capture par réalisation d'une multicouche d'anticorps fonctionnels. Au cours de cette étude bibliographique, nous nous focaliserons principalement sur les principales techniques de dosage en phase solide.

I.1.3.2 Interface biospécifique

Le biorécepteur est l'élément clef de la biodétection puisqu'il est l'élément biologique de reconnaissance moléculaire. La qualité du récepteur est le facteur déterminant de la sélectivité et contribue à la sensibilité du dosage. Le choix du récepteur dépendra de l'analyte à détecter et à quantifier mais dépendra également de la composition de l'échantillon à analyser. Nous pouvons classer les biorécepteurs en deux catégories : les biorécepteurs naturels et les biorécepteurs de synthèse qui peuvent être dans les deux cas de nature catalytique ou d'affinité.

I.1.3.2.1 Biorécepteurs naturels

a) Biorécepteurs naturels catalytiques

Les biorécepteurs enzymatiques ou biorécepteurs catalytiques sont composés d'enzymes ayant une activité catalytique spécifique à un substrat. Il existe 6 catégories de réactions enzymatiques: Oxydoréductases, Transférases, Hydrolases, Lyases, Isomérases et Ligases. Elles sont généralement choisies pour leur capacité de reconnaissance et leur forte activité à faible concentration L'affinité d'une enzyme pour son substrat est caractérisée par la constante de Michaelis, Km. Elle définit la concentration de substrat qui sature l'enzyme à moitié. Plus l'affinité est élevée, plus Km est petit. Le rapport de constante catalytique (kcat) sur la constante de Michaelis est souvent donné comme mesure de l'efficacité catalytique car il correspond à la vitesse de réaction pour de basses concentrations de substrat. Les capteurs à base d'enzyme sont essentiellement utilisés pour détecter la présence de petites molécules telles que les nitrates, les composés organophosphorés, le glucose, des toxines etc. Différents

types de détection sont possibles, en mesurant un transfert d'électrons ou de protons, en mesurant le pH, en dosant directement la consommation de substrat ou en dosant un (des) produit(s) issu(s) de l'activité enzymatique.

A titre d'exemple, la catalyse du glucose sous l'effet de la glucose oxydase forme la gluconolactone qui est spontanément hydrolysée en acide gluconique accompagnée de la réduction de O_2 en H_2O_2.

$$glucose + O_2 + H_2O \xrightarrow{glucose\ oxydase} acide\ gluconique + H_2O_2 \quad \text{(I.2)}$$

$$H_2O_2 \rightleftharpoons O_2 + 2H^+ + 2e^- \quad \text{(I.3)}$$

Cette réaction peut alors être mesurée par électrochimie du fait du transfert de 2 électrons lors de la dégradation de H_2O_2 [26,27], par fluorescence en mesurant la consommation d'oxygène ou par mesure de pH.

La valeur de Km généralement atteinte par les capteurs à base de biorécepteur catalytique tout comme pour le dosage du glucose cité précédemment est de l'ordre de 10^{-6} mol.L^{-1} [28–30] mais peuvent exceptionnellement atteindre dans certaine application 10^{-10} mol.L^{-1} [31].

L'utilisation des biorécepteurs catalytiques présente de nombreuses contraintes car leur structure est instable thermiquement et est sensible aux conditions environnantes. Une technique fiabilisant leur utilisation mais onéreuse consiste à encapsuler une enzyme dans un gel ou des membranes semi-perméables qui permettent le passage des substrats et produits mais pas des enzymes [32]. De plus, la durée et le mode de conservation entrainent une perte d'activité suite à la dénaturation de la protéine ce qui montre les limites de cette technologie de biorécepteur [33,34].

b) Biorécepteurs naturels d'affinité

Les biorécepteurs d'affinité sont souvent des molécules biologiques permettant une haute spécificité entre le récepteur et l'analyte pouvant atteindre 10^{-12} mol.L^{-1}. Le biorécepteur qui peut être de nature nucléique ou protéique, fixe l'analyte par interaction conformationnelle renforcée par des liaisons faibles (électrostatiques, hydrogènes...). Un grand nombre de protéines est capable d'interagir avec l'ADN afin de moduler l'expression de gènes impliqués dans le contrôle de fonctions biologiques. L'étude des interactions entre récepteur de nature nucléique et les protéines permet d'identifier de nouvelles cibles ou de nouvelles molécules thérapeutiques impliquées dans certaines réactions inflammatoires, troubles métaboliques et cancers. La plupart des biorécepteurs sont des immunoglobulines (Ig) ou plus communément

appelées anticorps; ils présentent l'avantage d'être sélectifs et affins sur une plus large gamme de protéines. Les anticorps sont des glycoprotéines capables de se lier spécifiquement par leur paratope à un déterminant antigénique unique appelé épitope. Les anticorps monoclonaux (les plus spécifiques) ne reconnaissent qu'un seul type d'épitope d'un antigène tandis que les anticorps polyclonaux reconnaissent différents épitopes. On trouve cinq classes d'immunoglobulines : IgG, IgA, IgM, IgD et IgE mais toutes sont bâties sur un modèle de base commun et symétrique. Les Ig de type IgG et IgM sont produites dans la quasi-totalité des réponses immunitaires, alors que les IgA se spécialisent dans les réponses au niveau des muqueuses, les IgE se concentrent au niveau des réponses aux allergènes et aux parasites et les IgD participent aux réponses immunitaires se déroulant dans les voies respiratoires supérieures. Dans le sérum, on retrouve majoritairement des IgG, des IgA et des IgM. Les IgE et les IgD représentant moins de 1% des immunoglobulines totales du sérum. Chacun des isotypes, sont représentés par classe dans la figure 6. L'IgG monomère fut la première décrite [35,36]. Les immunoglobulines ont un poids moléculaire d'environ 150 kDa (1 Da = 1 g/mol) et sont composées de quatre chaînes polypeptidiques groupées en deux paires identiques de tailles inégales [37,38]. Représentée en figure 6, une immunoglobuline se compose de deux chaînes lourdes d'environ 50 kDa chacune soit 450 à 600 acides aminés et sont appelés Fragment Crystallisable (F_c). Sur chacune des chaînes lourdes est liée une chaîne légère d'environ 25 kDa soit 210 à 220 acides aminés appelés le Fragment Antigen Binding (F_{ab}). Les chaînes légères sont les sites de reconnaissance de l'antigène, elles sont liées aux chaînes lourdes par un pont disulfure très proche de leur extrémité carboxy-terminale. La structure des anticorps présente de nombreuses fonctions amines (NH_2) et carboxyles (-COOH) et nous verrons par la suite que cela facilite grandement leur immobilisation sur phase solide.

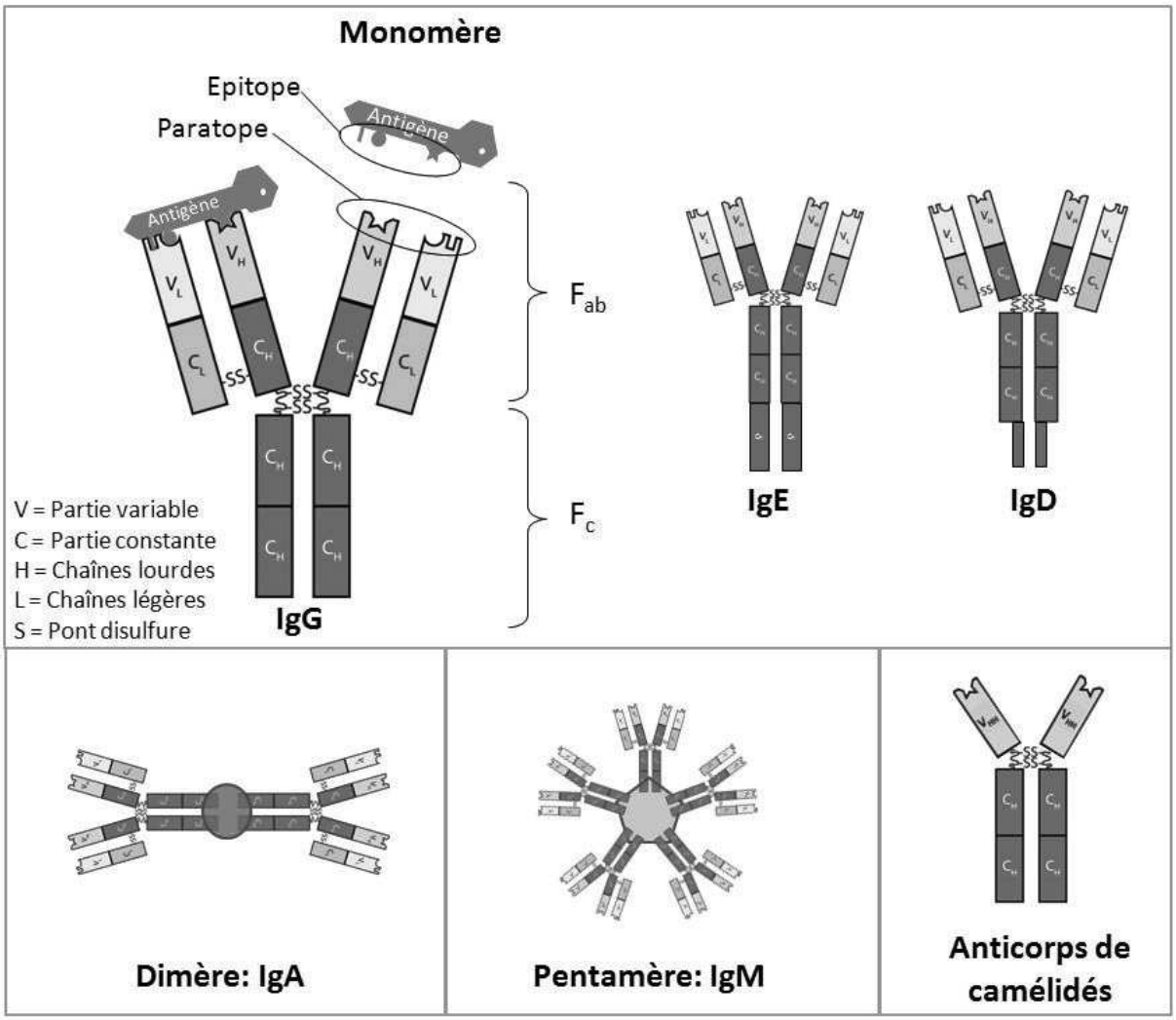


Figure 6 : Représentation schématique des différents isotypes d'anticorps chez l'espèce humaine et du plus petit anticorps naturel de camélidés.

Comparativement aux IgG, les autres isotypes d'immunoglobuline sont moins fréquemment utilisés dans le domaine des immunocapteurs. Toutefois nous pouvons citer une application des pentamères IgM utilisés dans le cadre du développement d'un transfuseur sanguin dans lequel est intégrée une biopuce permettant de détecter la compatibilité ABO entre le sang du patient et le concentré globulaire à lui transfuser. Cette identification se fera par immunocapture des globules rouges à l'aide d'anticorps anti-A et anti-B greffés à la surface des biopuces [39].

La découverte dans les années 90 que les anticorps de camélidés ne présentaient pas de chaînes légères [40] (Figure 6), a permis l'élaboration de nouveaux anticorps dix fois plus petits que les IgG classiques chez l'humain appelé Nanobodies ou sdAb. Les nanobodies sont des fragments d'anticorps à domaine unique de camélidé nommé VHH pour le différencier de VH conventionnels. Les nanobodies sont caractérisés par une très bonne solubilité et une

excellente stabilité. Ils présentent des affinités comparables à celles des anticorps conventionnels [41]. Par leur petite taille (environ 15 kDa) et leur structure, les nanobodies ont un avenir prometteur dans le domaine des petites molécules thérapeutiques. En effet, leur taille leur permet de pénétrer dans les tissus beaucoup plus efficacement qu'un anticorps entier et notamment dans les tumeurs solides [42]. Enfin, la nature monodomaine et la stabilité des sdAb en font des candidats de choix pour la réalisation de puces à anticorps [43,44].

La spécificité et la sensibilité de la biodétection dépend de la spécificité et de l'affinité de l'interaction antigène-anticorps ou plus précisément épitope-paratope mais dépend également du milieu à analyser et du bruit de fond engendré. La reconnaissance par immunocapture est particulièrement adaptée à la capture d'analyte en faible concentration dans un échantillon et présente une constante d'affinité pouvant atteindre 10^{-12} mol.L^{-1} [45]. C'est pourquoi, on les trouve pour de très nombreuses techniques de dosage de biomarqueurs dans le domaine du diagnostic clinique [46].

Il existe trois grandes stratégies pour le développement d'un biocapteur basé sur les biorécepteurs d'affinité en phase solide:

(i) la biodétection d'interaction ou « Protein array » consiste à immobiliser les protéines afin d'étudier leur interaction avec d'autres protéines ou des anticorps. Cette technique est la base des tests enzymatiques (EIA), des biopuces ou du test ELISA en mode indirect.

(ii) La biodétection de capture ou « antibody array » consiste à immobiliser sur un support la molécule de capture (ex : anticorps) afin de capturer les protéines cibles à partir d'une solution purifiée ou complexe et ainsi quantifier l'abondance de la cible dans l'échantillon. Cette stratégie peut être utilisée dans le cas des tests ELISA pour les marqueurs protéiques et est régulièrement pratiquée dans le domaine des biopuces. On la retrouve également dans une variante de la méthode de radio-immunoassays (RIA) sur phase solide appelée radio-immunoarray.

(iii) La dernière stratégie d'architecture de biorécepteur d'affinité, consiste à immobiliser sur le support l'échantillon fractionné ou complexe et à injecter une solution d'anticorps spécifique ou des solutions plus complexes afin de détecter des marqueurs de maladie et d'évaluer des évolutions dans un processus métabolique.

La forte affinité entre l'anticorps et l'antigène rend difficile la réutilisation de biorécepteur sans modifier la spécificité et la qualité d'interaction ce qui contraint de prévoir une partie

jetable. C'est le cas par exemple pour les tests ELISA où les interactions se déroulent dans des microplaques jetables.

I.1.3.2.2 Biorécepteurs de synthèse

a) Biorécepteurs synthétiques catalytiques

Le concept d'anticorps catalytique ou abzyme fut énoncé dès les années 1940 mais fut réellement obtenu dans les années 1980. Différentes approches ont permis l'obtention des abzymes, par voie chimique ou biologique. Cette dernière par manipulation du réseau idiotypique consiste à sélectionner un anticorps Ab1 pour reconnaître le site actif d'une enzyme, de sorte qu'il possède des propriétés structurales complémentaires. Cet Ab1 est utilisé comme antigène afin de produire des Ab2 dirigés contre le site de reconnaissance de l'Ab1. Le second anticorps représente une "image interne" du site actif enzymatique de départ et possède une activité catalytique spécifique [47,48]. Les abzymes sont principalement utilisées pour leur potentiel thérapeutique, de plus les recherches visant à produire des anticorps à activité protéase spécifique d'une séquence pourraient déboucher sur la conception de traitements anti-viraux et de vaccins [49].

b) Biorécepteurs synthétiques d'affinité

Afin d'optimiser la bioreconnaissance des récepteurs dans le but d'augmenter la stabilité et d'améliorer la rentabilité des méthodes de dosage pour des dispositifs médicaux, des biorécepteurs de synthèse équivalents aux récepteurs naturels en terme d'affinité ont été synthétisés. Egalement appelés biorécepteurs biomimétiques, les polymères à empreintes moléculaires et les aptamères en sont des exemples.

Les polymères à empreintes moléculaires ou MIPs (Moleculary Imprinted Polymers) sont formés par la polymérisation d'un polymère autour d'une molécule cible servant de gabarit qui sera ensuite extraite du moule formé (Figure 7) [50]. Cette technique permet de synthétiser des biorécepteurs proches des composés du moule et permet de couvrir une large gamme de détection allant des hormones aux anticorps [51,52]. Leur affinité pouvant atteindre 10^{-9} mol.L^{-1} [53] leur permet d'être utilisé dans le domaine de la protéomique dans diverses applications comme pour la déplétion d'échantillons, alternative aux colonnes d'immunoaffinité [54]. Les MIPS ne nécessitent pas de conditions de stockage particulières et ils présentent une très grande stabilité même en présence de solvants organiques.

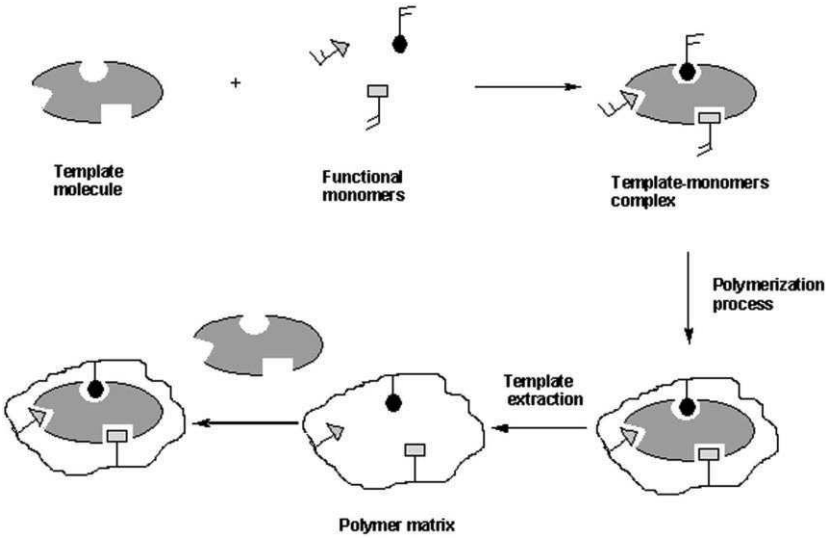


Figure 7: Fabrication d'un polymère à empreinte moléculaire [54]

Les aptamères sont des molécules d'acides oligonucléiques (ADN ou ARN) ou des peptides capables de reconnaitre un ligand spécifiquement [55]. La flexibilité du squelette de l'ADN ou de l'ARN permet à deux régions complémentaires d'un même brin de s'associer en appariant leurs bases azotées. Les paires de bases se forment entre l'adénine A et la thymine T (ADN) ou l'uracile U (ARN) et entre la guanine G et la cytosine C par des liaisons hydrogène. Lorsqu'un acide nucléique simple brin se replie sur lui-même en une structure stable, des motifs structuraux composés d'une combinaison d'hélices et de boucles forment des structures tridimensionnelles (Figure 8).

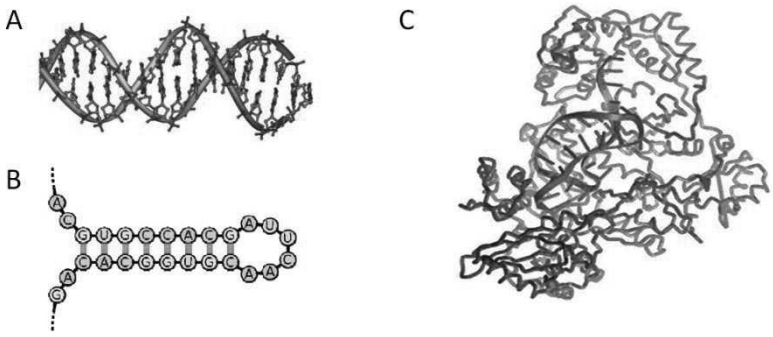


Figure 8 : Représentation schématique des principaux motifs structuraux : la double hélice (A), la tige boucle (B) [56]. Représentation de la structure 3D d'un Aptamère (en violet) capturant une protéine (en bleu) [57]

Ces oligonucléotides sont sélectionnés à partir d'une banque aléatoire de séquences selon leur aptitude à reconnaître une cible par une méthode de sélection baptisée SELEX (évolution systématique de ligands par enrichissement exponentiel) [58]. Les aptamères d'acides

nucléiques, en particulier, trouvent de nombreuses applications qui nécessitaient auparavant l'utilisation d'anticorps. L'inhibition de la fonction d'une protéine lors de son interaction avec un aptamère est une propriété largement exploitée comme outil pharmacologique; ils peuvent également assurer le transport de molécules actives. Leur affinité avec leur cible peut atteindre 10^{-10} mol.L^{-1} [59] ce qui leur permet d'être utilisés comme outil de purification pour la mise en œuvre de chromatographie d'affinité [60–62] après avoir été fixé à un support solide. Ils présentent l'avantage d'être plus stables, plus faciles à manipuler et leur petites tailles leur permet d'obtenir un taux de couverture d'une surface et un taux de sites actifs plus important que les anticorps [58]. Les aptamères sont plus faciles à produire que les biorécepteurs naturels et à moindre coût. Ils sont résistants au solvant et à la température et conservent leurs structures au cours des cycles répétés de dénaturation / renaturation. Les aptamères peuvent donc être utilisés dans un large éventail d'application et notamment dans le domaine des biopuces en format microarray pour le multiplexage de capture de protéines dont l'expression est liée à l'apparition d'une pathologie [63,64].

I.1.3.3 Les modes d'immobilisation des biorécepteurs

Le biorécepteur, une fois fixé à une phase solide, ne doit pas être dénaturé par son immobilisation et lors du stockage, ce qui pourrait compromettre sa fonctionnalité au cours de l'analyse. L'encombrement stérique des molécules jouera un rôle important sur l'accessibilité des récepteurs pour les analytes ainsi que la rugosité de surface [65]. L'immobilisation de biorécepteurs sur la surface du transducteur est donc un point clef de la qualité de l'analyse. La liaison doit offrir une fixation du biorécepteur stable afin d'éviter toute désorption, lorsqu'il y a interaction ou lorsqu'il est soumis à des changements de milieux comme des rinçages ou nettoyages au détergent doux. Et enfin, la bioreconnaissance doit présenter un haut niveau de spécificité pour sa cible.

La nécessité de contrôler la fixation des biorécepteurs afin d'optimiser les capacités de capture de cibles a contribué à de très nombreuses stratégies d'immobilisation visant toujours à optimiser la densité de récepteurs, sa distribution et son orientation. Ces paramètres sont les points cruciaux de la viabilité d'un dosage. Car, dans le domaine clinique, les échantillons à analyser sont très souvent des milieux biologiques complexes (sang, plasma, extraits cellulaires etc.) qui présentent une large variété d'éléments biologiques pouvant interagir avec les récepteurs immobilisés.

I.1.3.3.1 Adsorption physique ou chimique

L'adsorption directe de molécules sur la phase solide est la technique de greffage la plus simple et la moins coûteuse. De par la nature du biorécepteur et de la surface à coupler, l'adsorption peut être classée en deux familles, l'adsorption physique (ou physisorption) et l'adsorption chimique (ou chimisorption). Lorsque l'immobilisation du récepteur est régie par des liaisons faibles grâce aux forces ioniques, de Van Der Waals ou hydrophobes on parle alors de physisorption qui, en général, est réversible, ce qui est rarement ou difficilement le cas pour la chimisorption, qui met en jeu des énergies de liaison importantes et correspond à un échange ou un transfert d'électrons pour créer une liaison chimique modifiant ainsi la molécule adsorbée. L'adsorption peut être réalisée sur un grand nombre de supports de nature organique ou inorganique. Néanmoins, l'immobilisation par physisorption a ses limites car les liaisons faibles sont réversibles, il y a donc un risque que la couche de récepteurs présente des défauts. Ce manque d'uniformité du tapis de récepteurs peut induire des interactions avec la grande variété de molécules présentes dans les milieux complexes à analyser favorisant les interactions non spécifiques. De plus, l'incapacité à maîtriser l'orientation du récepteur [66] et le risque de dénaturer la molécule peuvent altérer sa fonction [67].

I.1.3.3.2 L'encapsulation

La méthode d'encapsulation ou d'inclusion consiste à incorporer les molécules biologiques dans un gel. Ce gel peut être constitué d'une matrice organique ou inorganique. Les matériaux utilisés sont généralement des polymères, des dérivés polyvinyliques ou des polycarbonates, de la polyacrylamide et de l'acétate de cellulose. Les biorécepteurs sont mélangés à la matrice, puis déposés sur une surface. Ils se retrouvent alors piégés mécaniquement à l'intérieur des matrices. Cette dernière assure à la fois la rétention de la molécule d'intérêt mais aussi l'accès aux sites actifs grâce à sa porosité. Toutefois cette technique est parfois limitée par la taille des pores du gel qui favorise le relargage des biorécepteurs de faible poids moléculaire. Les avantages de cette méthode proviennent de la compatibilité avec les biomolécules, préservées par le façonnage à température ambiante et ne subissant ainsi qu'une faible dénaturation. Ces films sont de plus très stables chimiquement, thermiquement et structurellement.

I.1.3.3.3 Immobilisation par liaison covalente

Le greffage consiste à fixer les biorécepteurs sur une surface par la formation de liaisons covalentes. Le lien entre la protéine et la surface peut être réalisé par deux méthodes différentes que l'on appelle chimie 2D et chimie 3D.

Dans le cas de la chimie 2D, il s'agit de fixer les biorécepteurs en monocouche plus ou moins compacte. Cette fonctionnalisation est généralement obtenue par une monocouche auto-assemblée appelé SAM (Self Assembled Monolayers). Elle est composée de molécules hétéro-bifonctionnelles présentant un groupement fonctionnel d'accroche, d'un bras espaceur et d'un groupe terminal fonctionnel (Figure 9). Les groupes fonctionnels d'accroche les plus communs sont les thiols (-SH) pour les surfaces métalliques [68] ou les silanes ($-S_i(OR)_3$) pour les oxydes [69]. Les bras espaceurs sont généralement soit des chaînes carbonées (alkyles) de nature hydrophobe, soit des chaînes polyéthylène-glycol (PEG) à caractère hydrophile qui sont parfois préconisées afin de réduire les interactions non-spécifiques en milieux complexes [70]. Les groupements terminaux sont, eux, adaptés au groupement fonctionnel porté par les acides aminés du biorécepteur pour le lier de façon covalente au bras espaceur. On retrouve par exemple les groupements amine, carboxyle, thiol, hydroxyle, etc.

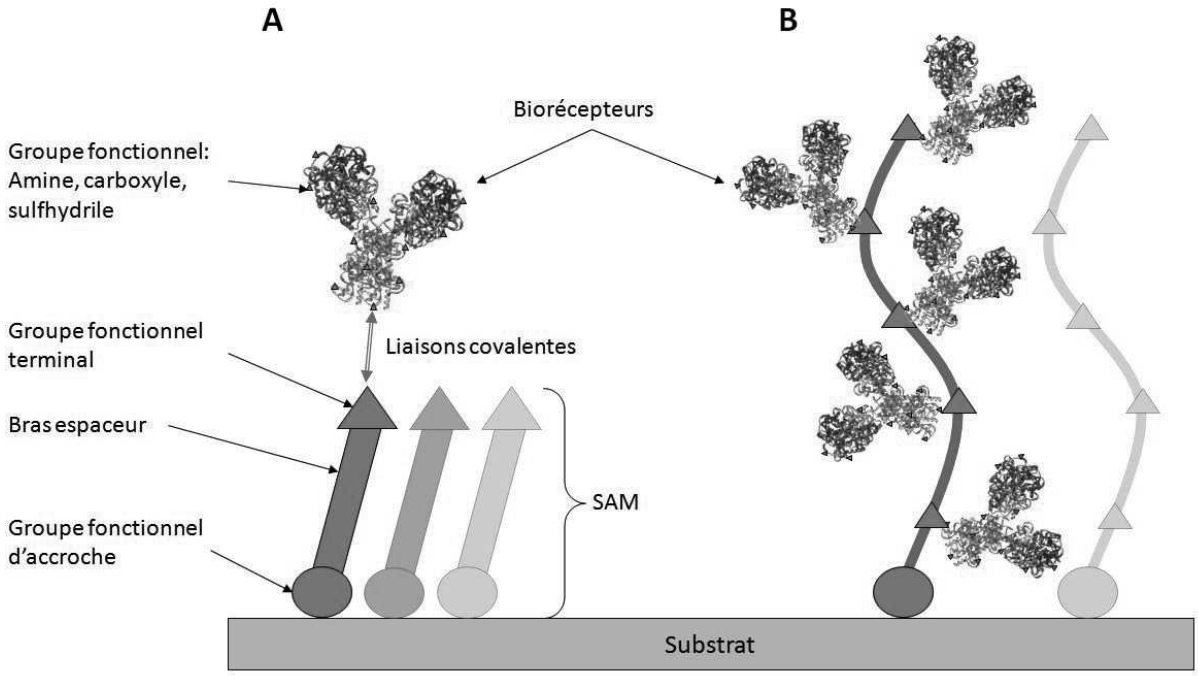


Figure 9 : (A) Immobilisation d'anticorps sur substrat par chimie 2D (SAM). (B) Immobilisation par chimie 3D (Dextran)

Cette méthode d'immobilisation est potentiellement moins dénaturante et conserve généralement le site d'activité biologique du biorécepteur [71] mais elle ne garantit pas l'accessibilité de ce site. Les fortes liaisons covalentes sont résistantes aux conditions de nettoyage, aux variations de pH ou de température [68,72] et permettent la fonctionnalisation de la surface du transducteur par des molécules chimiques permettant d'obtenir le contrôle de

l'uniformité, la densité et la distribution des récepteurs. Les liaisons spécifiques permettent de maîtriser davantage l'orientation des récepteurs qu'avec la technique d'adsorption directe.

La chimie 3D, appelée matrice hydrogel, est composée d'un groupement fonctionnel d'accroche de même nature que les SAM et d'une matrice dextran présentant de nombreux groupements fonctionnels adaptés au couplage covalent avec les biorécepteurs [73] (Figure 9). Cette configuration a pour avantage d'accroitre le nombre de biorécepteurs disponibles pour l'interaction mais le risque d'interaction non spécifique avec un milieu biologique complexe augmente [74].

I.1.3.4 Les éléments de transductions

Le transducteur est le composant qui va permettre de mesurer un changement physique à la surface du capteur suite à un événement de reconnaissance en le convertissant en un signal de sortie. Le signal provenant de l'événement moléculaire peut être mesuré directement ou par l'intermédiaire d'une amplification chimique ou biochimique. Il existe un très grand nombre de transducteurs pour la détection et la quantification de molécules biologiques. Ils peuvent être classés selon leur méthode de transduction comme par exemple les transducteurs optiques, électrochimiques, acoustiques ou encore semi-conducteurs. Chacune des technologies regroupent plusieurs principes de mesure. Des exemples de transducteurs couramment utilisés pour le dosage de biomarqueurs sont référencés dans le tableau 3 faisant apparaitre leur principales caractéristiques telles que la limite de détection, les maladies ciblées, etc. Leurs performances de détection peuvent être améliorées par l'utilisation de nanoparticules ou quantum dots (QDs) pour amplifier le signal, par augmentation de masse, de la surface utile ou par modification des propriétés physiques de la surface, etc. [75,76]. Nous remarquerons que les modes de détection sans marquage permettent le suivi en temps réel des cinétiques d'interaction mais ces techniques présentent des limites de détection moins performantes que les techniques avec amplification.

Les transducteurs optiques peuvent être classés en deux catégories : la première concerne les méthodes optiques avec marquage pour la révélation telle que la fluorescence ou phosphorescence et la colorimétrie. La seconde concerne les techniques de transduction sans marquage comme l'ellipsométrie, l'interférométrie, la spectroscopie par diffraction ou la résonance plasmonique de surface. Les transducteurs électrochimiques peuvent être distingués selon trois catégories: ampérométriques, potentiométriques et conductimétriques. Contrairement aux méthodes de transductions telles que la résonance des plasmons de surface ou les transducteurs par variation de masse, le résultat de la transduction par électrochimie

provient d'un signal direct ou indirect issu de la reconnaissance biologique, ce signal étant généralement lié à l'activité enzymatique des biorécepteurs catalytiques. Lorsqu'une molécule interagit avec son biorécepteur, elle contribue inexorablement à l'augmentation de masse du support sur lequel le récepteur a été greffé. Cette variation de masse peut être évaluée par mesure d'une déflexion (statique) d'une poutre par exemple ou par l'utilisation d'ondes acoustiques (transducteur acoustique) sur membrane.

	Technique de détection	Biomarqueur /Milieu	Elément de bioreconn-aissance	LOD ng/mL	Commentaires	Maladie /cancer	Réf
Optique	**ELISA**	LAG-3/plasma	Anticorps	0.12		Cancer du sein	[77]
	Fluorescence	IL-8 /Salive	Anticorps	< 0.6	Marquage de l'analyte avant capture	Cancer de la bouche	[78]
	SPR	PSA-ACT Complexe /sérum	Anticorps directe Sandwich	47 18	Temps réel Amplification	Cancer de la prostate	[79]
	SPRi	ALCAM hCG /blood	Anticorps array	45 100	Format microarray 120 spots	Ovaire, sein	[80]
	LSPR	p53 /sérum	Anticorps	0.06	Nanoparticule d'argent	Tête et cou	[81]
	FRET	TnTI /Plasma humain	Sandwich assay	1320	Temps de réponse ≈ 1min	infarctus aigu du myocarde	[82]
Electrochimique	**Ampérométrique**	AFP Ferritin CEA CA 15-3 CA 125 /sérum	Anticorps Competition assay	1.4 7 1.2 0.7 1.2	Multiplexage (array)	Cancers Cancers Sein Ovaire	[83]
	Potentiométrique	PSA /sérum	Anticorps	0.1	Révélation enzymatique	prostate	[84]
	Conductiométrique	cTnI /tampon + BSA	Anticorps	2.5 x 10-4	Temps réel	Pathologie du myocarde	[85]
Acoustique	**QCM**	OVTA 1 /sérum	anticorps	100	Temps réel	Ovaires	[86]
	SAW	IL-6 /sérum	Anticorps directe	20	Temps réel	cancers	[87]
Semi-conducteur	**FET**	HIV-1 Tat /PBS	Aptamère	14	Biocapteur réutilisable	HIV	[88]

Tableau 3 : Exemple de performances des transducteurs courants

Dans un souci de clarté, nous développerons uniquement la technique optique par fluorescence ou colorimétrie par l'exemplification de la technique d'immunoassay ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) considérée comme le test "gold standard" des laboratoires cliniques et de recherche. Nous développerons également la résonance des plasmons de surface très utilisée depuis deux décennies et qui fera l'objet d'une partie d'étude dans ce manuscrit.

I.1.3.5 Technique d'immunoassay

Dérivée de la technique de l'EIA (enzyme immunoassay), la méthode ELISA est utilisée en routine dans les laboratoires et elle est considérée comme le "gold standard" du dosage par immunoassay [[89]]. Elle consiste à capturer sur un support par l'intermédiaire d'un antigène ou d'un anticorps la molécule cible et à révéler sa présence par un second anticorps couplé à une enzyme. Cette enzyme agit sur un substrat pour le transformer en un composant qui sera suivi par une spectroscopie pour mesurer la quantité d'analyte capturé. Cette technique permet de coupler la spécificité d'une interaction antigène/anticorps, la réaction enzymatique et la sensibilité de la mesure des composés de révélation. Elle a été possible suite à la découverte en 1966 par Nakana, Ram et Avrameas de la possibilité de coupler une enzyme à une protéine. Et en 1971, Engvall et Van Weemen ont montré que ce couplage pouvait permettre l'élaboration d'une technique de dosage. Dans le cas du test ELISA, le biorécepteur est adsorbé par des interactions hydrophobes et électrostatiques à la surface de microplaques en plastique, généralement du polystyrène ou du polycarbonate ayant des propriétés d'adsorption spécifiques, compatibles avec les espèces étudiées. Deux formats de microplaques existent, proposant 96 et 384 puits pouvant contenir chacun jusqu'à 200 µL. Le nombre de puits peut permettre une analyse multiplexée de différents patients et un screening varié de protéines cibles. Néanmoins, un dosage par immuno-enzymologie nécessite une gamme étalon et les dosages sont généralement réalisés en triplicat.

Le principe de la méthode ELISA est exposé en figure 10. Les étapes 3 et 4 de la technique ELISA dite en Sandwich peuvent être combinées en utilisant un anticorps dirigé contre la cible couplé directement à une enzyme. La technique en ELISA directe est le fruit de la simplification de l'ELISA indirecte qui consiste à combiner les étapes 2 et 3 par un anticorps primaire conjugué à une enzyme; dans ce cas, il s'agit de doser l'antigène du milieu biologique qui entre en compétition avec l'antigène fixé sur la plaque.

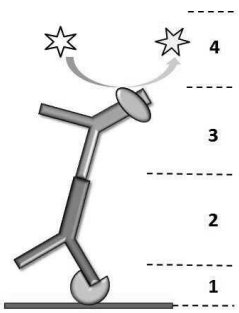
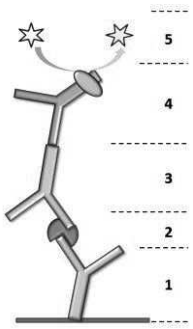
	ELISA indirecte	ELISA en Sandwich
Etapes		
1	Les antigènes s'adsorbent dans le puits des microplaques.	Les anticorps s'adsorbent dans le puits des microplaques
2	Les anticorps présents dans l'échantillon se fixent à l'antigène.	Les antigènes présents dans l'échantillon sont capturés par les anticorps
3	Après rinçage, un anticorps secondaire couplé à une enzyme et dirigé contre le fragment constant d'anticorps est déposé dans le puits. L'anticorps secondaire se fixe à l'anticorps à doser.	Après rinçage, un anticorps dirigé contre la protéine cible est déposé dans le puits et se fixe à celui-ci.
4	Après rinçage, un substrat est ajouté et est converti par l'enzyme en un signal mesurable	Après rinçage, l'anticorps secondaire couplé à une enzyme et dirigé contre le fragment constant d'anticorps est déposé dans le puits. L'anticorps secondaire se fixe à l'anticorps spécifique de la protéine à doser.
5		Après rinçage, un substrat est ajouté et est converti par l'enzyme en un signal mesurable

Figure 10 : Principe de la méthode ELISA

Ces différentes variantes de tests sont toutes basées sur le principe de la sélectivité d'une cible dépendante de la spécificité de l'interaction anticorps/antigènes et de l'amplification par réaction enzymatique à l'ajout d'un substrat produisant un signal mesurable. Ce signal peut être de nature colorimétrique, fluorescente ou luminescente. La technique ELISA permet ensuite une mesure quantitative de la cible grâce à une gamme étalon réalisée en parallèle. Les faibles taux de détection vont pouvoir être démultiplié grâce aux anticorps secondaires de marquage permettant d'atteindre des limites de détection de l'ordre de la centaine de pg/mL [90]. L'accessibilité du test à tous les biologistes par la facilité de réalisation et l'utilisation d'appareils de lecture peu onéreux sont les facteurs qui rendent le test ELISA indispensable dans les laboratoires.

I.1.3.6 Détection directe par résonance des plasmons de surface

Le phénomène de résonance des plasmons de surface (SPR, Surface Plasmon Resonance) est une méthode de transduction optique couramment utilisée pour étudier les interactions entre molécules à la surface d'une puce [91]. La SPR est une technique sensible, simple et sans marquage, de reconnaissance quantitative d'espèce biologique en temps réel par mesure du changement d'indice de réfraction local résultant d'une interaction à la surface du capteur. Le principe de la SPR sera très largement abordé principalement au chapitre II, c'est pourquoi nous ne décrirons que brièvement son principe.

Il existe de nombreuses configurations de capteurs SPR telles que le couplage par guide d'onde ou par grilles de diffraction [92]. La principale configuration que l'on trouve dans les capteurs SPR commerciaux tel que, par exemple, chez Biacore (General Electric) est la configuration dite de Krestschmann. Lorsqu'un rayon de lumière polarisée monochromatique (onde polarisée magnétique transverse: TM) illumine une interface entre ces deux milieux d'indices de réfraction différents, une partie de la lumière incidente est réfléchie sur l'interface et l'autre partie de la lumière est réfractée à travers la surface. L'utilisation d'un prisme, permet à la lumière polarisée d'être totalement réfléchie [93,94]. Dans ces conditions, une composante électromagnétique de la lumière, appelée onde évanescente, se propage perpendiculairement à l'interface. La zone balayée par l'onde est appelée champ évanescent. Le prisme est en contact avec une surface de verre recouverte d'une fine couche de métal, généralement de l'or, elle-même en contact avec un système fluidique véhiculant la solution contenant les analytes (milieu biologique) (Figure 11A1).

Dans ces conditions, les électrons libres de la couche périphérique de l'or entrent en résonance avec l'onde évanescente, ce phénomène est appelé résonance plasmonique de surface. Le faisceau réfléchi présente alors une chute d'intensité à un angle défini appelé angle de résonance (Figure 11A2). Cet angle varie en fonction de l'indice de réfraction du milieu présent dans le champ évanescent donc, ici, l'indice de réfraction du milieu biologique.

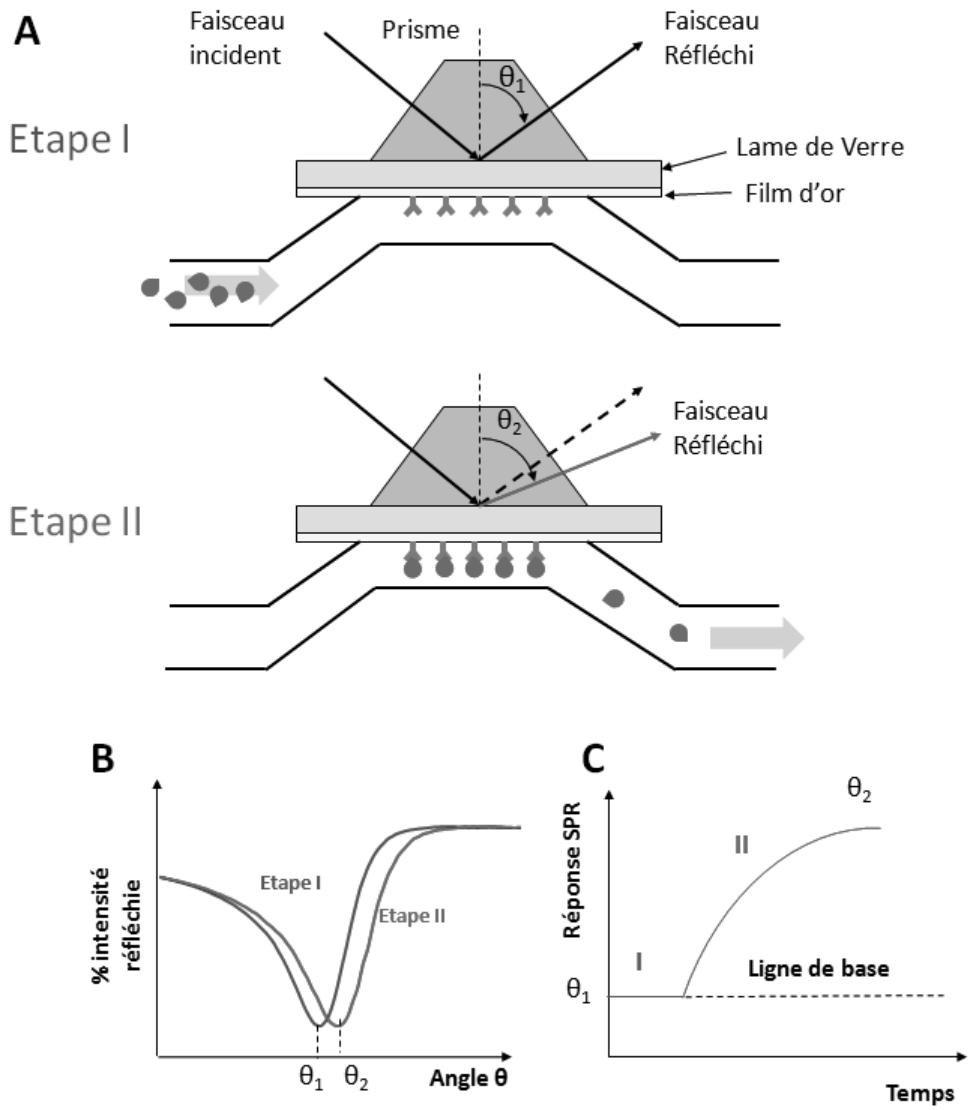


Figure 11 : Représentation schématique de la détection d'interactions par SPR. (A1) Le faisceau de lumière polarisé est totalement réfléchi selon un angle θ_1. (A2) Les analytes injectés via le circuit microfluidique interagissent avec les biorécepteurs fixés à l'or et modifie l'angle de réfraction. (B) La variation d'angle est détectée par l'appareil puis (C) convertie en signal de réponse en fonction du temps.

Les changements de masse induits par l'association ou la dissociation de complexes à la surface de la biopuce modifient la réfringence du milieu et décalent la position de l'angle de résonance (Figure 11B). La variation d'angle est enregistrée en fonction du temps sur un sensorgramme (Figure 11C). Ainsi, il a été établi, de façon empirique, une corrélation entre la variation d'angle et celle de masse de molécules déposées sur la puce ($\Delta\theta$=0,1° <=> 1ng/mm^2 [95].

Si la SPR est limitée en nombre de zones analysables simultanément (4 à 6 canaux de 1mm^2), l'imagerie SPR (SPRi) permet la mesure plasmon d'une zone de 1 cm^2 lui permettant d'étudier les interactions de 500 ligands différents. La très haute sensibilité de la SPR et de la

SPRi avec comme limite de détection 1 pg/mm^2 (SPR) et 5 pg/mm^2 (SPRi) [96] offre une nouvelle voie pour l'étude d'interactions de molécules de tailles diverses suivies en temps réel comme l'ADN, les protéines, les virus, les cellules, les microparticules etc. La détection en temps réel permet la détermination des constantes cinétiques d'interaction, les constantes d'association et de dissociation et ainsi permet de déterminer l'affinité des ligands pour leur cible [97]. L'imagerie SPR permet l'analyse simultanée d'une multitude d'interactions ce qui en fait une technologie, particulièrement bien adaptée au suivi simultané d'un panel de biomarqueurs dans des fluides biologiques complexes [80,98].

I.2. Etude des modifications qualitatives

I.2.1 Définition des variants protéiques

Une altération du génome telle qu'une modification au niveau nucléotidique peut engendrer une substitution d'un acide aminé par un autre dans la séquence protéique. Ce type de mutation peut avoir des conséquences phénotypiques plus ou moins importantes, elle peut engendrer des cancers ou des maladies génétiques [99]. La mutation n'implique pas seulement la modification d'acides aminés dans la séquence d'une protéine mais elle peut modifier complètement sa structure tridimensionnelle, qui conditionne son fonctionnement. Ces modifications structurelles peuvent perturber la stabilité et la conformation de la protéine, la fonction catalytique, la fonction de régulation et son interaction avec son ligand ou avec les autres protéines. Une mutation peut être le fruit d'une mauvaise lecture du génome, ces protéines ou variants protéiques qui en découlent seront à l'origine du développement de maladies. Ces variants protéiques pourront être soit très différents soit structurellement très proches des protéines correctement traduites mais elles ne présenteront pas les mêmes fonctions [100].

Si, dans le cas d'une mutation, la protéine est l'élément déclenchant de la maladie, une maladie peut par une dérégulation, être la source de modifications post-traductionnelles d'une protéine native. La protéine saine peut être alors modifiée chimiquement le plus souvent par une enzyme en lien avec la maladie par l'addition d'un groupe fonctionnel, d'un groupe peptidique ou par un changement de la nature chimique des acides aminés [77]. Dans ce cas, le biomarqueur n'est pas la source mais le produit de la maladie.

Les modifications liées aux mutations et aux événements post traductionnels engendrent des protéines spécifiques à une pathologie et à son stade d'évolution. La détection et le dosage de ces protéines deviennent alors des techniques particulièrement intéressantes pour le diagnostic clinique.

I.2.2 Stratégies pour la caractérisation des biomarqueurs

L'existence de variants protéiques issus d'altérations du génome, de dégradations chimiques ou de modifications post-traductionnelles, est considérée comme une nouvelle source de biomarqueurs. Exprimées de façon transitoire dans les fluides biologiques, ces protéines ou variants, peuvent être dégradées naturellement par le corps humain. La difficulté majeure réside dans la détection, l'identification et la quantification de ces variants car très peu de méthodes classiques d'immunologie sont capables d'effectuer une telle sélection. Cette discrimination des sous-populations protéiques nécessite de nouvelles approches technologiques utilisées en protéomique clinique, notamment, celles utilisant la spectrométrie de masse qui permet de détecter, d'identifier et parfois de quantifier ces marqueurs dans les fluides biologiques.

I.2.2.1 Approche protéomique

La fin du séquençage du génome humain a été annoncée dans les années 2003 [[101]]. Mais le séquençage des différents génomes ne permet pas de connaître les protéines exprimées dans une cellule à un moment donné. Le génome humain contient environ 25 000 gènes codant potentiellement 40 000 protéines différentes mais les modifications post-traductionnelles et l'épissage de l'ARN augmentent considérablement le nombre de protéines et de fragments aujourd'hui estimé à 2 000 000 [[102]]. De plus, nous avons vu que le suivi des marqueurs protéiques constitue un potentiel complémentaire pour le diagnostic. En conséquence, le protéome est plus complexe que le génome et permet d'obtenir des informations complémentaires et primordiales pour le développement de nouveaux outils diagnostiques. L'approche protéomique globale vise donc à étudier les protéines exprimées qui constituent un organisme vivant, un tissu ou une cellule sans *à priori* et de manière la plus large possible [[103]]. Elle vise également à identifier, quantifier, étudier la fonction de ces protéines et à en comprendre leur expression en fonction du phénotype [[4]]. Les approches de protéomique ciblées visent à analyser (identifier, caractériser, quantifier) une protéine ou un sous-ensemble de protéines d'intérêts dans un échantillon, c'est cette dernière approche qui a été privilégiée dans ce manuscrit.

I.2.2.2 La spectrométrie de masse

Le principal instrument utilisé aujourd'hui pour l'identification et la caractérisation des protéines est la spectrométrie de masse (MS). C'est l'une des principales techniques physiques d'analyse permettant de détecter et d'identifier des molécules d'intérêt par mesure de masse et de caractériser leur structure chimique. Les spectromètres de masse sont

composés d'une source, d'un analyseur et d'un détecteur. Les sources ionisantes permettant de générer les ions, l'analyseur de masse sépare les ions selon leur masse et leur charge avant le détecteur lequel permet de réaliser un comptage des ions et de délivrer un spectre de masse de la molécule analysée après traitement du signal (Figure 12).

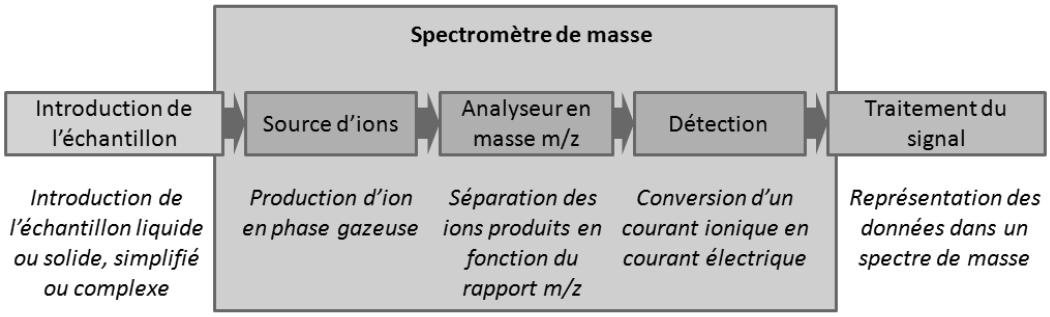


Figure 12 : Principe de la spectrométrie de masse

La source d'ionisation a pour but de transformer l'échantillon en ions en phase gazeuse. Les critères d'ionisation des molécules dépendront de leur stabilité thermique et chimique, de leur volatilité, de leur taille et de leur quantité disponible. De nombreuses sources d'ionisation existent, les principales utilisées en protéomique sont les sources par électronébulisation ou électrospray (ESI) et les sources d'ionisation par laser assistée par une matrice (MALDI: Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation). Les étapes d'ionisation ainsi que le transport des ions de la source vers l'analyseur se déroulent dans un vide secondaire atteint à l'aide de pompes turbomoléculaires ou à diffusion ce qui permet d'éviter toutes collisions avec les molécules résiduelles.

L'analyseur consiste à trier les ions en fonction du ratio masse/charge par un champ électrique ou un champ magnétique ou une combinaison des deux. Il existe cinq types d'analyseurs : quadripôle (Q), magnétique (BE), temps de vol (TOF, Time Of Flight), trappe ionique (IT) ou orbitrap et cyclotron à résonance des ions (FT-ICR). Ils sont caractérisés par quatre paramètres : la résolution, la vitesse de balayage, la gamme de masse et la transmission.

Les détecteurs permettent de fournir un signal électrique proportionnel au nombre d'ions détectés. Ils enregistrent soit la charge induite soit le courant produit lorsqu'un ion passe ou percute leur surface. Les principaux types de détecteurs sont : les plaques photographiques, le cylindre de Faraday, le multiplicateur d'électrons et le multiplicateur de photons.

I.2.2.2.1 Préparation de l'échantillon

Quelles que soient les techniques utilisées, une étape en amont de l'analyse par spectrométrie de masse est nécessaire pour réduire au maximum le nombre de variétés d'éléments biologiques contenus dans l'échantillon à analyser. Effectivement, le travail dans du plasma est un défi en raison d'une gamme très large de protéines qui le constitue [10]. La qualité de l'extraction protéique est un point crucial de toute analyse protéomique car elle doit être réalisée dans des conditions strictes et contrôlées afin de minimiser les contaminations. La simplification du composé à analyser peut s'effectuer directement sur l'échantillon complexe par différents traitements comme la chromatographie liquide qui vise à fractionner l'échantillon, mais il est également possible de cibler l'analyse en séparant les protéines à analyser de l'échantillon complexe. Dans les deux cas, l'échantillon à analyser peut être introduit dans le spectromètre de masse sous forme liquide ou solide. Nous allons décrire brièvement les techniques les plus utilisées en protéomique.

I.2.2.2.2 Source d'ionisation en phase liquide

Le principe de l'Ionisation par ElectroSpray (ESI), consiste à générer à pression atmosphérique des gouttelettes de solutés à analyser à l'extrémité d'un capillaire porté à un potentiel élevé. Sous un champ électrique intense et un courant d'air co-axial, le liquide est transformé en nuage de fines gouttelettes chargées qui, durant leur vol, subissent un processus de désolvatation et de fission par répulsion de charge. Les ions alors présents dans ces nanogouttelettes sont transformés en ions dans la phase gazeuse. Le champ électrique appliqué permet également de diriger les ions formés vers deux cônes d'échantillonnage servant de barrières avec l'analyseur sous vide. L'ESI présente l'avantage de fonctionner à basse température et à pression atmosphérique et évite de rompre les liaisons covalentes.

a) LC-ESI-MS

L'ionisation par électrospray présente l'avantage d'être compatible avec les techniques de chromatographie liquide à micro ou nano débit, on appelle alors ce couplage LC-ESI-MS (Liquid Chromatoraphy Electrospray Ionisation Mass Spectrometry). La chromatographie en phase liquide est une technique de séparation de molécules en fonction de certaines de leur propriétés respectives (taille, polarité, hydrophile, affinité...) pouvant se présenter sous différentes formes de support. Pour le couplage avec la spectrométrie de masse, l'échantillon à analyser traverse une colonne chromatographique. Les molécules sortiront de la colonne à différents temps de rétention des colonnes et pourront être analysées en continu par ESI-MS. L'intégralité de l'échantillon est alors analysé (50 - 300 µl/min) par fraction pour, au final,

identifier l'ensemble des protéines qui le composent. Cette technique est idéale pour l'analyse des macromolécules biologiques, ainsi que les petites molécules. Du fait que les analytes sont multichargés par la source d'ionisation, l'ESI-MS permet une analyse MS-MS hautement sensible par analyseur QTOF ou Orbitrap. La LC-ESI-MS est utilisée pour la recherche de biomarqueurs dans les milieux complexes [104].

b) Suivi et quantification par MRM

La MRM (Multiple Reaction Monitoring) ou également appelé SRM (Selected Reaction Monitoring) est une technique très similaire à la LC-ESI-MS classique puisque la MRM couple généralement un système de chromatographie liquide de haute performance (HPLC) à un spectromètre de masse de type "triple quadrupole" ou "quadrupole -Trap". Mais ce type d'analyse permet de séparer un fragment spécifique générant un profil MS très simple contenant généralement un seul pic. Cette caractéristique rend la MRM efficace pour une quantification sensible et spécifique d'une protéine ou d'un peptide car la concentration absolue d'une protéine peut être mesurée en utilisant un standard interne marqué avec un isotope lourd [105]. Cette technique est particulièrement intéressante pour le suivi des biomarqueurs [106] mais la spécificité analytique et la fiabilité de la mesure de la concentration sont controversées, mettant en avant certaines limitations de la LC/MS-MS [107] et inexactitudes de mesure [108].

I.2.2.2.3 Source d'ionisation en phase solide

a) Source MALDI

Dans le cadre d'une analyse utilisant une source MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation) l'analyte est mélangé à une matrice ionique solubilisé dans un solvant. Par évaporation du solvant, le mélange peptide-matrice déposé sur une surface métallique cocristallise formant alors un dépôt solide. L'excitation des molécules cristallisées est provoquée par l'adsorption de l'énergie d'un faisceau laser appliqué sur le dépôt et va engendrer la nébulisation des peptides qui, ionisés, vont être accélérés dans un champ électrique. Les ions générés sont acheminés par l'analyseur jusqu'au détecteur mesurant ainsi la masse de chaque peptide ionisé. Les spectres de masse obtenus sont comparés à une base de données permettant de détecter la présence d'une protéine d'intérêt et de l'identifier. La source MALDI sera détaillée davantage au chapitre III.

Si la source MALDI permet l'analyse de protéines entières et de digests de protéines pour analyse par PMF (Peptide Masse Fingerprinting), l'analyse MS-MS a néanmoins été introduite

tardivement et présente aujourd'hui une moins bonne sensibilité que les techniques à source d'ionisation en phase liquide.

L'analyse MS par source MALDI nécessite des échantillons simplifiés constitués de seulement quelques protéines différentes (< 5) ce qui nécessite les mêmes étapes de préparation et purification que pour les sources en phase liquide. L'échantillon à analyser est alors déposé sur une plaque en acier inoxydable appelée cible MALDI par un robot de dépôt d'échantillons. La cible peut accueillir plusieurs centaines de dépôts, chacun analysables en quelques secondes. Le débit analytique est donc mieux adapté pour l'analyse clinique à haut débit qu'avec la source ESI.

La source MALDI présente également l'avantage d'être utilisée avec d'autres supports que la cible dédiée, à condition qu'ils soient conducteurs. Ces supports peuvent servir à la fois pour la purification de l'échantillon mais également comme support d'ionisation. Cette configuration est utilisée dans le domaine du couplage des biopuces avec la MS [109] ou par exemple dans la technique SELDI [110].

b) Source SELDI

La technologie SELDI-TOF MS (Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization - Time Of Flight Mass Spectrometry) a été introduite par Hutchens T.W. et Yip T.T. au début des années 90 [110]. Cette approche propre à la protéomique a été développée afin de générer à haut débit et de manière extrêmement simple des profils protéiques d'échantillons complexes de type plasma, sérum, urine. L'objectif étant de découvrir de potentiels nouveaux biomarqueurs diagnostiques, pronostiques ou prédictifs par comparaison de ces différents profils en fonction des paramètres cliniques des patients dont étaient issus les échantillons biologiques. Pour la mesure des masses, la technologie SELDI-TOF repose sur un analyseur de type temps de vol (TOF) adapté à l'analyse de protéines de hauts poids moléculaires.

L'originalité de l'approche repose sur le fait que le support utilisé pour la purification des protéines/peptides et pour l'ionisation est le même. Ces supports sont des barrettes SELDI qui présentent à leur surface différents éléments qui leur confèrent soit un caractère chromatographique hydrophile, hydrophobe, échange ionique ou autres chimies couramment utilisées pour le profilage de protéines dans des mélanges biologiques complexes [111] soit une forte spécificité après fixation de biorécepteurs qui permet l'interaction par affinité avec les protéines cibles spécifiques contenues dans l'échantillon [112]. Ces surfaces permettent de concentrer/purifier des sous-populations de protéines et ainsi de simplifier la complexité de l'échantillon.

L'échantillon à analyser est déposé sur la barrette SELDI et toutes les molécules dont l'interaction est non spécifique sont éliminées lors des différentes étapes de rinçage du support afin de réduire le bruit de fond. Après dépôt de matrice sur la barrette, l'analyse MS est similaire à l'analyse par source MALDI, puisqu'un laser vient désorber et ioniser les protéines piégées par la surface chromatographique.

L'analyse du profil protéomique par SELDI-TOF est une approche qui a été conçue pour la détection et la découverte de biomarqueurs potentiels pour diverses maladies [113]. Durant les années 2000-2007, de nombreuses investigations cliniques utilisant SELDI-TOF-MS pour différents types de cancer, comme le cancer du pancréas, du côlon, du sein, du cerveau et plusieurs maladies infectieuses ont été publiées montrant l'apport de cette approche technologique. Néanmoins, de ces études, très peu de marqueurs ont pu ensuite être validés. Ce constat d'échec est dû à plusieurs facteurs dont la procédure expérimentale des études, le faible pouvoir discriminant des surfaces au regard de la complexité des mélanges testés, de la mauvaise reproductibilité de la méthode et du manque de résolution qui permet uniquement de faire de la mesure de masse moyenne sur des protéines abondantes [114].

I.2.3 Sélection de cibles par biocapteurs et identification par MS

De nombreuses techniques d'enrichissement existent dont l'enrichissement par biocapteur (Figure 13). Depuis 2000, les interactions biomoléculaires analysées par spectrométrie de masse (BIA-MS) ont été étudiées par deux approches analytiques: l'approche off-chip, résultant de l'élution des analytes liés avant l'analyse par spectrométrie de masse [115–133] et l'approche « on-chip », basée sur l'analyse directe du pattern de biorécepteurs après la capture des cibles [134–146]. Elles présentent l'avantage de pouvoir visualiser et quantifier en temps réel les interactions biologiques à la surface des biocapteurs. Les types de transduction sont généralement soit optiques et plus particulièrement la SPR ou la SPRi, soit par variation de masse comme les QCM (Microbalance à quartz).

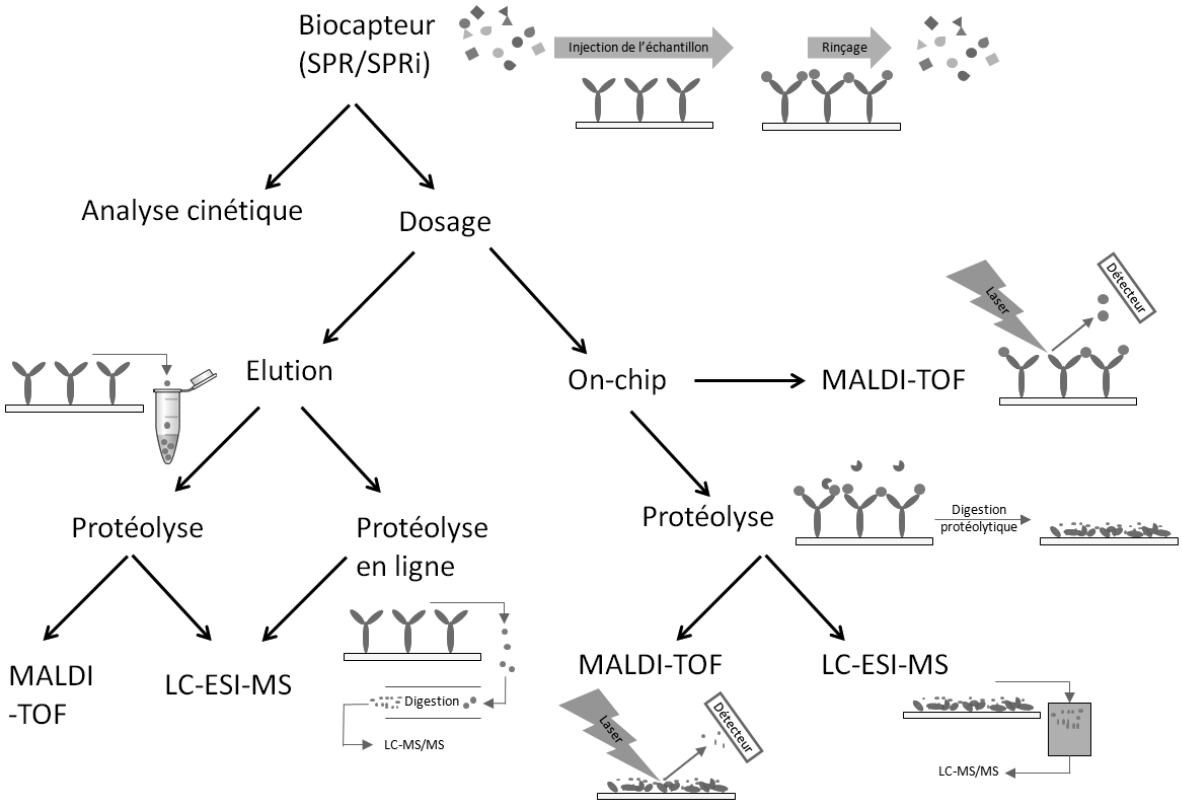


Figure 13 : Schéma des différentes approches de couplage biocapteur - MS [109]

I.2.3.1 Analyse « off chip »

L'utilisation de biocapteurs SPR par rapport à une simple colonne d'affinité présente l'avantage de pouvoir comparer, quantifier et soustraire directement les réponses d'une zone de référence à une zone spécifique qui permet d'éliminer les faux positifs causés par une liaison non spécifique. La BIA-MS (biomolecular interaction analysis – mass spectrometry) par SPR consiste dans un premier temps à capturer la protéine cible ou un complexe de protéines à la surface de la puce. L'étape suivante est l'élution des analytes qui consiste à les dissocier de leur ligand ou à digérer le complexe récepteur – cible et à collecter les solutions d'élution pour un traitement pré MS. Ensuite ils procédent à une analyse en spectrométrie de masse par MALDI [119–123,130,131] ou par ESI [115–117,124–129,132,133,147]. Cette stratégie est pour le moment la plus populaire des techniques de couplage SPR combinée avec la MS. Elle a été introduite par Sönksen en 1998 [130] qui a étudié l'interaction entre des anticorps et les protéines (myoglobine ou PPar) en utilisant la SPR. Après désorption du matériel capturé, il est collecté dans une pointe de pipette et utilisé pour l'analyse MS.

Une caractéristique importante de la BIA-MS « off chip » est la possibilité de réutilisation du biocapteur mais la principale limitation réside dans la difficulté d'obtenir de bons

rendements d'élution de l'analyte cible. Le volume dans lequel seront élués les analytes capturés devra être minimisé afin de ne pas diluer les molécules à analyser. Des systèmes fluidiques permettent l'inversion des sens d'injection et d'entrecouper les échantillons par des bulles d'air afin de limiter le phénomène de dilution et de diffusion des analytes dans la solution d'élution [[148]]. Pour optimiser encore la récupération d'échantillons, Catimel et al [[117]] ont utilisé une plus grande superficie de capture (16 mm^2) que les canaux SPR (1 mm^2), reliés à un système microfluidique déposant automatiquement l'analyte élué sur une cible MALDI. Cependant, cette vaste zone de capture n'est pas connectée à l'unité de détection, le suivi en temps réel de la biointeraction n'est donc pas possible.

Ces procédures nécessitent l'élution des protéines capturées de la surface de détection par des tampons compatibles avec la MS et peuvent entraîner la dilution de l'échantillon. Ce risque de perte d'analytes couplé au bruit généré par la signature MS de la solution d'élution peut affecter la reproductibilité de l'analyse.

Une autre approche a été suggérée par Larsericsdotter et al. pour résoudre le problème de pertes de matériel rencontrées en raison de l'adsorption non spécifique au cours du processus de récupération de l'échantillon dans le système microfluidique [[118]]. Ce groupe a étudié la possibilité d'utiliser des nanoparticules (particules de silice) en tant que véhicule pour transférer la protéine récupérée de la surface du biocapteur par voie microfluidique, ce qui a amélioré d'un facteur deux le rendement de récupération mais cette approche ne semble pas avoir été généralisée dans la chaîne analytique de la BIA-MS off chips.

L'élution est possible, généralement, par un tampon d'élution à faible pH comme par exemple la glycine pH 1.3, précédée d'une injection d'acide acétique pour éliminer les sels du tampon qui pourraient entraver la digestion et l'analyse. Le fruit de l'élution peut être analysé par LC-ESI-MS comme cela a été montré par Natsume et al. dans les années 2000 [[115]]. Stigter et al proposent, après une capture et une élution dans l'appareil de SPR (IBIS), une digestion en ligne couplée directement à une chromatographie en phase inverse [[116]]. L'analyse en automatique par nanoLC-MS des peptides protéolytiques est possible par la connexion directe des colonnes de chromatographie au nano-électrospray. Si le temps total pour l'analyse d'un seul échantillon prend 3h, Stigter montre qu'il est possible de commencer une autre analyse décalée réduisant ainsi les temps entre chaque analyse à 60 min.

Néanmoins, pour les analyses MS par ESI ou MALDI d'échantillons issus d'élution, 15 à 320 femtomoles ont été nécessaires pour parvenir à une identification des protéines [[115,116,118,125,130,131,149]]. Ces quantités sont obtenues après plusieurs cycles de capture et

d'élution, ce qui complique la méthode de récupération par voie fluidique et nécessite des biorécepteurs robustes aux régénérations successives.

I.2.3.2 Analyse « On chip »

L'approche analytique d'interrogation sur puce par spectrométrie de masse est une technique particulièrement bien adaptée à l'analyse multiplexée requise pour le diagnostic moderne. Ce domaine a connu les premières avancées technologiques au début des années 2000 [134], en montrant la possibilité d'analyser directement sur biopuces, les protéines entières de bas poids moléculaires. Différentes approches ont été abordées, l'analyse MS sur puce SPR [136–141,146,150], sur puce SPRi permettant une analyse multiplexée [135,144,145,151], sur capture LSPR [143,152] ou encore à partir de capteurs SAW [153].

Les résultats présentés jusqu'en 2007 étaient pour le moins d'encourageantes avancées technologiques et les tous premiers travaux de Nelson et al [137] démontrent la possibilité d'utiliser la technique BIA/MS par couplage des puces SPR commerciales avec la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF. Il a montré la possibilité de déposer manuellement de la matrice sur les 4 pistes ayant capturées l'analyte et de procéder à une analyse par MALDI-TOF directement sur la puce (Figure 14).

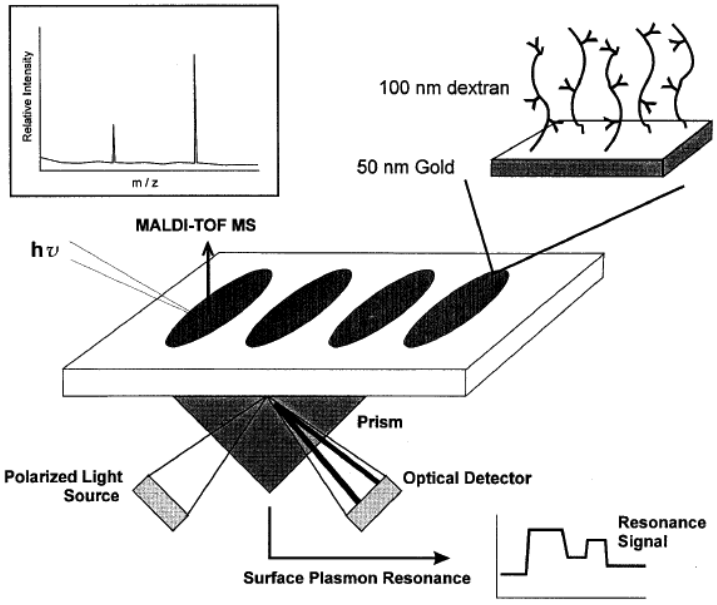


Figure 14 : Principe de la BIA/MS [137]

Malgré des résultats encourageants en milieu idéal, la méthode de dépôt manuel de la matrice est source de contamination croisée entre les pistes. C'est pourquoi Nelson et Nedelkov avait proposé en 2000 l'utilisation d'un spray [134] afin de déposer la matrice de pré-analyse MS par micro gouttelettes projetées plutôt que le dépôt d'un volume trop

important risquant de fusionner avec les pistes alentours. Ils ont montré une capture de la protéine RBP (Retinol binding protein) dans du plasma humain dilué 100 fois. La mesure par SPR a conduit à la mesure de 8 femtomoles/mm^2 de protéine RBP capturée. Après retrait de la puce de l'appareil SPR un dépôt de matrice a été réalisé grâce à un spray. L'analyse par MALDI-TOF en protéines entières des entités capturées a permis de démontrer la présence de molécules de masse (21 048 Da) proche de celle attendue. Ces résultats encourageants ont montré la nécessité d'optimiser les procédures pour l'amélioration de la sensibilité et de la précision car la différence entre le poids moléculaire théorique de la protéine RBP (21065 Da) et celui mesuré expérimentalement ne permettait pas une identification significative, empêchant toute discrimination de structure (variant).

Il faudra attendre 2008 pour voir apparaître la digestion on chip des analytes capturés par couplage d'une microbalance de SAW instruments GmbH (S-sens® K5 sensor) à une analyse MALDI-TOF [[153]]. Après capture de la thrombine en tampon, une solution de digestion est déposée sur les éléments de capture. Après incubation et séchage, la matrice est déposée pour réaliser l'analyse MS qui contribuera à la génération de spectres de masse et par profilage peptidique à l'identification significative de la protéine Thrombine.

Dans le cas de protéine complexe ou de la recherche de modification post traductionnelle liée à une pathologie, l'analyse par spectrométrie de masse en tandem (MS-MS) devient nécessaire. Au sein du laboratoire, nous avons montré la capacité de la BIA/MS à analyser par MS-MS des peptides détectés après analyse MS [[141]]. L'étape de capture sur puce SPR a conduit à une capture à l'échelle de la femtomole d'un marqueur potentiel du cancer du sein. Son identification par MS et une analyse MS-MS d'un peptide contribuant aussi à une identification de la protéine recherchée ont été obtenues après l'optimisation d'étapes manuelles de digestion et dépôt de matrice sur puce.

L'utilisation des technologies telle que la SPR ou les micros balances posent cependant une limitation de taille, celle de la capacité du multiplexage pour le screening de plusieurs biomarqueurs. Effectivement, la recherche de biomarqueurs dans le domaine clinique nécessite un réseau de biocapteurs dans le cas des microbalances ou un réseau de biorécepteurs dans le cas d'une puce SPR. Les appareils commerciaux de SPR proposent en général un faible nombre de zones d'analyse appelées pistes. A titre d'exemple, le système ProteOn XPR36 de chez Bio-Rad propose 6 pistes, le T200, 4 pistes et le Biacore 4000, 16 pistes au maximum. Récemment, la communauté scientifique éprouve un fort intérêt pour l'imagerie par résonance des plasmons de surface car cette configuration permet l'analyse

SPR en format array c'est-à-dire sous un format d'une multitude de zones de biorécepteurs variés disposés selon un tableau (array) prédéfini. Contrairement à la configuration habituelle de la SPR qui propose une cellule fluidique (piste) par type de biorécepteurs [154], la SPRi permet l'étude d'un nombre important d'interaction en parallèle en même temps [135,136]. Elle est également d'un grand intérêt si la puce après la biointeraction peut être analysée par spectrométrie de masse en évitant les contaminations et la perte d'analyte capturé. Bellon et al ont montré en 2009 (Figure 15), la capture en temps réel de β-lactoglobulin et d'ovalbumine en tampon sur puce commerciale SPRi présentant 12 zones de biorécepteurs appelés spots : 6 d'anti-β-lactoglobulin et 6 d'anti-ovalbumine. La puce est retirée de l'appareil de SPRi et séchée. Une solution de digestion (trypsine) est déposée manuellement sur chaque spot ainsi que de la matrice après séchage du mélange peptidique. L'analyse par MALDI-TOF a montré pour la première fois, la détection et l'identification des protéines d'ovalbumine et de β-lactoglobulin sur puce SPRi par MS et MS-MS [151].

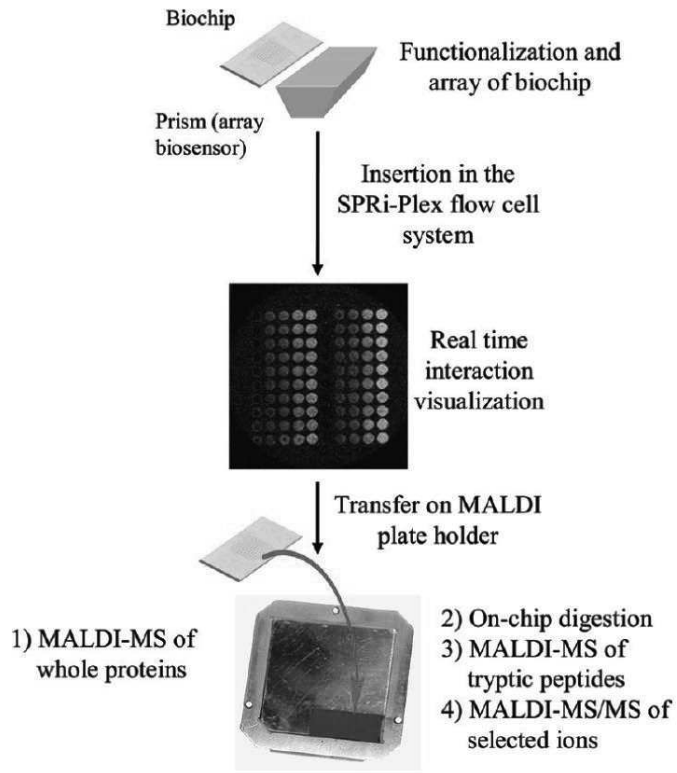


Figure 15 : Principe de la SPRi – MALDI.MS et MS/MS [151]

L'enrichissement par affinité en SPRi couplé à l'analyse sur puce par spectrométrie de masse MALDI présente un intérêt majeur en protéomique grâce à la capacité d'analyse en temps réel d'un grand nombre d'interactions biomoléculaires et grâce à la facilité d'analyse structurelle des marqueurs capturés. Malgré les avancées récentes de 2011 en milieu

complexe [145] qui ne présentent pas d'identification des analytes capturés, le couplage SPRi-MS nécessite d'importants développements comme la maîtrise du greffage des biorécepteurs pour amélioration de la spécificité des interactions en milieu complexe et la conception d'une interface plus polyvalente entre SPRi et MS.

I.2.4 Les besoins d'une nouvelle plateforme d'analyse

Les techniques de dosage par simple quantification d'analyte capturé présente des limites incompatibles avec l'étude des biomarqueurs en milieu complexe. Les limitations intrinsèques aux anticorps, par exemple, pourraient conduire à des réponses ambiguës quand ils sont utilisés dans des tests biologiques car ils ne peuvent pas discriminer les isoformes d'une protéine cible qui serait marqueur d'une pathologie. C'est principalement le cas lorsque la structure de la protéine est modifiée (suppression de séquence par exemple en dehors du site épitope) ou lorsque la protéine a été modifiée par modifications post-traductionnelles. De plus le fragment Fc d'un anticorps est une source d'adsorption non spécifique lorsqu'il est en présence d'un pool de protéines très complexes comme le plasma ou les extraits cellulaires. C'est la raison pour laquelle de nombreux cas de tests immunologiques (tests directs et sandwich) ne sont pas suffisamment précis et donne une quantification biaisée d'antigènes sans la discrimination d'une sous-population. Dans certains cas, des tests biologiques doivent être repensés pour tenir compte de la co-existence de ces variants protéiques.

Dans certaines pathologies, il existe un besoin pour le diagnostic d'aller au-delà du dosage biologique classique et nécessite une nouvelle instrumentation analytique qui apporte des informations plus complètes sur la structure des biomarqueurs capturés. Très peu de nouveaux biomarqueurs ont été approuvés par la FDA, ces dernières années en raison d'un taux élevé de découvertes faussées par des méthodes classiques et un manque de robustesse des études pour leur validation. De nos jours, la spectrométrie de masse apparaît comme le meilleur outil d'analyse afin de permettre l'identification sans ambigüité par séquençage et interrogation d'une banque de données, apportant ainsi de nouvelles informations pour la réévaluation des biomarqueurs connus et pour la découverte de variantes structurelles potentiellement plus pertinentes que la technique conventionnelle. Des travaux récents, traitant du couplage des bioassays (ELISA) avec la spectrométrie de masse, démontrent l'utilité de cette combinaison dans le cadre de plateformes analytiques pour la discrimination des isoformes structurelles [155,156]. Cependant, tout comme l'approche commerciale SELDI-TOF décrite précédemment, la biointeraction se déroule en aveugle et la qualité de l'immunocapture n'est pas visualisable ni quantifiable préalablement à l'analyse MS. C'est pourquoi les techniques d'analyses en

protéomique couplant la spectrométrie de masse à une technique d'enrichissement par biocapteur se diversifient. La plupart consiste, dans un premier temps à enrichir une surface des analytes recherchés pour les analyser directement sur puce ou après élution. Les biocapteurs les plus utilisés à ce jour sont incontestablement les biocapteurs SPR. L'analyse par élution de l'analyte est le plus courant, elle permet l'utilisation de chimie 3D telle que le dextran qui propose un rendement d'immobilisation d'anticorps très élevé. Mais il est particulièrement difficile de procéder à une élution sur des zones de petites dimensions. De plus le faible nombre de canaux (piste) en SPR limite considérablement le suivi simultané de plusieurs marqueurs.

Depuis 2007, la technologie émergente est le couplage des microarrays avec la spectrométrie de masse [136,151]. Cette technologie combine le pouvoir haut débit de l'analyse multiplexée par SPRi à la rapidité et à la sensibilité de l'analyse par MALDI-TOF. Le format array que propose la SPRi permet de suivre de nombreuses interactions simultanées et les faibles coûts de production des consommables sont des éléments non négligeables pour la création d'une telle plateforme pour le domaine clinique de routine. Mais à ce jour, il n'existe aucune plateforme d'analyse capable de combiner la puissance analytique de l'imagerie par SPR à la puissance de caractérisation fine que propose la spectrométrie de masse et ce en milieu complexe (Annexe 2). Les derniers travaux font état d'une procédure d'analyse par imagerie SPR de plusieurs protéines en milieu idéal et en milieu complexe, mais elle ne peut être suivie en temps réel du fait de la configuration de leur instrument et des techniques d'incubation [145]. La caractérisation par MS a été réalisée en protéine entière et sur peptide issu d'une digestion in situ (dépôt manuel de trypsine) et ne permet pas l'identification significative des cibles capturées du fait d'une trop grande différence de masse entre la mesure et la masse théorique. De nombreux développements sont donc nécessaires pour mettre en œuvre une plateforme d'analyse fiable et performante.

I.3. Objectifs et organisation de la thèse

Nous nous proposons de développer une plateforme d'analyse destinée à la capture et à la caractérisation fine des biomarqueurs à partir d'un échantillon biologique complexe en couplant la technologie d'imagerie SPR avec la spectrométrie de masse MALDI-TOF.

Dans un premier temps (chapitre I), nous avons développé des puces aux propriétés plasmoniques compatibles avec l'instrumentation d'imagerie SPR d'HORIBA-Scientific; SPRi-Plex II. L'utilisation des techniques de salle blanche et de caractérisation, ont permis de générer des puces hautement sensibles, reproductibles et à faible coût. Nous avons pu établir

par couplage de la SPRi avec l'AFM (microscope à force atomique), une corrélation entre signal plasmon mesuré et la quantité réelle de matériel biologique capturé validant ainsi la fiabilité des mesures d'interaction.

Nous proposerons ensuite (chapitre III), les développements nécessaires à une analyse sur puce par spectrométrie de masse des éléments biologiques fixés à sa surface. Nous exposerons les choix technologiques originaux permettant les préparations chimiques et enzymatiques nécessaires à une analyse en MALDI-TOF ainsi que les premiers résultats de couplage puce / MS.

Nous verrons enfin au chapitre IV les développements effectués pour la réalisation et la biofonctionnalisation des puces SPRi par des biorécepteurs d'affinité naturels (anticorps) immobilisés sur une monocouche autoassemblée. Nous présenterons les performances de capture d'un biomarqueur en milieu idéal et en plasma humain et nous développerons les stratégies nécessaires pour limiter les phénomènes d'adsorption non spécifique en milieu complexe. Nous démontrerons ensuite que les procédures MS développées au chapitre III sont compatibles avec les biopuces SPRi au format arrays. L'automatisation des procédures MS et l'analyse des spectres MS viendront confirmer la validation du couplage SPRi-MS. Ce couplage sera nommé SUPRA-MS pour Surface Plasmon Resonance in Array coupled with Mass Spectrometry.

II. DEVELOPPEMENT D'UN BIOCAPTEUR

Dans le premier chapitre, nous avons vu qu'il existe un nombre très important de moyens de détection de biomarqueurs. L'imagerie par résonance des plasmons de surface paraît être une technique de transduction particulièrement bien adaptée pour le suivi en temps réel des interactions sans marquage pouvant être couplée à une analyse par spectrométrie de masse. La qualité de l'identification des protéines dépendra d'une multitude de paramètres dont la capacité du biocapteur à capturer de façon spécifique et en quantité suffisante. C'est pourquoi nous développerons dans cette partie, la conception et la réalisation d'un biocapteur par imagerie SPR en vue d'une utilisation en milieu complexe et compatible en spectrométrie de masse. Après une brève introduction historique et théorique, nous présenterons la conception du transducteur (puce d'or) suivie de l'élaboration de l'immunopuce.

II.1. Imagerie par résonance des plasmons de surface

L'imagerie par résonance des plasmons de surface est sensible à la variation d'indice de réfraction induite à la surface du capteur dans les limites de la profondeur de pénétration d'une onde évanescente. Cette technique classée parmi les méthodes de détection sans marquage (détection directe) permet le suivi en temps réel des interactions à étudier. L'appareil d'imagerie SPR utilisé dans le cadre de cette étude sera le SPRi-Plex II d'HORIBA-Scientific.

II.1.1 Historique

En 1902, Wood découvre, en observant le spectre d'une source de lumière blanche à partir d'un réseau de diffraction en réflexion, des bandes sombres dans le spectre diffracté [157]. Fano comprendra en 1941 que ces anomalies étaient liées aux ondes de surface [158]. En 1968, Otto [94] découvre que ces ondes peuvent être excitées en utilisant la réflexion totale atténuée tandis que Krestchmann et Raether les obtiennent dans une autre configuration [93]. Les plasmons de surface deviennent un outil de plus en plus répandu pour la caractérisation des films minces et l'étude de phénomènes se déroulant sur des interfaces métalliques. A titre d'exemple, Nylander et Liedberg ont utilisé pour la première fois en 1983 la configuration de Kretschmann pour la détection des gaz et biomolécules [159]. Le fort engouement pour la détection et la compréhension des phénomènes d'interactions biomoléculaires a contribué à la commercialisation d'appareil SPR dans les années 1990.

II.1.2 Les plasmons de surface

Lorsqu'un faisceau lumineux incident en polarisation Transverse Magnétique (TM) traverse un milieu d'indice n_1 avec un angle θ supérieur à l'angle critique θ_c, le rayon lumineux ne pénètre pas dans le milieu d'indice optique n_2 lorsque $n_1 > n_2$ et se trouve totalement réfléchi dans le milieu d'indice n_1 ; c'est la réflexion totale interne ou TIR (Figure 16A). Au même moment se produit une onde évanescente appelée plasmon de surface qui se propage dans le milieu diélectrique couvrant le milieu d'indice n_2. Le plasmon de surface correspond à une oscillation d'électrons. Cette onde se propage parallèlement à l'interface et est caractérisée par une décroissance exponentielle de son amplitude avec la distance de part et d'autre de l'interface métal - diélectrique. Sa propagation est modifiée par toute perturbation présente dans le milieu diélectrique (Figure 16B).

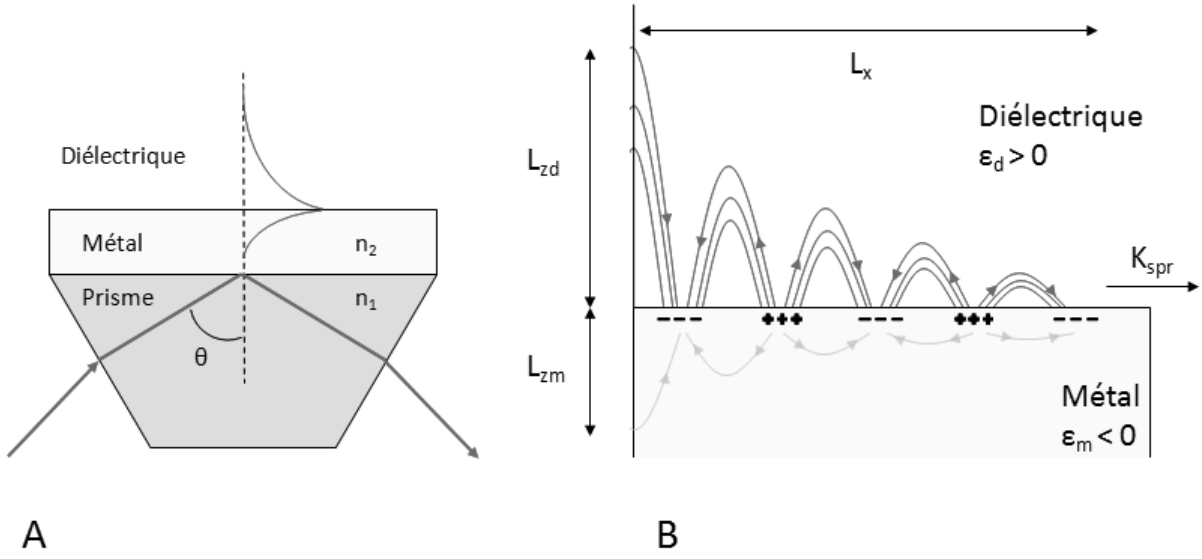


Figure 16 : Représentation schématique du principe SPR ; (A) phénomène de résonance des plasmons sous l'effet d'un rayon lumineux incident subissant la TIR, (B) Oscillations des plasmons de surface.

D'après les calculs basés sur les équations de Maxwell, la composante longitudinale K_{spr} du vecteur d'onde vaut :

$$K_{spr} = Re\left(\sqrt{\frac{\varepsilon_m \cdot \varepsilon_d}{\varepsilon_m + \varepsilon_d}}\right) \cdot \frac{\omega}{c} \qquad \text{(II.1)}$$

avec ε_d la permittivité du milieu diélectrique, ε_m la permittivité du métal, c la célérité de la lumière en $m.s^{-1}$ et ω la pulsation en $rad.s^{-1}$ qui est liée à la longueur d'onde λ du faisceau incident par la relation : $\omega = c2\pi/\lambda$. La permittivité diélectrique est la propriété physique qui

décrit la réponse d'un milieu donné à un champ électrique appliqué. Elle est donnée par l'indice optique du milieu n et s'écrit : $\varepsilon = n^2 = (n_0 + ik)^2$ avec n_0 la partie réelle de l'indice de réfraction du milieu et k le coefficient d'extinction qui mesure la perte d'énergie d'un rayonnement électromagnétique traversant un milieu transparent. n_0 et k dépendent des caractéristiques du milieu ainsi que de la longueur d'onde émise dans ce milieu.

La pénétration dans le milieu diélectrique et dans le métal respectivement nommé L_{zd} et L_{zm} et la distance L_x jusqu'à laquelle l'onde se propage dans la direction x peuvent être définies par les équations suivantes :

$$L_{zm} = \frac{c}{2\omega} \cdot \left(\mathrm{Im}\left\{ \sqrt{\frac{{\varepsilon_m}^2}{\varepsilon_m + \varepsilon_d}} \right\} \right)^{-1} \quad \text{(II.2)}$$

$$L_{zd} = \frac{c}{2\omega} \cdot \left(\mathrm{Im}\left\{ \sqrt{\frac{{\varepsilon_d}^2}{\varepsilon_m + \varepsilon_d}} \right\} \right)^{-1} \quad \text{(II.3)}$$

$$L_x = \frac{c}{2\omega} \cdot \left(\mathrm{Im}\left\{ \sqrt{\frac{\varepsilon_\mathrm{m} \cdot \varepsilon_\mathrm{d}}{\varepsilon_m + \varepsilon_d}} \right\} \right)^{-1} \quad \text{(II.4)}$$

Si on s'intéresse à la configuration du SPRi-Plex II fonctionnant à une longueur d'onde de 810 nm et d'après les mesures d'indices de réfraction des matériaux utilisés en particulier l'or, nous pouvons constater que l'indice optique du milieu couvrant (diélectrique) est étroitement lié à la perturbation provoquée par une interaction biologique à l'interface car la majeure partie de l'onde évanescente (94 %) est confinée dans le diélectrique et permet ainsi de sonder tout changement se produisant dans le milieu à moins de 175 nm de l'interface (L_{zd}).

AN : indice de réfraction de l'or : $\tilde{n}_{Au}$ = 0.187 + 5i à 810 nm, indice de réfraction de l'eau : $\tilde{n}_{eau}$= 1.3288 à 810 nm [160]

Résultats :

L_{zm} = 12.4 nm, L_{zd} = 175.1 nm, L_x = 16.8 µm, 94.1 % du champ est concentré dans le milieu couvrant.

II.1.3 Principe de la SPRi

Il existe deux principales configurations de dispositif d'imagerie SPR sur puce. La première configuration, la moins répandue est celle dite par réseau de diffraction. Plutôt que d'augmenter l'indice de réfraction du milieu d'incidence comme cela peut être le cas avec un

prisme de verre traditionnel, il est possible d'augmenter le vecteur d'onde du faisceau incident en le faisant interagir avec un réseau de diffraction. Un faisceau incident frappe la surface de la puce présentant une nanostructuration périodique recouverte d'or. La lumière réfléchie est captée par une caméra CCD. La réflexion du faisceau sera alors sensible aux interactions biomoléculaires qui se déroulent à la surface de l'or. Le principal désavantage de cette méthode est que les faisceaux incidents et réfléchis doivent traverser le milieu couvrant et peuvent être perturbés par les variations optiques des liquides injectés.

Dans le cadre de ce travail, nous nous intéresserons à la deuxième configuration davantage répandue celle dite de Kretschmann. Pour un angle d'incidence θ de TIR particulier et une longueur d'onde fixe, l'énergie apportée par le faisceau incident va créer une onde évanescente capable de résonner avec l'onde électromagnétique du plasmon de surface et va induire une absorption photonique se caractérisant par une diminution d'intensité du rayon réfléchi ; cet angle est appelé angle de résonance plasmonique.

Les appareils commerciaux peuvent être basés selon trois configurations différentes. Lorsqu'un événement biologique se produit à l'interface métal / diélectrique et, si seule la longueur d'onde est fixée, l'énergie nécessaire pour exciter les plasmons de surface va changer et l'angle de résonance plasmonique va varier (interrogation angulaire, Figure 17A), au même titre que la longueur d'onde évoluera si l'on fixe l'angle d'incidence (interrogation spectrale, Figure 17B). Dans le cas d'un angle et d'une longueur d'onde fixe, l'intensité lumineuse va augmenter (interrogation en réflectivité, Figure 17A). A titre d'exemple, l'appareil de SPR commercialisé par BIAcore® est basé sur l'interrogation angulaire, il consiste à focaliser un faisceau lumineux sur une surface d'or engendrant une résonance des plasmons de surface à l'interface métal / diélectrique. Comme seule la longueur d'onde est fixe, la mesure des événements à l'interface est effectuée en mesurant le déplacement Δθ du minimum de réflectivité (Figure 17A) de la courbe plasmon à l'aide d'une barrette de photodiode.

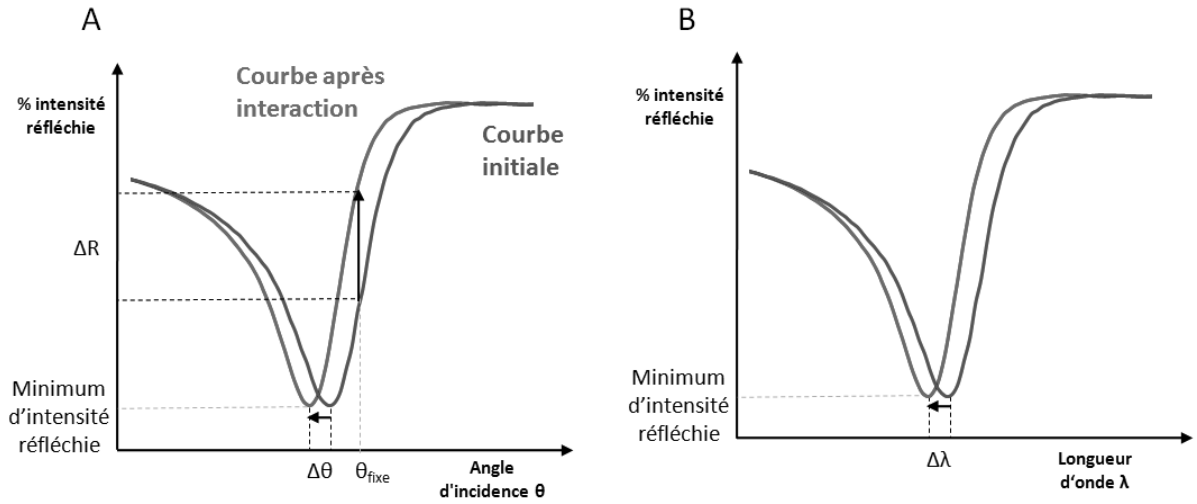


Figure 17 : Différentes méthodes de mesure d'évolution des courbes plasmon lors d'un événement à l'interface : (A) Δθ correspond à la mesure de la variation de l'angle d'incidence au minimum d'intensité réfléchie à longueur d'onde fixe lors d'un événement à l'interface (utilisé en SPR classique); ΔR correspond à la mesure de la variation de réflectivité ou intensité réfléchie à angle et longueur d'onde fixes (utilisé en imagerie SPR). (B) Δλ correspond à la mesure de la variation de longueur d'onde au minimum d'intensité réfléchie à angle fixe.

Dans le cas de l'imagerie SPR, le système doit mesurer une variation de réflectivité ΔR lors d'une interaction biologique à l'interface. Comme pour la configuration SPR, le faisceau incident ne doit pas traverser le milieu qui, par sa composition diverse, pourrait perturber sa propagation. C'est pourquoi la configuration de Kretschmann qui consiste à exciter les plasmons par l'arrière du capteur grâce à un prisme est la plus répandue pour ce genre de biocapteur (Figure 16A). L'appareil SPRi-Plex II de chez HORIBA-Scientific, sur lequel les développements présentés dans ce manuscrit ont été réalisés, est basé sur une méthode courante en imagerie SPR : l'interrogation en réflectivité. En effet, l'interrogation angulaire nécessiterait un balayage du faisceau lumineux à un rythme adapté à la vitesse d'acquisition de la caméra, mais qui ne serait pas compatible avec la durée d'interaction biologique mesurée. Le schéma de principe du SPRi-Plex II est représenté en figure 18. Une source de lumière monochromatique émet un faisceau lumineux qui, une fois collimaté par une lentille, est polarisé en TM. Dans un premier temps, un miroir motorisé permet de faire varier l'angle d'entrée du faisceau dans un prisme de haut indice optique (n_p = 1.76). Le faisceau est dirigé, avec un angle variable, vers la surface dorée de la puce ou du prisme. Le rayon réfléchi est alors capté par une caméra CCD, elle-même reliée à un ordinateur. L'intensité de la lumière réfléchie va pouvoir être enregistrée en fonction de l'angle d'incidence du faisceau incident émis par le miroir, il en résulte la courbe plasmon présentée en figure 17A.

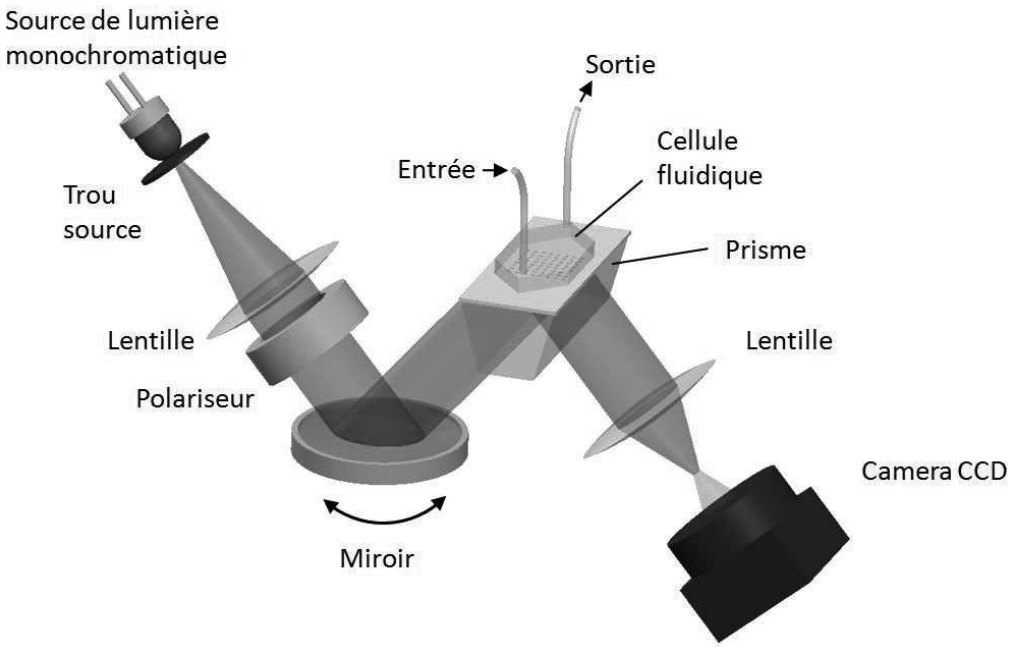


Figure 18 : Représentation schématique du trajet optique de l'appareil d'imagerie SPR (SPRi-Plex II) utilisé au cours de la thèse.

La variation de réflectivité sera optimale lorsqu'une perturbation à l'interface provoquera une variation maximale. Pour une sensibilité optimale, il faudra donc se référer à l'endroit de la courbe plasmon où la pente est maximale. Dans le cas de l'interrogation en réflectivité, il suffira, à longueur d'onde fixe, de choisir l'angle d'incidence de travail θ_t vérifiant $\left|\frac{dR}{d\theta}\right|(\theta_t) = max\left|\frac{dR}{d\theta}\right|$, ce qui est le cas pour le SPRi-Plex II ou à fixer un angle de travail et à choisir la longueur d'onde vérifiant $\left|\frac{dR}{d\lambda}\right|(\lambda_t) = max\left|\frac{dR}{d\lambda}\right|$. Dans les deux cas, la longueur d'onde et l'angle de travail sont fixés. Au-dessus du prisme doré ou de la puce d'or est disposé un appareillage microfluidique constitué d'une voie d'entrée, d'une cellule fluidique et d'une voie de sortie (Figure 18).

Dans le cas du SPRi-Plex II, la longueur d'onde est fixée à 810 nm puis, après balayage du faisceau grâce au miroir motorisé, l'utilisateur peut choisir l'angle de travail optimal à l'expérience. En effet, l'imagerie SPR permet de mesurer la variation de réflectivité moyenne sur des zones prédéfinies sur la surface de la puce par l'utilisateur. Ces zones que l'on nommera ROI (region of interest) sont de forme circulaire et de taille variable (30 à 8000 µm). Il peut être choisi jusqu'à 500 ROIs, qui sont en règle générale localisés sur les zones présentant les biorécepteurs. Le choix de l'angle de travail θ_t à fixer est commun à chaque ROI, l'utilisateur doit donc choisir l'angle le plus judicieux en fonction de l'expérience à

réaliser. Dans la pratique, θ_t sera fixé à la pente maximale de la courbe plasmon des ROIs présentant le plus grand intérêt en s'aidant des valeurs de la dérivée affichées par le logiciel.

Une fois l'angle de travail fixé, les interactions peuvent avoir lieu grâce à un dispositif fluidique ajusté à la surface de la biopuce (Figure 19). Ce dispositif est équipé d'une pompe permettant la circulation du tampon de course, celui-ci est éliminé de ses bulles à l'aide d'un dégazeur en amont de la pompe. Celle-ci est connectée à une valve qui selon sa position permet d'acheminer le tampon de course soit directement dans la cellule fluidique soit dans la boucle d'injection pour pousser l'échantillon dans la cellule.

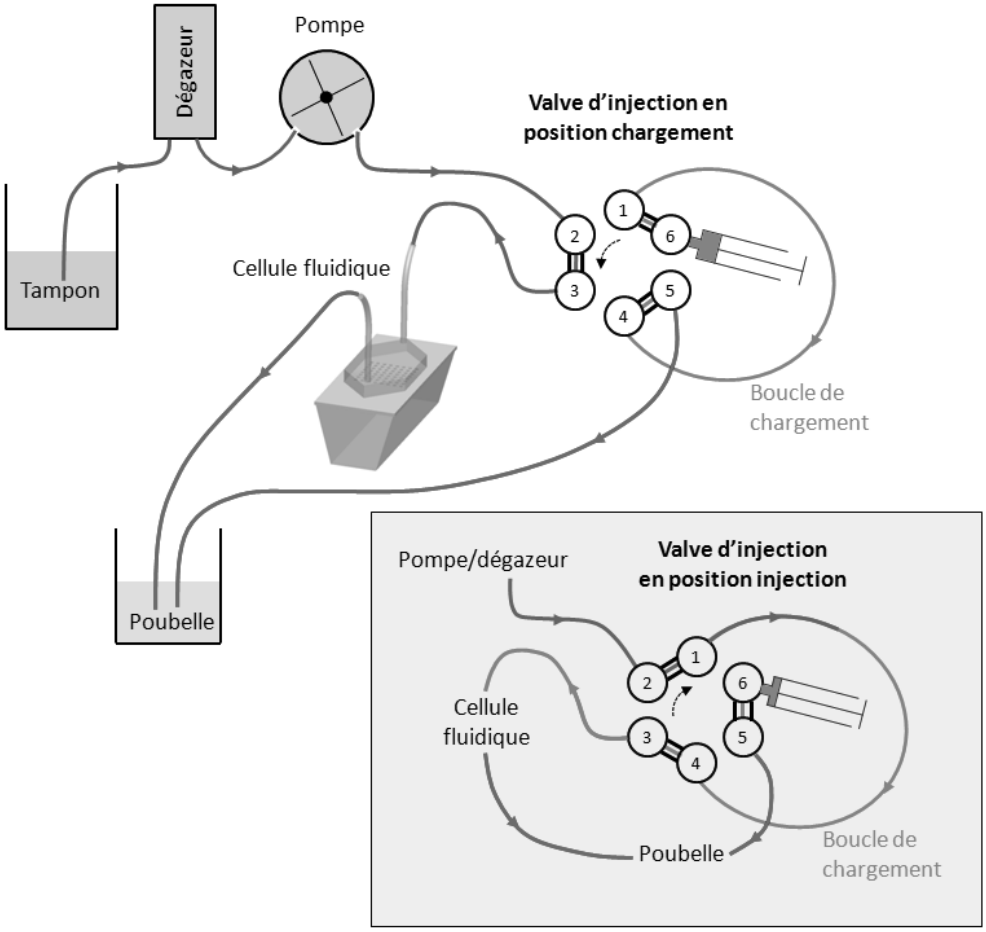


Figure 19 : Représentation schématique du système fluidique SPRi-Plex II. Les deux configurations de la valve sont représentées. La première en position chargement qui consiste à injecter l'échantillon dans la boucle de chargement. La deuxième (dans l'encadré) représente la position de la valve en position injection, le tampon de course est dirigé dans la boucle d'injection ce qui achemine l'échantillon jusque dans la cellule fluidique.

Lorsque la valve est en position « chargement », le tampon de course parcourt la cellule fluidique avec un débit contrôlé par la pompe et l'utilisateur peut alors charger la boucle d'injection de l'échantillon qu'il désire faire passer sur la puce. La boucle d'injection est un tube en polyéther éther cétone (PEEK) de longueur variable selon les volumes d'échantillon à injecter (généralement 200 ou 500 µL). Lorsque la valve est actionnée, le tampon de course, poussé par la pompe, est dirigé dans la boucle d'injection alors elle-même connectée à la cellule (encadré Figure 19) ; l'injection a lieu.

Au cours de l'injection de l'échantillon, va s'opérer une interaction biologique entre récepteurs fixés à la surface de la puce et cibles contenues dans l'échantillon, ce qui va induire une variation localisée de l'indice optique. Cette évolution d'indice va alors perturber la résonance des plasmons de surface se traduisant par une modification de l'intensité du faisceau réfléchi. Ces variations de réflectivité sont enregistrées au cours du temps (Figure 20A) et représentées sur un « sensorgramme » recueillant ainsi les données cinétiques de la phase d'association entre le récepteur immobilisé et la cible, suivie d'une phase de dissociation, une fois que le tampon de course circule à nouveau sur la puce (Figure 20B). En utilisant un modèle cinétique de Langmuir 1.1, il est alors possible de déterminer les constantes d'association et de dissociation pour le couple récepteur / cible et par extension la constante d'équilibre de la réaction aussi nommée constante d'affinité.

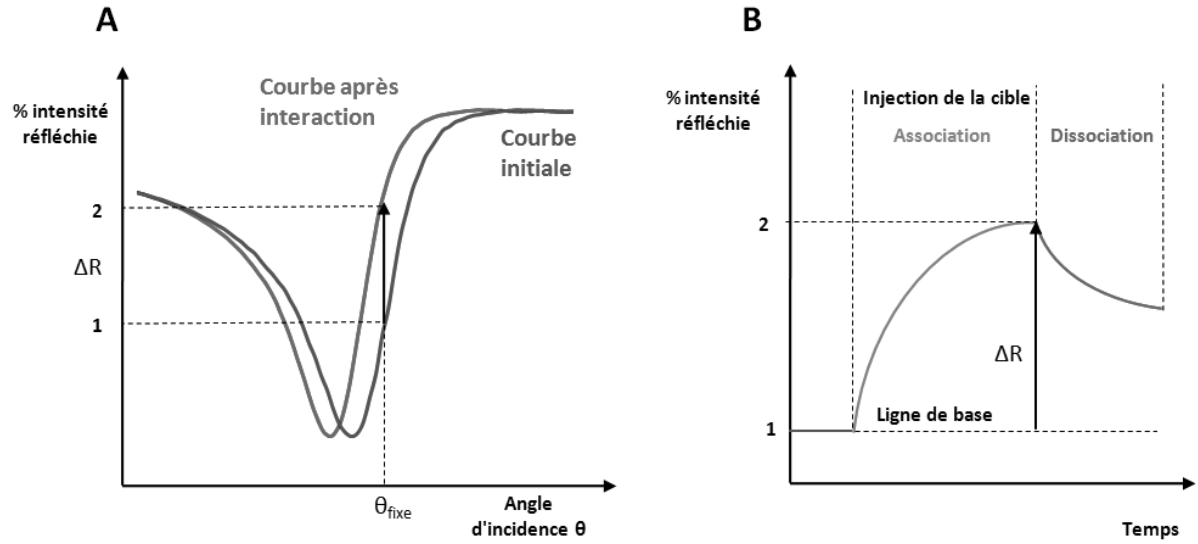


Figure 20 : (A) Evolution de la courbe plasmon avant (1) et après (2) une interaction à la surface de la biopuce, (B) suivi en temps réel de la variation de réflectivité décrivant la phase d'association et la phase de dissociation

II.2. Aspect théorique et expérimental

Les travaux réalisés et présentés dans ce manuscrit ont pour objectif de développer et valider une nouvelle plateforme d'analyse combinant la spectrométrie de masse à l'imagerie SPR. Le développement des puces doit être pensé en fonction des contraintes de ces deux technologies mais également être compatible avec une analyse en routine au sein de la plateforme de protéomique CLIPP et, dans le futur, au sein d'hôpitaux ou de laboratoires de recherche. Nous détaillerons dans un premier temps les contraintes et les choix technologiques pour la fabrication de la puce d'or, élément clef du transducteur.

II.2.1 Conception de la puce d'or

II.2.1.1 Dimension et type de verre

L'appareil d'imagerie SPR commercialisé par HORIBA-Scientific propose deux configurations de montage de la puce ; le prisme doré ou la lame de verre dorée couplée à un prisme de verre. Le prisme doré présente de nombreux avantages: en effet, les biorécepteurs sont directement greffés à la surface du prisme recouvert d'or, le montage de celui-ci dans l'appareil est très simple et ne génère pas de contraintes mécaniques supplémentaires. De plus, le chemin optique est minimal car le faisceau lumineux ne doit traverser que le chrome (Cr) couche d'accroche avant d'atteindre l'or. L'analyse MS est destructive car elle peut détériorer la couche d'or et incite donc à utiliser des substrats bas coût ce qui n'est pas le cas des prismes dorés. De plus, le prisme a une hauteur trop importante (9 mm) pour être utilisé dans les spectromètres de masse Bruker Daltonics, dont l'Ultraflextrem disponible à l'IFR SANTE-STIC de Dijon. En effet, pour procéder à l'analyse MS directe de la puce, elle doit être compatible avec l'épaisseur de la cible MALDI (8 mm) habituellement utilisée pour déposer des échantillons biologiques à analyser. Le laser est réglé pour être focalisé au niveau de la surface de la cible MALDI, il faut donc adapter par usinage mécanique la cible pour y insérer la puce. Seule la lame de verre est compatible avec cette configuration. Il est à noter qu'une cible MALDI peut être analysée par n'importe quel spectromètre de masse MALDI. Durant ces travaux, les analyses MS ont été réalisées principalement avec l'Utraflextrem mais également l'Autoflex de Bruker Daltonics.

Les puces sont considérées comme consommables, le facteur coût de la puce devra entrer en considération. Le SPRi-Plex II est conçu pour utiliser des prismes et des lames en SF11 de haut indice optique (n_{SF11} = 1.7640 à 810 nm). Néanmoins, le choix du type de verre pour les lames se portera sur du verre de type Borosilicate Crown, plus communément appelé BK7 qui présente un plus faible indice optique (n_B = 1.5106 à 810 nm) que le SF11. Ce type de verre

qui peut être réalisé par étirement, s'avère au prix de la lame moins onéreux qu'une lame en SF11 poli. Les dimensions des lames de verre (28 mm x 12.5 mm x 0.3/0.5 mm) commandées chez AGAR Scientific (Angleterre) seront proches des dimensions commerciales afin de s'adapter au mieux à l'appareil et aux utilisateurs potentiels par la suite.

Dans un souci de fabrication des lames en moyenne série et afin de réduire les coûts, un support en téflon a été réalisé pour un nettoyage collectif avant le dépôt de métal. Ce nettoyage consiste à plonger durant 10 min les lames dans un bain sous ultrasons d'éthanol, d'acétone puis d'eau ultra pure suivi d'un séchage à l'azote. La position verticale des lames permet de faciliter l'élimination des impuretés. La capacité de chargement de 30 lames permet d'optimiser les temps de nettoyage. Les lames de verre peuvent ensuite être recouvertes de métal à propriété plasmonique.

Le choix du métal pour réaliser le transducteur dépendra de ses qualités plasmoniques et devra présenter des propriétés physico-chimiques compatibles avec les fonctionnalisations de surface.

Plusieurs métaux permettent de générer le phénomène de SPR à 810 nm: l'or, l'argent, le cuivre ou l'aluminium. Le cuivre et l'aluminium s'oxydent très rapidement à l'air respectivement en CuO et Al_2O_3. L'argent présente la courbe de résonance plasmon la plus étroite et donc une meilleure sensibilité théorique [161] mais il s'oxyde également. Il est donc incompatible pour la réalisation de capteurs SPR. L'or présente une bonne caractéristique plasmonique, de nombreuses chimies de fonctionnalisation possibles et sa stabilité dans le temps le rend le plus adapté aux puces SPR.

La couche de métal déposée sur la lame doit présenter une bonne adhérence sur le verre ce qui n'est pas le cas de l'or. Pour améliorer l'adhérence de l'or sur les composés d'oxydes comme le verre, il est préconisé d'utiliser une fine couche d'accroche de chrome (1 à 2 nm) [162–164] ou de titane (5 nm) [165,166]. A noter que certains auteurs ont utilisé une multicouche chrome-argent-or plus sensible que la bicouche chrome-or mais plus délicate à maitriser donc à reproduire [161,167,168].

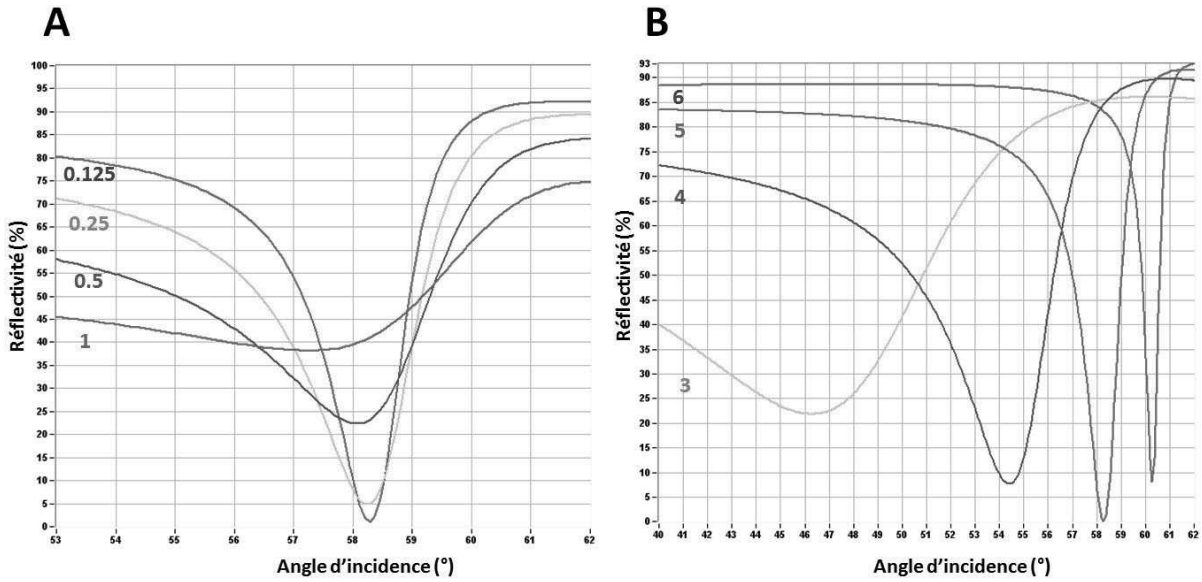


Figure 21 : Influence théorique des paramètres du métal sur la réponse SPR. (A) Influence de la valeur de l'indice de réfraction du métal indiqué sur le graphe à une partie imaginaire constante (k = 5). (B) Influence de la valeur de la partie imaginaire de l'indice de réfraction du métal indiqué sur le graphe à un indice de réfraction constant (n_0 =0.14)

Comme illustré en figure 21, plus la partie réelle de l'indice de réfraction du métal est faible et plus le pic d'adsorption dû à la SPR est étroit. On retrouve le comportement inverse dans le cas de la partie imaginaire de l'indice de réfraction. Le métal idéal devrait s'approcher de l'indice optique $n = i \cdot \infty$. D'après la littérature, il est difficile d'obtenir avec précision les indices optiques pour l'or car les valeurs diffèrent selon les sources et la qualité du dépôt. Nous nous baserons sur les indices suivants pour l'or $n_{AU} = 0.1500 - 5.0027 \cdot i$ [[169,170]annexe 4] et pour le chrome $n_{Cr} = 3.1816 - 3.4689 \cdot i$ [[171]].

Les simulations présentées dans ce manuscrit ont été réalisées à l'aide d'un programme écrit par Emmanuel Maillart durant sa thèse dans laquelle est détaillé l'ensemble des calculs et des justifications telles que la polarisation en TM [[170] annexe 3].

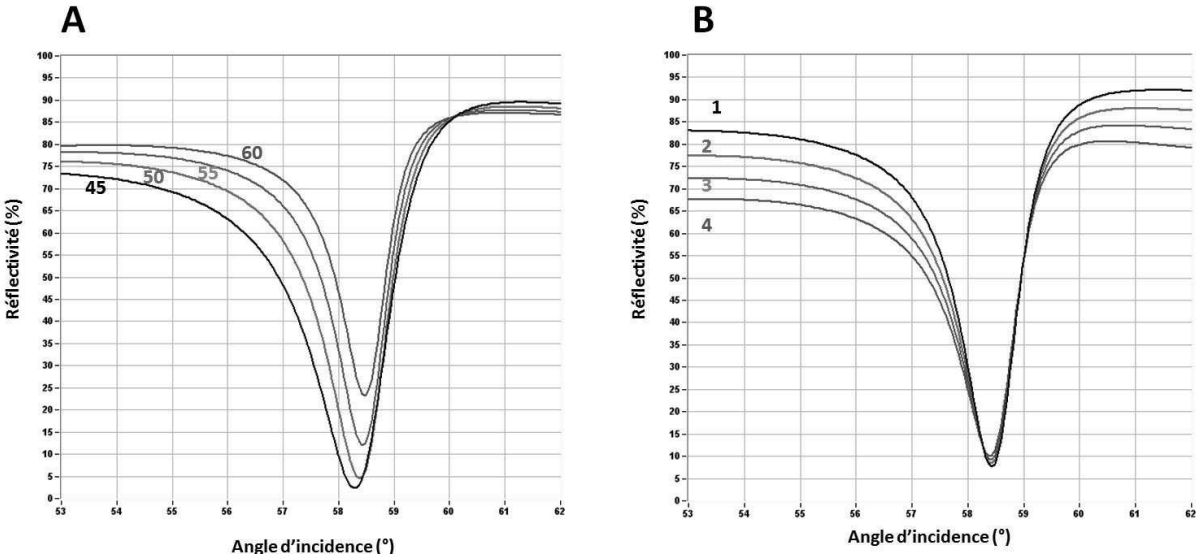


Figure 22 : Influence des épaisseurs du métal sur la réponse SPR d'une lame dorée. (A) Influence de l'épaisseur de l'or indiquée sur le graphe en nm pour une épaisseur de chrome de 2 nm. (B) Influence de l'épaisseur du chrome indiquée sur le graphe en nm pour une épaisseur d'or de 50 nm.

Les simulations montrent en figure 22 que l'épaisseur de la couche métallique d'or a beaucoup plus d'influence que l'épaisseur de la couche d'accroche de chrome pour les plages d'épaisseurs étudiées. En effet, on remarque que plus l'épaisseur de l'or est faible et plus le pic d'adsorption s'élargit et le minimum de réflectivité diminue alors que, lorsque l'épaisseur augmente, le pic d'adsorption devient plus « pointu » augmentant ainsi la pente de la courbe et donc la sensibilité de la mesure. Au contraire, l'épaisseur de la couche d'accroche ne va pas agir sur la sensibilité mais seulement sur la hauteur des plateaux de part et d'autre du pic d'adsorption.

L'objectif sera alors de réaliser des essais de dépôt de chrome de 1 à 4 nm suivis d'un dépôt de 55 à 60 nm d'or afin de contrôler expérimentalement la réponse plasmon et ainsi optimiser les paramètres de dépôt.

II.2.2 Dépôt et états de surface variables

Afin de procéder au dépôt des différentes couches de métal, deux types de méthodes sont à notre disposition à la centrale technologique MIMENTO (MIcrofabrication pour la MEcanique, les Nanosciences, la Thermique et l'Optique) de Besançon : La technique de dépôt par pulvérisation cathodique (Figure 23A) et la technique par EBPVD (Electon Beam Physical Vapeur Deposition) (Figure 23B).

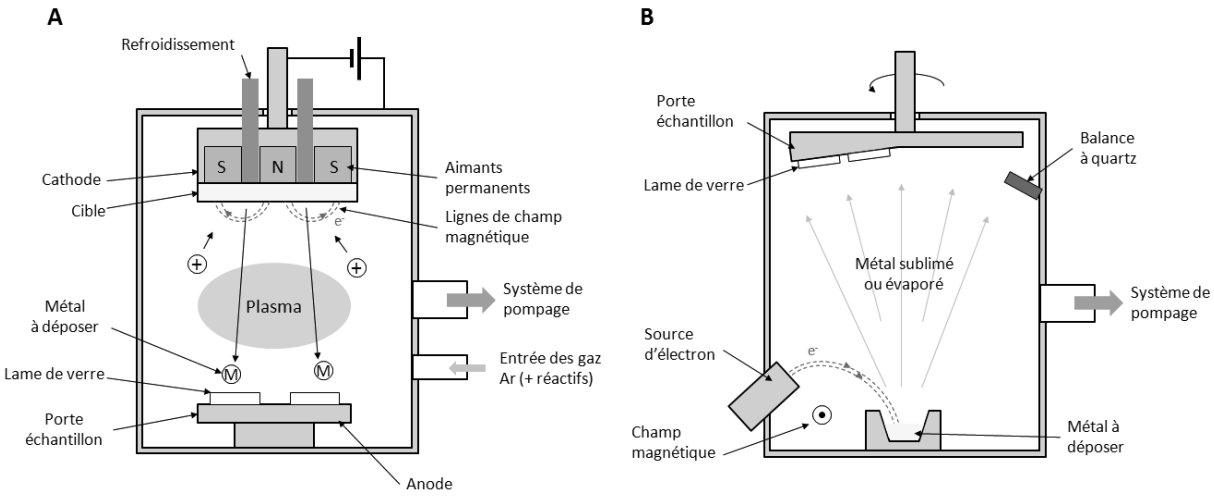


Figure 23 : Principe des métallisations des lames de verres : (A) par pulvérisation cathodique magnétron, (B) par évaporation par canon à électron ou EBPVD.

II.2.2.1 Dépôt par pulvérisation cathodique magnétron

La pulvérisation cathodique magnétron est une technique consistant à recouvrir la surface d'un substrat par des atomes provenant du bombardement d'une cible (cathode), constituée du matériau à déposer, par des ions énergétiques lourds (en général Ar+) issu d'un plasma (Figure 23 A). Une contrainte liée au bâti de dépôt limite à sept le nombre de lames de verre par porte-échantillons du bâti de pulvérisation magnétron DC (PLASSYS). Après l'obtention d'un vide à 10^{-6} mbar, de l'argon est injecté à 7 x 10^{-3} mbar. Un décapage de 2 min à une puissance de 150 W (générateur RF) permet le nettoyage de la surface du verre. Le chrome est déposé immédiatement après le décapage à une intensité de 0.3 A soit à une vitesse de 316 Å/min [^{172}] pendant 2 s afin d'obtenir une couche d'environ 1nm. L'or est déposé sur la couche de chrome à la même intensité à une vitesse de 1150 Å/min pendant 28 s afin d'obtenir une couche d'environ 55 nm. La technique de pulvérisation cathodique est une technique relativement rapide comparée aux autres méthodes, car seul le temps de pompage du vide initial ralentit la procédure qui est d'environ 30 min pour un dépôt de 28 puces (4 portes échantillons contenant 7 puces chacun). Néanmoins, en figure 24, nous avons montré une forte hétérogénéité de l'épaisseur de dépôts sur une zone de la taille d'un wafer 4 pouces due à la conception même de l'appareil de dépôt. En effet les champs magnétiques des aimants présents dans la cathode provoquent une surépaisseur de métal déposé suivant une couronne dont le rayon est compris entre 15 et 30 mm à partir du centre du porte échantillon. Les lames de verre doivent être déposées suivant ce disque limitant ainsi le nombre d'échantillons par dépôt.

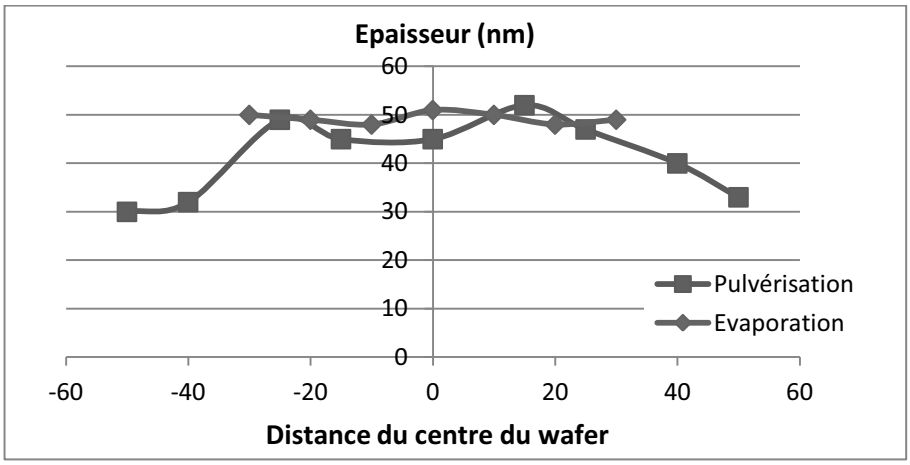


Figure 24 : Répartition de l'épaisseur de dépôt sur un wafer 4 pouces en pulvérisation et 3 pouces en évaporation

De plus, l'usure préférentielle de certaines zones de la cible de métal induit une variation des paramètres de dépôt et donc des modifications de l'épaisseur déposée qui requièrent une calibration régulière des paramètres de dépôt.

II.2.2.2 Dépôt par EBPVD : Electron Beam Physical vapeur deposition

La technique EBPVD (Figure 23B) consiste à bombarder une cible de métal à déposer par un faisceau d'électrons émis par un filament de tungstène sous haute tension dans un vide poussé (10^{-6} mbar). Le faisceau d'électron, qui est dirigé sur la charge de métal à l'aide d'un champ magnétique, provoque la transformation en phase gazeuse des atomes de la cible. Ainsi le métal se dépose sur l'ensemble de l'enceinte recouvrant ainsi les échantillons. Le bâti de dépôt à disposition est un évaporateur EVA 450 (Alliance Concept) qui permet d'accueillir 5 porte-échantillons de la taille d'un wafer 3 pouces. Dans un souci d'optimisation des coûts de fabrication, un support de puces en acier inoxydable a été réalisé pouvant accueillir 15 lames de verre par porte-échantillons permettant une production maximale de 75 puces par dépôt (5 x 15). Le support de puce (Figure 25A) est équipé d'une excroissance permettant de dessiner un détrompeur directement sur l'or (Figure 25B) sur chacune des puces. Ce repère permet d'une part de différencier le côté or du côté verre de la puce et d'autre part de définir une origine pour l'analyse par spectrométrie de masse.

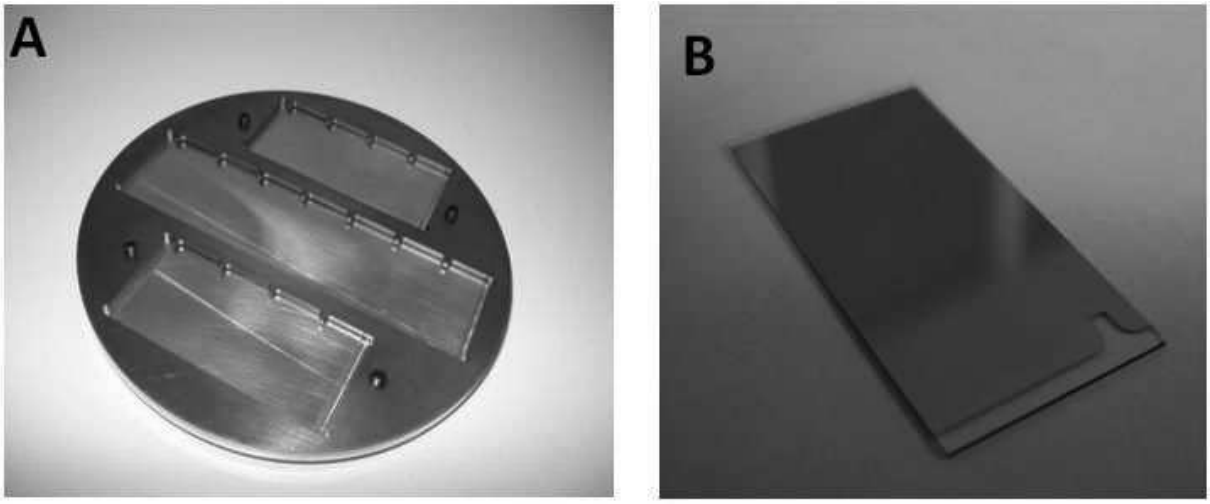


Figure 25 : (A) Support permettant le dépôt d'or par évaporation sur 14 puces simultanément. (B) Lame de verre recouverte d'une fine couche de chrome et d'or présentant un détrompeur.

Dans un premier temps, les puces sont décapées pendant 2 minutes par un faisceau d'ions argon neutre produit à partir d'un canon à ions (HCN Veeco 3000). Ensuite, les paramètres ont été optimisés de façon à obtenir des vitesses de dépôt adaptées aux matériaux à déposer (pression : 4 x 10^{-6} mbar, ampérage : 0.5 A, vitesse de rotation du porte échantillon : 5 tr/min). Cette technique présente l'avantage d'obtenir une épaisseur homogène inter et intra porte-substrat (Figure 24), de pouvoir traiter un grand nombre d'échantillons et de pouvoir choisir la taille des grains d'or à la surface de la puce. Les puces d'or dédiées à la SUPRA-MS seront fabriquées par dépôt de chrome et d'or à température ambiante dans l'environnement technologique.

II.2.2.3 Réponse plasmon et topographie

Les paramètres de pulvérisation ou d'évaporation ont été ajustés de façon à obtenir la meilleure réponse plasmon possible (Figure 26A) pour chaque méthode de dépôt. En effet, la simulation théorique des plasmons donne une idée de l'épaisseur optimale des couches de métal mais dans la pratique, il est difficile d'obtenir un modèle fidèle à la réalité tenant compte de l'ensemble des paramètres du banc optique et des caractéristiques des couches métalliques. A titre d'exemple, la rugosité de surface, liée au paramètre de dépôt, peut induire un biais non négligeable à la simulation [[173]].

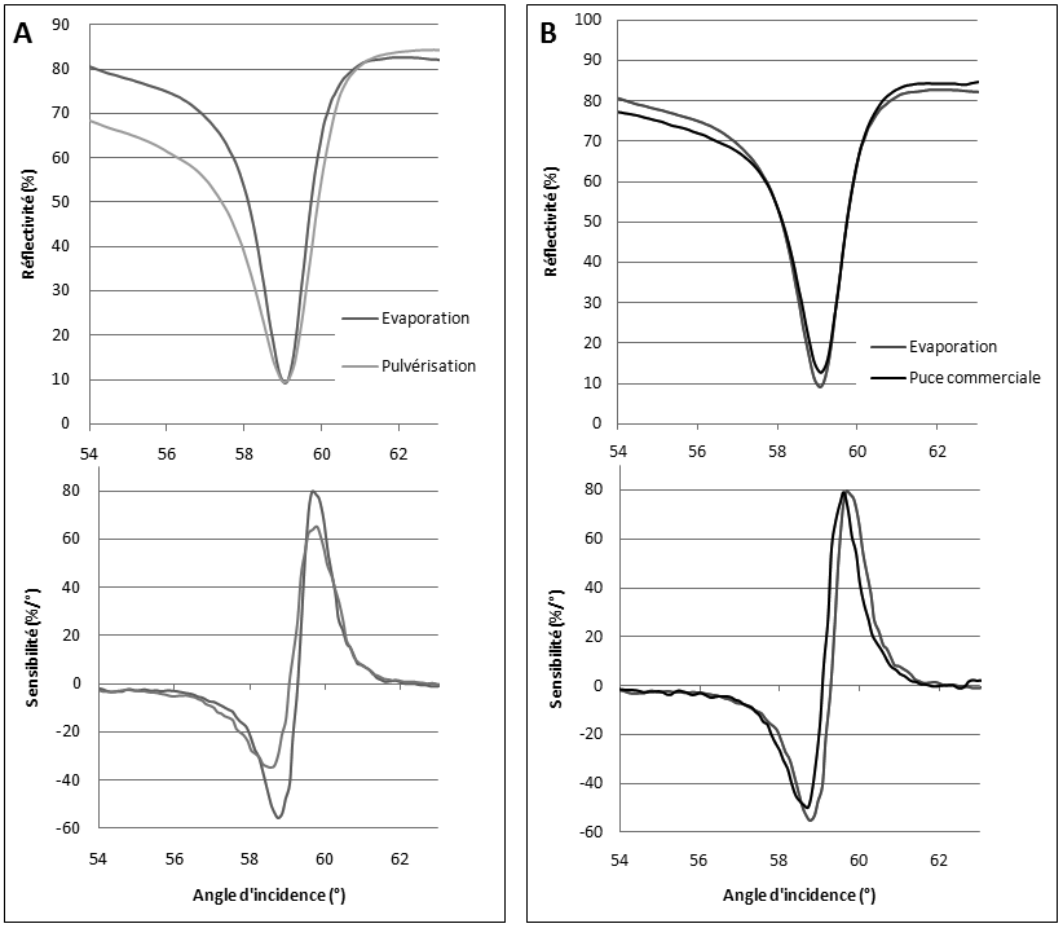


Figure 26 : (A) Exemple de réponse plasmon des puces d'or réalisées par pulvérisation et évaporation. (B) Comparaison des réponses plasmon des puces d'or commerciales (verre SF11 + dépôt Schott) et des puces home made (BK7 + dépôt par évaporation).

Après différentes optimisations par modification de la pression d'argon et de la vitesse de dépôt, les puces réalisées par pulvérisation présentent une moins bonne sensibilité (65%/° ±5) que les puces fabriquées par évaporation (75%/° ±5). Ceci s'explique par la structure de l'or obtenue par la méthode de dépôt qui, par pulvérisation présente des grains compris entre 5 à 30 nm contre 20 à 60 nm en évaporation (Figure 27). Les puces par évaporation ont été sélectionnées comme puce de routine et présentent les mêmes caractéristiques plasmoniques que les puces commerciales (Figure 26B) pour un coût plus faible.

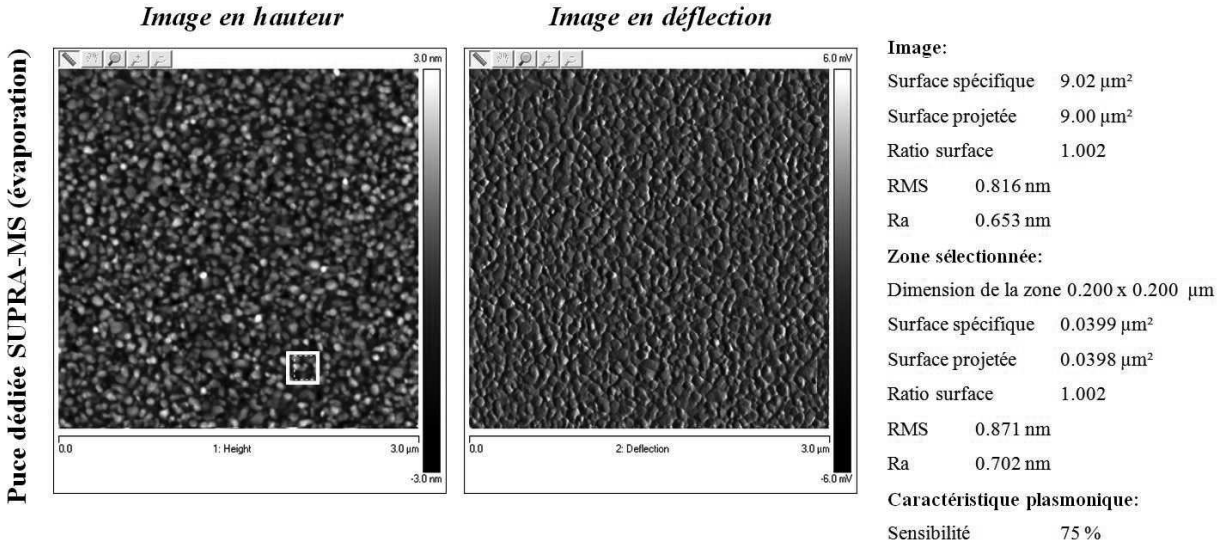


Figure 27 : Images AFM en hauteur et en déflection et caractéristiques topographiques des puces home-made dédiées à la SUPRA-MS.

L'épaisseur de la couche métallique et la topographie de la surface ont pu être mesurées par microscopie à force atomique. L'épaisseur est déterminée par mesure de marche après avoir réalisé un lift-off de la couche d'or et de chrome. Ainsi nous avons pu déterminer expérimentalement que l'épaisseur totale devait être comprise entre 52 et 56 nm dont 1 à 2 nm de chrome pour obtenir des sensibilités optimales (> 70 %/°) et reproductibles. La surface présente des grains d'or de taille variable d'environ 60 nm et une rugosité (Ra) d'environ 0.65 nm. Une propriété intéressante est le rapport entre la surface spécifique (ou réelle) et sa surface projetée (ou apparente). En effet, la surface exposée à la biodétection est la surface spécifique. Plus elle est importante par rapport à la surface apparente et meilleure sera la sensibilité de la capture. Dans le cas d'un capteur SPR, les contraintes liées à l'épaisseur de la couche métallique limite la possibilité de forte structuration de surface. Ici quelle que soit la fenêtre de mesure (3 x 3 ou 0.2 x 0.2 µm), le rapport des surfaces est unitaire (1.002).

II.2.3 Optimisation instrumentale: couplage puce / prisme

Le couplage de la puce sur le prisme est réalisé par de l'huile de haut indice optique afin de conserver la continuité optique. Le montage commercial de la puce sur le prisme consiste à coupler ces derniers par un film d'huile qui couvre totalement le prisme (Figure 28A). Cependant, lors du serrage de la cuve sur la puce, des contraintes déforment la puce et provoquent une hétérogénéité de la réponse à la surface de celle-ci visible sur l'image SPR de la puce et qui se traduit par une dispersion en angle des courbes plasmons suivant la largeur de la puce. Lorsqu'un angle de travail sera fixé, la sensibilité sera alors altérée sur les courbes pour lesquels l'angle ne sera pas optimal. Cette hétérogénéité sera caractérisée par la variation

d'angle (noté Δangle sur la Figure 28A) entre les deux courbes les plus éloignées. Cette hétérogénéité de sensibilité suivant la zone de mesure engendrera une variation de la réponse (jusqu'à 50% de variation de sensibilité pour les puces d'épaisseurs 300 µm et 20 % pour les puces de 500 µm) mais provoquera également de fortes dérives du signal qui compromettent la fiabilité des mesures (0.3 %/min pour les puces 300 µm, 0.07 %/min pour les puces 500 µm).

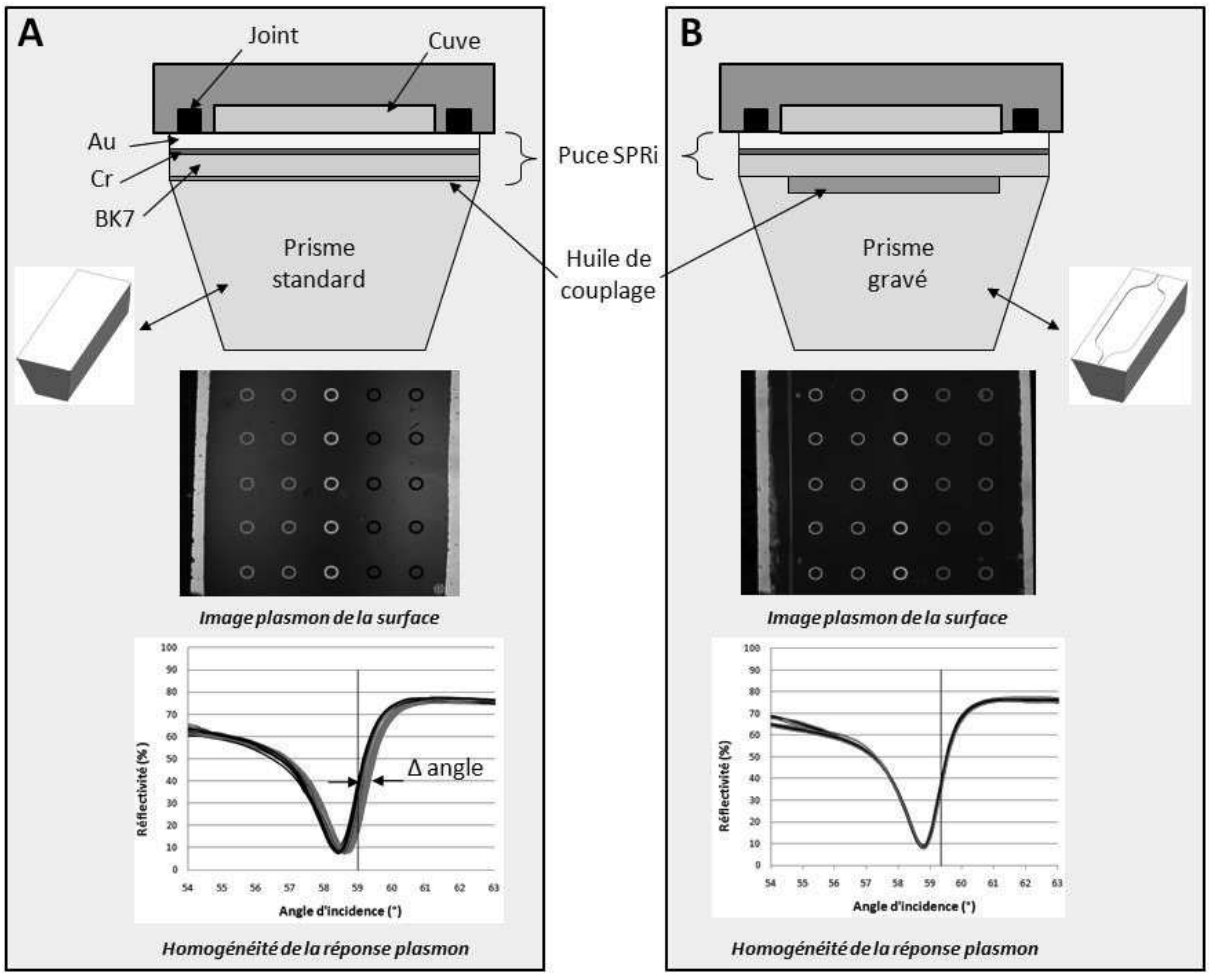


Figure 28 : Configuration du couplage de la puce sur le prisme, image plasmon de la surface de la puce et des ROIs, homogénéité des réponses plasmoniques des ROIs. (A) Configuration commerciale, la puce est directement couplée par un film d'huile d'indice de réfraction similaire au prisme. (B) Configuration expérimentale utilisée: une gravure sur le prisme forme un réservoir d'huile pour le couplage de la puce sur le prisme.

Pour contrer ce problème d'hétérogénéité de la sensibilité, un prisme a été gravé en son centre par HORIBA-Scientific sous la fenêtre d'analyse (Figure 28B). Sa profondeur d'environ 7 µm agit comme un réservoir d'huile qui, après une série de tests, nécessitera une huile translucide d'indice de réfraction de 1.65 (contrairement à l'huile commerciale utilisée pour le prisme standard, colorée et d'indice 1.75). L'huile d'indice 1.65 est plus visqueuse et

présente l'avantage de ne pas sécher même après 48 h d'expérience, ce qui n'est pas le cas pour l'huile d'indice 1.75 qui peut sécher en quelques heures et mettre fin à l'expérimentation en cours. Le montage par prisme gravé présente le principal avantage de limiter les contraintes mécaniques au centre de la lame et ainsi d'obtenir une bien meilleure homogénéité des réponses plasmons avec en moyenne seulement 10 % de variation de sensibilité et une dérive de la ligne de base inférieure à 0.003 %/min soit un gain d'un facteur 20 comparé à un montage classique par prisme standard. Toutefois, du fait de n'avoir aucun appui au centre de la lame de verre, une variation de pression induite par un changement de débit engendre une déformation de la lame. Celle-ci va influencer l'intensité réfléchie mesurée par les ROIs, ce qui se traduit par un saut d'indice sur le sensorgramme. Ce saut d'indice dépendra du delta de pression (Δp) et de l'épaisseur de la lame, car lors des procédures expérimentales nécessitant des changements de débit de 20 à 50 µL/min ($\Delta p = 10^{-2}$ bar) sur une puce de 300 et 500 µm, nous noterons respectivement un saut d'indice de 0.5 % de VR et 0.1 % de VR. Cet artéfact peut avoir un impact pour la mesure de cinétique mais n'aura pas d'incidence lors d'une mesure quantitative de l'interaction.

Dans la suite de l'étude, les lames de verre de 500 µm d'épaisseur seront choisies. Elles seront couplées à un prisme gravé par de l'huile d'indice 1.65.

II.3. Conversion de ΔR en taux de recouvrement surfacique Γ

L'étude précédente n'avait pas pour objectif de développer des puces SPRi plus sensibles que les puces commerciales mais plutôt d'élaborer des puces bas coût présentant des performances similaires. Nous allons nous intéresser à la réponse générée par la puce lors d'un événement à sa surface. En effet, de nombreux travaux traitent du développement des capteurs SPRi, mais il est important de pouvoir quantifier les éléments d'interaction biomoléculaire. L'objectif sera donc de transformer une grandeur optique en une grandeur biologique dépendante de la concentration de matière à la surface du capteur. Comme nous l'avons vu précédemment, la variation de réflectivité provoquée par la variation d'indice de réfraction est indirectement liée à la quantité de matière déposée sur le transducteur; cette grandeur est Γ, le taux de recouvrement surfacique.

II.3.1 Aspect théorique

La conversion entre ΔR et taux de recouvrement surfacique Γ pour l'appareil SPRi-Plex II a été établie par le Dr Emmanuel Maillart [170]. Cette conversion, d'après les équations de Maxwell, peut s'avérer très complexe mais Stenberg et al ont démontré que la réponse SPR varie quasi-linéairement avec la variation du taux de recouvrement surfacique de protéines

marquées par radioactivité [95]. Cette première approximation, valable seulement si (e_b<< Lz_c ≈ 200 nm) peut se traduire par la relation suivante [95]:

$$\Gamma = \frac{|n_c - n_b| \cdot e_b}{\partial n / \partial C} \quad \text{(II.5)}$$

avec n_c, l'indice de réfraction du milieu couvrant (ou milieu diélectrique), n_b et e_b, l'indice de réfraction et l'épaisseur du milieu biologique et $\partial n/\partial C$, l'incrément d'indice de la molécule étudiée en $cm^3.g^{-1}$. L'indice du milieu est connu, l'indice et l'incrément d'indice de la molécule biologique dépendent de ses propriétés pouvant être mesurées par réflectomètre d'Abbe [174]. Et dans les cas où les propriétés biologiques de la molécule étudiée ne sont pas connues, elles peuvent être approximées car l'incrément d'indice ne varie que très peu en fonction des protéines et des oligonucléotides [175]. Dans le cas des protéines, l'évaluation de Γ dans le logiciel du SPRi-Plex II est obtenue à partir des valeurs n_b = 1.41 et $\partial n/\partial C$ = 0.19 cm^3/g [176,177].

La relation liant la réflectivité mesurée et l'épaisseur de la couche biologique e_b peut être obtenue par calibration de l'appareil. En réalité, il s'agira du recouvrement progressif de la surface de molécules de dimension donnée, mais cette hypothèse va permettre d'établir une calibration à partir d'une variation d'indice de réfraction d'un milieu global [178]. Il pourra alors être défini un indice effectif n_{eff} tenant compte de l'indice du milieu couvrant et de l'indice de la couche biologique qui sera calculé à partir d'une moyenne pondérée entre n_b et n_c tel que:

$$n_{eff} = \frac{1}{L_{Zc}} \cdot \int_0^{\infty} n(z) \cdot exp\left(-\frac{z}{L_{Zc}}\right) \cdot dz \quad \text{(II.6)}$$

Avec n(z) l'indice de réfraction à la hauteur z. On sait que n(0<z<e_b) = n_b et n(e_b<z) = n_c et d'après l'hypothèse que e_b<< L_{Zc}, l'équation (II.6) peut être simplifiée par :

$$n_{eff} = n_c + \frac{(n_b - n_c) \cdot e_b}{L_{Zc}} \quad \text{(II.7)}$$

La calibration de l'appareil va consister à injecter successivement le tampon d'interaction d'indice de réfraction connu n_c suivi du même tampon de concentration légèrement différente (indice de réfraction n_{cal}) de façon à obtenir une faible variation d'indice de réfraction entre les deux injections d'environ (Δn_c= 10^{-3}). La sensibilité réelle de l'appareil peut alors être écrite :

$$S_{P,R} = \frac{\Delta R_{Cal}}{\mathrm{n_{Cal}} - \mathrm{n_c}} \quad \text{(II.8)}$$

avec $S_{P,R}$, la sensibilité $_{\text{Puce / Réflectivité}}$, ΔR_{Cal} est la variation de réflectivité mesurée après l'injection du liquide de calibration d'indice de réfraction $\mathrm{n_{Cal}}$ venant remplacer le tampon de course d'indice $\mathrm{n_c}$.

Une fois $S_{P,R}$ déterminé, il sera possible de mesurer tout changement d'indice de milieu couvrant par la relation :

$$\Delta R = S_{P,R} \cdot (n - n_c) \quad \text{(II.9)}$$

En combinant les équations (II.7), (II.8) et (II.9) et comme $n_{eff} = n$ il a été obtenu la relation de conversion entre ΔR et taux de recouvrement surfacique Γ :

$$\Gamma = \frac{\Delta R \cdot L_{Zc}}{S_{P,R} \cdot \partial n/\partial C} \quad \text{(II.10)}$$

avec :

ΔR la variation de réflectivité mesuré en % lors de l'interaction

L_{Zc} = 1,75.10^{-4} mm (longueur de pénétration de l'onde plasmon dans le milieu couvrant)

$\partial n/\partial C$ = 1,9.10^{-10} mm^3/pg (incrément d'indice pour les protéines et les oligonucléotides)

$S_{P,R}$ = Valeur obtenue par calibration de l'appareil

En posant F_c, le facteur de conversion $F_c = \frac{L_{Zc}}{S_{P,R} \cdot \partial n/\partial C}$, nous obtenons la formule de conversion suivante :

$$\Gamma = F_c \cdot \Delta R(\%) \quad \text{(II.11)}$$

D'autre part, à partir d'un prisme de SF11 recouvert de 48 nm d'or et pour un milieu couvrant d'indice $\mathrm{n_c}$= 1.333 et à longueur d'onde de 810 nm, la sensibilité théorique était $S_{P,R}\ théorique \approx$ 12 000 %/R.I.U [170] (Figure 29).

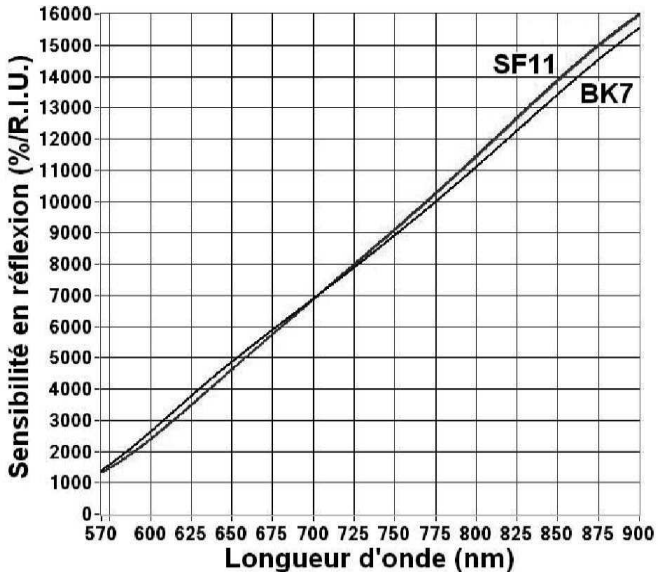


Figure 29 : Sensibilité SPR pour des différents prismes en BK7 et en SF11 en fonction de la longueur d'onde. [170]

Un écart de sensibilité entre les $S_{P,R}$ théorique et empirique est inévitable; il peut être la conséquence des nombreuses imperfections inhérentes d'une part à la conception et la réalisation de l'appareil telles que les systèmes optiques, la source lumineuse et d'autre part à la puce d'or pour laquelle les épaisseurs d'or varient d'un dépôt à l'autre de ± 1 nm tout comme la rugosité de surface qui influence la réponse plasmon [173]. Nous avons constaté cette variation de $S_{P,R}$ d'un appareil à l'autre.

Le facteur de conversion F_c permet de transformer la variation de réflectivité ΔR en taux de recouvrement Γ en pg/mm^2 et donc de remonter au nombre de molécules capturées si il s'agit d'une même espèce de poids moléculaire connue. Donc F_c est directement lié à la sensibilité $S_{P,R}$ (Figure 30) qui elle-même est liée à la forme du pic d'absorption dû à la résonance des plasmons de surface.

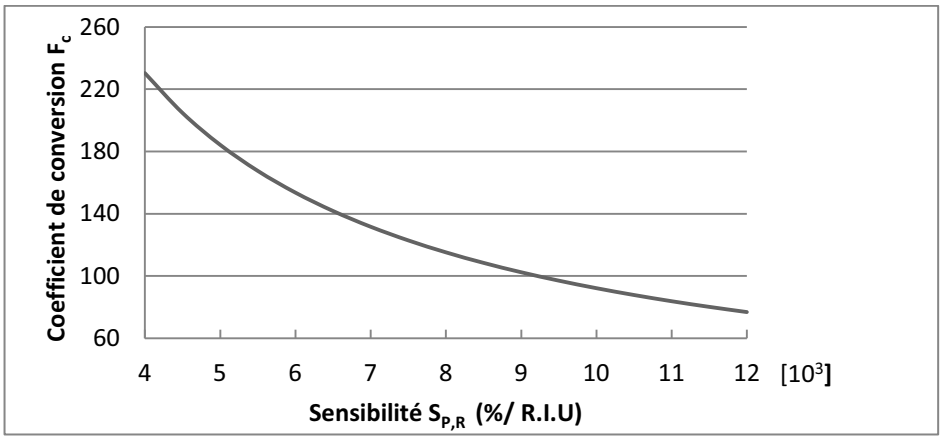


Figure 30 : Evolution théorique du coefficient de conversion Fc en fonction de la sensibilité $S_{P,R}$

Une variation du coefficient de conversion issu de plusieurs approximations et d'une calibration dépendante de nombreux paramètres va induire une erreur non négligeable sur l'évaluation du nombre de molécules fixées sur la puce et peut fausser les analyses quantitatives et qualitatives telles que les déterminations de constantes de cinétiques d'interactions.

II.3.2 Calibration de l'appareil par mesure de la sensibilité Sp,r

D'après la remarque précédente, la sensibilité $S_{P,R}$doit être estimée sur les appareils utilisés au cours des expériences. Pour cela, des injections de solutions à différents indices de réfraction vont permettre d'établir leurs coefficients $S_{P,R}$ respectifs. L'indice n d'une solution se définit en fonction de l'indice du solvant n_s et de la concentration C (g/ml) du soluté.

$$\Delta n = n - n_s = a_1 \cdot C + a_2 \cdot C^2 \qquad \text{(II.12)}$$

L'expression "incrément spécifique d'indice de réfraction" ou incrément d'indice, désigne la limite ΔR/C lorsque C tend vers 0 pour une longueur d'onde λ et une température T données.

$$\nu = \frac{\partial n}{\partial C} = \lim_{c \to 0} \left(\frac{\Delta n}{C} \right)_{\lambda,T} \qquad \text{(II.13)}$$

Dans le cas des solutés suffisamment dilués, l'expression devient:

$$n = n_s + \nu \cdot C \qquad (14)$$

Différentes solutions de sucrose diluées dans l'eau vont être injectées successivement. L'incrément d'indice du sucrose est $\frac{\partial n}{\partial C} = 0.143\ mg/ml$ et les solutions seront injectées de 0.5 à 30 mg/ml.

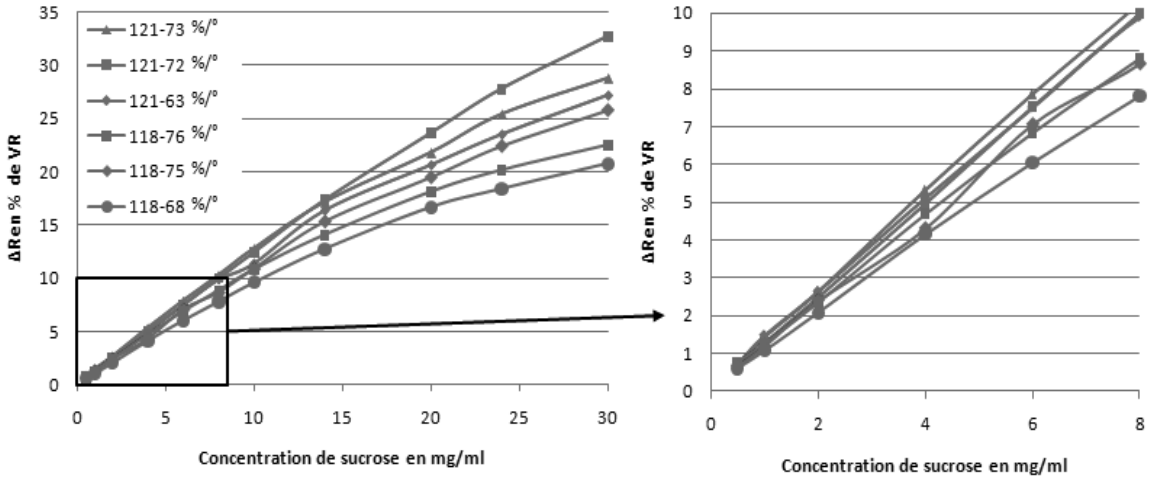


Figure 31 : Réponse plasmon à différentes injections de sucrose sur différentes puces de sensibilités différentes (en %/°) et sur différents appareils (appareil #118 en bleu et appareil #121 en rouge)

La variation de réflectivité suite aux injections de sucrose à concentration croissante répond de façon quasi linéaire sur une plage de réponse de 0 à 10 % de VR (Figure 31). Au-delà, une perte de linéarité est observée. Elle est due au fait que la pente de la courbe plasmon ne peut pas être parfaitement linéaire entre le minimum et le maximum de réflectivité.

D'après la concentration du sucrose et de son incrément d'indice qui en résulte dans la solution injectée Δn, il est possible de calculer par la simple relation $\frac{\Delta R}{\Delta n}$ le coefficient de sensibilité $S_{P,R}$.

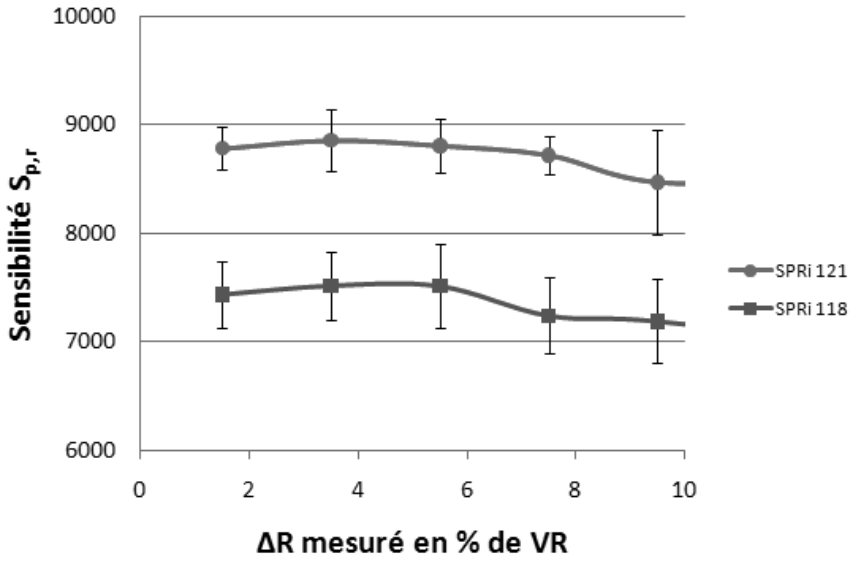


Figure 32 : Sensibilité Sp,r calculée en fonction de la variation de réflectivité mesurée suite à l'injection de sucrose, en rouge sur l'appareil #121, en bleu l'appareil #118

Il peut être facilement observé que le coefficient de sensibilité $S_{P,R}$ est dépendant de l'appareil utilisé (Figure 32). Nous relèverons une sensibilité moyenne de 7400 (σ ± 380) pour l'appareil #118 et 8700 (σ ± 325) pour l'appareil #121. Il apparait clairement que la qualité de la puce intervient directement sur le coefficient $S_{P,R}$ et signifie qu'une variation de 10 % de la pente de la courbe plasmon induit une variation de $S_{P,R}$ d'environ 10%.

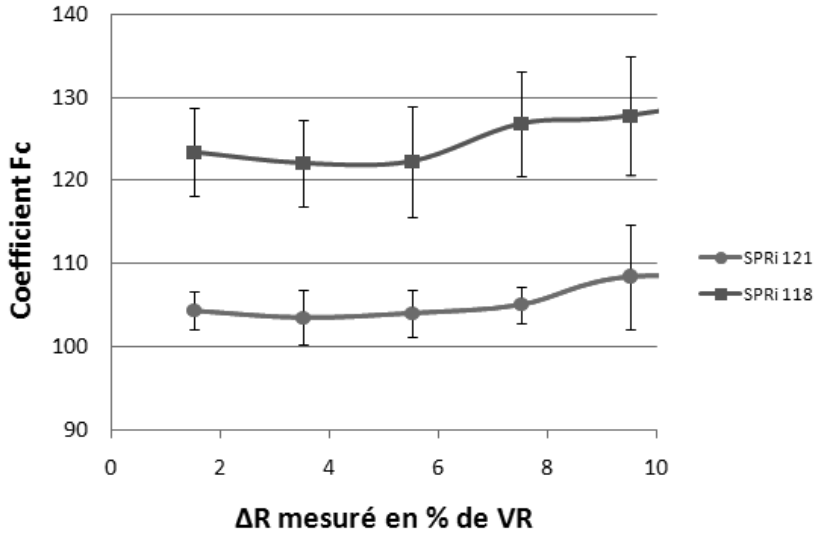


Figure 33 : Evolution du coefficient de conversion Fc en fonction de la variation de réflectivité mesurée suite à l'injection de sucrose (appareil #121 en rouge, #118 en bleu)

En toute logique, le coefficient de conversion du ΔR en taux recouvrement Γ peut être calculé pour chaque appareil en admettant qu'une variation de sensibilité des puces sera inévitable (Figure 33).

$$\Gamma(pg/mm^2) = 125\ (\pm 6) * \Delta R(\%) \text{ pour l'appareil \#118} \qquad (II.15)$$

$$\Gamma(pg/mm^2) = 105\ (\pm 4) * \Delta R(\%) \text{ pour l'appareil \#121} \qquad (II.16)$$

Nous allons nous intéresser à la réponse SPR suite à un événement biologique à la surface des puces. Pour cela, nous faisons le choix d'utiliser l'appareil SPRi-Plex II #118.

II.3.3 Vérification expérimentale de la corrélation ΔR / taux de recouvrement Γ

Dans un souci de fiabiliser les performances de la plateforme SUPRA-MS mais également toute biodétection de molécules traces par SPRi, nous devons vérifier si la formule de conversion du ΔR en taux recouvrement Γ est en phase avec le nombre réel de protéines fixées au capteur SPRi.

Afin de s'en assurer, nous allons faire le lien direct entre un greffage de molécule contrôlé en temps réel dans le SPRi-Plex II et le nombre réel de molécules à la surface de la puce

imagée par AFM. Le choix du type de molécules se portera sur des anticorps de type IgG car c'est ce même modèle biologique qui sera utilisé par la suite. Néanmoins, les puces SPRi classiques présentent une rugosité de surface telle que la largeur des grains d'or (20 à 60 nm) qui la recouvrent est proche de la dimension des anticorps ce qui rend difficile leur caractérisation topographique et leur dénombrement par AFM. C'est pourquoi des puces présentant une surface atomiquement plane et compatibles avec la SPRi ont été réalisées pour faciliter la visualisation d'anticorps par AFM sur la surface d'or.

II.3.3.1 Elaboration de substrats spécifiques

L'évaporateur EVA 450 utilisé pour la fabrication des puces classiques est équipé d'un système de chauffage des échantillons par des lampes halogènes à quartz. Les lames de verre nues sont portées à 280 °C, suivi du dépôt d'une couche d'accroche en titane à une vitesse de 2 Å/s et du dépôt d'or à 0.5 Å/s. Après un recuit de 8 heures, le chauffage est arrêté jusqu'à ce que la chambre revienne à la température ambiante. Dans ces conditions, le recuit provoquera une réorganisation des atomes d'or et la formation de grain d'or atomiquement plan appelés terrasses d'or [179]. Le titane a été préféré au chrome comme couche d'accroche dans le cas des puces à terrasse car il a été observé qu'il améliorait l'adhérence de l'or sur le verre pour un dépôt à chaud.

L'originalité de ces puces à terrasse vient de leur propriété plasmonique équivalente à celle des puces classiques SPRi (Figure 34) car elles présentent une sensibilité moyenne de 70 %/° ±10.

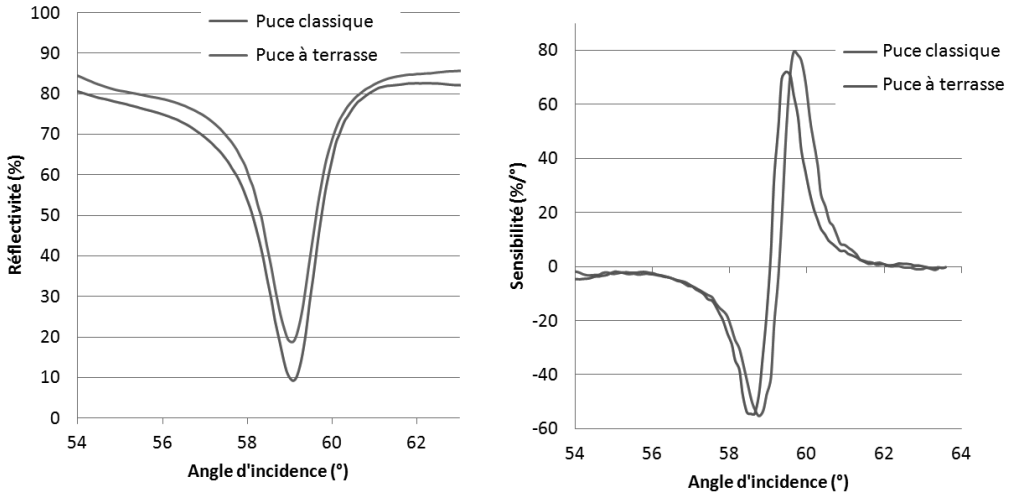


Figure 34 : réponse plasmon et sensibilités des puces d'or à terrasse réalisées avec recuit (en bleu) et des puces dédiées à la SUPRA-MS réalisées sans recuit (en rouge)

Un dépôt à température ambiante et un dépôt à chaud suivi d'un recuit, engendrent une structuration de la couche d'or bien différente (Figure 35). La structuration de l'or recuit présente une rugosité globale beaucoup plus importante avec Ra = 7.15 nm et les atomes d'or adoptent une structure cristalline selon le plan (111).

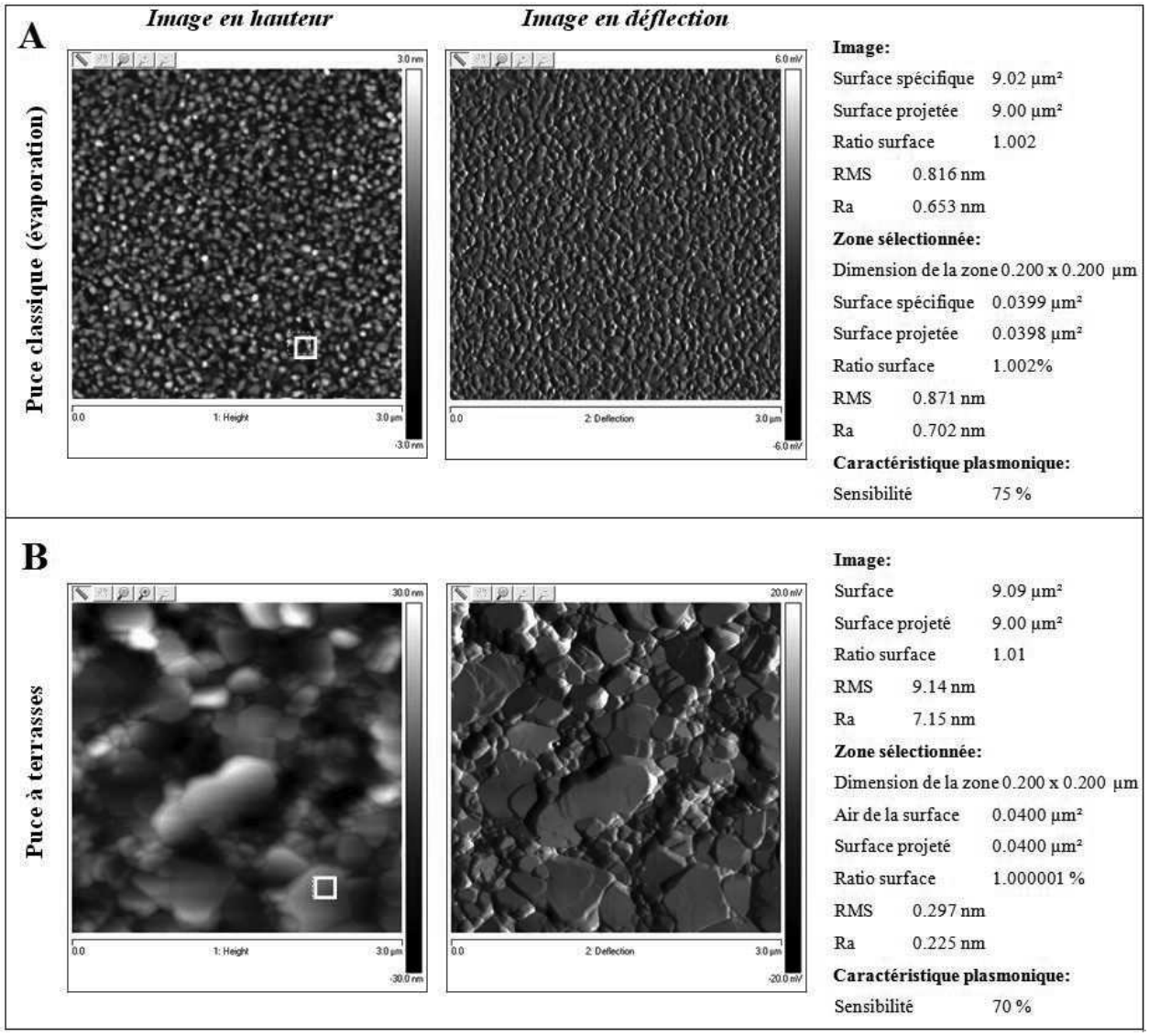


Figure 35 : Image AFM en hauteur et en déflection, comparaison des états de surface (A) des puces classiques et (B) des puces à terrasse d'or.

Cette réorganisation se traduit par des grains d'or de largeur comprise entre 200 et 1000 nm présentant une surface atomiquement plane avec comme seuls défauts quelques marches monoatomiques d'environ 250 pm (Figure 36). Ces grains appelés terrasses présentent une rugosité très faible (0.2 nm) comparée à celle des puces rugueuses disponibles dans le commerce et à celle des puces home made. Le rapport entre surface spécifique et surface projetée est de 1,01. Ce rapport est plus important que pour les puces classiques mais l'écart reste négligeable. Il faut tout de même garder à l'esprit que le rayon de la pointe joue un rôle

de pondérateur. En effet, le fond des interstices entre grains d'or ne peut être imagé et donc n'est pas pris en compte dans les calculs de rugosité ou des surfaces spécifiques.

Leur excellente qualité plasmon (Figure 34) et leur surface plane rendent ces puces d'or compatibles pour la visualisation en SPRi des interactions à leur surface couplée à une analyse et à la visualisation de molécule unique par AFM. En effet, la rugosité habituelle des puces SPR est un frein à la visualisation des petites entités (2 à 80 nm) qui ne peuvent contraster avec les motifs des grains d'or. Ce type de substrat aura comme première application, la caractérisation du greffage d'anticorps sur puces SPRi home-made mais il pourra être utilisé pour diverses applications en nanobiosciences et notamment la mesure de forces d'interactions sur molécules uniques.

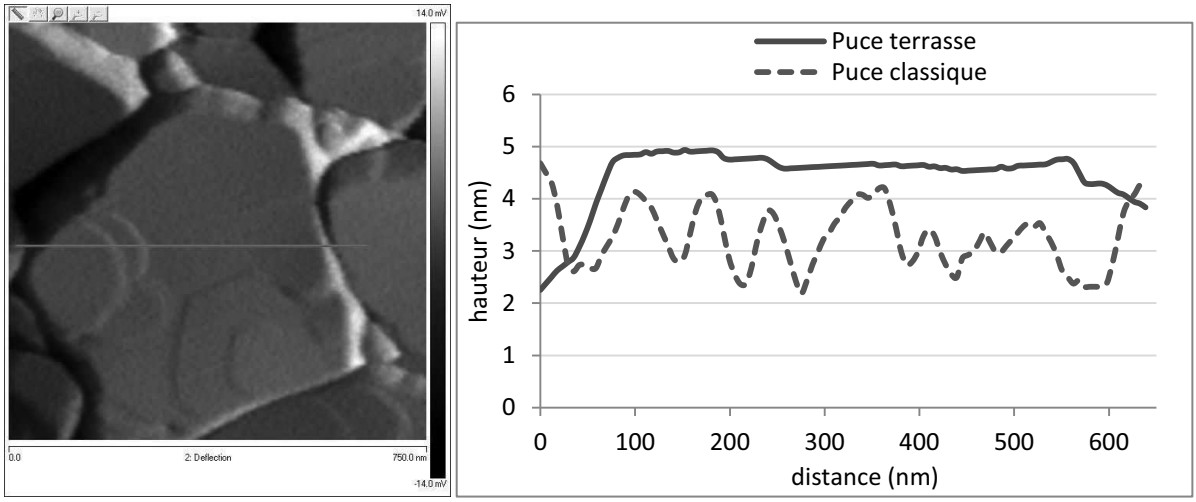


Figure 36 : Image AFM en déflection d'une terrasse d'or et représentation de sa section (en rouge) comparée à une section de puce home-made classique (en bleu)

II.3.3.2 Méthode d'immobilisation des anticorps

La surface d'or doit présenter des sites permettant l'immobilisation covalente des protéines pour éviter leur désorption lors qu'elles sont soumises à une force de cisaillement sous écoulement fluidique ou sous l'action de différentes solutions (ioniques, détergent) pendant les expériences. De façon à obtenir une monocouche d'anticorps, la chimie utilisée devra être une chimie 2D. Le choix se portera sur une monocouche auto-assemblée qui sera ultérieurement utilisée pour l'élaboration de l'immunopuce. Cette couche de fonctionnalisation schématisée en figure 37 a été obtenue après incubation de la puce d'or dans une solution composée de 90% de HS-C11-OH (11-MUOH) et 10% de HS-C15-COOH (16-MHA) (Sigma–Aldrich) durant 16 h. Le détail et l'élaboration de cette méthode

d'immobilisation ainsi que les choix technologiques qui s'y rattachent seront détaillés au chapitre IV. Après rinçage et séchage de la surface de la puce, les groupements carboxyliques sont activés par une solution de 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide/N-hydroxysulfosuccinimide (EDC/Sulfo-NHS) (Sigma–Aldrich) en goutte sur la totalité de la surface de la puce d'or durant 30 min. Les groupes carboxyliques activés réagiront avec les groupements amine des protéines pour les immobiliser covalemment à la surface de la puce (Figure 37). Après activation, la puce est rincée à l'eau ultra pure, séchée puis insérée dans le SPRi-Plex II pour procéder à l'injection des anticorps et au suivi de leur greffage sur la puce.

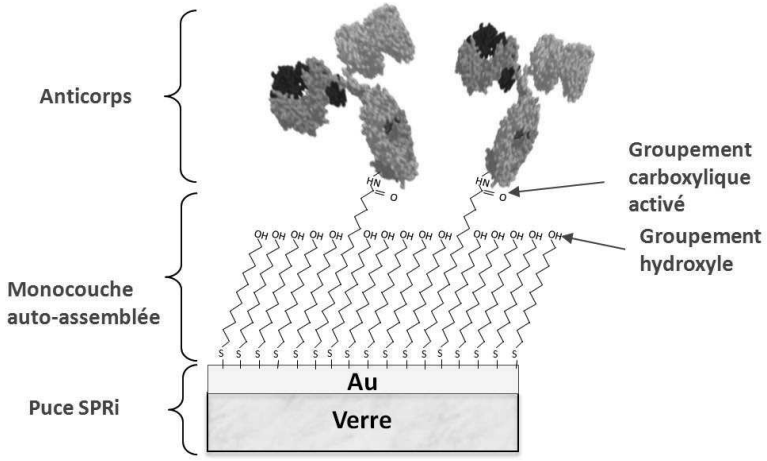


Figure 37 : Représentation schématique d'un greffage d'anticorps sur puce SPRi par chimie MUDO/MHDA 10%

II.3.3.3 Méthode de greffage par SPRi

L'instrument SPRi-Plex II est utilisé pour suivre en temps réel les interactions biomoléculaires ligand/analyte à la surface d'une biopuce, mais il permet également de suivre le greffage de molécules sur une chimie dans des étapes de mise au point des architectures moléculaires constituant le biorécepteur. Dans un premier temps, la mesure de la réponse plasmon doit s'effectuer sur l'ensemble de la fenêtre d'analyse (7 mm x 6 mm) où seront positionnés 100 ROIs (10 x 10) de 500 µm de diamètre chacun (Figure 38A). Cela correspond à une mesure SPR sur environ 50 % de la fenêtre d'analyse. Le tampon de course utilisé dans le cas de cette étude sera du tampon acétate 10 mM dont le pH a été optimisé pour le greffage de cet IgG (pH 5.2). Les anticorps sont injectés dans le tampon de course à différentes concentrations (0.4 à 40 µg/mL) selon la quantité d'anticorps souhaitée à la surface de la puce suivi d'une injection d'Octyl-β-D-Glucopyranoside (Sigma–Aldrich) à 40 mM à 50 µL/min pendant 30 s (Figure 38). Ce détergent a pour effet d'éliminer les molécules qui se seraient adsorbées à la surface sans y être greffées de manière covalente et qui pourraient se désorber

au cours de l'expérience. La puce est ensuite rincée dans l'appareil par du tampon phosphate (PBS) à 10 mM, pH = 7.4 composé de NaCl (138 mM) et KCl (2.7 mM) pendant 2 min. La puce est retirée de l'appareil pour être stockée à 4°C en PBS. A aucun moment, la surface de la puce ne séchera après avoir été insérée dans l'appareil jusqu'à la fin de l'analyse par AFM.

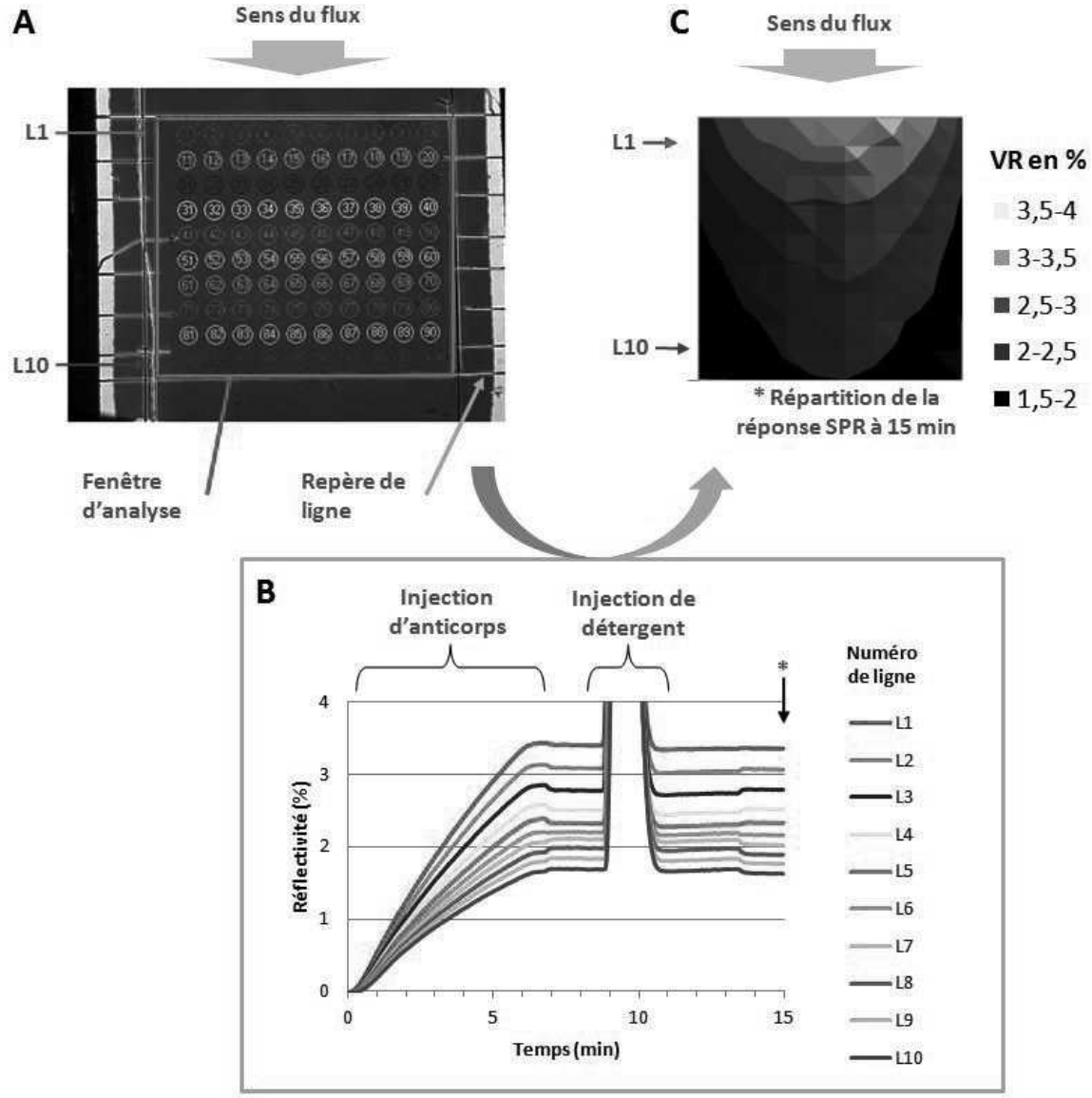


Figure 38 : (A) Image SPR de la surface de la puce avant greffage et positionnement des 10 x 10 ROIs à l'intérieur de la fenêtre d'analyse, (B) sensorgramme représentant la variation moyenne de réflectivité de chacune des lignes de ROIs à l'injection d'une solution d'anticorps à 4 µg/mL en tampon acétate pH 5.2 à 20 µL/min. (C) Répartition du greffage dans la zone d'analyse.

La saturation de la surface en anticorps est obtenue après une injection à 40 µg/mL à 20 µL/min pendant 10 minutes pour atteindre une variation de réflectivité de 16 % soit d'après la relation (II.15), 2000 pg/mm^2 d'anticorps et donc 13.3 femtomoles/mm^2. Il faut néanmoins garder à l'esprit qu'au-delà d'une réponse de 10 % de VR la sensibilité de la puce décroit ce

qui a pour conséquence de sous-estimer la quantification des interactions biologiques. En faisant l'hypothèse que cette variation est négligeable, nous en déduisons une densité de 8000 Acs/μm^2 et donc que la surface projetée d'un anticorps sur la puce serait d'environ 12 nm de diamètre ce qui est une valeur cohérente au vu de la taille connue d'un anticorps (dimension d'un IgG: 142 x 85 x 38 Å) [180].

L'homogénéité du greffage d'anticorps sur la totalité de la puce n'a été atteinte que dans le cas d'une concentration élevée (40 µg/ml) de l'échantillon injectée et jusqu'à saturation de greffage. Dans le cas des concentrations plus faibles, un phénomène d'épuisement de l'échantillon injecté a été observé à la couche limite. Cette limitation dans le transfert de masse a entraîné une distribution hétérogène d'anticorps dans le sens de l'écoulement fluidique de la cellule comme le montre la figure 38B. Par conséquent, la valeur de réflectivité de la région à l'entrée de la cellule fluidique est environ 2 fois la valeur de réflectivité de la sortie. On notera également une variabilité de greffage intra-lignes, c'est-à-dire dans le sens de la largeur de la puce comme le montre la figure 38C. Ce phénomène devra être pris en compte lors de la mesure par AFM. C'est pourquoi des repères ont été gravés sur l'or avant le montage de la puce dans l'appareil de SPR permettant d'une part de positionner les ROIs et d'autre part de localiser les zones à analyser par AFM après le retrait de la puce du SPRi-Plex II. Les puces sont clivées tout en préservant l'hydratation de la puce pour ensuite procéder à l'analyse pas AFM.

II.3.3.4 Analyse par microscopie à force atomique

La Microscopie à Force Atomique (AFM) est utilisée pour caractériser et déterminer la topographie des surfaces à l'échelle de plusieurs dizaines de microns jusqu'à l'échelle atomique (Å). Mis au point par Quate et Gerber en 1986 [181], cet outil permet d'obtenir une image topographique d'un échantillon en détectant les forces d'interactions apparaissant entre une pointe fine et une surface lorsqu'elles sont séparées par une petite distance ou directement en contact avec la surface de l'échantillon. La précision des déplacements de cette pointe ou de l'échantillon grâce à des actionneurs piézoélectriques (plan x,y) permet la visualisation topographique de structures complexes ou de motifs uniques. Par ses capacités et ses différents domaines d'utilisation, l'AFM s'est imposée au carrefour de la physique et de la chimie (ex. caractérisation des surfaces d'échantillons cristallins) et de la biologie (visualisation et exploration des échantillons cellulaires). Un des grands avantages de cet outil, est qu'il est capable d'opérer à l'air ou en milieu liquide, à température ambiante, et

permet d'explorer la matière molle, en particulier les échantillons biologiques dans leurs milieux physiologiques.

II.3.3.4.1 Principe de l'AFM

Le principe consiste à amener, soit au contact de la surface à étudier, soit à une distance de quelques angströms, une pointe généralement en nitrure de silicium (Si_3N_4) dont l'extrémité a un rayon de quelques nm et à lui faire balayer ligne par ligne la topographie de cette surface en évitant de la déformer. La pointe se situe à l'extrémité d'un levier flexible. A chaque point (x,y), la variation de hauteur est enregistrée grâce à la déviation de position d'un faisceau laser sur un photo-détecteur, le faisceau laser étant réfléchi sur le dos de la pointe. Cette variation est tout de suite compensée par l'asservissement en position d'un actionneur piézoélectrique (z) afin de conserver une force constante lors du balayage.

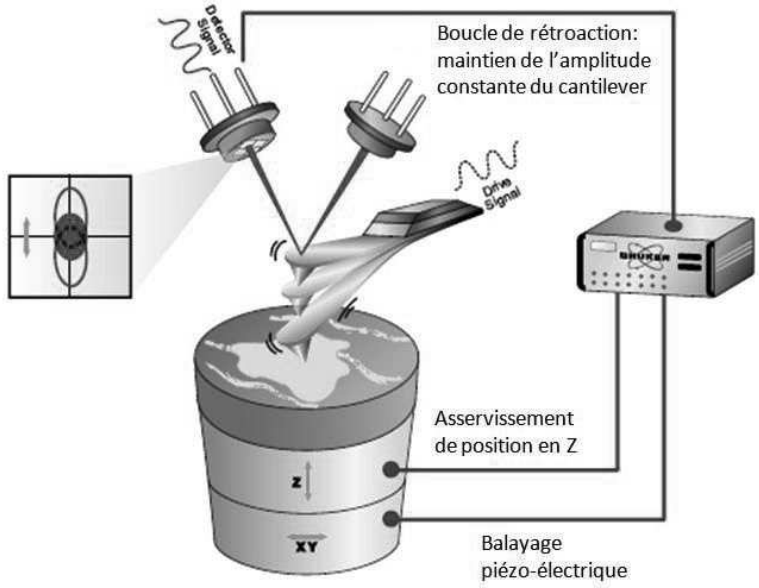


Figure 39 : Schéma de principe du fonctionnement d'un AFM en mode tapping [182]

Le mode contact, mode de fonctionnement dans lequel la pointe et la surface restent en contact ou quasi-contact, permet d'obtenir des images à haute résolution sur des objets indéformables. Durant un balayage, trois types d'images peuvent être collectées simultanément: les images topographiques (ou images en hauteur), les images de déflexion correspondant à la dérivée des mouvements de réajustement de la position relative entre la pointe et l'échantillon qui font ressortir les détails de la surface et les images de friction résultant de la torsion du cantilever. Ces phénomènes de friction, susceptibles d'endommager l'échantillon biologique sont à l'origine du développement du « mode oscillant avec contact » ou plus communément appelé mode Tapping (Figure 39). La pointe oscille à la fréquence de

résonance du cantilever grâce à un actionneur piézoélectrique et ne touche que de façon périodique la surface de l'échantillon. Ce mode est particulièrement utile pour l'étude d'échantillons faiblement adsorbés sur leur support, de topographie très irrégulière ou présentant une structure fragile ou molle comme des cellules ou des biomolécules.

Dans le cas de notre étude, les images AFM des anticorps greffés seront réalisées en milieu liquide afin de conserver au maximum la conformation des molécules. Cette méthode d'imagerie est réalisée à l'aide d'une cellule fluidique qui permet, d'une part de maintenir le tampon phosphate salin sur la puce et, d'autre part de présenter un actionneur piézoélectrique qui permettra d'exciter le levier à sa fréquence de résonance.

Nous utiliserons principalement le mode tapping avec l'AFM Multimode III (Veeco, Bruker Nano), équipé d'un scanner 1306 J, d'une cellule fluidique (Veeco instruments) et de pointes Veeco® NPS20 en nitrure de silicium. Chaque support de pointes contient 4 leviers triangulaires de raideurs différentes au bout desquels ont été collées des pointes pyramidales dont l'extrémité présente un rayon de courbure compris entre 10 et 40 nm (Figure 40). Les flancs des pyramides sont inclinés à 35° par rapport à la normale de la surface.

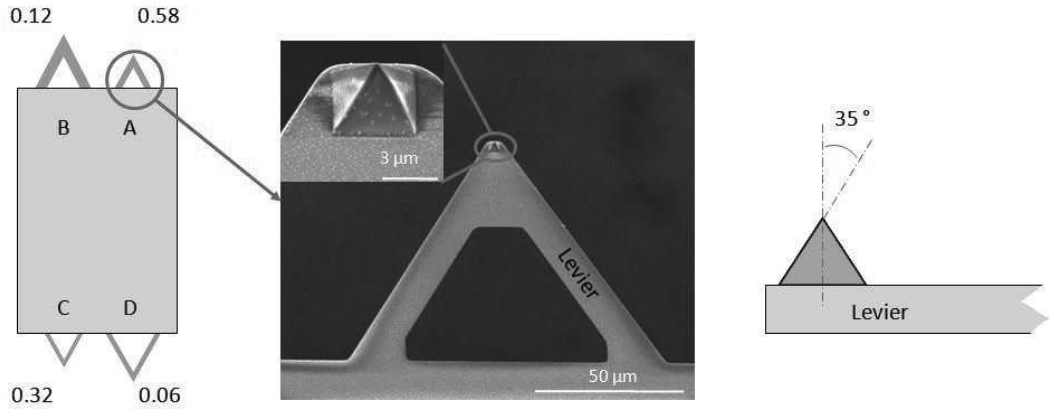


Figure 40 : Rigidité (en N/m) des différents leviers, image MEB (microcopie à balayage électronique) d'une pointe NPS20 et section de la pointe.

Les leviers de petites tailles (pointes A et C) seront préférés au plus grands pour conserver des qualités de résonance en milieu liquide et ainsi limiter les artéfacts de mesure.

Nous utiliserons également une variante du mode tapping, le mode Peak Force QNM (Quantitative Nanomechanic Property Measurements) qui permet de générer un calcul de 2000 courbes de force (en picoNewton) par seconde et ajuster en temps réel les contraintes mécaniques du cantilever en fonction des forces mesurées. La vibration du levier n'est alors pas constante sur la totalité du scan de l'échantillon, contrairement au mode tapping classique.

Cette première propriété permet de protéger l'échantillon biologique et de moins contaminer la pointe par les entités organiques à la surface de la puce. La deuxième propriété, permet de réaliser une image qu'on appelle « image en adhésion », qui est une topographie des forces d'adhésion entre la pointe et l'échantillon ce qui permet d'obtenir un contraste entre une surface solide et une entité souple. En résumé, le PFQNM permet d'obtenir des images de topographie de surfaces extrêmement molles et/ou très adhérentes, pour lesquelles l'imagerie en mode Tapping est difficile. Pour ce mode l'AFM Nanoscope 8 (Veeco instruments) a été utilisé équipé du scanner 7425-Z (15 µm scan range) et de pointe DNP-S probe (rigidité du levier k_L = 0.4 N/m).

II.3.3.4.2 Dénombrement par AFM

Nous avons travaillé sur plusieurs puces (n = 12) dont la densité en anticorps greffés a varié de 0.1 à 13 femtomoles/mm^2. Après retrait de la puce de l'appareil SPRi, les puces sont clivées suivant les repères préalablement gravés sur l'or. Les fragments de puces peuvent être imagés par AFM en mode Tapping ou Peak Force, tous deux en milieu liquide (PBS). Les images générées ont une dimension de 512 par 512 pixels. Dans un premier temps, une image de 3 µm de côté est générée afin d'observer et de cibler des zones présentant de larges terrasses d'or. Des images plus résolues de dimension 1 µm permettent de visualiser les anticorps (Figure 41).

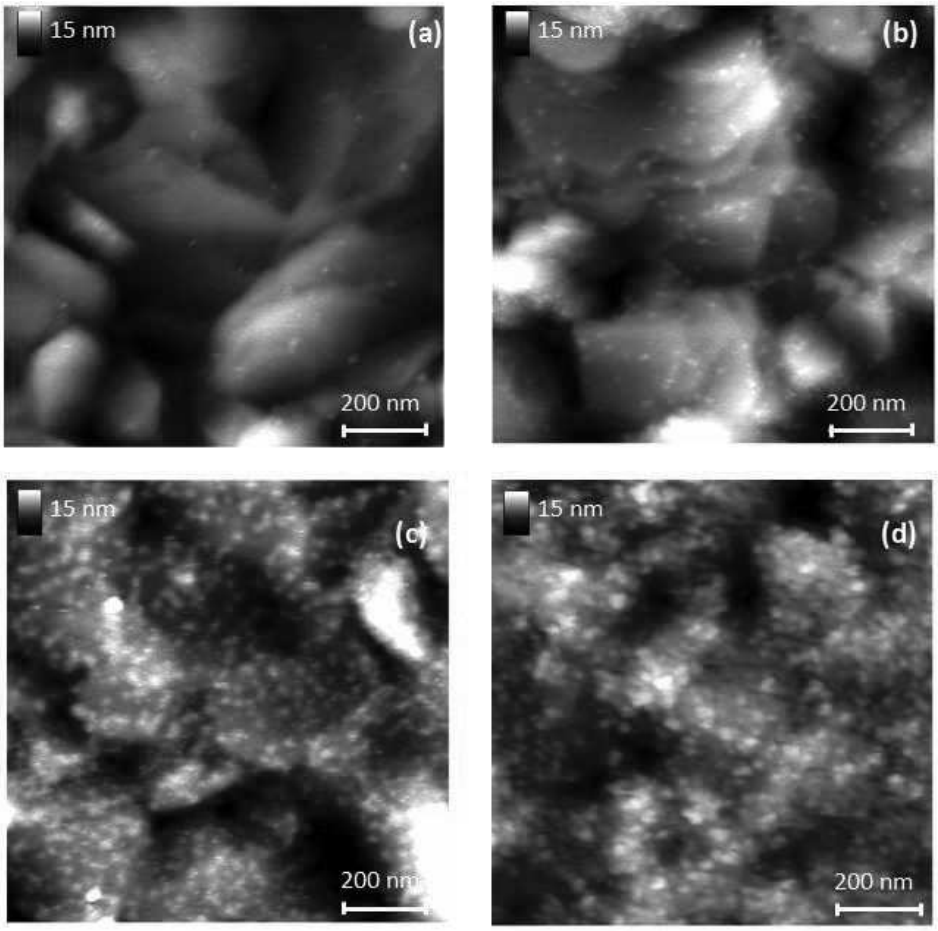


Figure 41 : Images AFM en hauteur de différents taux de couverture en anticorps greffés sur puce à terrasse d'or. Analyse en mode tapping : (a) 124 Acs/µm^2, (c) 600 Acs/µm^2, (d) 3800 Acs/µm^2. (b) Analyse en mode peak force : 260 Acs/µm^2

La dimension des motifs mesurés par AFM n'est pas fidèle à la réalité car il faut garder à l'esprit que l'image observée est la convolution de la topographie de la surface et de la forme de la pointe. Trois paramètres vont induire des modifications de l'image:

- Le rayon de courbure de la pointe qui est compris entre 10 et 40 nm va interférer sur la taille des motifs: Plus le rayon de la pointe est important et plus le diamètre du motif sera large, il sera également plus difficile de discriminer des motifs proches les uns des autres car la pointe ne pourra pas s'introduire entre les anticorps (Figure 42).

- La période d'échantillonnage: Nous réalisons des images de 512 par 512 pixels représentant des surfaces carrées de 1 µm de côté, le pas entre deux pixels est alors d'environ 2 nm, ce qui modifie légèrement la précision de la mesure.

- Les flans pyramidaux : Les flans de la pointe sont inclinés à 35° par rapport à la normale, à la surface. Ils vont donc induire un élargissement des motifs pour des objets en relief et un rétrécissement des motifs pour des objets en creux.

Néanmoins, au vu de la hauteur des motifs attendus (maximum 15 nm) et du rayon de courbure de la pointe, ses flancs pyramidaux n'auront que peu d'effet sur la résolution de l'image. D'après la documentation technique des pointes utilisées, le rayon de courbure de celle-ci peut fortement varier d'une pointe à l'autre. La dimension d'un motif de la taille d'un anticorps peut alors varier du simple au double suivant le rayon de la pointe. Les images obtenues dans le cadre de cette étude n'ont pas été réalisées avec la même pointe pour des raisons évidentes de casse et de contamination de la pointe.

A titre d'exemple, des clichés AFM en mode tapping et Peak force de 4 puces sont présentées en figure 41. Les anticorps apparaissent clairement sur les images AFM sous forme de motif d'environ 20 à 30 nm de diamètre pour une hauteur d'environ 7 nm pour les clichés (a), (b) et (c). Il est plus difficile de discriminer les motifs lorsque la densité d'anticorps devient importante comme cela peut être le cas pour l'image (d).

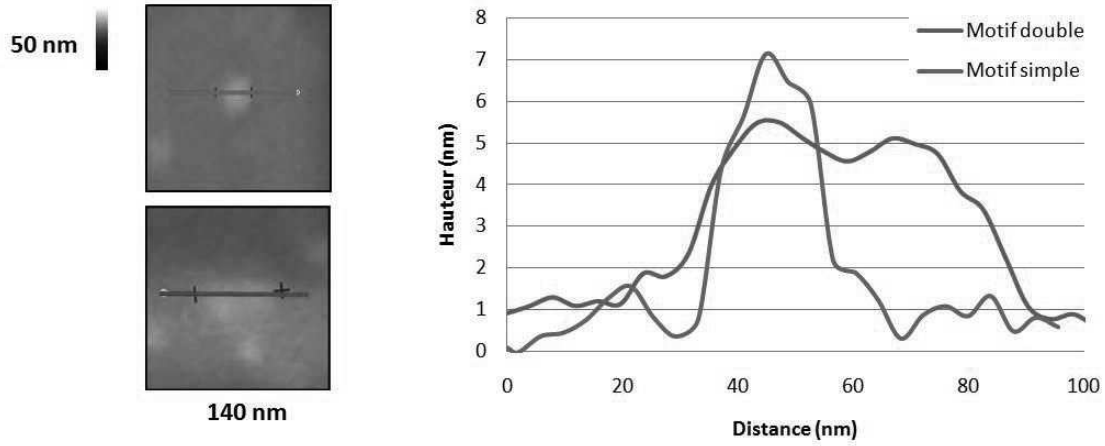


Figure 42 : Image AFM d'un anticorps seul, de deux anticorps proches (entraxe 25 nm) et tracés de leur profil topographique

La hauteur mesurée des motifs est d'environ 7 nm ce qui peut s'expliquer par deux hypothèses. La première serait que les anticorps sont greffés couchés sur la surface, mais alors leur encombrement ne serait pas compatible avec la densité maximale que l'on parvient à greffer par SPRi. La seconde hypothèse, la plus probable, serait que la pointe, lors de son passage successif sur l'échantillon, modifie la conformation des anticorps comme cela a pu être constaté dans certains travaux [183]. Nous remarquerons que les images doivent être générées rapidement et qu'elles ne sont plus exploitables après quelques scans, une nouvelle zone doit être alors explorée.

Pour le dénombrement, des terrasses suffisamment larges sont sélectionnées et sont redressées de façon à contraster davantage l'image dans le but de faire ressortir les motifs d'anticorps. En effet, si les terrasses sont remarquablement planes (Ra = 0.2 nm), elles sont en revanche rarement de niveau. Le contraste des motifs par rapport à la surface ne sera alors pas homogène sur la totalité de la terrasse (Figure 43).

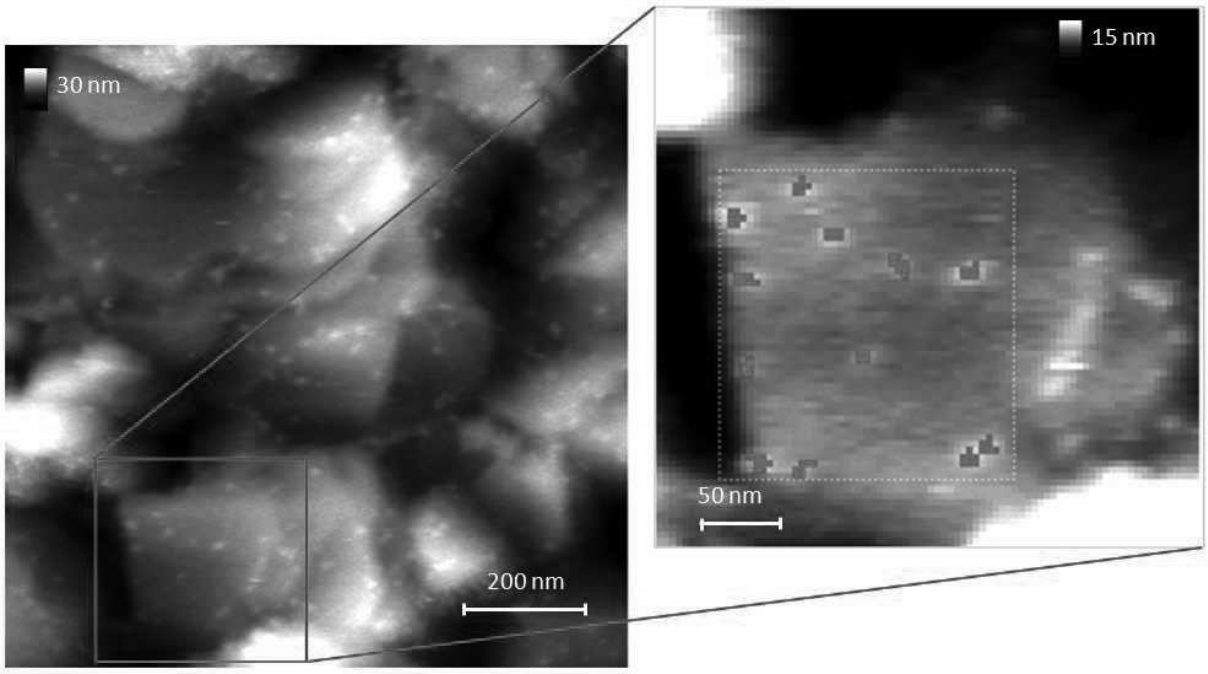


Figure 43 : Image AFM en hauteur de la surface greffée d'anticorps et redressement de la zone (par moindre au carré) présentant une terrasse d'or pour procéder au dénombrement.

Le dénombrement des anticorps peut être réalisé uniquement sur les surfaces planes des terrasses. Connaissant la superficie de la zone où le comptage (entre 200 nm et 1 µm de coté) aura lieu, il pourra en être déduit le nombre d'anticorps par μm^2. En moyenne deux à trois terrasses sont exploitables par cliché AFM de 1 μm^2 et entre deux à quatre images à différents endroits de l'échantillon sont choisies pour une même densité d'anticorps selon la SPRi. Nous ferons l'hypothèse que la répartition des anticorps sur les terrasses d'or est la même que dans les interstices qui les séparent. En considérant, la surface plane d'une terrasse comme une surface projetée, il est possible d'évaluer le nombre d'anticorps sur la totalité de l'image en tenant compte de la rugosité. Pour cela une correction par un rapport de 1.01 (rapport des surfaces calculé en II.3.3.1) du dénombrement calculé sur les terrasses permettra d'obtenir une valeur qui pourra être comparée à la réponse mesurée par SPRi.

Si on considère qu'un motif d'un anticorps mesure 7 nm de haut pour un rayon de 20 nm, l'entraxe minimum entre deux anticorps pour qu'une pointe de 10 nm de rayon puisse toucher la surface, peut être estimé à 26 nm. Cet entraxe correspond à un taux de couverture idéale de 1700 Acs/µm^2 pour un rayon de pointe le plus favorable. Il sera donc délicat d'imager et de dénombrer les anticorps au-delà de cette densité.

II.3.3.5 Comparaison des résultats AFM / SPRi

Des fragments de puces (n = 15) à différentes concentrations d'anticorps ont été analysés par AFM. L'ensemble des résultats de mesures est donné dans le tableau ci-dessous ainsi que les valeurs estimées par SPRi d'après la relation (II.15):

$$\Gamma = F_c \cdot \Delta R(\%) \text{ soit } \Gamma(pg/mm^2) = 125 * \Delta R(\%)$$

ΔR mesuré par SPRi lors du greffage d'Acs (% de VR)	0,10	0,11	0,25	0,40	0,53	0,68	0,78	1,21	1,28	1,76	2,40	7,58	15,96
Nombre d'Acs /µm^2 estimés par SPRi	49	55	124	199	263	337	389	600	635	872	1192	3766	7925
Nombre d'Acs /µm^2 dénombré par AFM	62	65	136	236	328	404	460	650	690	950	1200	**1800**	**1500**

Tableau 2: Comparaison des résultats du dénombrement par AFM et SPRi

Nous observons une excellente corrélation jusqu'à 1200 Acs/µm^2 et une forte divergence au-delà. Cela est cohérent avec notre estimation au paragraphe II.3.3.4.2. Il devient difficile de discriminer les motifs et de procéder à un comptage fiable en AFM comme cela est le cas pour l'image (c) de la figure 41 lorsque la taille des motifs varie entre 30 et 60 nm. Le manque de contraste entre deux motifs rend l'image inexploitable. L'utilisation des pointes de rayon de courbure plus faible serait un gain en résolution pour discriminer les molécules à plus forte densité. A titre d'exemple, il existe des pointes effilées ou des pointes présentant un nanotube de carbone à leur extrémité. Afin de ne pas fausser la corrélation, nous tiendrons compte des limites de l'imagerie AFM et nous ne nous intéresserons qu'à la plage de taux de couverture de 0 à 1200 Acs/µm^2. Cette plage reste cohérente avec l'utilisation de l'appareil SPRi-Plex II car d'une part, la recherche de molécules traces (biomarqueurs) à des stades précoces d'une pathologie s'accompagne d'une faible réponse (inférieure à 5 % de VR), d'autre part il a été démontré que la réponse plasmon est quasi linéaire sur une plage de 0 à 10%.

S'il a pu être vérifié expérimentalement que la réponse SPR est proportionnelle à un changement d'indice du milieu couvrant, le changement d'indice provoqué par une densité

variable d'anticorps peut être une source d'erreur dans l'estimation du taux de recouvrement. Jung et al ont émis l'hypothèse qu'une densité croissante en protéines sur une surface pouvait être assimilée à une couche biologique d'indice n_b et d'épaisseur moyenne e_b (Figure 44) et que ceci permettait d'établir un indice effectif en tenant compte du milieu de l'indice du milieu couvrant (équation II.7) [178]. En réalité, il s'agira du recouvrement progressif de la surface de molécules de dimension donnée et nous allons vérifier par notre étude si cette hypothèse est cohérente pour de faibles taux de recouvrement. En effet, Stenberg et al avaient démontré que la réponse SPR était quasiment linéaire par rapport au taux de couverture en protéines mais l'étude avait été menée sur une chimie 3D à base de molécule dextran pour une densité en protéines comprise entre 2 et 50 ng/mm^2, ce qui n'est pas adaptée à une densité en protéines fixées en monocouche sur SAM [95].

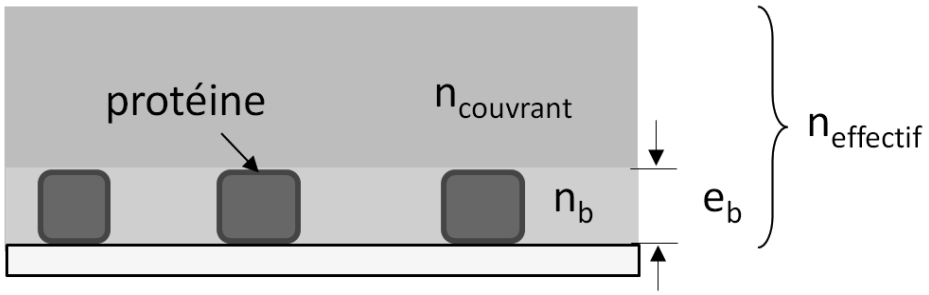


Figure 44 : Représentation schématique de la conversion du nombre de molécules en une couche biologique d'indice de réfraction n_b et d'épaisseur e_b [178].

Les nombres d'anticorps estimés par SPRi et dénombrés par AFM sont comparés en figure 45A sur une plage permettant une visualisation fiable des anticorps par AFM (0 à 1200 Acs/µm^2). Le facteur de conversion F_c utilisé pour la conversion du ΔR et le taux recouvrement Γ ont été calculés selon la relation (II.15) décrite en II.2.1.1 avec comme sensibilité $S_{p,r} = 7400 \pm 380$ déterminée par calibration.

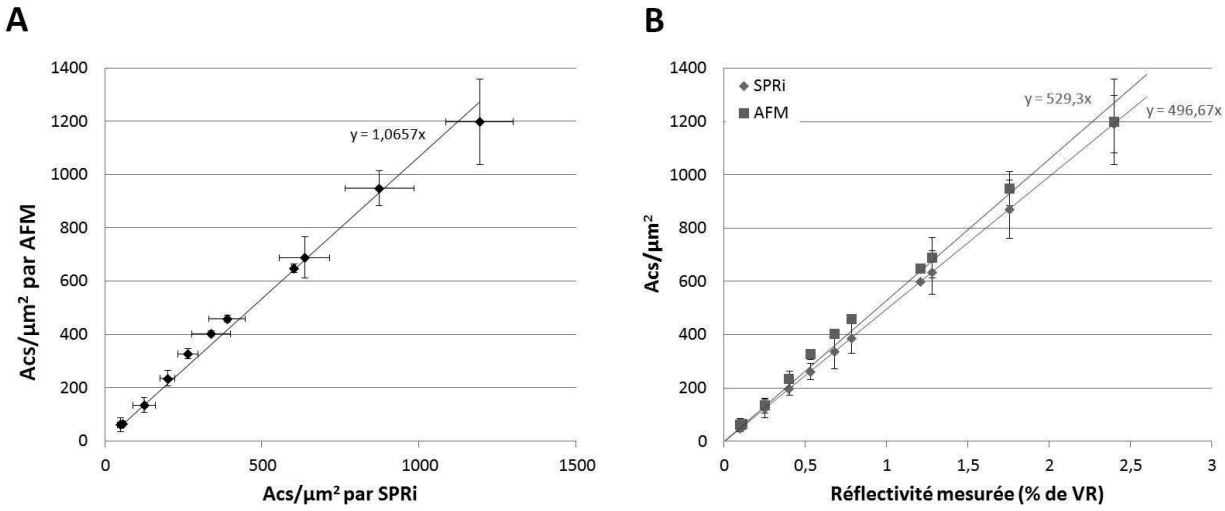


Figure 45 : (A) Comparaison du dénombrement par SPRi et AFM. (B) Dénombrement d'anticorps estimé par SPRi (avec $S_{p,r} = 7400$) (en bleu) et mesuré par AFM (en rouge) dans une plage de 0 à 2.5 % de VR

La linéarité observée entre le nombre d'anticorps greffés estimés par SPRi et le dénombrement par AFM permet de valider que la densité en anticorps à la surface de la puce n'influence pas la méthode de conversion de la réponse SPR en taux de recouvrement par mm^2.

La droite d'équation y = 1.065x montre une faible divergence de dénombrement entre AFM et SPRi. Cette divergence d'environ 6% ±5 représentée en figure 45B est acceptable au regard de la complexité des technologies utilisées. Elle montre la très bonne corrélation de mesure entre deux techniques différentes, l'une issue de mesures à l'échelle nanométrique et l'autre correspondant à une réponse macroscopique.

Pour conclure, la relation (II.15) utilisée pour convertir la réponse SPR (en % de VR) en taux de recouvrement (en pg/mm^2) est adaptée aux puces dédiées à l'ensemble des immunopuces sur SAMs et particulièrement à la plateforme SUPRA-MS qui s'appuie sur des données fiables de dénombrement pour permettre un dosage quantitatif des cibles biologiques. D'après les expériences par AFM, nous pouvons être confortés sur la justesse des mesures SPR et ainsi déterminer avec sérénité les quantités de protéines capturées.

Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons défini les contraintes de dimensionnement du substrat pour la réalisation de la biopuce compatible avec l'appareil de SPRi d'HORIBA-Scientific et les appareils de spectrométrie de masse de type MALDI-TOF. Des procédures et des outils ont été développés pour réduire les temps de nettoyage des lames de verres. Les paramètres des couches de métaux ont été déterminés dans un premier temps par simulations, puis des

campagnes de réalisation de puces ont permis de déterminer les paramètres de dépôts pour optimiser les performances plasmon. La technique par évaporation (EBPVD) a permis de déposer sur les lames entre 1 et 2 nm de chrome et 55 à 60 nm d'or, générant un film de métal adapté à la résonance des plasmons de surface. De sensibilité similaire aux puces commerciales, les puces home-made ont été conçues dans l'optique de réduire les coûts de production afin de devenir des consommables au sein de la plateforme SUPRA-MS.

La variation de réflectivité générée par un événement biologique à la surface de la puce a été étudiée. Pour cela, des substrats d'or compatibles avec une interrogation SPR et présentant des surfaces atomiquement planes (terrasse d'or) ont été élaborées au sein du laboratoire par un procédé de dépôt à chaud. Ces surfaces planes ont permis la visualisation et le dénombrement, par AFM, des anticorps (IgG) préalablement immobilisés en SPRi. La conversion de la réponse SPR en quantité surfacique de protéines fixées a pu être comparée au nombre d'anticorps par unité de surface dénombrés par AFM, validant ainsi les étapes de calibration conduisant à l'élaboration de la formule: $\Gamma(pg/mm^2) = 125 * \Delta R(\%)$. Les substrats à terrasse d'or ont également permis de visualiser la répartition homogène des anticorps à l'échelle micrométrique et millimétrique sur la puce d'or par différentes observations en AFM. Cela confirme que la chimie de surface utilisée pour le greffage est fonctionnelle.

Dans le chapitre suivant, nous nous intéresserons aux développements nécessaires pour procéder à une analyse par spectrométrie de masse sur puce en vue d'une identification de protéines immobilisées à sa surface.

III. SPECTROMETRIE DE MASSE (MS) SUR PUCE

La spectrométrie de masse permet de mesurer la masse molaire d'une molécule. Son principe est basé sur la séparation en phase gazeuse de molécules chargées en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). Nous décrirons ici la technique de spectrométrie de masse la plus adaptée à l'étude de protéines sur puces à savoir le MALDI-TOF.

III.1. MALDI TOF

Dès 1976, des peptides ont été analysés par désorption laser sur des échantillons solides [184], mais ce type d'ionisation ne permettait pas d'observer des composés de masse supérieure à 1000 Da. Ce n'est qu'à la fin des années 80 que la technique de l'ionisation/désorption Laser Assistée par Matrice (MALDI) fut introduite par deux équipes Karas et Hillemkamp [185,186] et Tanaka et coll [187]. Pour protéger l'analyte de l'énergie du laser, une matrice solide, absorbant à la longueur d'onde du laser, fut utilisée. Lors de l'ionisation MALDI, l'analyte, incorporé à la matrice est, dans un environnement à basse pression (10^{-5} bar), frappé par un faisceau laser. Les ions sont alors expulsés en phase gazeuse sous l'effet de l'impulsion du laser et sont acheminés vers l'analyseur sous l'effet d'un champ électrique.

III.1.1 La source MALDI

Il existe différents types de sources qui se distinguent généralement selon leur mode de production des ions. La plus récente est la source Désorption/Ionisation Laser Assistée par Matrice (MALDI) apparue dans les années 1980 [187].

La désorption et l'ionisation se font grâce à un laser de longueur d'onde donnée (Figure 46, note 1). Pour désorber une molécule de son support, il faut lui fournir de l'énergie suffisamment rapidement pour qu'elle puisse s'ioniser sans se dégrader. La méthode d'ionisation MALDI est dite « douce » car elle consiste à protéger les molécules de l'échantillon des effets destructeurs du faisceau laser en les dispersant dans de la matrice (généralement, les ratios analyte/matrice sont compris entre 1 :100 et 1 :10000). Lors de la co-cristallisation de la matrice avec les échantillons et suite à une impulsion laser, les molécules de matrice ionisées se volatilisent et entraînent avec elles les molécules de l'échantillon dans la phase gazeuse (Figure 46, note 2). Dans le cadre de ce travail de thèse, le laser utilisé est un laser Smartbeam II à 355 nm pour l'UltrafleXtreme et un laser azote à 337 nm pour l'Ultraflex, tous deux de chez Bruker Daltonics. Durant le processus d'éjection, l'énergie

absorbée par la matrice (mH*) est directement transmise aux molécules de l'échantillon (M), qui s'ionisent par transfert de protons ou d'électrons:

$$mH^* + M \rightarrow [M + H]^+ + m^- \text{ pour le mode d'ionisation positif}$$

$$mH^* + M \rightarrow [M + H]^- + m^+ \text{ pour le mode d'ionisation négatif}$$

Les ions produits sont accélérés et rentrent dans l'analyseur grâce au champ électrique appliqué au moment de l'impact laser ou quelques millisecondes après (Figure 46, note 3).

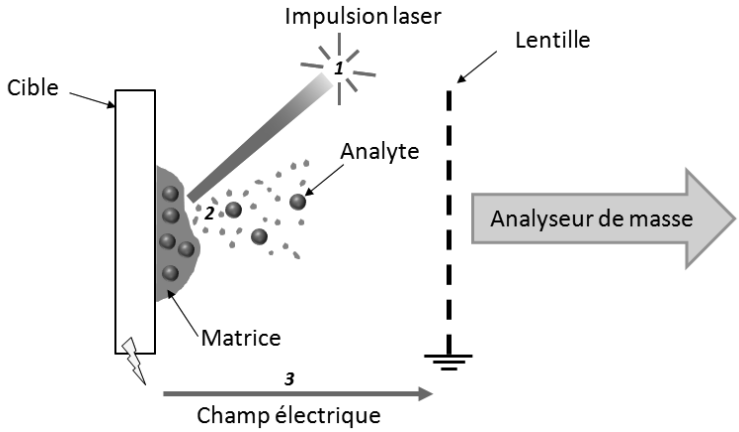


Figure 46 : Principe de la Ionisation/désorption Laser Assistée par Matrice: 1) Longueur d'onde du laser correspond à une bande d'absorption forte de la matrice. 2) La matrice est excitée, désorbée et l'analyte est éjecté. Une phase gazeuse se forme alors et il y a transfert de protons vers l'échantillon. 3) L'analyte protoné est extrait par le champ électrique appliqué à la surface de la cible et passe à travers les lentilles de focalisation, en direction de l'analyseur de masse.

III.1.2 L'analyseur TOF

L'analyseur à temps de vol (Time Of Flight: TOF) est un cylindre vide dans lequel règne une basse pression (10^{-7} mbar). L'analyseur à temps de vol permet la séparation des espèces en fonction de leur énergie cinétique initiale, induite par le champ électrique. Cet analyseur est scindé en deux zones, une première zone consiste à appliquer un potentiel élevé aux ions pour les accélérer et une zone libre de champs c'est à dire une zone où les ions volent librement à la vitesse qui leur a été conférée par la première zone (Figure 47). Cet analyseur fonctionne comme un chronomètre mesurant le temps de vol des différents ions.

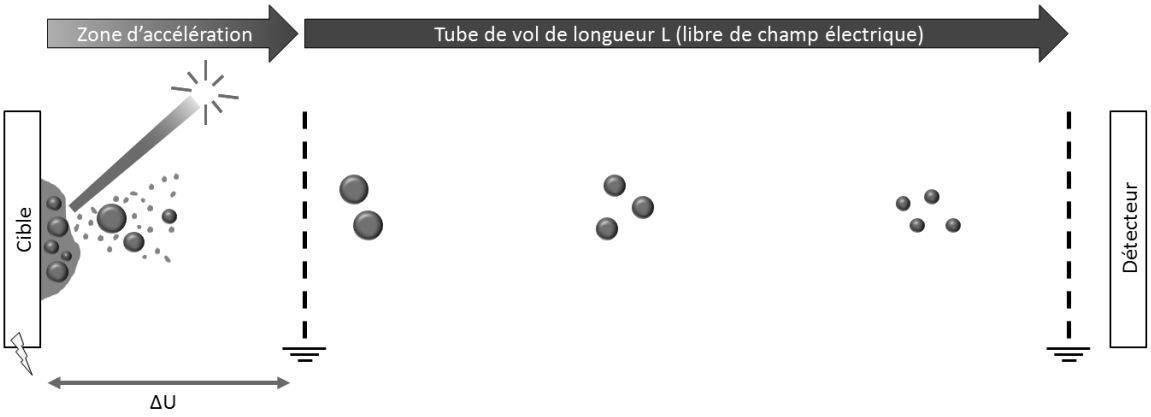


Figure 47 : Schéma d'un analyseur à temps de vol en mode linéaire

Les ions produits par la source vont être accélérés sous l'effet d'un champ électrique fixe ΔU et aura pour effet de donner la même énergie cinétique E_c à tous les ions de même charge:

$$E_c = ZeΔU = \frac{1}{2}mv^2 \qquad \text{III.1}$$

Avec:

Z, l'état de charge de l'ion ou charge effective portée par la molécule, sans unité

e, charge de l'électron (1,602 x 10^{-19} C)

v: vitesse de l'ion ($m.s^{-1}$)

m: masse de l'ion (kg)

La vitesse des ions sera alors de :

$$v = \sqrt{\frac{2E_c}{m}} \qquad \text{III.2}$$

Le temps t nécessaire aux ions pour traverser le tube de vol, de longueur L, peut donc être déduit des équations précédentes et à partir de la simple relation v = d / t, on obtient alors:

$$t = L\sqrt{\frac{m}{2ZeΔU}} \qquad \text{III.3}$$

Dans le cas où tous les ions pénètrent dans le tube de vol avec la même énergie cinétique, le temps nécessaire aux ions pour traverser le tube de vol dépendra de leur masse et du nombre de charges qu'ils portent.

Le rapport m/z des différents ions pourra en être déduit facilement :

$$\frac{m}{Z} = 2eΔU\left(\frac{t}{L}\right)^2 \qquad \text{III.4}$$

Donc pour deux ions de même état de charge, celui de masse plus élevée traversera le tube de vol plus lentement que celui de masse plus faible. Le rapport "masse sur charge (m/z)" d'un ion peut être déterminé en mesurant précisément son temps de vol à travers le tube de vol. S'il n'y a pas de courbe de référence réalisée à partir d'un calibrant, il ne sera pas possible de mesurer le m/z, une courbe de calibration est alors réalisée en utilisant des molécules dont la masse exacte est connue. Cela permet de faire une courbe de temps de vol en fonction de la masse puis à partir de cette courbe seront déterminées les masses des nouvelles molécules en fonction du temps mis pour traverser le TOF.

La source MALDI produit très majoritairement des ions monochargés : la masse de la molécule détectée est alors (m+1)/1. La résolution d'un analyseur définit sa capacité à distinguer un ion de rapport (m/z) d'un ion de rapport (m/z + Δ m/z à mi hauteur). En général, la résolution est calculée selon : R=(m/z)/(Δ m/z).

Il existe deux modes de fonctionnement d'un spectromètre de masse MALDI-TOF. Le premier mode, le plus simple, est le mode linéaire précédemment décrit en figure 47. Ce mode présente une bonne sensibilité mais une faible résolution de l'ordre, pour des ions, de 500 à 1000 [184]. Cette perte en résolution s'explique par une dispersion spatiale et énergétique des ions entrants dans le tube de vol. Les ions ne sont pas forcément générés au même moment et au même endroit, par conséquent, les ions de même rapport m/z peuvent ne pas avoir la même énergie cinétique initiale.

La résolution des analyseurs TOF a été améliorée grâce à deux évolutions instrumentales: le réflecteur électrostatique à l'extrémité de l'analyseur et l'extraction retardée dans la source. Le réflecteur applique un champ électrique qui s'oppose à la progression des ions dans l'analyseur. Les ions les plus énergétiques pénètrent plus profondément dans le champ du réflecteur et vont donc mettre plus de temps pour être réfléchis alors qu'ils sont arrivés avant les ions les moins énergétiques dans le réflecteur. Lorsque les ions atteignent une vitesse nulle, ils font demi-tour et sont ré-accélérés en sens inverse (Figure 48). Ceci permet de mieux focaliser les ions de même rapport m/z et d'augmenter la résolution [188].

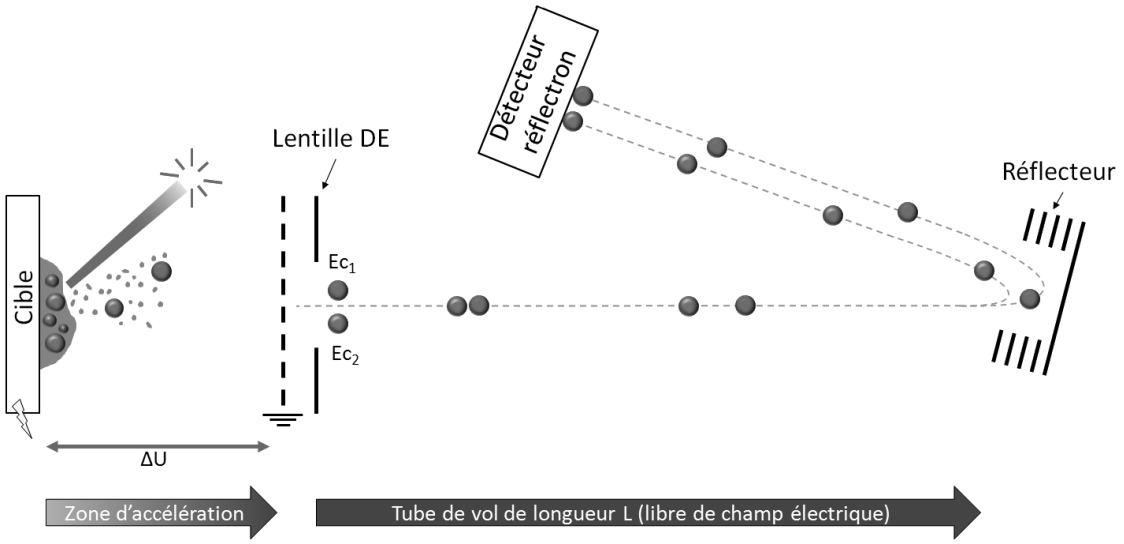


Figure 48 : Schéma du MALDI-TOF en mode réflectron comportant un système d'extraction retardé (DE). Deux ions de même rapport m/z et d'énergie cinétique différente (Ec1 > Ec2) pénétrant plus ou moins profondément dans le réflecteur sont réfléchis et arrivent simultanément au détecteur.

III.1.3 La fragmentation en MALDI-TOF-TOF

Les ions générés par une source d'ionisation peuvent être classés selon trois catégories:

- Les ions stables à faible énergie interne, ils ne se décomposent pas et constituent le pic moléculaire des spectres de masse.

- Les ions instables à forte énergie interne, ils se décomposent rapidement dans la source en fournissant des ions fragments.

- Les ions métastables à énergie intermédiaire, ils ont une durée de vie intermédiaire et ne se décomposent pas dans la source mais durant le vol.

La spectrométrie de masse en tandem ou MS-MS consiste à amplifier le phénomène de dissociation métastable sans être tributaire de la spontanéité de ces décompositions. Une analyse MS-MS consiste le plus souvent à sélectionner et isoler un ion « dit parent ou précurseur» en fonction de sa masse, puis de fragmenter cet ion par différentes approches et d'analyser la masse des ions « dit fils ou produit» issus de la fragmentation. Cette approche est utilisée dans le domaine de l'analyse protéomique pour le séquençage de peptides et de protéines ainsi que la caractérisation des modifications post-traductionnelles [[189–191]].

La technologie TOF-TOF est une technique d'analyse MS-MS qui a été décrite pour la première fois en 2000 [[192]].

Nous décrirons dans cette partie, le principe de fonctionnement de l'instrument Ultraflextrem TOF-TOF (Bruker) utilisé lors de ce travail de thèse (Figure 49). Il a été

développé avec une approche légèrement différente de celle utilisée dans les instruments MS/MS classiques.

En mode MALDI, on pourra distinguer deux modes de fragmentation, le premier nommé CID (Collision Induced Dissociation) est réalisé en présence de molécules d'argon afin de renforcer et favoriser les fragmentions à haute énergie. Le deuxième mode, LID pour Laser Induced Dissociation, est principalement lié à l'excès d'énergie interne produit par la source et, comme son nom l'indique, par l'irradiance du laser. Seul le mode LID a été utilisé durant mes travaux de thèse.

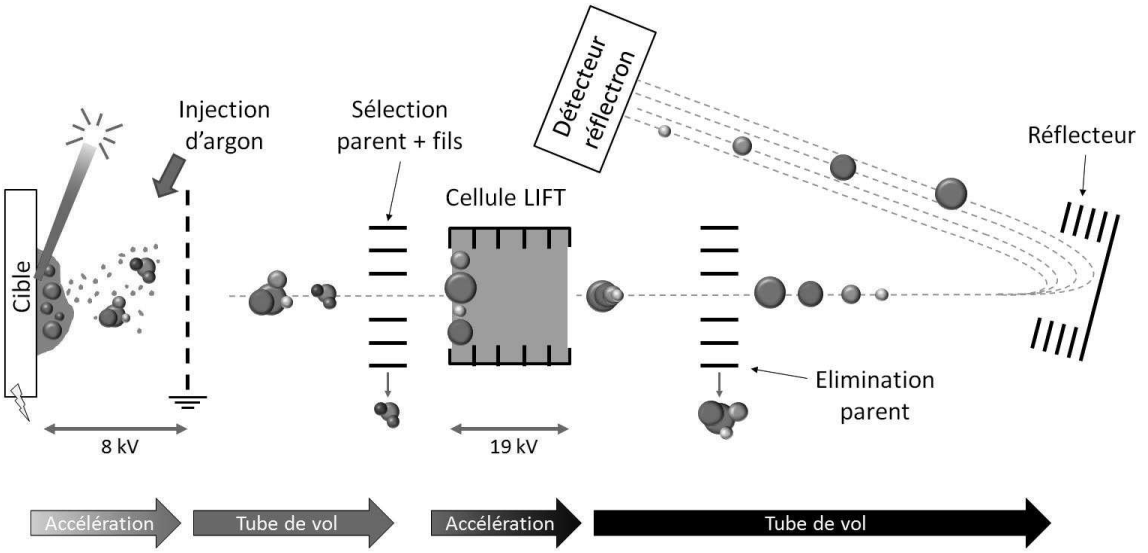


Figure 49 : Schéma de principe du MALDI-TOF-TOF de l'UltrafleXtreme

Pour le mode LID, l'énergie interne apportée par le laser provoque très rapidement, après l'accélération, une dissociation de l'ion parent. Comme nous sommes dans un environnement présentant un vide poussé, alors les ions parents et fils volent dans le tube à une vitesse identique (principe de l'astronaute qui sort de la navette les deux vont évoluer à la même vitesse malgré la différence de masse). Les ions parents et fils issus de la même molécule sont isolés à l'aide d'une grille déflectrice sur la base de leur temps de vol. Les ions alors isolés arrivent au niveau de la cellule LIFT (ascenseur à potentiel) et sont accélérés par un fort potentiel d'au moins deux fois le potentiel initial (19 KV). Après accélération, les ions fragments évoluent alors dans la seconde partie du TOF selon leur masse et sont séparés selon le même principe que l'analyse MS.

III.2. Mise en place des procédures spécifiques pour notre application

La technologie de spectrométrie de masse MALDI-TOF nécessite l'utilisation d'un support solide appelé cible sur lequel seront déposés l'échantillon et la matrice. L'échantillon peut être de différentes natures: des protéines entières, des digestes de protéines, des coupes de tissu etc. Dans le cadre de notre développement, nous avons choisi de réaliser l'analyse MS et MS-MS des échantillons directement sur les biopuces. Cette contrainte a donc nécessité un certain nombre de mises au point pour obtenir une puce compatible à la fois pour l'instrumentation SPRi et le MALDI-TOF.

Il a été vu dans le chapitre II qu'il n'était pas possible de travailler sur des prismes de verre recouverts d'or car leur épaisseur n'était pas compatible avec l'appareil de spectrométrie de masse de Bruker. L'analyse MS devait donc être réalisée sur la puce (rappel des dimensions 28 x 12.5 x 0.5 mm) après son retrait de l'appareil SPRi. La procédure d'ionisation par laser assistée par matrice nécessite une focalisation précise et répétable du laser à la surface de la cible MALDI. Une déformation de la cible MALDI ou du support entraîne automatiquement une erreur de mesure, il est donc indispensable que la puce intégrée au support soit dans le même plan que le reste de la cible. Du fait d'une distance précise entre la cible et les premières lentilles d'accélération, sur lesquelles est appliquée une très haute tension, il est impossible d'ajouter simplement la puce à la surface d'une cible MALDI au risque de créer un arc électrique. Il a donc été choisi dans un premier temps de créer un logement dans une cible MALDI permettant d'insérer la puce. Cette approche a vite montré ses limites car nous avons une variation d'épaisseur des lames de verre de plus ou moins 0.05 mm, qui est inhérente à leur procédé de fabrication. Cet écart entre surface d'or de la puce et surface de la cible compromet l'optimisation des conditions d'irradiation laser, telles que son diamètre d'impact et sa localisation. Cela influence aussi directement l'intensité d'énergie dissipée et compromet la reproductibilité des analyses.

Une cible MALDI a dû être conçue et usinée de façon à garantir le parallélisme et la coplanéité de la surface de la puce d'or avec la surface de la cible MALDI (Figure 50).

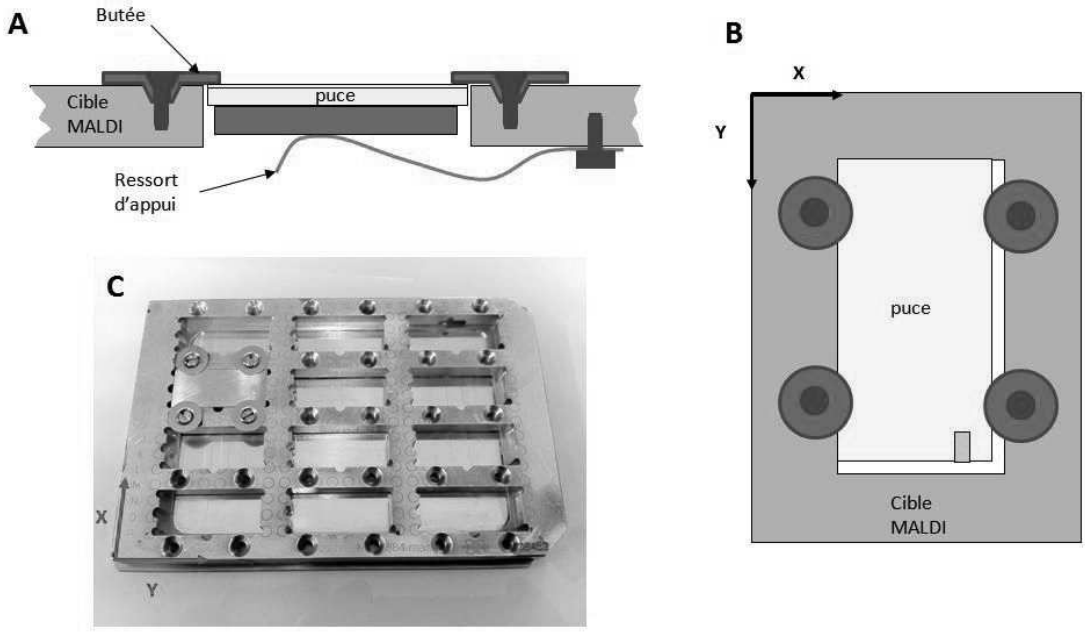


Figure 50 : (A) Principe de montage d'une puce dans une cible MALDI. (B) Positionnement d'une puce suivant son repère x et y. (C) Cible MALDI modifiée et ses 12 logements de puce.

Les puces sont insérées par l'arrière de la cible MALDI et leurs faces supérieures viennent en butée contre des rondelles fixées à la cible (Figure 50A). Un ressort couplé à une entretoise viennent maintenir et plaquer les puces contre ces rondelles leur assurant un bon maintien et un affleurement parfait de leur surface d'or par rapport à la cible MALDI. Il faut noter qu'un ressort sans plaque pour la répartition de l'appui de serrage, risque de déformer la lame de verre et d'induire un défaut de planéité.

De plus, en vue d'une analyse automatique en MS, l'emplacement de la puce doit être connu avec précision sur la cible MALDI et n'importe quel endroit de la puce doit pouvoir être interrogé de façon automatique. Les usinages destinés à accueillir les puces sont volontairement plus larges que les dimensions de la lame de verre. Le jeu qui en découle va d'une part permettre de tolérer les variations de dimensions de lames mais également de pouvoir, avec un outil, plaquer la puce selon deux de ses côtés. En effet, tout au long des procédures de fabrication de puce, de préparation de la biopuce, de l'analyse SPRi et de l'analyse MS, un référentiel x et y a été défini selon 2 côtés orthogonaux de la puce (Figure 50B). De cette façon, nous n'étions plus tributaires des tolérances des lames, de l'orthogonalité et de la qualité des découpes. Ce référentiel est repéré grâce au détrompeur présent sur l'or, lors de son dépôt par évaporation.

Cette cible MALDI home-made aura donc pour avantages :

- D'accueillir des lames d'épaisseur variable et de dimensions grossières.
- De localiser la puce (référence x et y) et de pouvoir interroger en mode automatique la zone désirée.
- D'accueillir jusqu'à 12 puces SPRi, ce qui augmente considérablement la capacité de débit d'analyse automatique (Figure 50C).

III.2.1 Prétraitement MS

Dans les conditions classiques, les échantillons sont traités (digestion et mélange avec la matrice) en tube puis déposés au dernier moment sur une cible pour réaliser l'analyse. Dans notre projet, l'analyse MS se déroulant directement sur la puce, il était nécessaire de réaliser un prétraitement in situ.

Le traitement des échantillons biologiques est différent en fonction de l'analyse MS que nous souhaitons réaliser. Par exemple l'analyse d'une protéine entière consistera à déposer uniquement la matrice à la surface de la puce. Dans le cadre de nos travaux, nous cherchons à déterminer une cartographie peptidique des protéines capturées sur la puce pour une identification plus fiable et une caractérisation fine de sa structure. Trois étapes de prétraitement sont nécessaires pour une analyse en PMF par MALDI-TOF: étape de réduction, digestion et dépôt de matrice.

III.2.1.1 Réduction et digestion sur puce

Dans un premier temps, les protéines vont subir une réduction qui consiste à rompre les ponts disulfures (S-S) qui les composent. Ce mécanisme de réduction dépend du type d'agent réducteur, également nommé antioxydant. Il en existe plusieurs sortes, avec des structures et des tailles variées. Dans cette étude, nous utiliserons du tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) qui réduit les ponts S-S des protéines dans une réaction représentée en figure 51.

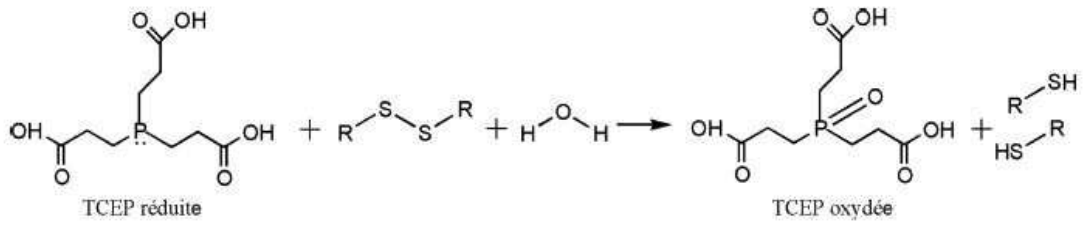


Figure 51 : Réduction des ponts disulfure par la TCEP [193]

Dans un premier temps, l'atome de phosphore (P) se substitue à l'un des deux atomes de soufre (S) de la liaison disulfure (S-S). Celle-ci est clivée et une liaison S-P est formée. Il y a ensuite une étape d'hydrolyse qui aura comme résultat l'obtention d'une liaison double P=O et de thiol S-H.

La TCEP est plus efficace qu'un autre antioxydant, le DTT (dithiothréitol), en permettant la réduction de ponts S-S à des valeurs de pH plus basses et à température ambiante. Néanmoins, la TCEP se présente sous quatre formes d'état de protonation active dans la réaction, ce qui rend la cinétique de réaction plus complexe. De plus, la taille de la molécule de TCEP est plus importante que celle du DTT ce qui peut rendre les ponts S-S moins accessibles.

La réduction des ponts S-S aura pour effet de modifier la conformation de la structure des protéines. Ces changements structurels affectent principalement les structures du type hélice en modifiant leur pas [193] et implique un phénomène de déploiement de la protéine.

Le dépliement des structures secondaires va avoir pour intérêt de rendre plus accessibles les sites de clivage pour la seconde étape du prétraitement MS qui va consister à digérer la protéine en peptide au moyen d'une protéase. Il existe différentes enzymes disponibles pour la digestion, telle que la trypsine, la papaïne, la chymotrypsine et la pepsine. Dans le cas de notre étude, la trypsine semble particulièrement bien adaptée à la digestion des protéines car c'est une enzyme hautement spécifique. Elle hydrolyse les liaisons peptidiques coté C-terminal des acides aminés, lysine et arginine sauf dans les cas où ces acides aminés sont suivis par une proline (Figure 52)

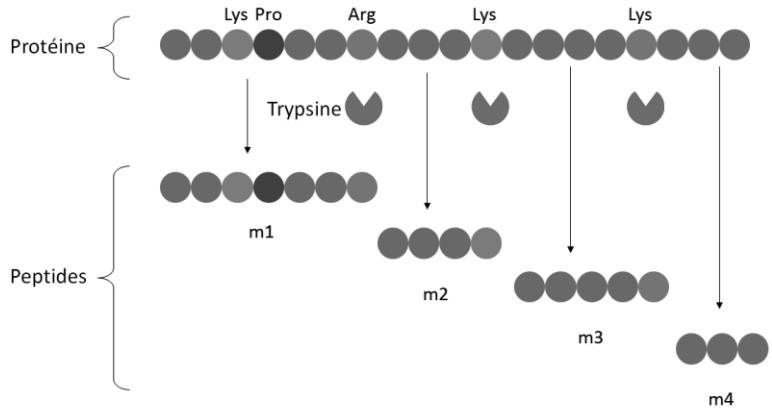


Figure 52 : Digestion enzymatique d'une protéine par la trypsine

.

La trypsine est active dans des milieux légèrement basiques (pH 8) et son activité enzymatique est maximale à la température physiologique de 37°C. C'est le résultat de cette digestion qui sera interrogé en spectrométrie de masse.

III.2.1.2 Matrice d'ionisation

L'ajout de la matrice va permettre la désorption et l'ionisation des fragments de protéine dans la source MALDI, comme il a été vu en III.1.1. Il existe plusieurs types de matrice adaptés aux analytes étudiés [188]. Les plus courantes sont:

- L'acide α-cyano-4-hydroxycinnamique (HCCA) pour l'analyse des peptides et des protéines
- L'acide 2,5 dihydroxybenzoïque (DHB) pour les oligosaccharides, les glycoprotéines
- L'acide sinapinique (SA) pour les peptides, les protéines et les glycoprotéines
- L'acide 3-hydroxypicolinique (3-HAP) pour les oligonucléotides

Dans le cadre de cette étude, la matrice utilisée est l'acide α-cyano-4-hydroxycinnamique (HCCA) présentant un coefficient d'extinction molaire élevé à la longueur d'onde du laser incident. Elle est soluble dans les solvants et cristallise facilement après évaporation du solvant. La matrice HCCA possède des fonctions chimiques favorisant les interactions avec l'échantillon et favorise sa dispersion. Et enfin, elle présente une bonne capacité de transfert des protons aux fragments désorbés.

III.2.1.3 Technologie de spray par Imageprep

Les 3 étapes de prétraitement MS doivent être exécutées directement sur la puce. Dans le cas futur où la puce présentera différents ligands répartis selon des zones appelées "spots", les solutions devront être déposées sur chacune de ces zones. L'utilisation d'un spotter automatique déposant des solutions de prétraitement sur chaque ligand n'est pas possible. En effet, les solutions (composées de solvants) ne permettent pas d'être confinées à une goutte de la taille correspondant aux spots où est greffé chaque ligand. Nous verrons par la suite dans le manuscrit que ces spots ont un diamètre d'environ 1 mm. L'étalement du liquide déposé provoque une fusion des gouttes et une cross contamination d'un spot à un autre. L'idée a donc été de détourner l'utilisation d'un appareil destiné à la préparation de coupe de tissu : la station ImagePrep (Bruker Daltonics GmbH, Brême, Allemagne). C'est un dispositif de dépôt de matrices pour les applications MALDI Imaging. L'ImagePrep fait appel à une technique de vaporisation vibrationnelle pour fournir des préparations de matrices reproductibles en vue d'obtenir des images MS, dans le cadre d'un processus entièrement automatisé [194].

Une feuille de métal percée de trous de taille micrométrique est portée à une vitesse de vibration supersonique par un actionneur piézo-électrique. Elle va générer une pulvérisation fine de solution (spray) sur la puce à traiter dans une enceinte saturée en azote. La taille des gouttelettes est contrôlée par la puissance du spray. Afin d'éviter la contamination croisée d'une zone à une autre, la durée et la fréquence de pulvérisation devront être choisies pour générer des dépôts de gouttelettes par des cycles courts de pulvérisation pour empêcher leur confluence et la délocalisation d'analyte [[195,196]].

L'ImagePrep possède un capteur optique qui suit la lumière diffusée à partir de cristaux de matrice pour contrôler tous les paramètres de préparation en temps réel: les périodes et intervalles de dépôt, l'épaisseur de la couche matricielle, l'humidité, le taux de séchage, etc.

Les paramètres pouvant être modifiés sont : la quantité totale de solution appliquée (thickness), le temps d'attente entre chaque cycle de spray (Incubation time) et l'humidité résiduelle avant le prochain spray (Wetness). Une méthode peut comporter une ou plusieurs phases ; pour chaque phase les conditions de pulvérisation, d'incubation et de séchage sont ajustables. Dans chaque phase un nombre de cycle peut être défini, représentant le nombre de répétition du procédé programmé. Chaque phase comprend les paramètres de puissance du spray (0 à 100%), de la modulation de la puissance du spray, du temps d'incubation entre chaque spray et le temps de séchage par azote.

Ainsi l'ImagePrep va permettre de déposer les différentes solutions nécessaires au prétraitement MS sur la totalité de la surface de la puce, en générant des micros gouttelettes de 50 µm de diamètre.

III.2.2 Analyse MS sur puce

La puce est montée dans l'UltrafleXtreme MALDI-TOF-TOF à l'aide de la cible MALDI usinée et adaptée aux dimensions de la puce. L'UltrafleXtreme est équipé d'un laser smartbeam-II avec fréquence de tir de 1 kHz, qui permet une acquisition de données à ultra haute vitesse tant en mode MS qu'en mode MS/MS. L'UltrafleXtreme est utilisé en mode positif et réflectron pour la mesure de masse des peptides issus de la digestion sur la puce.

Deux types d'analyse sont possibles. Le premier consiste à analyser la totalité de la surface. Les spectres MS sont automatiquement enregistrés en utilisant la méthode AutoXecute combiné au logiciel Fleximaging 2.1 (Bruker Daltonics). Des images de la distribution des peptides à la surface de la puce sont générées, avec comme tolérance ± 0.5 Da. Afin de déterminer les conditions de tir, la surface de la biopuce est

analysée par positions de tir successives espacées de 120 µm. Chaque spectre de masse résulte d'une accumulation de 2000 tirs aléatoires, dans un rayon de 70 µm, pour chaque position. Ces paramètres ont été déterminés après avoir obtenu l'image (en bleu figure 53) la mieux résolue du mot "CLIPP" formé par le dépôt robotisé de peptides à la surface de la puce (Figure 53). Nous pouvons constater dans ces conditions de tir, l'absence de délocalisation des peptides détectés.

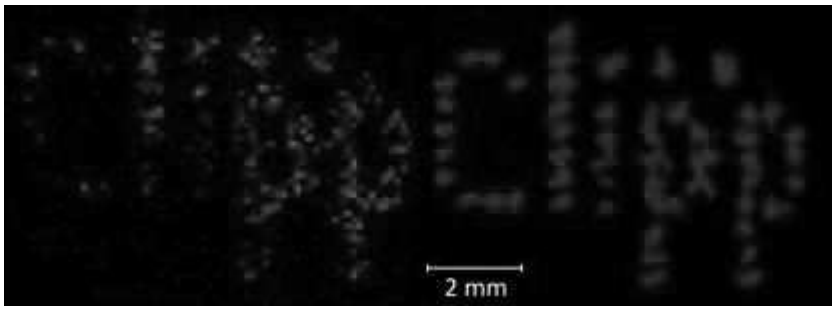


Figure 53 : Imagerie MS de la surface de la puce où a été déposé 1 nl de solution de peptides à 50 femtomoles par spot de façon à former le mot "CLIPP". En rouge déplacement tous les 50 µm avec une accumulation de 1000 tirs par position. En bleu déplacement tous les 120 µm avec 2000 tirs par position

Le deuxième type d'analyse consiste à indiquer les positions exactes au logiciel d'acquisition FlexControl (Bruker Daltonics) des emplacements à analyser automatiquement comme par exemple les spots d'anticorps sur une biopuce. Comme pour l'imagerie, la tension d'accélération en mode MS est de 25 kV, pour un temps d'extraction des ions de 80 ns, est mesurée mais il est également possible de procéder à une analyse MS-MS des peptides détectés. Les spectres MS-MS sont acquis manuellement, avec comme tension d'accélération 7.5 kV pour un temps d'extraction des ions de 60 ns. Chaque spectre MS-MS obtenu, résulte d'une moyenne de 1000 tirs laser en mode parent et 2000 tirs laser en mode fragments.

La séquence peptidique obtenue est alors comparée aux séquences peptidiques théoriques contenues dans la base de données Swiss-Prot TrEMBL et permet l'identification de la protéine avec comme paramètres de sélection : la base de données de mammifères, la digestion par trypsine et le manque d'un site de clivage. La probabilité pour que la protéine identifiée soit bien celle présente, est calculée par un algorithme Mascot Matrix Science (Mascot version 2.2.01 ; Boston, MA, USA) et donnée sous forme de score Mascot. Plus le score est élevé, plus le niveau de confiance dans l'identification de la protéine est important. Ce score est considéré comme significatif au-dessus de 40. La tolérance de masse en mode

MS a été fixée à 50 ppm, tandis que la tolérance des masses des fragments en mode MS-MS a été fixée à 0,6 Da.

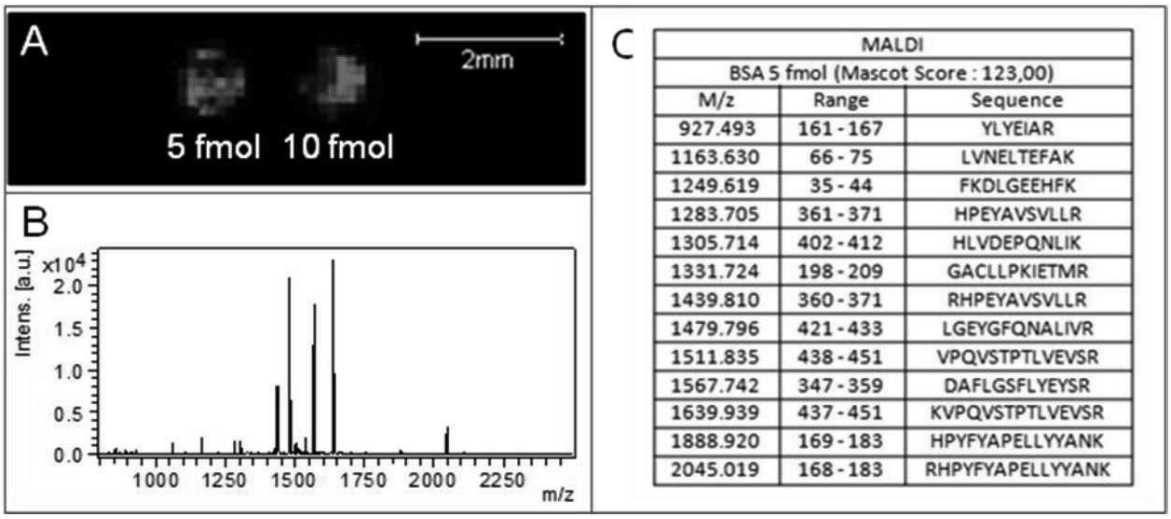
III.2.3 Optimisation des procédures de prétraitement MS

Chaque paramètre de prétraitement doit être expérimenté, un à un, sur une surface de puce dans l'ordre décroissant du déroulement normal du couplage SPRi-MS. Les paramètres de tir laser ont été déterminés de façon à obtenir la meilleure résolution d'analyse. L'optimisation des étapes de dépôt de matrice et de digestion est exposée dans les paragraphes suivants.

III.2.3.1 Dépôt automatique de matrice

Cette étude préliminaire a été effectuée par l'équipe de l'IFR SANTE STIC de Dijon pour déterminer si le dépôt automatique de matrice par ImagePrep permettait une résolution d'analyse suffisante à une analyse MS de spots de protéine espacés de 1 mm. Pour valider le traitement collectif des puces à l'aide d'un spray, plusieurs critères ont été définis, notamment: la sensibilité, la reproductibilité, l'uniformité et la résolution.

Deux dépôts de 0.2 µL contenant 5 et 10 femtomoles de digest d'albumine de sérum de bovin (BSA) ont été déposés sur une surface d'or nue équivalente à 1 mm^2 chacun. La quantité de BSA à la surface de la puce, équivalente à 5 et 10 femtomoles/mm^2 correspond à des taux de capture attendus par un immunocapteur fiabilisé. Plusieurs méthodes de spray de matrice ont été testées où la puissance de spray varie de 10 à 25 % et la modulation de vibration de 10 à 30 %. La figure 54 montre que la procédure de dépôt de matrice HCCA (1 mg/mL à 50/50 vol/vol en eau/acetonitrile avec 0.25 % TFA) optimisée par ImagePrep permet d'obtenir des résultats en phase avec les contraintes liées à l'approche du couplage SPRi-MS. La sensibilité MS sur puce permet l'identification significative de la BSA avec une quantité de l'ordre de la femtomole, avec un score Mascot significatif de 123, et il apparait qu'aucun peptide parmi les 13 peptides spécifiques à la BSA n'est délocalisé après le dépôt de matrice par spray.



C

MALDI		
BSA 5 fmol (Mascot Score : 123,00)		
M/z	Range	Sequence
927.493	161 - 167	YLYEIAR
1163.630	66 - 75	LVNELTEFAK
1249.619	35 - 44	FKDLGEEHFK
1283.705	361 - 371	HPEYAVSVLLR
1305.714	402 - 412	HLVDEPQNLIK
1331.724	198 - 209	GACLLPKIETMR
1439.810	360 - 371	RHPEYAVSVLLR
1479.796	421 - 433	LGEYGFQNALIVR
1511.835	438 - 451	VPQVSTPTLVEVSR
1567.742	347 - 359	DAFLGSFLYEYSR
1639.939	437 - 451	KVPQVSTPTLVEVSR
1888.920	169 - 183	HPYFYAPELLYYANK
2045.019	168 - 183	RHPYFYAPELLYYANK

Figure 54 : Imagerie MALDI-MS de la puce d'un digest de BSA après dépôt de matrice par ImagePrep. (A) distribution du peptide tryptique spécifique de m/z 1487.79 indiqué en rouge. (B) spectre MS obtenu sur le dépôt à 5 femtomoles/mm^2 permettant d'identifier la BSA avec une score Mascot de 123 et avec 13 peptides spécifique (C) [150]

Le programme retenu pour l'application de la matrice sur la puce par ImagePrep pour toutes les analyses MS au cours de la thèse est décrite dans le tableau suivant :

Phase 1					
Matrice	Spray			Incubation	Séchage
7 cycles	Puissance	Modulation	Durée	5 s	30 s
	10%	30%	1,50 s		
Phase 2					
Matrice	Spray			Incubation	Séchage
7 cycles	Puissance	Modulation	Durée	5 s	45 s
	10%	30%	1,50 s		
Phase 3					
Matrice	Spray			Incubation	Séchage
11 cycles	Puissance	Modulation	Durée	5 s	60 s
	10%	30%	1,50 s		

Tableau 4 : Paramètres de dépôt de matrice automatique par ImagePrep

III.2.3.2 Digestion MS sur puce

La validation de l'étape d'automatisation du dépôt de la matrice obtenue à la section III.2.1.1 a permis de conforter notre capacité à analyser des peptides sur la puce à un seuil de sensibilité en adéquation avec les études SPRi. Par ailleurs, l'utilisation de spray a déjà été testée pour le dépôt de matrice sur une puce et a conduit à des spectres de masse de protéines entières de transferrine et de b-2-microglobuline [135]. Une contrainte pour effectuer une caractérisation fine des protéines par MS est la nécessité d'analyser leurs fragments résultant

d'une digestion enzymatique. Pour ce faire, l'enzyme est pulvérisée sur la surface de la puce par l'ImagePrep pour procéder à la digestion in situ. Pour optimiser l'efficacité enzymatique, deux paramètres sont modulés : la concentration de la trypsine et la température. L'ImagePrep fonctionne habituellement à température ambiante, mais nous avons expérimenté des cycles d'incubation à 37 °C après pulvérisation. Les critères utilisés pour optimiser le processus de la digestion sont : l'intensité des pics, le nombre de peptides spécifiques de la protéine cible et le nombre total de peptides détectés.

Le prétraitement MS par ImagePrep de la RSA (albumine de sérum de rat) déposé à la surface de la puce comprend les étapes suivantes : l'étape de réduction (TCEP 10 mM / 0.1 M NH_4HCO_3, Sigma Aldrich), suivie de l'étape de digestion par la trypsine (10 et 40 ng/µL, Trypsin Gold Mass Spectrometry Grade, Promega) toutes deux à 37 °C (Tableau 5) et enfin l'étape de dépôt de matrice HCCA dont les paramètres ont été déterminés en III.2.1.1. Une étape d'alkylation est nécessaire lors d'une digestion en milieu liquide , mais dans notre cas, cette étape n'est pas nécessaire en raison de la courte durée de la digestion qui réduit le risque de formation de ponts disulfures des groupes sulfhydriles libres [[197]].

Phase 1					
Réduction	Spray			Incubation	Séchage
3 cycles	Puissance	Modulation	Durée	3 s	0 s
	45%	20%	1 s		

Phase 2					
Digestion	Spray			Incubation	Séchage
3 cycles	Puissance	Modulation	Durée	3 s	0 s
	45%	20%	1 s		

Tableau 5 : Paramètres de dépôt automatique par ImagePrep pour la réduction et digestion sur puce

Pour optimiser la digestion sur puce, la trypsine a été déposée par spray à concentration 10 et 30 ng/µL sur une même puce. La figure 55A montre que la concentration de 30 ng/µL de trypsine spray est plus efficace et donne un score d'identification de 103 et le plus grand nombre de peptides (15) détectés spécifiques à la RSA (Figure 55B). La figure 55C montre la différence d'intensité entre les deux conditions de digestion pour le peptide 1960,05 m/z. La couverture de séquence des peptides détectés après réduction et digestion de la RSA déposée à 10 femtomoles/mm^2 en utilisant 30 ng/µL de trypsine atteint 23 % (annexe 3). Les tests effectués avec une plus forte concentration de trypsine (> 40 ng/µL) ne sont pas concluants,

car les peptides issus de l'autolyse de l'enzyme de digestion deviennent abondants et réduisent significativement le signal de l'analyte.

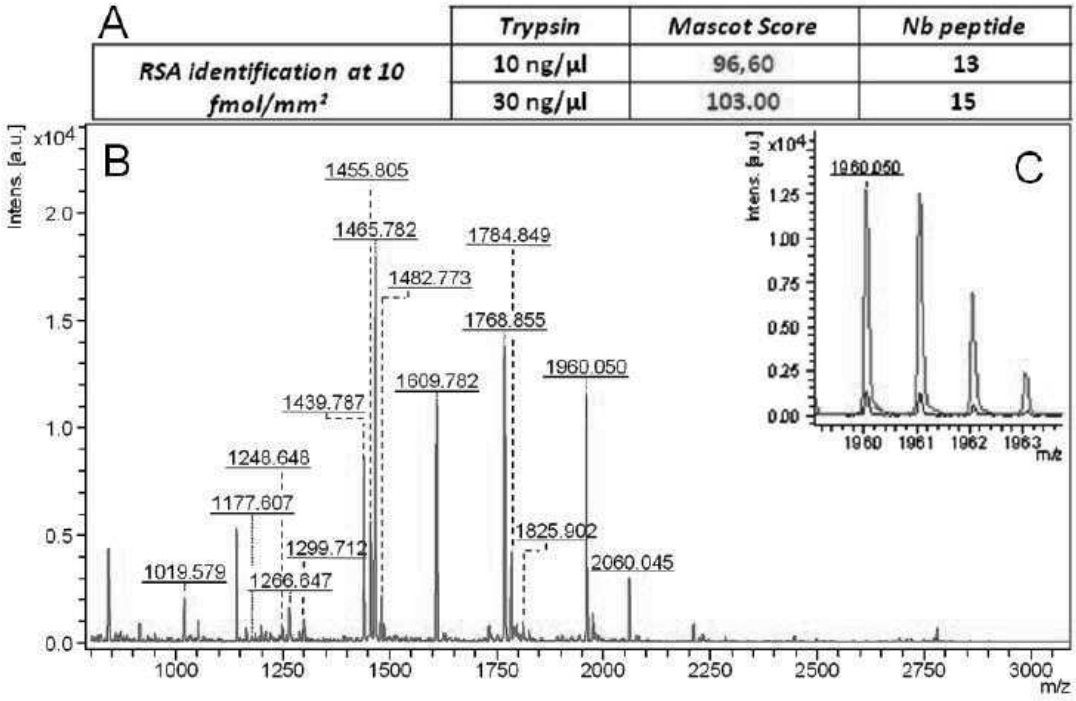


Figure 55 : (A) Score Mascot d'identification et nombre de peptides détectés après réduction et digestion, (B) spectre MS obtenu après réduction, digestion et dépôt de matrice pas ImagePrep d'un dépôt manuel de RSA à 10 femtomoles/mm^2, intensité du pic 1960,05 m/z de RSA pour une digestion à 10 ng/µL (en bleu) et 30 ng/µL (en rouge) de trypsine [^{150}].

III.2.3.3 Bilan

Les procédures de prétraitement telles que la réduction, la digestion et le dépôt de matrice ont été optimisées ainsi que les paramètres de tirs laser afin de procéder aux analyses MS directement sur la puce. L'analyse par imagerie MS a montré que l'utilisation du spray n'induit pas de délocalisation des peptides. De plus, la digestion sur puce est efficace puisque les 15 peptides spécifiques à la protéine permettent son identification significative avec des scores mascot MS relativement élevés. Afin d'évaluer la possibilité du couplage SPRi / MS, nous allons chercher à analyser par MS les protéines immobilisées en SPRi.

III.2.4 Couplage SPRi-MS: analyse MS de RSA greffé par SPRi

III.2.4.1 Génération d'échantillon par SPRi

Dans un premier temps, des puces présentant un nombre de molécules connues et en monocouche à la surface de l'or ont été générées pour fournir à la spectrométrie de masse des

substrats présentant une densité de molécules cohérentes à une interaction biologique. Pour cela, l'appareil SPRi-Plex II a été utilisé.

Des puces d'or développées au chapitre II sont fonctionnalisées chimiquement et un tapis de protéines a été greffé par SPRi-Plex II afin de garantir des quantités fixées de l'ordre de quelques femtomoles/mm^2.

Les puces d'or sont fonctionnalisées et activées chimiquement selon les mêmes procédures qu'au chapitre II et montées dans l'appareil de SPRi. Nous avons fait le choix de greffer, sur la totalité de la surface d'analyse, de l'albumine de sérum de rat (RSA) à 40 µg/mL. La RSA est une protéine de 66 KDa, elle est greffée sans difficulté à la surface de la puce et sera, par la suite, utilisée comme agent bloquant pour la réalisation de l'immunopuce.

Après greffage de la RSA à la quantité souhaitée, une injection de détergent (OG 40 mM) permet d'éliminer l'albumine qui se serait adsorbée. De l'éthanolamine pendant 10 min à 20 µL/min est injectée pour désactiver les groupements carboxyles activés de la SAM. De l'eau ultra pure est injectée en fin d'expérience SPRi afin d'éliminer les sels à la surface de la puce. La récupération de la puce au sein du SPRi Plex II est une étape relativement délicate car l'huile de couplage entre le prisme et la puce ne doit à aucun moment remonter dans la zone d'analyse. La goutte, présente à la surface de la puce, est évacuée par l'inclinaison de la puce sur un papier absorbant et la surface est séchée à l'air.

III.2.4.2 Prétraitement et analyse MS

Le mode opératoire utilisé pour traiter les puces SPRi est issu du développement décrit précédemment. L'analyse MS de la RSA greffée par SPRi à 10 femtomoles/mm^2 a conduit à l'identification significative de la protéine RSA avec un score Mascot de 62.00 avec 12 peptides matchés. L'analyse MS en mode imagerie va permettre de contrôler si le dépôt de la trypsine est homogène dans la zone analysée. En effet, l'image générée, en figure 56, montre la répartition d'un peptide spécifique à la trypsine (2211,10 m/z) et de deux peptides spécifiques à la RSA (1960,05 et 1439,78 m/z). Le dépôt homogène de l'enzyme permet la bonne reproductibilité de l'analyse intra puce, mais permet également de traiter jusqu'à deux puces simultanément, assurant ainsi une préparation comparable entre les puces qui ont été exposées à différents types d'échantillons biologiques. La reproductibilité des prétraitements est également permise par l'atmosphère contrôlée de l'ImagePrep, qui prévient l'influence de la température extérieure et du degré hydrométrique sur l'activité enzymatique et la vitesse de cristallisation de la matrice. L'automatisation des procédures par l'ImagePrep permet donc de réduire les variabilités techniques et permet d'obtenir des résultats robustes.

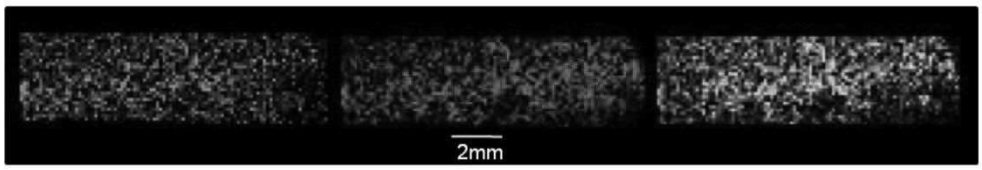


Figure 56 : Distribution du peptide 2211.10 (spécifique à la trypsine), 1960.05 et 1439.78 (spécifiques à la RSA), après analyse de 10 femtomoles/mm² de RSA greffée, digérée par trypsine à 30 ng/µl avec un dépôt de matrice HCCA à 1 mg/mL

L'analyse MS de protéines issues d'une puce SPRi, montre que le couplage est possible. La chimie utilisée, les dimensions des lames, les outils et les procédures mises en œuvre s'avèrent efficaces et robustes. L'utilisation de l'appareil de SPRi et les méthodes de préparation de la puce n'induisent pas de contamination risquant de compromettre l'analyse MS. Mais des précautions drastiques lors de manipulation des puces par l'utilisateur sont de rigueur pour éviter toutes contaminations extérieures comme par exemple la kératine issue de l'épiderme ou les cheveux.

Conclusion

A travers ce chapitre, nous avons présenté une technique originale pour la préparation des protéines capturées sur puce en vue de l'analyse MS. Cette technique, dérivée de la préparation de coupe de tissus pour une analyse MS, repose sur l'utilisation d'un spray pour déposer la matrice. La difficulté a été d'adapter les méthodes et cycles de spray afin de procéder à la réduction, à la digestion et au dépôt de matrice directement sur une biopuce. Nous avons, dans un premier temps, développé une cible permettant d'intégrer les puces dédiées SUPRA-MS. Le positionnement précis de la puce est l'un des points clefs pour garantir une analyse fiable de la totalité de la puce. Nous avons ensuite déterminé les cycles de spray de matrice et les paramètres de tir laser pour garantir une analyse MS homogène de la surface. Des dépôts de BSA sur puce, ont permis d'obtenir, après digestion sur puce, des identifications significatives et d'assurer la non délocalisation de l'information. Un premier couplage entre puce SPRi et MS a permis de valider l'homogénéité des solutions sprayées, la compatibilité entre les dimensions de la puce avec les différents instruments et l'absence de contaminations liées à la fonctionnalisation chimique et à l'analyse SPRi.

Cette procédure qui comprend l'intégralité des préparations des protéines à une analyse en PMF sans élution est unique et ouvre une voie d'analyse automatisée et robuste dans le domaine du couplage immunopuce / MS.

IV. VALIDATION DE LA SUPRA-MS

Il a été montré dans le chapitre II que les puces d'or bas coût, ayant des propriétés plasmoniques présentaient des sensibilités adaptées aux études d'interaction biomoléculaire à leur surface. Leur réponse à un greffage de protéines a pu être directement vérifiée par visualisation à l'échelle nanométrique des éléments fixés à la puce, validant ainsi la correspondance entre signal mesuré par SPRi et taux de recouvrement réel en protéines. Parallèlement, des éléments fixés de façon covalente ont pu être analysés par spectrométrie de masse MALDI-TOF grâce à une procédure originale de prétraitement MS sur puce, suivi de l'analyse MS automatique.

Dans un premier temps, une interface biospécifique est développée pour assurer la capture suffisante de l'analyte en milieu idéal. Dans un souci de multiplexage de l'analyse, la surface de la puce est subdivisée en zones circulaires qui présenteront différents biorécepteurs. Ces zones, appelées spots, sont disposées à intervalle régulier selon une matrice (tableau ou « array ») à définir. L'analyse par spectrométrie de masse des spots après interaction aura pour but d'identifier les analytes capturés pour la validation de la plateforme SUPRA-MS en milieu idéal puis en milieu biologique complexe.

Dans un deuxième temps, la plateforme SUPRA-MS est testée avec divers milieux biologiques complexes pour permettre, à court terme, son utilisation dans des études cliniques sur des échantillons de patients.

Nous allons présenter dans ce chapitre les développements ainsi que les performances obtenues, qui ont contribué à la validation de la plateforme SUPRA-MS.

IV.1. Réalisation de la biopuce

La biopuce est composée de la puce d'or à propriété plasmonique et d'une interface biospécifique. Cette interface est composée de biorécepteurs et d'une fonctionnalisation chimique de l'or, celle-ci dépendra du type de biorécepteurs. Cette interface biospécifique a pour obligation première de maintenir une haute spécificité entre le récepteur et l'analyte. Pour cela, le biorécepteur, une fois immobilisé, ne doit pas être dénaturé par son immobilisation ce qui pourrait compromettre sa fonctionnalité au cours de l'analyse. Le choix du type de biorécepteur associé à la méthode d'immobilisation est un point clef de la qualité et de la spécificité de la capture de l'analyte. En effet, la capacité à ne pas interagir avec d'autres protéines, contribuera directement à baisser le bruit de fond des spectres MS et donc à la réussite de l'analyse SUPRA-MS. Dans le cadre de mon travail de thèse pour la phase de

faisabilité, le choix du biorécepteur s'est porté sur les IgGs monoclonaux car ils présentent une forte affinité vis à vis de leurs cibles antigéniques (Ag).

IV.1.1 Choix d'un modèle biologique

Afin d'optimiser l'ensemble de la procédure pour réaliser la preuve de concept de la plateforme SUPRA-MS, un modèle biologique a été défini. Ce modèle consiste à utiliser la protéine LAG-3 (Lymphocyte activation gene-3) décrit comme biomarqueur potentiel de la tuberculose et du cancer du sein [90]. En effet, Triebel et al ont montré que la protéine LAG-3 est un indicateur potentiel de pronostic de la survie des patientes atteintes de cancer du sein lorsque les récepteurs auxœstrogènes (ER) et les récepteurs à la progestérone (PgR) sont positifs. Des patientes présentant un faible taux de LAG-3 (< 120 pg/mL) dans le plasma ont une probabilité de survie de 76 % dans un délai de 3 ans, tandis que les patientes présentant un taux plus élevé (> 120 pg/mL) ont 100 % de probabilité de survie [90]. L'étude a donc montré qu'une concentration élevée de la protéine LAG-3 prédit un faible risque de rechute dans les cas d'ER et PgR positifs.

IV.1.1.1 Modèle de capture: couple anticorps/antigène

LAG-3, ou CD223, est une protéine humaine immuno-modulatrice exprimée à la surface des cellules T activées et se liant avec une grande affinité aux molécules du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) de classe II exprimées par les cellules dendritiques. La protéine LAG-3 est composée de 525 acides aminés (séquence en annexe 4) pour un poids moléculaire de 57,45 kDa. Mais la protéine LAG-3Ig utilisée dans le cadre de notre étude est une fusion de deux protéines LAG-3 et de la fraction constante d'une immunoglobuline de type G de souris qui totalise un poids moléculaire de 160 kDa. Le développement de cette protéine est issu de deux axes de recherche de la société biopharmaceutique, Immutep (Châtenay Malabry, France). Immutep utilise LAG-3 comme adjuvant vaccinal et comme agent d'immunothérapie en oncologie pour traiter des patientes atteintes de cancer du sein métastatique [198].

La protéine LAG-3Ig ainsi que son anticorps A9H12 spécifique ont été fournis par la société Immutep dans le cadre d'une collaboration avec FEMTO-ST en 2008. Le couple LAG-3Ig / A9H12 est un modèle d'antigène/anticorps (Ag/Ab) bien connu de la plateforme CLIPP car utilisé dans les développements des biocapteurs SPR sur Biacore 2000 [141]. A9H12 est un anticorps de type IgG 2a. Cet anticorps est dit "chimérique" car il est humain à 60%. Les parties constantes des chaînes lourdes et légères (CH et CL) d'anticorps humain sont greffées sur les parties variables respectives (VH et VL) d'un anticorps de souris. De plus, il ne reconnait qu'un seul type d'épitope présent sur la protéine LAG-3 et comme LAG-3Ig est

composée de deux protéines LAG-3, LAG-3Ig présente donc 2 épitopes identiques permettant sa capture par A9H12.

IV.1.1.2 Modèle de contrôle

Il est nécessaire d'utiliser un témoin négatif pour toutes analyses d'interactions biologiques afin de contrôler la spécificité de l'interaction. De nombreux paramètres peuvent être source de non spécificité, telle que les protéines interagissant de façon non contrôlées à la surface de la puce ou dans la zone présentant les anticorps (spots). Cette source de contamination de la surface peut provenir de la chimie utilisée pour l'immobilisation des anticorps, de la réactivité naturelle des anticorps avec d'autres protéines ou d'une altération des anticorps due aux méthodes de préparation de la puce.

Deux anticorps de contrôle ont été choisis, le premier est une IgG polyclonale, fabriquée chez le mouton, et dirigée contre de l'albumine de sérum de rat: anti-RSA acheté chez AbD Serotec (MorphoSys,UK). Le second est une IgG monocolonale, fabriquée chez la souris, et dirigée contre de l'albumine d'œuf (ovalbumine ou OVA) : anti-OVA acheté chez Sigma-Aldrich.

IV.1.2 Architecture de l'interface de bioreconnaissance

Les anticorps doivent, dans un premier temps, être fixés à la surface d'or. Pour cela, les monocouches auto-assemblées (ou SAMs) sont des interfaces organiques qui permettent de fournir une grande densité de sites d'accroche pour la fixation covalente des biorécepteurs [[199]]. Elles sont composées de longues chaînes de molécules organiques possédant des fonctionnalités diverses (-SH, -COOH, -NH_2 ...). Les SAMs présentent de nombreux avantages physico chimiques pour la fonctionnalisation chimique de surface [[68]]. Les SAMs forment une barrière physique compacte de quelques nanomètres d'épaisseurs avec les milieux à analyser ce qui limite les interactions non-spécifiques des protéines avec l'or [[200]].

IV.1.2.1 Formation de la SAM

La formation de SAM nécessite plusieurs types de réactifs, plusieurs étapes de préparation mais cette méthode est simple, peu couteuse et facile à mettre en œuvre.

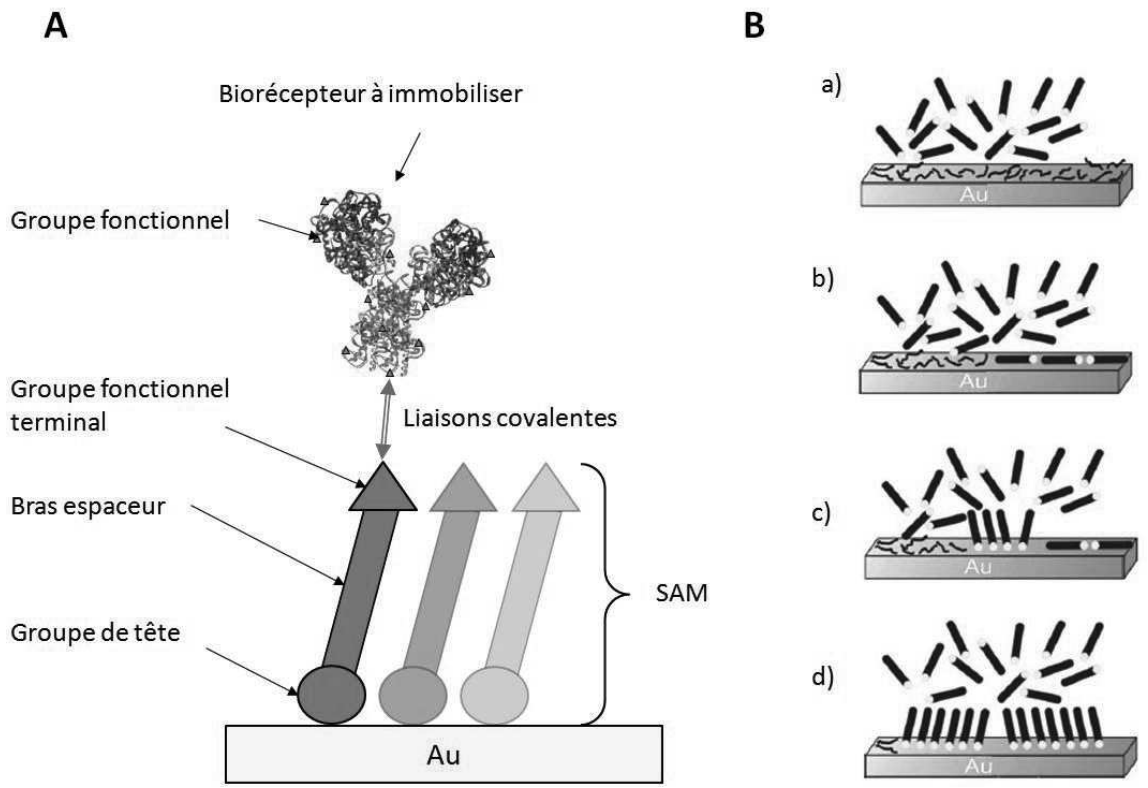


Figure 57 : (A) Architecture de la couche biospécifique, (B) cinétique de fonctionnalisation de l'or [201]

Les SAMs sont formées d'une haute densité de molécules organiques composées chacune d'un groupement de tête (ou groupe d'accroche) et d'un groupement fonctionnel terminal relié entre eux par un bras espaceur (Figure 57A). Le groupement de tête est dépendant de la nature du substrat à fonctionnaliser. Dans le cas de l'or, les thiols sont couramment utilisés. Le thiol est un composé organosulfurique qui contient une liaison soufre-hydrogène (SH). La chimisorption du groupe de tête sur le substrat est le procédé le plus énergétique lors de la formation de la monocouche. Cette liaison des groupes thiolates sur la surface d'or est robuste car sa force de liaison homolytique est d'environ 40 kcal mol^{-1} soit quasiment une liaison covalente [202].

En effet, la réaction est une addition oxydante de la liaison SH avec la surface d'or suivie d'une élimination réductrice de l'hydrogène (équation IV.1) [203].

$$RS - H + Au \Rightarrow RS - Au - H \Rightarrow RS - Au + {}^{1}/_{2}\, H_2 \qquad \text{(IV.1)}$$

L'avantage des thiols dans cette approche est que, lorsque ces molécules sont mises en suspension dans un milieu liquide, elles s'organisent entre elles pour former une couche ordonnée; ce qu'on appelle monocouche auto-assemblée ou SAM.

La chimisorption de groupement thiol hydrophile sur un substrat est formée soit en phase vapeur, soit en phase liquide, suivie par une organisation lente en deux dimensions des chaînes alkyles hydrophobes. Initialement, les molécules de thiol de la solution s'adsorbent facilement sur l'or, puisqu'elles abaissent l'énergie de surface du substrat et sont stables en raison de la forte chimisorption des groupes de tête (Figure 57B.a). Par contre, les molécules forment une masse désordonnée, ou adoptent une conformation «couchée» (Figure 57B.b) puis après une période de quelques heures, elles commencent à former des structures cristallines ou semi-cristallines sur la surface du substrat (Figure 57B.c) [[68]].Tandis que le groupe de tête assure l'attachement des molécules sur le substrat, les groupements terminaux pointent vers l'extérieur de la surface. Les régions où les molécules se greffent à l'or, servent à la nucléation et la croissance de la monocouche jusqu'à ce que celle-ci couvre la surface entière du substrat. De plus, la présence de chaînes organiques aliphatiques contribue à la stabilisation de la monocouche, car leur proximité provoque des réactions inter-chaînes dues aux forces de Van der Waals. Ces interactions inter-moléculaires vont donc permettre aux molécules de s'organiser sur la surface afin d'obtenir une structure monocouche bien ordonnée (Figure 57B.d).

IV.1.2.2 Composition de la SAM

Il existe différents types de molécules pour la création d'une monocouche. L'utilisation de différents groupements fonctionnels terminaux de ces molécules organiques permet la fonctionnalité chimique de surfaces selon la nature des éléments à immobiliser et de leur utilisation. Le groupement fonctionnel terminal de la chaîne de thiol pourra être de nature à réaliser une surface hydrophobe ($R\text{-}CH_3$) ou hydrophile ($R\text{-}NH_2$, R-COOH).

La fonctionnalisation de l'or par un seul type d'alkanethiol a été développée dans de très nombreux travaux [[204]], mais l'utilisation de deux composés alkanethiol de nature et de propriétés différentes apporte un gain dans la biodétection [[205,206]] ainsi que dans la passivation des surfaces vis-à-vis des milieux biologiques complexes [[207–209]]. Le choix se portera alors sur une couche de biofonctionnalisation de thiol mixte:

- Un alkanethiol composé d'une chaine de 16 carbones et d'un groupement terminal carboxyle, l'acide 16- mercapto-1-hexadécanoique (16-MHA). Sa formule avant toute réaction est $SH\text{-}(CH_2)_{15}\text{-}COOH$.

- Un alkanethiol composé d'une chaine de 11 carbones et d'un groupement terminal hydroxyle, le 11- mercapto-1-undécanol (11-MUOH). Sa formule avant toute réaction est $SH\text{-}(CH_2)_{11}\text{-}OH$.

Ces deux molécules représentées en figure 58A possèdent un groupement de tête d'accroche (-SH) qui permet leur liaison à la surface de l'or. Les chaines carbonées (-CH_2-CH_2-) n'ont pas le même nombre de groupements méthylène. En effet, les molécules 11-MUOH sont plus courtes que celles de 16-MHA. Elles sont constituées de 11 groupements -CH2- et d'un groupement terminal hydroxyle (-OH). Leur compacité et les propriétés hydrophiles du groupement hydroxyle leur permettent de créer une passivation de la surface de l'or.

La molécule 16-MHA est quant à elle composée de 15 groupements méthylène. Etant plus longue, elle dépasse de la couche 11-MUOH, facilitant l'accès au groupement terminal carboxyle (-COOH) qui est utilisé pour fixer la protéine (Figure 58B). La proportion de molécules 16-MHA par rapport aux molécules 11-MUOH peut être ajustée en fonction de la taille des protéines à immobiliser pour réduire les problèmes d'encombrement stérique et ainsi, optimiser les interactions biomoléculaires [141,200,204–206,208,209] et être présent de façon minoritaire dans la SAM pour ne pas perturber l'organisation interne des chaînes alkyles et réduire sa compacité.

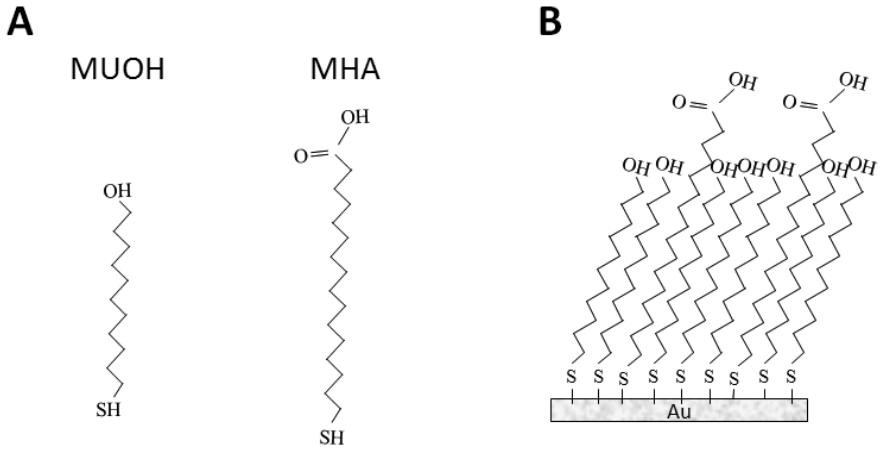


Figure 58 : Molécules d'alkanethiol (A) utilisées dans la réalisation d'une couche mixte de fonctionnalisation de l'or (B).

Frederix et al ont démontré en 2003 que le greffage d'un anticorps monoclonal anti-HSA (Human Serum Albumin) par un mixte de SAM d'alkanethiol composé de 16-MHA et 11-MUOH a permis d'accroître la performance de l'immunocapteur, comparée aux couches de fonctionnalisation disponibles dans le commerce [206].

Le 16-MHA porte un groupe fonctionnel afin de créer une liaison covalente pour l'immobilisation du biorécepteur, tandis que 11-MUOH minimise l'adsorption non spécifique. Différentes densités d'immobilisation d'anticorps ont été réalisées en faisant varier le rapport

des quantités de 16-MHA et 11-MUOH en utilisant une solution mixte de SAM exprimé en pourcentage molaire. Pour déterminer la composition optimale des SAM mixtes, Huang et al ont cherché à greffer un anticorps anti-PSA sur différents pourcentages de 16-MHA allant de 100 à 1% (mol/mol) sur une puce SPR [209]. L'immobilisation de l'anticorps et la capture de l'antigène (PSA) ont été suivies en temps réel par l'instrument de SPR Biacore™ 2000. Il a été montré que la capture de l'antigène la plus efficace a été obtenue pour un greffage d'anticorps sur 10 % de 16-MHA. Effectivement dans ce cas, les groupements carboxyles sont moins imbriqués les uns dans les autres car espacés par les chaînes plus courtes de 11-MUOH; ils se retrouvent donc plus accessibles pour l'immobilisation. De plus, les chimies, à différents pourcentages de 16-MHA, ont été soumises à une injection de plasma humain dilué à 50 %. Les résultats ont montré une proportion plus faible d'interactions non spécifiques des protéines plasmatiques avec les anticorps et la couche de fonctionnalisation lorsque le pourcentage de 16-MHA décroît car la différence de longueur des chaînes provoque une désorganisation de la couche de 11-MUOH [209].

IV.1.2.3 Protocole de fonctionnalisation de l'or

Les puces d'or sont stockées à l'abri de la poussière, à température ambiante en salle blanche. Le protocole de fonctionnalisation commence par un nettoyage de l'or sous un jet d'éthanol ultra pur afin d'éliminer les éventuelles poussières et de mouiller les surfaces d'or par le solvant utilisé pour la fonctionnalisation. Un nettoyage de la surface d'or nu avant fonctionnalisation par UV ozone est couramment utilisé pour éliminer d'éventuelle contamination inorganique comme le soufre [210]. Mais nous n'emploierons pas ce procédé, car les composés organiques contaminant possiblement la surface sont déplacés et ôtés par compétition par les thiols lors de l'auto-assemblage quand le processus d'immobilisation est supérieur à 10 h [68].

La fonctionnalisation se déroule en milieu liquide, ce qui permet de traiter plusieurs puces simultanément et de manière reproductible et aussi de réduire les coûts. La fonctionnalisation se fait par immersion des puces dans un bain d'une solution d'éthanol contenant 1mM d'un mélange de molécules thiolées durant une nuit, soit environ 16 h, sous agitation avec un plateau rotatif, à température ambiante et à l'abri des UVs. Les molécules de 16-MHA et 11-MUOH, dont les masses moléculaires sont respectivement de 258.5 $g.mol^{-1}$ et 204.38 $g.mol^{-1}$, se présentent sous forme de poudre. Les ratios X % 16-MHA et Y % 11-MUOH (avec Y=100-X) sont obtenus après réalisation de deux solutions 16-MHA et 11-MUOH concentrées à 1 mM. Le mélange se fait mole à mole pour obtenir une solution finale de

molarité Z à 1 mM avec $V_{16\text{-}MHA}$ = X%*Z et $V_{11\text{-}MUOH}$ = Y%*Z. Pour simplifier les notations, on parlera uniquement du pourcentage de 16-MHA sous la forme de X% 16-MHA.

Après incubation dans la solution de fonctionnalisation, les puces sont retirées du bain et sont rincées abondamment sous jet d'éthanol, puis sous jet d'eau ultra pure pour ensuite être séchées sous azote. Les puces fonctionnalisées sont stockées pour une durée maximale de 2 mois à température ambiante en salle blanche et à l'abri des UVs. En effet, les thiols sont sensibles aux UV de la lumière ambiante ce qui peut rompre les liaisons S-Au et dégrader la couche de thiols [211].

IV.1.2.4 Activation des groupements carboxyles

La fixation protéique sur la surface fonctionnalisée se fait par estérification des groupements carboxyles des chaines 16-MHA (Figure 59), qui permet à la protéine de se fixer via ses groupements amine primaire (-NH_2), présents aux extrémités des chaines N-terminal des résidus lysine (Lys), arginine (Arg), Asparagine (Asn) et Glutamine (Gln).

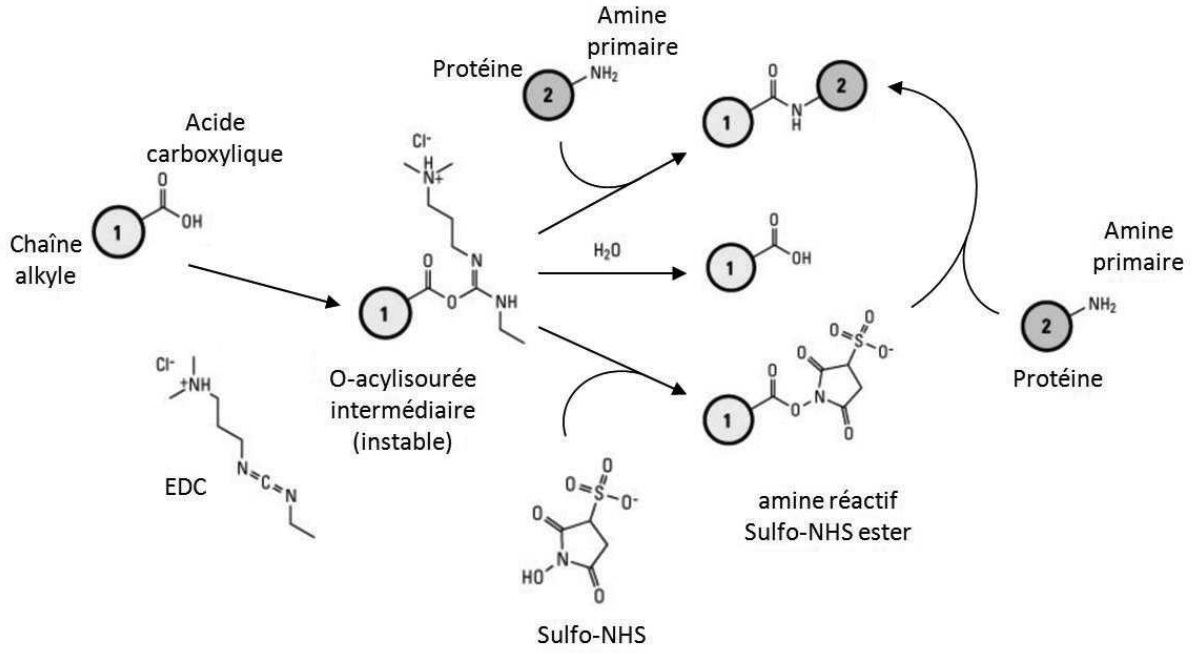


Figure 59 : Principe d'activation des groupements carboxyle par EDC et Sulfo-NHS pour le greffage d'une protéine par amine primaire.

Dans un premier temps, une réaction entre groupements carboxyle est obtenue avec l'EDC (1-ethyl-3-[3-diméthylaminopropyl]carbodiimide) pour former un composé intermédiaire amine "O-acyl iso urée" qui peut directement réagir avec le groupement amine primaire de la protéine pour donner une liaison amide stable. Néanmoins, cette réaction intermédiaire est sensible à l'hydrolyse le rendant instable et présentant une courte durée de vie dans une

solution aqueuse. L'addition de NHS (N-hydroxysuccinimide) ou Sulfo-NHS (N-hydroxysulfosuccinimide) stabilise l'intermédiaire amine-réactif en le transformant en une amine NHS ester ou amine Sulfo-NHS ester, augmentant ainsi l'efficacité de couplage de la réaction EDC pour le couplage de la chaîne alkyle et la protéine.

Dans le cas d'une fonctionnalisation de la surface par une couche de thiol mixte, les fonctions alcool sont supportées par des chaînes d'une longueur moins importante que les fonctions carboxyle ce qui permet d'éviter les effets stériques lors de la fixation du groupement N-chlorosuccinimide et aussi lors de l'immobilisation du biorécepteur.

Le Sulfo-NHS est un sel de sodium de sulfonate de NHS qui présente une plus grande solubilité que le NHS dans l'eau. Le composé -SO_3 du Sulfo-NHS, du fait de ses charges négatives, va augmenter l'attractivité des protéines vers la surface et donc améliorer la préconcentration. Il n'a néanmoins pas d'incidence sur la réactivité d'interaction entre l'ester et la fonction amine de la protéine à greffer car NHS ou Sulfo-NHS offrent la même densité de molécules greffées en condition fluidique [212].

Le résultat de l'activation des chaînes carboxyle par EDC et Sulfo-NHS suivi d'un greffage des protéines par leur groupement amine est présenté en figure 60.

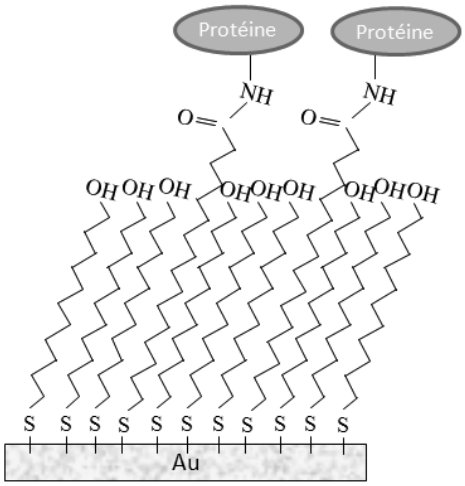


Figure 60 : Schéma de protéines immobilisées à la surface de l'or en utilisant un mélange d'alkylthiol hydroxyle/ carboxyle en monocouche auto-assemblée

Nous verrons par la suite que les chaînes activées n'ayant pas réagi avec une fonction amine primaire d'une protéine seront désactivées par l'éthanolamine.

IV.1.3 Elaboration d'une biopuce pour analyse multiplexée

L'analyse multiplexée d'un échantillon est un point important dans le diagnostic clinique puisqu'il permet le suivi d'un panel de biomarqueurs fiabilisant l'analyse car, comme nous l'avons déjà souligné, un même biomarqueur peut être issu de plusieurs pathologies. Le recoupement de différents marqueurs peut être effectué en immobilisant sur la puce différents biorécepteurs spécifiques à ces marqueurs.

Pour cela, chaque biorécepteur doit être immobilisé sur la puce SPRi indépendamment les uns des autres. Chaque zone présentant une espèce de biorécepteur donnée est appelée « spot ». L'action de créer ces spots quelle que soit la technique utilisée est nommée « spotting ». Leur miniaturisation permet d'accroître le nombre de spots sur une même puce (> 1000), d'y intégrer des contrôles négatifs et de doubler voire tripler les différentes espèces d'anticorps greffées pour assurer la reproductibilité et la fiabilité de résultats. Dans le cas du développement de la plateforme SUPRA-MS, nous utiliserons un seul anticorps (A9H12) de reconnaissance du biomarqueur (LAG-3) car il est crucial de valider l'homogénéité d'une matrice de spots avant de proposer un multiplexage.

IV.1.3.1 Techniques de spotting

Pour réaliser une analyse multiplexée, les spots de biorécepteur doivent être organisés selon un tableau (array) dans la zone de mesure SPRi de l'appareil. Il existe de nombreuses techniques de spotting dont les trois plus populaires sont : le spotting par contact, le spotting sans contact et le spotting fluidique.

Le spotting par contact est une technique standard pour la réalisation de tableau de micro-spots d'oligonucléotide pour le profilage d'expression [[213–215]]. Cette technique consiste à prélever, à l'aide d'une pointe manipulée par un robot, une solution de molécules à immobiliser, et à venir en contact avec la surface pour y déposer la solution. Le spotting contact peut également être assimilé à la technique par tampon appelée micro-printing. Il s'agit de déposer les biorécepteurs sur un tampon en PDMS et de l'appliquer sur la puce pour y transférer les biorécepteurs. Les volumes déposés par technique avec contact sont généralement très faibles (de 0.1 à quelques nanolitres) pour des diamètres de spots entre quelques dizaines à quelques centaines de microns.

Le spotting sans contact consiste à prélever une solution et à la déposer par éjection de gouttes sur la puce. Cette éjection peut être de nature pneumatique ou piézoélectrique. Selon les techniques utilisées, les volumes déposés sont équivalents au spotting par contact, mais il

est possible de déposer, par éjections successives, des volumes plus importants (plusieurs microlitres) et ainsi obtenir différentes tailles de spots.

Le spotting fluidique, récemment introduit dans le domaine des microarrays à protéines, a pour objectif de reproduire des conditions de greffages similaires aux conditions fluidiques des techniques SPR. En effet, cette technique consiste à faire circuler 60 µL de solution de biorécepteurs à la surface de la puce par l'intermédiaire d'une tête en PDMS et de canaux reliés à une pompe [212]. Celle-ci génère des va et vient permettant à la solution de circuler un nombre défini de fois sur la surface de la puce activée pendant des durées différentes (10 à 60 min) et à débit équivalent aux système fluidique SPR tel que Biacore.

IV.1.3.2 Contraintes de spotting

Dans le cas d'un spotting par contact, la qualité de greffage dépendra de nombreux facteurs, notamment la taille de la pointe de spotting, la taille de la cavité (pour les pointes creuses), le temps de contact avec le substrat et les propriétés physiques du substrat [216]. La variabilité d'énergie de surface du substrat, la géométrie de la pointe et l'humidité de l'environnement de spotting ont un rôle important dans le résultat de spotting. De plus, que ce soit en mode contact ou non, la morphologie du spot et son uniformité sont affectées par le mécanisme de séchage des gouttes sur la surface. L'effet de bord dû au séchage est un artéfact très couramment rencontré qui réduit la qualité de la bioreconnaissance et introduit de la variabilité dans l'analyse.

Le spotting par dépôt de goutte devient encore plus difficile lorsqu'il s'agit de solutions de protéines, dont la viscosité et les tensions de surface varient selon leur concentration [217]. Les faibles volumes déposés par spotting contact imposent de disposer des protéines à de fortes concentrations car les temps de contact entre goutte et puce sont très courts avant séchage. Les spotters avec ou sans contact sont en règle générale volumineux et malgré un système qui génère une humidité de la chambre de spotting pouvant monter à 90%, les faibles volumes de solution déposée sont exposés à un séchage en seulement quelques minutes ce qui est trop rapide pour une cinétique de greffage fiable. En effet la durée pendant laquelle les gouttes restent hydratées n'est pas compatible avec le temps de greffage des protéines habituellement utilisé en systèmes fluidiques. A titre d'exemple, l'immobilisation des anticorps sur puce SPR fonctionnalisée par une couche mixte de 16-MHA et 11-MUOH requiert des temps de contacts entre la solution d'anticorps et la puce de plusieurs dizaines de minutes [141].

Dans un premier temps, nous avons élaboré une méthode de spotting sans contact adaptée aux greffages de protéines et adaptée aux contraintes géométriques imposées par les instruments composant la plateforme SUPRA-MS.

Dans un deuxième temps, nous évaluerons si les méthodes mises en œuvre pour l'analyse MS sur puce sont compatibles avec la technique de spotting par voie fluidique afin d'automatiser le greffage, de miniaturiser les spots et ainsi augmenter le caractère multiplexé de l'analyse.

IV.1.3.3 Comportement d'une goutte sur une surface

Lorsqu'une goutte d'analyte est déposée sur une surface et que l'on ne peut empêcher le processus d'évaporation, il se forme soit une tache homogène (dépôt d'analyte homogène), soit un anneau (dépôt non homogène de l'analyte), soit une tache très concentrée en son centre (Figure 61).

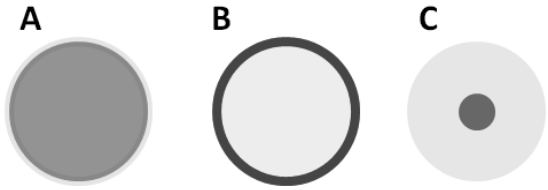


Figure 61 : Représentation schématique de la répartition de particules présentes dans une goutte de solution ayant séché. (A) répartition homogène des particules, (B) effet tache de café, (C) concentration des particules au centre du spot.

La concentration des particules au centre du spot est observée lorsque la goutte réduit de taille par son contour suite à une évaporation en chambre humide qui limite l'évaporation au sommet de la goutte. Le dépôt est alors préférentiellement formé au centre de la goutte (Figure 61C). On observe une répartition homogène de particules et l'effet tache de café (Figure 61A et B) lorsqu'il y a eu accroche de la ligne de contact sur le substrat lors de l'évaporation. Ces répartitions de particules sont dues aux vitesses d'écoulement à l'intérieur d'une goutte lors de son évaporation et sont relativement complexes. De nombreux modèles de simulation existent [[218–220]] mais le principe d'écoulement peut être décrit en deux principaux mécanismes.

Le premier mécanisme est responsable de l'anneau observé après séchage d'une goutte de café par exemple et est appelé effet de bord ou effet tache de café (Figure 61B). La zone la plus foncée (anneau) est formée après évaporation du solvant quand la plupart des particules solides se sont déposées sur le bord de la tache alors que très peu se sont déposées à l'intérieur. Ce phénomène s'explique par le phénomène d'advection résultant de l'évaporation.

Lorsqu'il y a évaporation et accroche de la ligne de contact à la surface, un écoulement induit du centre de la goutte vers la ligne de contact se crée pour compenser le flux évaporé (Figure 62A). Ce flux est plus important au niveau de la ligne de contact, on parle alors de la divergence du flux d'évaporation [218].

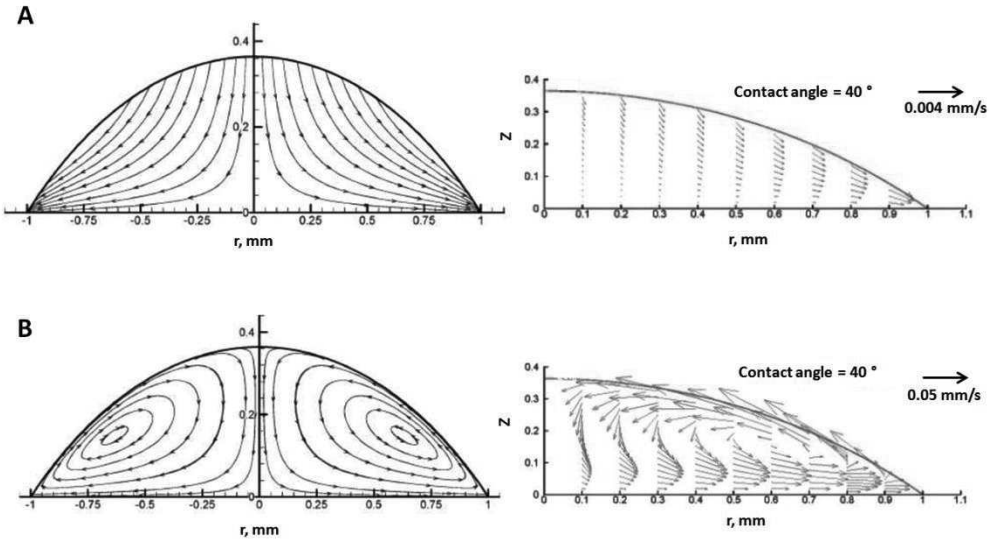


Figure 62 : (A) Phénomène de divergence du flux d'évaporation calculé par un modèle à éléments finis [218]. (B) Phénomène de convection dû à un gradient de température lors de l'évaporation calculé par un modèle à éléments finis [221].

Un deuxième phénomène est à prendre en considération lors de l'évaporation d'une goutte. Il s'agit de l'effet Marangoni qui décrit un écoulement provoqué par un gradient de tension de surface, dû à une variation de composition ou de température dans le liquide [221]. L'évaporation a lieu sur la totalité de la surface de la goutte, la température à la surface diminue, due à la chaleur latente de vaporisation [222]. Ce gradient de température va induire un gradient de tension de surface entre la ligne de contact et le reste de la surface de la goutte, ce qui va créer un mouvement de recirculation, appelé mouvement de convection (Figure 62B).

La répartition des particules, suite à une évaporation, est donc le résultat d'une compétition entre le flux qui tend à concentrer les particules au bord de la goutte et le flux qui tend à les redisperser. Cet équilibre dépend de nombreux paramètres comme la température, l'humidité ambiante, la viscosité du solvant, la concentration des particules en suspension, les propriétés du support mais particulièrement la tension de surface sur laquelle la goutte a été déposée.

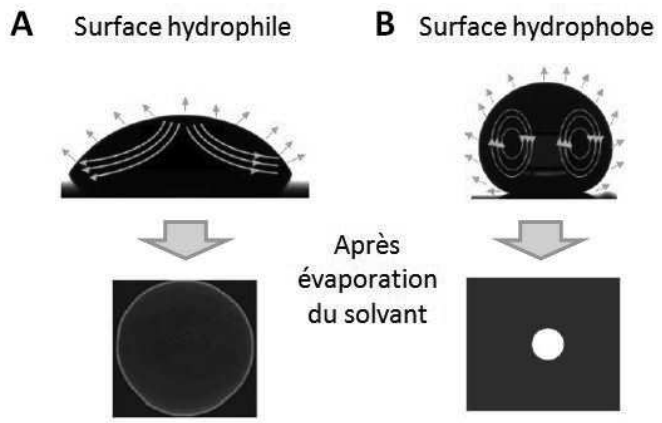


Figure 63 : (A) Séchage d'une goutte sur surface hydrophile, (B) séchage d'une goutte sur surface hydrophobe.

Dans le cas d'une surface hydrophile (angle de contact < 90°), les particules sont concentrées vers les bords de la goutte car le phénomène de divergence des flux est plus important que le phénomène de convection ce qui crée l'effet tache de café (Figure 63A). A contrario, dans le cas d'une surface hydrophobe (angle de contact > 90°), l'effet Marangoni devient prédominant, la vitesse d'évaporation au voisinage de la ligne de contact est très lente car il y a une saturation en vapeur de solvant dans cette zone.

Dans le cas d'un dépôt de solution d'anticorps, l'uniformité de la couche d'anticorps est préférable à une concentration d'anticorps en anneau car le spot uniforme permettra une concentration de l'analyte capturé homogène et reproductible. Néanmoins, les mécanismes d'immobilisation d'anticorps à la surface d'une puce sont plus complexes que le simple dépôt de particules suite au séchage de son solvant, car l'anticorps, une fois en contact avec la surface peut être immobilisé s'il rencontre un site de greffage.

La plupart des spotters avec ou sans contact ont été conçus pour réaliser des puces à ADN avec comme objectif de toujours plus réduire les tailles des spots et ainsi accroître les capacités de multiplexage de l'analyse. Les techniques de microarray ont été possibles car le séchage des gouttes n'a pas d'incidence sur l'intégrité moléculaire des acides nucléiques et n'interfère pas sur la qualité des interactions à base d'ADN. En revanche, les conditions d'immobilisation en configuration microarray par spotting incluant un séchage sont peu adaptées au spotting de protéines et nécessitent des adressages fluidiques [223–225]. Pour contrer le phénomène du séchage, Minunni et al ont utilisé des puits en PDMS afin d'y déposer de plus grands volumes de solution mais sans méthode d'agitation, le greffage est hétérogène et des effets de bord dûs au puits sont visibles [226].

IV.1.3.4 Mouillabilité de la surface

La mouillabilité d'une surface peut être obtenue par mesure de l'angle de contact (AC) pour déterminer le caractère hydrophobe ou hydrophile d'une surface. La mesure se fait en déposant une goutte de 2 µL d'eau dé-ionisée sur la surface à caractériser et en mesurant l'angle formé entre la tangente à la goutte et la surface. L'appareil utilisé pour réaliser les mesures d'angle de goutte à une précision de ± 2° est un goniomètre Tracker.

Une surface d'or exempte de toute contamination présente une surface hydrophile [210]. Lorsque cette surface est exposée à l'air ambiant, des contaminations non organiques rendent la surface plus hydrophobe [206]. Nous avons fait le choix de travailler avec des surfaces ayant été conservées à l'air ambiant, d'une part pour simplifier les étapes de fonctionnalisation en supprimant l'étape de nettoyage à l'UV ozone et d'autre part pour limiter les variabilités que pourrait induire le délai entre le moment où la puce est sortie de l'appareil de UV Ozone et le moment où elle est plongée dans le bain de fonctionnalisation. Les contaminations peuvent être rapides et difficiles à contrôler dans le cas où plusieurs puces sont traitées en même temps. Le nettoyage à l'UV Ozone a été tenté mais n'a présenté aucun avantage manifeste.

Afin de contrôler l'effet du pourcentage de 16-MHA sur la mouillabilité de la surface, plusieurs lots de puces issus de dépôts différents (n=3) sont fonctionnalisés avec des pourcentages de 16-MHA variées. Une puce d'or nue de chaque lot a été utilisée comme référence après immersion dans de l'éthanol pendant le même temps de fonctionnalisation. Le résultat des mesures d'angle de contact est montré dans le tableau ci-dessous.

	Fonctionnalisation de la surface d'or				
	Nu	**0 % 16-MHA**	**3 % 16-MHA**	**10 % 16-MHA**	**100 % 16-MHA**
Angle de contact en °	**83 ± 4**	**16 ± 1**	**22 ± 2**	**30 ± 2**	**20 ± 2**

Tableau 6 : Angles de contact d'une goutte d'eau dé-ionisée mesurée sur substrat d'or nu et fonctionnalisé 0% 16-MHA, 3 % 16-MHA, 10 % 16-MHA, 100 % 16-MHA.

La mesure d'angle de contact (AC) sur la surface d'or nue (83 °) est conforme à ce que l'on peut trouver dans la littérature [206]. Les mesures de mouillabilité des surfaces fonctionnalisées par uniquement du 16-MHA et 11-MUOH donnent des résultats conformes à une surface qui a été fonctionnalisée avec succès (AC < 20°). Si on compare les surfaces mixtes, celle fonctionnalisée par 10 % de 16-MHA est moins hydrophile que la surface à 3 % 16-MHA qui est elle-même moins hydrophile que la couche de fonctionnalisation composée

d'une seule même espèce. Ces valeurs correspondent donc bien à la présence des deux types de molécules sur la surface et non d'un seul. Les groupements carboxyles et alcools sont hydrophiles, mais la différence de longueur entre les molécules 16-MHA (19,1 Å) et les 11-MUOH (14,7 Å) laisse entrevoir des groupements méthylènes caractérisés comme des fonctions hydrophobes. Il est donc tout à fait normal de constater une différence de mouillabilité entre les différents ratios de 16-MHA et 11-MUOH [227].

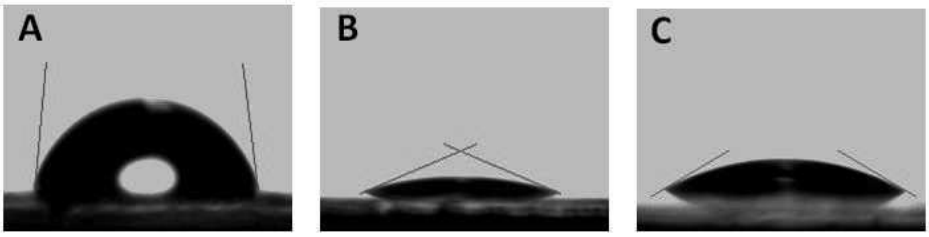


Figure 64 : Angles de contact d'une goutte d'eau ultra pure mesurée sur substrat d'or nu (A) et fonctionnalisé 3% 16-MHA (B) et 10 % 16-MHA (C).

La différence de comportement d'une goutte entre une surface d'or nue et fonctionnalisée montre que le greffage des thiols semble efficace sur une surface d'or n'ayant pas subi de nettoyage drastique avant fonctionnalisation (Figure 64) ce qui valide la première étape de fonctionnalisation.

Nous avons fait le choix de greffer les anticorps par dépôt de goutte de solution d'anticorps. La forme de la goutte aura un impact direct sur les mouvements de fluides à l'intérieur de la goutte. Des tests de spotting et d'interaction vont être effectués pour déterminer laquelle des deux concentrations 3 ou 10 % de 16-MHA semble être la plus efficace pour le greffage: D'une part, les gouttes déposées doivent conserver leur forme tout au long de l'incubation et ne doivent surtout pas sécher ou fusionner les unes avec les autres. D'autre part, l'interaction biologique doit être efficace, c'est à dire avec une grande spécificité pour l'antigène à reconnaître, tout en limitant au maximum les interactions non spécifiques avec les composants du milieu biologique complexe.

Des études par diffraction électronique de monocouche d'alkanethiolates sur l'or (111) ont montré une organisation symétrique et hexagonale des atomes de soufre espacés de 4.97 Å ce qui correspond à une surface occupée par une molécule de 21.4 $Å^2$ [203] soit environ 4.5 molécules par nm^2 [68]. En faisant l'hypothèse que pour une solution de fonctionnalisation à X % de 16-MHA, la surface présente réellement X % de groupement carboxyle réparti de façon homogène sur la puce, on peut alors estimer le nombre de molécules de 16-MHA disponibles pour la fixation d'une protéine à partir de sa projection surfacique (Tableau 7).

Biorécepteur	Surface occupée	3% 16-MHA	10 % 16-MHA
Anticorps **142 x 85 x 38 Å^3 [228]**	Position couchée: 12070 Å^2	16.4	55
	Position debout: 3230 Å^2	4.4	14.6
Nanobodies **Ø 25 x 40 Å^3 [229]**	Position couchée: 1000 Å^2	1.4	4.5
	Position debout: 490 Å^2	0.7	2.2

Tableau 7 : Nombre de sites d'ancrage (16-MHA) disponibles à la surface pour un anticorps et un nanobody en fonction du pourcentage de 16-MHA.

Cette estimation donne un ordre de grandeur du nombre de sites d'accroche disponibles en fonction du pourcentage de 16-MHA de la couche pour le greffage de biorécepteurs naturels tels que les anticorps et les nanobodies dans le cas d'une monocouche dense. En théorie, la fonctionnalisation à 3 % de 16-MHA devrait être suffisante pour une immobilisation quelle que soit l'orientation des anticorps avec entre 4 et 17 sites d'ancrage. Pour les ligands de plus petite taille comme les nanobodies, 3% de 16-MHA peut être limitant pour le greffage car le nombre de chaînes n'est pas suffisant pour assurer une monocouche dense de biorécepteurs. Dans le cadre de la thèse, les deux pourcentages seront évalués pour le greffage en spots.

IV.1.3.5 Développement d'un spotter

L'objectif est de déposer des gouttes de solutions d'anticorps à la surface de la puce à des endroits précis selon un plan défini et de pouvoir maintenir les gouttes hydratées durant plusieurs dizaines de minutes tout en contrôlant visuellement leur état. Le dispositif doit être en mesure de conserver un environnement humide avant et après dépôt des gouttes et de pouvoir maintenir une température constante. De plus, la surface des puces est hydrophile, les flux d'écoulement qui tendent à concentrer les anticorps au niveau de la ligne de contact risquent d'être prépondérants par rapport au phénomène de convection. Les gouttes devront alors être soumises à un système d'agitation.

Le choix du dispositif s'est porté vers un système qui permet de guider le cône effilé d'une micropipette (2.5 µL) par l'intermédiaire d'un guide en plexiglas muni de perçage (Figure 65A). Le positionnement des perçages correspond au pattern de spots que l'on désire effectuer et comprend 16 trous (4 x 4) de 0.55 mm ± 0.02 de diamètre. Pour garantir un dépôt reproductible de la goutte sur la puce, la distance entre l'extrémité du cône et la surface d'or est de 0.8 ± 0.1 mm. En effet cet espace permet, une fois la solution déposée, qu'elle ne soit

plus en contact avec le cône ce qui minimise l'introduction d'air dans la goutte lors de l'éjection du liquide de la micropipette. Cette bulle peut déformer la goutte et provoquer des projections de solutions d'anticorps sur la puce lors de son éclatement.

Afin d'assurer une mise en position précise de la puce par rapport au guide en plexiglas et ses perçages, un logement dans le spotter permet de la bloquer selon deux de ses cotés et de la maintenir par deux ressorts amovibles (Figure 65B). Les coordonnées des gouttes (X,Y) déposées seront programmées dans le logiciel de spectrométrie de masse pour procéder à l'analyse en automatique des spots. De plus, le pattern de spots est localisé dans la partie centrale de la puce analysable par l'appareil SPRi-Plex II.

Le dispositif comprend deux logements de puces afin de procéder à leur spotting en série dans le même environnement (Figure 65C). Le volume de solution déposé varie entre 270 et 300 nL selon le type de solution spottée. A l'air ambiant, la durée de vie d'une goutte est comprise entre 5 et 7 min à 22 °C. Ce temps d'incubation est trop court, comparé aux temps de greffage en fluidique ; de plus, les gouttes de solution d'anticorps ne doivent en aucun cas sécher. C'est pourquoi le dispositif est équipé pour chaque logement, d'une chambre hermétique de 2 cm^3 obtenue lorsque le guide en plexiglas est apposé sur le support et vissé. Un environnement à forte hygrométrie est obtenu dans ces chambres grâce aux réservoirs de part et d'autre de chaque puce, réservoir qui permet d'y déposer du papier absorbant humidifié. Le spotting peut s'effectuer dans une enceinte relativement confinée, comparée aux dimensions des spotteurs commerciaux. Quatre minutes sont nécessaires pour réaliser l'opération de spotting sur une même puce ce qui donne un delta de temps d'incubation négligeable entre la première et la dernière goutte.

La transparence du plexiglas (Figure 65D) permet de contrôler l'opération de spotting et le suivi de la conformation de la goutte durant son incubation. Le résultat du spotting de 16 gouttes est montré en figure 65E. Le dispositif permet de conserver hydratées des gouttes de 300 nL durant plus de 40 min à 22 °C sans adjuvant. En effet le dispositif permet d'éviter l'utilisation de glycérol qui, de par sa viscosité, limite les mouvements browniens dans la goutte.

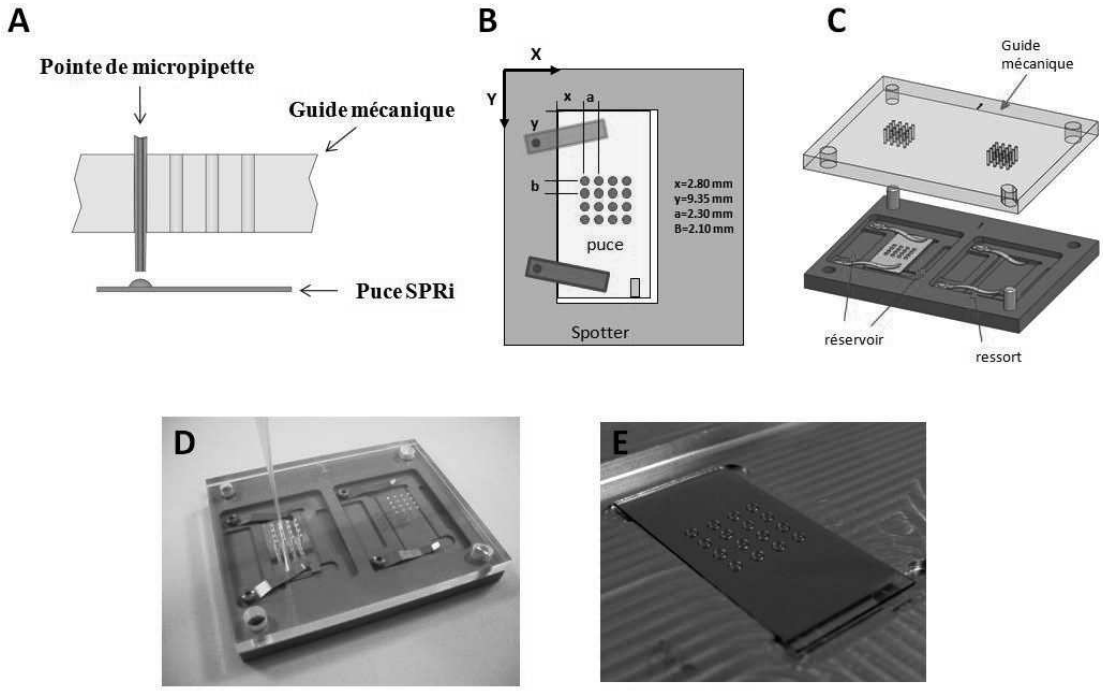


Figure 65 : Développement d'un spotter: (A) principe de dépôt de la solution sur la puce, (B) coordonnées de spotting, (C) conception par CAO du spotter, (D) photo du dispositif, (C) résultat du dépôt de 16 gouttes sur une puce

IV.1.3.6 Préparation de la biopuce et protocole SPRi

Après incubation, les gouttes de solution d'anticorps sont rincées abondamment sous un jet d'eau ultra pure à la pissette. Dans un souci de préservation de la couche d'anticorps, la surface de la puce n'est pas séchée mais rincée par la solution à utiliser pour l'étape suivante. Après greffage des anticorps, il est possible de bloquer la surface (voir paragraphe IV.1.3.13) par immobilisation d'une protéine ne réagissant avec aucune des protéines du milieu biologique à sonder. Dans notre cas, nous utiliserons comme agent bloquant de l'albumine de sérum de rat à 40 µg/mL en tampon acétate à pH adapté pendant 30 min. Le blocage est suivi d'un rinçage à l'eau ultra pure puis les fonctions NHS-ester n'ayant pas eu l'opportunité de se coupler à une amine primaire d'anticorps ou de RSA sont inactivées par le dépôt de 240 µL de solution d'éthanolamine à 1 M (HCl pH 8.5) pendant 30 min. En effet, l'éthanolamine comporte une fonction amine primaire qui va, comme pour une protéine, réagir avec le NHS-ester et le désactiver. Après rinçage de la surface de la puce, celle-ci est montée dans l'appareil SPRi-Plex II par l'intermédiaire d'un prisme gravé (voir chapitre II).

Le tampon de course utilisé pour toutes les expériences d'interaction est du tampon phosphate salin (PBS) à une concentration de 10 mM (NaCl 138 mM, KCl 2,7 mM, pH 7,4 à 25 °C) dans lequel a été rajouté 0.05 % de surfactant Tween 20. Ce surfactant non ionique est

une substance tensioactive, qui a un effet de détergent préventif des interactions non spécifiques d'un milieu complexe sur la surface.

Une première injection d'un détergent non ionique, l'octyl-β-D-glucopyranoside (OG) à 40 mM de 30 s à 50 µL/min permet de nettoyer la surface de la puce d'éventuelles contaminations et des protéines qui ne se seraient pas greffées de façon covalente.

L'antigène peut alors être injecté pour effectuer la capture et mesurer les niveaux de réponse. Les développements s'effectuant sur l'optimisation de greffage de l'anticorps A9H12, nous procéderons à des injections de son antigène, LAG-3, à diverses concentrations et débits.

IV.1.3.7 Choix de la chimie d'activation

Pour l'activation des groupements carboxyle, l'EDC est utilisé suivi d'une réaction d'estérification par NHS ou Sulfo-NHS. Afin de faire un choix, une puce a été fonctionnalisée par 3 % de 16-MHA selon le protocole décrit au paragraphe IV.1.2.3. La surface d'or fonctionnalisée est séparée par une bande de PDMS où sont déposés de part et d'autre une solution d'EDC NHS et d'EDC Sulfo-NHS, tous deux à 50 mM d'EDC et 200 mM de NHS ou sulfo-NHS. Après incubation d'une durée de 30 min, les solutions d'activation sont rincées à l'eau ultra pure et la puce est séchée.

Les solutions d'anticorps d'A9H12 et d'anticorps de contrôle (anti-RSA) sont déposées sur la surface, manuellement, à 200 µg/mL en tampon acétate pH 5.2 suivant le pattern présenté en figure 66. Le temps d'incubation est de 10 minutes en atmosphère humide. Le pH 5.2 d'immobilisation est normalement le plus adapté au greffage d'anticorps sur 3% 16-MHA activé à l'EDC NHS (IV.1.3.8).

A

	Famille	# spot
	Surface / sulfo NHS	1,9
	Surface / NHS	2,10
	Anti RSA / sulfo NHS	3
	Anti RSA / NHS	4
	A9H12 / sulfo NHS	5,7
	A9H12 / NHS	6,8

B

Figure 66 : (A) Espèces spottées manuellement et leur numéro de spot correspondant, (B) image SPR de la puce fonctionnalisée et activée à l'EDC Sulfo-NHS pour la partie de gauche et EDC NHS sur sa partie de droite après greffage.

On peut remarquer un faible contraste entre l'intérieur des spots et la surface. Le contour des spots est néanmoins plus contrasté, comme si le greffage s'était fait préférentiellement aux alentours de la ligne de contact de la goutte ce qui a sans doute été induit par l'effet "tache de café". La mesure de réflectivité est systématiquement restreinte à l'intérieur du spot et ne tient pas compte des effets de bord.

L'injection de LAG-3 à 10 nM pendant 10 min à 20 µL/min suivie d'une injection d'OG, montre une forte interaction sur les bords des spots de forme correspondant sans doute à la zone des gouttes qui avait séché (Figure 67A). On note néanmoins une bonne homogénéité de greffage à l'intérieur des spots. Les taux de capture suivis en temps réel sur le sensorgramme (Figure 67B) montre très nettement que la surface activée par EDC Sulfo-NHS permet une capture plus rapide et deux fois plus importante que la surface activée par EDC NHS sans pour autant augmenter significativement les interactions non spécifiques sur les spots contrôles (anti-RSA) et la surface. La figure 67C confirme la même tendance sur plusieurs puces (n=3). Nous déciderons d'utiliser l'EDC Sulfo-NHS pour l'activation future des puces fonctionnalisées.

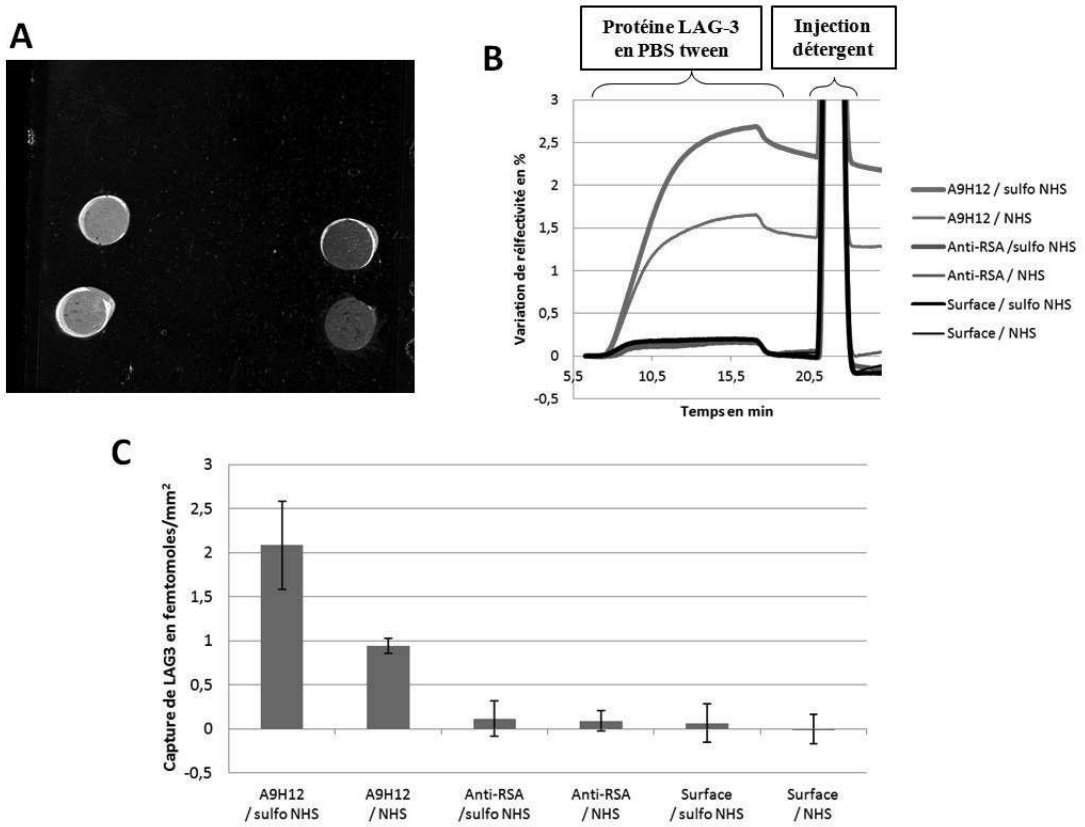


Figure 67 : (A) Image différentielle SPR de la surface de la puce après injection et capture de LAG-3 à 10 nM pendant 10 min à 20 µL/min par A9H12 spotté manuellement. (B) Cinétique de l'interaction avec LAG-3 sur chaque espèce immobilisée suivie d'une injection d'OG. (C) Comparatif (n=3) des taux des captures de LAG-3 en fonction de la technique d'activation par EDC et NHS ou Sulfo-NHS.

IV.1.3.8 Tampon d'immobilisation

La pré-concentration est une étape qui vise à concentrer les protéines à immobiliser au voisinage de la surface en maximisant les forces d'attraction électrostatique entre les molécules réceptrices de la SAM et les protéines. La pré-concentration consiste à charger négativement les chaines 16-MHA par les fonctions ester et à charger positivement la protéine grâce à un tampon d'immobilisation à faible force ionique dont la valeur de pH est comprise entre la valeur du pKA de la monocouche et la valeur de pHi (ou point isoélectrique) de l'anticorps.

Le tampon utilisé pour charger positivement les anticorps est une solution d'acétate de sodium à 10 mM préparée dans de l'eau ultra pure, dont le pH est adapté pour chaque anticorps à immobiliser. En effet le pH d'immobilisation peut être différent suivant les protéines immobilisées. Le pH, qui permettra la plus forte attraction, ne permettra pas forcément le meilleur rendement de greffage car l'interaction peut être purement électrostatique et se rompre au premier lavage [230]. Cette étape de pré-concentration est donc nécessaire et pour cela nous avons utilisé dans un premier temps l'appareil de SPR, Biacore 2000 pour évaluer le pH permettant un greffage rapide des anticorps et dans un second temps le SPRi-Plex II pour évaluer leur capacité de capture. La première étape consiste à injecter l'anticorps à immobiliser à faible concentration (10 µg/mL) pendant un court instant (30 s) dans une plage de pH comprise entre 4 et 6. Nous pouvons ainsi déterminer le pH optimal générant le greffage le plus efficace. L'histogramme en figure 68A montre que le maximum de préconcentration est obtenu pour un pH 4 avec comme valeur 40 RU/s mais seulement 81 RU est réellement immobilisée après rinçage au tampon de course. La valeur de pH qui permet de fournir le maximum de protéines immobilisées en 30 s est le pH 6. On pourra noter que la vitesse de pré-concentration est inférieure aux autres pH avec 23 RU/s.

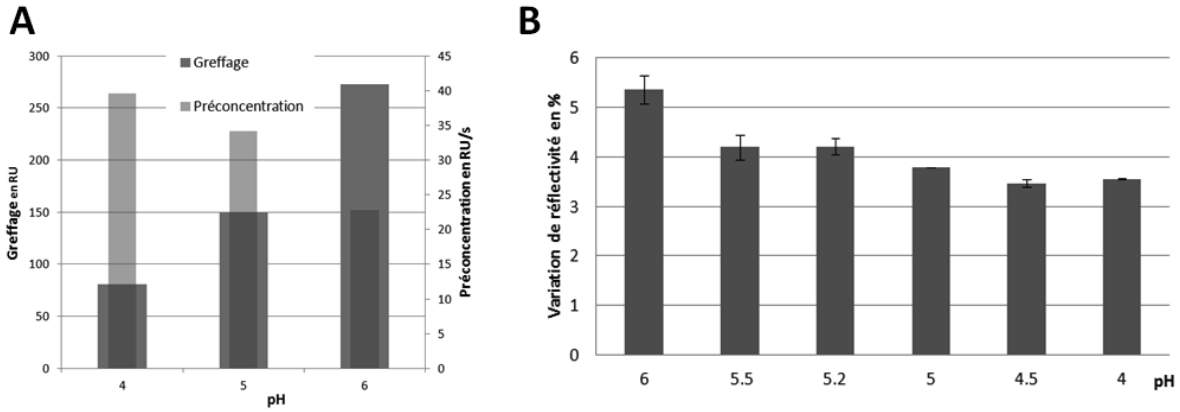


Figure 68 : (A) Greffage à différents pH d'immobilisation d'A9H12 suivi en Biacore 2000. (B) réponses SPRi à une capture de LAG-3 sur spots A9H12 obtenus à différents pH.

Si la meilleure densité de greffage est obtenue pour un pH 6, nous avons vérifié par spotting à différents pH d'A9H12, la qualité de capture de LAG-3 sur puce SPRi. Les résultats en figure 68B montrent clairement que la meilleure capture est obtenue pour un greffage de A9H12 à pH 6 ce qui corrobore le fait que plus la densité en anticorps est élevée (mesurée par Biacore) et meilleurs seront les taux de capture. Au-delà du pH 6, le tampon acétate ne garantit plus le maintien du pH. Des tests ont été menés en solution PBS à pH 7 mais ils n'ont pas permis de greffer efficacement les anticorps.

Les pHs d'immobilisation optimum pour chaque espèce utilisée durant la thèse sont résumés dans le tableau ci-dessous:

	3% 16-MHA	**10 % 16-MHA**
A9H12	6	6
Anti-RSA	4	5.5
RSA	4	5

Tableau 8 : Récapitulatif des pHs d'immobilisation pour chaque espèce en tampon acétate

IV.1.3.9 Activation ultrasonore

S'il est possible d'agir sur différents paramètres de greffage tel que le pH, la température, la concentration, la durée et l'utilisation de systèmes fluidiques pour déplacer les états stationnaires de ces réactions [230], dans le cas du greffage en gouttes, les mouvements fluidiques sont générés uniquement par les phénomènes thermodynamiques illustrés au paragraphe IV.1.3.3. De plus, les ligands sont confinés dans un faible volume limitant ainsi la

quantité de molécules disponibles pour le greffage ce qui réduit son rendement comparé à un système fluidique. Un autre aspect limitatif concerne l'hétérogénéité possible dans le procédé de greffage entre les différents spots d'une même puce ce qui peut affecter la reproductibilité de la réponse de capture [226].

Pour surmonter ces inconvénients, un système d'agitation pourrait être apporté au dispositif. Il existe deux principales technologies pour agiter des gouttes, l'électromouillage par diélectrique (EWOD) [231] et l'énergie de surface par onde acoustique (SAW) [232–234] également utilisée pour favoriser les interactions ligand/analyte sur le biocapteur [235]. Une approche EWOD pour la manipulation de gouttelettes a récemment donné des résultats intéressants pour la biofonctionnalisation de biopuces dans le domaine des puces à ADN [236]. Néanmoins, la complexité de l'appareil combiné avec la nécessité d'une surface hydrophobe de la puce semble être défavorable pour le développement de puces à protéine. Au sein de l'institut FEMTO-ST, une récente étude a été menée sur un dispositif 2D consacré à la réalisation d'un mélangeur acoustique à basse fréquence pour l'optimisation de greffage d'anticorps en spots [237]. Ce dispositif consiste à spotter les gouttes sur l'actionneur acoustique puis à appliquer la puce SPRi fonctionnalisée au contact des gouttes les confinant. Cette approche a montré l'augmentation de la vitesse de transfert d'anticorps à la surface de la puce améliorant ainsi la quantité de protéines greffées d'un facteur deux par rapport à une fluidique discrète passive. Néanmoins, le volume de 400 nL par goutte permet une incubation des anticorps de seulement 15 min car au-delà, il y a risque de séchage dû à l'absence d'environnement humide. De plus, le spotting de 5 spots est insuffisant pour une analyse multiplexée.

L'activation acoustique est commercialisée pour l'agitation de microplaque afin d'améliorer le mélange entre deux composés et augmenter ainsi les performances d'interactions biologiques dans le cas d'immunoassays par exemple [238]. Nous avons fait le choix de transposer cette méthode pour générer des mouvements fluidiques à l'intérieur des gouttes. Afin de générer des vibrations à la puce qui les transmettra aux gouttes, nous avons utilisé des ondes ultrasonores générées par un bac à ultrasons. Après spotting, le spotter est placé dans un bécher lui-même placé dans un bac à ultrasons (Elma) réglé à une fréquence de 37 kHz et à 30 % de sa puissance maximale (Figure 69).

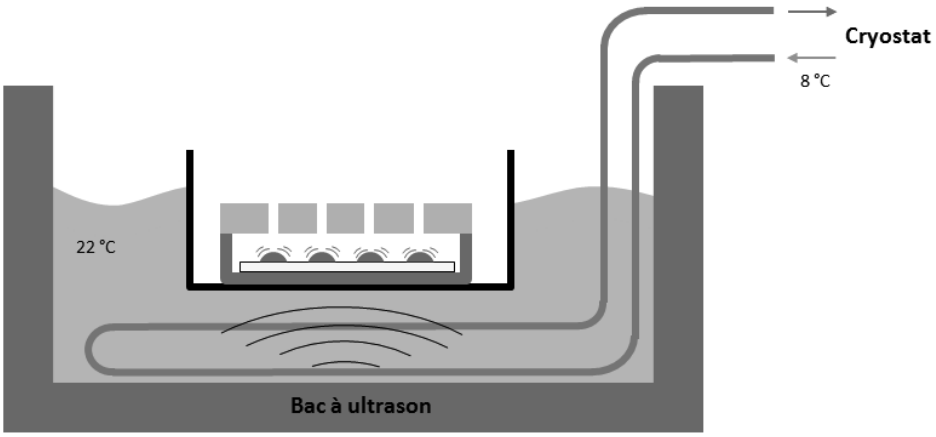


Figure 69 : Incubation des gouttes de solution d'anticorps dans le spotter et agitation ultrasonore.

Les ultrasons produits génèrent une élévation de la température de l'eau et donc de la puce. Pour maintenir une température équivalente à la température ambiante de la pièce, un système de refroidissement a été adapté au bac à ultrasons. Il est composé d'un serpentin en acier inoxydable plongé dans le bac branché sur un cryostat. Après optimisation, une température de 8 °C en sortie du cryostat permet de maintenir une température de l'eau du bac à 22 °C pendant toute la durée de l'incubation.

Il est difficile d'évaluer l'impact des ondes produites par le bac sur les mouvements fluidiques internes aux gouttes. Pour cela, nous avons procédé à des tests expérimentaux pour évaluer l'intérêt de cette technique en comparant les réponses en capture d'antigènes sur spots d'anticorps ayant subis ou non une activation ultrasonore pour un même temps d'incubation (10 min).

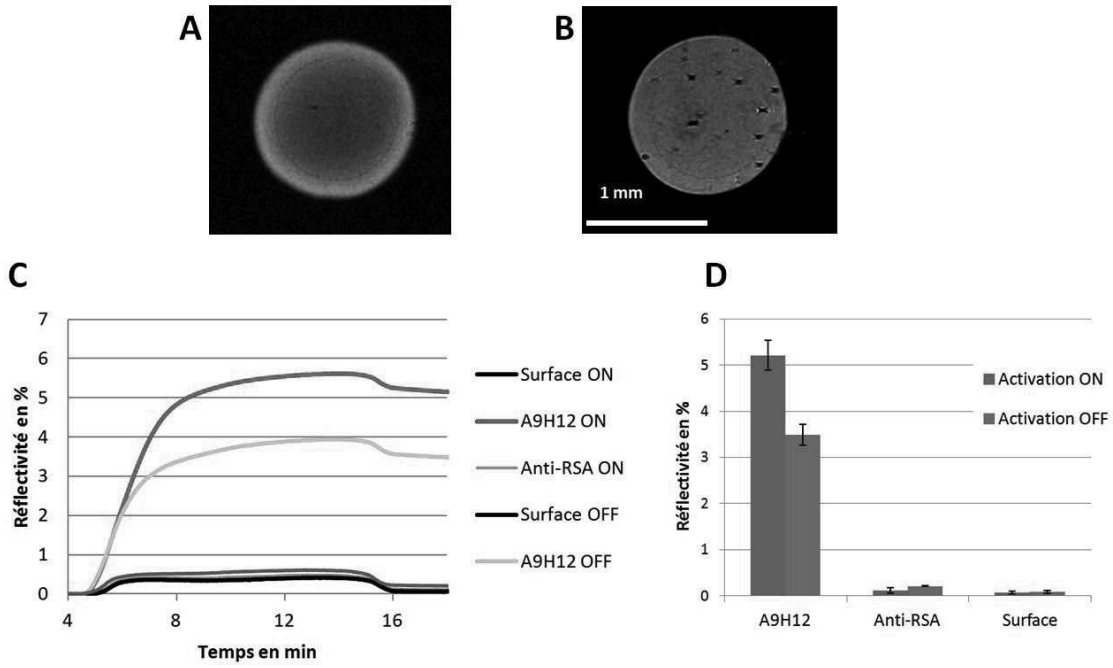


Figure 70 : Homogénéité de capture d'un spot A9H12 ; sans (A) et avec agitation ultrasonore (B). (C) Sensorgramme montrant la cinétique de capture de LAG-3 sur une puce dont le greffage s'est déroulé sous activation ultrasonore (noté « ON ») et une puce dont le greffage s'est déroulé sans activation (noté « OFF »). (B) Comparatif des taux de capture de LAG-3 entre spots ayant subi ou non une agitation.

L'image en figure 70A du spot sans agitation montre une hétérogénéité de capture due à un greffage préférentiel des anticorps au voisinage des bords de la goutte. Ce ne sont néanmoins pas les mêmes types d'effet de bords qu'en figure 67A où il s'agissait de zone qui avait séché. Le spot ayant subi une agitation lors du greffage répond de façon homogène sur la totalité du spot (Figure 70B). Les ROIs représentées par un cercle rouge sont disposées selon le pattern prédéfini par le spotter, c'est-à-dire que pour 16 spots, il y a 16 ROIs de diamètre (1 mm) légèrement inférieur au spot d'anticorps. Les ROIs macroscopiques sont centrées par rapport au spot et permettent la mesure SPR dans la même zone qui sera analysée ultérieurement par spectrométrie de masse. Des ROIs pourront être sélectionnées en dehors des spots pour mesurer les interactions non spécifiques sur la surface par exemple, on notera alors ces valeurs de réflectivité « surface » dans le sensorgramme et l'histogramme figure 70C et D.

La cinétique en figure 70C montre la capture de LAG-3 sur spots A9H12 qui ont été soumis ou non à une activation ultrasonore. Les spots agités ont une réponse 1.5 fois plus élevée que les spots ayant incubés en statique (Figure 71D). Cette différence peut s'expliquer par l'homogénéité de greffage obtenue par l'agitation des gouttes lors de l'immobilisation que l'on peut observer par imagerie SPR après capture de l'antigène (Figure 71B). L'activation

ultrasonore a montré son efficacité et sera utilisée systématiquement pour les optimisations des autres paramètres de greffages.

IV.1.3.10 Durée d'immobilisation

La durée d'incubation des anticorps est également un élément clef pour un greffage performant. Différents temps d'incubation (10, 20, 30, 40 min) ont été testés pour une même concentration d'anticorps d'A9H12 (200 µg/mL) sous agitation ultrasonore. Au-delà, de 40 minutes, les gouttes de tampon d'acétate ont un fort risque de séchage. Après interaction avec LAG-3 en SPRi jusqu'à état d'équilibre de capture, les taux de capture indiquent que les temps d'incubation de 30 et 40 min sont les conditions préférables aux conditions 10 et 20 min pour obtenir une forte capture de 11 % de VR soit d'environ 9 femtomoles/mm^2 (Figure 71). Il a été montré par voie fluidique en SPR, que le ratio entre le nombre d'anticorps greffés de A9H12 et le nombre de molécules de LAG-3 capturées était de un pour un à l'état d'équilibre pour une densité d'anticorps d'environ 7 femtomoles/mm^2. On considère donc que pour 9 femtomoles/mm^2 de LAG-3 capturées, il a été greffé au moins 9 femtomoles/mm^2 d'anticorps. On obtient alors des taux d'immobilisation d'A9H12 par spotting similaire au greffage par voie fluidique en SPR [141].

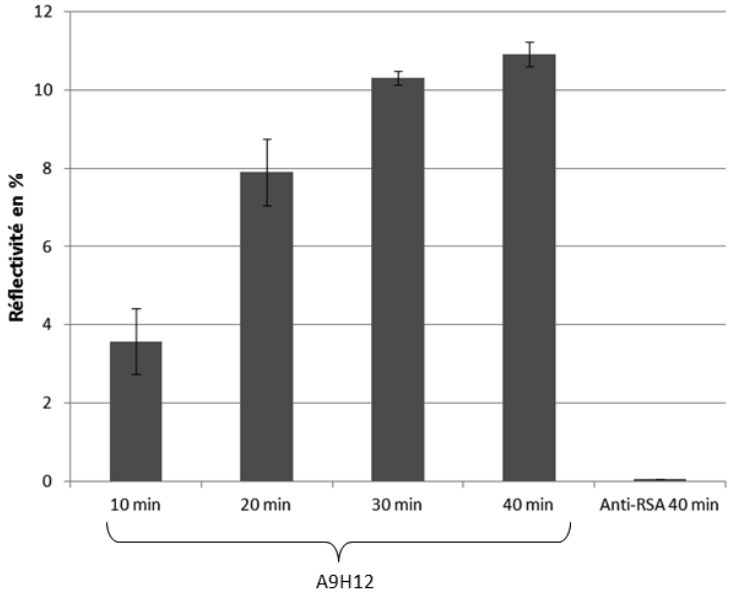


Figure 71 : Taux de capture de LAG-3 en fonction du temps d'incubation d'A9H12

IV.1.3.11 Concentration en anticorps pour immobilisation

La concentration en anticorps d'une solution mère peut parfois être un facteur limitant dans la préparation des solutions à spotter. En effet, sa dilution d'au moins au quart par la solution tampon est nécessaire pour garantir un pH adapté à l'immobilisation. La

concentration d'A9H12 est de 4.9 mg/mL, il peut donc être spotté à forte concentration, néanmoins tous les anticorps n'ont pas une telle concentration. Le but est de déterminer la concentration optimale pour une interaction efficace. A9H12 a été spotté à différentes concentrations sur une puce. En dessous de 150 µg/mL, la forme et la texture des spots changent rapidement mais au-delà, les taux de capture sont similaires et seules les traces de rinçage appelées "smears" sont davantage présentes. Les "smears" proviennent de l'excédent d'anticorps dans la goutte qui se greffe à la surface de la puce lors du rinçage des gouttes après incubation. Nous verrons par la suite que les "smears" ne présentent pas de contraintes particulières mais qu'elles peuvent être évitées par l'utilisation d'une technique de rinçage adaptée.

En dessous d'une certaine concentration en anticorps (< 100 µg/mL), le spot obtenu n'est plus homogène malgré une agitation ultrasonore comme indiqué en figure 72. Comme la concentration en molécules semble jouer un rôle important sur l'efficacité de greffage, nous avons cherché à spotter A9H12 à différentes concentrations mais en rajoutant dans la goutte le complément en nombres de molécules de RSA pour obtenir la même molarité que pour un spotting à 200 µg/mL d'anticorps pur soit 1.3 µM. Nous préparons alors des spots à 1.3 µM dont x µM d'A9H12 et 1.3-x µM de RSA, en tampon acétate pH 6 afin de privilégier la préconcentration d'A9H12 plutôt que de la RSA. Un schéma de spotting représenté en figure 72A et la capture qui en résulte en figure 72B montrent clairement un gain en homogénéité des spots contenant de la RSA pour une même concentration en anticorps.

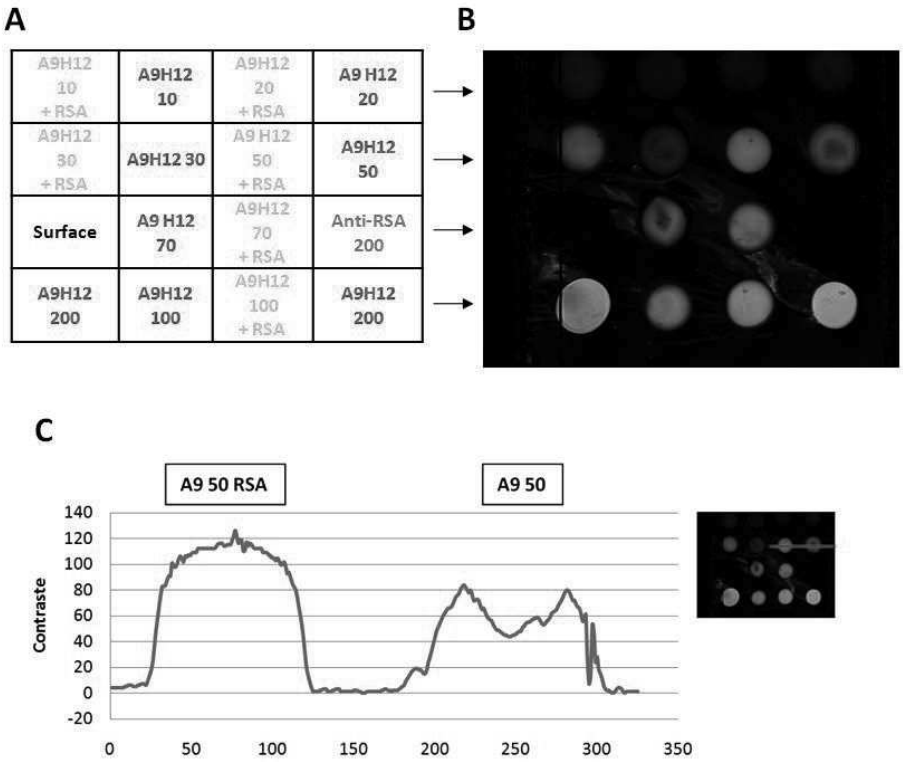


Figure 72 : Influence de la concentration en anticorps lors du spotting. (A) schéma de spotting (espèce / concentration de spotting en µg/mL / présence ou non de RSA), (B) image différentielle après capture, (C) profil de capture de deux spots de même concentration d'A9H12 (50 µg/mL) avec ou sans RSA après capture de LAG-3.

En plus d'homogénéiser le greffage d'A9H12, l'ajout de RSA permet, au vu du profil de capture de la figure 72C, d'augmenter la densité globale en anticorps pour une même concentration ce qui contribue à une augmentation de la capture d'environ 40 %. Le gain n'a, par contre, pas été démontré au-delà d'une concentration de 200 µg/mL en anticorps.

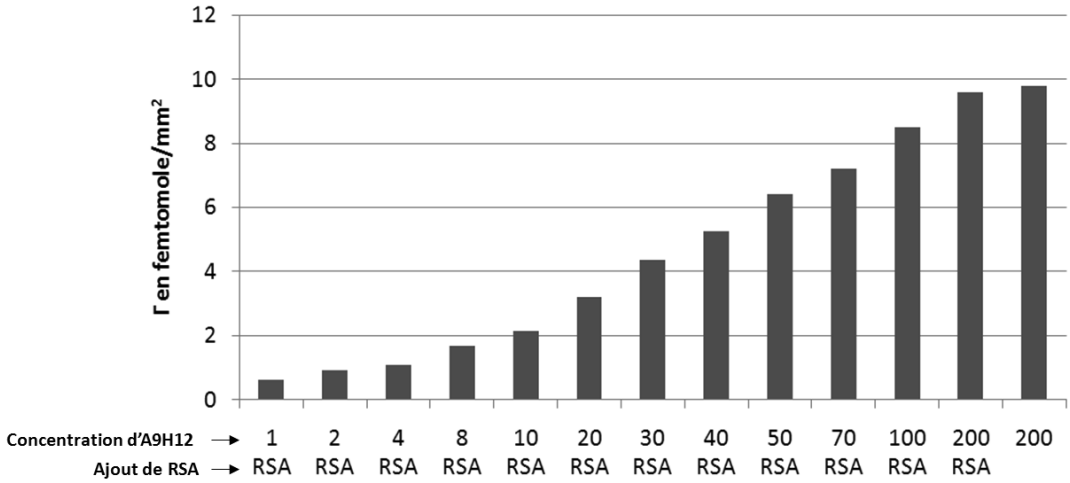


Figure 73 : Taux de capture en fonction de la concentration d'A9H12 (en µg/mL) mélangé à la RSA pour une molarité totale de 1.3 µM

La figure 73 montre la réponse de capture de LAG-3 en fonction de la concentration d'A9H12. Celui-ci étant assez concentré et comme nous disposons d'un stock important d'aliquotes d'anticorps, nous choisirons la concentration la plus élevée d'anticorps (200 µg/mL) qui ne nécessite pas l'addition de RSA. Néanmoins, il est intéressant pour les développements et les applications futures d'avoir une alternative pour le spotting à faible concentration dans la perspective d'homogénéiser les spots d'analyse.

Si on considère le diamètre d'un spot d'environ 1.4 mm et que le taux de recouvrement maximal atteint en spotting est de 10 femtomoles/mm^2, cela signifie que pour une concentration de 200 µg/mL, il y a 25 fois plus d'anticorps dans une goutte de 300 nL que ce que la surface est capable d'immobiliser. Ce chiffre est largement acceptable au vu du faible volume que nécessite un spot (300 nL à 200 µg/mL) et comparé au volume nécessaire à une immobilisation par voie fluidique (60 µL à 40 µg/mL).

IV.1.3.12 Rinçage des spots

L'excédent d'anticorps n'ayant pas été greffé, peut, lors du rinçage des gouttes, s'immobiliser à la surface de la puce. Nous n'avons jamais observé que l'immobilisation non contrôlée avait un impact négatif sur les spots environnants. Nous interprétons ceci car ces surfaces ayant déjà réagi lors du spotting, leur capacité de greffage est extrêmement limitée. Quatre méthodes ont été testées pour pallier à cet artefact de spotting qui peut engendrer la réduction du rapport signal sur bruit quand on mesure les interactions sur la surface (Figure 74).

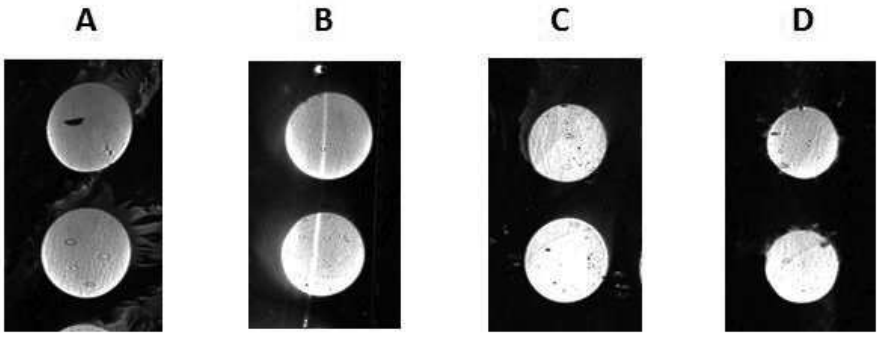


Figure 74 : Images SPR d'interaction avec LAG-3 de spots ayant été rincés par différentes techniques; (A) Rinçage sous jet d'eau ultra pure. (B) Rinçage par immersion de la puce dans un bain d'eau, (C) rinçage par de la glycine NaOH pH 10 puis sous jet d'eau. (C) Spray de RSA à 250 µg/mL puis rinçage sous jet d'eau.

Le rinçage sous jet d'eau ultra pure provoque des traces très marquées (Figure 74A). L'immersion dans un bain d'eau a tendance à créer des "smears" plus diffus figure 74B). L'utilisation de glycine NaOH à pH 10 limite le mécanisme de greffage en dehors des spots

mais le flux de la solution de rinçage tend toujours à pousser la goutte d'anticorps sur la surface (Figure 74C). La pulvérisation de fines gouttelettes de RSA dans son tampon d'immobilisation a permis de tapisser la surface en dehors des spots d'anticorps avant même le rinçage des gouttes. Ainsi, les "smears" sont moins intenses et moins étendus qu'avec toutes les autres techniques (Figure 74D). Cette dernière technique semble prometteuse mais l'ensemble des nos analyses se faisant dans les spots, conjugué à une simplification du protocole de fabrication de la biopuce, nous utiliserons le rinçage sous jet d'eau.

IV.1.3.13 Blocage de la surface

L'albumine de sérum est utilisée en routine dans le cadre des tests ELISA pour passiver les surfaces après adsorption des anticorps dans les puits des microplaques. Elle est également utilisée dans le domaine des microarrays pour limiter le non spécifique sur la surface, à l'injection des échantillons complexes [[239]].

Nous avons fait le choix d'intégrer cette étape de blocage à la préparation des puces SPRi. Elle consiste à incuber pendant 30 min après greffage des anticorps et rinçage, une goutte de solution de RSA à 40 µg/mL préparée en tampon acétate pH 5.5 (pour une fonctionnalisation à 10 % de 16-MHA). La puce est ensuite rincée à l'eau ultra pure et désactivée à l'éthanolamine. Cette étape de blocage se déroule habituellement à la paillasse, mais en la réalisant dans l'appareil de SPRi (Figure 74), il peut être mesuré 22.4 femtomoles/mm^2 de RSA greffées sur la surface hors spot, tandis qu'il y a seulement 0.7 femtomole/mm^2 greffée à l'intérieur des spots. Comme la RSA est une plus petite protéine que les anticorps, elle peut combler plus facilement d'éventuels défauts dans la SAM et réagit avec les sites activés encore disponibles.

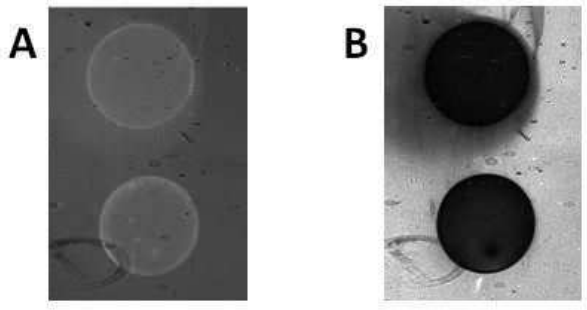


Figure 75 : (A) image SPR de deux spots A9H12 avant blocage à la RSA. (B) Image différentielle obtenue après blocage à la RSA à 40 µg/mL suivie en temps réel par SPRi

La RSA greffée en dehors des spots permet de créer une biofonctionnalisation de surface limitant l'adsorption des protéines du milieu complexe avec la SAM. A l'injection de plasma

humain on relèvera 12 pg/mm^2 de non spécifique sur une surface bloquée à la RSA soit trois fois moins que sur une surface non bloquée (35 pg/mm^2).

IV.1.3.14 Architecture finale de la biopuce

Pour conclure, l'architecture finale de la biopuce est résumée en figure 76. Après fonctionnalisation de l'or par une monocouche auto assemblée de 10 % (mol/mol) de 16-MHA et 90 % de 11-MUOH, les groupements carboxyles sont activés par de l'EDC Sulfo-NHS. Le dépôt de gouttes de 300 nL de solution d'anticorps par spotter permet la réalisation d'un pattern de macro-array composé de 16 spots de diamètre compris entre 1.2 et 1.4 mm. Après incubation et rinçage des spots, de la RSA est greffée essentiellement en dehors des spots et minoritairement à l'intérieur des spots d'anticorps. La dernière étape de la préparation de la puce est la désactivation par de l'éthanolamine des chaînes 16-MHA activées à l'EDC Sulfo-NHS. Après rinçage, la puce est immédiatement montée dans le SPRi-Plex II afin de maintenir une couche d'hydratation.

Les performances de l'immunopuce peuvent être évaluées par la capture de cibles antigéniques et application des techniques développées au chapitre III pour l'analyse par spectrométrie de masse des entités capturées.

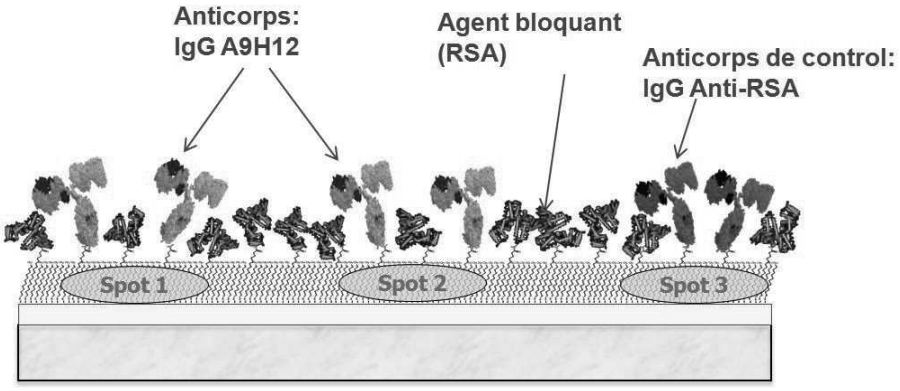


Figure 76 : Architecture finale de la biopuce. Les spots d'A9H12 et Anti-RSA sont disposés selon un pattern adapté aux expériences à réaliser.

IV.2. Résultats en milieu idéal

IV.2.1 Cinétique

L'affinité des anticorps correspond à la force d'interaction d'un site anticorps avec un épitope de l'antigène. Cette interaction peut être représentée par l'équation suivante:

$$A + B \underset{k_d}{\overset{k_a}{\rightleftharpoons}} AB \qquad \text{(IV.2)}$$

Avec, A l'antigène dans la solution, B le ligand fixé à la surface et AB le complexe résultant de l'interaction entre le ligand et l'analyte, directement mesuré par la variation de réflectivité. La formation du complexe entre deux entités est réversible et se caractérise par deux constantes cinétiques:

- K_a exprimée en $M^{-1}s^{-1}$ est la constante de vitesse de formation du complexe calculée à partir de la zone d'association de la courbe de capture.

- K_d exprimée en s^{-1} est la constante de vitesse de dissociation calculée à partir de la zone de dissociation visualisable après injection de l'antigène et retour en tampon de course.

Le rapport de ces deux constantes de vitesse (K_a/K_d) ou (K_d/K_a) fournit respectivement la constante d'association notée K_A (en M^{-1}) et la constante de dissociation K_D (en M) du complexe.

Ces valeurs K_A et K_D qui caractérisent la force de liaison entre deux entités peuvent être déterminées empiriquement en utilisant la méthode de Langmuir de type 1:1 utilisée par le logiciel ScrubberGen d'HORIBA-Scientific. Il consiste à injecter l'analyte pendant un court instant (3 min à 50 µL/min) suivi de 12 min de dissociation en figure 77A. Différentes concentrations comprises entre 0.1*K_D et 10*K_D sont injectées entre coupées de régénération.

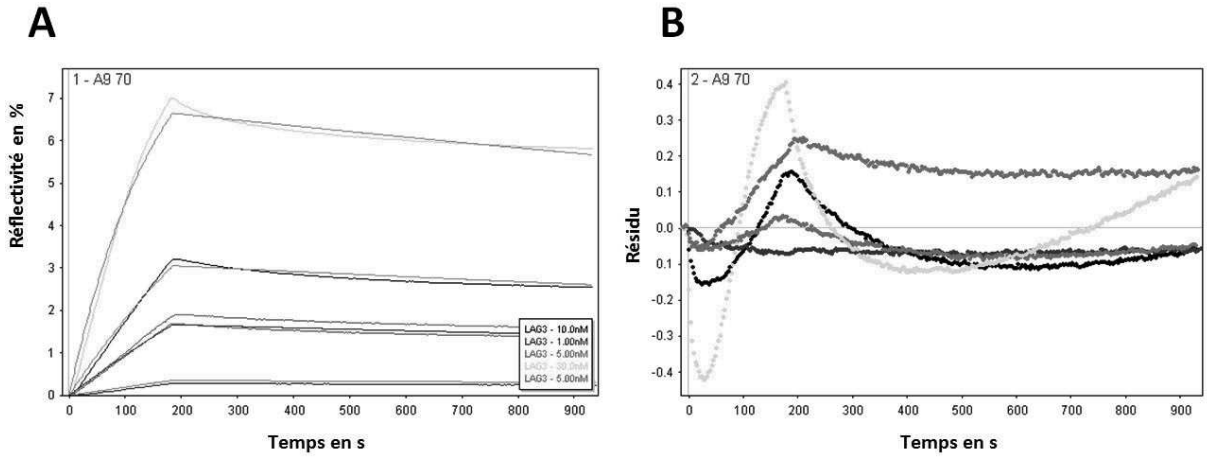


Figure 77 : (A) Injections successives de LAG-3 à 1, 5, 10 et 30 nM et calcul des constantes d'association et de dissociation par le logiciel ScubberGen. (B) Erreur de fit en valeur de réflectivité et courbe obtenue par intégration analytique.

Ainsi les valeurs des vitesses d'association et de dissociation sont respectivement 3.1 x 10^5 ± 2 $M^{-1}s^{-1}$ et 2.26 x 10^{-4} ± 0.26 s^{-1}. Le résidu affiché en figure 77B est la différence entre la mesure réelle et le fit calculé. Ce résidu est acceptable pour calculer la constante de dissociation K_D qui est de 1.35 ± 0.9 x 10^{-9} M. Cette valeur est conforme à la valeur que l'on peut trouver dans la littérature pour les anticorps particulièrement affin [228] et s'avère très proche des valeurs de K_D d'A9H12 mesurées par greffage par voie fluidique évaluées à 5 x 10^{-10} M [240] ou encore 4 x 10^{-9} M [237].

Les différentes méthodes de greffage donnent des résultats similaires, cela signifie que le spotting en macroarray ne perturbe pas l'affinité de capture entre A9H12 et son antigène LAG-3.

IV.2.2 Gamme dynamique du biocapteur

Afin d'évaluer les performances du biocapteur, il est nécessaire d'établir sa gamme dynamique. Pour cela, l'état d'équilibre doit être atteint pour chaque concentration d'analyte injecté. C'est à dire que l'injection sera stoppée lorsque les vitesses d'association et de dissociation se compenseront. Cet état d'équilibre peut être très rapidement atteint selon la concentration injectée. De plus, l'injection doit être réalisée à débit élevé (200 µL/min) pour que les cinétiques d'interaction ne soient pas limitées par le phénomène de transfert de masse [134]. Cependant, une interaction jusqu'à l'état d'équilibre peut prendre jusqu'à 15 min, cela voudrait dire qu'il faille disposer de 3 mL de solution d'antigène et d'une boucle d'injection adaptée. Pour pallier à cet écueil de cette technique beaucoup trop consommatrice en échantillon, une procédure d'injection par recirculation a été élaborée (Figure 78). Cette procédure consiste à faire circuler l'échantillon plusieurs fois à la surface de la puce. 400 µL suffisent pour cette procédure, soit 100 µL de plus qu'une injection de 200 µL classique (200 µL injecté + 100 µL de volume mort). Le débit est fixé à 200 µL/min pour l'injection de l'échantillon (repère 1). La position des tubulures est modifiée afin de créer un circuit fermé entre la cuve et la pompe. Ainsi, l'échantillon peut circuler pendant un temps infini. L'arrêt de la recirculation de l'échantillon consiste à replacer les tuyaux à leurs positions initiales pour faire circuler le tampon de course sur la puce et la rincer repère 2. Deux injections de glycine pH 2 permettent de régénérer la surface en dissociant les complexes anticorps - antigènes (repère 3). La régénération est en moyenne efficace à 96 % selon les quantités capturées ce qui permet de procéder à une dizaine d'injections de LAG-3 à différentes concentrations.

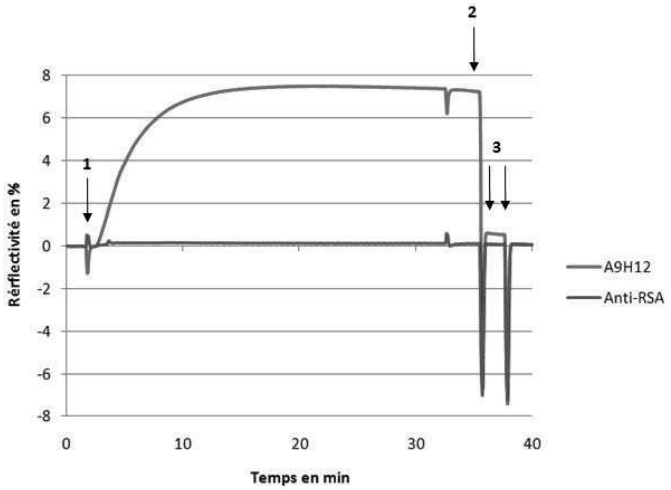


Figure 78 : Sensorgramme d'une injection par recirculation de LAG-3 à 10 nM à 200 µL/min

L'élaboration d'une gamme dynamique par injections successives de LAG-3 à différentes concentrations est obtenue en figure 79. Cette gamme dynamique est particulièrement importante lorsqu'il s'agit de quantifier le biomarqueur dans l'échantillon. Deux points d'inflexion sont observés, l'un aux alentours de 1 nM et le deuxième vers 15 nM avec comme réponse linéaire entre ces deux points $\Delta R = 2.9527\ln(C) + 0.4658$. La zone comprise entre 0.1 et 1 nM est également caractérisée par une réponse linéaire tandis qu'au-delà de 15 nM, la saturation du ligand par l'analyte est proche. L'ajout d'une plus forte concentration n'engendre plus de variation du signal au-delà de 100 nM.

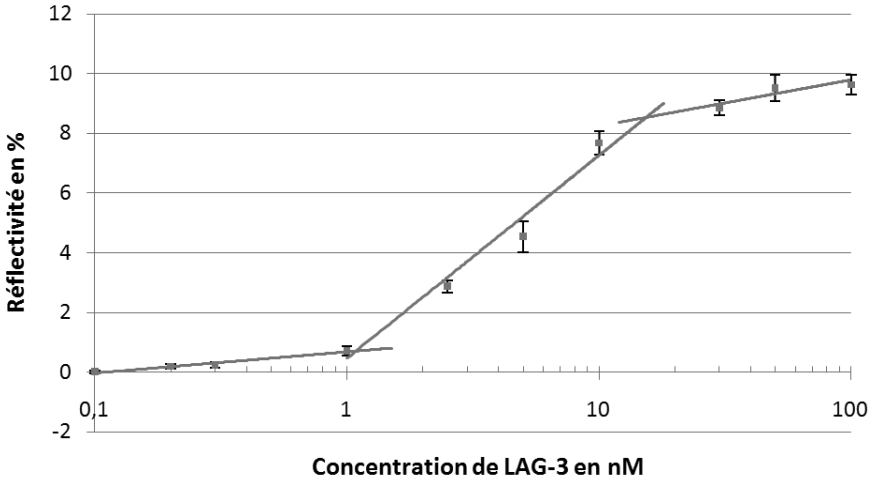


Figure 79 : Gamme dynamique du biocapteur dans une gamme de 0.1 à 100 nM

IV.2.3 Limite de détection de LAG-3 en PBS

La limite de détection d'analyte va dépendre de nombreux facteurs qui sont, principalement, l'affinité de l'anticorps pour l'antigène (K_D = 1.3 nM), le bruit de l'appareil (ici

0.02 %) et les variabilités inhérentes à la sensibilité SPR, à l'efficacité de capture, aux préparations des solutions etc.

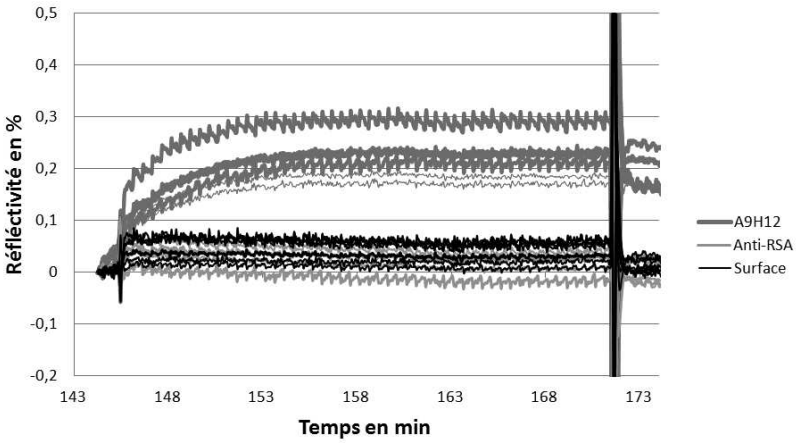


Figure 80 : Réponse des spots à une injection de LAG-3 à 0.2 nM (30 ng/mL) en recirculation (200µL/min)

Nous avons déterminé que la limite de détection pour un taux de capture induisant une variation de réflectivité d'environ 0.2 % ± 0.06 correspond à une concentration en LAG-3 de 0.2 nM soit 30 ng/mL (Figure 80). Cette valeur est cohérente et réaliste comparée aux limites de détection de protéines en milieu idéal sans méthode d'amplification du signal [[241]].

IV.2.4 Analyse MS et MS-MS

Avant de tester la plateforme SUPRA-MS dans des milieux complexes, nous devons valider les prétraitements en vue de l'analyse MS et MS-MS sur une puce ayant capturé la protéine LAG-3 en milieu idéal.

IV.2.4.1 Capture de LAG-3 en tampon idéal pour analyse MS

LAG-3 est injectée à 20 nM en tampon PBS Tween 0.05% en recirculation à un débit de 200 µL/min pendant 30 min conduisant à l'état d'équilibre de l'interaction biomoléculaire (Figure 81). Une injection de détergent d'OG permet d'évaluer la stabilité et la spécificité de l'interaction Ag/Ac. L'antigène capturé induit une variation de réflectivité sur six spots A9H12 de 6 ± 1% (2σ) de RV, alors que nous ne constatons que 0.65 ± 0.18% de RV sur les spots anti-RSA et 0.31 ± 0.561% sur la surface conduisant à un rapport signal sur bruit de 9.5 et une bonne homogénéité de réponse à l'intérieur des spots.

De l'eau ultra pure est injectée à 50 µL/min en fin d'expériences pour éliminer les sels du tampon de course de la surface de la puce. La pompe est stoppée en cours d'injection pour éviter le retour du PBS sur la puce. La puce est retirée du SPRi-Plex II et sa surface est séchée. La puce est conservée à température ambiante dans une boite hermétique à la poussière en attente de l'analyse MS.

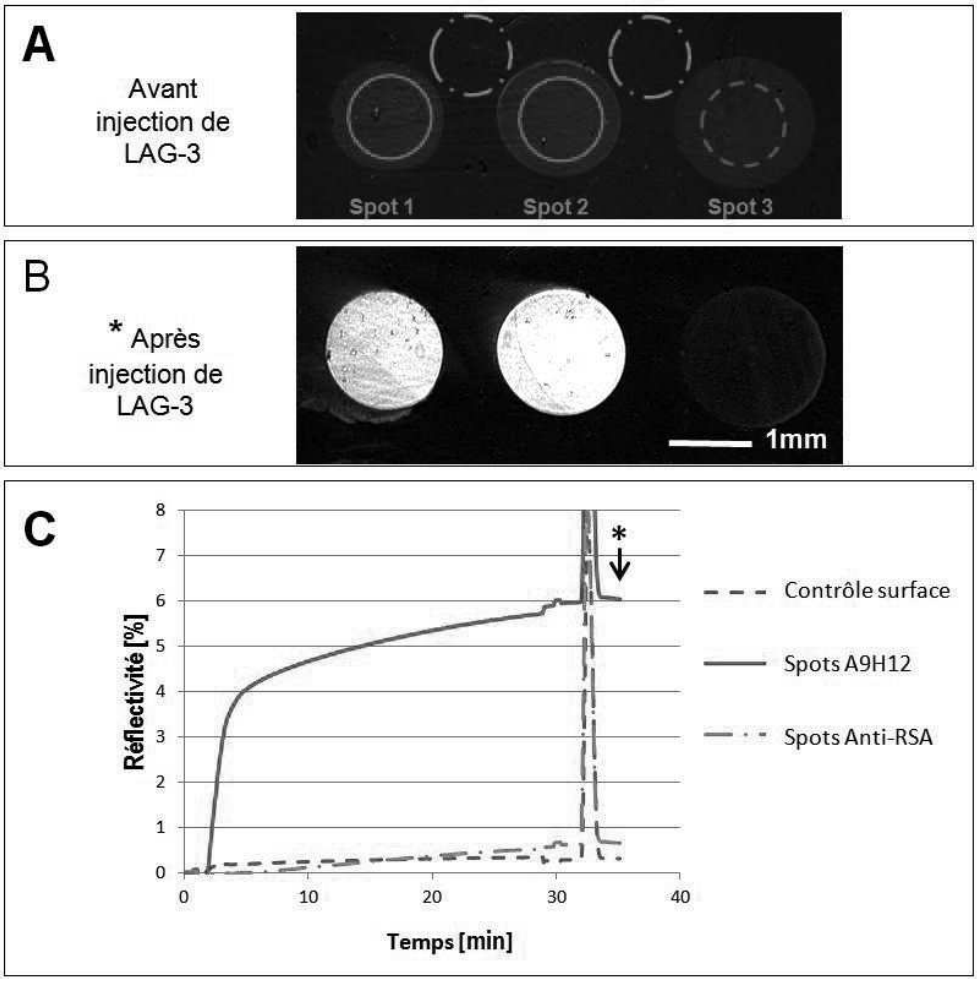


Figure 81 : (A) Image SPR de la biopuce et définition des ROIs avant injection de LAG-3 des spots: IgGs A9H12 (rouge), IgGs anti-RSA (bleu), contrôle de la surface (vert). (B) Image différentielle à l'instant t (indiqué par un *astérix* sur le sensorgramme (C)) après capture de LAG-3 injectée à 20 nM en tampon de course et injection d'OG. (C) Sensorgramme enregistrée durant l'injection de LAG-3 suivie d'une injection d'octyle glucopyranoside (OG) (moyenne de 6 spots d'A9H12, 3 spots d'anti-RSA et 4 contrôles de surface).

IV.2.4.2 Analyse MS et MS-MS

Le but de la technique SUPRA-MS est la détection multiplexée et la caractérisation des fragments peptidiques de la protéine d'intérêt grâce aux traitements automatisés nécessaires avant l'analyse MS. Pour éviter la contamination croisée entre les différents spots sur la puce, l'ensemble des traitements biochimiques, notamment la digestion enzymatique et le dépôt de matrice ont été réalisés par la technologie ImagePrep dont les optimisations et procédures ont été exposées au chapitre III.

La biopuce a été placée dans l'UltrafleXtreme MALDI TOF/TOF par l'intermédiaire de la plaque MALDI modifiée pour accueillir les biopuces et dont la géométrie est définie dans le

logiciel d'acquisition FlexControl (Bruker). L'acquisition automatique des spectres est rendue possible par la position exacte de chaque spot du pattern telle que définie dans la figure 65B par le spotter.

L'analyse par MALDI-MS a permis de générer des spectres de masse très peu bruités permettant d'isoler au moins 14 peptides spécifiques de la protéine LAG-3 dans une plage de mesure dont le rapport m/z est compris entre 900 et 4000 (Figure 82A). L'identification de la protéine LAG-3 après analyse PMF a conduit à un score de mascot significatif (> 87) par MS seule. Cette identification a été validée par l'analyse MS-MS du peptide à 1422.70 m/z pour lequel un score significatif a également été obtenu (> 56) (Figure 82B).

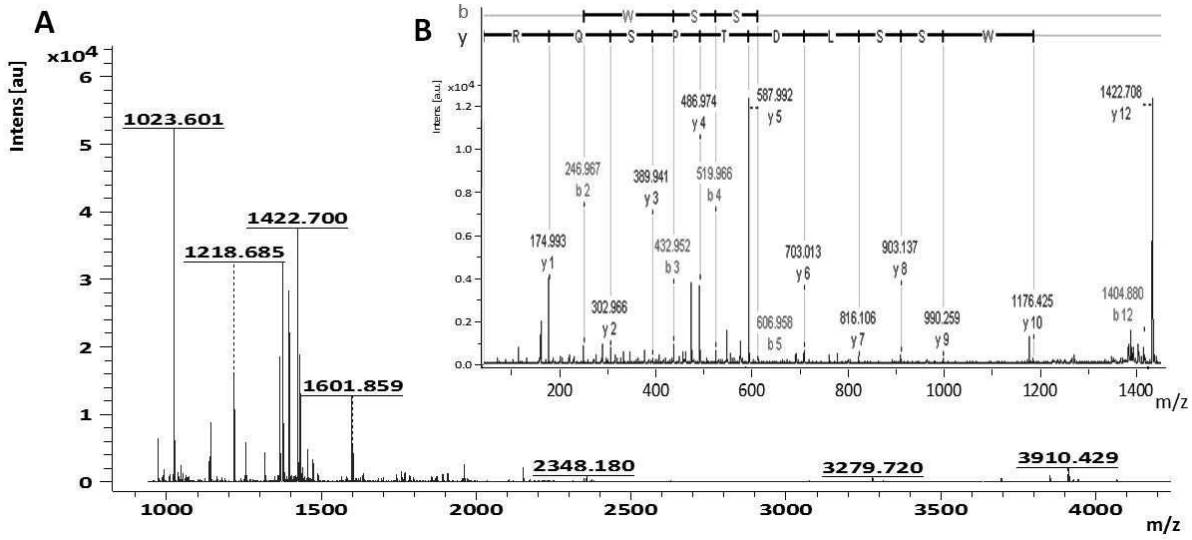


Figure 82 : (A) Identification par MS de LAG-3 (capturé en tampon) après prétraitement sur puce, (B) spectre MS-MS obtenu du pic 1422.70 m/z

Le nombre de peptides détectés et le recouvrement de séquence (SC = 37 %) (Figure 83A) sont similaires aux valeurs obtenues par une analyse protéomique classique utilisant la digestion enzymatique en phase liquide. Cette bonne corrélation et la répartition des peptides détectés au travers de la séquence de la protéine LAG-3 indique que la digestion sur puce est efficace.

De plus, l'imagerie MS confirme l'efficacité des différentes procédures de prétraitement sur puce, puisque la distribution du peptide spécifique à LAG-3 à 1422.70 m/z est visible exclusivement à l'intérieur des spots où a eu lieu la capture de LAG-3 ce qui indique qu'aucune délocalisation de l'information biologique ne se produit au cours des procédures de prétraitement des spots (Figure 83B). La zone extérieure des spots est couverte exclusivement par la RSA (pic 1960.50 m/z) qui est destinée à bloquer les interactions non spécifiques. Nous observons également de la RSA à l'intérieur des spots, ceci provient du greffage en faible

proportion de la RSA lors de l'étape de blocage comme indiqué en figure 75. D'après la quantité de RSA greffée dans les spots A9H12 au paragraphe IV.1.3.13, la RSA peut être identifiée sur la puce à des quantités inférieures à la femtomole/spot.

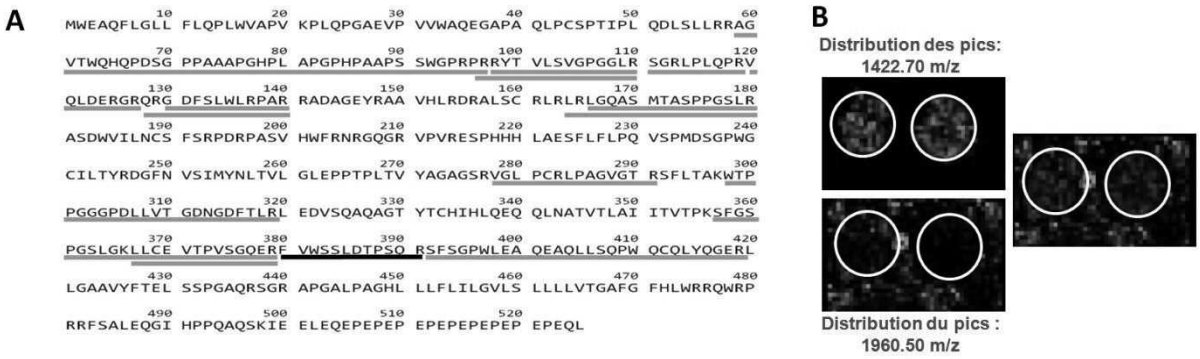


Figure 83 : (A) Séquence de la protéine LAG-3 avec en surligné en gris les fragments utilisés pour l'identification de la protéine par MS et surligné en noir le peptide 1422.70 m/z. (B) Imagerie MS sur puce du peptide spécifique de LAG-3 (1422.70 m/z) et la RSA (1960.50 m/z) et de leur superposition.

La distribution du peptide 1422.70 m/z révèle l'absence de délocalisation et de contamination croisée entre l'immobilisation des anticorps, la capture, le rinçage et les étapes de prétraitement MS.

Si on réalise un zoom sur une fenêtre de 1010 à 1235 m/z d'un spectre MS obtenu sur un spot A9H12, nous relevons en faible intensité des peptides d'anticorps et de RSA alors qu'apparaissent en plus forte intensité les peptides de la protéine LAG-3 (Figure 84). Nous émettons l'hypothèse que la couche supérieure de protéine est préférentiellement digérée lors de l'étape de prétraitement ce qui limite le nombre de peptides appartenant aux entités greffées sur la puce.

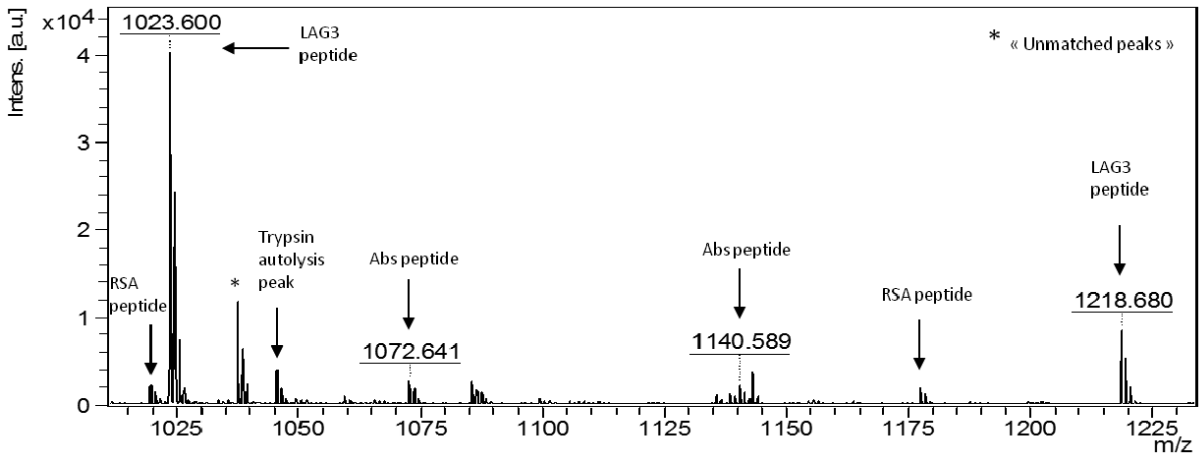


Figure 84 : Spectre des peptides après digestion et analyse d'un spot A9H12 contenant LAG-3 et l'agent bloquant (RSA)

IV.2.4.3 Limite d'identification MS

Afin d'établir la limite d'identification MS (LOI), A9H12 a été greffé à différentes concentrations de façon à générer des taux de capture variables de LAG-3 sur une même puce. Les analyses MS ont ainsi été effectuées sur des spots contenant de 0.1 à 10 femtomoles/mm^2 de protéine LAG-3. Les résultats d'identification MS sont représentés en figure 85 et montrent qu'à partir de 1 femtomole/mm^2 de LAG-3 capturé, 100 % des analyses permettent l'identification de la protéine LAG-3 avec un score Mascot significatif supérieur à 40 avec une moyenne de 71 ± 13. Une corrélation entre la quantité de protéine capturée et le score Mascot peut être observée à partir de différentes puces analysées (n = 5). Cela corrobore une très bonne reproductibilité des procédures de la SUPRA-MS en inter et intra puce. Dans une plage de 0.1 à 1 femtomole/mm^2, nous observons davantage de dispersion avec seulement 40 % d'identification de LAG-3 dont 66 % significatif.

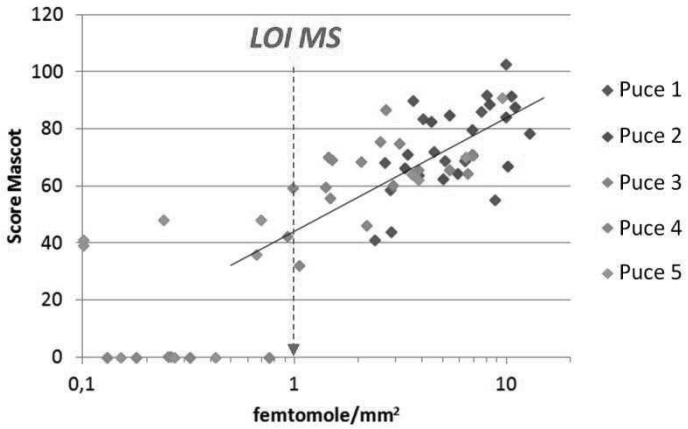


Figure 85 : Score Mascot en fonction du taux de recouvrement en macroarray en PBS

La limite d'identification par spectrométrie de masse de la protéine LAG-3 est donc fixée à un taux de capture sur puce de 1 femtomole/mm^2, ce qui correspond d'après la gamme dynamique élaborée au paragraphe IV.2.2 à une concentration de 1.14 nM de LAG-3 en tampon soit 180 ng/mL.

IV.2.4.4 Limite de détection

L'identification des protéines est automatique et réalisée par le logiciel, mais l'identification n'est pas forcément nécessaire selon les applications. En effet, l'identification de la protéine est nécessaire si l'on recherche une protéine inconnue, dans le cas de la découverte de nouveaux biomarqueurs. Mais en diagnostic clinique, qui vise à valider ou non la présence du marqueur dans l'échantillon du patient, il est possible de ne s'intéresser qu'à un seul ou plusieurs peptides spécifiques au biomarqueur. Dans le cadre de notre étude, nous pouvons observer, en figure 86, que, sous la limite d'identification fixée à 1 femtomole/mm^2,

en moyenne 3 peptides appartenant à la protéine LAG-3 sont détectés. Ainsi, il est possible de définir une limite de détection (LOD) d'environ 0.3 femtomole/mm^2 ce qui correspond à une concentration de LAG-3 de 0.25 nM.

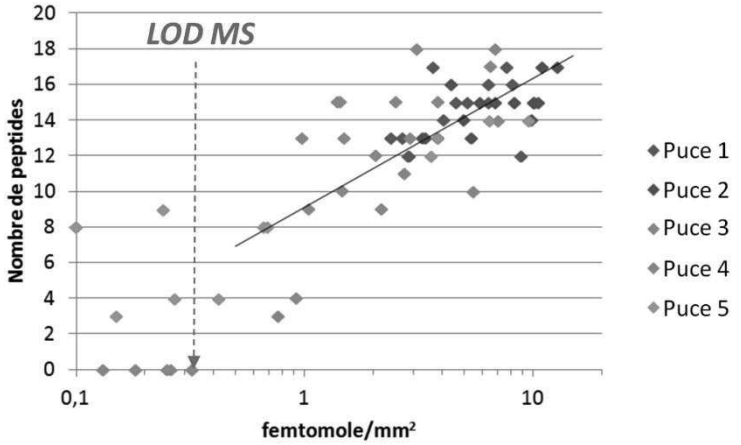


Figure 86 : Nombre de peptides détectés en fonction du taux de recouvrement en macroarray en PBS

La distribution des peptides spécifiques de ce biomarqueur, grâce à l'imagerie MS, a permis de valider que les traitements qu'ont subi les puces, n'impliquaient pas de délocalisation des informations. Nous avons montré qu'il était possible de réaliser au niveau d'une femtomole, une analyse multiplexée et automatique pour la caractérisation de protéines issues d'interaction entre biopuces à anticorps et échantillons non complexes. Les résultats en PMF et MS-MS ont conduit à une identification significative d'un biomarqueur potentiel du cancer du sein en milieu idéal.

IV.3. Validation de la SURPA-MS en milieu complexe

IV.3.1 Capture de LAG-3 en plasma humain

Afin de confronter la SUPRA-MS à l'analyse en milieu complexe, la protéine LAG-3 est injectée à 10 nM en plasma total humain dilué 40 fois dans du tampon PBS Tween 0.05% pendant 10 min à 20 µL/min (Figure 87A), suivie d'une injection de détergent (OG) pendant 30 s à 20 µL/min. Comme pour la procédure en PBS, une injection d'eau permet de nettoyer la puce des sels du tampon avant le retrait de l'appareil de SPRi.

A la fin de l'analyse, nous relevons en moyenne 5.85 ± 0.4 % de VR sur les spots A9H12, 0.42 % de VR sur les spots Anti-RSA et seulement 0.27 % ± 0.03 % de VR sur la surface. La densité de LAG-3 capturée peut être estimée à 730 pg/mm^2 ce qui correspond à 4.5 femtomoles/mm^2 par spot. Le rapport signal sur bruit est supérieur à 20, ce qui démontre la spécificité de l'interaction. L'image différentielle montre l'homogénéité de capture inter et intra spots des 4 spots d'anticorps A9H12 (Figure 87B).

Les expériences en plasma ont été réalisées sur un nombre significatif de puces (n = 5) et de spots (70) dont les résultats sont résumés en figure 87C. Afin de vérifier qu'A9H12 ne croise pas avec des composés du plasma, une injection de plasma à 2.5 % sans LAG-3 dans les mêmes conditions que pour la capture (Figure 87C) permet de constater qu'il y a 1 ± 0.6 % de VR de non spécifique sur les spots A9H12 et 0.26 ± 0.14 % sur Anti-RSA. Les spots A9H12 ont une légère tendance à réagir avec le plasma ce qui n'empêche pas un rapport signal sur bruit de 5 entre une réponse au plasma seul et une réponse au plasma contenant LAG-3 à 10 nM.

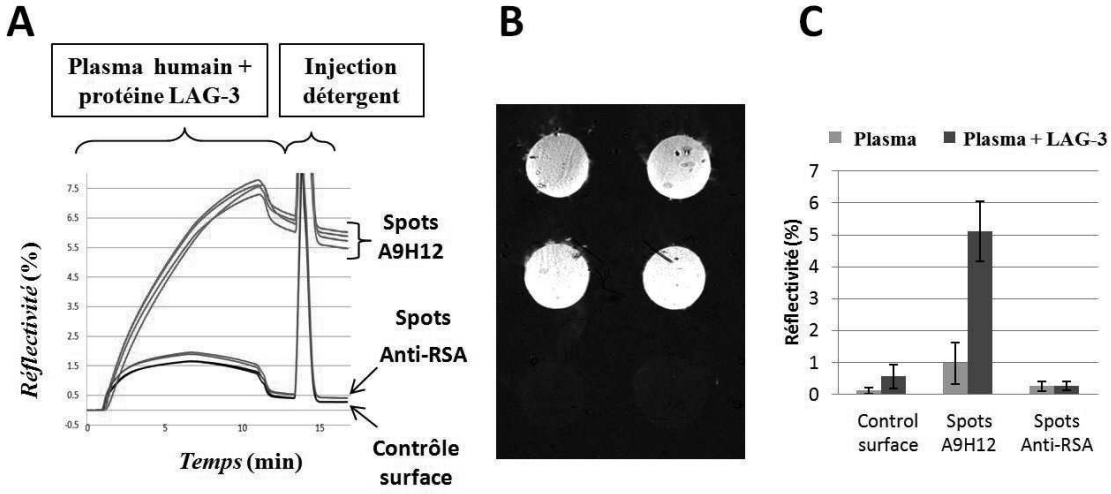


Figure 87 : (A) courbe cinétique enregistrée sur les spots A9H12, Anti-RSA et de controle de la surface pendant une injection de la protéine LAG-3 à 10 nM en plasma à 2.5% à 20 µL/min pendant 10 min suivie d'une injection de détergent, (B) Image différentielle de la puce après l'injection de LAG-3 en plasma puis détergent. (C) Comparaison des résultats (n puce = 3) après injection de plasma à 2.5% et une injection de plasma contenant LAG-3 à 10 nM.

Ce léger croisement d'A9H12 avec le plasma va donc limiter la possibilité d'accroitre le temps de contact entre l'échantillon et la puce afin de ne pas risquer l'accumulation de réponse non spécifique. En effet, c'est la capacité à visualiser les interactions spécifiques et non spécifiques en temps réel par SPR, qui ont permis de déterminer les paramètres d'injection. L'accumulation de non spécifique suite à une incubation trop longue pourrait compromettre l'analyse MS. Cela pourrait être le cas pour de simples surfaces chromatographiques découplées de toute méthode de détection.

IV.3.2 Limite de détection SPRi de LAG-3 en plasma humain

Pour déterminer la limite de détection de LAG-3 dans le plasma humain par SPRi, il n'est pas possible de procéder comme pour la LOD en PBS qui consistait à injecter à différentes concentrations la protéine LAG-3 sur une même puce en régénérant la surface entre chaque interaction. En effet, le signal non spécifique détecté sur A9H12 lors d'une injection de

plasma ne peut être régénéré. Nous ne pouvons donc pas procéder à plusieurs injections de LAG-3 en plasma sur une même puce sans risquer de dégrader la couche bioréceptrice et d'altérer les performances du biocapteur. Nous avons donc utilisé une puce pour chaque concentration dans la plage basse de la gamme dynamique du biocapteur en PBS c'est à dire 0.2 à 5 nM (Figure 88).

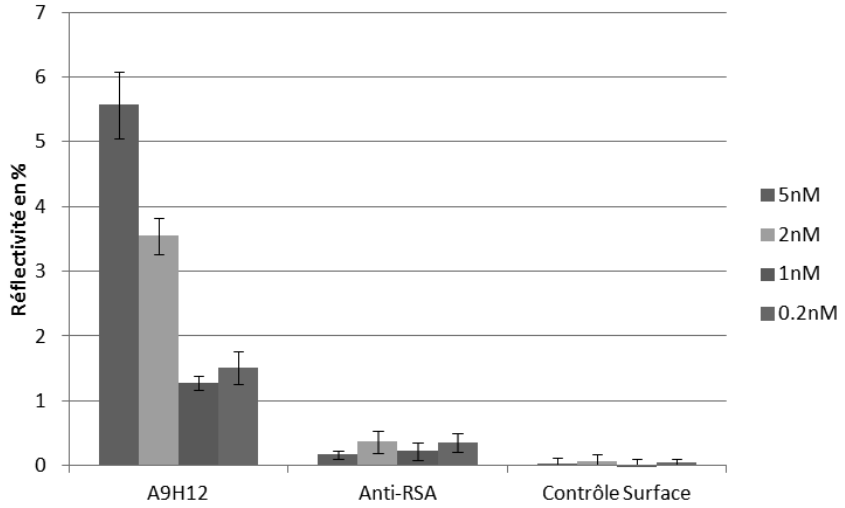


Figure 88 : Réponse SPR à des injections de plasma à 2.5 % contenant LAG-3 à 0.2, 1, 2 et 5 nM

On s'aperçoit que les réponses à l'injection de 0.2 et 1 nM sur A9H12 sont quasiment identiques. Le signal dû à la capture de LAG-3 est du même ordre de grandeur que celui généré par le bruit de fond du plasma sur A9H12. Nous ne pouvons pas déterminer en SPRi s'il y a eu réellement capture pour ces deux concentrations. Néanmoins, les réponses sont significatives pour les concentrations de LAG-3 à 2 et 5 nM avec respectivement 3.5 et 5.5 % de VR. Le signal obtenu est composé en grande partie du signal de capture de la protéine cible, mais nous pouvons nous demander si la proportion de non spécifique dûe à l'interaction d'A9H12 avec des protéines du plasma, n'induira pas un bruit de fond en masse pouvant perturber l'analyse.

La limite de détection de LAG-3 dans le plasma à 2.5 % est fixée à 2 nM.

IV.3.3 Analyse MS et MS-MS

IV.3.3.1 Analyse MS et MS-MS

La procédure complète de la SUPRA-MS a été réalisée sur trois puces pour un total de 40 spots d'intérêt. Les taux de capture moyens sont de 4.87 ± 1.49 femtomoles/mm^2 de LAG-3 en plasma humain à 2.5 % (Figure 89A). L'analyse MS de chaque spots a permis de générer des spectres peu bruités (voir annexe 4) conduisant à la détection d'en moyenne 13 ± 0.5 peptides

de la protéine LAG-3 (Figure 89B) identifiés sur 100 % des spots A9H12 avec un score mascot moyen de 87.9 ± 2.4 (Figure 89C). Les identifications sont confirmées par analyse MS-MS de l'un des peptides caractéristiques de LAG-3, le fragment 1422.70 m/z (Figure 89D).

Une corrélation a été observée entre la quantité moyenne de LAG-3 capturée sur la puce (A) et le score mascot en MS-MS (D) indiquant la capacité semi-quantitative de l'analyse MS. Même si la quantification par MALDI est délicate à mettre en œuvre, des travaux récents ont montré la possibilité, à partir d'un marquage isotopique d'un calibrant standard interne, de quantifier des peptides ou des protéines [[242,243]]. Il serait donc envisageable d'élaborer à partir des biopuces des courbes d'étalonnage pour permettre la quantification par MALDI-TOF de biomarqueurs.

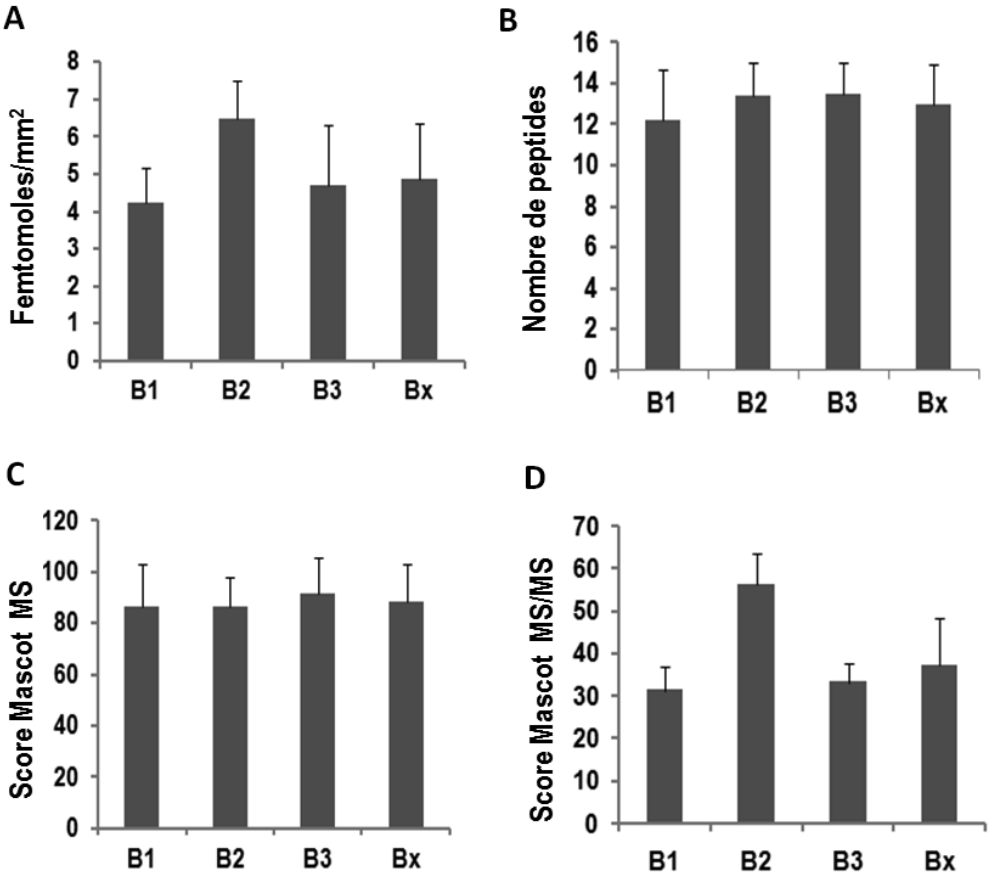


Figure 89 : (A) Résultat des taux de capture obtenus sur 3 puces B1, B2 et B3 et la moyenne Bx. (B) Moyenne du nombre de peptides détectés. (C) Moyenne des scores mascot d'identification par MS de la protéine LAG-3 et (D) moyenne des scores mascot obtenus par MS-MS du peptide 1422.70 m/z.

IV.3.3.2 Limite d'identification de LAG-3 en plasma

Afin de déterminer la limite d'identification de LAG-3 en plasma, des analyses MS ont été effectuées sur les puces présentées en IV.3.1.1. Les résultats des scores mascot obtenus sur

chaque spots et puces en figure 90 montrent, qu'au-delà d'un taux de couverture de capture de 2.5 femtomoles/mm^2, l'identification de la protéine LAG-3 est obtenue significativement à 92 % au-dessus d'un score supérieur à 40 et avec comme score moyen 57 ± 9. Ces résultats correspondent à une concentration de 2 et 5 nM tandis que 20 % d'identifications sont significatives pour l'injection à 1 nM et 0 % pour l'injection à 0.2 nM

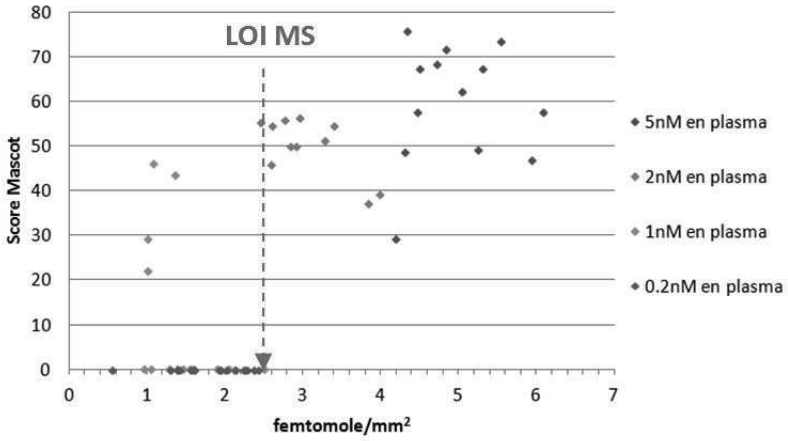


Figure 90 : Score Mascot en fonction du taux de recouvrement en macroarray en plasma humain à 2.5 %

La limite d'identification sera donc fixée à un taux de capture LAG-3 en plasma sur A9H12 de 2.5 femtomoles/mm^2 ce qui correspond à une concentration en analyte de 2 nM (320 ng/mL). Cette limite d'identification est similaire à la limite de détection par SPRi.

IV.3.3.3 Limite de détection de LAG-3 en plasma

Si l'on s'intéresse à détecter la présence de la protéine LAG-3 seulement par la détection d'un ou plusieurs peptides caractéristiques, on peut constater pour chaque concentration qu'au moins un peptide est matché (Figure 91).

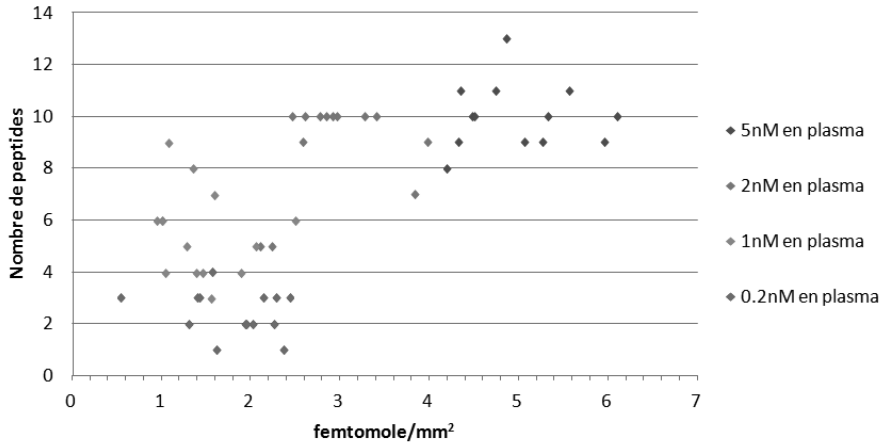


Figure 91 : Nombre de peptides détectés de LAG-3 en fonction du taux de recouvrement en macro-array en plasma humain à 2.5 %

Cela signifie que pour une très faible proportion de la protéine d'intérêt noyée dans un bruit de fond qui a généré au moins 5 fois plus de réponse que la réponse liée à la capture de la cible, la spectrométrie de masse est capable de détecter des peptides spécifiques de cette cible biologique.

Si on considère que la limite de détection par MS de la protéine LAG-3 en plasma est d'au moins 0.2 nM (32 ng/mL), cette limite est dix fois plus basse que la LOD en SPRi et que la LOI en plasma.

IV.3.4 Bilan

L'ensemble des procédures de réalisation de l'immunopuce, des conditions de capture en milieu idéal et en milieu complexe de la protéine LAG-3 et des procédures d'analyse MS ont permis de valider l'approche SUPRA-MS (annexe 6). Les performances en limite de détection et d'identification résumées dans le tableau 9 place la SUPRA-MS comme la plus performante parmi les plateformes combinant la SPR à une analyse in situ par MS, (voir en annexe 2).

		SPRi	**SUPRA-MS**
Milieu idéal	LOI	/	160 ng/mL (1 nM)
	LOD	32 ng/mL (0.2 nM)	40 ng/mL (0.25 nM)
Milieu complexe	LOI	/	320 ng/mL (2 nM)
	LOD	320 ng/mL (2 nM)	32 ng/mL (0.2 nM)

Tableau 9 : Récapitulatif des limites de détection et d'identification de la protéine LAG-3 par l'approche SUPRA-MS

Les limites de détection ne seraient pas suffisantes pour détecter et identifier la protéine LAG-3 dans le plasma humain dans le cadre d'un diagnostic si LAG-3 était utilisé officiellement comme biomarqueur du cancer du sein. Néanmoins, la limite basse de détection de 30 ng/ml et la limite d'identification de 300 ng/mL couvrent une très large gamme de protéines plasmatiques utilisées en routine comme biomarqueurs de pathologie [15].

Grâce à une chimie de fonctionnalisation adaptée aux greffages d'anticorps et à sa passivité face à un milieu biologique complexe, les spectres obtenus sont peu bruités et permettent l'identification du biomarqueur de façon significative avec des scores Mascot

similaires entre une analyse en tampon et en plasma. De plus, la qualité des spectres MS permet la détection d'un nombre de peptides tel que la couverture de séquence atteint 37 % pour une analyse en milieu complexe, valeur similaire aux pourcentages obtenus par Bellon et al en milieu idéal [151].

Après de nombreuses expériences, le pourcentage de 16-MHA à 10 % a montré un gain important dans la préparation de l'immunopuce et dans la capture d'analyte. L'hydrophobicité de la surface générée par 10 % de chaîne carboxyle permet un spotting aisé et reproductible évitant toute fusion de goutte ou risque de séchage.

L'architecture de la puce au format macroarray permet la disposition de 16 spots interrogeables automatiquement pas SPRi. Cette densité de spots est suffisante pour valider le concept de la plateforme SUPRA-MS et pour les développements de projets de recherche. Dans un souci d'automatisation et d'augmentation des capacités de criblage d'un échantillon, nous avons cherché à transposer l'approche SUPRA-MS en macroarray au microarray.

IV.4. Miniaturisation des spots pour multiplexage à moyenne densité

Afin d'évaluer la possibilité d'augmenter les nombres de spots sur une puce, nous avons eu l'opportunité de tester un spotter fluidique CFM (Continuous Flow Microspotter) développé par WasatchMicrofluidics et commercialisé par HORIBA-Scientific.

IV.4.1 Spotter fluidique: CFM

Le spotter CFM utilise une tête d'impression composée d'un réseau tridimensionnel de canaux qui permet la circulation de solutions sur la puce. Cette tête en PDMS permet le spotting de 48 spots (4 x 12) d'environ 300 µm de diamètre espacés de 500 µm (Figure 92A). Chaque spot est réalisé suivant le principe décrit en figure 92B. Un canal microfluidique ouvert au niveau de la puce (représentée en vert) permet de faire circuler les solutions de protéine à greffer. Ces solutions sont prélevées dans une microplaque de 96 puits, puis acheminées jusqu'à la puce. Par va et vient, il est possible de faire recirculer un nombre défini de fois la solution sur la surface permettant ainsi de choisir un temps de contact (1 à 99 min). Des solutions de rinçage peuvent également être injectées. Les dimensions de la tête CFM et la robotisation du support de lame permet de procéder au spotting de deux fois 48 spots comme visualisé en figure 92C.

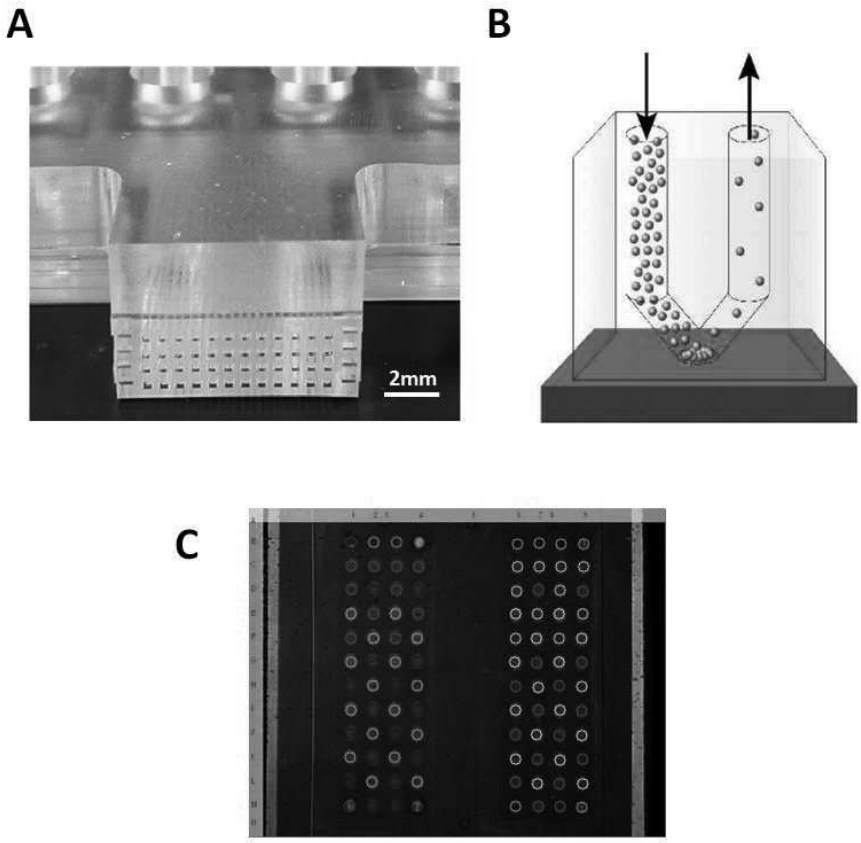


Figure 92 : (A) Tête d'impression en PDMS du CFM et ses 48 puits, (B) principe fluidique d'un spot du CFM pour l'immobilisation sur puce, (C) exemple de deux patterns de 48 spots chacun sur une puce SPRi

Cette méthode a pour intérêt de reproduire les mêmes conditions de greffage qu'en SPR. D'après Myska et al, le CFM ne permet pas d'améliorer la quantité maximale de protéines greffées par rapport aux autres techniques de spotting mais il permet, par exemple, de réduire sensiblement la concentration de la protéine greffée tout en générant une réponse de capture linéaire, ce qui n'est pas le cas d'un spotting par contact (Figure 93) [[244]].

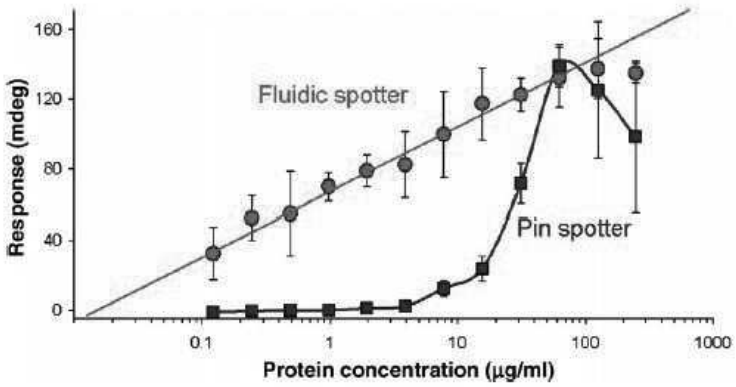


Figure 93 : Réponse d'un spotting contact (en bleu) et d'un spotting CFM (en rouge) en fonction de la concentration en protéines [[244]]

IV.4.2 Optimisation des procédures

Dans un premier temps, nous avons déterminé le temps d'incubation nécessaire au spotting par fluidique CFM. Pour cela, nous avons choisi un couple d'Ac/Ag habituellement utilisé par HORIBA-Scientific pour leur développement et démonstration. Ce couple est un anticorps (Anti-OVA) dirigé contre de l'ovalbumine d'œuf (OVA). On voit clairement sur la figure 94A que la courbe (moyenne de spots dans les mêmes conditions) bleue, correspondant à une incubation de 15 min, est davantage déplacée à gauche que les autres courbes de temps d'incubation plus long. Il y a donc visiblement davantage d'anticorps greffés pour cette condition, ce qui se confirme par la capture plus importante à l'injection de l'antigène (OVA) dont les résultats sont montrés en figure 94B. Nous formulons l'hypothèse selon laquelle les conditions fluidiques et plus particulièrement la vitesse d'écoulement de la solution au voisinage de la surface, tendent à endommager la couche d'anticorps greffés à partir de 30 min de procédure de greffage.

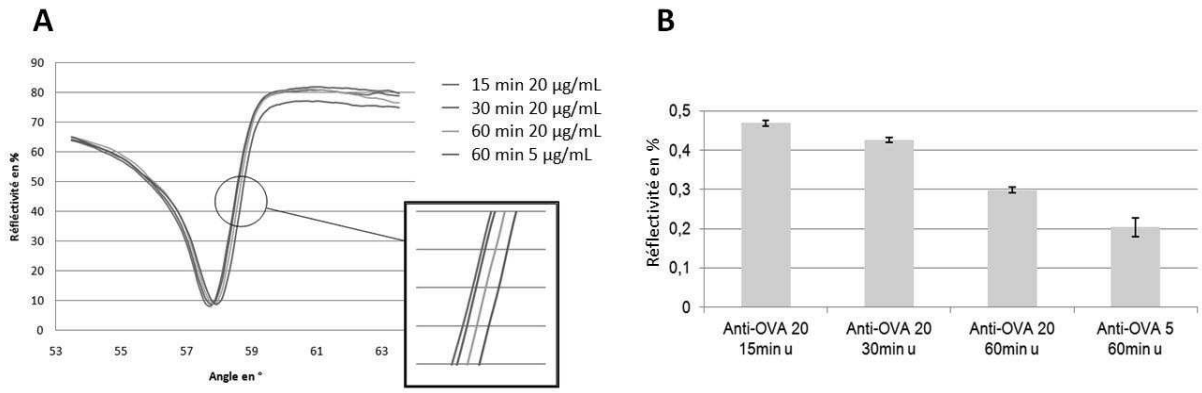


Figure 94 : (A) Comparatif des courbes plasmon des spots Anti-OVA greffés à différentes durées d'immobilisation. (B) Taux de capture à une injection d'OVA à 227 nM.

Nous avons donc démontré qu'un temps d'incubation de 15 minutes, permettait de greffer davantage d'anticorps et d'obtenir de meilleurs taux de capture qu'un greffage de 30 et 60 min (Figure 94).

Afin de comparer les réponses de capture entre macroarray et microarray, un pattern de 48 spots a été réalisé par CFM avec différentes concentration d'A9H12 (200, 50, 20, 10 µg/mL). Après 15 minutes d'immobilisation, les spots sont rincés à l'eau et protégés par une solution de sucrose appelé Stabilguard (SurModics IVD). Cette solution va créer, après retrait de la tête CFM, un biofilm hydraté protégeant les spots d'anticorps et empêcher leur séchage et donc leur dénaturation. Six macrospots sont réalisés à côté du pattern CFM et agités sous ultrasons.

Après incubation, la puce est rincée, bloquée à la RSA et désactivée avant montage dans le SPRi-Plex II.

L'image différentielle en figure 95A montre une bonne homogénéité de capture intra et inter spot. Nous avons néanmoins constaté, que lorsque les spots sont trop proches les uns des autres dans le sens du flux, les spots en amont tendent à réagir davantage que les spots en aval. Ce phénomène est simplement dû à l'épuisement en antigène de l'échantillon au niveau de la couche limite de diffusion. Il faut donc prendre garde de positionner les spots de même espèce en ligne et non en colonne ou de les espacer le plus possible lorsqu'ils sont en colonne comme pour le pattern CFM de la figure 95A.

Les réponses à l'injection de LAG-3 sur les macroarrays et les microarrays sont très similaires pour les concentrations 200, 50 et 20 µg/mL (Figure 95B). D'autres expériences, avec des concentrations inférieures à 20 µg/mL, ont montré la même tendance que la réponse à 10 µg/mL. Dans le cas de la plateforme SUPRA-MS, nous cherchons à obtenir une couche en anticorps la plus efficace possible et ainsi augmenter les chances de détecter et d'identifier cet antigène par MS. Nous ferons le choix de spotter les anticorps à 20 µg/mL pour la suite des développements.

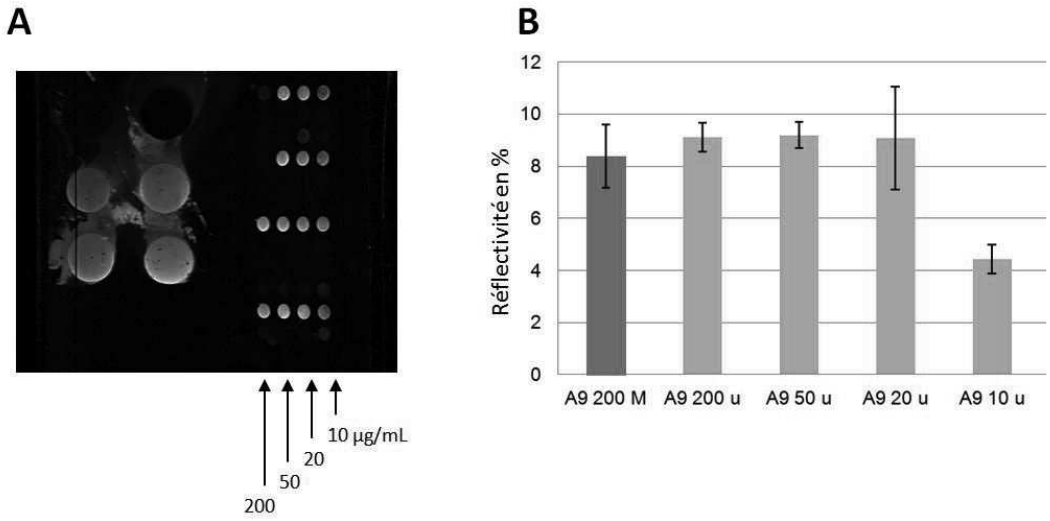


Figure 95 : (A) Image différentielle après capture de LAG-3 à 10 nM en recirculation (B) Comparaison des réponses de capture entre spots A9H12 en macroarray (noté M) et microarray (noté u) en fonction de la concentration d'immobilisation.

IV.4.3 Résultats MS

IV.4.3.1 Imagerie MS

Nous avons démontré que les procédures MS fonctionnent pour des spots de large diamètre (1.2 mm) disposés de façon précise à la surface de la puce. L'analyse MS étant

réalisée dans une zone de diamètre de 1 mm centrée au spot, une légère dispersion en position est acceptable (± 100 µm). Les spots CFM ont une forme ovale de dimension 250 par 350 µm, la moindre erreur de positionnement risque d'introduire des biais dans l'analyse MS. La mise en position de la tête CFM sur la puce pour le spotting s'avère trop imprécise pour localiser avec précision les spots par rapport aux bords de la puce. Il n'est donc pas possible de modifier le programme de tir pour une analyse MS automatique. De plus nous ignorons si la taille des spots CFM est suffisante pour obtenir une identification.

Dans un premier temps, l'analyse MS sera effectuée par imagerie MS. Les conditions de greffage étant fixées, des puces sont générées et sont analysées par imagerie MS selon les conditions optimisées au chapitre III.

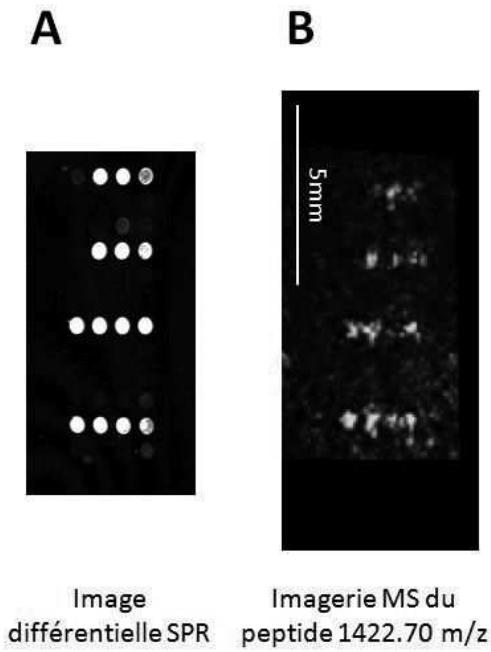


Figure 96 : (A) Image différentielle SPR après capture de LAG-3 en PBS, (B) imagerie MS de la distribution du peptide 1422.70 m/z de la même puce

La figure 96 montre un exemple de l'image différentielle obtenue en SPRi après interaction avec LAG-3 en PBS et l'imagerie MS de la distribution du peptide 1422.70 m/z. Les logiciels ne permettent pas de générer une cartographie de la surface en affichant les protéines à identifier. Seule la possibilité d'afficher la distribution peptide par peptide est possible. L'emplacement des spots CFM est visible mais quelques délocalisations apparaissent. Les zones hors spots apparaissant en vert sont simplement dues au bruit de fond des spectres et non à un peptide réel de LAG-3. L'identification des protéines sur chaque spot a du être réalisée manuellement, c'est à dire qu'un pixel de chaque spot est sélectionné afin de procéder au calcul du score mascot de la protéine à identifier.

De cette façon, nous avons obtenu 94 % d'identification sur spots A9H12 ayant capturé LAG-3 en PBS et 81 % d'identification pour une analyse en plasma.

IV.4.3.1 Analyse MS en automatique

Afin de localiser l'emplacement des patterns CFM, nous avons tenté de repérer les 4 coins de chaque pattern de spot par le greffage des billes de silice de 100 nm de diamètre. Ces billes sont fonctionnalisées et présentent des groupements amines primaires. Il est donc possible de les immobiliser à la surface de la puce au même titre que les anticorps. Une image SPR en figure 97A montre que les 4 coins du pattern de droite sont mieux visibles que le pattern de gauche. Cela montre que le greffage des billes n'est pas optimisé.

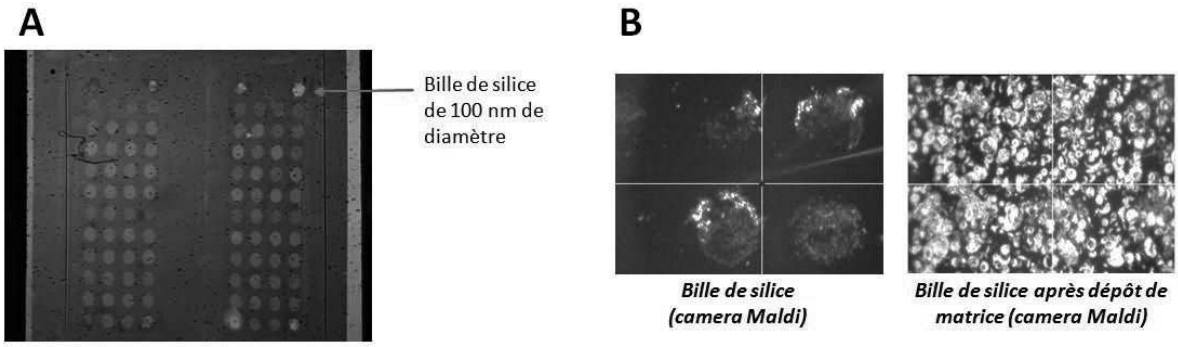


Figure 97 : (A) Image SPR de deux patterns CFM et des billes de silices à leurs quatre coins. (B) image des spots de silice observés par la caméra de l'Ultrafelxtrem avant et après dépôt de matrice.

Si les billes sont visibles par SPRi ou par la caméra du MALDI (Figure 97B), il s'avère nettement plus difficile de les discriminer une fois la matrice déposée sur la puce et c'est bien à ce moment-là que le repérage des patterns est nécessaire. Lorsque la puce est montée dans le MALDI, il est possible de sélectionner manuellement les 4 coins du pattern, on appelle cette procédure le "teaching". Par cette procédure on indique au logiciel un référentiel pour localiser les autres spots en entrant leurs entraxes en x et y.

Le "teaching" a été possible sur trois puces analysées en PBS et sur une en plasma, dont les résultats de l'analyse MS en semi-automatique sont montrés en figure 98. Les taux de captures de LAG-3 en PBS et en plasma sont équivalents, ce qui a permis de détecter par MS respectivement 10.4 (PBS) et 7.3 (plasma) peptides matchés par spots A9H12 contribuant à l'identification de LAG-3 sur 90 % (PBS) et 37 % (plasma) des spots pour un score mascot supérieur à 40. On note donc une analyse MS moins performante sur la puce dont la capture a eu lieu en plasma (Figure 98).

A

	Femtomole/mm2	Score Mascot moyen	nb peptide	Indentification	Identification > 40
PBS	7.7 ± 1.2	73.5 ± 6	10.4 ± 1.8	95%	90%
Plasma	7.8 ± 1.1	41 ± 12	7.3 ± 2.6	75%	37.50%

B

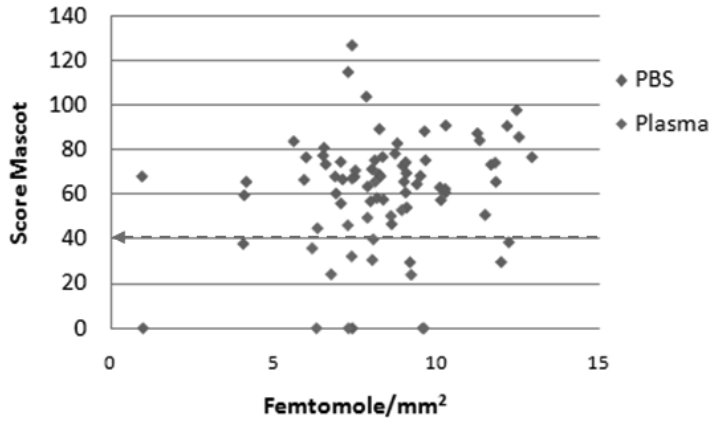


Figure 98 : (A) Résumé des résultats MS en CFM, (B) Score mascot des identifications de LAG-3 sur spots A9H12 sur puce ayant travaillé en PBS et en plasma.

L'analyse MS-MS sur spot CFM n'a pas donné de résultats satisfaisants car la surface des spots est trop petite pour permettre une analyse MS et une MS-MS sur le même spot, l'analyte étant "consommé" par la première analyse MS. Le nombre de spots que propose la technique microarray, pourrait permettre de réserver des spots dédiés à l'analyse MS et d'autres dédiés à la MS-MS.

Si l'on peut valider la plateforme SUPRA-MS pour un format microarray par CFM en milieu idéal, elle ne peut être validée en l'état pour les milieux complexes. Davantage d'expériences devraient être réalisées en plasma mais le problème de localisation des spots est un réel frein au couplage microarray-MS.

IV.4.4 Bilan

Pour la première fois, le couplage CFM / SPR / MS a été réalisé validant la SUPRA-MS en format microarray présentant deux fois 48 spots, en milieu idéal. Le CFM présente l'avantage de spotter les protéines, par voie fluidique, par l'intermédiaire de canaux microfluidiques garantissant l'homogénéité de greffage inter et intra spot. Un va et vient fluidique permet de maitriser le temps d'incubation. L'échantillon est récupérable et réutilisable pour un autre pattern ou une autre puce mais la consommation en ligand pour la réalisation d'un spot CFM est égale à vingt fois la consommation nécessaire à la réalisation d'un macrospot.

Si l'analyse des interactions par SPRi des spots d'anticorps avec son antigène est validée quelle que soit la nature de l'échantillon, le CFM présente deux principales contraintes compliquant l'analyse MS. La première est une contrainte de localisation des spots sur la puce. La conception du CFM ne permet pas un positionnement assez précis des spots sur la puce pour réaliser une analyse MS en mode automatique. De plus, il existe un défaut de parallélisme des colonnes de spots, générant un pattern très légèrement trapézoïdal. Il n'est donc pas aisé d'analyser avec certitude l'intégralité du spot.

La deuxième limitation est une contrainte géométrique des spots. De par leur taille (250 par 350 µm), la quantité de protéines capturées et disponibles pour l'analyse MS est 16 fois moins importante qu'un macroarray à taux de recouvrement égal. Même si les étapes de prétraitement MS par spray sont adaptées à ces tailles de spots, l'étude par spectrométrie de masse à démontré a démontré l'impossibilité d'effectuer une analyse MS et MS-MS sur le même spot.

Le nombre de marqueurs protéiques pour une pathologie étant restreint et donc ne nécessitant pas un nombre très important de spots, l'augmentation de la taille par deux des spots CFM avec mise en position précise de la tête sur la puce au moment de l'immobilisation, permettrait de combiner facilité et automatisation de la technologie CFM avec la fonctionnalité des macroarrays pour l'analyse MS et MS-MS.

IV.5. Application de la SUPRA-MS à une application biologique

La preuve de concept de la plateforme SUPRA-MS étant validée, l'objectif principal à ce jour est l'utilisation de cette technologie à une application biologique concrète. Une collaboration est née entre la plateforme CLIPP et l'institut clinique de neuroscience de l'université de Bristol dans le cadre de la recherche sur la maladie d'Alzheimer (MA). Le glutamate (neurotransmetteur chimique) facilite la mémoire et l'apprentissage, mais il a été observé que chez les patients présentant la MA, le glutamate à forte concentration devenait toxique pour les cellules du cerveau. 30 % du glutamate est produit par l'enzyme hBCAT qui lors de la MA est exprimé 170 fois au-dessus de la normale. De plus, il a été montré que plusieurs isoformes (hBCATc, hBCATm, hBCATm-deletion, hBCATm-sp) de cette enzyme pouvaient être détectées dans les extraits de cerveau et le liquide cérébrospinal et que ces formes pourraient être indicateurs des stades de la maladie [245]. L'objectif est de capturer et d'identifier les isoformes hBCATc et hBCATm dans des lysats de cellules neuronales dont la concentration totale en protéines est de 1.7 mg/mL.

IV.5.1 Capture des isoformes en PBS

Nous disposons des deux types d'anticorps polyclonaux issus du lapin; un IgG Anti-hBCATc (Biotechnology) et un IgG Anti-hBCATm (Abcam) que nous dénommerons respectivement Anti-C et Anti-M. Une préconcentration par SPR a permis de déterminer les pH d'immobilisation; pH 5 pour Anti-C et pH 6 pour Anti-M.

Nous avons dans un premier temps cherché à spotter Anti-C et Anti-M sur puce SPRi et à procéder à une capture en PBS des protéines recombinantes hBCATc et hBCATm qui étaient à notre disposition. Nous avons obtenu de très faibles taux de capture compris entre 0.2 et 0.3 % de VR pour des concentrations en protéines recombinantes supérieures à 1 µM. Ces valeurs sont anormales, les poids moléculaires des protéines hBCATc et hBCATm sont respectivement 43 kDa et 41 kDa, ce qui signifie que seulement 0.6 à 0.9 femtomole/mm^2 a été capturé. Les affinités entre les anticorps et les protéines recombinantes sont trop faible, nous ne pouvons donc utiliser ces protéines qui devaient faciliter cette étude. Une différence conformationnelle entre la protéine ayant servit à l'immunisation et la protéine recombinante utilisée, peut être à l'origine de cette absence de bioreconnaissance, nous avons choisi de poursuivre l'étude en en lysat de cellules neuronales.

IV.5.2 Capture des isoformes en lysat de cellules neuronales

Nous avons procédé au spotting d'Anti-C et Anti-M et Anti-OVA (spots contrôles) etA9H12 (Figure 99A). Afin d'intégrer un contrôle interne à toutes les procédures de greffage, de lavage, de prétraitement et d'analyse MS, nous avons opté pour le couple A9H12/LAG-3, ainsi, LAG-3 sera ajouté dans chaque échantillon d'extrait cellulaire, les résultats de son analyse permettront de valider (ou non) la bonne exécution de la procédure SUPRA-MS.

Trois injections successives de lysat de cellules neuronales à 50 % en PBS Tween à 0.05% contenant 10 nM de LAG-3 ont été réalisées à 20 µL/min sur une durée totale de 30 min. L'image différentielle en figure 99B montre une parfaite homogénéité de capture. Nous relevons une grande différence de capture entre Anti-C et Anti-M avec respectivement 11.4 ± 0.6 % de VR et 0.8 ± 0.06 % VR après la troisième injection de lysat (Figure 99C). La concentration de hBCATc dans l'extrait cellulaire après dilution au demi est comprise entre 8 et 16 nM (d'après nos collaborateurs), mais nous ignorons qu'elle est la concentration de la protéine hBCATm. La réponse sur les spots Anti-M s'apparente à une réponse non spécifique car elle est comprise entre la réponse des spots contrôles (Anti-OVA) avec 1.1 % et la réponse des ROIs de surface (0.7 %). La réponse des spots A9H12 avec 4.9 % de VR semble spécifique et est cohérente par rapport aux résultats obtenus en plasma humain.

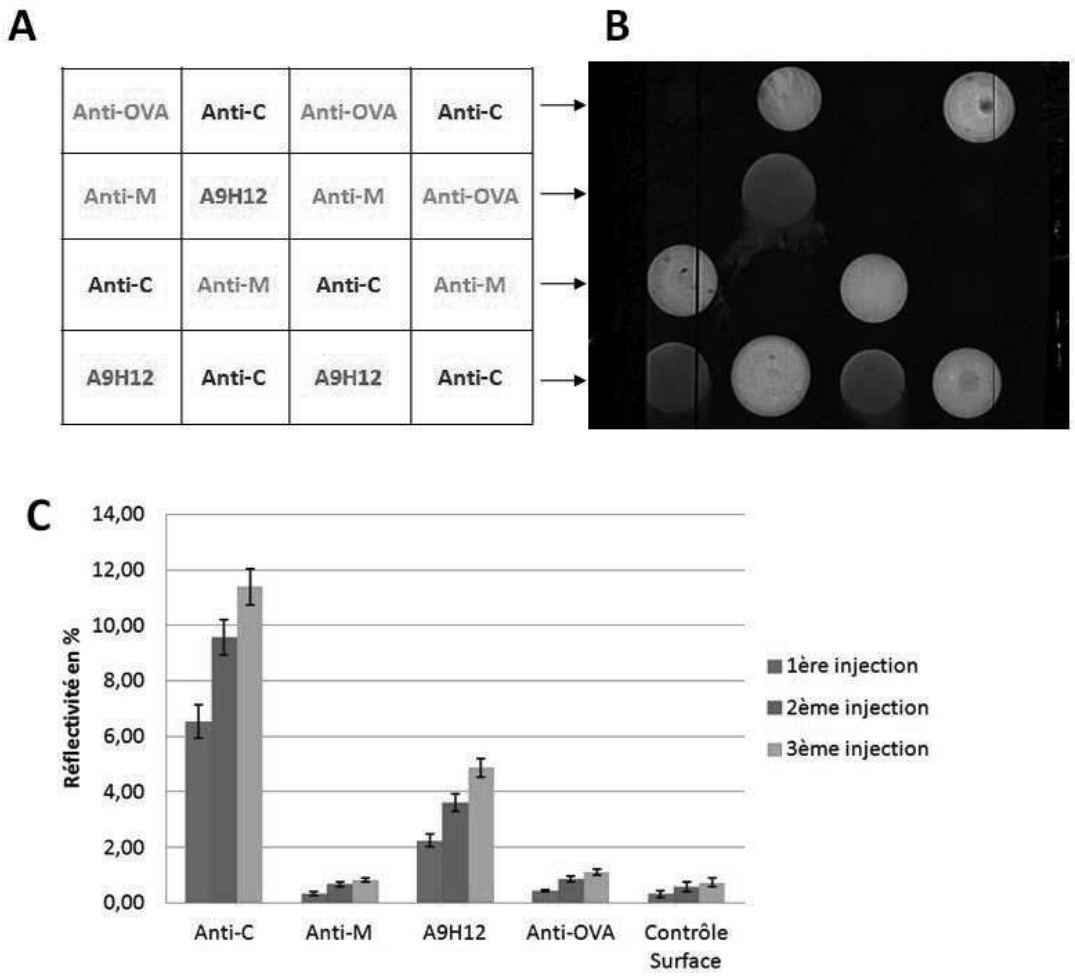


Figure 99 : (A) Schéma de spotting. (B) Image différentielle après 3 injections à 20 µL/min pendant 10 min de lysat de cellules neuronales à 50 % en PBS Tween 0.05%. (C) Réponse SPR de chaque espèces d'anticorps (moyenne des spots) pour chaque injection de lysat de cellules neuronales.

Nous pouvons nous interroger sur la réponse des spots Anti-C. Deux hypothèses sont proposées: la première est que les protéines recombinantes hBCATc et hBCATm n'étaient pas reconnues par les anticorps pour une raison indéterminée, mais que celles présentes dans le lysat le sont; une concentration supérieure de hBCATc par rapport hBCATm dans le lysat pourrait expliquer une telle différence de capture.

La deuxième hypothèse serait que les anticorps ne reconnaissent aucune des protéines hBCAT à cause d'une trop faible affinité ou d'une dénaturation éventuelle lors d'une des étapes de préparation ou de greffage. Dans ce cas, la très forte réponse sur les spots Anti-C serait d'origine non spécifique.

Nous sommes dans une situation où il nous est impossible de conclure en l'état et pour laquelle, l'analyse par spectrométrie de masse devrait permettre d'apporter un éclairage particulier.

IV.5.3 Analyse MS

Nous avons dans un premier temps procédé séparément à l'analyse MS de chaque échantillon en notre possession par digestion liquide et dépôts sur cible MALDI afin de contrôler l'absence de contamination. Nous avons obtenu des identifications significatives et des confirmations par MS-MS des anticorps Anti-C, Anti-M et des protéines recombinantes hBCATc et hBCATm à partir de spectres peu bruités indiquant que les échantillons en notre possession sont de bonne qualité.

Les spots de la puce montrée en figure 99 ont été traités et analysés par MS et MS-MS (Figure 100) selon les procédures développées au cours de ce manuscrit.

			Analyse MS (Score mascot) Espèces identifiées			
Spot	**Epsèces**	**VR en %**	**hBCATc**	**hBCATm**	**LAG-3**	**IgG**
Spot 2	Anti-C	11,84				29,20 (8)
Spot 4	Anti-C	11,64				56,00 (6)
Spot 9	Anti-C	10,71				40,80 (8)
Spot 11	Anti-C	9,12				51,50 (9)
Spot 14	Anti-C	11,44				28,50 (6)
Spot 16	Anti-C	12,43				78,40 (9)
Spot 5	Anti-M	1,47				35,30 (8)
Spot 7	Anti-M	0,62				30,10 (6)
Spot 10	Anti-M	0,85				42,80 (6)
Spot 12	Anti-M	0,88				38,10 (7)
Spot 6	A9H12	4,57			97,00 (15)	55,10 (9)
Spot 13	A9H12	4,94			76,10 (12)	62,70 (9)
Spot 15	A9H12	5,06			60,50 (13)	63,00 (10)
Spot 1	Ant-OVA	3,2				28,90 (7)
Spot 3	Ant-OVA	0,49				25,80 (6)
Spot 8	Ant-OVA	1,56				56,70 (7)

Anti-C
Anti-M
Anti-OVA
A9H12
(x) nombre de peptides

Figure 100 : Résultats MS de chaque spots ayant interagi avec du lysat de cellules neuronales

Aucune identification des protéines hBCAT n'a été possible, malgré une forte réponse des spots Anti-C suite à l'injection de lysat de cellules neuronales. Il semblerait donc que la réponse observée sur ces spots était liée à des interactions non spécifiques de protéines présentes dans le lysat. Le fait qu'aucune de ces protéines n'ait pu être identifiée signifie que les 11 % de VR ne sont pas dus à une seule protéine mais à plusieurs qui représentent au final un pool de protéines ne pouvant être discriminées par MALDI-TOF. Nous pouvons constater que les anticorps ont été identifiés sur la totalité des spots.

La protéine LAG-3 a été identifiée significativement (score mascot 78) sur 100 % des spots A9H12 selon les mêmes performances qu'en plasma humain avec la détection de 13 peptides confirmés par une analyse MS-MS sur 3 des peptides. Cette performance indique

qu'aucun biais n'a été introduit pour une analyse en lysat cellulaire et que l'ensemble des procédures de la plateforme SUPRA-MS a fonctionné.

IV.5.4 Bilan

En plus de valider la SUPRA-MS dans un autre fluide biologique complexe que le plasma, ici un extrait de cellules neuronales en culture, nous avons pu introduire un contrôle interne à toutes les procédures de préparation de la puce et de son traitement MS en parallèle aux expérimentations de nouveaux modèles biologiques.

Le couplage de la SPRi avec la MS a permis de conclure que les réponses plasmon obtenues en SPRi sont d'origine non spécifique et que vraisemblablement, les anticorps utilisés pour le projet ne sont pas assez performants pour une capture efficace des isoformes hBCAT.

Conclusion

La réalisation de l'immunopuce repose sur l'utilisation d'une SAM mixte composée de 10 % de 16-MHA et 90 % de 11-MUOH qui permet après activation, l'immobilisation d'environ 10 femtomoles/mm^2 d'anticorps. L'utilisation d'un spotter home made permet de contrôler les conditions de greffage de 16 macrospots conduisant à des performances de capture similaires aux techniques d'immobilisation par voie fluidique. La capture au niveau de la femtomole/mm^2 a été établie pour des concentrations de protéine LAG-3 compatibles avec des concentrations en biomarqueur protéique de pathologies utilisé en routine clinique (300 ng/mL en plasma). Les étapes de blocage de la surface et de désactivation permettent de limiter les interactions non spécifiques sur les spots d'anticorps avec seulement 35 à 125 pg/mm^2 d'adsorption selon les anticorps, ce qui place cette spécificité à l'état de l'art comparativement à un greffage ou un adressage fluidique [80,246].

L'utilisation d'un spray a été pour la première fois décrite en 2000 puis en 2007 par Nedelkov et al pour déposer de la matrice sur spots d'anticorps issu de greffage en SPR [136,138]. L'originalité de notre approche a été d'utiliser le spray pour réaliser l'intégralité des étapes de prétraitement comprenant la réduction, la digestion et le dépôt de matrice. Ces étapes développées au chapitre III ont montré leurs performances après analyse par spectrométrie de masse sur puce des spots, permettant d'obtenir une caractérisation des protéines présentes à la surface de la puce. Le biomarqueur potentiel du cancer du sein LAG-3 a été identifié significativement par MS et MS-MS après capture en tampon et plasma dilué au quarantième générant des scores mascot équivalents aux travaux en PBS par les équipes de

Boireau [141] et Bellon [151]. Les performances obtenues en plasma tant en SPRi qu'en analyse MS, la simplicité des procédures ainsi que la rapidité de l'analyse globale (environ 3h) place la plateforme SUPRA-MS comme un outil puissant pour la caractérisation et la recherche de biomarqueurs et devance les résultats obtenus par les dernières plateformes d'analyse MS sur puce [145].

Dans le cadre du projet Alzheimer, qui pour but la caractérisation et le dosage d'isoformes de la protéine hBCAT, nous avons mis en évidence l'utilité du couplage de la SPRi avec la MS qui permet d'avoir une analyse critique plus prononcée sur les expériences SPRi qui paraissaient incontestables.

L'amélioration de l'automatisation de spotting et de l'augmentation de la capacité multiplexage a été évaluée par spotting microfluidique. Les résultats en SPRi sont similaires aux résultats en macroarray. L'analyse MS en milieu idéal a donné des résultats très encourageants d'évolution de la SUPRA-MS vers les biopuces à mircoarrays. Cependant, pour une investigation complète en MS et MS-MS, la miniaturisation des spots d'analyse devient un paramètre limitant. Les limites actuelles de dimensionnement d'un spot pour une analyse ponctuelle de type MS ou MS-MS peuvent être définies de l'ordre de 0.1 mm^2.

CONCLUSION GENERALE

Nous avons élaboré un biocapteur basé sur l'imagerie par résonance de plasmons de surface. Son format à base de puce d'or est compatible avec l'instrumentation SPRi et la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF. La technique par évaporation de couches minces a permis d'obtenir d'excellentes sensibilités plasmoniques de l'ordre de 75 %/°. La réponse plasmon à un événement biologique à la surface de la puce a été étudiée en utilisant des substrats dont l'originalité repose sur la présence de terrasses d'or atomiquement planes aux caractéristiques plasmoniques. Ces surfaces ont permis la visualisation, par AFM, des anticorps après greffage réalisé et suivi en temps réel par SPRi et ainsi nous avons pu dénombrer à l'échelle moléculaire le nombre de protéines immobilisées dans une fenêtre de 1 à 1200 molécules/μm^2. Cette comparaison entre données SPRi et AFM, a permis de vérifier la relation entre variation de réflectivité et taux de recouvrement en pg/mm^2 fiabilisant ainsi les performances du capteur pour l'étude d'interactions biologiques.

Une immunopuce sur substrat d'or a été développée de façon à proposer des spots d'anticorps dirigés contre un biomarqueur potentiel du cancer du sein, la protéine LAG-3. Un spotter home made a permis l'optimisation des procédures d'incubation pour le greffage d'anticorps contribuant à des taux de capture à l'échelle de la femtomole par spots permettant d'atteindre des limites de détection de LAG-3 par SPRi de 30 ng/ mL en PBS et 300 ng/mL en plasma humain.

L'optimisation des procédures collectives de prétraitement MS des protéines de la puce ainsi que l'élaboration d'une procédure automatisée d'analyse MS, ont permis l'identification significative de la protéine LAG-3 par MS (scores mascot de 80) et par MS-MS sur le peptide 1224.70 m/z (score mascot de 40). Avec en moyenne 13 peptides détectés, nous avons obtenu un taux de couverture de séquence de 37 % de la protéine LAG-3.

Les performances de l'immunopuce, couplée au développement original de l'analyse MS, ont permis d'obtenir des limites d'identification du biomarqueur potentiel à 160 ng/mL en milieu idéal et à 300 ng/mL en plasma humain. Ces performances de détection au sub µg/mL sont réalistes vis-à-vis de certaines concentrations de marqueur protéique utilisé en diagnostic clinique comme l'alpha foeto protéine.

Ce travail a permis d'établir une preuve de concept pour la détection, l'identification et la caractérisation d'un marqueur potentiel du cancer du sein, la protéine LAG-3, ajoutée à du plasma humain. Nous avons validé l'approche "on chip" basée sur un biocapteur utilisant la SPRi et l'identification par MS dans les fluides biologiques avec une grande robustesse. La

fiabilité des procédures de réalisation de la biopuce, le rapport signal sur bruit de la biodétection et la stabilité des procédures automatiques avant et pendant l'analyse MS sont encourageants quant à l'émergence de cette nouvelle solution analytique intitulée SUPRA-MS pour le diagnostic in vitro et le suivi thérapeutique de pathologies humaines à partir d'un panel de protéines bio-indicatrices.

PERSPECTIVES

A l'issue de ce travail, la plateforme analytique SUPRA-MS est « opérationnelle » pour l'étude de protéines cibles. Plusieurs axes d'applications sont envisagés.

La principale consiste à valider un biomarqueur candidat pour une application clinique qui n'aurait pu franchir les barrières de la validation par les techniques conventionnelles. La plateforme SUPRA-MS peut également être utilisée pour l'identification des nouveaux biomarqueurs. Différents projets sont en cours d'étude au sein de la plateforme CLIPP, vise à identifier le partenaire de TREM-1 (Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells – 1) indicateur de la gravité du choc septique ou pour discriminer des sous populations protéiques telles que des variants indicateurs de l'avancée de la maladie (projet Alzheimer).

En plus d'être un nouvel outil de diagnostic en étude clinique basé sur les biomarqueurs connus, la SUPRA-MS pourrait ouvrir une voie prometteuse de recherche fondamentale en biologie pour la discrimination des protéines impliquées en complexe (complexome) et intervenant dans de nombreuses voies de la signalisation cellulaire.

La discrimination de cibles antigéniques à partir de bibliothèques d'anticorps à visée thérapeutique ou pour des applications en diagnostic in vitro est une application potentielle de la SUPRA-MS et est envisagée dans un avenir proche.

Un volet d'optimisation de l'immunopuce est possible. En effet, pour pallier aux limitations que pourrait rencontrer la SUPRA-MS face à l'utilisation d'anticorps (la fragilité de certains anticorps à l'immobilisation, leur réactivité au milieu complexe ou encore leurs nombreux fragments générés par une digestion trypsique pouvant réduire le rapport S/N des peptides d'intérêt), comme la stratégie envisagée consiste à utiliser des ligands naturels et synthétiques de petites tailles; comme les nanobodies et les aptamères. Leurs dimensions leur confèrent une plus grande densité de greffage, ce qui améliore la capacité de capture dans le cas des petites protéines. De plus, leurs squelettes réduits à base d'acides aminés ou de bases nucléiques, génèrent, après processus de digestion enzymatique, un nombre restreint de fragments dans la fenêtre de m/z 900 – 3500, source d'amélioration du rapport S/N dans le PMF et de l'augmentation de l'intensité des pics d'intérêt pour la MS-MS qui seront un gain de sensibilité pour la SUPRA-MS.

L'optimisation de l'analyse MS est également envisagée d'un point de vue instrumental par l'utilisation d'un robot (ADVION) récemment acquis par l'équipe de massistes et qui permet la récupération des protéines dans 1 µL de solution pour chaqu'un des 16 spots. Le robot est couplé à une source ESI et à un analyseur Orbitrap (Thermo Scientific), ce qui

permet l'analyse en continu de la solution d'élution tout en procédant à une analyse MS-MS systématique des peptides détectés. Cette évolution, rendue possible grâce à une technique d'élution unique, permettrait de coupler l'aspect multiplexage et maîtrise de la capture de protéines cibles en milieu complexe sur puce SPRi, avec l'automatisation par spray du prétraitement MS et la sensibilité exceptionnelle conférée par la source ESI.

Ainsi, les deux techniques leaders en MS devraient, à court terme, permettre une investigation poussée et complémentaire sur la même puce et offrir un choix d'approches analytiques selon les applications biologiques, médicales ou cliniques.

Liste des abréviations et anglicismes

11-MUOH	11- mercapto-1-undécanol
16-MHA	16- mercapto-1-hexadécanoique
3-HAP	3-hydroxypicolinique
AC	Angle de Contact
ACE	Antigène Carcino Embryonnaire
ADN	Acide desoxyribonucléique
AFM	Microscopie à Force Atomique
ALCAM	Activated leukocyte cell adhesion molecule
Antibody array	Puce à anticorps
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messager
Array	Tableau de spot
BE	Magnétique
BIAS-MS	Biomolecular Interaction Analysis - Mass Spectrometry
BSA	Albumine de Sérum de Bovin
CA-125	Carbohydrate Antigen 125
CCD	Charge-Coupled Device
CFM	Continuous Flow Microspotter
CID	Collision Induced Dissociation
CLIPP	CLinical and Innovation Proteomic Platform
DC	Direct Current
DHB	α-cyano-4-hydroxycinnamique
DTT	Dithiothréitol
EBPVD	Electron Beam Physical Vapeur Deposition
EDC	1-ethyl-3-[3-diméthylaminopropyl]carbodiimide
EIA	Enzyme Immuno Assay (dosage immuno enzymologique)
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (dosage avec un immuno adsorbant lié à un enzyme)
ESI	Ionisation par Electro Spray
ESI-MS	Electrospray Ionization Mass Spectrometry (Spectrométrie de masse par Ionisation par Electro Spray)
EWOD	Electrowetting On Dielectric
Fab	Fragment antigen binding
FDA	Food an Drug Administration

FEMTO-ST	Franche-Comté Electronique, Mécanique, Thermique et Optique - Sciences et Technologies
FET	Field Effect Transistor
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfert
FT-ICR	Clycotron à résonance des ions
hBCAT	human Branched Chain Aminotransferase enzymes
HCCA	Acide α-cyano-4-hydroxycinnamique
hCG	Human chorionic gonadotropin
HIV-1 Tat	Human immunodeficiency virus type 1 Trans-activator transcription
Home made	Fait maison
HSA	Human Serum Albumin
HUPO	The Human Proteome Organization
IgG	Immunoglobuline de type G
Immuno assay	Immuno dosage
IT	Ion Trap (Trappe ionique)
LAG-3	Lymphocyte activation gene-3
LC-ESI-MS	Liquid Chromatography Electrospray Ionization Mass Spectrometry
LID	Laser Induced Dissociation
LOD	Limite Of Detection
LOI	Limite Of Identification
LSPR	Localized Surface Plasmon Resonance (Résonance des plasmons de surface Localisée)
MA	Maladie d'Alzheimer
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation
MIMENTO	Microfabrication pour la Mécanique, les Nanosciences, la Thermique et l'Optique
MIPs	Moleculary Imprinted Polymers
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MS	Spéctrométrie de Masse
MS-MS	Spectrométrie de masse en tandem
Nanobody	Anticorps de petite taille composé d'un seul V_{HH}
NHS	N-hydroxysuccinimide
NIH	National Institute of Health
Off chip	Séparé de la puce
OG	d'Octyl-β-D-Glucopyranoside
On chip	Sur puce

OVA	Ovalbumine
Pattern	Schéma
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Réaction en chaîne par polymérase
PDMS	Polydiméthylsiloxane
PEEK	Polyéther éther cétone
PEG	Polyéthylène glycol
PF	Peak Force : Mode de fonctionnement d'AFM par mesure de force
PMF	Peptide Mass Fingerprinting
PMF	Peptide Mass Fingerprint
PPar	Peroxisome Proliferator-activated receptors
Protein array	Puce à protéines
PSA	Antigène Spécifique de la Prostate
Q	Quadripolaire
QCM	Microbalance à quartz
QDs	Quantum Dots
QNM	Quantitative Nanomechanic Property Measurements
Q-TOF	Quadripolaire à temps de vol
R&D	Recherche et développement
RBP	Retinol Binding Protein
RF	Radio Fréquence
RIA	Radio Immuno Assay (dosage radio immunologique)
ROI	Region Of Interest
RSA	Albumine de Sérum de Rat
SA	Acide sinapinique
SAGE	Serial Analyses of Gene Expression
SAM	Self Assembled Monolayers (monocouche auto assemblée)
SAW	Surface Acoustic Wave (ondes acoustiques de surface)
SC	Surface covering
SCG	Squamous cell carcinome
sdAb	Nanobody
SELDI	Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization
SELEX	Evolution of Ligands by EXponential enrichment (évolution systématique de ligands par enrichissement exponentiel)
Spotter	Appareil permettant le spotting
Spotting	Action de réaliser des spots par dépôt de goutte ou par voie fluidique

SPR	Surface Plasmon Resonance (Résonance des Plasmon de Surface)
SPRi	Imagerie SPR
SRM	Selected Reaction Monitoring
STIC	Sciences et Technologies de l'Information et de la Communication
Sulfo-NHS	N-hydroxysulfosuccinimide
SUPRA-MS	Surface Plasmon Resonance in Array coupled with Mass Spectrometry
Tapping	Mode de fonctionnement d'AFM par oscillation de la pointe
TCEP	Tris (2-Carboxyethyl) phosphine
TIR	Réflexion Totale Interne
TM	Onde polarisée Magnétique Transverse
TnTc	Troponine Cardiaque
TOF	Time Of Flight (temps de vol)
UV	Ultra Violet
V_H	Partie variable de la chaîne lourde d'un anticorps
V_{HH}	Partie variable d'un nanobody

ANNEXE 1

Marqueur	Type histologique tumoral	Organe (s)	Utilisation pratique
Antigène Carcino-Embryonnaire (ACE)	Adénocarcinomes	Colon Thyroïde	Suivi Suivi
CA 125	Adénocarcinomes	Ovaire	Suivi
CA 15-3	Adénocarcinomes	Sein	Suivi
CA 19-9	Adénocarcinomes	Colon Pancréas	Suivi Suivi
SCC	Carcinomes épidermoïdes	Col utérin Œsophage	Suivi Suivi
Cyfra-21	Carcinomes	Bronches	Suivi
Neurone Specific Enolase (NSE)	Tumeurs neuro-endocrines	Bronches	Suivi
Alphafoetoprotéine (AFP)	Tumeurs germinal séminomateuses	Testicule	Suivi Suivi Diagnostic
	Hépatocarcinomes	Foie	Pronostic Suivi
	Tumeurs germinales non séminomateuses	Testicule	
Lacticodéshydrogénases (LDH)	Tous types (reflet de la masse tumorale)	Tumeurs germinales	Pronostic Suivi
		Lymphome	Pronostic Suivi
Hormone Chorionique Gonadotrop (HCG)	Tumeurs germinales non séminomateuses	Testicules	Diagnostic Pronostic Suivi
	Tumeurs trophoblastiques	Placenta	Diagnostic Suivi
Antigène spécifique de prostate (PSA)		Prostate	Diagnostic Pronostic Suivi
Thyroglobuline		Thyroïde (Cancers différenciés)	Suivi
Thyrocalcitonine		Thyroïde (Cancer médullaires	Diagnostic Suivi
Immunoglobulines monoclonales		Plasmocytes	Diagnostic Suivi

Liste des principaux marqueurs tumoraux

ANNEXE 2

Réf	Milieu idéal/Tampon							Milieu complexe						
	Analyte	Concentration	Quantification	Pré traitement	MS en protéine entière (m/z)	PMF avec score significatif	MS-MS avec score significatif	Analyte	Concentration	Quantification	Pré traitement	MS en protéine entière (m/z)	PMF score significatif	MS-MS avec score significatif
D. Nedelkov **2000 [109]**	/	/	/	/	/	/	/	Retinol binding protein	N/A en plasma x 100	8 fmol/mm²	Spray: dépôt de matrice	21 048*	/	/
D.Nedelkov **2006 (110]**	/	/	/	/	/	/	/	b-2-microglobulin cystatin C transferring IGF-I & II	N/A en plasma humain x 10 or 50	N/A*	Spray: dépôt de matrice	N/A**	/	/
D.Nedelkov **2007 [111]**	b-2-microglobulin cystatin C transferring transthyretin C-reactive protein	100mM 100mM 100mM 100mM 2.3mg/mL	N/A**	Spray: dépôt de matrice	11 729.70* 12 323.01* 79 435.30* 13 879.42* 23008.07*	/	/	/	/	/	/	/	/	/
G. Treitz **2008 [112]**	Thrombin thrombin + antithrombin III	1µM 1µM 300nM	4.7pmol/mm² 4 fmol/mm² 0.8 fmol/mm²	Spotting manuel: digestion, réduction, alkylation, dépôt de matrice	/	70 /	/	/	/	/	/	/	/	/
W. Boireau **2009 [116]**	Lymphocyte-activation protein 3	160µg/mL	6.4 fmol/mm²	Spotting manuel: réduction, digestion tryptique, dépôt de matrice	/	82	52.94	/	/	/	/	/	/	/
S. Bellon **2009 [117]**	lactoglobulin ovalbumin	50µg/mL 50µg/mL	2 fmol/mm² 2 fmol/mm²	Spotting manuel: dépôt de matrice	18 473* 44 629* /	88 63	145 120		/	/	/	/	/	/
Y.E. Kim **2011 [114]**	C-reactive protein prostate-specific protein human Interleukin 6 bovine serum albumin prostate-specific protein	20 µg/mL 20 µg/mL 20 µg/mL 100µg/mL 100 µg/mL	N/A**	Spotting manuel: dépôt de matrice Digestion tryptique, dépôt de matrice	N/A* /	/ N/A***	/ /	C-reactive protein /	N/A in human serum untreated /	N/A /	Spotting manuel: depot de matrice /	N/A* /	/ /	/ /
PERFORMANCES INSUFISANTES POUR UNE PLATEFORME D'ANALYSE FIABLE ET ROBUSTE														

Liste des travaux réalisés depuis 2000 proposant une analyse MS sur puce sans élution

D. Nedelkov 2000 [**109**]:

*21048 m/z mesurée alors que le poids moléculaire théorique de la protéine RPS est de 21065 Da, Δm / z est trop grand pour une caractérisation fine de la molécule

D.Nedelkov 2006 [**110**]:

* Spotting en microarray sur puce SPR commerciale (Biacore) n'a pas permis de caractériser qualitativement et quantitativement les espèces capturés en SPR . Un bruit de fond important a été observé. De plus l'adsorption non spécifique a été observée sur les biopuces, les auteurs ne montrent pas de sensorgramme dans cette publication où ils n'utilisent pas la fluidique de l'instrumentation SPR.

** Il n'a pas été mentionné de valeur m / z dans les parties résultats et discussion, il n'ya pas de comparaison avec les valeurs théoriques de ces protéines.

D.Nedelkov 2007 [**111**]:

* Le poids moléculaire mesuré n'a pas été comparé à la valeur théorique.

** Seule l'image SPR a été montrée après interaction sans quantification des protéines capturées.

S. Bellon 2009 [**117**]:

* Le poids moléculaire mesuré n'a pas été comparé à la valeur théorique.

Y.E. Kim 2011 [**114**]:

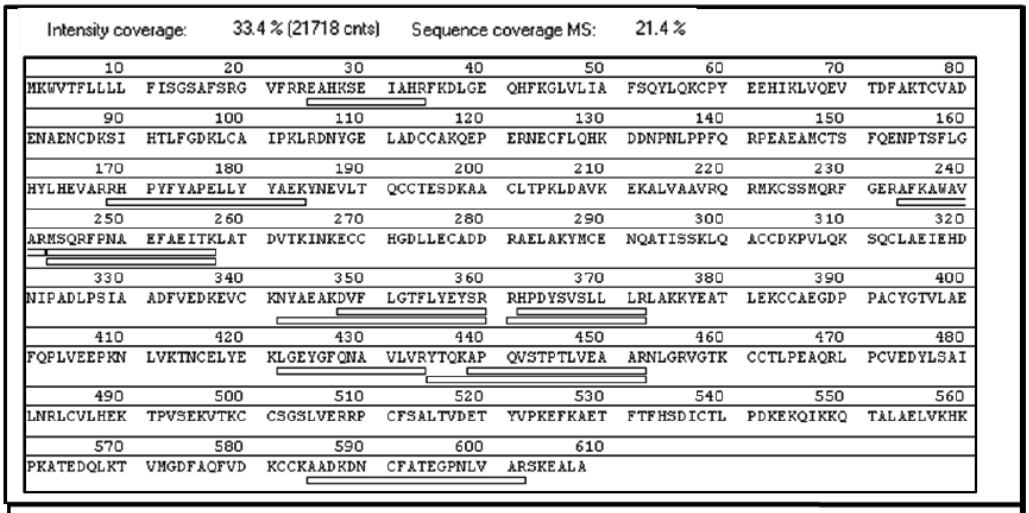
* Il n'a pas été mentionné de valeur m / z dans les parties résultats et discussion, il n'ya pas de comparaison avec les valeurs théoriques de ces protéines.

** Seule l'image SPR a été montrée après interaction sans quantification des protéines capturées.

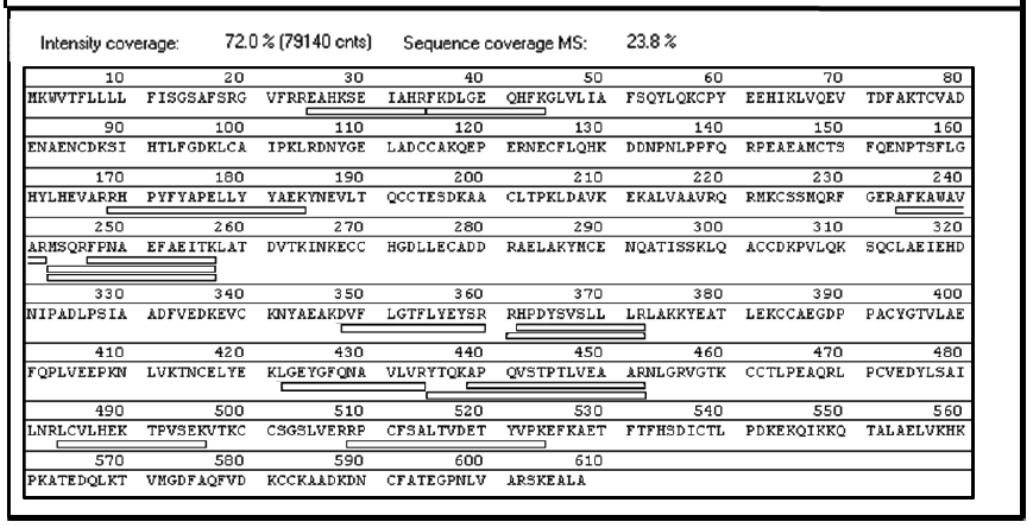
*** Trois peptides (m / z 1409,92, 1875,78 et 2233,46) ont été identifiés comme des résidus peptidiques de PSA, qui selon l'auteur, correspond bien avec des pics d'une digestion liquide de PSA (m / z 1408,31, 1872,94 et 2230,08). Mais afin d'obtenir une identification significative (score significatif), le Δ m / z ne doit pas dépasser 0,5 m / z dans auquel cas le logiciel ne pourra matcher le peptide.

ANNEXE 3

10 ng/µl



30 ng/µl



Couverture de séquence des peptides détectés après réduction et digestion de la RSA déposé à l'aide 10 femtomoles/mm^2 pour 10 et 30 ng/µl de trypsine

ANNEXE 4

```
        10         20         30         40         50         60
MWEAQFLGLL FLQPLWVAPV KPLQPGAEVP VVWAQEGAPA QLPCSPTIPL QDLSLLRRAG

        70         80         90        100        110        120
VTWQHQPDSG PPAAAPGHPL APGPHPAAPS SWGPRPRRYT VLSVGPGGLR SGRLPLQPRV

       130        140        150        160        170        180
QLDERGRQRG DFSLWLRPAR RADAGEYRAA VHLRDRALSC RLRLRLGQAS MTASPPGSLR

       190        200        210        220        230        240
ASDWVILNCS FSRPDRPASV HWFRNRGQGR VPVRESPHHH LAESFLFLPQ VSPMDSGPWG

       250        260        270        280        290        300
CILTYRDGFN VSIMYNLTVL GLEPPTPLTV YAGAGSRVGL PCRLPAGVGT RSFLTAKWTP

       310        320        330        340        350        360
PGGGPDLLVT GDNGDFTLRL EDVSQAQAGT YTCHIHLQEQ QLNATVTLAI ITVTPKSFGS

       370        380        390        400        410        420
PGSLGKLLCE VTPVSGQERF VWSSLDTPSQ RSFSGPWLEA QEAQLLSQPW QCQLYQGERL

       430        440        450        460        470        480
LGAAVYFTEL SSPGAQRSGR APGALPAGHL LLFLILGVLS LLLLVTGAFG FHLWRRQWRP

       490        500        510        520
RRFSALEQGI HPPQAQSKIE ELEQEPEPEP EPEPEPEPEP EPEQL
```

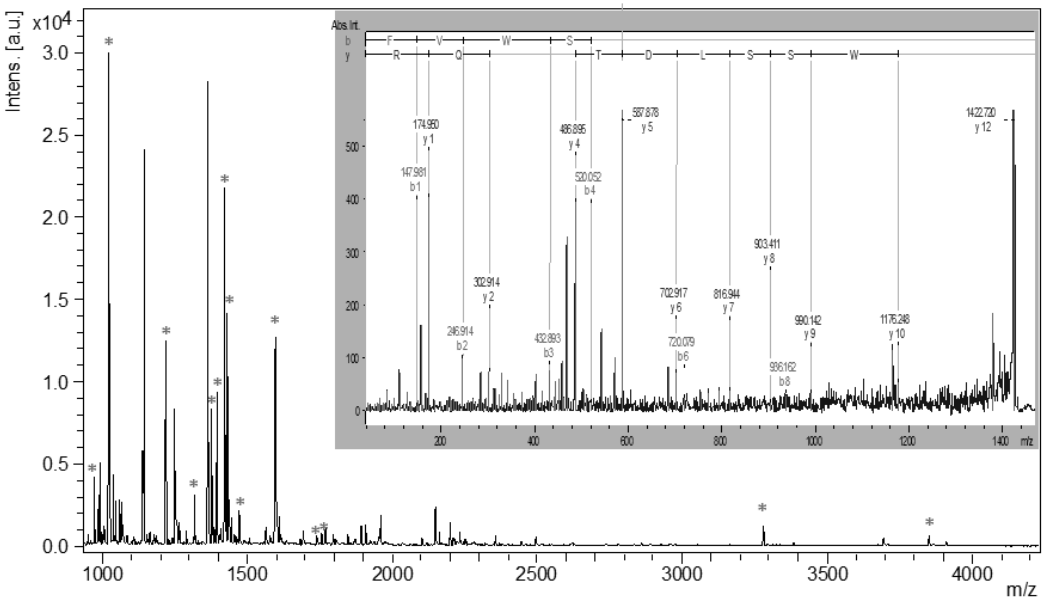
Theoretical pI/Mw: 8.14 / 57448.56

Séquence de la protéine LAG-3

ANNEXE 5

A

* Matched peptide list (m/z)
972.51
1023.60
1218.68
1317.71
1374.79
1395.79
1422.69
1430.73
1472.76
1601.85
1741.94
3279.57
3909.94



B

#	Species	SPRi-Plex SPR intensity (% of RV)	MALDI LAG3 Score MS	MALDI LAG3 Nb Pep	MALDI LAG3 Score MS/MS
1	α-LAG3 spot	5.81	101	13	25.16
2	α-LAG3 spot	5.55	109	13	32.78
3	α-LAG3 spot	6.10	107	13	27.84
4	α-LAG3 spot	5.96	60.6	11	37.85
5	α-RSA spot	0.42	/	/	/
6	α-RSA spot	0.42	/	/	/
/	Control surface	0.26	/	/	/
/	Control surface	0.29	/	/	/

Identification par MS de LAG-3 (capturé en plasma humain à 2.5 %) après prétraitement (A) et spectre MS-MS obtenu du pic 1422.70 m/z ainsi que la liste des peptides matchés. (B) Détails des résultats MS et MS-MS sur le peptide 1422.70 m/z des spots présentés en figure 89.

ANNEXE 6

Matériel et méthodes:

Protocole de préparation d'une biopuce à macroarray (4 x 4)

Une solution à 1 mM de 10 % de 16-MHA (acide 16- mercapto-1-hexadécanoique) et 90% de 11-MUOH (11- mercapto-1-undécanol) est préparée dans l'éthanol dans un bécher en verre et mélangée dans un bain à ultrason Elma pendant 10 min (puissance 90 W, fréquence 50/60 Hz). La puce d'or est immergée dans la solution pendant une nuit sous agitation à température ambiante puis est rincée à l'éthanol et à l'eau ultra pure.

La monocouche auto assemblée (SAM) est ensuite activée chimiquement en déposant sur la puce 240 µL de solution de Sulfo-NHS à 200 mM (N-hydroxysulfosuccinimide) et d'EDC à 50 mM (1-ethyl-3-[3-diméthylaminopropyl]carbodiimide). Après une incubation de 30 min à l'abri des UV et à température ambiante, la solution d'activation est rincée à l'eau ultra pure et la puce est séchée.

La puce activée est placée dans le spotter et maintenue en place par des ressorts. Du papier absorbant humidifié est ajouté dans les réservoirs et le couvercle en plexiglas (guide mécanique) est apposé et fixé par des vis. Les solutions d'anticorps sont préparées, généralement, à 200 µg/mL en tampon acétate 10 mM à pH adapté au meilleur rendement de greffage et de capture. Le spotting nécessite un volume de 270 à 300 nL de solution d'anticorps par spot (matrice de 4 x 4 spots). Après le dépôt des 16 gouttes, le spotter est placé dans un bécher, lui même placé dans un bac à ultrason (Elma; fréquence 37 kHz, puissance 30%) durant 30 min à 22 °C à l'abri des UV.

Après incubation, la puce est rincée à l'eau ultra pure et 240µL de solution de RSA à 40 µg/mL en tampon acétate pH 5 est déposée sur la puce pendant 30 min à l'abri des UV, à température ambiante. Après rinçage à l'eau ultra pure, 240 µL de solution d'éthanolamine 1 M (HCl pH 8.5) est déposée sur la puce pendant 30 min. La puce est ensuite rincée à l'eau ultra pure, puis séchée et montée dans l'appareil de SPRi.

Protocole d'expérimentation en SPRi-Plex II

L'appareil SPRi a été nettoyé préalablement au SDS 1% pendant 5 min à un débit de 500 µL/min, puis rincée selon les mêmes conditions. Une circulation de tampon de course, PBS à 10 mM (NaCl 138 mM, KcL 2,7 mM, pH 7,4 à 25 °C) dans lequel a été ajouté 0.05% de Tween 20, est effectué pendant 5 min à 500 µL/min avant le montage de la puce. Afin de préserver l'intégrité des éléments greffés sur la puce, sa surface n'est séchée que seulement quelques minutes entre le moment de la fin du rinçage de l'éthanolamine et le montage de la puce dans l'appareil. La puce est montée sur un prisme de verre à l'aide d'une huile de couplage d'indice 1.65 puis l'ensemble monté dans le SPRi-Plex II d'Horiba Scientific.

Le tampon PBS tween remplit la cuve à un débit de 1000 µL/min pendant 2 s afin de chasser l'intégralité de l'air présent dans celle-ci, puis le débit est abaissé à 50 µL/min. Une fois que l'effet Peltier a stabilisé la température de la cuve à 25 °C, la mesure des plasmons peut s'effectuer. Les ROIs sont ensuite sélectionnés sur les zones qui nous intéressent afin d'y mesurer la variation de réflectivité (VR). L'appareil d'imagerie SPR passe alors en mode "cinétique".

Une première injection d'un détergent non ionique, l'octyl-β-D-glucopyranoside (OG) à 40 mM de 30 s à 50 µL/min permet de nettoyer la surface de la puce d'éventuelles contaminations et des protéines qui ne se seraient pas greffées de façon covalente.

L'antigène peut alors être injecté à diverses concentrations et débits pour visualiser l'interaction et mesurer les niveaux de réponse.

Une injection d'OG à 40 mM de 30 s à 50 µL/min permet d'éliminer les interactions non spécifiques. Puis une injection de 200 µL à 50 µL/min est effectuée, mais le débit est stoppé après avoir rempli la cuve d'eau (saut d'indice négatif sur l'ensemble des ROIs). La puce est retirée du SRPi-Plex II puis séchée et stockée à l'abri des contaminations (kératines) et poussières. L'appareil est ensuite nettoyé selon le protocole préconisé par Horiba.

Analyse MS on-chip

L'étape de réduction des protéines sur la puce est réalisée par trois cycles d'une seconde de pulvérisation de TCEP 10 mmol.L^{-1} dans 0,1 mol.L^{-1} de NH_4HCO_3 via la station ImagePrep (spray: puissance 45%, modulation 20 %, chaque cycle est suivi d'une incubation de 3 s)

L'étape de digestion est réalisées par trois cycles d'une seconde de pulvérisation de trypsine à 30 ng/µL (spray: puissance 45%, modulation 20%, chaque cycle est suivi d'une incubation de 3 s).

Une étape d'hydratation par pulvérisation d'eau est réalisée deux fois par trois cycles d'une seconde après chaque étape via la station ImagePrep (spray: puissance 45%, modulation 20 %, chaque cycle est suivi d'une incubation de 3 s)

Toutes ces étapes sont suivies par un temps d'incubation de 90 s, à 37 °C.

La procédure de dépôt par spray (spray: puissance 45%, modulation 20%) de matrice HCCA (1 mg/mL à 50/50 vol/vol en eau/acetonitrile avec 0.25% TFA) à température ambiante est décrite dans le tableau 4 (III 2.3.1).

La puce est ensuite placée dans une plaque MALDI adaptée à son format et insérée dans l'instrumentation de spectrométrie de masse de type MALDI-TOF (UltrafleXtreme). La génération des spectres MS résulte d'une accumulation de 4000 tirs laser aléatoire dans chaque zone du spot (tension d'accélération de la source: 25 kV, temps d'extraction des ions: 80 ns).

Les spectres MS-MS sont obtenus en mode semi-automatique à une tension d'accélération de 7.5 kV et un temps d'extraction des ions de 60 ns. Chaque spectre MS-MS résulte d'une moyenne de 1000 tirs laser pour le mode parent et de 2000 tirs pour le mode fragment.

La séquence peptidique obtenue est alors comparée aux séquences peptidiques théoriques contenues dans la base de données Swiss-Prot TrEMBL et permet l'identification de la protéine avec comme paramètres de sélection : la base de données de mammifères, la digestion par trypsine et le manque d'un site de clivage. La probabilité pour que la protéine identifiée soit bien celle présente, est calculée par un algorithme Mascot Matrix Science (Mascot version 2.2.01 ; Boston, MA, USA) et donnée sous forme de score Mascot. Plus le score est élevé, plus le niveau de confiance dans l'identification de la protéine est important. Ce score est considéré comme significatif au-dessus de 40. La tolérance de masse en mode MS a été fixée à 50 ppm, tandis que la tolérance des masses des fragments en mode MS-MS a été fixée à 0,6 Da.

Références

1. Réflexion prospective autour des biomarqueurs 2009. at <http://www.dgcis.redressement-productif.gouv.fr/etudes-et-statistiques/reflexion-prospective-autour-des-biomarqueurs-decembre-2009>
2. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin. Pharmacol. Ther.* **69,** 89–95 (2001).
3. Jones, H. B. On a New Substance Occurring in the Urine of a Patient with Mollities Ossium. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* **138,** 55–62 (1848).
4. Patterson, S. D. & Aebersold, R. H. Proteomics: the first decade and beyond. *Nat. Genet.* **33 Suppl,** 311–323 (2003).
5. Enokida, H. *et al.* CpG hypermethylation of MDR1 gene contributes to the pathogenesis and progression of human prostate cancer. *Cancer Res.* **64,** 5956–5962 (2004).
6. Kaneuchi, M. *et al.* Expression and methylation status of 14-3-3 sigma gene can characterize the different histological features of ovarian cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **316,** 1156–1162 (2004).
7. Verma, M. & Srivastava, S. Epigenetics in cancer: implications for early detection and prevention. *The Lancet Oncology* **3,** 755–763 (2002).
8. http://www.edimark.fr/publications/articles/les-puces-a-adn/10741.
9. Velculescu, V. E., Zhang, L., Vogelstein, B. & Kinzler, K. W. Serial analysis of gene expression. *Science* **270,** 484–487 (1995).
10. Anderson, N. L. & Anderson, N. G. The Human Plasma Proteome History, Character, and Diagnostic Prospects. *Mol Cell Proteomics* **1,** 845–867 (2002).
11. Bijlsma, S. *et al.* Large-scale human metabolomics studies: A strategy for data (pre-) processing and validation. *Anal. Chem.* **78,** 567–574 (2006).
12. Denkert, C. *et al.* Mass spectrometry-based metabolic profiling reveals different metabolite patterns in invasive ovarian carcinomas and ovarian borderline tumors. *Cancer Res.* **66,** 10795–10804 (2006).
13. Andersson, H. & van den Berg, A. Microfluidic devices for cellomics: a review. *Sens. Actuator B-Chem.* **92,** 315–325 (2003).
14. Kilner, J. *et al.* A proteomic analysis of differential cellular responses to the short-chain fatty acids butyrate, valerate and propionate in colon epithelial cancer cells. *Mol. Biosyst.* **8,** 1146–1156 (2012).
15. Surinova, S. *et al.* On the development of plasma protein biomarkers. *J. Proteome Res.* **10,** 5–16 (2011).
16. Braillon, A., Hill, C. & Dubois, G. Prostate Specific Antigen (PSA), encore combien de dégâts ? *La Presse Médicale* **41,** 482–485 (2012).
17. Rigollet, L., Chauvelier, S., Schuch, G., Prigent, A. & Gauchez, A.-S. Précurseurs et dérivés du PSA : nouveaux marqueurs dans les pathologies prostatiques ? *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée* **22,** 101–106 (2007).
18. Salomon, L. *et al.* Recommandations en Onco-Urologie 2010 : Cancer de la prostate. *Progrès en Urologie* **20,** S217–S251 (2010).
19. Polanski, M. & Anderson, N. L. A List of Candidate Cancer Biomarkers for Targeted Proteomics. *Biomark Insights* **1,** 1–48 (2007).
20. Hutchinson, L. M. *et al.* Development of a sensitive and specific enzyme-linked immunosorbent assay for thymosin β15, a urinary biomarker of human prostate cancer. *Clinical Biochemistry* **38,** 558–571 (2005).

21. Visintin, I. *et al.* Diagnostic Markers for Early Detection of Ovarian Cancer. *Clin Cancer Res* **14,** 1065–1072 (2008).
22. Les biomarqueurs, les produits de santé et l'Afssaps. at <http://ansm.sante.fr/L-ANSM2/Biomarqueurs/Biomarqueurs-et-produits-de-sante/%28offset%29/0>
23. http://www.astrosurf.com/luxorion/Bio/proteine-structure1-4.gif.
24. Feinberg, M. *La Validation des méthodes d'analyse: Une approche chimiométrique de l'assurance qualité au laboratoire*. (Dunod, 2004).
25. Berson, S. A. & Yalow, R. S. General principles of radioimmunoassay. *Clinica Chimica Acta* **369,** 125–143 (2006).
26. Clark, L. & Lyons, C. Electrode Systems for Continuous Monitoring in Cardiovascular Surgery. *Ann.NY Acad.Sci.* **102,** 29–& (1962).
27. Cammann, K. *et al.* Chemical Sensors and Biosensors - Principles and Applications. *Angew. Chem.-Int. Edit. Engl.* **30,** 516–539 (1991).
28. Barker, S. L. R., Kopelman, R., Meyer, T. E. & Cusanovich, M. A. Fiber-optic nitric oxide-selective biosensors and nanosensors. *Anal. Chem.* **70,** 971–976 (1998).
29. Choi, M. M. F. Progress in Enzyme-Based Biosensors Using Optical Transducers. *Microchim. Acta* **148,** 107–132 (2004).
30. Pelster, L. N. & Minteer, S. D. Ubiquinol-cytochrome c reductase (Complex III) electrochemistry at multi-walled carbon nanotubes/Nafion modified glassy carbon electrodes. *Electrochimica Acta* **82,** 214–217 (2012).
31. Namdeo, M. & Bajpai, S. K. Immobilization of α-amylase onto cellulose-coated magnetite (CCM) nanoparticles and preliminary starch degradation study. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **59,** 134–139 (2009).
32. Arakawa, T. *et al.* Biosensor for L-phenylalanine based on the optical detection of NADH using a UV light emitting diode. *Microchim Acta* **173,** 199–205 (2011).
33. Rogers, K. R. & Mascini, M. Biosensors for field analytical monitoring. *Field Analytical Chemistry & Technology* **2,** 317–331 (1998).
34. Tothill, I. E. Biosensors developments and potential applications in the agricultural diagnosis sector. *Computers and Electronics in Agriculture* **30,** 205–218 (2001).
35. Porter, R. R. The hydrolysis of rabbit γ-globulin and antibodies with crystalline papain. *Biochem J* **73,** 119–127 (1959).
36. Edelman, G. M. Antibody structure and molecular immunology. *Science* **180,** 830–840 (1973).
37. Rutishauser, U., Cunningham, B. A., Bennett, C., Konigsberg, W. H. & Edelman, G. M. Amino acid sequence of the Fc region of a human gamma G-immunoglobulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **61,** 1414–1421 (1968).
38. Harris, L. J., Skaletsky, E. & McPherson, A. Crystallographic structure of an intact IgG1 monoclonal antibody. *Journal of Molecular Biology* **275,** 861–872 (1998).
39. SmarTTransfuser - A Biochip System for the Final ABO Compatibility Test. in 257–262 (SciTePress - Science and and Technology Publications, 2012). doi:10.5220/0003852402570262
40. Hamers-Casterman, C. *et al.* Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* **363,** 446–448 (1993).
41. Deffar, K., Shi, H., Li, L., Wang, X. & Zhu, X. Nanobodies - the new concept in antibody engineering. *Afr. J. Biotechnol.* **8,** 2645–2652 (2009).
42. Roovers, R. C. *et al.* Efficient inhibition of EGFR signaling and of tumour growth by antagonistic anti-EFGR Nanobodies. *Cancer Immunol. Immunother.* **56,** 303–317 (2007).
43. Abbady, A. Q., Al-Daoude, A., Al-Mariri, A., Zarkawi, M. & Muyldermans, S. Chaperonin GroEL a Brucella immunodominant antigen identified using Nanobody and

MALDI-TOF-MS technologies. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **146,** 254–263 (2012).
44. Walper, S. A., Brozozog Lee, P. A., Goldman, E. R. & Anderson, G. P. Comparison of single domain antibody immobilization strategies evaluated by surface plasmon resonance. *Journal of Immunological Methods* **388,** 68–77 (2013).
45. Rispens, T. *et al.* Label-free assessment of high-affinity antibody–antigen binding constants. Comparison of bioassay, SPR, and PEIA-ellipsometry. *Journal of Immunological Methods* **365,** 50–57 (2011).
46. Justino, C. I. L., Rocha-Santos, T. A., Duarte, A. C. & Rocha-Santos, T. A. Review of analytical figures of merit of sensors and biosensors in clinical applications. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **29,** 1172–1183 (2010).
47. Izadyar, L., Friboulet, A., Remy, M. H., Roseto, A. & Thomas, D. Monoclonal anti-idiotypic antibodies as functional internal images of enzyme active sites: production of a catalytic antibody with a cholinesterase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90,** 8876–8880 (1993).
48. Avalle, B., Débat, H., Friboulet, A. & Thomas, D. Catalytic mechanism of an abzyme displaying a beta-lactamase-like activity. *Appl Biochem Biotechnol* **83,** 163–171 (2000).
49. Ali, M., Hariharan, A. G., Mishra, N. & Jain, S. Catalytic antibodies as potential therapeutics. *Indian J. Biotechnol.* **8,** 253–258 (2009).
50. Kriz, D., Ramström, O. & Mosbach, K. Peer Reviewed: Molecular Imprinting: New Possibilities for Sensor Technology. *Anal. Chem.* **69,** 345A–349A (1997).
51. Scarano, S., Vestri, A., Ermini, M. L. & Minunni, M. SPR detection of human hepcidin-25: A critical approach by immuno- and biomimetic-based biosensing. *Biosensors and Bioelectronics* **40,** 135–140 (2013).
52. Haupt, K. & Mosbach, K. Molecularly Imprinted Polymers and Their Use in Biomimetic Sensors. *Chem. Rev.* **100,** 2495–2504 (2000).
53. Kan, X., Liu, T., Zhou, H., Li, C. & Fang, B. Molecular imprinting polymer electrosensor based on gold nanoparticles for theophylline recognition and determination. *Microchim Acta* **171,** 423–429 (2010).
54. Vasapollo, G. *et al.* Molecularly Imprinted Polymers: Present and Future Prospective. *Int J Mol Sci* **12,** 5908–5945 (2011).
55. Thibaut, J., Merieux, Y., Rigal, D. & Gillet, G. A novel assay for the detection of anti-human platelet antigen antibodies (HPA-1a) based on the peptide aptamer technology. *Haematologica* (2011). doi:10.3324/haematol.2011.051276
56. Wakeman, C. A., Winkler, W. C. & Dann III, C. E. Structural features of metabolite-sensing riboswitches. *Trends in Biochemical Sciences* **32,** 415–424 (2007).
57. http://bio349.biota.utoronto.ca/20069/bio349jerry1/aptameradvantages.html.
58. Chauveau, F., Pestourie, C. & Tavitian, B. [Aptamers: selection and scope of applications]. *Pathol. Biol.* **54,** 251–258 (2006).
59. Meini, N. *et al.* A sensitive and selective thrombin impedimetric aptasensor based on tailored aptamers obtained by solid-phase synthesis. *Sensors and Actuators B: Chemical* **166–167,** 715–720 (2012).
60. Deng, Q., German, I., Buchanan, D. & Kennedy, R. T. Retention and Separation of Adenosine and Analogues by Affinity Chromatography with an Aptamer Stationary Phase. *Anal. Chem.* **73,** 5415–5421 (2001).
61. Romig, T. S., Bell, C. & Drolet, D. W. Aptamer affinity chromatography:: combinatorial chemistry applied to protein purification. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* **731,** 275–284 (1999).

62. Michaud, M. *et al.* A DNA Aptamer as a New Target-Specific Chiral Selector for HPLC. *J. Am. Chem. Soc.* **125,** 8672–8679 (2003).
63. Sosic, A., Meneghello, A., Cretaio, E. & Gatto, B. Human Thrombin Detection Through a Sandwich Aptamer Microarray: Interaction Analysis in Solution and in Solid Phase. *Sensors* **11,** 9426–9441 (2011).
64. Laurenson, S. *et al.* Development of peptide aptamer microarrays for detection of HPV16 oncoproteins in cell extracts. *Analytical Biochemistry* **410,** 161–170 (2011).
65. Bin, X., Sargent, E. H. & Kelley, S. O. Nanostructuring of Sensors Determines the Efficiency of Biomolecular Capture. *Analytical Chemistry* **82,** 5928–5931 (2010).
66. Caruso, F., Rodda, E. & Furlong, D. N. Orientational Aspects of Antibody Immobilization and Immunological Activity on Quartz Crystal Microbalance Electrodes. *Journal of Colloid and Interface Science* **178,** 104–115 (1996).
67. Brillhart, K. L. & Ngo, T. T. Use of microwell plates carrying hydrazide groups to enhance antibody immobilization in enzyme immunoassays. *Journal of Immunological Methods* **144,** 19–25 (1991).
68. Love, J. C., Estroff, L. A., Kriebel, J. K., Nuzzo, R. G. & Whitesides, G. M. Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. *Chem. Rev.* **105,** 1103–1169 (2005).
69. Neouze, M.-A. & Schubert, U. Surface Modification and Functionalization of Metal and Metal Oxide Nanoparticles by Organic Ligands. *Monatsh Chem* **139,** 183–195 (2008).
70. Furuya, M., Haramura, M. & Tanaka, A. Reduction of nonspecific binding proteins to self-assembled monolayer on gold surface. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **14,** 537–543 (2006).
71. Leggett, G. J. *et al.* Approaches to the immobilization of proteins at surfaces for analysis by scanning tunneling microscopy. *Langmuir* **9,** 2356–2362 (1993).
72. Wang, J., Frostman, L. M. & Ward, M. D. Self-assembled thiol monolayers with carboxylic acid functionality: measuring pH-dependent phase transitions with the quartz crystal microbalance. *J. Phys. Chem.* **96,** 5224–5228 (1992).
73. David, C., Millot, M. C., Renard, E. & Sébille, B. Coupling of Antibodies to β-Cyclodextrin-Coated Gold Surfaces via an Intermediate Adamantyl-Modified Carboxymethylated Dextran Layer. *Journal of Inclusion Phenomena* **44,** 369–372 (2002).
74. Roussille, L. *et al.* Surface characterization and efficiency of a matrix-free and flat carboxylated gold sensor chip for surface plasmon resonance (SPR). *Anal Bioanal Chem* **401,** 1605–1621 (2011).
75. Malic, L., Sandros, M. G. & Tabrizian, M. Designed Biointerface Using Near-Infrared Quantum Dots for Ultrasensitive Surface Plasmon Resonance Imaging Biosensors. *Anal. Chem.* **83,** 5222–5229 (2011).
76. Munge, B. S. *et al.* Nanostructured Immunosensor for Attomolar Detection of Cancer Biomarker Interleukin-8 Using Massively Labeled Superparamagnetic Particles. *Angew Chem Int Ed Engl* **50,** 7915–7918 (2011).
77. Wang, Z. & Moult, J. SNPs, protein structure, and disease. *Hum. Mutat.* **17,** 263–270 (2001).
78. Tan, W. *et al.* Optical protein sensor for detecting cancer markers in saliva. *Biosensors and Bioelectronics* **24,** 266–271 (2008).
79. Cao, C. *et al.* A strategy for sensitivity and specificity enhancements in prostate specific antigen-alpha1-antichymotrypsin detection based on surface plasmon resonance. *Biosens Bioelectron* **21,** 2106–2113 (2006).

80. Piliarik, M., Bocková, M. & Homola, J. Surface plasmon resonance biosensor for parallelized detection of protein biomarkers in diluted blood plasma. *Biosensors and Bioelectronics* **26,** 1656–1661 (2010).
81. Zhou, W., Ma, Y., Yang, H., Ding, Y. & Luo, X. A label-free biosensor based on silver nanoparticles array for clinical detection of serum p53 in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Nanomedicine* **6,** 381–386 (2011).
82. Cody Stringer, R., Hoehn, D. & Grant, S. A. Quantum Dot-Based Biosensor for Detection of Human Cardiac Troponin I Using a Liquid-Core Waveguide. *IEEE Sensors Journal* **8,** 295–300 (2008).
83. Wilson, M. S. & Nie, W. Multiplex Measurement of Seven Tumor Markers Using an Electrochemical Protein Chip. *Anal. Chem.* **78,** 6476–6483 (2006).
84. Szűcs, J., Pretsch, E. & Gyurcsányi, R. E. Potentiometric enzyme immunoassay using miniaturized anion-selective electrodes for detection. *The Analyst* **134,** 1601 (2009).
85. Lee, I., Luo, X., Huang, J., Cui, X. T. & Yun, M. Detection of Cardiac Biomarkers Using Single Polyaniline Nanowire-Based Conductometric Biosensors. *Biosensors* **2,** 205–220 (2012).
86. Sadhasivam, S. *et al.* A real time detection of the ovarian tumor associated antigen 1 (OVTA 1) in human serum by quartz crystal microbalance immobilized with anti-OVTA 1 polyclonal chicken IgY antibodies. *Materials Science and Engineering: C* **32,** 2073–2078 (2012).
87. *an interleukin 6 zno sio2 si surface acoustic wave biosensor pdf free ebook download*. at <http://ebookbrowse.com/an-interleukin-6-zno-sio2-si-surface-acoustic-wave-biosensor-pdf-d408982714>
88. Ruslinda, A. R., Tanabe, K., Ibori, S., Wang, X. & Kawarada, H. Effects of diamond-FET-based RNA aptamer sensing for detection of real sample of HIV-1 Tat protein. *Biosens. Bioelectron.* **40,** 277–282 (2013).
89. Lequin, R. M. Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Clinical Chemistry* **51,** 2415–2418 (2005).
90. Triebel, F., Hacene, K. & Pichon, M.-F. A soluble lymphocyte activation gene-3 (sLAG-3) protein as a prognostic factor in human breast cancer expressing estrogen or progesterone receptors. *Cancer Letters* **235,** 147–153 (2006).
91. Raut, S. & Gaffney, P. J. Interaction of heparin with fibrinogen using surface plasmon resonance technology: investigation of heparin binding site on fibrinogen. *Thromb. Res.* **81,** 503–509 (1996).
92. Roh, S., Chung, T. & Lee, B. Overview of the Characteristics of Micro- and Nano-Structured Surface Plasmon Resonance Sensors. *Sensors* **11,** 1565–1588 (2011).
93. Kretschmann, E. & Raether, H. Radiative decay of nonradiative surface plasmons excited by light. *Z. Naturforsch. A* **23,** 2135 (1968).
94. Otto, A. Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection. *Z. Physik* **216,** 398–410 (1968).
95. Stenberg, E., Persson, B., Roos, H. & Urbaniczky, C. Quantitative determination of surface concentration of protein with surface plasmon resonance using radiolabeled proteins. *Journal of Colloid and Interface Science* **143,** 513–526 (1991).
96. http://www.horiba.com/scientific/products/surface-plasmon-resonance-imaging-spri/details/spri-plex-tm-76/.
97. Rich, R. L. & Myszka, D. G. Advances in surface plasmon resonance biosensor analysis. *Curr. Opin. Biotechnol.* **11,** 54–61 (2000).
98. Lee, H. J., Wark, A. W. & Corn, R. M. Microarray methods for protein biomarker detection. *Analyst* **133,** 975–983 (2008).

99. Yip, Y. L. *et al.* The Swiss-Prot variant page and the ModSNP database: a resource for sequence and structure information on human protein variants. *Hum. Mutat.* **23,** 464–470 (2004).
100. Li, X., Keskin, O., Ma, B., Nussinov, R. & Liang, J. Protein-protein interactions: hot spots and structurally conserved residues often locate in complemented pockets that pre-organized in the unbound states: implications for docking. *J. Mol. Biol.* **344,** 781–795 (2004).
101. *The Sequence of the human genome pdf free ebook download*. at <http://ebookbrowse.com/the-sequence-of-the-human-genome-pdf-d158667699>
102. Kosak, S. T. Gene Order and Dynamic Domains. *Science* **306,** 644–647 (2004).
103. Kenyon, G. L. *et al.* Defining the Mandate of Proteomics in the Post-Genomics Era: Workshop Report ©2002 National Academy of Sciences, Washington, D.C., USA. Reprinted with permission from the National Academies Press for the National Academy of Sciences. All rights reserved. The original report may be viewed online at http://www.nap.edu/catalog/10209.html. *Mol Cell Proteomics* **1,** 763–780 (2002).
104. Tessitore, A. *et al.* Serum Biomarkers Identification by Mass Spectrometry in High-Mortality Tumors. *International Journal of Proteomics* **2013,** (2013).
105. Anderson, L. & Hunter, C. L. Quantitative Mass Spectrometric Multiple Reaction Monitoring Assays for Major Plasma Proteins. *Mol Cell Proteomics* **5,** 573–588 (2006).
106. Kitteringham, N. R., Jenkins, R. E., Lane, C. S., Elliott, V. L. & Park, B. K. Multiple reaction monitoring for quantitative biomarker analysis in proteomics and metabolomics. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **877,** 1229–1239 (2009).
107. Vogeser, M. & Seger, C. Pitfalls associated with the use of liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the clinical laboratory. *Clin. Chem.* **56,** 1234–1244 (2010).
108. Duncan, M. W., Yergey, A. L. & Patterson, S. D. Quantifying proteins by mass spectrometry: the selectivity of SRM is only part of the problem. *Proteomics* **9,** 1124–1127 (2009).
109. Stigter, E. C. A., de Jong, G. J. & van Bennekom, W. P. Coupling surface-plasmon resonance and mass spectrometry to quantify and to identify ligands. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* (2012). doi:10.1016/j.trac.2012.09.004
110. Hutchens, T. W. & Yip, T.-T. New desorption strategies for the mass spectrometric analysis of macromolecules. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **7,** 576–580 (1993).
111. Reddy, G. & Dalmasso, E. A. SELDI ProteinChip® Array Technology: Protein-Based Predictive Medicine and Drug Discovery Applications. *J Biomed Biotechnol* **2003,** 237–241 (2003).
112. Issaq, H. J., Veenstra, T. D., Conrads, T. P. & Felschow, D. The SELDI-TOF MS Approach to Proteomics: Protein Profiling and Biomarker Identification. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **292,** 587–592 (2002).
113. Bons, J. A. P., de Boer, D., van Dieijen-Visser, M. P. & Wodzig, W. K. W. H. Standardization of calibration and quality control using surface enhanced laser desorption ionization-time of flight-mass spectrometry. *Clin. Chim. Acta* **366,** 249–256 (2006).
114. Popescu, I. D., Albulescu, R., Raducan, E., Dinischiotu, A. & Tanase, C. Applications of SELDI-TOF technology in cancer biomarkers discovery. *Rom. Biotech. Lett.* **15,** 5654–5667 (2010).
115. Natsume, T. *et al.* Combination of Biomolecular Interaction Analysis and Mass Spectrometric Amino Acid Sequencing. *Anal. Chem.* **72,** 4193–4198 (2000).

116. Stigter, E. C. A., de Jong, G. J. & van Bennekom, W. P. Development of an on-line SPR-digestion-nanoLC-MS/MS system for the quantification and identification of interferon-γ in plasma. *Biosensors and Bioelectronics* **24,** 2184–2190 (2009).
117. Catimel, B. *et al.* Biosensor-Based Micro-Affinity Purification for the Proteomic Analysis of Protein Complexes. *J. Proteome Res.* **4,** 1646–1656 (2005).
118. Larsericsdotter, H. *et al.* Optimizing the surface plasmon resonance/mass spectrometry interface for functional proteomics applications: How to avoid and utilize nonspecific adsorption. *PROTEOMICS* **6,** 2355–2364 (2006).
119. Zhukov, A., Schürenberg, M., Jansson, Ö., Areskoug, D. & Buijs, J. Integration of Surface Plasmon Resonance with Mass Spectrometry: Automated Ligand Fishing and Sample Preparation for MALDI MS Using a Biacore 3000 Biosensor. *J Biomol Tech* **15,** 112–119 (2004).
120. Abrantes, M., Magone, M. T., Boyd, L. F. & Schuck, P. Adaptation of a Surface Plasmon Resonance Biosensor with Microfluidics for Use with Small Sample Volumes and Long Contact Times. *Anal. Chem.* **73,** 2828–2835 (2001).
121. Catimel, B., Weinstock, J., Nerrie, M., Domagala, T. & Nice, E. C. Micropreparative ligand fishing with a cuvette-based optical mirror resonance biosensor. *J Chromatogr A* **869,** 261–273 (2000).
122. Borch, J. & Roepstorff, P. Screening for Enzyme Inhibitors by Surface Plasmon Resonance Combined with Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **76,** 5243–5248 (2004).
123. Borch, J. & Roepstorff, P. Combinations of SPR arid MS for characterization of native and recombinant proteins in cell lysates. *Mol. Biotechnol.* **33,** 179–190 (2006).
124. Natsume, T. *et al.* Rapid analysis of protein interactions: On-chip micropurification of recombinant protein expressed in Esherichia coli. *Proteomics* **2,** 1247–1253 (2002).
125. Ravanat, C. *et al.* Use of tandem Biacore-mass spectrometry to identify platelet membrane targets of novel monoclonal antibodies. *Anal. Biochem.* **386,** 237–243 (2009).
126. Henn, C., Boettcher, S., Steinbach, A. & Hartmann, R. W. Catalytic enzyme activity on a biosensor chip: combination of surface plasmon resonance and mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **428,** 28–30 (2012).
127. Marchesini, G. R. *et al.* Nanoscale affinity chip interface for coupling inhibition SPR immunosensor screening with Nano-LC TOF MS. *Anal. Chem.* **80,** 1159–1168 (2008).
128. Marchesini, G. R. *et al.* Towards Surface Plasmon Resonance biosensing combined with bioaffinity-assisted nano HILIC Liquid Chromatography / Time-of-flight Mass Spectrometry identification of Paralytic Shellfish Poisons. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **28,** 792–803 (2009).
129. Madeira, A. *et al.* Coupling surface plasmon resonance to mass spectrometry to discover novel protein-protein interactions. *Nat Protoc* **4,** 1023–1037 (2009).
130. Sönksen, C. P., Nordhoff, E., Jansson, O., Malmqvist, M. & Roepstorff, P. Combining MALDI mass spectrometry and biomolecular interaction analysis using a biomolecular interaction analysis instrument. *Anal. Chem.* **70,** 2731–2736 (1998).
131. Lopez, F. *et al.* Improved sensitivity of biomolecular interaction analysis mass spectrometry for the identification of interacting molecules. *Proteomics* **3,** 402–412 (2003).
132. Visser, N. F. C., Scholten, A., van den Heuvel, R. H. H. & Heck, A. J. R. Surface-Plasmon-Resonance-Based Chemical Proteomics: Efficient Specific Extraction and Semiquantitative Identification of Cyclic Nucleotide-Binding Proteins from Cellular Lysates by Using a Combination of Surface Plasmon Resonance, Sequential Elution and Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *ChemBioChem* **8,** 298–305 (2007).

133. Bouffartigues, E., Leh, H., Anger-Leroy, M., Rimsky, S. & Buckle, M. Rapid coupling of Surface Plasmon Resonance (SPR and SPRi) and ProteinChip™ based mass spectrometry for the identification of proteins in nucleoprotein interactions. *Nucleic Acids Research* **35,** e39 (2007).
134. Nedelkov, D. & Nelson, R. W. Practical considerations in BIA/MS: optimizing the biosensor-mass spectrometry interface. *J. Mol. Recognit.* **13,** 140–145 (2000).
135. Nedelkov, D., Tubbs, K. A. & Nelson, R. W. Surface plasmon resonance-enabled mass spectrometry arrays. *ELECTROPHORESIS* **27,** 3671–3675 (2006).
136. Nedelkov, D. Development of Surface Plasmon Resonance Mass Spectrometry Array Platform. *Anal. Chem.* **79,** 5987–5990 (2007).
137. Krone, J. R., Nelson, R. W., Dogruel, D., Williams, P. & Granzow, R. BIA/MS: interfacing biomolecular interaction analysis with mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **244,** 124–132 (1997).
138. Nedelkov, D., Rasooly, A. & Nelson, R. W. Multitoxin biosensor-mass spectrometry analysis: a new approach for rapid, real-time, sensitive analysis of staphylococcal toxins in food. *Int. J. Food Microbiol.* **60,** 1–13 (2000).
139. Nedelkov, D. & Nelson, R. W. Analysis of native proteins from biological fluids by biomolecular interaction analysis mass spectrometry (BIA/MS): exploring the limit of detection, identification of non-specific binding and detection of multi-protein complexes. *Biosensors and Bioelectronics* **16,** 1071–1078 (2001).
140. Grote, J., Dankbar, N., Gedig, E. & Koenig, S. Surface Plasmon Resonance/Mass Spectrometry Interface. *Anal. Chem.* **77,** 1157–1162 (2005).
141. Boireau, W., Rouleau, A., Lucchi, G. & Ducoroy, P. Revisited BIA-MS combination: Entire 'on-a-chip' processing leading to the proteins identification at low femtomole to sub-femtomole levels. *Biosensors and Bioelectronics* **24,** 1121–1127 (2009).
142. Lausted, C., Hu, Z. & Hood, L. Quantitative Serum Proteomics from Surface Plasmon Resonance Imaging. *Mol Cell Proteomics* **7,** 2464–2474 (2008).
143. Anker, J. N. *et al.* Detection and Identification of Bioanalytes with High Resolution LSPR Spectroscopy and MALDI Mass Spectrometry. *J. Phys. Chem. C* **113,** 5891–5894 (2009).
144. Grasso, G., Bush, A. I., D'Agata, R., Rizzarelli, E. & Spoto, G. Enzyme solid-state support assays: a surface plasmon resonance and mass spectrometry coupled study of immobilized insulin degrading enzyme. *European Biophysics Journal* **38,** 407–414 (2008).
145. Kim, Y. E., Yi, S. Y., Lee, C.-S., Jung, Y. & Chung, B. H. Gold patterned biochips for on-chip immuno-MALDI-TOF MS: SPR imaging coupled multi-protein MS analysis. *Analyst* **137,** 386–392 (2011).
146. Nelson, R. W., Jarvik, J. W., Taillon, B. E. & Tubbs, K. A. BIA/MS of epitope-tagged peptides directly from E. coli lysate: multiplex detection and protein identification at low-femtomole to subfemtomole levels. *Anal. Chem.* **71,** 2858–2865 (1999).
147. Hayano, T. *et al.* Automated SPR-LC-MS/MS system for protein interaction analysis. *J. Proteome Res.* **7,** 4183–4190 (2008).
148. Situ, C., Mooney, M. H., Elliott, C. T. & Buijs, J. Advances in surface plasmon resonance biosensor technology towards high-throughput, food-safety analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **29,** 1305–1315 (2010).
149. Natsume, T., Nakayama, H. & Isobe, T. BIA–MS–MS: biomolecular interaction analysis for functional proteomics. *Trends in Biotechnology* **19,** S28–S33 (2001).

150. Rouleau, A., Osta, M., Lucchi, G., Ducoroy, P. & Boireau, W. Immuno-MALDI-MS in Human Plasma and On-Chip Biomarker Characterizations at the Femtomole Level. *Sensors* **12,** 15119–15132 (2012).
151. Bellon, S. *et al.* Hyphenation of Surface Plasmon Resonance Imaging to Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry by On-Chip Mass Spectrometry and Tandem Mass Spectrometry Analysis. *Analytical Chemistry* **81,** 7695–7702 (2009).
152. Inuta, M., Arakawa, R. & Kawasaki, H. Use of thermally annealed multilayer gold nanoparticle films in combination analysis of localized surface plasmon resonance sensing and MALDI mass spectrometry. *Analyst* **136,** 1167–1176 (2011).
153. Treitz, G., Gronewold, T. M. A., Quandt, E. & Zabe-Kühn, M. Combination of a SAW-biosensor with MALDI mass spectrometric analysis. *Biosensors and Bioelectronics* **23,** 1496–1502 (2008).
154. Nedelkov, D. & Nelson, R. W. Design and use of multi-affinity surfaces in biomolecular interaction analysis-mass spectrometry (BIA/MS): a step toward the design of SPR/MS arrays. *J. Mol. Recognit.* **16,** 15–19 (2003).
155. Dick, L. W. & McGown, L. B. Aptamer-Enhanced Laser Desorption/Ionization for Affinity Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **76,** 3037–3041 (2004).
156. Oran, P. E., Jarvis, J. W., Borges, C. R., Sherma, N. D. & Nelson, R. W. Mass spectrometric immunoassay of intact insulin and related variants for population proteomics studies. *PROTEOMICS - Clinical Applications* **5,** 454–459 (2011).
157. Wood, R. W. On a Remarkable Case of Uneven Distribution of Light in a Diffraction Grating Spectrum. *Proceedings of the Physical Society of London* **18,** 269–275 (1902).
158. FANO, U. The Theory of Anomalous Diffraction Gratings and of Quasi-Stationary Waves on Metallic Surfaces (Sommerfeld?s Waves). *J. Opt. Soc. Am.* **31,** 213–222 (1941).
159. Liedberg, B., Nylander, C. & Lunström, I. Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. *Sensors and Actuators* **4,** 299–304 (1983).
160. Schiebener, P., Straub, J., Levelt Sengers, J. M. H. & Gallagher, J. S. Refractive index of water and steam as function of wavelength, temperature and density. *Journal of Physical and Chemical Reference Data* **19,** 677–717 (1990).
161. Lecaruyer, P., Canva, M. & Rolland, J. Metallic film optimization in a surface plasmon resonance biosensor by the extended Rouard method. *Appl. Opt.* **46,** 2361–2369 (2007).
162. Kukanskis, K. *et al.* Detection of DNA hybridization using the TISPR-1 surface plasmon resonance biosensor. *Anal. Biochem.* **274,** 7–17 (1999).
163. Xinglong, Y. *et al.* Micro-array detection system for gene expression products based on surface plasmon resonance imaging. *Sensors and Actuators B: Chemical* **91,** 133–137 (2003).
164. Smith, E. A. *et al.* Formation, Spectroscopic Characterization, and Application of Sulfhydryl-Terminated Alkanethiol Monolayers for the Chemical Attachment of DNA onto Gold Surfaces. *Langmuir* **17,** 2502–2507 (2001).
165. Stemmler, I., Brecht, A. & Gauglitz, G. Compact surface plasmon resonance-transducers with spectral readout for biosensing applications. *Sensors and Actuators B: Chemical* **54,** 98–105 (1999).
166. Hoogvliet, J. C. & van Bennekom, W. P. Gold thin-film electrodes: an EQCM study of the influence of chromium and titanium adhesion layers on the response. *Electrochimica Acta* **47,** 599–611 (2001).
167. Lecaruyer, P., Maillart, E., Canva, M. & Rolland, J. Generalization of the Rouard method to an absorbing thin-film stack and application to surface plasmon resonance. *Appl. Opt.* **45,** 8419–8423 (2006).

168. Zynio, S. A., Samoylov, A. V., Surovtseva, E. R., Mirsky, V. M. & Shirshov, Y. M. Bimetallic Layers Increase Sensitivity of Affinity Sensors Based on Surface Plasmon Resonance. *Sensors* **2,** 62–70 (2002).
169. http://www.filmetrics.com/refractive-index-database/Au/Gold.
170. Maillart, E. Imagerie par résonance des plasmons de surface pour l'analyse simultanée de multiples interactions biomoléculaires en temps réel. (2004). at <http://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00006480>
171. Johnson, P. B. & Christy, R. W. Optical constants of transition metals: Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, and Pd. *Phys. Rev. B* **9,** 5056–5070 (1974).
172. 'Process standard de pulvérisation cathodique (Pulvé Plassys)'. Rapport interne à l'attention des utilisateurs salle-blanche MIMENTO (2006). Version du 26/10/2006.
173. Kolomenski, A., Kolomenskii, A., Noel, J., Peng, S. & Schuessler, H. Propagation length of surface plasmons in a metal film with roughness. *Appl. Opt.* **48,** 5683–5691 (2009).
174. De Feijter, J. A., Benjamins, J. & Veer, F. A. Ellipsometry as a tool to study the adsorption behavior of synthetic and biopolymers at the air–water interface. *Biopolymers* **17,** 1759–1772 (1978).
175. Di Primo, C. & Lebars, I. Determination of refractive index increment ratios for protein–nucleic acid complexes by surface plasmon resonance. *Analytical Biochemistry* **368,** 148–155 (2007).
176. Karlsson, R., Michaelsson, A. & Mattsson, L. Kinetic analysis of monoclonal antibody-antigen interactions with a new biosensor based analytical system. *Journal of Immunological Methods* **145,** 229–240 (1991).
177. Liedberg, B., Lundström, I. & Stenberg, E. Principles of biosensing with an extended coupling matrix and surface plasmon resonance. *Sensors and Actuators B: Chemical* **11,** 63–72 (1993).
178. Jung, L. S., Campbell, C. T., Chinowsky, T. M., Mar, M. N. & Yee, S. S. Quantitative Interpretation of the Response of Surface Plasmon Resonance Sensors to Adsorbed Films. *Langmuir* **14,** 5636–5648 (1998).
179. Elie-Caille, C., Rauch, J.-Y., Rouleau, A. & Boireau, W. Preparation of flat gold terraces for protein chip developments. *Micro & Nano Letters* **4,** 88 (2009).
180. Xu, H., Lu, J. R. & Williams, D. E. Effect of Surface Packing Density of Interfacially Adsorbed Monoclonal Antibody on the Binding of Hormonal Antigen Human Chorionic Gonadotrophin. *The Journal of Physical Chemistry B* **110,** 1907–1914 (2006).
181. Binnig, G., Quate, C. F. & Gerber, C. Atomic Force Microscope. *Phys. Rev. Lett.* **56,** 930–933 (1986).
182. ttps://www.bruker.com/fileadmin/user_upload/8-PDF-Docs/SurfaceAnalysis/AFM/Webinars/Nanomechanical_AFM_measurements_on_biological_samples-Jan2013-AFMWebinar.pdf.
183. San Paulo, A. & García, R. High-resolution imaging of antibodies by tapping-mode atomic force microscopy: attractive and repulsive tip-sample interaction regimes. *Biophys. J.* **78,** 1599–1605 (2000).
184. Beavis, R. C. & Chait, B. T. Velocity distributions of intact high mass polypeptide molecule ions produced by matrix assisted laser desorption. *Chemical Physics Letters* **181,** 479–484 (1991).
185. Karas, M., Bachmann, D., Bahr, U. & Hillenkamp, F. Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **78,** 53–68 (1987).

186. Karas, M. & Hillenkamp, F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal. Chem.* **60,** 2299–2301 (1988).
187. Tanaka, K. *et al.* Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2,** 151–153 (1988).
188. Kussmann, M. *et al.* Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Sample Preparation Techniques Designed for Various Peptide and Protein Analytes. *Journal of Mass Spectrometry* **32,** 593–601 (1997).
189. Yergey, A. L. *et al.* De novo sequencing of peptides using MALDI/TOF-TOF. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **13,** 784–791 (2002).
190. Schnaible, V. *et al.* Screening for Disulfide Bonds in Proteins by MALDI In-Source Decay and LIFT-TOF/TOF-MS. *Anal. Chem.* **74,** 4980–4988 (2002).
191. Suckau, D. *et al.* A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics. *Anal Bioanal Chem* **376,** 952–965 (2003).
192. Medzihradszky, K. F. *et al.* The characteristics of peptide collision-induced dissociation using a high-performance MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometer. *Anal. Chem.* **72,** 552–558 (2000).
193. David, C. *Mécanismes de réduction des ponts S-S dans les protéines étudiés par spectroscopie Raman et modélisation moléculaire*. (2009).
194. http://www.bruker.com/fr/products/mass-spectrometry-and-separations/maldi-ms/imageprep/overview.html.
195. http://www.bruker.com/fr/products/mass-spectrometry-and-separations/maldi-ms/imageprep/technical-details.html.
196. Schuerenberg, M., Luebbert, C., Deininger, S.-O., Ketterlinus, R. & Suckau, D. MALDI tissue imaging: mass spectrometric localization of biomarkers in tissue slices. *Nature Methods* **4,** (2007).
197. Sun, W. Microwave-assisted Protein Preparation and Enzymatic Digestion in Proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics* **5,** 769–776 (2005).
198. Li, B., Van Roey, M., Triebel, F. & Jooss, K. Lymphocyte activation gene-3 fusion protein increases the potency of a granulocyte macrophage colony-stimulating factor-secreting tumor cell immunotherapy. *Clin. Cancer Res.* **14,** 3545–3554 (2008).
199. Kausaite-Minkstimiene, A., Ramanaviciene, A., Kirlyte, J. & Ramanavicius, A. Comparative Study of Random and Oriented Antibody Immobilization Techniques on the Binding Capacity of Immunosensor. *Anal. Chem.* **82,** 6401–6408 (2010).
200. Briand, E., Salmain, M., Compère, C. & Pradier, C.-M. Immobilization of Protein A on SAMs for the elaboration of immunosensors. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **53,** 215–224 (2006).
201. Bashir, A. Growth and structural characterization of self-assembled monolayers (SAMs) on gold made from functionalized thiols and selenols. (2008). at <http://d-nb.info/990398129/34>
202. Dubois, L. H. & Nuzzo, R. G. Synthesis, Structure, and Properties of Model Organic Surfaces. *Annual Review of Physical Chemistry* **43,** 437–463 (1992).
203. Ulman, A. Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers. *Chem. Rev.* **96,** 1533–1554 (1996).
204. Tsai, W.-C. & Pai, P.-J. R. Surface plasmon resonance-based immunosensor with oriented immobilized antibody fragments on a mixed self-assembled monolayer for the determination of staphylococcal enterotoxin B. *Microchim Acta* **166,** 115–122 (2009).
205. Wink, T., vanZuilen, S. J., Bult, A. & vanBennekom, W. P. Self-assembled monolayers for biosensors. *Analyst* **122,** R43–R50 (1997).

206. Frederix, F. *et al.* Enhanced performance of an affinity biosensor interface based on mixed self-assembled monolayers of thiols on gold. *Langmuir* **19,** 4351–4357 (2003).
207. Bolduc, O. R., Pelletier, J. N. & Masson, J.-F. SPR Biosensing in Crude Serum Using Ultralow Fouling Binary Patterned Peptide SAM. *Anal. Chem.* **82,** 3699–3706 (2010).
208. Ren, J., Ding, X., Greer, J. J. & Shankar, K. Increased detection of human cardiac troponin I by a decrease of nonspecific adsorption in diluted self-assembled monolayers. *Applied Surface Science* **258,** 5230–5237 (2012).
209. Huang, L. *et al.* Prostate-specific antigen immunosensing based on mixed self-assembled monolayers, camel antibodies and colloidal gold enhanced sandwich assays. *Biosensors and Bioelectronics* **21,** 483–490 (2005).
210. Worley, C. G. & Linton, R. W. Removing sulfur from gold using ultraviolet/ozone cleaning. *Journal of Vacuum Science Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films* **13,** 2281–2284 (1995).
211. Willey, T. M. *et al.* Rapid degradation of alkanethiol-based self-assembled monolayers on gold in ambient laboratory conditions. *Surface Science* **576,** 188–196 (2005).
212. Vashist, S. K. Comparison of 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) Carbodiimide Based Strategies to Crosslink Antibodies on Amine-Functionalized Platforms for Immunodiagnostic Applications. *Diagnostics* **2,** 23–33 (2012).
213. DeRisi, J. *et al.* Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nat. Genet.* **14,** 457–460 (1996).
214. Chee, M. *et al.* Accessing genetic information with high-density DNA arrays. *Science* **274,** 610–614 (1996).
215. DeRisi, J. L., Iyer, V. R. & Brown, P. O. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* **278,** 680–686 (1997).
216. Reese, M. O., van Dam, R. M., Scherer, A. & Quake, S. R. Microfabricated Fountain Pens for High-Density DNA Arrays. *Genome Res* **13,** 2348–2352 (2003).
217. Stears, R. L., Martinsky, T. & Schena, M. Trends in microarray analysis. *Nat. Med.* **9,** 140–145 (2003).
218. Hu, H. & Larson, R. G. Analysis of the microfluid flow in an evaporating sessile droplet. *Langmuir* **21,** 3963–3971 (2005).
219. Zheng, R. A study of the evaporative deposition process: pipes and truncated transport dynamics. *Eur Phys J E Soft Matter* **29,** 205–218 (2009).
220. Widom, B. Line Tension and the Shape of a Sessile Drop. *J. Phys. Chem.* **99,** 2803–2806 (1995).
221. Hu, H. & Larson, R. G. Analysis of the Effects of Marangoni Stresses on the Microflow in an Evaporating Sessile Droplet. *Langmuir* **21,** 3972–3980 (2005).
222. Touazi, O., Chénier, E., Doumenc, F. & Guerrier, B. Simulation of transient Rayleigh–Bénard–Marangoni convection induced by evaporation. *International Journal of Heat and Mass Transfer* **53,** 656–664 (2010).
223. Ladd, J. *et al.* DNA-directed protein immobilization on mixed self-assembled monolayers via a streptavidin bridge. *Langmuir* **20,** 8090–8095 (2004).
224. Ladd, J., Taylor, A. D., Piliarik, M., Homola, J. & Jiang, S. Hybrid surface platform for the simultaneous detection of proteins and DNAs using a surface plasmon resonance imaging sensor. *Anal. Chem.* **80,** 4231–4236 (2008).
225. Chevolot, Y. *et al.* DNA-based carbohydrate biochips: A platform for surface glyco-engineering. *Angew. Chem.-Int. Edit.* **46,** 2398–2402 (2007).
226. Scarano, S., Scuffi, C., Mascini, M. & Minunni, M. Surface plasmon resonance imaging (SPRi)-based sensing: a new approach in signal sampling and management. *Biosens Bioelectron* **26,** 1380–1385 (2010).

227. Kim, D. J. & Koo, K. K. Influence of alkyl chain length of biotin terminated n-alkanethiolate SAMs on a molecular recognition between streptavidin and biotin. *J. Ind. Eng. Chem.* **10,** 920–926 (2004).
228. Lin, S., Shih-Yuan Lee, A., Lin, C.-C. & Lee, C.-K. <![CDATA[Determination of Binding Constant and Stoichiometry for Antibody-Antigen Interaction with Surface Plasmon Resonance]]>. *Current Proteomics* **3,** 271–282 (2006).
229. Kratz, F. Albumin as a drug carrier: design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles. *J Control Release* **132,** 171–183 (2008).
230. Pei, Z. *et al.* Optimizing immobilization on two-dimensional carboxyl surface: pH dependence of antibody orientation and antigen binding capacity. *Anal. Biochem.* **398,** 161–168 (2010).
231. Paik, P., Pamula, V. K. & Fair, R. B. Rapid droplet mixers for digital microfluidic systems. *Lab Chip* **3,** 253–259 (2003).
232. Wixforth, A. Acoustically driven planar microfluidics. *Superlattices and Microstructures* **33,** 389–396 (2003).
233. Galopin, E. *et al.* SPR biosensing coupled to a digital microfluidic microstreaming system. *Biosensors and Bioelectronics* **23,** 746–750 (2007).
234. Bennès, J. *et al.* Action of low frequency vibration on liquid droplets and particles. *Ultrasonics* **44 Suppl 1,** e497–502 (2006).
235. Renaudin, A., Chabot, V., Grondin, E., Aimez, V. & Charette, P. G. Integrated active mixing and biosensing using surface acoustic waves (SAW) and surface plasmon resonance (SPR) on a common substrate. *Lab Chip* **10,** 111–115 (2010).
236. Malic, L., Veres, T. & Tabrizian, M. Biochip functionalization using electrowetting-on-dielectric digital microfluidics for surface plasmon resonance imaging detection of DNA hybridization. *Biosensors and Bioelectronics* **24,** 2218–2224 (2009).
237. Kardous, F. *et al.* Improving immunosensor performances using an acoustic mixer on droplet microarray. *Biosensors and Bioelectronics* **26,** 1666–1671 (2010).
238. http://www.microsonics.com/resources/applications/AppNote1002_HighQualityHTS_AcousticInstrumentsDuet.pdf.
239. Vaisocherová, H. *et al.* Ultralow Fouling and Functionalizable Surface Chemistry Based on a Zwitterionic Polymer Enabling Sensitive and Specific Protein Detection in Undiluted Blood Plasma. *Anal. Chem.* **80,** 7894–7901 (2008).
240. Poirier, N. *et al.* Antibody-mediated depletion of lymphocyte-activation gene-3 (LAG-3(+))-activated T lymphocytes prevents delayed-type hypersensitivity in non-human primates. *Clin. Exp. Immunol.* **164,** 265–274 (2011).
241. Ladd, J., Taylor, A. D., Piliarik, M., Homola, J. & Jiang, S. Label-free detection of cancer biomarker candidates using surface plasmon resonance imaging. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **393,** 1157–1163 (2008).
242. Clemis, E. J. *et al.* Quantitation of spatially-localized proteins in tissue samples using MALDI-MRM imaging. *Anal. Chem.* **84,** 3514–3522 (2012).
243. Anderson, N. L. *et al.* Precision of heavy-light peptide ratios measured by maldi-tof mass spectrometry. *J. Proteome Res.* **11,** 1868–1878 (2012).
244. Natarajan, S. *et al.* Continuous-flow microfluidic printing of proteins for array-based applications including surface plasmon resonance imaging. *Analytical Biochemistry* **373,** 141–146 (2008).
245. Hull, J. *et al.* Distribution of the branched chain aminotransferase proteins in the human brain and their role in glutamate regulation. *J. Neurochem.* **123,** 997–1009 (2012).

246. Vaisocherová, H. *et al.* Functionalizable surface platform with reduced nonspecific protein adsorption from full blood plasma—Material selection and protein immobilization optimization. *Biosensors and Bioelectronics* **24,** 1924–1930 (2009).

SPIM

■ École doctorale SPIM 16 route de Gray F - 25030 Besançon cedex
■ tél. +33 (0)3 81 66 66 02 ■ **ed-spim@univ-fcomte.fr** ■ www.ed-spim.univ-fcomte.fr

UFC UNIVERSITÉ