



IMAGERIE PAR RESONANCE DES PLASMONS DE SURFACE POUR L'ANALYSE SIMULTANEE DE MULTIPLES INTERACTIONS BIOMOLECULAIRES EN TEMPS REEL

Emmanuel Maillart

► To cite this version:

Emmanuel Maillart. IMAGERIE PAR RESONANCE DES PLASMONS DE SURFACE POUR L'ANALYSE SIMULTANEE DE MULTIPLES INTERACTIONS BIOMOLECULAIRES EN TEMPS REEL. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Paris Sud - Paris XI, 2004. Français. <NNT : >. <tel-00006480>

HAL Id: tel-00006480

<https://pastel.hal.science/tel-00006480v1>

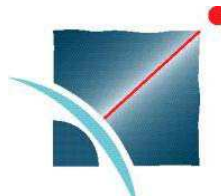
Submitted on 16 Jul 2004

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization



N° D'ORDRE :

UNIVERSITE PARIS XI
UFR SCIENTIFIQUE D'ORSAY

Ecole Doctorale Onde et Matière
Laboratoire Charles Fabry de l'Institut d'Optique

THESE
Présentée
Pour obtenir le grade de
DOCTEUR EN SCIENCES
DE L'UNIVERSITE PARIS XI ORSAY
par
Emmanuel MAILLART

DEVELOPPEMENT D'UN SYSTEME OPTIQUE D'IMAGERIE
EN RESONANCE DE PLASMONS DE SURFACE POUR
L'ANALYSE SIMULTANEE DE MULTIPLES INTERACTIONS
BIOMOLECULAIRES EN TEMPS REEL

Soutenue le 30 juin 2004 devant la Commission d'examen

Y. Lévy	Directeur de thèse
T. Livache	Examineur
M.C. Potier	Rapporteur
D. Pompon	Examineur
J.F. Roch	Président
P. Schaaf	Rapporteur

La spécialisation détruisit la tour de Babel,
chacun parlait une langue spéciale.
C'est notre époque.
Chimistes, financiers, marins, industriels, chanoines,
critiques d'art, philosophes, ont chacun leur argot.
Charabia !
Il n'y a plus que les va-nu-pieds pour se faire entendre de tout le monde.
Henri Michaux, *Les rêves et la jambe*.

Ce livre tout entier n'est qu'une esquisse.
Même pas ! Rien que l'esquisse d'une esquisse.
Oh Temps, Force, Argent, et Patience !
Herman Melville, *Moby Dick*.

A mon père.

Remerciements

Je remercie tout d'abord les membres du jury Jean François Roch, Denis Pompon, Thierry Livache et Yves Lévy d'avoir accepté d'examiner mon travail de thèse, ainsi que Marie Claude Potier et Pierre Schaaf qui ont en plus accepté d'être rapporteurs.

Je remercie également Pierre Chavel, directeur du Laboratoire Charles Fabry de l'Institut d'Optique, pour m'avoir permis d'effectuer ma thèse dans ce laboratoire.

Je remercie tout particulièrement mon directeur de thèse, Yves Lévy, pour m'avoir accueilli dans son équipe de Matériaux pour l'Optique Intégrée et Capteurs au sein du laboratoire Charles Fabry. Il m'a permis de découvrir puis de m'impliquer dans ce sujet pluridisciplinaire tout en me communiquant son enthousiasme. Je tiens aussi à remercier sa persévérance dans la période intermédiaire entre mon stage de DEA et le début de ma thèse où il a su utiliser toutes les cordes de son arc pour que j'obtienne un financement.

J'associe à ces remerciements les autres membres du groupe, c'est-à-dire Michael Canva qui, conjointement avec Yves Lévy, a su orienter mes recherches et me conseiller quand il le fallait et Françoise Martin, maintenant à la retraite, dont les compétences d'expérimentatrice m'ont toujours été très utiles. Je remercie aussi Alain Aide, technicien émérite, qui a toujours su répondre rapidement et simplement aux problèmes de mécanique que nous lui soumettions constamment.

Une place particulière est à réserver à Philippe Guédon dont les travaux de thèse précédant les miens dans l'équipe d'Yves ont ouvert la voie de l'imagerie SPR dans laquelle je me suis engouffré. Ami depuis mon arrivée à l'Institut d'Optique en 1996, c'est lui qui le premier, en me présentant les travaux de son équipe, a essayé de me convaincre de faire une thèse pour prendre sa suite.

Bien sûr, cette thèse n'aurait pu aboutir sans les conseils, scientifiques ou non, de Thierry Livache, du Département de Recherche Fondamentale sur la Matière Condensée, au CEA de Grenoble. Il a été l'interlocuteur privilégié pour tous les problèmes non optiques de mon sujet de thèse. De son côté, Thierry Soussi du Laboratoire de Génotoxicologie des Tumeurs, d'abord à l'Institut Curie puis à l'Hôpital Tenon à Paris, a supervisé les applications p53 et a grandement contribué à la publication des résultats obtenus dans Oncogene.

Toujours présentes lors des nombreuses expériences réalisées, Karen Brengel-Pesce, Emilie Mercey, respectivement post-doctorante et doctorante du CEA/DRFMC à Grenoble, et Delphine Capela, post-doctorante de l'Institut Curie à Paris ont eu le courage de venir s'enfermer très souvent au 2^{ème} sous-sol de l'Institut d'Optique. Elles ont contribué à toutes les étapes des expériences, de la préparation des puces à leur analyse tout en apportant leur bonne humeur.

Mes remerciements vont aussi aux autres doctorants de l'équipe, Nathalie Bassil qui, je l'espère de tout cœur, soutiendra sa thèse très bientôt, Hélène Goudket que j'ai précédée de quelques jours dans le monde des docteurs, et Pierre Lecaruyer que j'encourage pour la suite de ses travaux, aux stagiaires passés et présents, Ana-Maria Pena, Manuela Mandu, Mehdi Ammar, Daniel Benzimra, Tiberius Dicu, et à toutes les personnes que j'ai côtoyées durant ces quelques années, Thibaut Mercey, Jorge Reyes, Sylvie Yiou, Renaud Lebrun, Jérôme Louat, Nathalie Lassalle, Carine Brakha, Carole Karakasyan, Florence Grappin, Christelle David, Géraldine Chevrier, Sébastien Forget, ...

Enfin, bien que ce genre de questions semble être de peu d'importance pour beaucoup, je tiens à remercier tous ceux qui, grâce à leur aide financière (le principal nerf de la guerre) et morale, m'ont permis d'en arriver là. En particulier, je voudrais remercier ma maman, la fondation Georges Besse qui a financé mes études des classes préparatoires au diplôme d'ingénieur et l'AAAEESO (Association Amicale des Anciens Elèves de l'Ecole Supérieure d'Optique) qui ont accepté très rapidement de me prêter de l'argent pour faire le relais entre la fin de mon financement de thèse et le premier versement de mon allocation chômage quelques mois après.

Heureusement, tout est bien qui fini bien, car peu de temps avant la soutenance, suite à une présentation que j'ai effectuée dans le cadre d'un séminaire au Max Planck Institut für Polymerforschung (MPIP), le professeur Wolfgang Knoll m'a proposé d'effectuer un post-doc d'un an dans son laboratoire dès que je serai disponible. Je le remercie donc aussi de m'accueillir dans son laboratoire et ainsi de prolonger mon parcours dans le milieu de la recherche publique.

Table des matières

INTRODUCTION	13
I. ETAT DE L'ART	17
I.1. PRINCIPALES METHODES DE MESURE	18
I.1.1. Méthodes optiques évanescentes directes	19
I.1.1.1. Guide d'onde	20
I.1.1.2. Interféromètre Mach-Zehnder intégré	23
I.1.1.3. Miroir résonant	25
I.1.2. Autres méthodes	28
I.1.2.1. Microbalance à quartz (QCM)	28
I.1.2.2. ELISA	31
I.1.2.3. Microscopie de fluorescence	32
I.2. RESONANCE DES PLASMONS DE SURFACE (SPR)	33
I.2.1. Historique	34
I.2.2. Théorie	35
I.2.2.1. Interface métal/diélectrique	36
I.2.2.2. Couplage de l'onde incidente	37
I.2.2.3. Description qualitative de la résonance des plasmons de surface	42
I.2.2.4. Amplification des variations de réflectivité	43
I.2.3. Monocapteurs	44
I.2.3.1. Interrogation angulaire	44
I.2.3.2. Interrogation spectrale	47
I.2.4. Imagerie et multicapteurs	48
I.2.4.1. Protocole expérimental type	50
I.2.5. Sensibilité théorique	53
I.2.5.1. Couplage par prisme	53
I.2.5.2. Couplage par réseau	63
I.2.6. Amélioration de la sensibilité de détection	72
I.2.6.1. Evolution de la phase de l'onde réfléchie	72

I.2.6.2.	Méthode sandwich.....	74
I.2.6.3.	Spectrométrie de masse.....	75
I.3.	COMPARAISON DES DIFFERENTES METHODES	76
I.3.1.	<i>Avantages et inconvénients des méthodes optiques directes</i>	76
I.3.1.1.	Absence de marquage.....	77
I.3.1.2.	Mesure en temps réel.....	77
I.3.1.3.	Détection en parallèle.....	78
I.3.1.4.	Sensibilité.....	78
I.3.2.	<i>Performances des différents biocapteurs</i>	79
II.	DEVELOPPEMENT D'UN BIOCAPTEUR PAR IMAGERIE SPR.....	83
II.1.	PREPARATION DE L'INTERFACE	83
II.1.1.	<i>Composition du transducteur</i>	84
II.1.1.1.	Critères de sélection du métal	84
II.1.1.2.	Résonance des plasmons de surface sur Ag, Au, Cu et Al.....	86
II.1.2.	<i>Fonctionnalisation du capteur</i>	89
II.1.2.1.	Auto-assemblage moléculaire	90
II.1.2.2.	Pyrrole	92
II.1.2.2.1.	Electrocopolymérisation.....	93
II.1.2.2.2.	Couplage.....	95
II.1.2.2.3.	Structuration en plots.....	97
II.1.2.2.4.	Avantages	99
II.2.	OPTIMISATION ET CHOIX DES ELEMENTS DU BANC.....	100
II.2.1.	<i>Source de lumière</i>	101
II.2.1.1.	Longueur d'onde	101
II.2.1.2.	Largeur spectrale, cohérence temporelle et divergence	102
II.2.2.	<i>Balayage angulaire</i>	106
II.2.3.	<i>Fluidique</i>	110
II.2.3.1.	Pompe.....	111
II.2.3.2.	Injection des échantillons	113
II.2.3.3.	Cellule d'interactions	114
II.2.4.	<i>Prisme</i>	116
II.2.4.1.	Critères de sélection	116

II.2.4.1.1.	Simplicité du système optique.....	117
II.2.4.1.2.	Minimalisation des aberrations.....	118
II.2.4.2.	Simulation des différentes configurations.....	122
II.2.4.2.1.	Limitations technologiques.....	122
II.2.4.2.2.	Choix de la configuration	122
II.2.5.	<i>Imagerie et caméra</i>	123
II.2.6.	<i>Récapitulatif</i>	127
II.3.	AUTOMATISATION ET TRAITEMENT DES DONNEES	129
II.3.1.	<i>Caractérisation des lames</i>	129
II.3.1.1.	Conversion des niveaux de gris en variation de réflectivité.....	129
II.3.1.2.	Ajustement des courbes de réflectivité en fonction de l'incidence.....	131
II.3.2.	<i>Quantification des prises</i>	136
II.3.2.1.	Conversion de ΔR en taux de recouvrement surfacique Γ	136
II.3.3.	<i>Etude des cinétiques</i>	140
II.3.3.1.	Modèle théorique monovalent.....	140
II.3.3.2.	Ajustement des mesures en temps réel.....	143
II.3.3.3.	Détermination des constantes d'affinité.....	146
II.3.3.4.	Limitations du modèle.....	147
II.3.4.	<i>Automatisation</i>	151
II.3.4.1.	Reconnaissance des plots	152
II.3.4.2.	Mesure de la réflectivité en fonction de l'angle d'incidence	158
II.3.4.3.	Mesure des cinétiques	160
II.3.4.4.	Analyse des résultats	162
II.4.	CONCLUSION	164
III.	APPLICATIONS DE L'IMAGERIE SPR	165
III.1.	ACIDES DESOXYRIBONUCLEIQUES.....	165
III.1.1.	<i>Généralités</i>	165
III.1.1.1.	Structure de l'ADN	165
III.1.1.2.	Hybridation et dénaturation.....	167
III.1.1.3.	Intérêt biomédical des puces à ADN.....	168
III.1.2.	<i>Interactions ADN/ADN liées au gène κ-ras</i>	169
III.1.2.1.	Description du matériel utilisé	169

III.1.2.2.	But de l'expérience.....	171
III.1.2.3.	Résultats	172
III.1.2.3.1.	Spécificité.....	173
III.1.2.3.2.	Détection de mutations ponctuelles.....	174
III.1.2.3.3.	Vers un outil de diagnostique.....	177
III.1.2.3.4.	Dénaturation et réutilisation	179
III.1.2.4.	Récapitulatif	181
III.2.	PROTEINES	182
III.2.1.	<i>Contexte</i>	182
III.2.1.1.	De l'ADN à la protéine : l'expression génétique	183
III.2.1.2.	Le système immunitaire	185
III.2.1.2.1.	Structure des immunoglobulines	185
III.2.1.2.2.	Exemple de reconnaissance immune : les tests de grossesse	186
III.2.1.3.	Cancer et contrôle du cycle cellulaire	187
III.2.2.	<i>Interactions anticorps/antigène liées à l'hormone de grossesse</i>	189
III.2.2.1.	Matériel et méthodes	190
III.2.2.2.	Résultats	192
III.2.2.2.1.	Détection d'antigènes humains et de lapins	192
III.2.2.2.2.	Détection de l'hormone de grossesse	196
III.2.2.3.	Récapitulatif	200
III.2.3.	<i>Activité de liaison à l'ADN double-brin de la p53</i>	201
III.2.3.1.	Description du matériel utilisé	201
III.2.3.2.	Puce à ADN universelle	202
III.2.3.3.	But des expériences.....	204
III.2.3.4.	Protocole expérimental.....	206
III.2.3.5.	Résultats	207
III.2.3.5.1.	Hybridation des séquences zip-codes.....	207
III.2.3.5.2.	Reconnaissance des ADN cibles doubles-brins par la p53	211
III.2.3.5.3.	Calcul des affinités entre la p53 et les ADN cibles.....	216
III.2.3.6.	Récapitulatif	218
III.3.	OLIGOSACCHARIDES.....	219
III.3.1.	<i>Généralités</i>	219
III.3.1.1.	Les glycosaminoglycanes sulfatés (GAGs).....	220

III.3.1.2.	Rôle de la chimiokine SDF-1 α	221
III.3.2.	<i>Interactions entre l'héparine HP6 et la chimiokine SDF-1α</i>	222
III.3.2.1.	Matériel et méthodes	222
III.3.2.2.	Greffage des sucres	223
III.3.2.3.	But de l'expérience.....	225
III.3.2.4.	Résultats	226
III.3.2.4.1.	Spécificité.....	226
III.3.2.4.2.	Calcul des affinités	230
III.3.2.4.3.	Régénération.....	232
III.3.2.5.	Récapitulatif	235
CONCLUSION		237
ANNEXE 1.	GLOSSAIRE	242
ANNEXE 2.	RAPPELS D'OPTIQUE	249
ANNEXE 3.	EQUATIONS DE MAXWELL.....	259
ANNEXE 4.	TABLE DES INDICES DE REFRACTION	263
ANNEXE 5.	ETUDE DU BRUIT DE LA CAMERA CCD	272

Introduction

Les progrès enregistrés dans la connaissance du génome humain au cours des deux décennies écoulées ont rendu possible, parmi de nombreuses autres retombées, l'analyse d'un nombre toujours croissant de gènes responsables de maladies. Parallèlement, depuis que le génome humain a été décodé, le domaine de la protéomique, qui est l'étude de l'ensemble des protéines fabriquées par les gènes, a émergé. Les protéines sont les acteurs essentiels des mécanismes cellulaires, et leur dysfonctionnement entraîne de nombreuses maladies. Compte tenu du grand nombre de fonctionnalités qui vont devoir être criblées, le défi technologique à relever est considérable, puisqu'il s'agit de substituer à des techniques manuelles telles les analyses ELISA, et donc coûteuses, des méthodes efficaces permettant le criblage à grande échelle des variations individuelles. Le développement de systèmes *ad hoc* automatisés à forte capacité et haut débit, tels que les puces immunologiques, constituées par une multitude de protéines ancrées sur un support approprié, les puces à ADN ou même les puces à oligosaccharides s'impose comme une priorité.

De par l'aspect multiparamétrique de ces biopuces, ces techniques constituent un apport important à la biologie moléculaire. En revanche, souvent, il reste nécessaire de marquer les molécules cibles par fluorescence ou radioactivité afin de pouvoir les détecter, ce qui ajoute une étape au procédé et ne permet pas, de manière immédiate, le suivi de la réaction en temps réel. Le système optique que nous développons apporte des améliorations très sensibles par rapport aux systèmes classiques. En effet, il permet d'acquérir, en parallèle, sur chaque plot, la réponse cinétique des interactions biologiques mesurées et, de surcroît, sans avoir recours à des marqueurs. En d'autres termes, l'évolution des multiples interactions peut être suivie en temps réel et permet donc de mesurer les constantes d'association, de dissociation et d'affinité des espèces biomoléculaires et donc de caractériser leur fonctionnalité. Bien sûr, la réalisation de tels biocapteurs, de plus en plus perfectionnés et possédant des fonctionnalités multiples, nécessite la contribution d'acteurs d'origines différentes, conférant au projet un caractère pluridisciplinaire à travers les nombreuses collaborations développées avec d'autres équipes de recherche. Les différentes disciplines

complémentaires mises en jeu sont, entre autres : chimie, biochimie, biologie, informatique, électronique, mécanique et optique.

Dans le système que nous avons développé, nous utilisons la résonance des plasmons de surface. De par sa mise en œuvre simple et sa sensibilité, le phénomène des plasmons de surface a été appliqué, dès le début des années quatre-vingt, à la reconnaissance d'interactions biologiques. Les années quatre-vingt dix ont vu naître un grand nombre de capteurs biochimiques alliant la résonance des plasmons de surface à une chimie préparant la couche réceptrice biosensible. Certains capteurs, plus spécifiques, se sont restreints à la reconnaissance de macromolécules comme les protéines, pour déboucher sur une instrumentation commercialisée notamment par Biacore sous le nom de BIAcore et BIAcore 3000. Cette société a réalisé des monocapteurs performants mais qui, malheureusement, ne permettent de réaliser qu'une à trois mesures à la fois (plus une mesure de référence).

Notre but était donc, dans un premier temps, de concevoir et d'automatiser un banc de mesure et d'analyse pour réaliser des expériences de reconnaissance biomoléculaire. Un tel système doit être capable de mesurer, quantitativement et en temps réel, les molécules biologiques qui se fixent sélectivement sur les différents capteurs. Ces capteurs forment une grille de plots uniformément espacés sur un film mince métallique, chaque plot étant composé d'éléments biologiques différents (voir Figure 1).

Tout d'abord, nous avons étudié les biocapteurs de manière théorique, en particulier ceux basés sur la résonance des plasmons de surface. Puis, nous avons identifié les différents paramètres critiques du montage et les améliorations susceptibles d'y être apportées sans oublier la chimie de surface fonctionnalisant le biocapteur. Nous nous sommes intéressés ensuite au traitement informatique, comprenant l'acquisition de données, le traitement d'images et le traitement des données en vue de pouvoir suivre en temps réel les réactions biomoléculaires sur chaque plot et en extraire tous les paramètres caractéristiques pertinents. Enfin, nous nous sommes attachés à illustrer les possibilités d'application d'un tel système dans des problématiques réelles liées à la compréhension de mécanismes cellulaires, à des maladies héréditaires ou au cancer à travers l'étude d'interactions ADN/ADN, ADN/protéines, protéines/protéines et oligosaccharides/protéines.

Le vocabulaire technique utilisé dans cette thèse est regroupé dans un glossaire (Annexe 1, page 242). Les mots regroupés dans ce glossaire sont soulignés deux fois lors de leur première occurrence.

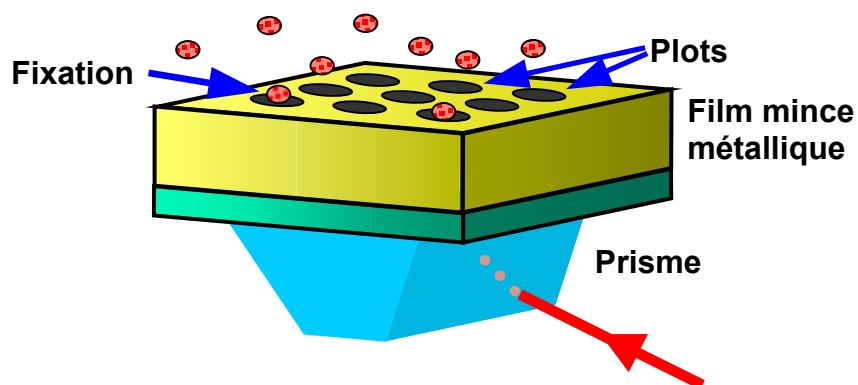


Figure 1 : Multicapteur biomoléculaire.

I. ETAT DE L'ART

Les biocapteurs sont des dispositifs permettant d'analyser des interactions biomoléculaires et dans lesquels les réactions d'intérêt sont couplées à un transducteur, transformant un signal biologique en un signal mesurable. La base fondamentale de l'analyse biomoléculaire est la spécificité de la reconnaissance moléculaire entre les deux espèces en présence permettant la formation d'un complexe stable, que ce soit pour les analyses en solution ou pour celles où l'une des espèces est fixée à une interface solide. Un biocapteur est donc un dispositif analytique qui intègre un élément biologique sur une surface fonctionnalisée (sonde), rendant possible une interaction biospécifique réversible avec un analyte (cible), mesurée via un transducteur de signal. Cette interaction est caractérisée par la mesure de la quantité de matière ayant interagi par unité de surface, grandeur appelée taux de recouvrement. L'élément biologique d'un tel dispositif est une couche de molécules choisies pour la biorecognition : enzymes, récepteurs, peptides, simple brins d'ADN ou même cellules vivantes peuvent par exemple être utilisés. Lorsque des anticorps sont immobilisés, nous parlons alors d'immunocapteur. Comparés aux instruments d'analyse conventionnels, les biocapteurs sont caractérisés par une structure intégrée de tous ces composants. De plus, très souvent, les biocapteurs intègrent aussi un système fluide pour l'injection des analytes. Sachant qu'une analyse basée sur la technologie usuelle ELISA, très courante en laboratoire, nécessite 3 à 5 heures de travail, le développement d'autres moyens d'analyse suscite beaucoup d'intérêt.

Les biocapteurs peuvent être utilisés de manière indirecte, c'est-à-dire qu'une ou les deux espèces impliquées dans l'interaction étudiée sont couplées à des molécules révélatrices de leur présence par leurs propriétés de transduction connues (fluorophores, marqueurs radioactifs,...), ou de manière directe, c'est-à-dire sans marqueurs. Les principaux groupes de biocapteurs sont les capteurs **électrochimiques** : potentiométriques (potentiel transmembrane, potentiel d'électrode, transistor à effet de champ [1]), ampérométriques [2] ou conductimétriques/capacimétriques [3], les capteurs **optiques** (spectroscopie de réflexion interne totale (TIRS) [4], ellipsométrie [5], guide d'onde diélectrique [6], interféromètre intégré de Mach-Zehnder [7], résonance des plasmons de surface (SPR) [8], miroir résonant

[9]), les capteurs **microgravimétriques** (microbalance à quartz en mode de cisaillement en épaisseur (QCM-TSM) [10], ondes de surface acoustiques sur des cristaux (SAW) [11]) et les capteurs **thermométriques** (calorimétrie par titrage isotherme [12]).

Malgré un nombre toujours plus important de publications dans le domaine des biocapteurs en général et des immunocapteurs en particulier, il y a peu d'applications commerciales de ces capteurs pour les diagnostics cliniques. Les raisons sont, la plupart du temps, liées à une question fondamentale non résolue sur l'immobilisation, l'orientation et les propriétés spécifiques des biomolécules fixées sur la surface du transducteur. Pour qu'un nouveau type de biocapteur soit viable, il faut que ses qualités soient nombreuses : une bonne précision, une grande reproductibilité d'un échantillon à l'autre, une grande sensibilité analytique, une spécificité optimale et une bonne stabilité de la calibration, tout cela sans dérive temporelle [13]. Il doit aussi pouvoir enregistrer l'interaction de manière quasi-continue, utiliser de faibles volumes d'échantillon et permettre la réversibilité de l'interaction étudiée, tout en ménageant sa taille, son prix de revient et sa facilité d'utilisation en vue d'une éventuelle commercialisation [14].

Nous allons donc, dans un premier temps, décrire les méthodes les plus courantes utilisées pour analyser les interactions biomoléculaires. Nous décrirons ensuite, de manière plus détaillée, la technique retenue dans notre laboratoire : la résonance des plasmons de surface (SPR). Enfin, nous comparerons les performances, les avantages et les inconvénients de ces différentes techniques.

I.1. PRINCIPALES METHODES DE MESURE

Le nombre important de techniques utilisées dans le contexte des analyses biomoléculaires nous contraint à ne décrire que les méthodes les plus couramment utilisées : guides d'ondes, interféromètres Mach-Zehnder intégrés, miroirs résonants, microbalances à quartz, tests ELISA et microscopie de fluorescence. Premièrement, nous allons décrire les dispositifs basés sur les ondes évanescentes dont font partie les biocapteurs SPR qui seront décrits par la suite.

I.1.1. Méthodes optiques évanescentes directes

Une onde évanescente est obtenue lorsque l'onde incidente, issue du milieu le plus réfringent (prisme, réseau ou structure guidante), arrive sur l'interface sous un angle d'incidence supérieur à l'angle de réfraction limite (voir Annexe 2). L'amplitude de l'onde évanescente décroît exponentiellement en fonction de sa distance à l'interface et a donc la propriété intéressante d'être confinée au voisinage de l'interface (sur une profondeur ΔZ_c , définie comme la distance à laquelle l'intensité tombe à $1/e$ du maximum, dans la Figure 2), siège des interactions biomoléculaires et donc de ne pas être sensible aux perturbations situées hors de cette limite. L'utilisation des champs évanescents permet donc de sonder en temps réel les changements d'indice de réfraction, d'épaisseur de couche, d'adsorption et de fluorescence causés par des réactions se produisant à une distance d'au plus quelques centaines de nanomètres de la surface. L'adsorption de molécules sur l'interface va perturber la propagation de l'onde évanescente, entraînant des variations de phase et d'amplitude du faisceau réfléchi. Aucun marqueur n'est nécessaire pour effectuer ces mesures, ce qui classe ces capteurs dans la catégorie des biocapteurs directs. De plus, ces mesures ne perturbent pas l'interaction et ne nécessitent pas d'étape supplémentaire : les interactions peuvent donc être suivies en temps réel.

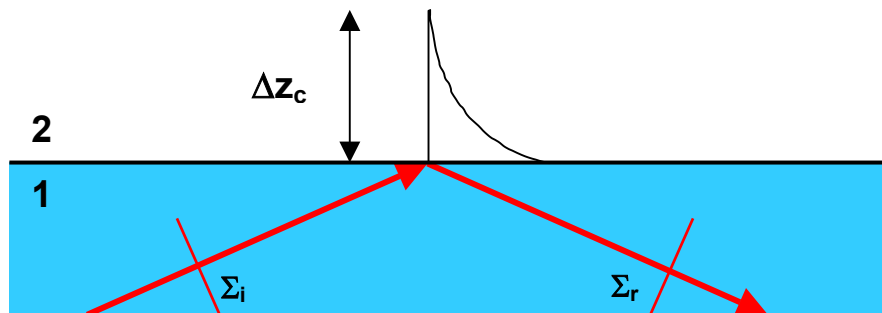


Figure 2 : Onde évanescente. Le faisceau lumineux (plan d'onde Σ_i), totalement réfléchi à l'interface entre deux milieux crée une onde évanescente confinée sur une profondeur ΔZ_c dans le milieu 2 ($\Delta Z_c \approx$ quelques centaines de nanomètres).

Les guides d'ondes, les interféromètres intégrés Mach-Zehnder, les miroirs résonants et la SPR sont les techniques optiques évanescentes les plus courantes dans le domaine des biocapteurs.

I.1.1.1. Guide d'onde

Un guide d'onde diélectrique est composé d'un film mince d'indice de réfraction élevé n_f (structure guidante) encadré de deux milieux diélectriques d'indices de réfraction plus faibles (pour une description plus précise, voir l'Annexe 2). Lorsqu'un guide d'onde est utilisé en tant que biocapteur, les deux milieux encadrant la structure guidante sont les suivants : le premier, d'indice n_s , est le substrat sur lequel est déposé le film mince tandis que le second, d'indice n_c , constitue le milieu couvrant dans lequel vont se produire les interactions biomoléculaires (Figure 3). Lorsqu'un faisceau lumineux est injecté dans ce guide d'onde sous forme d'un mode guidé, une onde évanescente se propage aux deux interfaces de la structure guidante. La longueur de pénétration de cette onde évanescente dans le milieu couvrant est alors définie par la relation suivante [15] :

$$\Delta z_c = \left(\frac{\lambda}{2\pi} \right) \cdot [N^2 - n_c^2]^{-\frac{1}{2}} \quad (\text{I-1})$$

avec λ la longueur d'onde et N l'indice de réfraction effectif* du mode ($\sup(n_c, n_s) < N < n_f$).

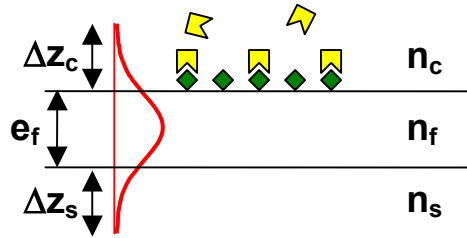


Figure 3 : Propagation d'une onde lumineuse dans un guide d'épaisseur e_f et d'indice de réfraction n_f . En rouge est représenté le profil d'amplitude du mode 0 en polarisation TE (profil sinusoïdal). Δz_s et Δz_c représentent la profondeur de pénétration de cette onde respectivement le substrat d'indice n_s et dans le milieu couvrant d'indice n_c , lieu des interactions entre les sondes (vert) et les cibles (jaune).

Différents types de capteurs optiques intégrés basés sur les guides d'onde peuvent être utilisés : ceux où le faisceau lumineux est couplé dans le guide par un réseau (couplage par réseau en entrée [6]), ceux où le faisceau guidé est couplé hors du guide par un réseau (couplage par réseau en sortie) ou encore les interféromètres différentiels [16]. Les deux premiers dispositifs sont illustrés dans la Figure 4. Le principe physique de ce type de

* Notion définie dans l'Annexe 2.

biocapteurs est le suivant : une perturbation au niveau de l'interface n_c/n_f se traduit par un changement ΔN de l'indice effectif du guide. Cette variation ΔN peut être induite par la formation d'une couche superficielle (d'épaisseur Δe) de molécules adsorbées ou liées ou par le changement Δn_c d'indice de réfraction du milieu couvrant. Afin d'obtenir la meilleure sensibilité, l'épaisseur du guide doit être très faible (guide monomode) pour ne guider que les modes 0 (TM_0 et TE_0). La possibilité d'utiliser deux polarisations différentes dans ces guides permet de mesurer deux grandeurs ΔN_{TM_0} et ΔN_{TE_0} et donc de déterminer deux paramètres, c'est-à-dire de différencier Δn_c de l'adsorption ou, si Δn_c est négligeable, de déterminer l'épaisseur et l'indice de la couche adsorbée. Par exemple, en mode TE, une perturbation va influencer sur l'indice effectif du guide selon la relation suivante [17] :

$$\Delta(N^2) = 2 \cdot N \cdot \Delta N = \int_{-\infty}^{+\infty} \Delta \varepsilon(z) \cdot [u(z)]^2 \cdot dz \Bigg/ \int_{-\infty}^{+\infty} [u(z)]^2 \cdot dz \quad (I-2)$$

avec $u(z)$ la distribution du champ électrique transverse et $\Delta \varepsilon(z)$ les variations de permittivité ($\varepsilon = n^2$).

L'équation (I-2) permet de lier la variation d'indice effectif mesurée à la variation d'indice du milieu couvrant qui est la grandeur d'intérêt du biocapteur. La sensibilité d'un tel capteur est inversement proportionnelle à l'épaisseur effective du guide d'onde (épaisseur réelle plus les profondeurs de pénétration Δz_c et Δz_s des ondes évanescentes de part et d'autre du guide). L'épaisseur du guide d'onde doit donc être la plus faible possible tout en restant supérieure à l'épaisseur de coupure (définition dans l'Annexe 2) pour qu'un mode puisse être guidé [18]. Si nous considérons une structure guidante d'indice de réfraction $n_f = 2,01$ déposée sur un substrat d'indice $n_s = 1,46$ en contact avec un milieu liquide ($n_c = 1,33$), l'épaisseur optimale avoisine alors les 200 nm. De manière pratique, ces variations d'indice effectif du guide sont déduites de la mesure de variation de l'angle optimal de couplage entre le réseau et le guide (Figure 4). La relation entre l'angle α_m du faisceau en air avec le réseau et l'indice effectif N du mode guidé (valable de la même manière en configuration réseau en entrée ou réseau en sortie par le principe de retour inverse de la lumière) est la suivante :

$$(\pm) N = n_{air} \cdot \sin \alpha_m + m \cdot \lambda / \Lambda \quad (I-3)$$

avec n_{air} l'indice de réfraction de l'air, α_m l'angle de couplage optimal, Λ le pas du réseau et m l'ordre de diffraction, le signe devant l'indice effectif indiquant le sens de propagation dans le guide. Il s'ensuit une relation simple entre les variations de l'indice effectif et celles de l'angle optimal de couplage :

$$\Delta N(t) = n_{\text{air}} \cdot \cos \alpha_m \cdot \Delta \alpha_m(t) \quad (\text{I-4})$$

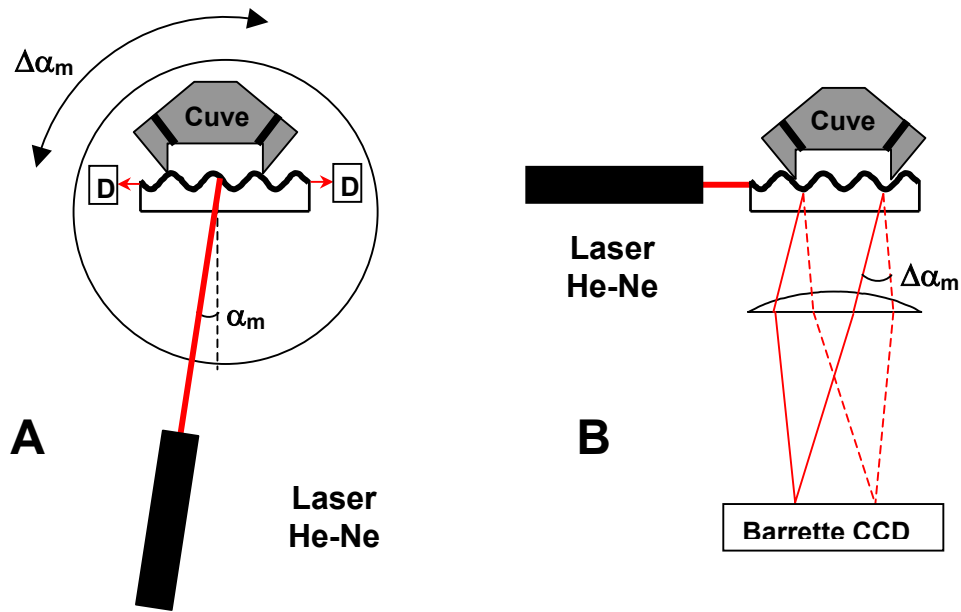


Figure 4 : Biocapteurs basés sur les guides d'onde couplés par réseau. Une cuve munie d'une entrée et d'une sortie permet l'injection des solutions contenant les molécules cibles. **A :** Configuration réseau en entrée. **B :** Configuration réseau en sortie.

En configuration de couplage par **réseau en entrée**, l'angle α est balayé pour trouver le meilleur angle de couplage qui correspond à un maximum d'intensité sur les détecteurs D de la Figure 4.A en fonction du temps. Lukosz [17] a obtenu une résolution $\Delta N_{\min} = 2.10^{-6}$ ($\lambda = 633 \text{ nm}$, longueur d'interaction $L = 1 \text{ mm}$), qui correspond à une variation d'indice minimale détectable du milieu couvrant de $\Delta n_{\text{c,min}} = 7.10^{-6}$, mais avec une résolution temporelle limitée par le temps d'un balayage (2,4 s pour l'expérience décrite dans la ref. [17]).

En configuration de couplage par **réseau en sortie**, le faisceau laser est focalisé sur l'entrée du guide et la position du faisceau en sortie sur une barrette CCD donne directement $\alpha(t)$ comme illustré sur la Figure 4.B. L'absence de balayage angulaire diminue le temps de

réponse. Lukosz [17] a obtenu une résolution $\Delta N_{\min} = 5.10^{-7}$ ($\lambda = 633$ nm, longueur d'interaction $L = 1$ mm), qui correspond à une variation d'indice minimale détectable du milieu couvrant de $\Delta n_{c,\min} = 2.10^{-6}$, avec une résolution temporelle submilliseconde si nécessaire.

En configuration **interféromètre différentiel**, la mesure du déphasage $\Delta\phi$ entre les modes TE_0 et TM_0 est utilisée pour déterminer les variations d'indice effectif. Sur une longueur d'interaction $L = 17$ mm, Stamm *et al.* [16] annoncent une résolution de $\Delta N_{\min} = 2.10^{-8}$ ($\lambda = 633$ nm), ce qui correspond à un taux de recouvrement minimal détectable $\Delta\Gamma_{\min} = 0,1$ pg/mm² (mais ils indiquent aussi une dérive de 0,2 pg/mm²/min due à la microporosité du guide d'onde, ce qui semble totalement incompatible avec la résolution annoncée). Contrairement aux deux configurations précédentes, basées sur la mesure de l'angle de couplage, la mesure est d'autant plus sensible que la longueur d'interaction est importante car le déphasage mesuré est directement proportionnel à cette longueur L (selon la formule bien connue de tous les opticiens $\Delta\phi = 2\pi \cdot L \cdot \Delta n / \lambda$). Cette configuration est très proche des biocapteurs basés sur les interféromètres Mach-Zehnder intégrés que nous allons maintenant décrire.

I.1.1.2. Interféromètre Mach-Zehnder intégré

Ce capteur est, lui aussi, basé sur l'interaction d'une onde guidée avec des biomolécules dans la région du champ évanescent. Le changement de l'environnement du guide au niveau de ce champ va provoquer un changement de phase $\Delta\phi$.

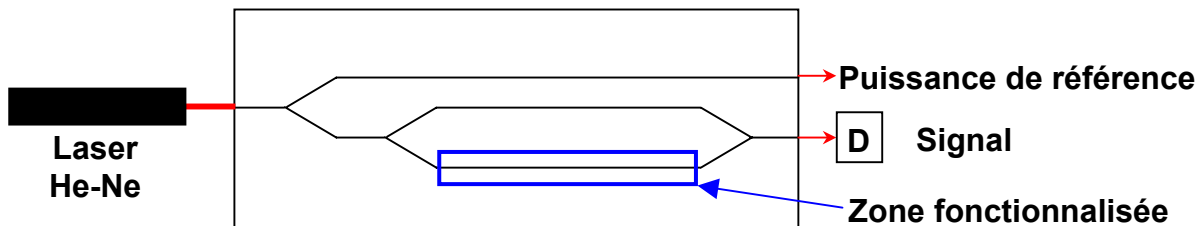


Figure 5 : Guide d'onde avec un interféromètre Mach-Zehnder intégré (d'après Weisser *et al.* [7]). Les 3 bras représentés par des lignes noires suivent la structure présentée sur la Figure 3. D représente le détecteur qui mesure le déphasage entre le bras fonctionnalisé où les interactions vont se produire et le bras non-fonctionnalisé.

Le principe de l'interféromètre Mach-Zehnder est de comparer le signal issu d'un guide d'onde non fonctionnalisé (bras de référence des interactions) à celui issu d'un bras fonctionnalisé avec les molécules d'intérêt. D'où, le signal en sortie pour l'adsorption d'une couche biologique (e_b , n_b) vaut :

$$P(t) = \frac{P_0}{2} \cdot (1 + \cos \Delta\phi(t)) \quad (I-5)$$

avec $\Delta\phi = L_{sens} \cdot \frac{2\pi}{\lambda} \cdot \left(\frac{\partial N}{\partial e_b} \cdot \Delta e_b + \frac{\partial N}{\partial n_b} \cdot \Delta n_b \right)$, L_{sens} la longueur d'interaction et λ la longueur d'onde du faisceau incident.

Pour que le signal en sortie ne dépende que des variations de phase, comme indiqué dans l'équation (I-5), il est conseillé de prendre en compte les fluctuations de la source en ajoutant, par exemple, en parallèle à l'interféromètre un troisième guide d'onde (Figure 5). De plus cette équation montre que la variation de phase est directement proportionnelle à L_{sens} , la longueur de guide fonctionnalisé. Contrairement aux capteurs décrits dans la partie précédente, le système est donc d'autant plus sensible que L_{sens} est grand. Cette grandeur doit tout de même être limitée pour des raisons d'encombrement et de coûts.

Le déphasage mesuré se décompose de la manière suivante: $\Delta\phi = \Delta\phi_{refr} + \Delta\phi_{nonsp} + \Delta\phi_{sp}$, c'est-à-dire qu'il est dû à différentes contributions, le changement d'indice de réfraction du tampon d'interaction, l'adsorption non-spécifique et la fixation spécifique des biomolécules [19]. Le problème, récurrent dans la plupart des biocapteurs, de distinguer les interactions spécifiques des non-spécifiques peut être résolu par l'utilisation de mesures interférométriques. En effet, si les sondes ne sont déposées que sur un seul bras alors que les cibles passent dans les deux bras de l'interféromètre, seul les changements de phase dus aux interactions spécifiques seront mesurées. Puisque $\Delta\phi_{refr}$, la variation de phase due au changement d'indice de la solution et $\Delta\phi_{nonsp}$, la variation de phase due à la fixation non-spécifique sont identiques sur les deux bras, le signal en sortie ne dépend plus que de $\Delta\phi_{sp}$.

Pour maximiser la sensibilité, la différence d'indice entre la couche guidante et la couche tampon doit être maximale et l'épaisseur de la couche guidante doit être environ deux fois l'épaisseur de coupure du mode fondamental. De plus, un seul mode doit pouvoir être

guidé. La fluidique d'un tel capteur, comme celle de tout biocapteur, peut être très simple : une lame couvre-objet déposée à une faible distance de l'interféromètre grâce à un film de colle [19] ou à un masque en parafilm [7] permet au liquide de circuler par capillarité.

Un des principaux défauts de cet interféromètre est que les variations mesurées peuvent être dues à des variations d'indice effectif de l'une ou l'autre des branches sans que nous puissions les différencier. Enfin, difficulté inhérente aux guides d'ondes, il est difficile de coupler beaucoup de lumière dans le guide.

La sensibilité obtenue en fonction des variations d'indice de réfraction du milieu couvrant vaut : $\Delta\phi/\Delta n_c = 2,64 \cdot 10^3 \cdot \pi$ [19]. En considérant qu'un déphasage de $\pi/20$ est détectable sans ambiguïté, la résolution en indice vaut $\Delta n_{c,\min} = 2 \cdot 10^{-5}$.

I.1.1.3. Miroir résonant

Les biocapteurs à miroir résonant ont pour but de combiner la sensibilité améliorée des capteurs à guide d'onde avec la facilité d'utilisation des capteurs SPR pour analyser en temps réel et sans marqueurs les interactions biologiques.

Pour les guides d'ondes, les pertes beaucoup plus faibles dans les matériaux diélectriques autorisent des longueurs d'interaction plus grandes qu'avec les métaux utilisés en SPR, ce qui résulte en une amélioration potentielle de la sensibilité d'un ordre de grandeur ou plus [17]. Comme pour les biocapteurs à guide d'onde décrits dans les parties I.1.1.1 et I.1.1.2, les modes guidés existent en polarisation TM et TE, ce qui permet de mesurer simultanément l'épaisseur et l'indice de réfraction du film adsorbé.

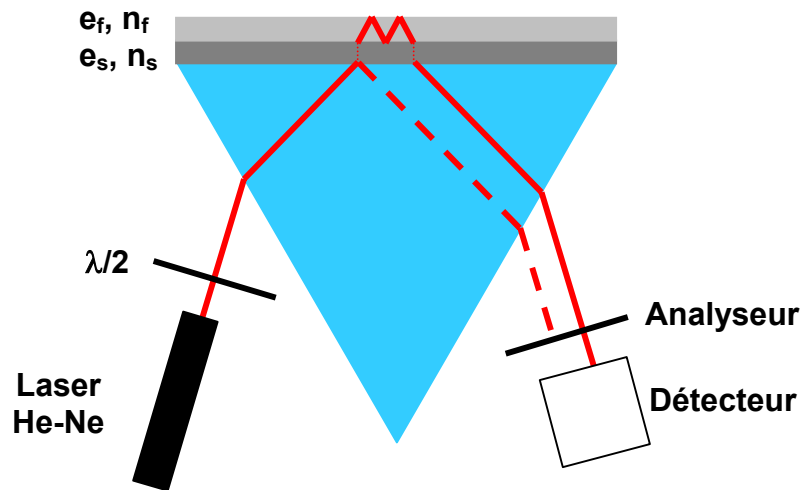


Figure 6 : Biocapteur basé sur les miroirs résonants. Un faisceau incident polarisé à 45° du plan d'incidence (laser He-Ne + lame $\lambda/2$ décomposant le faisceau en polarisation TE et TM) est couplé à un guide d'onde via un prisme. Ce faisceau est réfléchi puis le signal issu de l'interférence entre les composantes est mesuré (analyseur + détecteur). Si l'angle d'incidence est différent de l'angle de résonance TE ou TM, le faisceau est réfléchi directement par le prisme (rayon en pointillés). Si l'angle d'incidence est celui de résonance, une des deux composantes se propage dans le guide puis est réfléchi, ce qui se traduit par un retard de phase de cette composante (rayon en trait plein).

Un biocapteur à miroir résonant consiste en un guide d'onde diélectrique où l'onde lumineuse est couplée par un prisme. En pratique, nous avons un prisme sur lequel est déposée une structure guidante du type de la Figure 3. Généralement, ce guide d'onde est composé d'une couche de quelques centaines de nanomètres de SiO_2 faisant office de milieu faible indice n_s et d'une couche d'une centaine de nanomètres de TiO_2 (milieu guidant d'indice de réfraction n_f élevé) recouverte du milieu couvrant biologique. Le principe des biocapteurs à miroir résonant est le suivant [20] : un faisceau lumineux, polarisé à 45° du plan d'incidence pour que ses composantes TM et TE soient de même amplitude, est réfléchi totalement sur un prisme. Un couplage efficace dans le guide se produit lorsqu'il y a accord de phase entre le faisceau incident et les modes résonants de la couche d'indice de réfraction élevé (rappelons le encore, les conditions de couplage sont différentes en polarisation TE et TM). Ce couplage dans la couche d'indice de réfraction élevé s'effectue par un transfert de l'énergie du faisceau incident au travers de la couche de faible indice de réfraction grâce à l'onde évanescente résultante de la réflexion totale. L'épaisseur e_s de la couche de faible indice, qui forme une barrière entre le prisme et le guide, va donc influencer directement sur le rendement de couplage. Bien sûr, le principe de retour inverse de la lumière explique que plus

l'énergie du faisceau passe facilement dans le guide et plus l'énergie contenue dans le guide peut retourner facilement dans le prisme.

Comme le miroir résonant est un système sans pertes (en réalité un système à faibles pertes en raison de sa rugosité et de son absorption résiduelle), la résonance ne se traduit pas par un pic d'absorption dans la courbe de réflectivité en fonction de l'angle d'incidence mais par un saut de phase de la lumière réfléchi à la résonance. Physiquement, en dehors des conditions de résonance, le faisceau est totalement réfléchi par le prisme sans être influencé par le guide tandis que, dans les conditions de résonance, il est aussi totalement réfléchi par le prisme mais après s'être propagé très brièvement dans le guide, d'où le déphasage (Figure 6). La phase du faisceau incident subit un changement de 2π en passant par la résonance (déphasage de π à l'angle de résonance). La position de ce saut de phase peut alors être mesurée de manière interférentielle pour suivre les changements au niveau du milieu extérieur. L'équation caractéristique des modes de propagation est la suivante [21] :

$$\frac{2\pi}{\lambda} \cdot e_f \cdot \sqrt{n_f^2 - N^2} + \Phi_{f,s} + \Phi_{f,c} = m\pi \quad (\text{I-6})$$

avec e_f l'épaisseur du guide, m l'ordre du mode et $\phi_{f,s}$ et $\phi_{f,c}$ les demi-déphasages à la réflexion totale entre, respectivement, la structure guidante et le substrat et entre la structure guidante et le milieu couvrant (l'expression de ces déphasages est définie dans l'Annexe 2).

Ces changements de phase sont habituellement mesurés par des méthodes interférométriques. Comme les résonances TE et TM sont largement séparées, ces deux polarisations peuvent servir de référence l'une pour l'autre [20]. De plus, ces deux ondes suivent un chemin identique, ce qui annule les autres causes possibles de variation et ont la même amplitude, ce qui maximise le contraste. Un simple analyseur à 45° du plan d'incidence nous donne un signal nul en dehors de la résonance et des pics de lumière étroits autour de la résonance.

Comme pour les autres biocapteurs basés sur les guides d'ondes, pour augmenter la sensibilité, la couche intermédiaire doit avoir l'indice le plus faible possible comme le SiO_2 ($n = 1,46$) ou le fluorure de magnésium ($n = 1,38$). La couche résonante doit par contre avoir l'indice le plus élevé possible. Mais, plus cet indice n_f augmente et plus les épaisseurs optimales pour les modes TE et TM divergent (c'est pour cette raison que les dispositifs les plus sensibles sont optimisés pour une seule polarisation et ne permettent donc plus de

différencier l'influence de l'épaisseur et de l'indice de la couche adsorbée). L'analyse se fait alors grâce à un analyseur à 90° (polariseur et analyseurs croisés) de manière à ce que seule la lumière s'étant propagée dans le guide, et donc ayant été affectée par les interactions de surface, atteigne le détecteur. Dans cette configuration, c'est l'angle de résonance qui est détecté (voir Figure 6).

La résolution que nous pouvons obtenir est déterminée par la largeur de la résonance et donc par les pertes intrinsèques du système (absorption, diffusion, couplage au prisme,...). Quand l'indice de la couche résonante augmente, les pertes par diffusion deviennent prépondérantes, ce qui fixe une limite au contraste maximal d'indice du guide. Cette technique des miroirs résonants a été commercialisée sous le nom de Iasys par Affinity Sensors [22] et permet, d'atteindre théoriquement une résolution $\Delta n = 2.10^{-6}$ [21] mais, lors d'expériences [23], seule une résolution de $\Delta \Gamma_{\min} = 7,4 \text{ pg/mm}^2$ a été atteinte (résolution environ trois fois plus faible).

Les miroirs résonants dont le principe physique semble tout aussi intéressant que celui de la SPR démontrent une sensibilité au moins équivalente et une utilisation aussi aisée que les capteurs SPR. Par contre, dans le domaine des applications biologiques ou, autrement dit, les biocapteurs, les miroirs résonants sont restés très peu utilisés. Cela semble dû, en grande partie, au manque de moyens existant pour fonctionnaliser les couches d'oxyde de titane (TiO_2) avec des biomolécules.

I.1.2. Autres méthodes

Les biocapteurs ne sont pas tous basés sur les ondes évanescentes. D'autres procédés sont aussi très développés comme les microbalances à quartz, mais surtout, les tests immunologiques basés sur les enzymes (ELISA), très populaires depuis les années 80 et la microscopie de fluorescence qui reste le biocapteur de référence.

I.1.2.1. Microbalance à quartz (QCM)

La microbalance utilise une lame de quartz extrêmement fine sur laquelle est fixée une électrode de platine ou d'or de chaque côté. Le quartz est un cristal piézoélectrique, c'est-à-dire qu'une pression appliquée sur ce cristal induit une différence de potentiel électrique entre ses faces.

En appliquant une différence de potentiel sinusoïdale à une certaine fréquence, nous allons créer une onde acoustique qui se propage à l'intérieur du cristal avec une amplitude parallèle à la surface du cristal. Nous allons donc induire un mouvement des 2 faces portant les électrodes à cette même fréquence, dite fréquence de résonance. Or, cette fréquence de résonance dépend de l'épaisseur du support, de sa structure chimique, de sa forme ainsi que de sa masse. C'est pourquoi le cristal doit être coupé selon une direction précise par rapport aux axes cristallographiques.

L'équation de Sauerbrey pour un quartz « AT-cut » dans l'air s'écrit [24] :

$$\Delta F = - \frac{2 \cdot F_0^2}{A \cdot \sqrt{\rho_q \cdot \mu_q}} \cdot \Delta m \quad (I-7)$$

avec F_0 la fréquence fondamentale du quartz (Hz), Δm la variation de masse (g), ρ_q la masse volumique du cristal ($2,65 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$), A l'aire de l'électrode (cm^2) et μ_q le module de cisaillement du quartz ($2,95 \cdot 10^{11} \text{ dyn}\cdot\text{cm}^{-2}$). Pour un quartz « AT-cut », la relation (I-7) devient : $\Delta F = -2,26 \cdot 10^{-10} \cdot F_0^2 \cdot \Delta m / A$ [25]. Pour un cristal de fréquence 8,9 MHz et de surface $0,2 \text{ cm}^2$, nous avons alors une sensibilité de $1,12 \text{ ng/Hz}$.

La dynamique d'un tel système est de $\pm 2 \%$ autour de la fréquence fondamentale du quartz (5, 8, 9 ou 27 MHz selon le type du quartz) ce qui donne environ $\pm 200 \text{ }\mu\text{g}$ pour une fréquence de 9 MHz en considérant la sensibilité provenant de l'application numérique précédente. Bien que la plupart des systèmes commerciaux annoncent une résolution meilleure que le Hertz [26], les performances des microbalances à quartz sont limitées par les vibrations parasites extérieures au dispositif ou par les impuretés contenues dans l'échantillon. En supposant que le bruit réel de mesure est de $\pm 5 \text{ Hz}$ en tampon à 20°C , cela implique un seuil de détection $\Gamma_{\min} = 60 \text{ pg/mm}^2$ pour un quartz 27 MHz [24], $\Gamma_{\min} = 560 \text{ pg/mm}^2$, pour un quartz à 8,9 MHz [25].

Malheureusement, ce modèle n'est pas valable lorsque le milieu couvrant est liquide (voir Figure 7). Les changements de fréquence de résonance en air sont directement reliés aux changements de masse mais, en solution, ces variations dépendent du solvant utilisé [26]. La relation entre fréquence et masse n'est plus linéaire et des corrections deviennent nécessaires.

Les oscillations de surface induisent des plans de flux laminaires dans le liquide. La relation devient alors :

$$\Delta F = -F_0^{3/2} \cdot \left(\frac{\rho \cdot \eta}{\pi \cdot \rho_q \cdot \mu_q} \right)^{1/2} \quad (\text{I-8})$$

avec ρ et η la densité et la viscosité du liquide. La profondeur de pénétration de l'onde dépend alors de $(\pi \cdot F_0 \cdot \mu_q \cdot \rho_q)^{-1/2}$. Cela correspond à 250 nm pour un cristal à 5 MHz dans l'eau à 20°C.

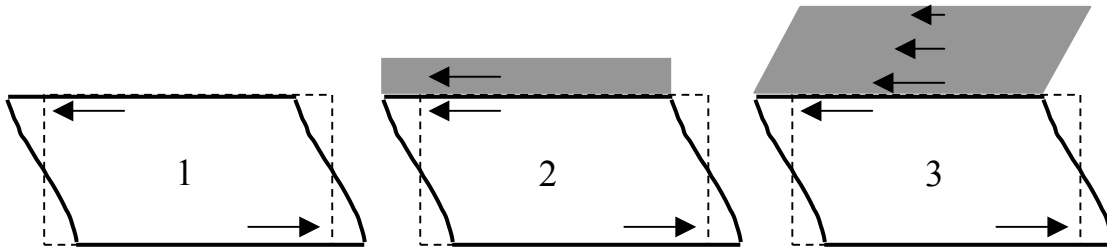


Figure 7 : Mode de vibration pour un cristal de quartz « AT-cut ». 1. cristal seul. 2. dépôt d'un film rigide vibrant à la même fréquence que le cristal. 3. Dépôt d'un film viscoélastique dont la fréquence de vibration diminue avec la distance au cristal.

Comprendre la réponse quantitative en fréquence des microbalances à quartz au niveau moléculaire n'est donc pas évident. En effet, cette réponse est affectée par la masse, la viscosité effective, l'épaisseur, la conductivité, la constante diélectrique et la morphologie de l'électrode et est donc influencée par un mécanisme général très complexe de couplage acoustique. Aux deux extrêmes de l'interprétation, nous avons le cas où les molécules sont attachées de façon rigide à l'électrode et où donc seules les variations de masse jouent un rôle ($\Delta F = -C \cdot F_0^2 \cdot \Delta m / A$ avec F_0 la fréquence fondamentale du cristal et A la surface de l'électrode) et nous avons le cas où la réponse, dans un liquide homogène est uniquement liée aux changements de viscosité et de densité ($\Delta F = -D \cdot F_0^{3/2} \cdot (\rho \cdot \eta)^{1/2}$). Malheureusement, dans le cas des biocapteurs, les variations de fréquence ne peuvent être décrites par l'un de ces deux modèles seulement dans les cas les plus simples [10]. La plupart du temps, les variations de fréquence suivent un modèle plus compliqué et une étape préalable de calibration est donc toujours nécessaire [27].

I.1.2.2. ELISA

Les techniques basées sur l'électrochimiluminescence comme la technique ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) sont devenues très populaires dans les années 80 et 90. Le test ELISA consiste en plusieurs étapes résumées sur la figure suivante :

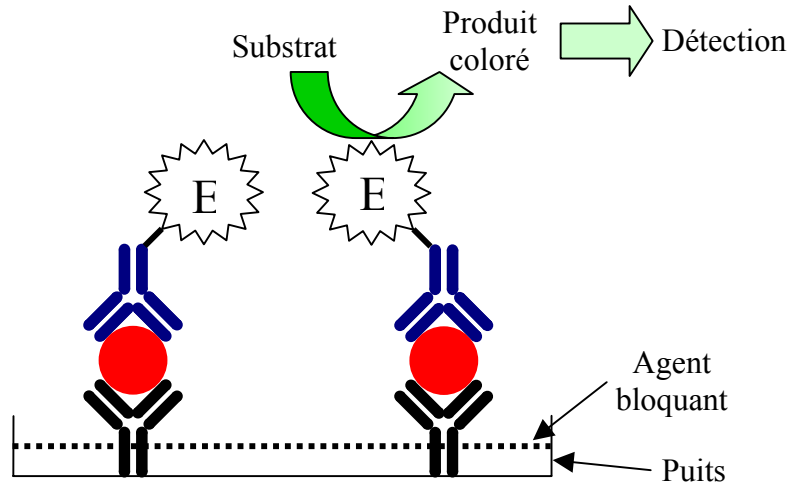


Figure 8 : Principe des biocapteurs basés sur les tests immuno-enzymatiques.

Un test immuno-enzymatique de type ELISA est constitué d'une microplaque standard (96 puits) où des ligands primaires (en noir sur la Figure 8) ont été fixés de manière non-covalente à une phase solide dans le fond de chaque puits. Après ajout d'un agent bloquant pour éviter la fixation non-spécifique de l'antigène étudié, la solution test est injectée dans les puits pour que l'antigène se fixe spécifiquement sur l'anticorps primaire. Ces puits sont ensuite rincés pour éliminer toutes les protéines non liées. D'autres étapes sont alors nécessaires pour permettre de vérifier la présence ou non d'antigènes. Un anticorps secondaire (en bleu sur la Figure 8) conjugué à une enzyme réactive (par exemple une peroxydase de raifort [28]) est ajouté dans les puits qui sont ensuite à nouveau rincés pour éliminer l'excédent de réactif. Cette enzyme a la propriété de convertir, en un temps donné, un substrat chromogénique en une solution colorée. C'est la couleur de cette solution qui va pour finir permettre de remonter à la concentration d'antigène cible à travers une mesure d'absorbance suivant la loi de Beer-Lambert [29], grâce à un spectrophotomètre :

$$DO = \varepsilon \cdot l \cdot c \quad (I-9)$$

avec DO la densité optique, ε l'absorbance (m^{-1}), l l'épaisseur du milieu coloré (m) et c la concentration (%).

Cette technique apporte sensibilité et spécificité sans avoir à marquer les ligands, bien que ce soit une mesure indirecte, ce qui fait que, contrairement à toutes les méthodes présentées auparavant, elle ne permet pas un suivi en temps réel des interactions. Elle nécessite très peu d'optimisation, est facile à utiliser et ne requiert pas de maintenance. Elle permet d'analyser 96 échantillons par plaque simultanément, ce qui, malgré la durée importante d'un test (3 à 5 heures), donne un temps de mesure par échantillon assez court. Les désavantages concernent tout de même le long temps de développement des analyses et, particulièrement pour les petites molécules, une dynamique linéaire assez faible. De plus, cette méthode requiert de grandes quantités de substrat et de consommables non réutilisables. Enfin, la possibilité d'analyser des produits recombinants en développement est limitée et requiert l'achat de produits à coût élevé.

I.1.2.3. Microscopie de fluorescence

Les biocapteurs basés sur la fluorescence sont non seulement très répandus mais aussi très divers. Nous ne prétendons pas en faire une description exhaustive dans cette sous-partie mais nous contenterons de détailler de manière générale les dispositifs en champ lointain, commerciaux, en omettant ceux en champ proche (spectroscopie de corrélation de fluorescence [30], fluorescence excitée par plasmons de surface [31],...).

La microscopie de fluorescence en champ lointain est basée sur l'utilisation d'une biopuce, c'est-à-dire un substrat fonctionnalisé avec de nombreuses sondes différentes. Comme pour les tests ELISA, la procédure d'utilisations comprend deux principales étapes : l'interaction puis la lecture. L'interaction consiste en l'injection sur la biopuce de la solution test contenant les cibles marquées par un fluorophore, suivie de l'élimination des cibles non liées par une solution de rinçage. Le nombre de molécules ayant réagi est ensuite déduit de la mesure de l'intensité de fluorescence.

Ce principe de base connaît de nombreuses variantes. Par exemple, le marquage peut se faire sur une molécule secondaire (voir Figure 9) qui va reconnaître les cibles qui se sont fixées ou alors, plusieurs fluorophores différents peuvent être utilisés. Cette méthode, dont le principe est très simple, permet une automatisation et une mise en parallèle des mesures très poussées : Affymetrix [32], leader dans le domaine des biopuces, propose des matrices de 500 000 plots inclus dans une surface de $1,28\text{cm}^2$, soit un plot tous les $16\text{ }\mu\text{m}$. De nos jours, la

fluorescence reste la méthode de référence pour la mesure d'interactions biomoléculaires, de par sa sensibilité ainsi que sa capacité d'analyses simultanées d'un très grand nombre de données, malgré la nécessité du marquage des cibles.

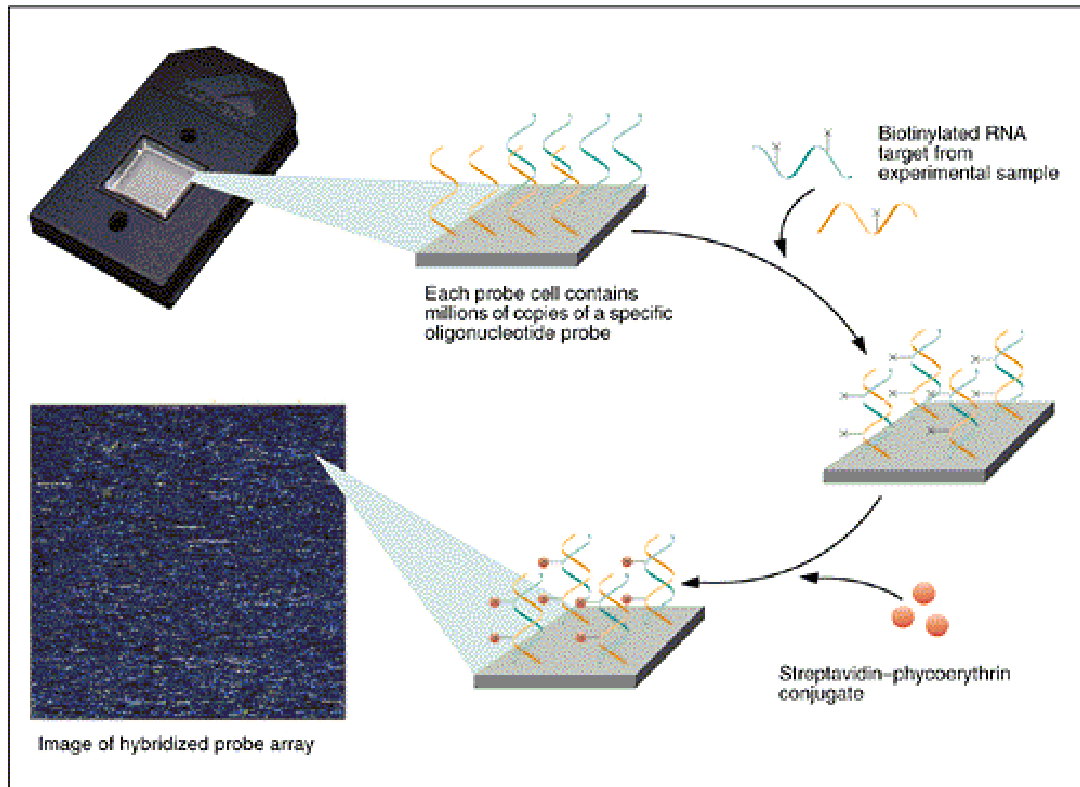


Figure 9 : Principe de la détection en microscopie de fluorescence utilisant une puce Affymetrix.

Entre les méthodes directes analysant une interaction biomoléculaire en temps réel et les méthodes indirectes analysant le résultat de nombreuses interactions biomoléculaires, nous comprenons tout l'intérêt que pourrait susciter un nouveau système couplant les avantages des deux méthodes, c'est-à-dire capable d'analyser en temps réel de nombreuses interactions. Nous allons maintenant détailler la résonance des plasmons de surface qui permet d'apporter cette solution.

I.2. RESONANCE DES PLASMONS DE SURFACE (SPR)

Comme les biocapteurs basés sur les guides d'ondes, les interféromètres Mach-Zehnder et les miroirs résonants, les biocapteurs basés sur la résonance des plasmons de

surface sont sensibles 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 méthode est donc classée parmi les méthodes de détection directe (sans marqueurs) en milieu hétérogène (un des deux réactifs est fixé sur une surface). Comme toutes les méthodes directes, la résonance des plasmons de surface permet un suivi en temps réel des interactions étudiées. Après une brève introduction historique, nous allons décrire dans cette partie les principes théoriques gouvernant ce type de capteur, ainsi que les différentes configurations de mesures en monocapteur et en multicapteur. Nous présenterons aussi des calculs de la sensibilité de ces configurations dans les cas du couplage par prisme et du couplage par réseau ainsi que différentes possibilités d'améliorer cette sensibilité. Enfin, pour finir cette partie, nous détaillerons les avantages et inconvénients des capteurs SPR.

I.2.1. Historique

En 1902, Wood, en observant le spectre d'une source continue de lumière blanche en utilisant un réseau de diffraction en réflexion, remarque de fines bandes sombres dans le spectre diffracté [33]. Des analyses théoriques entreprises par Fano [34], en 1941, ont abouti à la conclusion que ces anomalies étaient associées aux ondes de surface (plasmons de surface) supportées par le réseau. C'est en 1968 qu'Otto [35] montre que ces ondes de surface peuvent être excitées en utilisant la réflexion totale atténuée. Dans la même année, Kretschmann et Raether [36] obtiennent les mêmes résultats à partir d'une configuration différente de la méthode de réflexion totale atténuée. Suite à ces travaux, l'intérêt pour les plasmons de surfaces a considérablement augmenté, en particulier pour caractériser les films minces et pour l'étude de processus se déroulant sur des interfaces métalliques. Marquant un tournant dans les applications des plasmons de surface, Nylander et Liedberg, ont exploité pour la première fois, en 1983, la configuration de Kretschmann pour la détection des gaz et de biomolécules [37]. Les nombreuses possibilités ouvertes dans ce domaine et le besoin de plus en plus important d'appareils robustes et fiables permettant la compréhension des phénomènes biomoléculaires ont donné naissance à des entreprises spécialisées dans la vente d'appareils SPR telles que Biacore International [38] créée dès 1990.

I.2.2. Théorie

Sachant que le pouvoir réflecteur d'une lame de verre est de l'ordre de quelques pour-cent, la variation de réflectivité engendrée par une interaction biomoléculaire à la surface de cette lame de verre est tout à fait indécélable, c'est à dire noyée dans le bruit de détection. Si nous considérons une lame de microscope usuelle en BK7 ($n = 1,514$ @ $\lambda = 660$ nm, voir Annexe 4) immergée dans un liquide ($n = 1,333$), la variation de réflectivité à l'interface verre/liquide provoquée par la fixation d'une couche de 1 nm d'ADN ($n = 1,41$) peut être simulée théoriquement en utilisant les coefficients de réflexions définis dans l'Annexe 2.

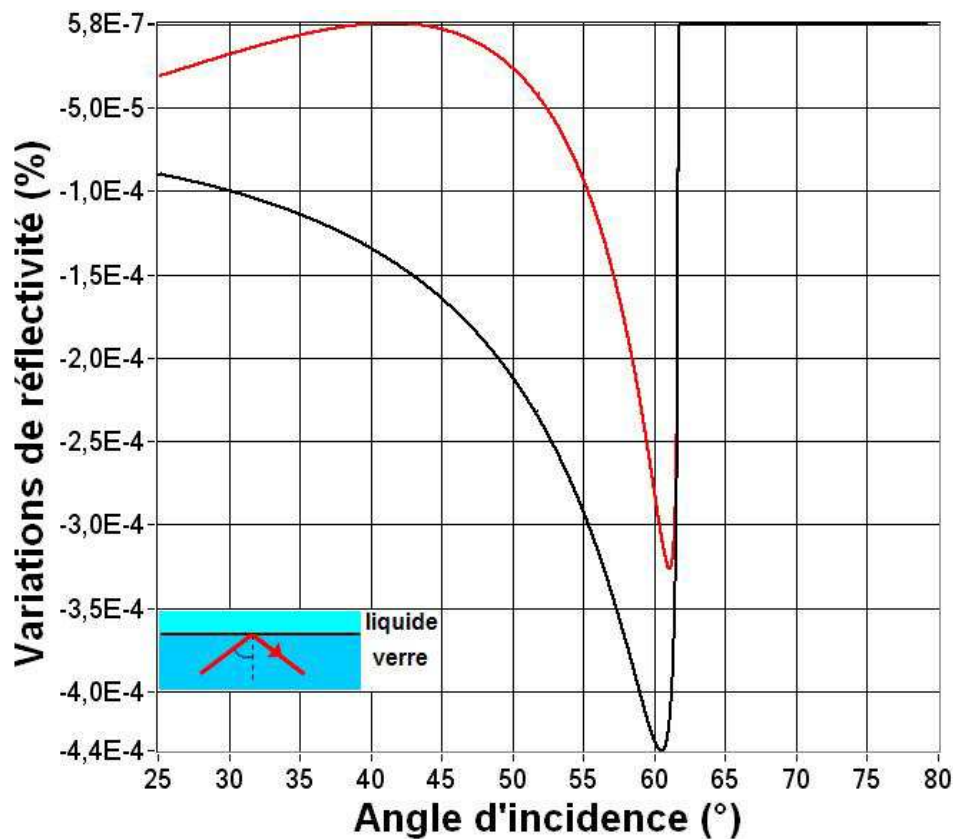


Figure 10 : Variation de réflectivité provoquée par l'adsorption d'une couche de 1 nm d'épaisseur d'ADN ($n_b=1,41$) à l'interface entre une lame de verre ($n_s=1,514$) et un liquide ($n_c=1,333$). Les abscisses sont les angles d'incidences (°) par rapport à la normale, les ordonnées sont en pour-cent (polarisation TM en rouge et TE en noir).

Cette variation de réflectivité est négative et est maximale pour des incidences très voisines de l'angle de réfraction limite [$\theta_c = \text{asin}(n_c/n_s)$ défini dans l'Annexe 2] qui correspond à l'angle à partir duquel tout le faisceau incident est réfléchi. En polarisation TE,

cette variation due à la fixation d'un nanomètre d'ADN vaut au maximum $\Delta R = -4,4.10^{-4} \%$, ce qui est indétectable de manière simple.

Pour augmenter ce contraste, nous pouvons utiliser l'onde évanescente issue d'une réflexion totale. Cette onde est caractérisée par une décroissance exponentielle de son amplitude avec la distance à l'interface et sa propagation est modifiée par toute perturbation se produisant à une distance de l'interface inférieure à sa profondeur de pénétration dans le milieu couvrant. Elle permet aussi d'être insensible aux perturbations plus éloignées et qui ne sont donc pas liées à l'interaction biomoléculaire étudiée.

I.2.2.1. Interface métal/diélectrique

Pour détecter une interaction biologique, le système doit, tout d'abord, mesurer une variation de réflectivité ΔR maximale lors d'une interaction moléculaire. De plus, le faisceau incident ne doit pas traverser la solution contenant les produits biologiques qui pourraient perturber sa propagation. Enfin, le champ optique doit être confiné sur l'interface, siège des interactions biomoléculaires. Cette propriété de confinement peut être obtenue par l'excitation d'une onde de plasmon de surface. Cette dernière se propage sur une surface séparant deux milieux de constantes diélectriques de signes opposés (voir Annexe 3). Il s'agit du phénomène de résonance des plasmons de surface sur une interface métal/diélectrique.

Le plasmon de surface est une onde à décroissance exponentielle des deux côtés de l'interface (Figure 11). Elle se propage parallèlement à l'interface séparant un métal (or, argent...) d'un milieu diélectrique sans pertes (milieu biologique). Le champ électromagnétique dans le milieu biologique présentant un caractère d'onde évanescente, c'est à dire l'amplitude décroissant exponentiellement avec la distance à l'interface, la fixation de molécules sur l'interface va modifier l'information contenue dans l'onde tant au niveau de sa phase que de son amplitude.

L'onde plasmon joue le rôle de sonde dans le milieu où se situe la réaction biomoléculaire. L'information pourra être recueillie soit sur la phase soit sur l'amplitude du faisceau réfléchi. Dans nos expériences, l'onde incidente, polarisée TM, traverse d'abord un prisme de verre d'indice de réfraction élevé et se réfléchit sur l'interface sous un angle d'incidence supérieur à l'angle critique défini par rapport au milieu biologique. Ce prisme

constitue le dispositif de couplage de l'onde incidente avec l'onde de surface (plasmon de surface).

L'intérêt du système optique, basé sur la résonance des plasmons de surface, est d'amplifier la variation du signal de réflectivité ΔR liée à la variation d'épaisseur optique produite en surface. Un film mince métallique, assurant le rôle de transducteur, autorise la résonance des plasmons de surface. A ce transducteur sont associés des paramètres qui vont permettre de déterminer la sensibilité de ce dispositif et ses limites.

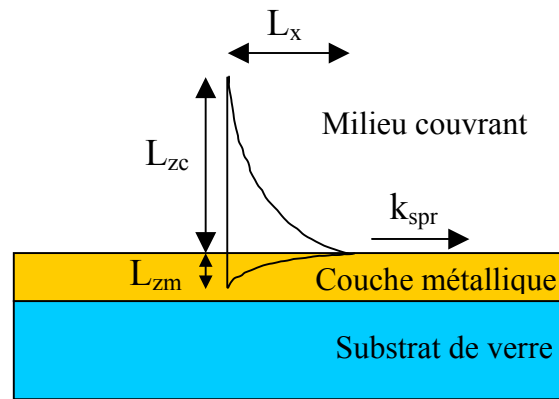


Figure 11 : Représentation des interfaces métal/milieu extérieur et or/verre et de l'onde plasmon de surface (dimensions typiques définies dans le Tableau 1).

I.2.2.2. Couplage de l'onde incidente

L'onde incidente ne peut être couplée avec l'interface métal/diélectrique directement. En effet, comme l'indiquent les calculs basés sur les équations de Maxwell de l'Annexe 3, la composante longitudinale k_{spr} du vecteur d'onde de l'onde de surface vaut :

$$k_{SPR} = \text{Re} \left\{ \sqrt{\frac{\epsilon_m \cdot \epsilon_d}{\epsilon_m + \epsilon_d}} \right\} \cdot \frac{\omega}{c} \quad (\text{I-10})$$

avec ϵ_d la permittivité du milieu diélectrique et ϵ_m la permittivité du métal.

Dans le cadre de l'utilisation des plasmons de surface pour la détection d'interactions biologique, le milieu diélectrique est le milieu couvrant (milieu liquide siège des interactions) de la Figure 11. Ce vecteur d'onde va nous permettre de calculer les profondeurs de pénétration de l'onde plasmon de surface dans les milieux couvrant (L_{zc}) et métallique (L_{zm})

ainsi que sa longueur de propagation sur l'interface (L_x). Ces profondeurs de pénétration et longueurs de propagation sont définies comme la distance à laquelle l'intensité de l'onde ne vaut plus que $1/e$ de l'intensité maximale et donc valent $L_i = 1/[2 \cdot \text{Im}(k_i)]$ avec k_i défini dans les équations (III-12) et (III-13) de l'Annexe 3.

$$L_{z_m} = \frac{c}{2\omega} \cdot \left(\text{Im} \left\{ \sqrt{\frac{\varepsilon_m^2}{\varepsilon_m + \varepsilon_d}} \right\} \right)^{-1} \quad (\text{I-11})$$

$$L_{z_c} = \frac{c}{2\omega} \cdot \left(\text{Im} \left\{ \sqrt{\frac{\varepsilon_d^2}{\varepsilon_m + \varepsilon_d}} \right\} \right)^{-1} \quad (\text{I-12})$$

$$L_x = \frac{c}{2\omega} \cdot \left(\text{Im} \left\{ \sqrt{\frac{\varepsilon_m \cdot \varepsilon_d}{\varepsilon_m + \varepsilon_d}} \right\} \right)^{-1} \quad (\text{I-13})$$

A.N. : métal $\Rightarrow$ or : $n = 0,13 + i \cdot 3,69$ ou argent : $n = 0,14 + i \cdot 4,21$ @ $\lambda = 660$ nm
milieu diélectrique couvrant $\Rightarrow$ eau : $n = 1,3316$ @ $\lambda = 660$ nm

Longueur d'onde $\lambda = 660$ nm	L_{z_m} (nm)	L_{z_c} (nm)	L_x (μm)	Concentration du champ dans le diélectrique
Or	13,3	102,1	7	88,5 %
Argent	11,8	118,5	10,1	90,9 %

Tableau 1 : Grandeurs caractéristiques d'une onde plasmon de surface à $\lambda = 660$ nm.

Ce calcul montre que, dans le cas des plasmons de surface, la majeure partie de l'onde évanescente (≈ 90 %) est confinée dans le diélectrique et que cette technique permet de détecter tout changement se produisant dans ce milieu diélectrique à moins de 100 nm de l'interface. Par analogie avec les guides d'ondes, nous allons définir l'indice effectif N_{SPR} de l'interface métal/diélectrique où seront guidées les ondes plasmons de surface.

$$N_{SPR} = \text{Re} \left\{ \sqrt{\frac{\varepsilon_m \cdot \varepsilon_d}{\varepsilon_m + \varepsilon_d}} \right\} \quad (\text{I-14})$$

Pour qu'il y ait excitation des plasmons de surface, il faut qu'il y ait égalité entre la projection sur l'interface du vecteur de propagation de l'onde incidente et la constante de propagation de ce plasmon.

$$n_i \cdot \sin(\theta_i) = N_{SPR} \quad (I-15)$$

avec n_i et θ_i l'indice de réfraction et l'angle d'incidence dans le milieu précédent le métal. Pour que cette relation puisse être réalisée, il faut que n_i soit plus grand que le second terme de cette équation. Si nous considérons une configuration où le métal est l'or ($n = 0,13 + i3,69$ @ $\lambda = 660$ nm) et le milieu diélectrique est l'eau ($n = 1,3316$ @ $\lambda = 660$ nm), n_i doit alors être supérieur à 1,43 (ordonnée de la courbe jaune d'indice effectif du plasmon correspondant à une longueur d'onde $\lambda = 660$ nm sur la Figure 12). La figure suivante illustre l'impossibilité d'exciter directement le plasmon à travers le milieu diélectrique par un faisceau incident sur la surface métallique plane, c'est-à-dire l'impossibilité d'égaliser l'indice de réfraction effectif du plasmon de surface à l'interface entre l'or et l'eau avec l'indice de l'eau pour des longueurs d'ondes comprises entre 550 nm et 900 nm. Les valeurs des indices utilisées dans l'équation (I-14) proviennent de M.L. Theye [39] pour l'or et de P. Schiebener *et al.* [40] pour l'eau.

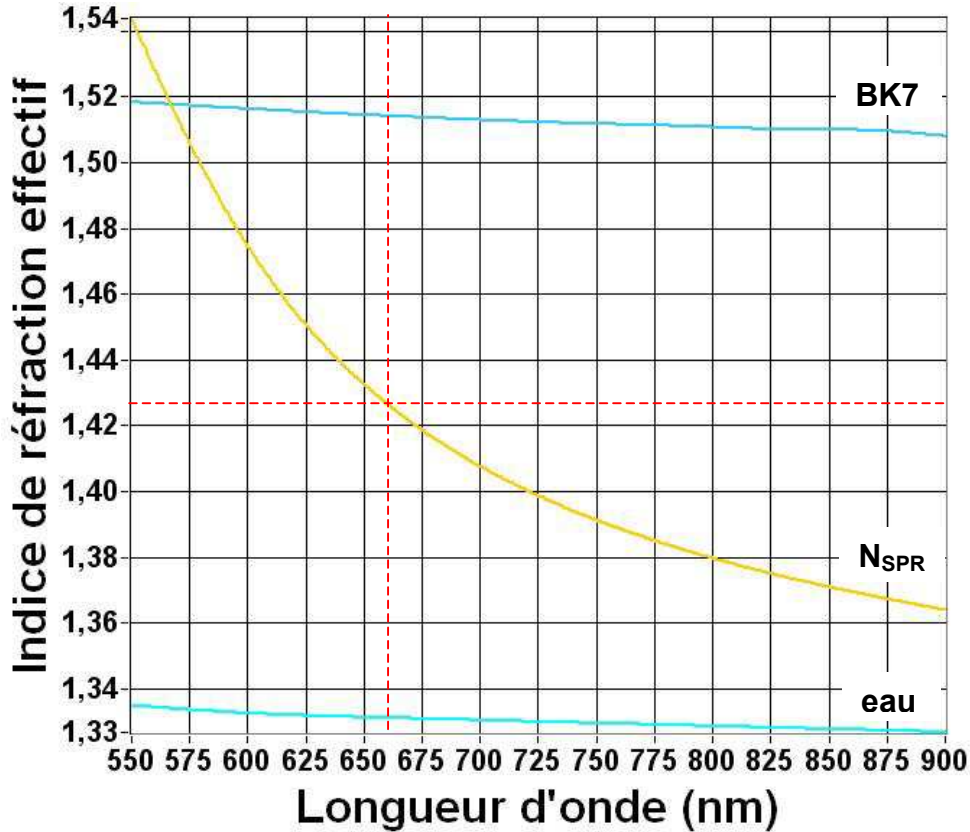


Figure 12 : Indice de réfraction effectif du plasmon de surface à l'interface entre l'or et l'eau en fonction de la longueur d'onde (courbe jaune). Indice de l'eau (courbe bleue entre 1,33 et 1,34) et indice du BK7 (courbe bleue entre 1,50 et 1,52).

Il faut donc augmenter le vecteur d'onde incident pour assurer le couplage avec celui de l'onde de surface. Deux modes de couplage sont utilisés couramment :

- par prisme

Le vecteur d'onde d'un faisceau lumineux peut être augmenté en passant dans un milieu d'indice de réfraction plus élevé. Par exemple, un prisme en borosilicate (BK7) permet de trouver des solutions à l'équation (I-15) dans le cas d'une interface or/eau et pour des longueurs d'onde supérieures à $\lambda = 570$ nm (voir Figure 12). Dans le cas d'un prisme d'indice n_p , qui n'influence pas k_{SPR} pour des épaisseurs de métal supérieures à 45 nm [41], la condition de couplage s'écrit :

$$k_x = k_0 \cdot n_p \cdot \sin \theta = k_{SPR} \quad (I-16)$$

L'indice du prisme doit donc être supérieur à l'indice effectif de l'onde plasmon de surface afin qu'un choix judicieux de l'angle d'incidence θ du faisceau sur l'interface métal/diélectrique permette d'égaliser la projection du vecteur d'onde sur cette interface avec le vecteur d'onde du plasmon. Ce principe est illustré dans la figure suivante représentant la configuration de Kretschmann.

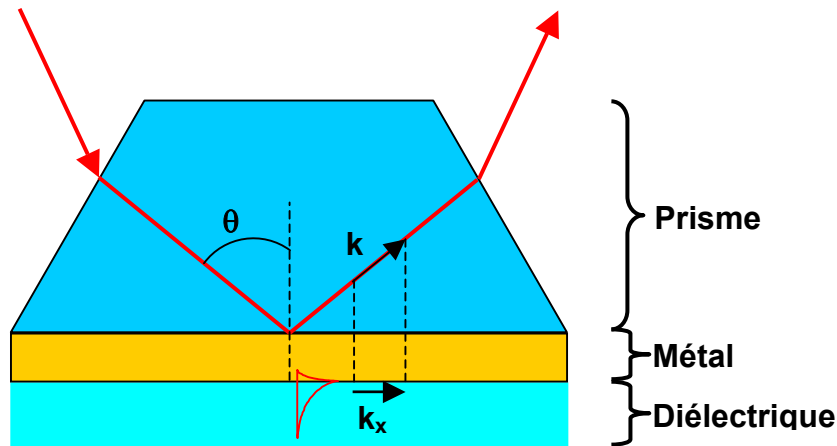


Figure 13 : Excitation des plasmons de surface par un prisme en verre d'indice n_p recouvert d'une couche mince métallique d'indice n_m et d'épaisseur e_m (configuration de Kretschmann).

Dans l'équation (I-10), les permittivités ϵ_m du métal et ϵ_d du diélectrique étant permutable, le milieu diélectrique peut donc être placé entre le prisme et le métal, c'est la configuration d'Otto [35]. L'onde plasmon est alors créée sur la face interne de la couche d'or au lieu de la face externe comme illustré sur la Figure 13.

- par réseau

Au lieu d'augmenter l'indice de réfraction du milieu d'incidence, nous pouvons directement augmenter le vecteur d'onde du faisceau incident en le faisant interagir avec un réseau de diffraction en réflectivité. Si nous supposons que l'expression de k_{SPR} n'est pas modifiée par la modulation de la surface due au réseau de pas Λ , la condition de couplage, pour l'ordre de diffraction m , s'écrit :

$$n_c \cdot \sin \theta + m \cdot \lambda / \Lambda = \pm N_{SPR} \quad (I-17)$$

Cette équation est équivalente à l'équation (I-3), c'est-à-dire que le réseau sert à augmenter le vecteur d'onde du faisceau incident pour atteindre l'indice effectif du guide ou de l'interface métal/diélectrique dans notre cas. Comme dans le cas des guides d'ondes couplés par réseau, le signe ($\pm$) représente le sens de propagation de l'onde. Bien sûr, comme $n_c < N_{SPR}$, le second terme du côté gauche de l'équation (I-17) doit nécessairement être du même signe que le côté droit de cette équation. Le signe « + » correspond aux ordres de diffraction positifs et le signe « - » correspond aux ordres de diffraction négatifs. Cela implique que pour les ordres de diffraction positifs, θ diminue quand la longueur d'onde augmente et que pour les ordres négatifs, θ augmente avec la longueur d'onde. Dans la Figure 14 est représenté le schéma d'un dispositif d'excitation des plasmons de surface par réseau. La projection du vecteur d'onde du premier ordre de diffraction (k_x) est égale à au vecteur d'onde du plasmon de surface. Le principal désavantage de cette méthode est que le faisceau incident ainsi que le faisceau réfléchi traversent le milieu couvrant et sont donc perturbés par les inhomogénéités de cette phase liquide.

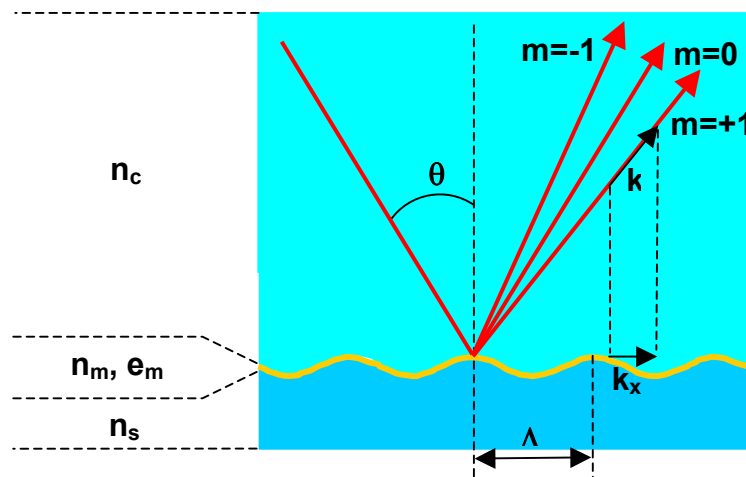


Figure 14 : Excitation des plasmons de surface par un réseau de pas Λ gravé sur un substrat d'indice n_s recouvert d'une couche mince métallique d'indice n_m et d'épaisseur e_m . Le milieu n_c est ici une phase liquide dans laquelle circulent les produits biologiques.

I.2.2.3. Description qualitative de la résonance des plasmons de surface

La résonance des plasmons de surface peut être considérée comme une oscillation collective des électrons libres du métal à l'interface entre ce métal et le milieu diélectrique. Cela se traduit par une chute de la réflectivité du métal dû à un transfert d'énergie entre le faisceau incident et l'onde de surface qui se propage sur l'interface métal/diélectrique lorsque les conditions de résonance sont remplies et donc par un pic d'absorption localisé autour de l'angle de résonance dans la plage angulaire de réflexion totale (Figure 15). Pour une épaisseur de la couche métallique bien choisie (voir la partie II.1.1), toute l'énergie incidente est absorbée au niveau de l'interface et la réflectivité devient nulle. Dans le cas du couplage par réseau, quand plusieurs ordres de diffraction peuvent satisfaire l'équation (I-17), il existe plusieurs angles de résonance, ce qui se traduit par plusieurs pics d'absorption dans la courbe de réflectivité dans l'ordre de diffraction zéro.

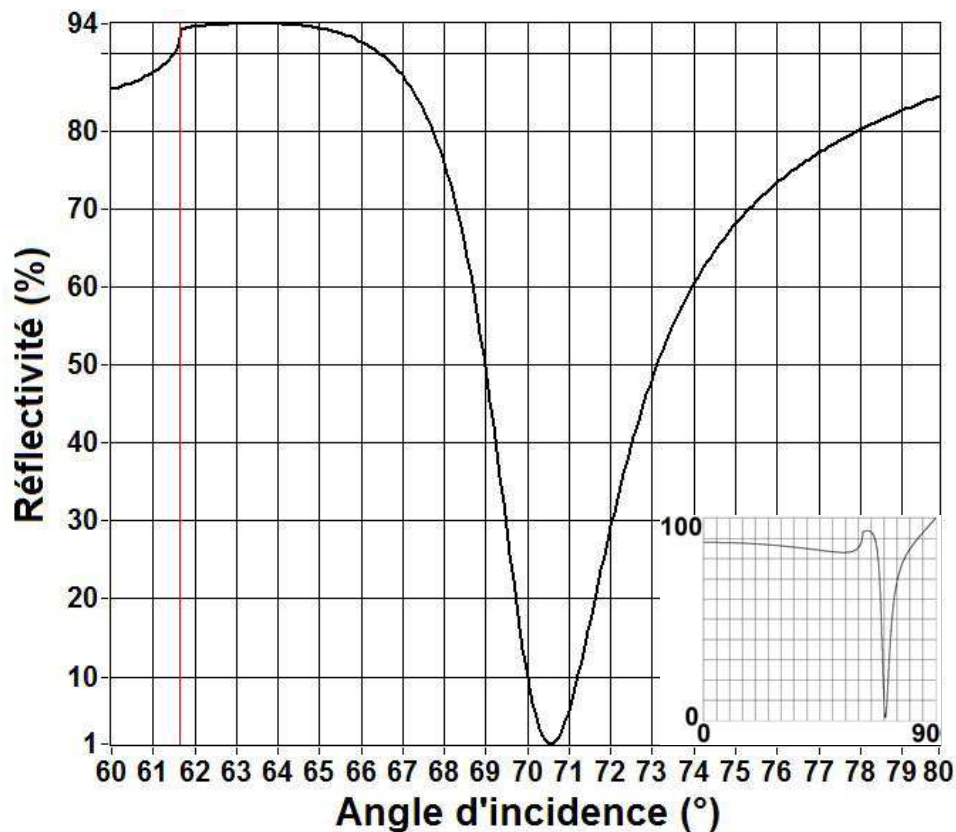


Figure 15 : Réflectivité, en polarisation TM et pour une longueur d'onde $\lambda = 660$ nm, entre un prisme en BK7 ($n = 1,514$) et une couche d'or de 48 nm en contact avec un milieu liquide ($n_c = 1,333$). Le pic d'absorption est dû à la SPR. La ligne rouge indique la position de l'angle de réfraction limite. En encart, la même courbe est tracée pour toutes les incidences possibles.

Les variations des propriétés de ce pic d'absorption vont permettre de quantifier les perturbations se produisant près de l'interface métal/diélectrique. Ces perturbations peuvent avoir trois origines :

- variation de l'indice de réfraction n_c du milieu couvrant,
- formation d'une couche biologique d'indice de réfraction n_b dont l'épaisseur e_b va augmenter au cours du temps,
- augmentation de la concentration en molécules cibles au voisinage de l'interface se traduisant par une augmentation de l'indice de réfraction n_b dans la couche biologique d'épaisseur e_b constante.

I.2.2.4. Amplification des variations de réflectivité

Nous allons maintenant calculer la variation de réflectivité obtenue suite à la fixation d'une couche de 1 nm d'ADN ($n_b = 1,41$) dans les mêmes conditions que pour la simulation représentée sur la Figure 10 mais avec une couche d'or insérée entre le verre et le liquide (la méthode de Rouard de calcul des coefficients de réflexion est détaillée dans l'Annexe 2). Cela va nous permettre d'évaluer l'amplification de la variation de réflectivité apportée par la résonance des plasmons de surface.

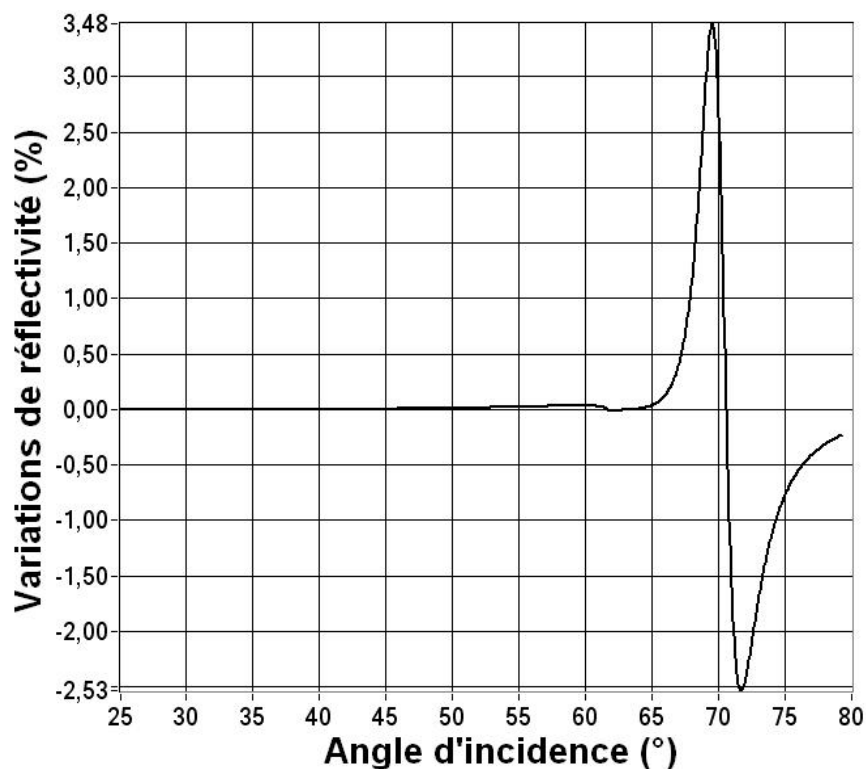


Figure 16 : Variation de réflectivité provoquée par l'adsorption d'une couche de 1 nm d'épaisseur d'ADN ($n_b = 1,41$) à l'interface entre un prisme de verre ($n_s = 1,514$) recouverte d'une couche mince d'or ($n = 0,129 + i3,689$ @ $\lambda = 660$ nm, $e = 48$ nm) et un liquide ($n_c = 1,333$). Les abscisses sont les angles d'incidences (°) par rapport à la normale, les ordonnées sont en pour-cent (polarisation TM en noir).

Dans cette configuration, au voisinage de l'angle de résonance des plasmons de surface ($\theta_{\text{SPR}} = 70,7^\circ$), la variation de réflectivité due à la fixation de la couche d'1 nm d'ADN atteint un maximum $\Delta R = 3,48 \%$ en polarisation TM. Ce maximum se situe à l'angle d'incidence où la pente de la courbe de réflectivité de la Figure 15 est la plus forte. **Par rapport au cas d'une simple lame de verre (Figure 10), l'adjonction d'une couche d'or a augmenté le contraste dû à l'adsorption de 1 nm d'ADN par un facteur 8 000, soit quasiment 4 ordres de grandeur.**

La résonance des plasmons de surface est donc un phénomène physique susceptible de donner lieu à un biocapteur à condition de choisir la bonne méthode de mesure de ce phénomène.

I.2.3. Monocapteurs

Les monocapteurs forment le groupe le plus utilisé, car le plus ancien, des biocapteurs basés sur la SPR. Ce terme regroupe les dispositifs ne permettant de suivre qu'une seule interaction biologique à la fois.

La condition de résonance des plasmons de surface donnée par l'équation (I-16) ou (I-17), lorsque les paramètres physiques sont fixés (prisme ou réseau, métal et milieu diélectrique) donne une relation entre l'angle d'incidence et la longueur d'onde (voir, par exemple, la Figure 29). Lorsqu'une interaction biomoléculaire se produit, elle provoque une perturbation locale de l'indice du milieu diélectrique et va donc changer les conditions de la résonance. Il existe donc principalement deux méthodes de détection, l'interrogation angulaire [37] qui consiste à suivre la position angulaire du minimum de réflectivité SPR à une longueur d'onde fixée et l'interrogation spectrale [42] qui consiste à suivre la position spectrale du minimum de réflectivité SPR à un angle d'incidence fixé.

I.2.3.1. Interrogation angulaire

Pour une longueur d'onde fixée, la position angulaire de la résonance des plasmons de surface se traduit par une chute de la réflectivité en polarisation TM, due à l'absorption de l'énergie incidente par l'interface métal/diélectrique (Figure 15). Les variations de la position

angulaire de ce minimum vont donc nous informer sur l'évolution de l'interaction étudiée au niveau de la surface sensible. Elles peuvent être mesurées de différentes manières :

- Le faisceau incident, collimaté, balaye les différentes incidences autour de l'angle de résonance [43] et le signal réfléchi est envoyé sur une photodiode. Une lecture simultanée du signal de la photodiode et de l'angle d'incidence nous donne la valeur de l'angle de résonance quand le signal de la photodiode est minimal. Le temps de mesure est lié à la durée d'un balayage. La mesure ne prend en compte que la surface éclairée par le faisceau laser.

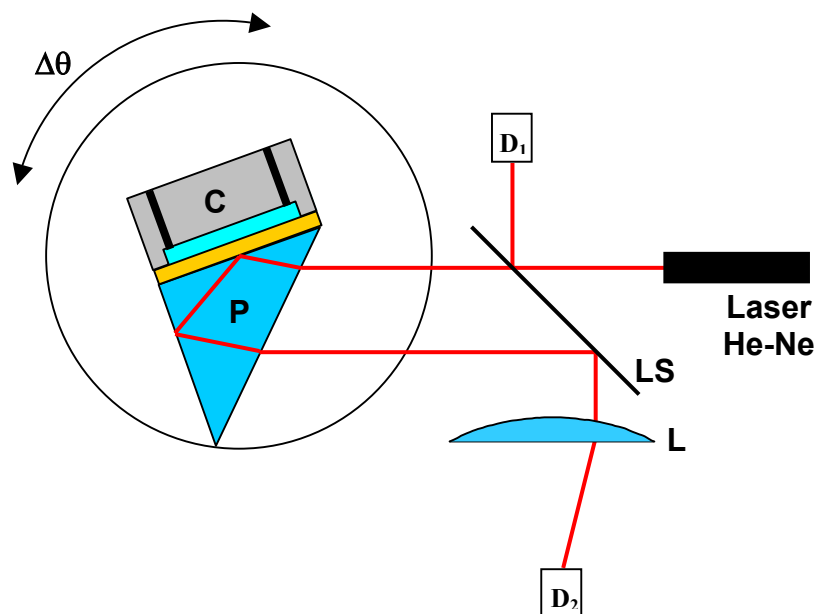


Figure 17 : Biocapteur SPR couplé par prisme à interrogation angulaire par balayage. **C** : cuve, **D₁** : photodétecteur de référence, **L** : lentille, **D₂** : photodétecteur du signal SPR placé au foyer de la lentille **L**, **LS** : lame semi-réfléchissante, **P** : prisme rectangle dont l'une des faces est recouverte d'or. Le prisme est monté sur une platine de rotation permettant de balayer l'angle d'incidence θ . Cette configuration en coin de cube réfléchit le faisceau dans la même direction que le faisceau incident.

Le remplacement de la platine de rotation par un cristal piézo-électrique, qui va induire de petites oscillations du prisme, couplé à une détection synchrone permet d'augmenter le rapport signal sur bruit du système en permettant de ne tenir compte que de la partie du signal liée à l'angle de mesure [14].

- Le faisceau incident, non-collimaté, éclaire la surface simultanément selon différentes incidences autour de l'angle de résonance [44] et le signal réfléchi est envoyé sur une barrette de photodiodes. Chaque photodiode correspond alors à une certaine incidence et la photodiode ayant reçu le signal minimal indique l'angle de résonance. Le temps de mesure est lié au temps de lecture de la barrette CCD. La mesure correspondant à chaque incidence provient d'une zone différente de la surface métallique dans le cas d'un faisceau divergent (Figure 18) ou de la zone de focalisation dans le cas d'un faisceau convergent (non représenté).

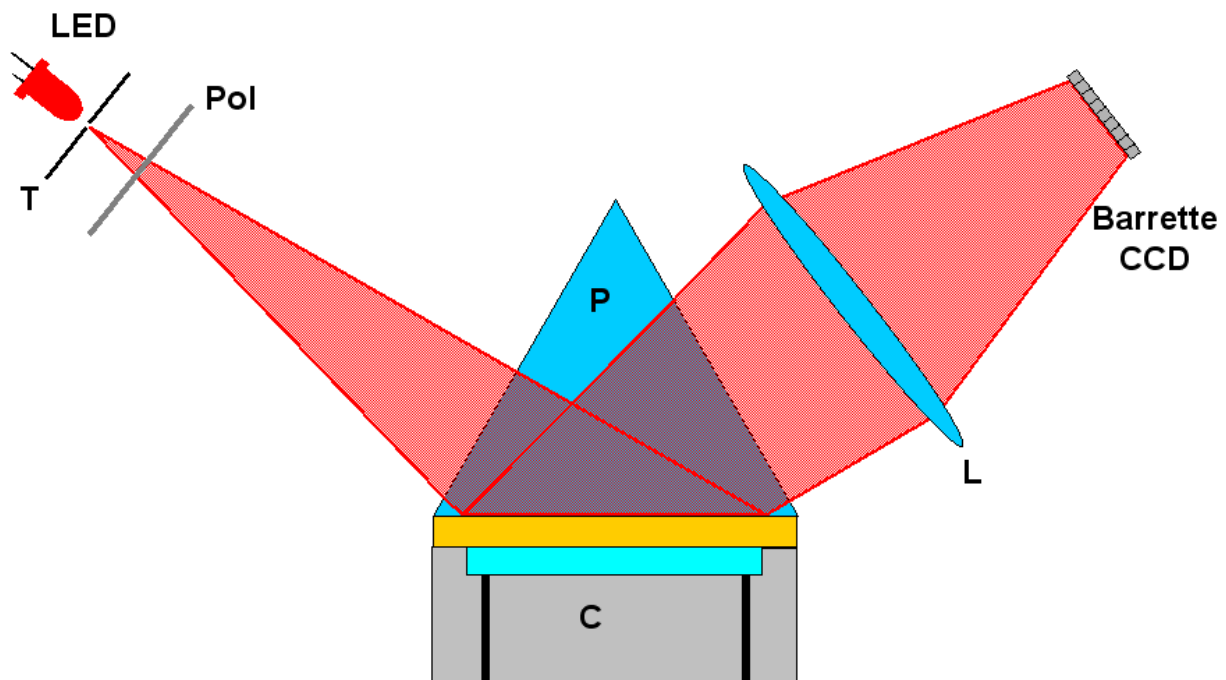


Figure 18 : Biocapteur SPR couplé par prisme à interrogation angulaire sans balayage. *C* : cuve, *L* : lentille, **LED** : diode électroluminescente, *LS* : lame semi-réfléchissante, *P* : prisme dont l'une des faces est recouverte d'or, *Pol* : polariseur, *T* : trou source.

Cette dernière configuration, c'est-à-dire, la SPR en interrogation angulaire sans balayage à partir d'un faisceau convergent, permet de s'affranchir des inhomogénéités de la zone sensible en comparaison avec la configuration en faisceau divergent représentée ci-dessus. De plus, le fait qu'il n'y ait aucune partie mobile permet de diminuer le temps d'acquisition d'une mesure et donc de pouvoir suivre des interactions plus rapides tout en simplifiant le montage. Un dispositif basé sur un faisceau divergent issu d'une diode LED, développé depuis 1995, est maintenant commercialisé par Texas Instrument sous le nom de

SPREETA [45] depuis 1999. Ce système permet d'atteindre une sensibilité $\Delta n = 5.10^{-6}$ à $\lambda = 830$ nm [46]. Par contre, Biacore International commercialise une gamme de dispositifs fondé sur l'interrogation angulaire sans balayage avec un faisceau convergent (biacore 2000, biacore 3000, biacore X, ... [38]) depuis 1990 et annonce une sensibilité de $\Gamma = 1 \text{ pg/mm}^2$ à 10 pg/mm^2 à $\lambda = 760$ nm suivant les modèles, ce qui correspond à un décalage du minimum de $\Delta\theta = 10^{-4}$ degrés (respectivement 10^{-3} degrés). D'autres sociétés utilisent aussi la même configuration que Biacore International comme Windsor Scientific avec son modèle IBIS [47]

I.2.3.2. Interrogation spectrale

Pour un angle d'incidence fixé, la position spectrale de la résonance des plasmons de surface se traduit par une chute de la réflectivité en polarisation TM, due à l'absorption de l'énergie incidente dans l'interface métal/diélectrique, dans le spectre visible (Figure 19). Les variations de la position spectrale de ce minimum vont donc nous informer sur l'évolution de l'interaction étudiée au niveau de la surface sensible.

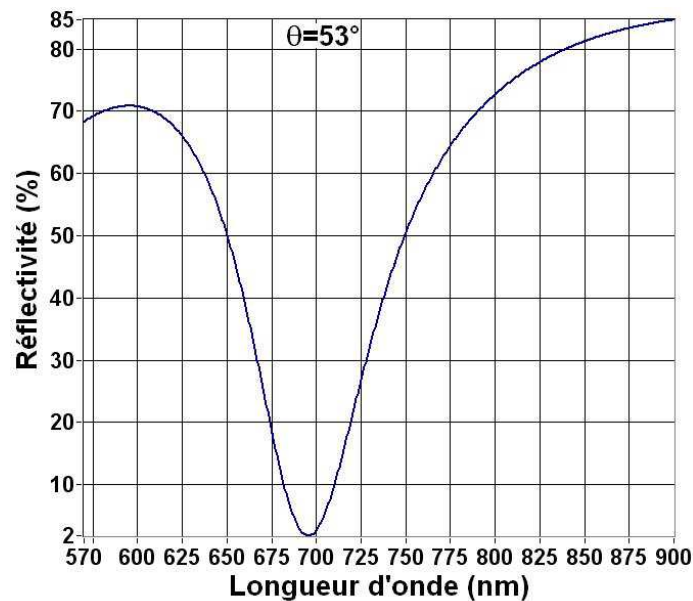


Figure 19 : Réflectivité en fonction de la longueur d'onde, en polarisation TM et pour un angle d'incidence $\theta = 53^\circ$, entre un prisme en SF11 et une couche d'or de 48 nm en contact avec un milieu liquide ($n_c = 1,333$). Le pic d'absorption est dû à la SPR.

Cette interrogation spectrale est, dans la plupart des cas, réalisée à partir d'un montage du type suivant [48] :

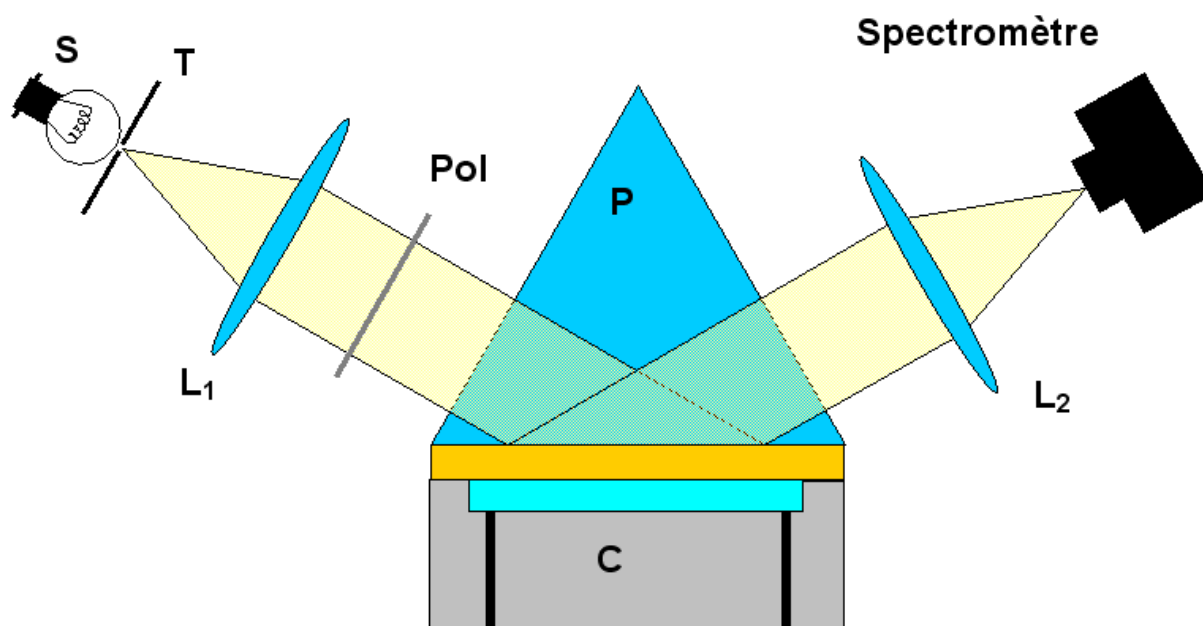


Figure 20 : Biocapteur SPR couplé par prisme à interrogation spectrale. *C* : cuve, *L*₁, *L*₂ : lentilles, *P* : prisme dont l'une des faces est recouverte d'or, *Pol* : polariseur, *S* : source de lumière blanche, *T* : trou source.

Bien que ces biocapteurs à interrogation spectrale soit couramment utilisés dans certaines équipes de recherche [49, 50, 51], ce type de mesure SPR n'a pas encore donné lieu, à notre connaissance, à une commercialisation. Cela est probablement dû à une sensibilité légèrement inférieure ($\Delta n_{\min} = 7,6 \cdot 10^{-5}$ [50] ou $\Delta n_{\min} = 1,7 \cdot 10^{-5}$ [51]) mais encore plus sûrement au prix de revient d'un spectromètre ayant une résolution suffisante.

I.2.4. Imagerie et multicapteurs

Les multicapteurs SPR forment le prolongement des monocapteurs SPR, c'est-à-dire qu'ils mettent en œuvre en chaque point de la surface fonctionnalisée des techniques utilisées précédemment pour une mesure moyennée sur cette même surface. Les premiers articles mentionnant l'imagerie SPR datent de 1988 [52] et le nombre de publications utilisant ce dispositif dans une grande variété d'applications n'a cessé d'augmenter depuis [53,54–59].

Comme expliqué dans le cadre des monocapteurs SPR, la condition de résonance des plasmons de surface donne une relation entre l'angle d'incidence et la longueur d'onde.

Lorsqu'une interaction biomoléculaire se produit, elle provoque une perturbation locale de l'indice du milieu diélectrique et va donc changer les conditions de la résonance. La méthode de mesure la plus répandue en imagerie SPR consiste à suivre, pour un angle d'incidence et une longueur d'onde fixés, les variations de la réflectivité dues au déplacement du pic d'absorption de la SPR, méthode que nous appellerons **interrogation en réflectivité**. En effet, l'imagerie en configuration d'interrogation angulaire, nécessiterait un balayage au rythme de la vitesse d'acquisition de la caméra, ce qui rendrait incompatible la précision voulue avec la durée des interactions mesurées. Une autre possibilité consiste à envoyer toutes les incidences simultanément. Une direction de la caméra correspond alors aux différents angles d'incidence, ce qui laisse l'autre direction libre pour suivre différentes sondes [55,56]. Nous parlons alors de multicapteurs 1D par opposition à l'interrogation en réflectivité permettant le suivi de multicapteurs 2D. Dans cette partie, nous allons nous concentrer sur les multicapteurs 2D.

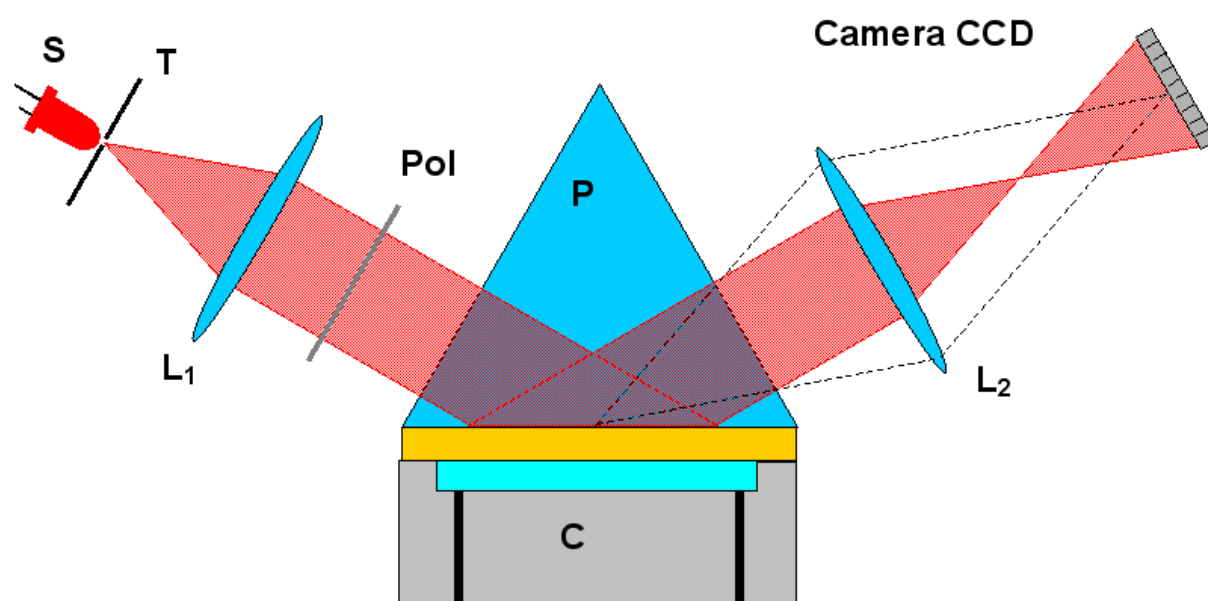


Figure 21 : Biocapteur basé sur l'imagerie SPR, couplé par prisme et à interrogation en réflectivité. *C* : cuve, *L*₁, *L*₂ : lentilles, *P* : prisme dont l'une des faces est recouverte d'or, *Pol* : polariseur, *S* : source de lumière monochromatique, *T* : trou source. Le trait en pointillé indique que la lentille *L*₂ conjugue l'interface métallique avec la caméra CCD.

Dans la Figure 21, un système optique, symbolisé par la lentille *L*₂, permet d'imager la surface métallique fonctionnalisée sur la caméra CCD. La valeur mesurée sur chaque pixel de

la caméra est alors proportionnelle à l'intensité du faisceau réfléchi issu d'une zone particulière de la surface.

I.2.4.1. Protocole expérimental type

Pour qu'un système basé sur les variations de réflectivité soit optimal, il faut le placer dans des conditions où une perturbation donnée provoquera une variation maximale. Cette variation est maximale au point où la pente de la courbe de réflectivité (en fonction de l'angle d'incidence ou de la longueur d'onde) est maximale, comme illustré par la relation entre la Figure 15 et la Figure 16. Deux possibilités se présentent donc pour maximiser les variations de réflectivité mesurées : à longueur d'onde fixée, la mesure se fait à l'angle d'incidence de travail θ_t vérifiant $\left| \frac{dR}{d\theta}(\theta_t) \right| = \max \left| \frac{dR}{d\theta} \right|$ ou, à angle fixé, la mesure se fait à la longueur d'onde de travail λ_t vérifiant $\left| \frac{dR}{d\lambda}(\lambda_t) \right| = \max \left| \frac{dR}{d\lambda} \right|$. Ces deux possibilités aboutissent à la même configuration où l'angle d'incidence et la longueur d'onde sont fixés.

- Détermination de l'angle de travail en cinétique θ_{cin}

La première opération du protocole expérimental consiste à se placer au bon endroit pour effectuer les mesures d'intérêt. Il faut donc mesurer, à longueur d'onde fixée, la réflectivité en fonction de l'angle d'incidence [57], ou, à angle fixé, la réflectivité en fonction de la longueur d'onde, sur une plage suffisamment importante afin d'englober la totalité du pic d'absorption dû à la SPR (Figure 15 et Figure 19).

Il suffit alors de se positionner à l'angle d'incidence de travail (resp. la longueur d'onde de travail) maximisant la pente de la courbe de réflectivité.

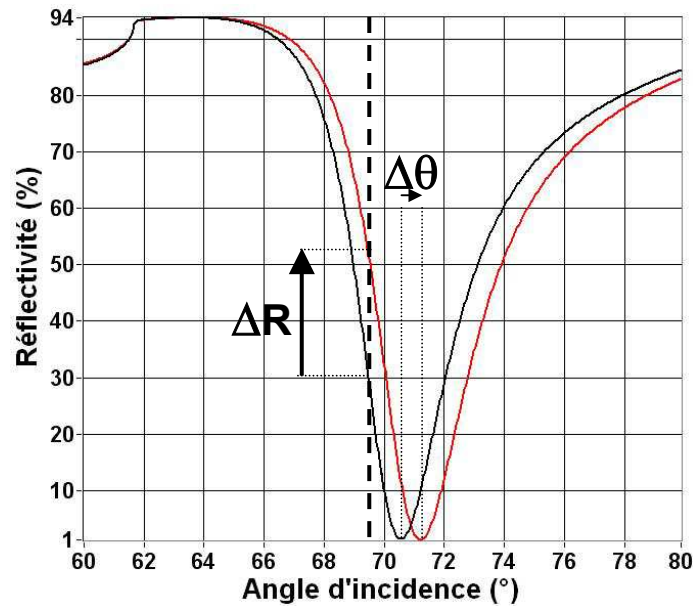


Figure 22 : Réflectivité, en polarisation TM et pour une longueur d'onde $\lambda = 660 \text{ nm}$, entre un prisme en BK7 ($n = 1,514$) et une couche d'or de 48 nm en contact avec un milieu liquide ($n_c = 1,333$). L'ajout d'une couche biologique fait passer de la courbe noire à la courbe rouge.

- Mesure cinétique

L'étape suivante consiste alors à suivre les variations de réflectivité, à la position de travail calculée, en fonction du temps. Une cinétique d'interaction se divise en trois parties (voir Figure 23). Tout d'abord, la lame est mise en contact avec la solution tampon sans les cibles afin de mesurer la réflectivité initiale qui va servir de référence. Ensuite, les molécules cibles, diluées dans la même solution tampon, sont injectées et vont interagir avec les sondes, c'est l'association. Enfin, le tampon seul est de nouveau injecté, c'est la phase de rinçage ou dissociation. Cette dernière phase nous permet de mesurer la réflectivité finale dans les mêmes conditions que la réflectivité initiale. La différence de réflectivité correspond alors au changement d'indice provoqué par la fixation stable de la cible sur les sondes.

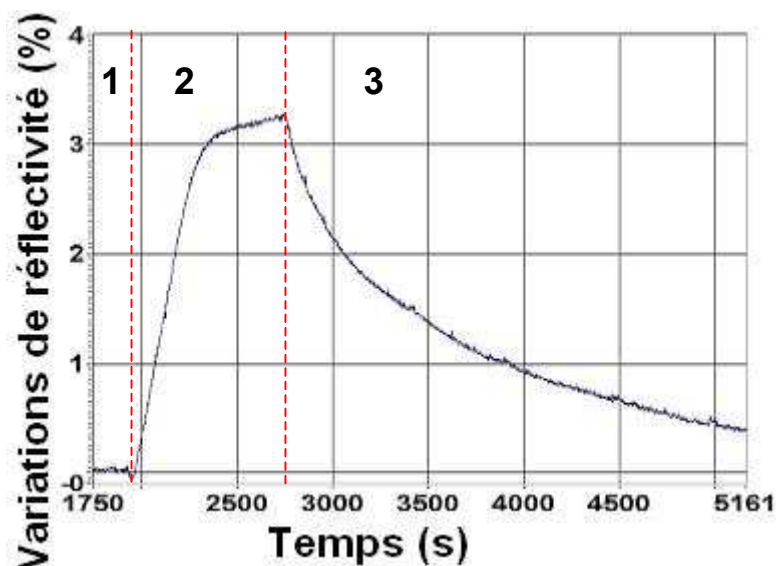


Figure 23 : Exemple de cinétique d'interaction. **1**, injection du tampon (référence). **2**, injection des cibles diluées en tampon (association). **3**, rinçage en tampon (dissociation).

La sensibilité de ce type de biocapteurs basé sur l'imagerie SPR est du même ordre de grandeur que celle de la majorité des autres biocapteurs SPR, c'est-à-dire de l'ordre de $\Gamma = 10 \text{ pg/mm}^2$ [56]. Cette sensibilité peut aussi s'exprimer sous forme, pour un réactif donné, de la concentration minimale détectable. Cette sensibilité a été reportée, dans le cas de l'hybridation d'oligonucléotides, à $C_{\min} = 10 \text{ nM}$ pour des brins d'ADN de 18 bases [58] ou de 15 bases [59].

La présence habituelle dans les laboratoires de nombreux biocapteurs basé sur la fluorescence analysant simultanément de nombreuses interactions ainsi que la percée de Biacore au cours de cette dernière décennie, permettant d'obtenir de nombreux paramètres sur une seule interaction ont fait grandir l'intérêt pour l'imagerie SPR. En effet, cette technique permet d'analyser finement de nombreuses interactions. Cela s'est traduit, depuis fin 2001, par la création d'entreprises ayant pour but de commercialiser ce type d'appareils tel Windsor Scientific [60], GWC [61] (issue des travaux de R.M. Corn *et al.* [53,58]), HTS Biosystems [62] (seule compagnie travaillant sur un système d'imagerie SPR couplé par réseau) ou encore Genoptics [63] (issue des travaux de P. Guédon *et al.* dans notre équipe [64]). Pour l'instant, à notre connaissance, seul Windsor Scientific a annoncé le lancement de son dispositif d'imagerie SPR sous le nom d'IBIS iSPR en mars 2003. Cette concurrence, tant

au niveau académique qu'industriel est un très bon indicateur de la potentialité d'un biocapteur basé sur l'imagerie SPR.

I.2.5. Sensibilité théorique

Nous allons maintenant nous intéresser à la sensibilité théorique de la résonance de plasmons de surface en fonction du mode de couplage (prisme ou réseau) et de la technique de mesure utilisée. Trois techniques de mesures, détaillées par la suite, sont couramment utilisées : l'**interrogation angulaire** ou suivi de la position angulaire du minimum de réflectivité SPR à une longueur d'onde fixée, l'**interrogation spectrale** ou suivi de la position spectrale du minimum de réflectivité SPR à un angle d'incidence fixé et l'**interrogation en réflectivité** ou suivi des variations de réflectivité à un angle d'incidence proche de la résonance et à une longueur d'onde fixes. Pour caractériser cette sensibilité, nous allons calculer les variations de la grandeur mesurée en fonction des variations de l'indice du milieu couvrant (ou diélectrique).

I.2.5.1. Couplage par prisme

Le couplage par prisme a été précédemment décrit page 40 (Figure 13 et équation (I-16)). Rappelons la condition de couplage :

$$n_p \cdot \sin \theta = \operatorname{Re} \left\{ \sqrt{\frac{\varepsilon_m \cdot n_c^2}{\varepsilon_m + n_c^2}} \right\} \quad (\text{I-18})$$

avec n_p l'indice du prisme et n_c l'indice du milieu diélectrique couvrant.

- interrogation angulaire

A partir de l'équation (I-18) et sachant que $n_p \cos \theta = \sqrt{n_p^2 - N_{SPR}^2}$, nous pouvons dériver l'angle SPR (à longueur d'onde fixe) par rapport à l'indice du milieu couvrant pour en déduire la valeur de la sensibilité angulaire $S_{p,\theta}$:

$$S_{p,\theta} = \frac{d\theta}{dn_c} = \operatorname{Re} \left\{ \left(\frac{\varepsilon_m}{\varepsilon_m + n_c^2} \right)^{\frac{3}{2}} \right\} \left/ \sqrt{n_p^2 - N_{SPR}^2} \right. \quad (\text{I-19})$$

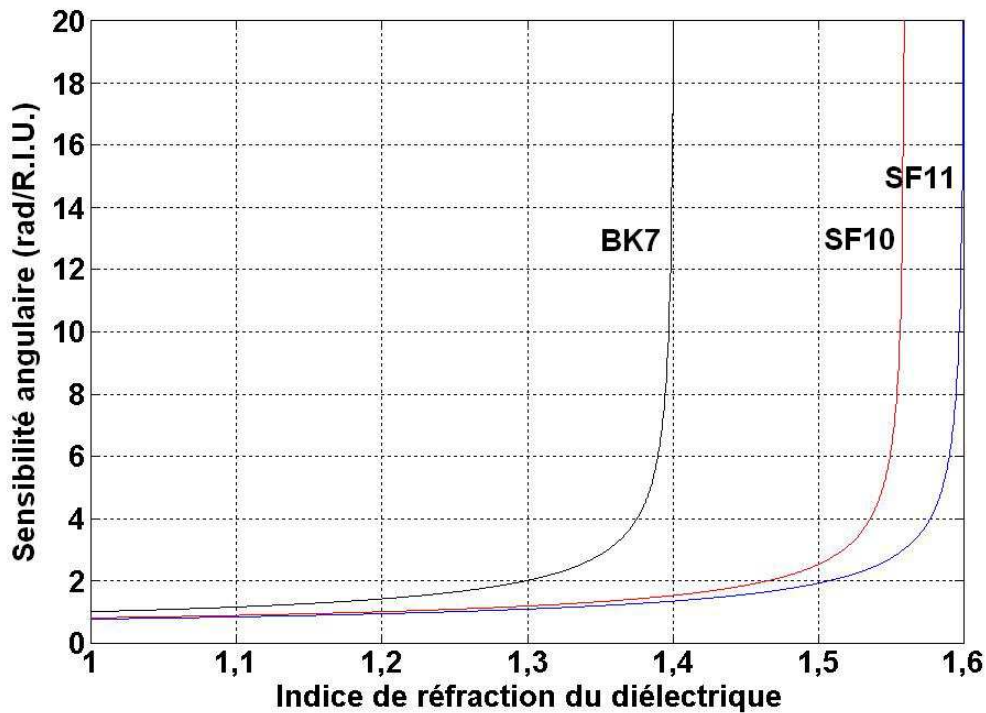


Figure 24 : Sensibilité angulaire de la SPR pour différents prismes en BK7 ($n = 1,5142$), SF10 ($n = 1,7205$) et en SF11 ($n = 1,7756$) (voir Annexe 4) recouverts d'une couche d'or, en fonction de l'indice de réfraction du milieu diélectrique couvrant à $\lambda = 660 \text{ nm}$.

Sur la Figure 24, pour les différents prismes étudiés, la sensibilité en interrogation angulaire (en radians par unité d'indice de réfraction (R.I.U.)) augmente avec l'indice de réfraction du milieu couvrant pour aboutir à un maximum lorsque l'indice effectif du plasmon de surface est égal à l'indice du prisme (voir le dénominateur de l'équation (I-19)). La sensibilité d'un dispositif SPR couplé par prisme d'interrogation angulaire peut donc être optimisée en choisissant un prisme d'indice le plus proche possible de l'indice effectif du plasmon de surface tout en lui restant supérieur pour que le couplage soit possible. Par contre, dans ces conditions, la sensibilité varie beaucoup avec la valeur de l'indice de réfraction du milieu couvrant tandis que lorsque l'indice de milieu diminue (ou si nous utilisons un prisme d'indice plus élevé), la sensibilité angulaire devient quasiment indépendante du milieu couvrant.

A.N. : Pour revenir à l'exemple étudié dans la Figure 16, c'est-à-dire un milieu couvrant liquide d'indice $n_c = 1,333$ à $\lambda = 660 \text{ nm}$, et en considérant que nous pouvons détecter sans problème la position du minimum avec une précision de 10^{-3} degrés, la sensibilité angulaire $S_{P,0}$ et la résolution $\Delta n_{\min}$ valent :

Verre	$S_{P,\theta}$ (rad/R.I.U.)	$\Delta n_{\min}$ (R.I.U.)
BK7	2,4628	$7,1 \cdot 10^{-6}$
SF10	1,2863	$1,4 \cdot 10^{-5}$
SF11	1,1694	$1,5 \cdot 10^{-5}$

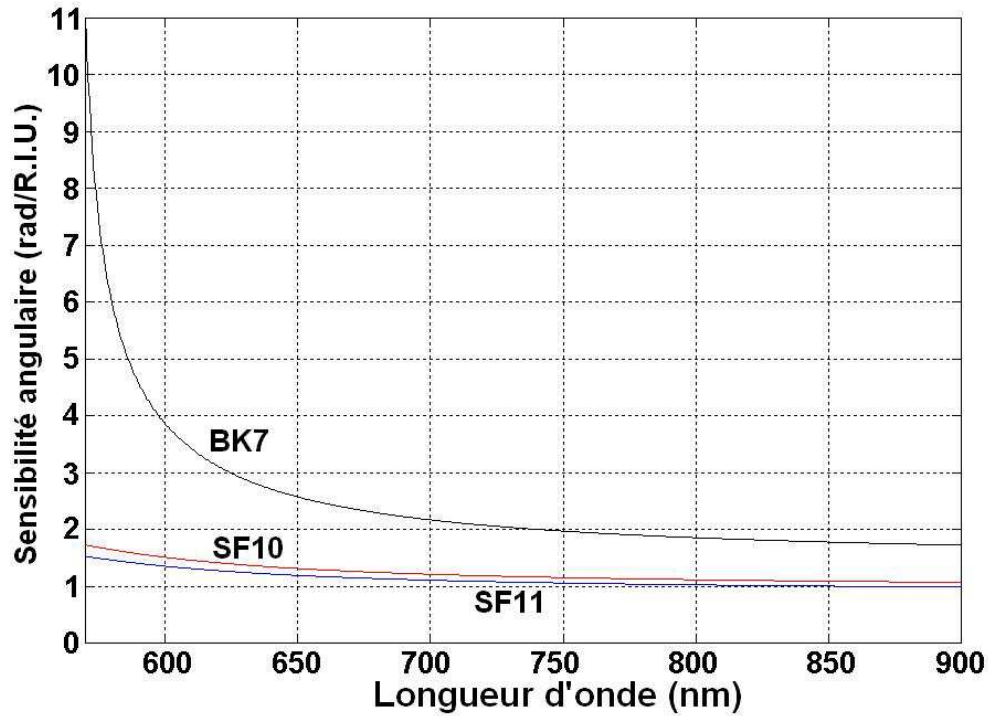


Figure 25 : Sensibilité angulaire de la SPR pour différents prismes en BK7, SF10 et en SF11 (indices de réfraction dans l'Annexe 4) recouverts d'une couche d'or, en fonction de la longueur d'onde pour un milieu diélectrique couvrant d'indice $n_c = 1,333$.

La sensibilité angulaire devient plus élevée aux longueurs d'onde faibles. Pour les longueurs d'onde élevées, la sensibilité angulaire ne varie plus beaucoup avec la longueur d'onde et, loin de la singularité, son expression peut être simplifiée ($|\epsilon_m| \gg n_c^2$) et devient quasiment indépendante des propriétés du métal [41] :

$$S_{P,\theta} \cong S_{P,\theta}^+ = \frac{1}{\sqrt{(n_p^2 - n_c^2)}} \quad (\text{I-20})$$

Nous pouvons remarquer que les systèmes commerciaux cités dans le paragraphe I.2.3.1 (page 44) utilisent des longueurs d'ondes proches de 800 nm et non des longueurs d'ondes proches de 600 nm comme nous pourrions nous y attendre suite à ces calculs. La

raison en est très simple : l'augmentation de la sensibilité à faible longueur d'onde s'accompagne d'une augmentation importante du bruit de mesure. En effet, détecter la position d'un minimum n'est pas chose aisée car, par définition, il se situe à un point où la dérivée de la courbe s'annule et ses voisins immédiats ont donc une valeur très proche de ce minimum. A faible longueur d'onde, le pic d'absorption dû à la SPR s'élargit, rendant plus difficile une détection précise du minimum. Le passage d'une longueur d'onde de travail $\lambda_1 = 800 \text{ nm}$ à $\lambda_2 = 600 \text{ nm}$ dans le cas d'un prisme en BK7, bien que multipliant la sensibilité par 2 (voir Figure 25), va élargir le pic, et par voie de conséquence diminuer le rapport signal sur bruit par un facteur 5 (voir Figure 26). Cette baisse finale de la résolution ne sera pas profitable pour la détection des interactions biomoléculaires.

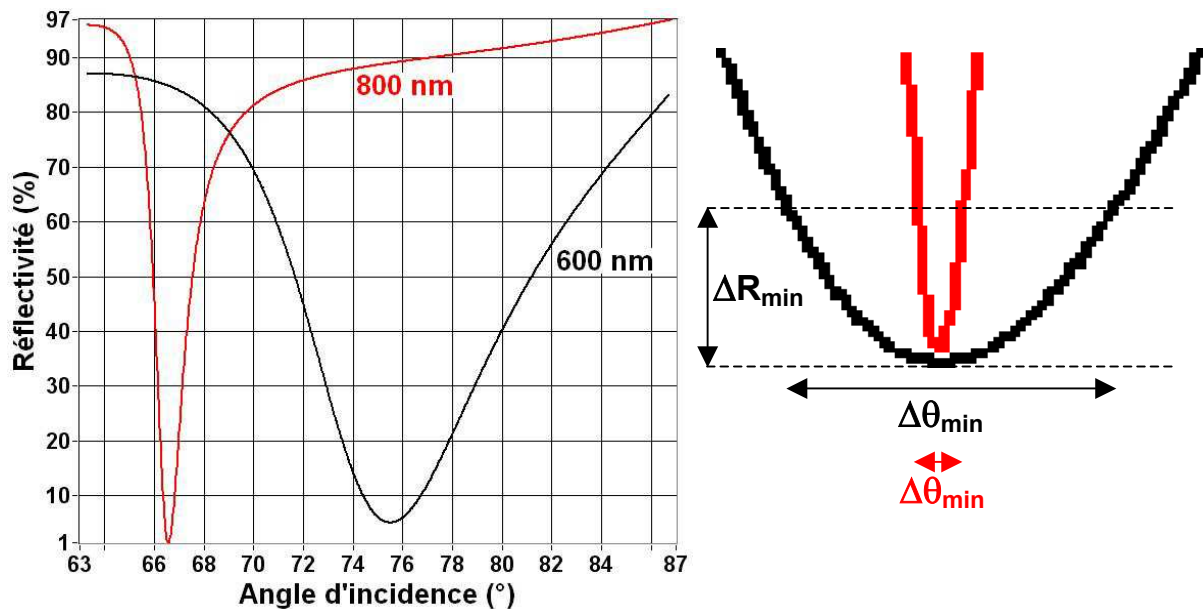


Figure 26 : Réflectivité, en polarisation TM et pour deux longueurs d'onde ($\lambda_1 = 600 \text{ nm}$ et $\lambda_2 = 800 \text{ nm}$), entre un prisme en BK7 et une couche d'or de 48 nm en contact avec un milieu liquide ($n_c = 1,333$). A droite, est illustré le fait que, pour une résolution de mesure $\Delta R_{\min}$, la précision de positionnement du minimum est d'autant plus précise que le pic est étroit.

- interrogation spectrale

Toujours à partir de l'équation de couplage (I-18), nous pouvons dériver la longueur d'onde de SPR (à angle fixe) par rapport à l'indice du milieu couvrant pour en déduire la valeur de la sensibilité spectrale $S_{P,\lambda}$:

$$S_{P,\lambda} = \frac{d\lambda}{dn_c} = \text{Re} \left\{ \left(\frac{\varepsilon_m}{\varepsilon_m + n_c^2} \right)^{\frac{3}{2}} \right\} \left/ \left(\frac{N_{SPR}}{n_c} \cdot \frac{dn_p}{d\lambda} - \frac{n_c^3}{2} \cdot \text{Re} \left\{ \frac{d\varepsilon_m/d\lambda}{\sqrt{\varepsilon_m \cdot (\varepsilon_m + n_c^2)^3}} \right\} \right) \right\} \quad (\text{I-21})$$

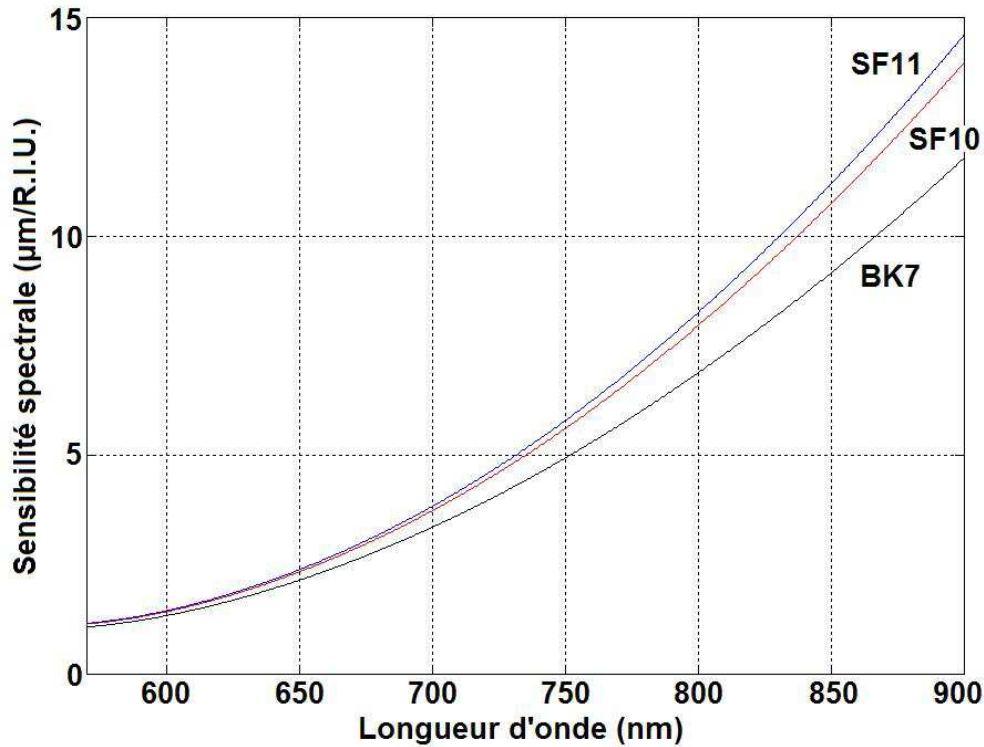


Figure 27 : Sensibilité spectrale de la SPR pour différents prismes en BK7, SF10 et en SF11 (indices de réfraction dans l'Annexe 4) recouverts d'une couche d'or, en fonction de la longueur d'onde pour un milieu couvrant d'indice $n_c = 1,333$.

La sensibilité spectrale augmente rapidement avec la longueur d'onde, contrairement à la sensibilité angulaire. Généralement, pour les verres couramment utilisés, la dispersion est faible, surtout aux faibles longueurs d'onde [41]. Pour les faibles longueurs d'onde, le terme en $(dn_p/d\lambda)$ du dénominateur de l'équation (I-21) peut être négligé, ce qui est confirmé par la superposition des 3 courbes de la Figure 27 obtenues pour trois prismes différents.

A.N. : Toujours dans le cadre de l'exemple de la Figure 16, c'est-à-dire un milieu couvrant liquide d'indice $n_c = 1,333$ à $\lambda = 660$ nm, et en considérant que nous pouvons détecter sans problème la position du minimum avec une précision de 0,1 nm, la sensibilité spectrale $S_{P,\lambda}$ et la résolution $\Delta n_{\min}$ valent :

Verre	$S_{P,\lambda}$ (μm/R.I.U.)	$\Delta n_{\min}$ (R.I.U.)
BK7	2,3629	$4,2 \cdot 10^{-5}$
SF10	2,5831	$3,9 \cdot 10^{-5}$
SF11	2,6395	$3,8 \cdot 10^{-5}$

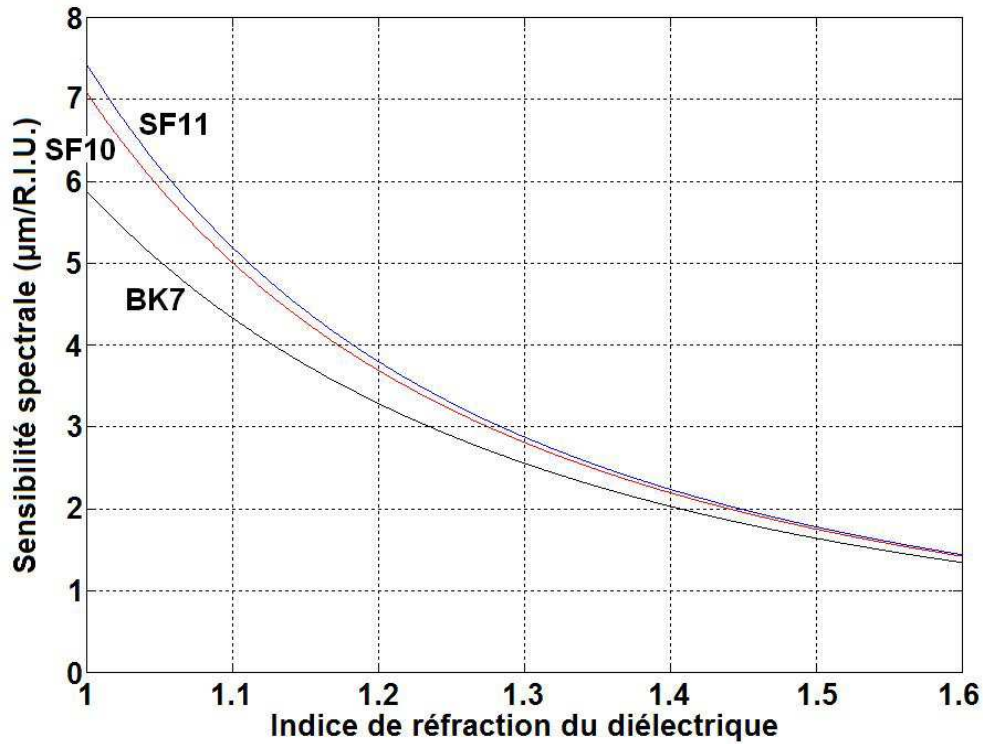


Figure 28 : Sensibilité spectrale de la SPR pour différents prismes en BK7 ($n = 1,5142$), SF10 ($n = 1,7205$) et en SF11 ($n = 1,7756$) recouverts d'une couche d'or, en fonction de l'indice de réfraction du milieu diélectrique à $\lambda = 660 \text{ nm}$.

Les dispositifs SPR couplés par prisme en interrogation spectrale ont un comportement opposé à ceux en interrogation angulaire : ils ont une meilleure sensibilité pour les grandes longueurs d'onde, les faibles indices de réfraction du diélectrique et des indices de prisme élevés. La Figure 29 résume simplement, dans le cas de la SPR excitée par un prisme en BK7, les propriétés opposées de l'interrogation angulaire et de l'interrogation spectrale lorsque l'indice du milieu diélectrique augmente. Dans la configuration 1, à $\lambda = 800 \text{ nm}$, cette augmentation provoque une variation importante $\Delta\lambda_1$ de longueur d'onde ou une variation faible $\Delta\theta_1$ de l'angle de résonance tandis que dans la configuration 2, à $\lambda = 585 \text{ nm}$, cette augmentation provoque une variation faible $\Delta\lambda_2$ de longueur d'onde ou une variation importante $\Delta\theta_2$ de l'angle de résonance.

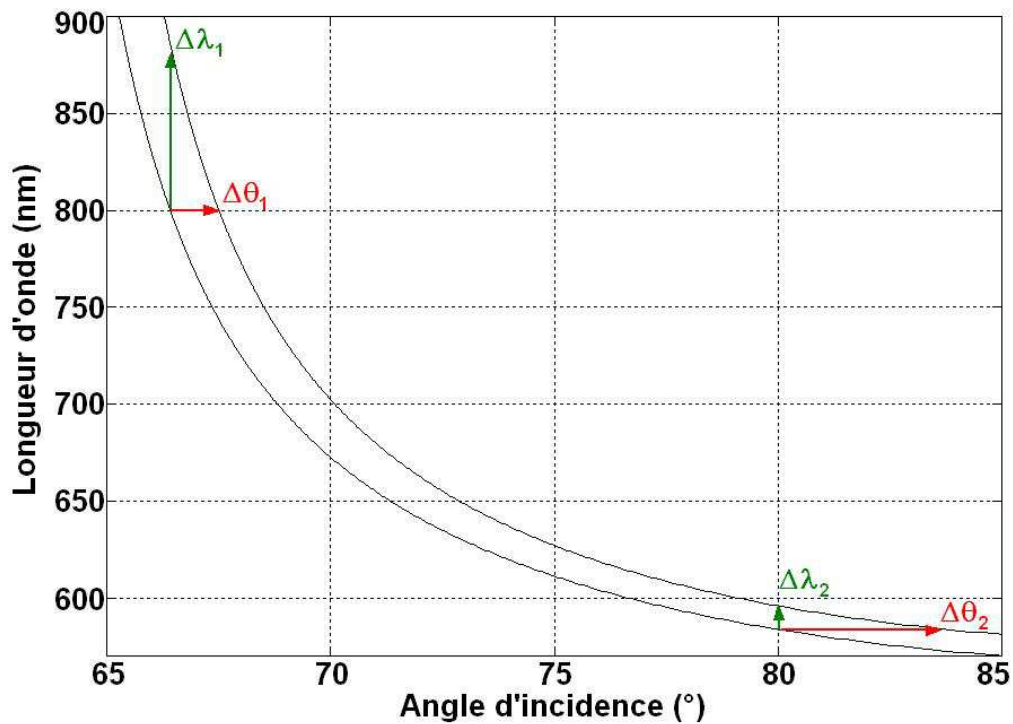


Figure 29 : Position de la résonance des plasmons de surface en longueur d'onde et en angle d'incidence pour un prisme en BK7 recouvert d'une couche mince d'or et un milieu diélectrique d'indice $n_c = 1,333$. La seconde courbe, au-dessus de la première, simule une augmentation d'indice du milieu couvrant $\Delta n_c = 10^{-2}$.

- Interrogation en réflectivité

Dans cette configuration, l'équation de couplage (I-18) n'est plus valable car la mesure ne se fait plus au minimum de réflectivité correspondant à la résonance des plasmons de surface mais au maximum de la pente de la courbe de réflectivité en fonction de la longueur d'onde ou de l'angle d'incidence. Ces deux possibilités aboutissent à la même configuration où l'angle d'incidence et la longueur d'onde sont fixés.

La sensibilité en interrogation en réflectivité sera d'autant plus importante que le pic d'absorption dû à la résonance des plasmons de surface est étroit et profond (minimum de réflectivité proche de zéro), ce qui augmente la pente maximale de la réflectivité et que le minimum de réflectivité (correspondant à la SPR) se déplace rapidement avec les perturbations survenant au cours d'une expérience. La forme de ce pic d'absorption, et par voie de conséquence la sensibilité en interrogation en réflectivité, dépendent non seulement de la permittivité du métal utilisé mais aussi de l'épaisseur de la couche métallique (Figure

32). Pour évaluer l'influence de ces différents paramètres sur la sensibilité, nous avons procédé par des simulations informatiques qui sont représentées sur les figures suivantes :

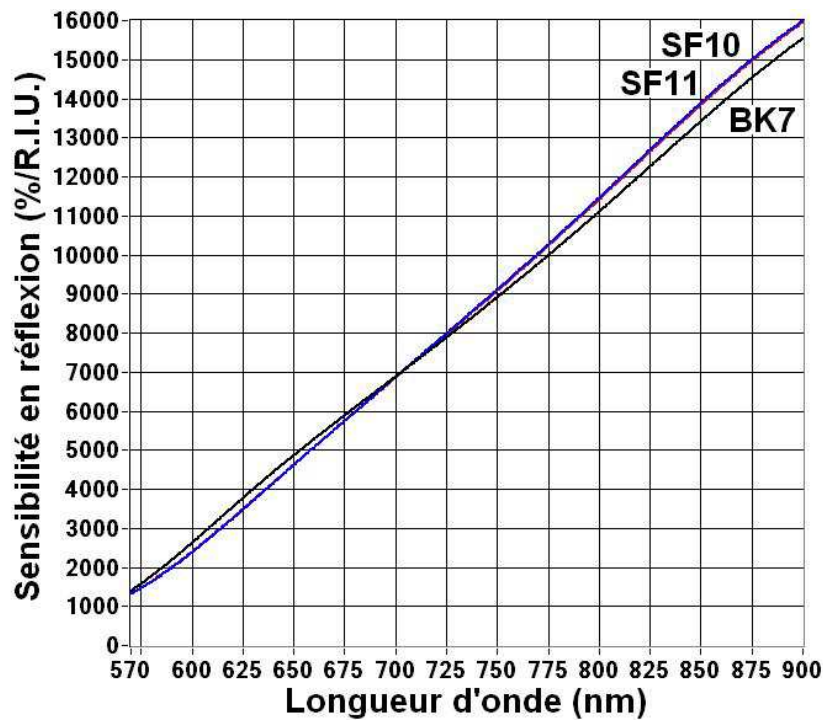


Figure 30 : Sensibilité de la SPR en réflectivité pour différents prismes en BK7, SF10 et en SF11 (indices de réfraction dans l'Annexe 4) recouverts d'une couche d'or, en fonction de la longueur d'onde pour un milieu couvrant d'indice $n_c = 1,333$ et une épaisseur d'or $e = 48 \text{ nm}$.

D'après la Figure 30, représentant pour différents prismes la sensibilité de l'interrogation en réflectivité en fonction de la longueur d'onde, nous pouvons dire en première approximation que cette sensibilité en interrogation en réflectivité est directement proportionnelle à la longueur d'onde et ne dépend pas de l'indice du prisme utilisé pour le couplage.

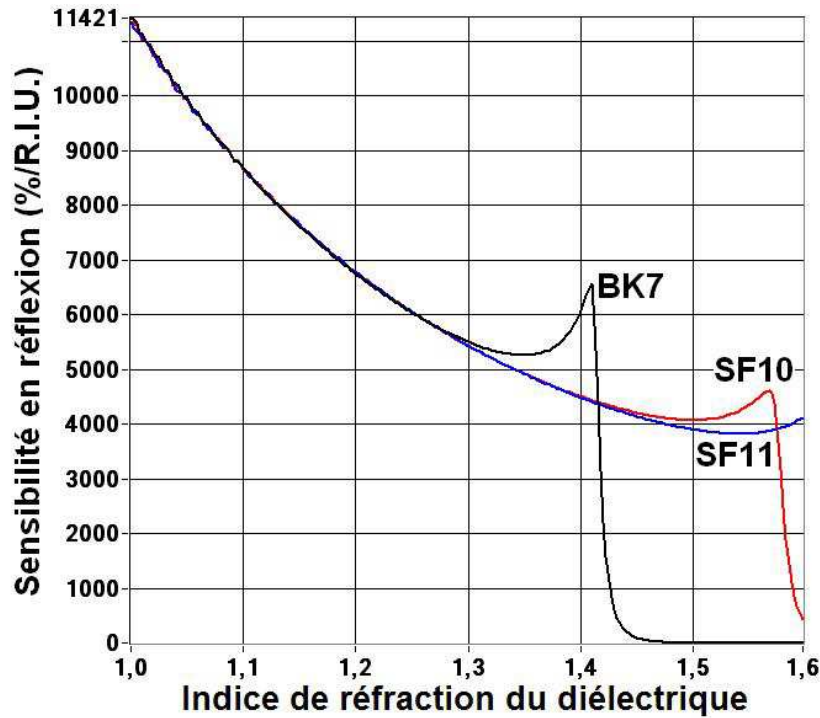


Figure 31 : Sensibilité de la SPR en réflectivité pour différents prismes en BK7 ($n = 1,5142$), SF10 ($n = 1,7205$) et en SF11 ($n = 1,7756$) recouverts d'une couche d'or, en fonction de l'indice de réfraction du milieu diélectrique couvrant à $\lambda = 660 \text{ nm}$ et pour une épaisseur d'or $e = 48 \text{ nm}$.

D'après la Figure 31, qui représente la sensibilité en réflectivité en fonction de l'indice de réfraction du milieu couvrant, nous pouvons dire en première approximation que la sensibilité en interrogation en réflectivité ne dépend pas de l'indice du prisme utilisé pour le couplage et décroît avec l'indice de réfraction du milieu diélectrique. La sensibilité devient dépendante de l'indice du prisme quand l'indice effectif du plasmon de surface devient proche de cet indice, ce qui explique que dans la Figure 30, la sensibilité en fonction de la longueur d'onde soit superposée pour les prismes en SF10 et SF11 alors que pour le prisme en BK7, elle est légèrement différente. Puis, lorsque l'indice du milieu diélectrique devient trop important, il devient impossible d'exciter le plasmon de surface avec le prisme ($N_{\text{SPR}} > n_p$) et la sensibilité tombe alors à zéro.

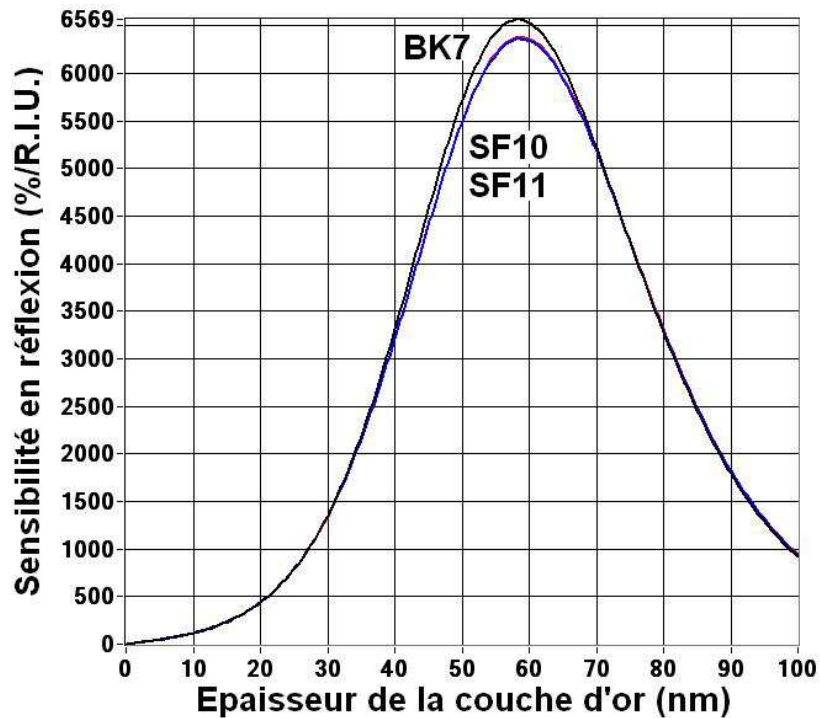


Figure 32 : Sensibilité de la SPR en réflectivité pour différents prismes en BK7 ($n = 1,5142$), SF10 ($n = 1,7205$) et en SF11 ($n = 1,7756$) recouverts d'une couche d'or en fonction de son épaisseur, à $\lambda = 660 \text{ nm}$ et pour un milieu couvrant d'indice $n_c = 1,333$.

D'après les simulations effectuées pour tracer la courbe de la Figure 32, l'épaisseur optimale d'or, pour l'interrogation en réflectivité à $\lambda = 660 \text{ nm}$, est 58 nm quel que soit le prisme utilisé. Une tolérance de $\pm 5 \text{ nm}$ sur cette épaisseur conduit alors à une perte de sensibilité d'au plus 5 %. Cette épaisseur optimale ne correspond pas à l'épaisseur minimisant la réflectivité à l'angle de résonance ($e = 48 \text{ nm}$) qui, elle, correspondrait à une dynamique maximale du système.

A.N. : Pour un prisme recouvert d'une couche d'or d'épaisseur 48 nm en contact avec un milieu couvrant liquide d'indice $n_c = 1,333$ à $\lambda = 660 \text{ nm}$, et en considérant que nous pouvons détecter une variation de réflectivité avec une précision de 0,05 %, la sensibilité en réflectivité $S_{P,R}$ et la résolution $\Delta n_{\min}$ valent :

Verre	$S_{P,R} \text{ (%/R.I.U.)}$	$\Delta n_{\min} \text{ (R.I.U.)}$
BK7	5288	$9,5 \cdot 10^{-6}$
SF10	5082	$9,8 \cdot 10^{-6}$
SF11	5081	$9,8 \cdot 10^{-6}$

I.2.5.2. Couplage par réseau

Le couplage par prisme a été précédemment décrit page 41 (Figure 14 et équation (I-17)). Rappelons la condition de couplage :

$$n_c \cdot \sin \theta + \frac{m \cdot \lambda}{\Lambda} = \text{sgn}(m) \cdot \text{Re} \left\{ \sqrt{\frac{\varepsilon_m \cdot n_c^2}{\varepsilon_m + n_c^2}} \right\} \quad (\text{I-22})$$

avec Λ le pas du prisme, m l'ordre de diffraction ($m \in \mathbb{Z}$), n_c l'indice du milieu couvrant et sgn la fonction signe.

De cette équation, nous pouvons déduire les conditions que doit satisfaire Λ pour que les plasmons de surface puissent être excités.

$$\frac{|m| \cdot \lambda}{N_{SPR} + n_c} \leq \Lambda \leq \frac{|m| \cdot \lambda}{N_{SPR} - n_c} \quad (\text{I-23})$$

- interrogation angulaire

A partir de l'équation (I-22), nous pouvons dériver l'angle SPR (à longueur d'onde fixe) par rapport à l'indice du milieu couvrant pour en déduire la valeur de la sensibilité angulaire $S_{R,\theta}$:

$$S_{R,\theta} = \left| \frac{d\theta}{dn_c} \right| = \frac{1}{n_c \cdot \cos \theta} \cdot \left(\frac{\lambda \cdot |m|}{n_c \cdot \Lambda} - n_c^2 \cdot \text{Re} \left\{ \frac{\sqrt{\varepsilon_m}}{(\varepsilon_m + n_c^2)^{3/2}} \right\} \right) \quad (\text{I-24})$$

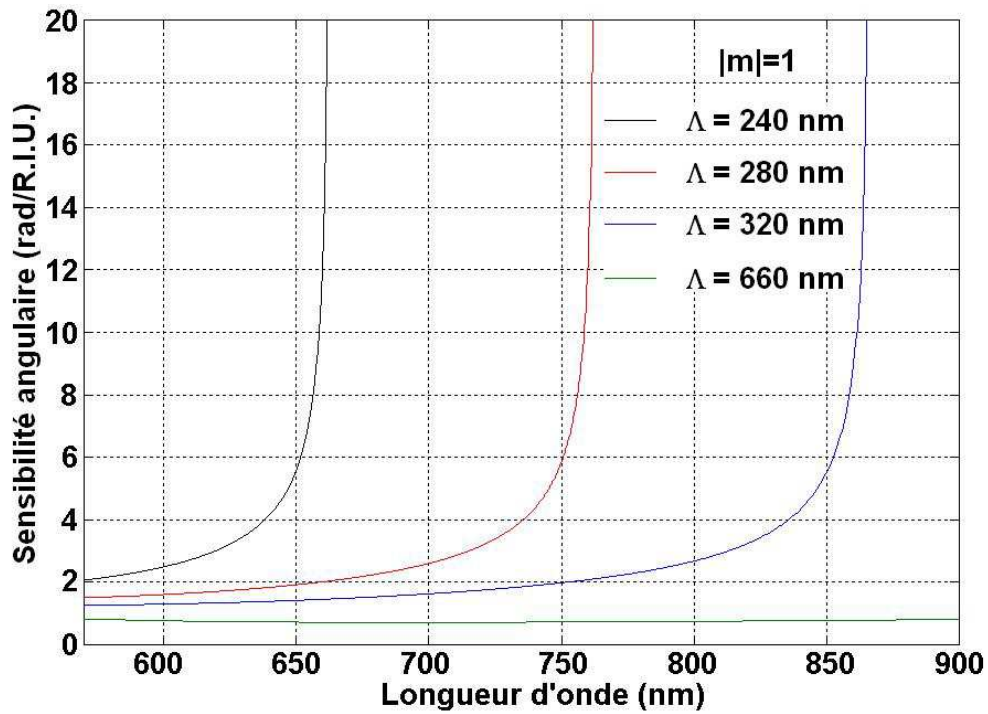


Figure 33 : Sensibilité angulaire de la SPR pour des réseaux de pas différents recouverts d'une couche d'or, en fonction de la longueur d'onde pour un milieu couvrant d'indice $n_c = 1,333$.

Sur la Figure 33, nous pouvons voir l'influence de la longueur d'onde sur la sensibilité angulaire de la SPR couplée par réseau. Seuls quelques pas Λ ont été représentés car, pour des pas plus faibles, les plasmons de surface ne peuvent plus être excités et pour des pas plus élevés, la sensibilité devient très faible au premier ordre de diffraction. Les ordres de diffraction plus importants ne sont pas représentés non plus car seul le rapport Λ/m apparaît dans l'équation (I-24), ce qui signifie que nous pouvons donc toujours nous ramener au premier ordre de diffraction. Comme dans le cas du couplage par prisme, la sensibilité angulaire augmente lorsque la configuration arrive en limite de couplage des plasmons, ce qui correspond à une incidence de plus en plus rasante et une dynamique de plus en plus faible. Ce phénomène est aussi visible sur la courbe d'influence de l'indice du milieu diélectrique sur la sensibilité angulaire de la SPR couplée par réseau de la Figure 34.

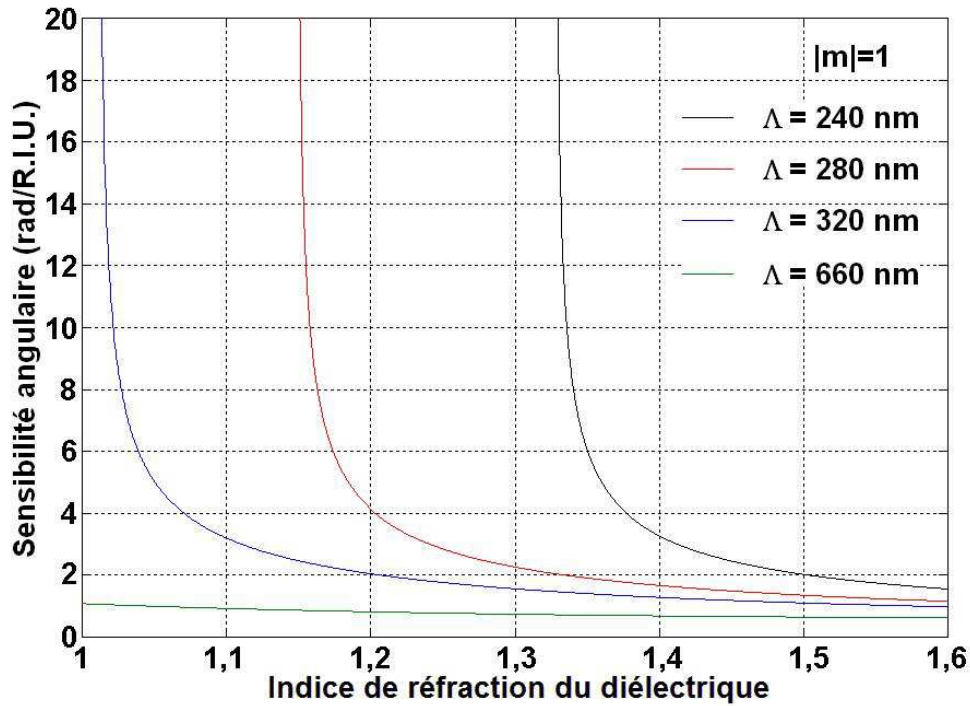


Figure 34 : Sensibilité angulaire de la SPR pour des réseaux de pas différents recouverts d'une couche d'or, en fonction de l'indice de réfraction du milieu diélectrique couvrant à $\lambda = 660$ nm.

Par rapport au couplage par prisme où les plasmons de surface peuvent être couplés pour une longueur d'onde supérieure à une certaine longueur d'onde de coupure ou pour un indice de réfraction du diélectrique inférieur à un certain indice de coupure, le couplage par réseau induit un comportement opposé dû au fait que le milieu d'incidence soit le même que le milieu diélectrique. Le couplage par réseau permet d'exciter les plasmons de surface jusqu'à une certaine longueur d'onde et/ou à partir d'un certain indice de réfraction. En résumé, l'interrogation angulaire donne environ la même sensibilité par les deux méthodes de couplages.

A.N. : Pour un réseau recouvert d'une couche d'or, en contact avec un milieu couvrant liquide d'indice $n_c = 1,333$ à $\lambda = 660$ nm, et en considérant que nous pouvons détecter une variation angulaire avec une précision de 10^{-3} degrés, la sensibilité angulaire $S_{R,\theta}$ et la résolution $\Delta n_{\min}$ valent :

Pas du réseau Λ (nm)	$S_{R,\theta}$ (rad/R.I.U.)	$\Delta n_{\min}$ (R.I.U.)
240	12,446	$1,4 \cdot 10^{-6}$
280	2,0152	$8,7 \cdot 10^{-6}$
320	1,4555	$1,2 \cdot 10^{-5}$
660	0,7211	$2,4 \cdot 10^{-5}$

- interrogation spectrale

Toujours à partir de l'équation de couplage (I-22), nous pouvons dériver la longueur d'onde de SPR (à angle fixe) par rapport à l'indice du milieu diélectrique pour en déduire la valeur de la sensibilité spectrale $S_{R,\lambda}$:

$$S_{R,\lambda} = \frac{d\lambda}{dn_c} = \frac{\frac{\lambda \cdot |m|}{n_c \cdot \Lambda} - n_c^2 \cdot \operatorname{Re} \left\{ \frac{\sqrt{\varepsilon_m}}{(\varepsilon_m + n_c^2)^{3/2}} \right\}}{\frac{|m|}{\Lambda} - \frac{n_c^3}{2} \cdot \operatorname{Re} \left\{ \frac{1}{\sqrt{\varepsilon_m} \cdot (\varepsilon_m + n_c^2)^{3/2}} \cdot \frac{d\varepsilon_m}{d\lambda} \right\}} \quad (\text{I-25})$$

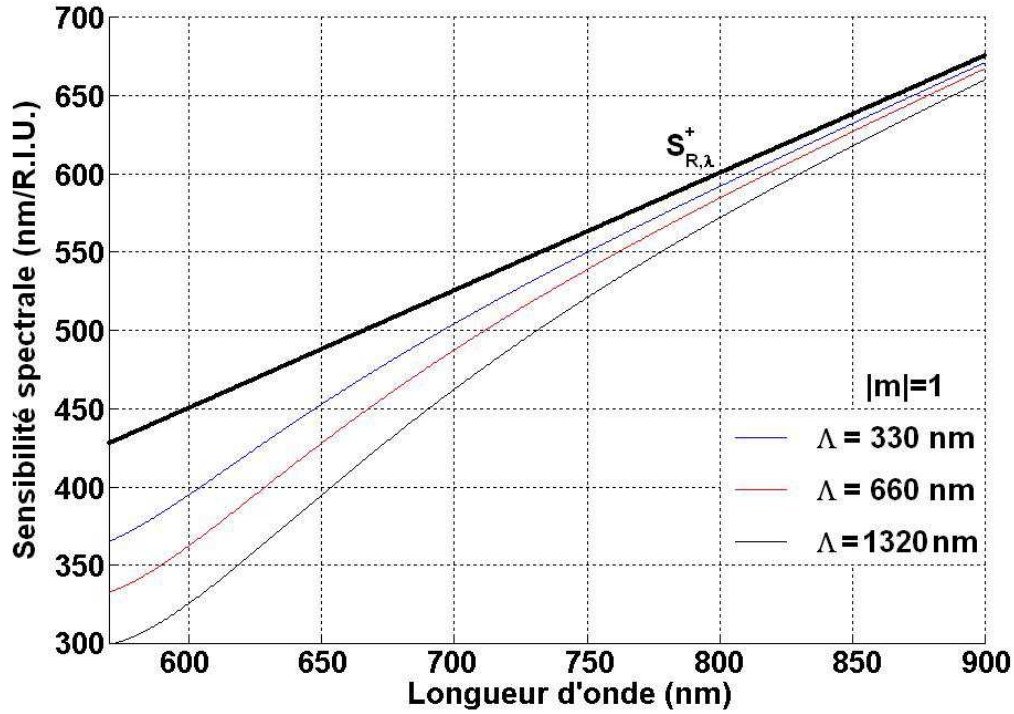


Figure 35 : Sensibilité spectrale de la SPR pour des réseaux de pas différents recouverts d'une couche d'or, en fonction de la longueur d'onde pour un milieu couvrant d'indice $n_c = 1,333$.

Pour les longueurs d'onde élevées, la sensibilité spectrale se simplifie et tend vers $S_{R,\lambda}^+$ comme illustré sur la Figure 35 :

$$S_{R,\lambda} \cong S_{R,\lambda}^+ = \frac{\lambda}{n_c} \quad (I-26)$$

Sur la Figure 35, comme pour les figures précédentes, nous n'avons représenté que le premier ordre de diffraction car seul le rapport Λ/m intervient dans la relation (I-25) donc nous pouvons toujours nous ramener à ce premier ordre de diffraction. La résolution spectrale augmente rapidement avec la longueur d'onde (Figure 35) et augmente légèrement lorsque le pas du réseau diminue tout en restant toujours inférieure à $S_{R,\lambda}^+$. En comparant la Figure 27 et la Figure 35, nous voyons qu'en interrogation spectrale, les réseaux ont une sensibilité nettement moins bonne que les prismes.

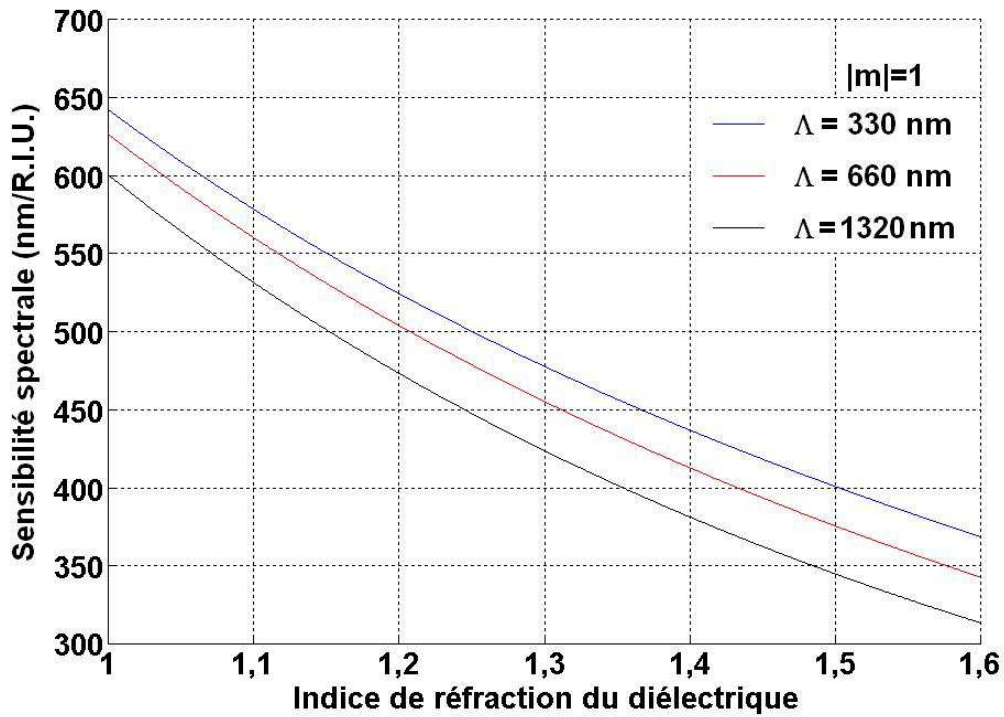


Figure 36 : Sensibilité de l'interrogation spectrale pour des réseaux de pas différents recouverts d'une couche d'or, en fonction de l'indice de réfraction du milieu couvrant à $\lambda = 660$ nm.

La sensibilité spectrale diminue avec l'indice de réfraction du milieu diélectrique comme dans le cas du couplage par prisme (Figure 28).

A.N. : Pour un réseau recouvert d'une couche d'or, en contact avec un milieu couvrant liquide d'indice $n_c = 1,333$ à $\lambda = 660$ nm, et en considérant que nous pouvons détecter une variation spectrale avec une précision de 0,1 nm, la sensibilité angulaire $S_{R,\lambda}$ et la résolution $\Delta n_{\min}$ valent :

Pas du réseau Λ (nm)	$S_{R,\Lambda}$ (nm/R.I.U.)	$\Delta n_{\min}$ (R.I.U.)
330	464	$2,2 \cdot 10^{-4}$
660	441	$2,3 \cdot 10^{-4}$
1320	409	$2,4 \cdot 10^{-4}$

Dans cette configuration, en interrogation spectrale, le réseau est 5 fois moins sensible que le prisme.

- Interrogation en réflectivité

Comme dans le cas du prisme, lorsque la variation de réflectivité est mesurée, l'équation de couplage (I-22) n'est plus valable car la mesure ne se fait plus au minimum de réflectivité correspondant à la résonance des plasmons de surface mais au maximum de la pente de la courbe de réflectivité en fonction de la longueur d'onde ou de l'angle d'incidence. Ces deux possibilités aboutissent à la même configuration où l'angle d'incidence et la longueur d'onde sont fixés.

La sensibilité en réflectivité sera d'autant plus importante que le pic d'absorption dû à la résonance des plasmons de surface est étroit et profond (minimum de réflectivité proche de zéro), ce qui augmente la pente maximale de la réflectivité et que le minimum de réflectivité (correspondant à la SPR) se déplace rapidement avec les perturbations survenant au cours d'une expérience. La forme de ce pic d'absorption, et ,par voie de conséquence, la sensibilité en interrogation en réflectivité dépendent non seulement de la permittivité du métal utilisé mais aussi de la profondeur d'inscription du réseau (Figure 37). Pour évaluer l'influence de ces différents paramètres sur la sensibilité, nous avons procédé par des simulations informatiques de différents réseaux en créneaux (ces simulations ont été rendues possibles grâce à une procédure Matlab développée par P. Lalanne et J.C. Rodier du laboratoire Charles Fabry de l'Institut d'Optique). Le résultat de ces calculs de sensibilité en fonction du pas du réseau en créneaux et de la profondeur d'inscription de ce réseau est représenté dans la Figure 37 ci-dessous.

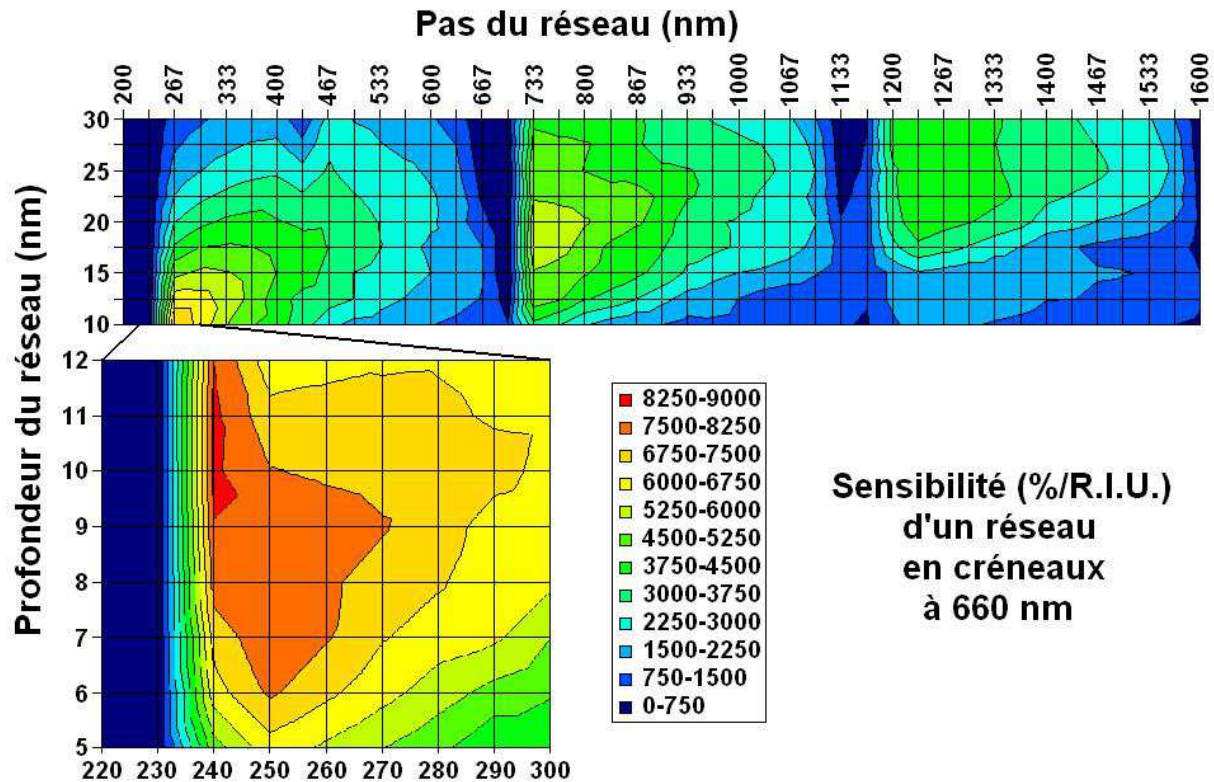


Figure 37 : Sensibilité de la SPR en réflectivité, pour des réseaux en créneaux recouverts d'une couche de 200 nm d'or, pour un milieu diélectrique couvrant d'indice $n_c = 1,333$ et à $\lambda = 660$ nm, en fonction du pas du réseau et de la profondeur des créneaux. Les trois maximums locaux de la courbe correspondent, de gauche à droite, aux ordres de diffraction -1, -3 et -5. L'apparition, au fur et à mesure de l'augmentation du pas du réseau, de maximums de sensibilité dans les ordres de diffraction élevés provient de l'impossibilité de coupler les plasmons dans les ordres de diffraction plus faibles.

Les 3 lobes de la Figure 37 correspondent à l'apparition d'un couplage de la résonance des plasmons de surface dans les ordres de diffraction $m = -1$ à partir de $\Lambda = 239$ nm, $m = -3$ à partir de $\Lambda = 717$ nm et $m = -5$ à partir de $\Lambda = 1195$ nm. Les meilleures sensibilités sont obtenues lorsque le pas du réseau permet à un nouvel ordre de diffraction le couplage de la résonance des plasmons de surface (pas du réseau égal au terme de gauche de l'inégalité (I-23)). De plus, sur cette figure, nous voyons que la meilleure sensibilité est obtenue pour un couplage dans l'ordre de diffraction $m = -1$. A titre de comparaison, à $\lambda = 660$ nm et pour un milieu couvrant d'indice $n_c = 1,333$, nous passons d'une sensibilité optimale de 6570 %/R.I.U. dans le cas d'un prisme (BK7 avec une couche d'or de 58 nm) à une sensibilité optimale de 8410 %/R.I.U. dans le cas d'un réseau (pas de 240 nm et profondeur du réseau en

créneaux 11 nm), soit une amélioration de la sensibilité de 28 %. Cette amélioration est surtout due au fait que le choix de l'indice du prisme est limité par les matériaux existants alors que le pas du réseau peut être choisi quasiment sans restriction et donc de manière plus appropriée.

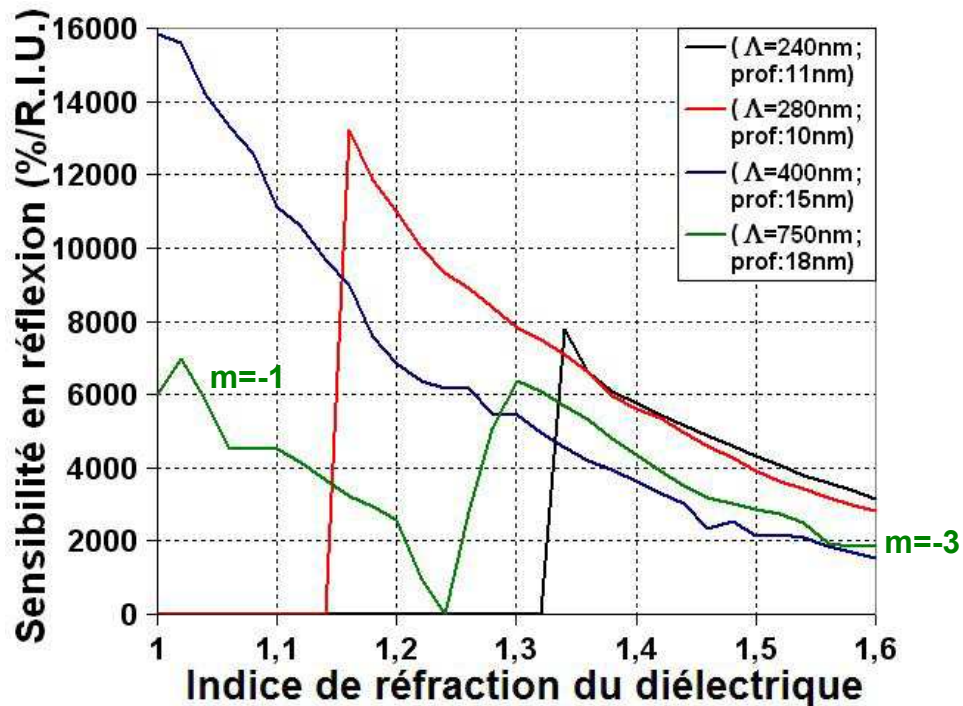


Figure 38 : Sensibilité de la SPR en réflectivité pour différents réseaux, de pas $\Lambda = 240$ nm, 280 nm, 400 nm et 750 nm, recouverts d'une couche d'or de 200 nm, en fonction de l'indice de réfraction du milieu diélectrique à $\lambda = 660$ nm.

D'après la Figure 38, nous pouvons dire que la sensibilité en réflectivité décroît avec l'indice de réfraction du milieu diélectrique. Contrairement au couplage par prisme où la sensibilité ne dépend pas de la nature du prisme, la sensibilité en réflectivité dépend de la période et de la profondeur des créneaux du réseau. Pour des pas de réseau proches du pas minimal permettant le couplage SPR dans l'ordre de diffraction $m = -1$ dans le cas d'un milieu couvrant d'indice $n_c = 1,333$ (par exemple, $\Lambda = 240$ nm et $\Lambda = 280$ nm sur la Figure 38), nous observons que le couplage des plasmons de surface n'est possible qu'à partir d'une certaine valeur de l'indice du milieu couvrant. De même, la valeur de pas, calculée pour la Figure 37, optimisant la sensibilité dans l'ordre de diffraction $m = -3$ pour un milieu d'indice

$n_c = 1,333$ ($\Lambda = 750$ nm) nous donne une courbe de sensibilité en fonction de l'indice du milieu couvrant séparée en deux parties. En effet, pour des indices du milieu couvrant trop faibles ($n_c < 1,25$), le 3^{ème} ordre de diffraction ne permet plus d'exciter les plasmons de surface et seul le 1^{er} ordre de diffraction excite alors le plasmon de surface.

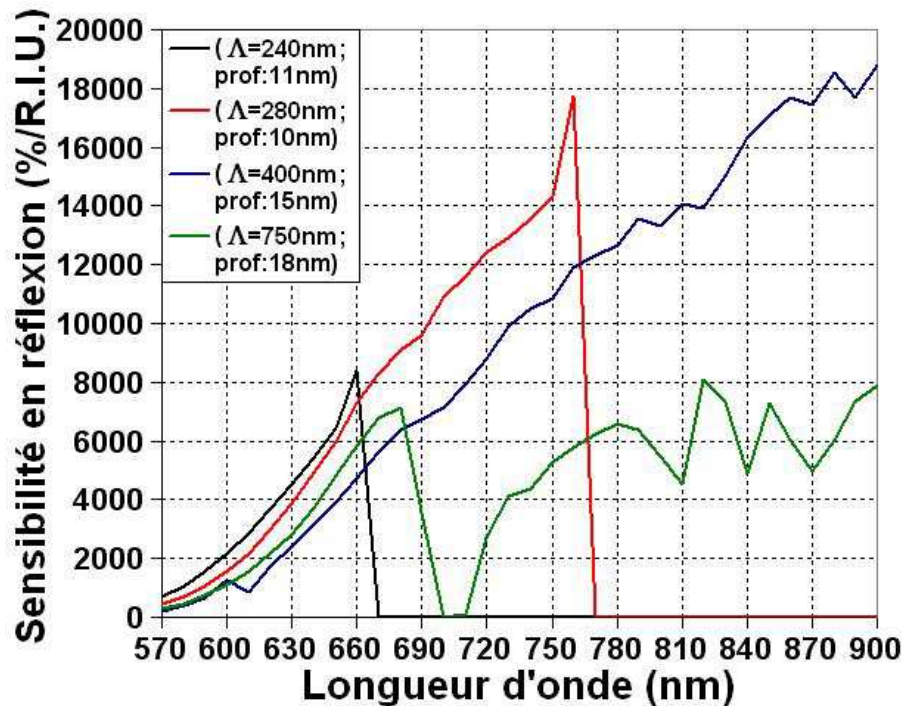


Figure 39 : Sensibilité de la SPR en réflectivité pour différents réseaux, de pas $\Lambda = 240$ nm, 280 nm, 400 nm et 750 nm, recouverts d'une couche d'or de 200 nm, en fonction de la longueur d'onde pour un milieu couvrant d'indice de réfraction $n_c = 1,333$. Les oscillations des différentes courbes sont des artefacts dus à l'échantillonnage du calcul.

D'après la Figure 39, nous pouvons dire que la sensibilité en réflectivité augmente avec la longueur d'onde, jusqu'à la longueur d'onde de coupure de l'ordre de diffraction étudié. Au delà de cette longueur d'onde, le plasmon de surface peut être excité par un ordre de diffraction inférieur (sur la courbe $\Lambda = 750$ nm, nous passons de $m = -3$ à $m = -1$ vers $\lambda = 690$ nm) ou, s'il n'en existe pas, la sensibilité devient nulle comme pour les autres courbes de la Figure 39 où la sensibilité correspond à l'excitation des plasmons de surface par le 1^{er} ordre de diffraction.

A.N. : Pour un réseau recouvert d'une couche d'or, en contact avec un milieu couvrant liquide d'indice $n_c = 1,333$ à $\lambda = 660$ nm, et en considérant que nous pouvons détecter une variation

de réflectivité avec une précision de 0,05 %, la sensibilité en réflectivité $S_{p,R}$ et la résolution $\Delta n_{\min}$ valent :

Pas du réseau Λ (nm)	$S_{R,R}$ (%/R.I.U.)	$\Delta n_{\min}$ (R.I.U.)
240	8410	$5,9 \cdot 10^{-6}$
280	7280	$6,9 \cdot 10^{-6}$
400	4745	$1,1 \cdot 10^{-5}$
750	5845	$8,6 \cdot 10^{-6}$

Ce dernier point complète la description des différents principes de biocapteurs basés sur la résonance des plasmons de surface. La comparaison de ces différents principes nous permet de mettre en évidence le manque de sensibilité de l'interrogation spectrale de la SPR couplé par réseau et la sensibilité équivalente, dans les autres configurations de mesure, du couplage par prisme et du couplage par réseau. Cette sensibilité intrinsèque de la SPR peut ensuite, si le besoin s'en fait sentir, être améliorée en la couplant à d'autres méthodes.

I.2.6. Amélioration de la sensibilité de détection

Différentes méthodes permettant d'augmenter les performances de la SPR ont été décrites dans la littérature. Nous allons maintenant en décrire quelques-unes. Certaines sont basées sur d'autres propriétés de la résonance des plasmons de surface comme le suivi de la phase, sur l'amplification du signal mesuré en augmentant la masse à détecter comme la méthode sandwich ou encore sur une toute autre méthode, complémentaire avec la SPR, comme la spectroscopie de masse, que nous allons décrire rapidement dans cette partie, ou la fluorescence [31], méthode que nous avons déjà abordée précédemment.

I.2.6.1. Evolution de la phase de l'onde réfléchie

L'idée de suivre l'évolution de la phase de l'onde réfléchie pour d'augmenter le contraste de la SPR est fondée sur le fait que le faisceau réfléchi subit un changement de phase important au voisinage de la résonance [65]. En effet, le bruit de mesure perturbe plus la détermination de la position du minimum de l'intensité réfléchie (Figure 26, page 56) que la détermination de la position du point d'inflexion du saut de phase, tous deux caractéristiques de la résonance des plasmons de surface.

Dans une configuration de banc SPR monocapteur en interrogation angulaire, les variations de la phase du faisceau réfléchi sont donc mesurées autour de l'angle de résonance des plasmons de surface. Au niveau de cet angle, un saut de phase très rapide se produit, d'autant plus abrupt que le minimum de réflectivité est proche de zéro [66]. La phase est alors mesurée en faisant interférer un faisceau polarisé TM avec un faisceau de référence TE. Après réflexion, les faisceaux sont séparés par une lame biréfringente puis traversent un analyseur orienté de manière à ajuster le ratio TM/TE pour augmenter le contraste des interférences [67].

En effet, à l'angle de résonance, nous avons un minimum de réflectivité, soit :

$$\begin{cases} (r \cdot r^*)' = 0 \\ (r \cdot r^*)'' > 0 \end{cases} \quad (\text{I-27})$$

avec $r = |r|e^{i\delta}$ le coefficient de réflexion en amplitude de l'interface métal/diélectrique.

Ce système d'équations (I-27) s'écrit aussi sous la forme :

$$\begin{cases} r'/r = -r^*/r^* \\ r'' \cdot r^* + r \cdot r^{*''} + 2|r'|^2 > 0 \end{cases} \quad (\text{I-28})$$

De cette équation, nous en déduisons que (r'/r) est imaginaire pur et en faisant tendre r vers zéro nous déduisons alors que $|r'|$ est strictement positif. Sachant que $\delta' = \text{Im}(r'/r)$, nous en déduisons :

$$\lim_{R \rightarrow 0} \delta' = \infty \quad (\text{I-29})$$

Considérons maintenant r comme une fonction de l'angle d'incidence θ et d'un paramètre q (l'épaisseur de la couche biologique déposée par exemple), tous les autres paramètres influant sur ce coefficient de réflexion en amplitude étant fixés. Cette fonction est bien entendu continue. Dans une configuration bien choisie, il existe une valeur optimale q_0 du paramètre q qui fait tendre r vers zéro. Quand q , au cours du temps, passe par sa valeur optimale q_0 , r passe à travers le point $r = 0$ dans le plan complexe, ce qui implique que δ' change de signe. D'après l'équation (I-29), la pente de la phase est très élevée au voisinage de l'optimum q_0 , ce qui rend son brusque changement de signe très remarquable. Le passage par

la valeur optimale du paramètre q se matérialise donc par une inversion du « saut » de phase caractéristique de la résonance. Puis, si le paramètre q continue d'évoluer, le « saut » de phase se déplace avec l'angle de résonance. L'interférogramme mesuré comprend donc une bande bien marquée correspondant au saut de phase \ angle de résonance \ minimum de réflectivité. Ce calcul s'applique très bien à la SPR, et q peut alors être, par exemple, l'épaisseur de la couche métallique ou l'indice du milieu diélectrique [67].

Le protocole expérimental à suivre pour profiter de l'amélioration de la sensibilité est le suivant :

- Dans un premier temps, il faut se placer très près de l'optimum, de manière à ce que la moindre liaison fasse basculer le système de l'autre côté de l'optimum. Cela provoquera des changements très importants de la courbe de phase.
- Puis, nous pouvons suivre les changements de la pente du saut de phase (tangente à l'angle de résonance) pour une résolution un peu moins élevée.
- Enfin, si le saut se décale suivant l'angle d'incidence, nous pouvons toujours suivre la position de l'angle de résonance, ce qui devient équivalent en sensibilité aux capteurs SPR usuels mais avec une meilleure résolution.

Les variations mesurées ne sont pas reliées à la largeur du pic de résonance mais sont seulement gouvernées par le paramètre qui fait tendre R vers 0. Cette méthode interférométrique de détection des variations de phase en SPR permet de mesurer des variations d'indice jusqu'à $\Delta n = 4.10^{-8}$ [68] en théorie (pour $\Delta\phi_{\min} = \pi/100$ et une réflectivité minimale de 5 %). Mais, en réalité, pour atteindre de telles résolutions, il faut que toutes les lignes de base soient stables et que tous les paramètres influant sur la résonance comme la température ($\partial n / \partial T(\text{H}_2\text{O}) = -1,1.10^{-4} \text{ deg}^{-1}$ [69]) soient contrôlés. En raison des contraintes drastiques de stabilité qu'il faut maintenir, cette méthode, bien que séduisante sur le papier, ne paraît pas du tout adaptée à l'imagerie SPR d'interactions biomoléculaires.

I.2.6.2. Méthode sandwich

Contrairement à la méthode précédente, cette méthode sandwich, consiste à amplifier le signal à mesurer plutôt que d'augmenter la sensibilité de détection du système. Lorsque le

signal obtenu après interaction est trop faible pour être mesuré, que ce soit à cause de la fixation d'une faible quantité de matière ou à cause de la faible taille des cibles, cette méthode permet d'amplifier le signal de l'interaction biomoléculaire d'intérêt entre les sondes et la cible, appelée interaction primaire, par une autre interaction, dite secondaire, entre une biomolécule (un anticorps par exemple) et la cible. Le protocole expérimental est alors le suivant :

- Stabilisation du biocapteur en solution tampon
- Injection de la cible qui va reconnaître certaines sondes (interaction primaire)
- Rinçage en tampon pour éliminer les cibles non fixées
- Injection de la molécule secondaire spécifique de la cible étudiée (interaction secondaire)
- Rinçage en tampon pour éliminer les molécules non fixées.

Cette méthode permet finalement, de passer d'un signal correspondant à la fixation de la cible à un signal correspondant à la fixation de la cible et de la molécule secondaire. Ce gain sera donc d'autant plus important que la masse de la molécule secondaire sera importante. Cette méthode a été utilisée, par exemple, dans le cas d'interactions anticorps/antigènes [49] en utilisant un anticorps secondaire reconnaissant spécifiquement le premier, et pour amplifier la détection de mutations d'une seule base sur des brins d'ADN [70] en utilisant une protéine (MutS) se liant spécifiquement sur les paires de base non complémentaires.

Pour finir, ce gain de sensibilité s'accompagne d'une perte d'information. En effet, le besoin d'attendre l'interaction secondaire pour détecter un signal, nous fait perdre le suivi en temps réel de l'interaction d'intérêt et donc les informations cinétiques (constantes d'association et de dissociation) liées à cette interaction, ce qui est un des principaux avantages de la SPR.

I.2.6.3. Spectrométrie de masse

La détection SPR est non-destructive et ouvre la possibilité d'une manipulation ultérieure de l'échantillon étudié. La SPR est utilisée pour détecter des molécules dans leur environnement natif (cibles non purifiées). Ensuite, les molécules alors sélectionnées grâce à la spécificité de l'interaction sonde/cible peuvent donc être analysées en spectrométrie de masse (voir Aebersold et Mann [71] pour une revue), le plus souvent par mesure de temps de vol de particules ionisées générées par désorption laser assistée par matrice (MALDI-TOF

MS) [72]. La nature qualitative de MALDI-TOF MS est complémentaire du caractère quantitatif de la SPR et permet de pallier l'incapacité de différencier et de caractériser les complexes multi-protéines et les liaisons non-spécifiques.

La spectrométrie de masse MALDI-TOF est basée sur la possibilité de générer en phase vapeur des ions par désorption/ionisation depuis un co-cristal composé de petites molécules volatiles (matrice) et des biomolécules. Un faisceau laser pulsé, réglé sur un maximum d'absorption de la matrice est utilisé pour initier la désorption/ionisation et générer simultanément un paquet d'ions de différents rapports masse/charge (m/z). Ces ions sont accélérés au même potentiel électrostatique et parcourent la même distance avant d'arriver sur un détecteur. La masse des ions est ensuite déterminée à partir des temps de vol des ions et des ratios m/z [71]. Cette méthode permet la détection très rapide et sensible de tous les ions issus d'une seule désorption/ionisation par comparaison avec une banque de données et possède une dynamique de 1 Da à 1MDa.

De plus, SPR et MALDI-TOF sont assez facilement combinables car la surface fonctionnalisée retenant les cibles en SPR peut être convertie par des modifications minimales pour l'utilisation en spectrométrie de masse. Les réponses SPR inférieures ou égales à 5 pg/mm² sont généralement considérées comme étant sous le seuil de détection pratique et de fiabilité. Mais, même sous ce seuil, l'analyse postérieure par MALDI-TOF donne des résultats non-équivoques sur les interactions. Cette technique est donc capable de détecter de faibles quantités (quelques picogrammes) et a été utilisée pour étendre la limite de détection de la SPR seule [72].

I.3. COMPARAISON DES DIFFERENTES METHODES

I.3.1. Avantages et inconvénients des méthodes optiques directes

Nous allons maintenant détailler les avantages et les inconvénients inhérents aux caractéristiques principales des méthodes optiques directes en général et des biocapteurs SPR en particulier par rapport aux autres méthodes.

I.3.1.1. Absence de marquage

L'absence de marquage dans les biocapteurs optiques que nous avons présenté présente plusieurs avantages. Tout d'abord, cela simplifie la procédure de préparation des échantillons et d'utilisation du biocapteur [13]. Ensuite, dans certains cas, le marquage peut influencer sur la fonctionnalité d'une molécule [73] et donc fausser les résultats de la mesure. Enfin, la détection sans marqueurs permet de contrôler toutes les étapes de l'utilisation du biocapteur, de la fonctionnalisation à l'interaction biomoléculaire d'intérêt en passant par les interactions intermédiaires alors que les méthodes indirectes ne permettent que de contrôler l'étape mettant en jeu les molécules marquées [74].

Par contre, la présence d'un marqueur permet d'effectuer des mesures très sensibles qui ne dépendent pas de la taille de la molécule. En effet, la mesure ne dépend que du type de marqueur utilisé et est totalement indépendante de la molécule d'intérêt. Ensuite, puisque la détection des marqueurs se fait sur fond noir, contrairement à la SPR, le bruit de photon est beaucoup plus faible dans ce cas, ce qui autorise des seuils de détection beaucoup plus faibles.

I.3.1.2. Mesure en temps réel

Dans les tests de reconnaissance immunologiques (comme ELISA), l'équilibre de réaction peut être perturbé par l'étape de rinçage alors qu'avec les biocapteurs SPR, la formation de complexes est mesurée en présence des molécules non liées, ce qui ne perturbe pas l'interaction. Cela permet aussi de caractériser des interactions de faible affinité qui ne se verraient pas en mesure de point final [75]. Reprenons l'exemple de la Figure 23 (page 52), correspondant à l'interaction de faible affinité entre un oligosaccharide et une protéine. Alors qu'au moment où nous avons stoppé l'association, la variation de réflectivité vaut $\Delta R_{\text{ass}} \approx 3,2 \%$, la variation de réflectivité après rinçage vaut au plus $\Delta R_{\text{total}} \approx 0,4 \%$ (la dissociation n'est pas tout à fait finie sur le graphe). Cela correspond, dans ce cas très précis, à un gain de quasiment un ordre de grandeur en résolution entre la mesure en temps direct et la mesure en point final.

De plus, la mesure en temps réel permet d'obtenir plus d'informations sur la formation de complexes sonde/cible, en particulier sur le comportement dynamique de ces complexes formés lors de l'interaction. La constante d'affinité, caractérisant une interaction, est une grandeur statique déterminée par le quotient entre la constante d'association et la constante de

dissociation, deux grandeurs dynamiques [76]. Pour un complexe d'une affinité donnée, celle-ci peut être le résultat d'une forte association et d'une forte dissociation (complexes « rapides ») ou le résultat d'une association plus faible avec une dissociation quasiment nulle (complexes « collants ») par exemple [77]. Ce type d'informations ne peut être obtenu par des mesures en point final.

I.3.1.3. Détection en parallèle

Comme son nom l'indique, la détection en parallèle permet de suivre simultanément l'interaction de cibles avec plusieurs sondes, fixées en différents endroits de la surface fonctionnalisée du biocapteur. Cette possibilité entraîne un gain de temps et une réduction de la consommation de produits biologiques en évitant de refaire n fois l'expérience pour n sondes différentes. De plus, les différentes interactions suivies en parallèle étant réalisées en même temps et dans les mêmes conditions sur le même biocapteur, la comparaison des résultats en fonction de la sonde est beaucoup plus aisée grâce à de plus faibles variations intra-analyses [28].

En contrepartie, la préparation du biocapteur est plus longue et plus compliquée. La mise en parallèle des interactions nécessite une fonctionnalisation en plots submillimétriques (entre quelques dizaines de microns et $800\ \mu\text{m}$) spécifiques au lieu d'une chimie de fixation uniforme sur toute la surface du biocapteur (ce point capital sera développé dans la partie II.1).

I.3.1.4. Sensibilité

La SPR détecte des changements d'indice au niveau de l'interface métal/diélectrique et, par conséquent, des variations de masse au niveau de cette interface. Ce système aura donc une résolution bien meilleure dans le cas de l'étude de grosses molécules telles des anticorps. Dans le domaine de la protéomique ou étude de la fonctionnalité des protéines, la sensibilité de la SPR est tout à fait suffisante. Par contre, pour l'étude de petites molécules telles des oligonucléotides courts, la résolution de la SPR est beaucoup plus faible que celle de la fluorescence (voir I.3.2). Mais, même dans ce cas, les avantages décrits précédemment (mesure en temps réel, absence de marquage, détection en parallèle) donnent une utilité aux études en SPR. Tout cela, sans compter sur la possibilité d'amplifier la réponse SPR.

Revenons sur ces différentes méthodes d'amélioration de la sensibilité présentées ci-dessus. L'utilisation de la méthode sandwich est très intéressante dans les cas où seule la réponse finale importe (la cinétique est perdue) car très simple à réaliser et relativement bon marché. Malheureusement, il n'est pas toujours possible de réaliser une interaction secondaire car il faut trouver une molécule interagissant de manière spécifique avec un site encore libre de la cible, cela dépend de l'interaction étudiée. L'utilisation de la spectrométrie de masse permet d'identifier, dans le cas de milieux complexes, les molécules ayant réagi. Cette approche est plutôt complémentaire de la SPR mais, dans le cas de réponses SPR très faibles, voire non détectables, le biocapteur ne sert plus qu'en temps que filtre sélectionnant les molécules à analyser par spectrométrie de masse, ce qui limite cette complémentarité. Enfin, la méthode de suivi de la phase peut, sous condition d'un contrôle très strict des conditions opératoires (température, ...), améliorer la sensibilité pour la détection de petites molécules. Par contre, elle ne permet un gain notable en sensibilité que sur une très faible dynamique, c'est-à-dire que dans le cas de grosses molécules comme des anticorps ($M \approx 150$ kDa), le gain apporté par cette méthode n'est pas évident.

I.3.2. Performances des différents biocapteurs

Pour conclure cette première partie, nous allons pour finir comparer les performances des différents biocapteurs présentés auparavant dans le tableau récapitulatif suivant. Ces différents biocapteurs sont : les guides d'onde couplés par réseau en entrée (**Guide réseau in**), en sortie (**Guide réseau out**), les guides d'onde en interféromètre différentiel (**Guide interf diff**), les interféromètres de Mach-Zehnder intégrés (**Interf Mach-Zehnder**), les miroirs résonants, les microbalances à quartz (**QCM**), la résonance des plasmons de surface couplée par prisme en interrogation angulaire (**SPR Prism Ang Div** et **SPR Prism Ang Conv**), en interrogation spectrale (**SPR Prism Spec**) et en interrogation de réflectivité (**SPR Prism Reflec**), la résonance des plasmons de surface couplée par réseau en interrogation angulaire (**SPR Res Ang**), en interrogation spectrale (**SPR Res Spec**) et en interrogation de réflectivité (**SPR Res Refl**), la microscopie de fluorescence et les tests ELISA.

Ces valeurs ne sont réunies ici qu'à titre indicatif pour une vue d'ensemble des biocapteurs. Certaines valeurs sont issues des calculs théoriques effectués dans ce chapitre, d'autres viennent d'articles (expérimentaux ou théoriques), ce qui fait que tous les résultats indiqués ne sont pas forcément totalement compatibles entre eux. Les cellules du tableau

laissées vides sont non significantes (les variations d'indice ne sont pas mesurées en fluorescence par exemple). Les différentes grandeurs représentées dans ce tableau sont les variations minimales détectables d'indice de réfraction du milieu couvrant ($\Delta n_{\min}$), d'indice effectif de la structure guidante ($\Delta N_{\min}$), de taux de recouvrement ($\Gamma_{\min}$) et, pour finir, la concentration en cibles minimale utilisable pour obtenir un signal relevant.

Méthode	$\Delta n_{\min}$	$\Delta N_{\min}$	$\Gamma_{\min}$ (pg/mm ²)	C _{min} *
Guide réseau in	$7 \cdot 10^{-6}$	$2 \cdot 10^{-6}$ [17]	10	20 nM
Guide réseau out	$2 \cdot 10^{-6}$	$5 \cdot 10^{-7}$ [17]	2,5	5 nM
Guide interf diff	$7 \cdot 10^{-8}$	$2 \cdot 10^{-8}$ [16]	0,1 [16]	200 pM
Interf Mach-Zehnder	$2 \cdot 10^{-5}$ [19]	$5 \cdot 10^{-6}$	25	50 nM
Miroir résonant	$2 \cdot 10^{-6}$ [21]	$5 \cdot 10^{-7}$	8 [23]	15 nM
QCM	/	/	60 [24]	250 nM [59]
SPR Prism Ang Div	$5 \cdot 10^{-6}$ [46]	$6,2 \cdot 10^{-6}$	5	10 nM
SPR Prism Ang Conv	10^{-6}	$1,2 \cdot 10^{-6}$	1 [38]	2 nM
SPR Prism Spec	$1,7 \cdot 10^{-5}$ [51]	$2,1 \cdot 10^{-5}$	17	30 nM
SPR Prism Reflec	$8 \cdot 10^{-6}\dagger$	10^{-5}	5	10 nM [59]
SPR Res Ang	$5 \cdot 10^{-6}\dagger$	$6,2 \cdot 10^{-6}$	3	10 nM
SPR Res Spec	$2,2 \cdot 10^{-4}\dagger$	$2,7 \cdot 10^{-4}$	120	400 nM
SPR Res Refl	$5,9 \cdot 10^{-6}\dagger$	$7,3 \cdot 10^{-6}$	3	10 nM
Fluorescence	/	/	/	1 pM [59]
ELISA	/	/	/	<200 pM [28]

Tableau 2: Comparaison des performances des différents biocapteurs présentés dans le chapitre I.

Pour les méthodes optiques évanescentes où nous mesurons une grandeur R:

$$\Delta n_{\min} = \Delta R_{\min} / (\partial R / \partial n)$$

$$\Gamma_{\min} = (\Delta n_{\min} * L_z) / (\partial n / \partial C) [78]$$

avec $\partial R / \partial n$, la sensibilité de la technique, L_z , la profondeur de pénétration de l'onde évanescence dans le milieu de mesure et $\partial n / \partial C$, l'incrément d'indice de la molécule étudiée (pour les molécules biologiques, $\partial n / \partial C \approx 0,19 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$).

En conclusion, les différentes méthodes optiques étudiées, mis à part l'interrogation spectrale du couplage de la SPR par réseau, permettent d'obtenir, tout au moins en théorie,

* Dans le cas d'oligonucléotides de 15 bases (M = 4500 Da).

† Voir calculs dans le paragraphe I.2.5 (Sensibilité théorique).

une résolution équivalente comprise entre $\Gamma = 1 \text{ pg/mm}^2$ et $\Gamma = 10 \text{ pg/mm}^2$, ce qui semble donner un avantage à ces méthodes par rapport aux biocapteurs basés sur les microbalances à quartz. Les nombreux avantages des méthodes directes (étude des cinétiques en temps réel, simplification de la préparation des échantillons, pas de modification de la fonctionnalité des cibles) sont des atouts d'importance pour l'analyse des interactions biomoléculaires et la caractérisation des paramètres de ces interactions. Elles présentent une sensibilité plus faible que les méthodes indirectes utilisant des marqueurs fluorescents. Cette différence de sensibilité est d'autant plus accentuée dans le Tableau 2 que nous avons considéré des interactions mettant en jeu de petits oligonucléotides. Le choix d'une méthode optique de mesure directe d'interactions biomoléculaire paraît donc être le plus approprié dans le cadre de la protéomique. Parmi ces méthodes, le choix va donc dépendre en grande partie de la facilité de sa mise en œuvre plutôt que de la sensibilité intrinsèque de cette méthode.

De par sa facilité d'utilisation et la possibilité d'imager une surface fonctionnalisée avec de nombreux capteurs, nous nous sommes concentrés, au cours de cette thèse, sur l'utilisation de l'imagerie de la Résonance des Plasmons de Surface par interrogation en réflectivité.

II. DEVELOPPEMENT D'UN BIOCAPTEUR PAR IMAGERIE SPR

A présent que l'état de l'art sur les principaux types de biocapteurs nous a permis une comparaison de leurs différentes performances, nous allons maintenant, tout au long de ce chapitre, expliquer comment réaliser de manière pratique un type précis de biocapteurs, fondé sur l'utilisation de l'imagerie de la Résonance des Plasmons de Surface par interrogation en réflectivité. Pour des raisons de facilité de réalisation au sein de notre laboratoire et des raisons historiques au sein de notre équipe, nous avons choisi de coupler les plasmons de surface par un prisme.

Nous allons, dans un premier temps, décrire la préparation de l'interface métal/diélectrique, siège de la résonance des plasmons de surface, ce qui englobe le choix de la couche métallique (nature et épaisseur) ainsi que le choix de la chimie de fonctionnalisation de la surface, indispensable pour une bonne utilisation du biocapteur. Nous décrirons ensuite les critères de choix et la réalisation des différents éléments du banc expérimental de la source au détecteur, pour finir par une présentation du logiciel développé pour automatiser les mesures et les analyses des interactions biomoléculaires.

II.1. PREPARATION DE L'INTERFACE

Puisque dorénavant nous ne nous occupons plus que de prismes – le réseau en restera au stade théorique du 1^{er} chapitre –, nous allons maintenant définir une nouvelle convention, plus pratique, pour les angles d'incidence du faisceau source sur le biocapteur. Nous appellerons **angle d'incidence extérieur** l'angle à l'extérieur du prisme que fait le faisceau source avec la face fonctionnalisée de ce prisme par opposition à l'**angle d'incidence interne** correspondant à l'angle que fait le faisceau source à l'intérieur du prisme avec la normale à l'interface fonctionnalisée (Figure 40). Cet angle d'incidence interne, que nous avons utilisé dans le 1^{er} chapitre, constitue la grandeur de référence pour le calcul théorique de la

réflectivité mais, contrairement à l'angle d'incidence extérieur, ne peut pas être mesuré directement, ce qui le rend moins pratique expérimentalement.

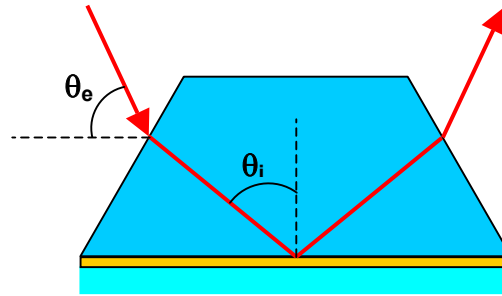


Figure 40 : Différentes conventions de définition des angles d'incidence. θ_e est l'angle d'incidence extérieur et θ_i est l'angle d'incidence intérieur.

Une relation, obtenue à partir de la loi de Snell-Descartes et de la trigonométrie, nous permet de relier les angles d'incidences extérieur et interne via l'indice de réfraction n_p et l'angle au sommet A_p du prisme.

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

Dans cette partie, nous allons commencer la description pratique de l'élaboration d'un biocapteur SPR, couplé par prisme, par l'élaboration du transducteur, site des interactions biomoléculaires, sur la base de ce prisme.

II.1.1. Composition du transducteur

Avant de simuler différentes couches métalliques, nous allons définir les différents critères faisant d'un métal un bon candidat pour notre biocapteur SPR à interrogation en réflectivité.

II.1.1.1. Critères de sélection du métal

Tout d'abord, la couche métallique du transducteur est destinée à être déposée sur le prisme. Il faut donc que le métal choisi puisse se fixer sur le verre et devienne ainsi une partie intégrante du capteur. Toutefois, certains métaux, comme l'or, n'adhèrent pas bien aux surfaces composées d'oxydes comme le verre ou le quartz [79]. Alors, pour faciliter l'adhésion du métal sur le verre, une couche ultrafine de chrome (1 à 2 nm [80], 2 nm [81], 5

nm [82]) ou parfois de titane (quelques nanomètres [51]) est souvent déposée sur le prisme. La fonction de ce métal (Cr ou Ti) est, d'un côté, de se lier de manière covalente aux oxydes à l'interface avec le verre et, de l'autre, de s'allier avec le métal choisi. L'insertion de cette couche ultrafine n'est cependant pas une obligation puisque le métal est parfois déposé directement sur le prisme [83].

Ensuite, la couche métallique choisie va être en contact avec les solutions contenant les produits biologiques intervenant dans les interactions mesurées. Le métal choisi doit donc être biocompatible, c'est-à-dire ne pas réagir avec les molécules mises en jeu dans les analyses et ne pas se détériorer au cours du temps suite aux contacts répétés avec ces milieux liquides (ne pas s'oxyder par exemple). Ce métal va aussi être le lieu de la fonctionnalisation de la surface et de greffage des sondes et doit donc avoir des propriétés physico-chimique compatibles avec cette nécessité. Le métal de choix répondant à tous ces critères est l'or. Toutefois, cela ne limite pas le choix final du métal qui sera compris entre 2 couches ultrafines : une première de chrome ou de titane facilitant sa fixation sur le verre et une seconde d'or facilitant la fonctionnalisation, la biocompatibilité et la stabilité de la surface. Ainsi, nous pouvons combiner les avantages du métal choisi avec ceux de l'or [84].

Enfin, le rôle principal de la couche métallique reste de rendre possible la résonance des plasmons de surface. Le choix de ce métal, toujours libre grâce à l'adjonction des deux couches ultrafines, doit être fonction de la sensibilité (en variation de réflectivité dans notre cas) qu'il permet d'obtenir. Cette sensibilité est fonction de l'indice de réfraction de ce métal. L'influence de la partie réelle et de la partie imaginaire de cet indice de réfraction sur les courbes de réflectivité en fonction de l'angle d'incidence est représentée sur la Figure 41, obtenue, comme dans la partie I.2, par des calculs fondés sur la méthode par récurrence de Rouard (Annexe 2). L'influence de ces paramètres est très claire : plus la partie réelle de l'indice de réfraction du métal est faible, plus le pic d'absorption dû à la SPR est étroit et, inversement, plus la partie imaginaire de l'indice de réfraction du métal est faible, plus le pic d'absorption dû à la SPR est évasé. Un métal sera donc un bon candidat pour un biocapteur SPR fonctionnant en interrogation en réflectivité si son indice de réfraction a une partie réelle la plus faible possible et une partie imaginaire la plus grande possible.

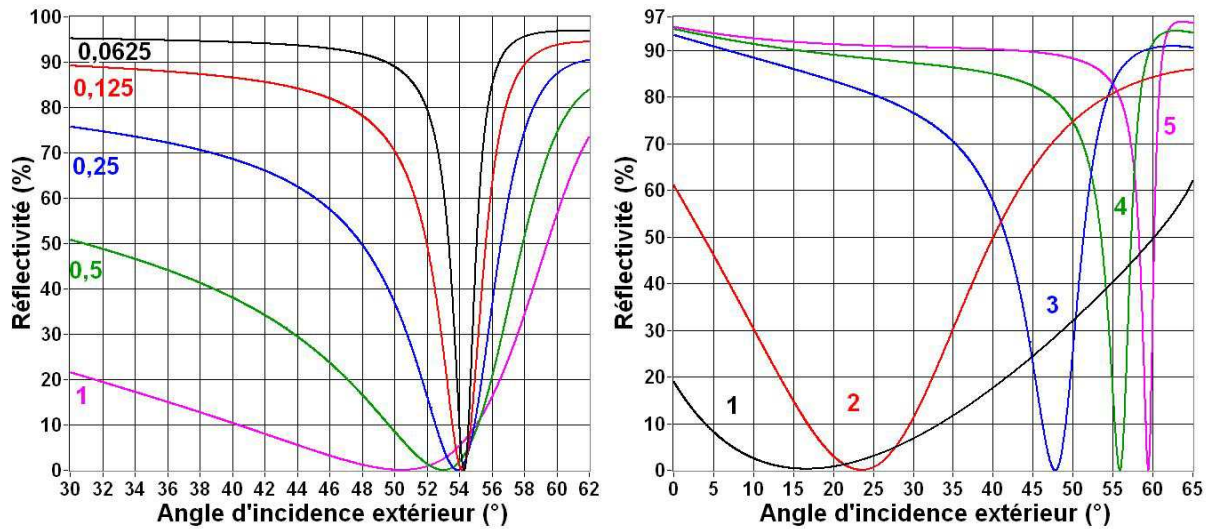


Figure 41 : Courbes de réflectivité en fonction de l'angle d'incidence extérieur à l'interface entre une couche métallique déposée sur un prisme en SF11 ($n_p = 1,776$) d'angle au sommet $A_p = 32^\circ$ et de l'eau ($n_c = 1,3316$). A gauche, différentes valeurs, indiquées sur chaque courbe, sont utilisées pour la partie réelle de l'indice de réfraction du métal (partie imaginaire constante $Im(n) = 3,689$). A droite, différentes valeurs, indiquées sur chaque courbe, sont utilisées pour la partie imaginaire de l'indice de réfraction du métal (partie réelle constante $Re(n) = 0,16$).

En résumé, pour former le transducteur, nous devons déposer sur la base du prisme une couche d'un ou deux nanomètres de chrome ou de titane, une couche d'un métal se rapprochant d'un métal parfait ($n = i \cdot \infty$) et d'épaisseur restant à définir et une couche de quelques nanomètres ($\approx 5\text{nm}$) d'or.

II.1.1.2. Résonance des plasmons de surface sur Ag, Au, Cu et Al

D'après les critères définis précédemment pour sélectionner le métal, nous nous sommes limités à l'étude de quatre métaux différents : l'or, l'argent, le cuivre et l'aluminium. Les indices de réfraction de ces métaux à $\lambda = 660\text{ nm}$ valent [175] : $n_{\text{Au}} = 0,145 + i \cdot 3,689$; $n_{\text{Ag}} = 0,140 + i \cdot 4,209$; $n_{\text{Cu}} = 0,211 + i \cdot 3,761$; $n_{\text{Al}} = 1,535 + i \cdot 7,900$. Nous avons simulé quatre configurations différentes composées d'un prisme en SF11, recouvert d'une couche d'un nanomètre de chrome et, suivant le cas, de 58 nm d'or, de 54 nm d'argent, de 52 nm de cuivre ou de 16 nm d'aluminium. Ces différentes épaisseurs ont été choisies pour donner la meilleure sensibilité (données non représentées sauf pour l'or en page 62). La comparaison de ces quatre configurations est représentée sur la Figure 42 où nous avons calculé la variation

de réflectivité causée par la fixation d'une couche de 1 nm d'épaisseur et d'indice de réfraction $n_b = 1,41$.

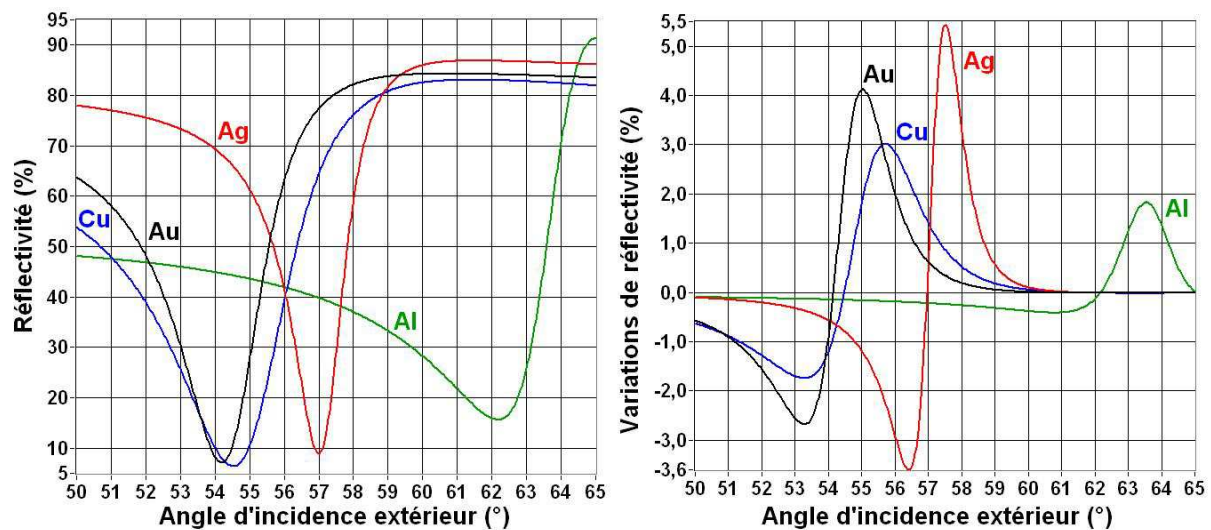


Figure 42 : Influence sur la SPR de la nature du métal déposé sur un prisme en SF11 ($n_p = 1,776$), d'angle au sommet $A_P = 32^\circ$ et recouvert sur sa base d'une couche de 1 nm de chrome. A gauche, les courbes de réflectivité en fonction de l'angle d'incidence extérieur à l'interface entre cette couche métallique, dont la nature est indiquée sur chaque courbe, et l'eau ($n_c = 1,3316$). A droite, la variation de réflectivité provoquée par l'adsorption d'une couche de 1 nm d'épaisseur et d'indice de réfraction $n_b = 1,41$ est représentée en fonction de l'angle d'incidence pour chaque assemblage.

Sachant que nous avons défini l'or comme le meilleur candidat pour être au contact des produits biologiques à cause de sa bonne stabilité chimique, l'utilisation de l'aluminium et du cuivre ne semble pas appropriée. En effet, un empilement d'un de ces deux métaux avec une couche de 5 nm d'or donnerait un capteur de sensibilité moindre qu'un capteur avec une simple couche d'or alors qu'il serait plus compliqué à réaliser. La comparaison préliminaire réalisée dans la Figure 42 nous permet donc de nous limiter maintenant à l'étude de deux empilements :

- Cr (1 nm)/Au (58 nm)
- Cr (1 nm)/Ag (49 nm)/Au (5 nm).

Nous allons maintenant comparer la sensibilité de ces deux systèmes en fonction de la longueur d'onde par le même procédé que celui utilisé dans la Figure 42, mais, au lieu de représenter les variations de réflectivité pour chaque incidence, nous allons directement

représenter la variation de réflectivité maximale $\Delta R_{\max}$. Nous pouvons donc maintenant comparer ces deux systèmes pour différentes longueurs d'onde.

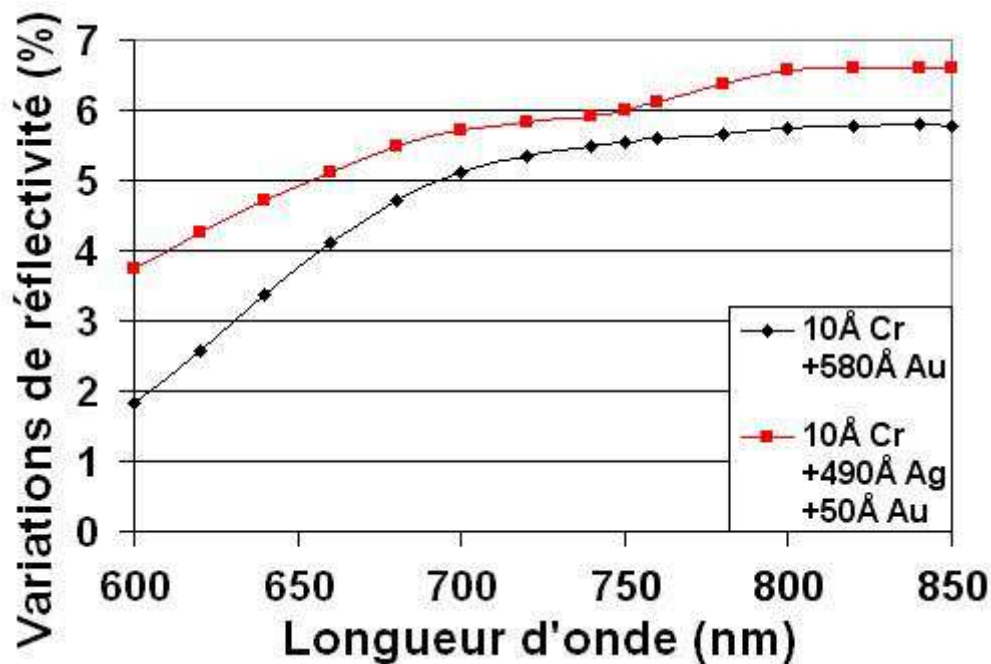


Figure 43 : Comparaison des propriétés SPR d'une couche simple d'or et d'une couche bimétallique argent/or. La variation maximale de réflectivité provoquée par l'adsorption d'une couche de 1 nm d'épaisseur et d'indice de réfraction $n_b = 1,41$ est représentée en fonction de la longueur d'onde pour chaque assemblage.

Sur la Figure 43, nous voyons que le gain apporté par la bicouche Ag/Au par rapport à une couche d'or diminue lorsque la longueur d'onde augmente : nous passons d'un gain de 100 % pour $\lambda = 600$ nm à un gain de 10 à 15 % pour des longueurs d'ondes supérieures à $\lambda = 700$ nm. Pour la longueur d'onde que nous utilisons dans notre montage (voir partie II.2.1), c'est-à-dire $\lambda = 650$ nm, la bicouche Ag/Au apporte un gain de 30% en sensibilité mais, ayant toujours eu en vue un changement ultérieur de longueur d'onde de travail vers le proche infrarouge où le gain de cette bicouche ne serait pas très important par rapport à la complexification du capteur, nous avons choisi, pour notre capteur, d'utiliser le système simple comprenant 1 nm de chrome suivi de 58 nm d'or.

Bien sûr, la sensibilité des deux systèmes étudiés dépend fortement de l'épaisseur d'or dans le cas Cr/Au et de l'épaisseur d'argent dans le cas Cr/Ag/Au. Les épaisseurs utilisées dans les différentes simulations précédentes proviennent d'une optimisation de ce paramètre

représentée sur la Figure 44. En pratique, ces simulations montrent que, pour le système Cr/Au, la sensibilité sera optimale pour une épaisseur d'or $e_{Au} = 58 \pm 2$ nm et que, pour le système Cr/Ag/Au, la sensibilité sera optimale pour une épaisseur d'argent $e_{Ag} = 49 \pm 2$ nm.

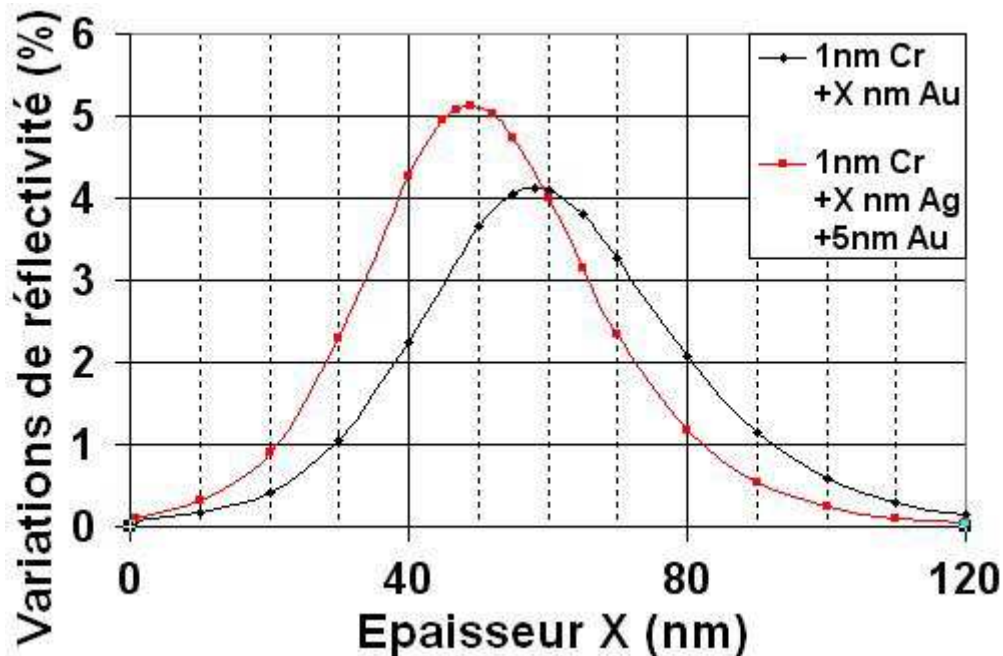


Figure 44 : Optimisation des propriétés SPR d'une couche simple d'or et d'une couche bimétallique argent/or à $\lambda = 660$ nm. La variation maximale de réflectivité provoquée par l'adsorption d'une couche de 1 nm d'épaisseur et d'indice de réfraction $n_b = 1,41$ est représentée en fonction de l'épaisseur pour chaque assemblage.

Nous avons à présent défini et justifié l'empilement de couches métalliques déposées sur le prisme pour former un capteur SPR : **1 nm de chrome recouvert de 58 nm d'or**. Une fois ce capteur recouvert d'une chimie de surface adéquate, il pourra alors servir en tant que biocapteur.

II.1.2. Fonctionnalisation du capteur

Pour analyser des interactions biomoléculaires à l'aide d'un biocapteur, un des réactifs impliqués dans l'interaction doit être fixé au transducteur. Il existe de nombreux moyens pour fixer cette espèce, que nous avons appelé sonde, à la surface métallique allant de la simple adsorption passive [37,85], à l'élaboration d'une structure chimique de liaison (comme les matrices d'hydrogel [86], les films électropolymérisés [87], les couches auto-assemblées [88],

etc...). Cette chimie va permettre une fixation stable des sondes sur la surface tout en limitant l'influence de cette surface en augmentant la distance entre celle-ci et les molécules biologiques (via un « bras espaceur »).

Une fois la sonde fixée par l'une de ces méthodes, la surface ainsi fonctionnalisée doit réagir spécifiquement avec la cible avec efficacité, ce qui implique une limitation des interactions non-spécifique et, si possible, la surface doit être réutilisable, c'est-à-dire que la surface doit résister aux conditions de régénération. Il faut donc que l'impact de l'environnement immédiat de la sonde (y compris la chimie de fixation) sur ses propriétés soit maîtrisé afin d'adapter la méthode de réalisation du biocapteur pour chaque type d'interaction étudiée, voire pour chaque application : la densité des sondes doit être judicieusement choisie pour limiter l'encombrement stérique et favoriser l'accessibilité des sites de réaction sur chaque molécule, les propriétés chimiques de la couche intermédiaire entre la surface métallique et les sondes ne doit pas adsorber non-spécifiquement les cibles, la localisation du greffage sur la sonde et longueur du bras espaceur ne doivent pas perturber la fonctionnalité de la sonde, etc...

Dans cette partie, nous allons décrire les différentes méthodes utilisées au sein de notre équipe pour fonctionnaliser les surfaces d'or : l'auto-assemblage moléculaire et l'électrocopolymérisation. Ces deux méthodes constituent l'étape finale et surtout l'étape cruciale du développement d'un biocapteur.

II.1.2.1. Auto-assemblage moléculaire

Ce type de fonctionnalisation de surface va être ici développé très succinctement car il a fait l'objet d'une partie importante du travail et du manuscrit de thèse de Nathalie Bassil [89], autre doctorante de l'équipe de recherche MOIC [90], dirigée par Yves Lévy, ayant effectué sa thèse parallèlement à la mienne. De plus, cet auto-assemblage moléculaire a été développé en collaboration avec l'équipe de recherche « assemblages macromoléculaires » [91] dirigée par Marie-Claude Millot du Laboratoire de Recherche sur les Polymères (LRP, CNRS UMR C7581, Thiais (94), France).

Comme de très nombreux procédés de fonctionnalisation de surface [92,93], celui-ci consiste à tapisser la surface d'avidine (ou streptavidine ou extravidine, molécules très voisines) afin de pouvoir fixer des sondes biotinylées à certains endroits de la surface. Ce type

de fonctionnalisation profite de la relative facilité de greffage de la biotine à de nombreuses molécules biologiques ainsi que de la très forte affinité entre l'avidine et la biotine ($K_A = 10^{15} \text{ M}^{-1}$) [94]. La plupart des molécules biologiques (un brin d'ADN par exemple) peuvent même être commandées directement avec une biotine à une de leurs extrémités pour un prix très voisin d'une molécule non greffée. Les molécules d'avidine, chargées négativement, sont liées à la surface par un assemblage électrostatique de couches chargées positivement puis négativement de façon alternative. La première couche, chargée positivement dans notre cas, est fixée sur l'or via une fonction thiol ($-\text{SH}$), connue pour interagir fortement sur l'or [95,96].

En résumé, nous fixons sur une lame d'or propre, selon un protocole approprié pour respecter les charges électriques de chaque réactif [89], une couche d'Acide 11-MercaptoUndécanoïque (MUA, $\text{pK}_a = 6,5$) comprenant un groupe thiol à une extrémité et chargé négativement à l'autre, puis une couche de PolyEthylèneImine (PEI) chargée positivement grâce à ses fonctions NH_3^+ et, pour finir, les molécules d'extravidine ($\text{pI} = 6,5$), chargées négativement.

Une fois la lame uniformément recouverte d'extravidine, elle est insérée dans un appareil commercial de « microarraying » (QArray [97] de Genetix), c'est-à-dire un appareil capable, grâce à un système de micropositionnement, de déposer des volumes très faibles (quelques dizaines de nanolitres) de liquide à un endroit prédéfini. Ce type d'appareil, mis à notre disposition par Michel Goossens du Laboratoire de Génétique Moléculaire et Physiopathologie (INSERM U 468, Hôpital Henri Mondor, Créteil (94), France) dans le cadre d'une collaboration sur l'étude de séquences ADN impliquées dans la mucoviscidose, est donc utilisé pour déposer différentes séquences d'ADN biotinylées sous forme de microgouttes à des endroits spécifiques de la surface. Après l'étape de fonctionnalisation uniforme de la lame, ceci constitue l'étape de structuration 2D de cette lame. Ces deux étapes sont résumées dans la figure suivante :

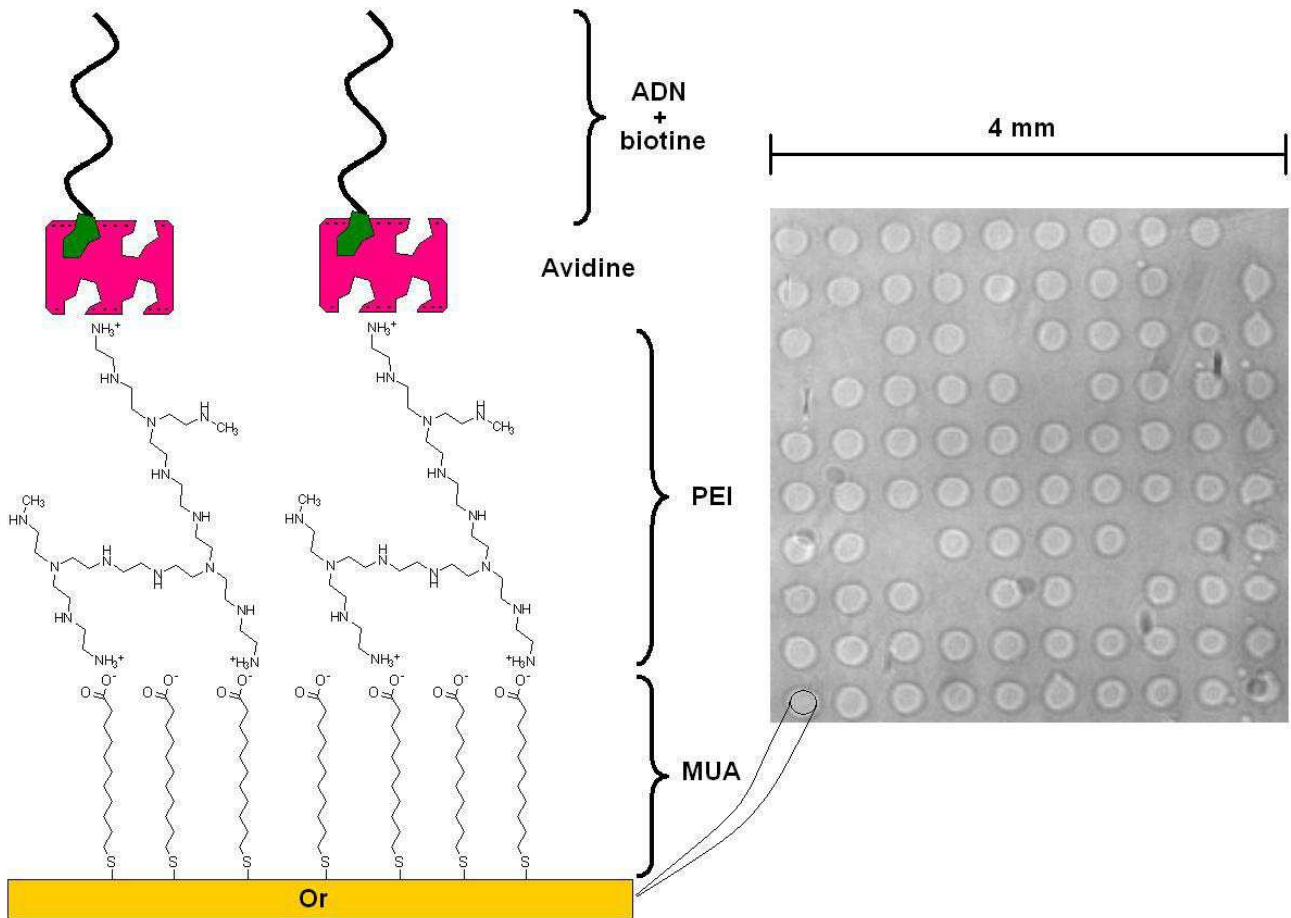


Figure 45 : Description de la fonctionnalisation de surface par auto-assemblage moléculaire. Cet assemblage utilise les interactions or/thiol, électrostatiques puis avidine/biotine. La structuration en plots des interactions avidine/biotine permet, par exemple, d'obtenir une lame fonctionnalisée en matrice de 10x10 plots de diamètre 250 μm telle l'image sur la droite.

Ce type de fonctionnalisation MUA/PEI/Avidine a ensuite été testé lors d'applications liées à la mucoviscidose et a fait l'objet d'une publication dans Sensors and Actuators B : chemical [98].

II.1.2.2. Pyrrole

La fonctionnalisation de surface par des polymères conducteurs (polypyrroles) a été développée au sein du groupe CREAB (Chimie de la Reconnaissance et Etude des Assemblages Biologiques) faisant partie du CEA/DSM/DRFMC/SI3M [99] (Commissariat à l'Energie Atomique / Direction des Sciences de la Matière / Département de Recherche

Fondamentale sur la Matière Condensée / Service des Interfaces et des Matériaux Moléculaires et Macromoléculaires) situé à Grenoble. Durant ma thèse, la plupart des applications que j'ai étudiées ont utilisé cette fonctionnalisation, ce qui a contribué à la caractérisation et à l'optimisation de cette technique que nous allons maintenant décrire.

II.1.2.2.1. Electrocopolymérisation

L'électropolymérisation du pyrrole a été décrite dès 1979 par Diaz *et al.* [100]. Nous allons maintenant en résumer le principe.

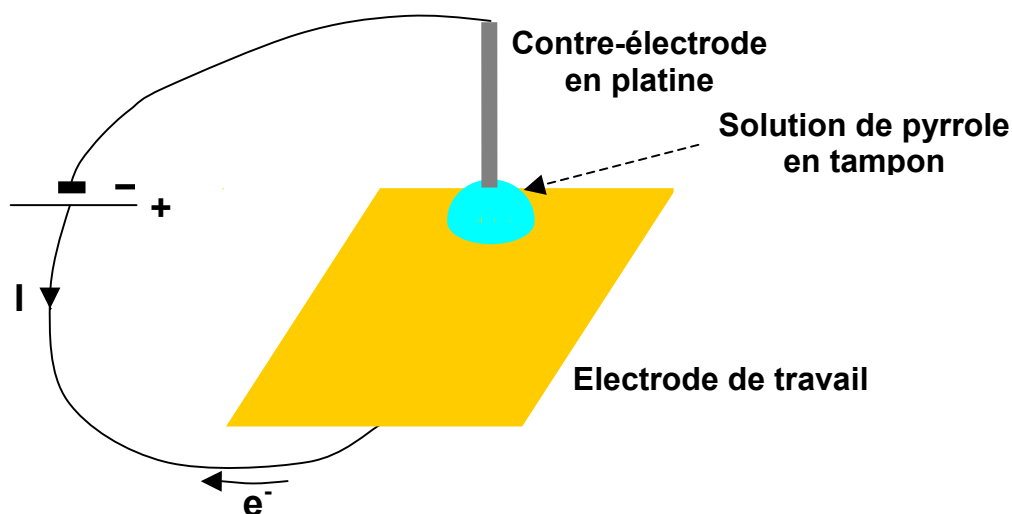


Figure 46 : Principe du dispositif d'électroco polymérisation. Une source de tension oxyde, entre les deux électrodes métalliques, les pyrroles présents dans la solution tampon. Les molécules de pyrrole vont alors polymériser au niveau de la surface de contact entre l'or et le liquide.

L'électropolymérisation implique l'application d'un potentiel approprié dans une solution aqueuse contenant les monomères. Au niveau de la contre-électrode en platine, polarisée négativement, l'eau est réduite, ce qui se traduit par un dégagement de dihydrogène. Au niveau de l'électrode de travail, polarisée positivement, le pyrrole est oxydé puis polymérisé. L'oxydation est un phénomène qui se produit à l'anode (électrode positive) dont l'équation chimique, en ce qui concerne le pyrrole est :



Par contre, pour qu'il y ait conduction, il faut que le pyrrole soit dopé avec un anion (ion chargé négativement) qui va pouvoir s'insérer dans le polymère et assurer sa conduction. La nature des anions va influencer sur les propriétés du film de polypyrrole formé [101]. Nous pouvons, par exemple, utiliser le perchlorate (ClO_4^-) provenant du perchlorate de lithium [102]. Les concentrations utilisées ont été optimisées à 20 mM de pyrrole et 100 mM de LiClO_4 [64,103,104]. Dans ces conditions, la réaction qui se passe alors au niveau de l'électrode de travail en or est la suivante :

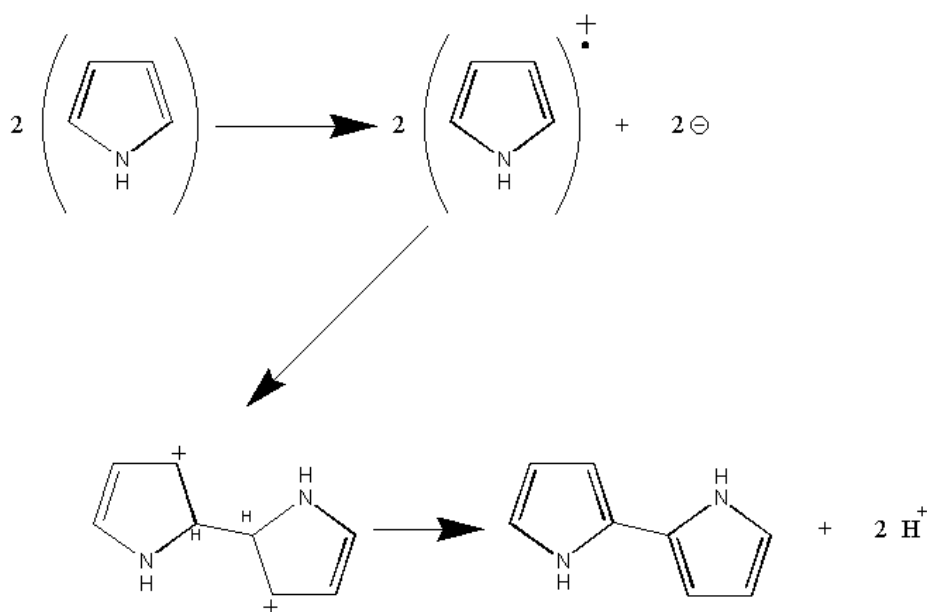


Figure 47 : Electropolymérisation du pyrrole. La première réaction est l'oxydation décrite dans l'équation (II-2). Au niveau de la surface d'or, les monomères de pyrrole positifs, instables, s'associent puis changent de conformation en libérant des protons.

Deux molécules de pyrrole, au niveau de l'électrode d'or (anode), perdent chacune un électron pour assurer la conduction et forment deux radicaux chargés positivement. Ces deux radicaux, instables, s'assemblent en formant un dimère chargé deux fois positivement. Puis, ce dimère perd deux protons pour former un dimère de pyrrole. Après de multiples itérations de ce principe, nous nous retrouvons en présence de longs filaments de polypyrrole enchevêtrés. Mais, la structure exacte du polypyrrole, comme pour tout polymère en général, est difficile à déterminer. Il en résulte que la synthèse de films de polypyrrole ayant certaines propriétés spécifiques demeure un travail largement empirique [105].

Habituellement, l'électrolyte permettant l'électrocopolymérisation du pyrrole était le perchlorate de lithium (LiClO_4). Cette molécule ne pose pas de problème pour synthétiser des biopolymères comportant des brins d'ADN, ces derniers étant très résistants, mais dénature les protéines (composé chaotropique). En effet, une protéine est une molécule composée d'acides aminés et repliée sur elle-même dans l'espace. La configuration tridimensionnelle d'une protéine est liée à son activité. Dans une protéine, se trouvent de petites cavités hydrophobes dues à ce repliement. Or, les ions perchlorate sont attirés par les zones hydrophobes et vont s'y fixer. Cette fixation va changer la configuration de la protéine et donc provoquer sa perte d'activité. De plus, la solution de perchlorate de lithium est non tamponnée. La libération de protons lors de la polymérisation (voir Figure 47) va donc acidifier le polypyrrole, ce qui entraîne une dénaturation de la protéine qui n'est plus à son pH optimum.

Pour éviter ces problèmes liés au perchlorate de lithium, un nouveau milieu de dilution du pyrrole a été développé au sein du groupe CREAB du CEA Grenoble. Ce milieu est composé, entre autres, d'un tampon phosphate ($\text{H}_2\text{PO}_4^- / \text{HPO}_4^{2-}$) et de chlorure de sodium. Le pKa de ce couple acide/base vaut 7,2. C'est-à-dire que, lorsque le pH de la solution est inférieur à 7,2, nous sommes en présence d'une majorité de H_2PO_4^- . Le domaine du pouvoir tampon de ce couple est situé entre pH = 6 et pH = 8,4. Une solution tampon phosphate basée sur ce couple doit donc avoir un pH compris entre ces deux valeurs. Sachant que le domaine d'activité des protéines est généralement compris entre pH = 6 et pH = 7,5 et que le pyrrole polymérise mieux en milieu acide (en effet, quand le pH augmente, le pyrrole libère les anions dopant et devient moins conducteur). Le choix d'un tampon phosphate légèrement acide paraît judicieux. Le problème de l'acidification de la solution avec le perchlorate n'existe plus avec ce tampon. Le rôle du dopant est maintenant tenu majoritairement par l'anion H_2PO_4^- et minoritairement par l'anion HPO_4^{2-} . Pour finir, le tampon phosphate n'est pas chaotropique donc il ne dénature pas les protéines.

II.1.2.2.2. Couplage

Pour utiliser ce principe d'électrocopolymérisation dans le cadre de la fonctionnalisation de surface des biocapteurs, différents procédés de couplages entre une molécule biologique et une molécule de pyrrole ont été développés. Contrairement aux molécules biologiques greffées à une biotine qui sont disponibles commercialement, le

greffage de pyrrole sur une biomolécule est à réaliser en laboratoire. Nous pouvons utiliser des pyrroles biotinylés (exemple de structure décrit dans la Figure 48 obtenue selon le protocole décrit par A. Dupont-Filliard *et al.* [106]) et revenir dans le cas des SAM par la fixation d'avidine sur une couche de polypyrroles couplés à la biotine [107]. Cette couche d'avidine peut, par la suite, être fonctionnalisée par des molécules biotinylées comme des oligonucléotides.

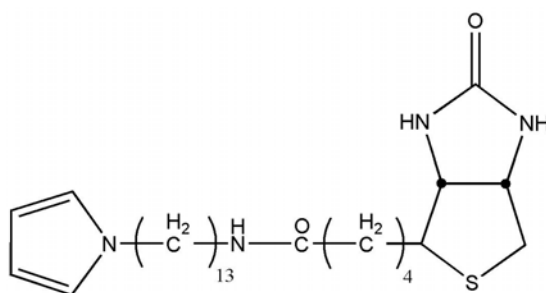


Figure 48 : Structure d'un dérivé de la biotine électropolymérisable composé d'un monomère de pyrrole (cycle de gauche) et d'une biotine (double cycle de droite) selon A. Dupont-Filliard *et al.* [107].

Nous pouvons aussi profiter de l'électropolymérisation du pyrrole pour effectuer une fonctionnalisation de la surface en une seule étape. Il suffit pour cela de greffer directement de manière covalente sur la sonde une fonction pyrrole. Aujourd'hui, le CREAB est capable de greffer un groupe pyrrole sur, entre autres, des oligonucléotides [108], des protéines, et des oligosaccharides. L'électrocopolymérisation de ces trois biomolécules différentes greffées à un pyrrole a fait l'objet d'études liées à différentes applications au cours de ma thèse, applications qui feront l'objet du chapitre III.

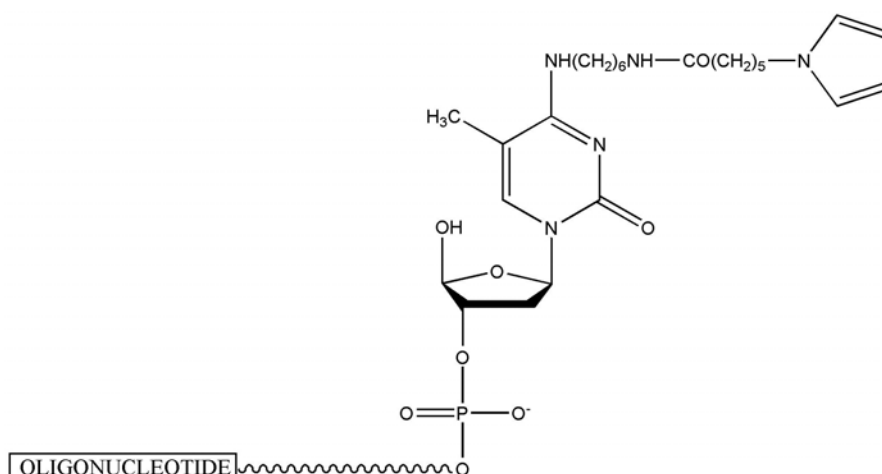


Figure 49 : Structure d'un dérivé d'oligonucléotide électropolymérisable composé d'un monomère de pyrrole (cycle de droite) lié de manière covalente à un oligonucléotide via un groupe phosphoramidite selon T. Livache [102].

Un exemple de structure ODN/pyrrole est décrit dans la Figure 49 obtenue selon le protocole décrit par T. Livache *et al.* [102]. Cette structure particulière a été validée et a fait l'objet de nombreuses études [59,64,102,108] que ce soit en fluorescence, en SPR ou avec les microbalances à quartz.

La faculté du pyrrole d'être électropolymérisable alliée avec la possibilité de lier de manière covalente un pyrrole avec diverses biomolécules vont nous permettre de structurer notre transducteur SPR par électrocopolymérisation de pyrrole et de pyrrole/biomolécule, ce qui veut dire que nous allons polymériser un mélange, dont les proportions restent à définir, de pyrrole et de pyrroles liés à une biomolécule.

II.1.2.2.3. Structuration en plots

Dérivé du procédé MICAM™ [104], le procédé propre au laboratoire CREAB du CEA Grenoble permet une fonctionnalisation simple d'une surface d'or homogène. Il est basé sur une électrocopolymérisation directe de pyrrole et de pyrrole fonctionnalisé sur un substrat d'or par l'utilisation d'une micro cellule électrochimique mobile décrite dans la Figure 50. Les spots de polypyrrole obtenus de cette façon sont caractérisés en terme d'épaisseur puis d'efficacité lors des réactions de reconnaissance biologique (hybridation de l'ADN ou reconnaissance protéine-ligand par exemple) [64].

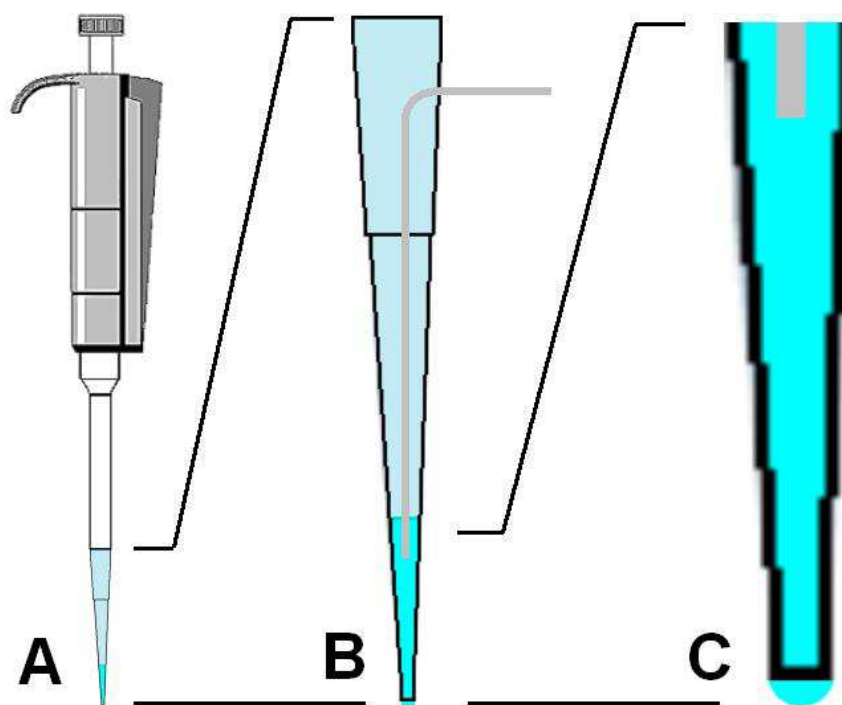


Figure 50 : Microcellule électrochimique mobile. **A :** micropipette réglable de 200 μL munie de son cône contenant 10 μL de solution de pyrrole. **B :** Zoom sur le cône modifié traversé par une électrode de platine en contact avec le liquide. **C :** Zoom sur l'extrémité du cône prolongée par un ménisque de liquide. C'est ce ménisque qui sera en contact avec l'électrode de travail (surface d'or non représentée).

La synthèse des plots de polymère, décrite par T. Livache *et al.* [109] est effectuée à l'aide du montage de la Figure 51. Ce montage se réalise avec un embout de pipette de 200 μL (P200 Gilson) dont le cône forme la cellule électrochimique possédant la contre électrode formée d'un fil de platine, en contact avec la solution contenant le tampon phosphate, le pyrrole (20 mM) et les biomolécules pyrrolées. Le déplacement de la pipette par rapport à la surface d'or est piloté par trois moteurs permettant un positionnement micrométrique dans les trois dimensions de l'espace et dirigés par le logiciel Polypotter (logiciel développé au CEA Grenoble). Lorsque le contact est établi entre le ménisque en extrémité du cône et la surface d'or, une impulsion électrique de 2V et de 250 ms, (cf. le schéma de l'impulsion électrique de la Figure 51), généré par un potentiostat, permet la réaction de copolymérisation. Le cône est déplacé et rincé entre chaque greffage de molécules biologiques, afin d'éviter toute contamination d'échantillons entre les différents dépôts.

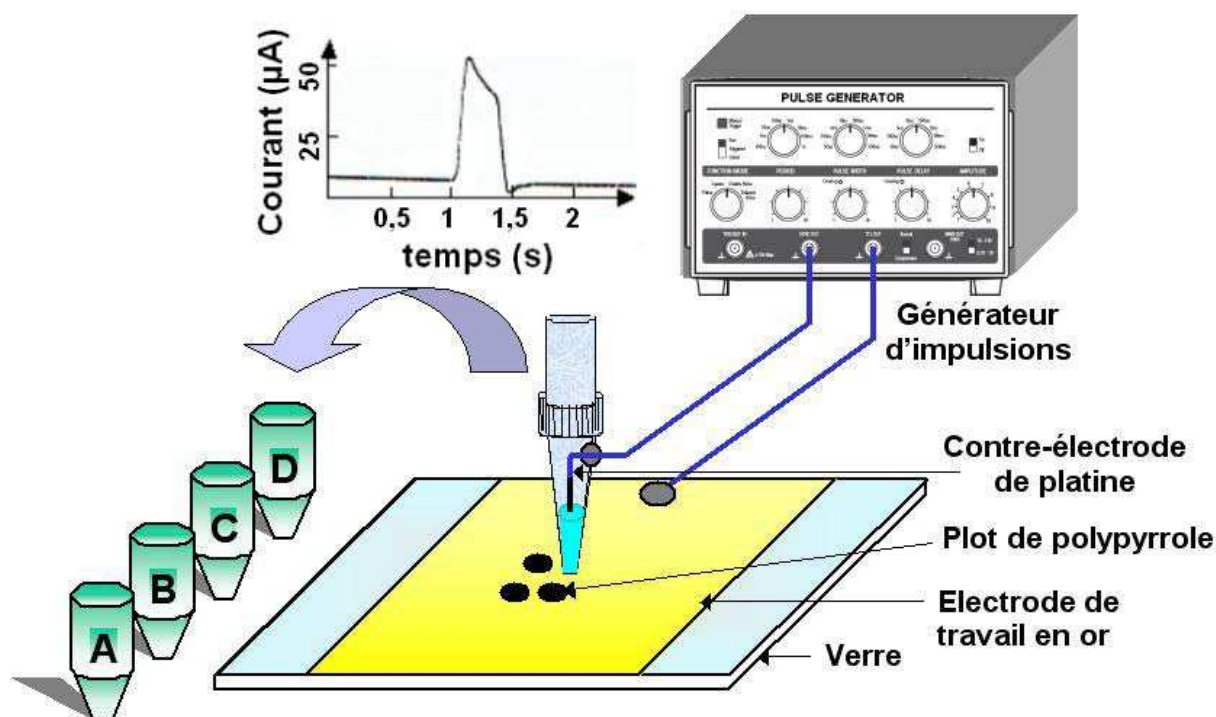


Figure 51 : principe de la microstructuration électrochimique en plots. Le graphe en haut à gauche montre l'impulsion électrique provoquant la copolymérisation.

II.1.2.2.4. Avantages

Les avantages de l'électrocopolymérisation du pyrrole sont nombreux. Un des principaux avantages de cette méthode est sa **simplicité** de mise en œuvre : les films peuvent être préparés en **une seule étape** très rapide. Un autre avantage de la fonctionnalisation électrochimique sur d'autres méthodes est la possibilité de générer le polymère sur une petite surface correspondant à la partie mouillée de l'électrode de travail. Ensuite, la **reproductibilité** de l'électrocopolymérisation est très bonne car la surface est exactement délimitée par les électrodes et l'**épaisseur contrôlée** par la charge injectée selon la relation suivante [104] :

$$l = \frac{M \cdot Q}{2.2 \cdot A \cdot F \cdot \rho} \quad (\text{II-3})$$

avec l l'épaisseur du polymère en mètres, $M = 0,067 \text{ kg/mol}^{-1}$ la masse molaire du pyrrole, Q la charge de synthèse en Coulombs, A l'aire de l'électrode en mètres carrés, $F = 9,64 \cdot 10^4 \text{ C.mol}^{-1}$ la constante de Faraday, $\rho = 1580 \text{ kg.m}^{-3}$ la densité du polypyrrole.

De plus, la **densité** de fixation **des biomolécules** peut, elle aussi, être **contrôlée** par le choix du ratio, dans le tampon phosphate, entre la concentration en pyrroles et celle en biomolécules greffées à un pyrrole. Enfin, un avantage précieux pour les biocapteurs d'imagerie SPR est le **contraste important de l'image acquise** (Figure 52) lors de l'expérience entre les zones non fonctionnalisées du biocapteur (or nu) et les plots constitués du copolymère de pyrroles autorisant une localisation très simple des plots.

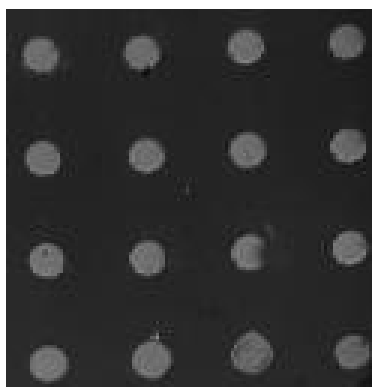


***Figure 52 :** Image SPR en milieu liquide d'une lame d'or fonctionnalisée selon une matrice de 4x4 plots de polypyrrole.*

En résumé, la fonctionnalisation 2D par électrocopolymérisation de pyrroles et de biomolécules pyrrolées est une méthode simple, rapide, conduisant à la formation de plots très solidement fixés sur l'or dont de nombreux paramètres physiques (forme, épaisseur, densité de biomolécules) peuvent être contrôlés de manière reproductible.

Nous sommes maintenant capables de fabriquer un biocapteur SPR, couplé par prisme, fonctionnel. Son utilisation pratique va nécessiter le développement d'un banc optique de mesure que nous allons décrire dans la partie suivante.

II.2. OPTIMISATION ET CHOIX DES ELEMENTS DU BANC

Dans cette partie, nous allons décrire le montage optique permettant la mesure des interactions biomoléculaires par imagerie SPR dont le principe général est décrit dans la Figure 21 (page 49). Cette description comprend plusieurs parties qui suivent le parcours du faisceau lumineux : la source, le système optique d'éclairage du capteur, le prisme et le

système d'injection des produits biologiques, le système optique d'imagerie et, pour finir, la caméra. Dans chaque partie, le choix des solutions sera justifié en fonction des performances envisagées.

II.2.1. Source de lumière

Une source de lumière est caractérisée par plusieurs paramètres : son spectre d'émission, sa divergence, sa cohérence (spatiale et temporelle) et l'intensité de son émission. Nous allons maintenant expliquer comment ces différents paramètres influent sur les performances du biocapteur SPR.

II.2.1.1. Longueur d'onde

Pour une source de lumière, le premier paramètre à choisir est la longueur d'onde. Pour l'imagerie SPR, ce choix résulte d'un compromis entre la sensibilité requise par le type d'interactions qui vont être mesurées, et la résolution latérale, liée à la longueur de propagation du plasmon (définie par l'équation (I-13)), requise pour imager les plots fonctionnalisés d'une taille donnée [110]. Une bonne sensibilité permet le suivi de petites molécules et de faibles concentrations tandis qu'une bonne résolution permet une plus grande densité d'informations (plots plus petits). Un exemple est donné dans la Figure 53 dans le cas de la fixation d'oligonucléotides de 20 bases ($M = 6$ kDa). Le taux de recouvrement (en fmol/mm^2) représenté sur cette figure correspond à la densité de matière nécessaire pour provoquer une variation de réflectivité $\Delta R = 1 \%$, ce qui est suffisamment confortable pour une mesure. Dans le cas où une détection de $20 \text{ fmol}/\text{mm}^2$ de ces brins d'ADN est requise, une longueur d'onde minimale $\lambda = 665 \text{ nm}$ sera nécessaire et va conduire à une résolution latérale, au mieux, de $\delta x = 6,8 \mu\text{m}$.

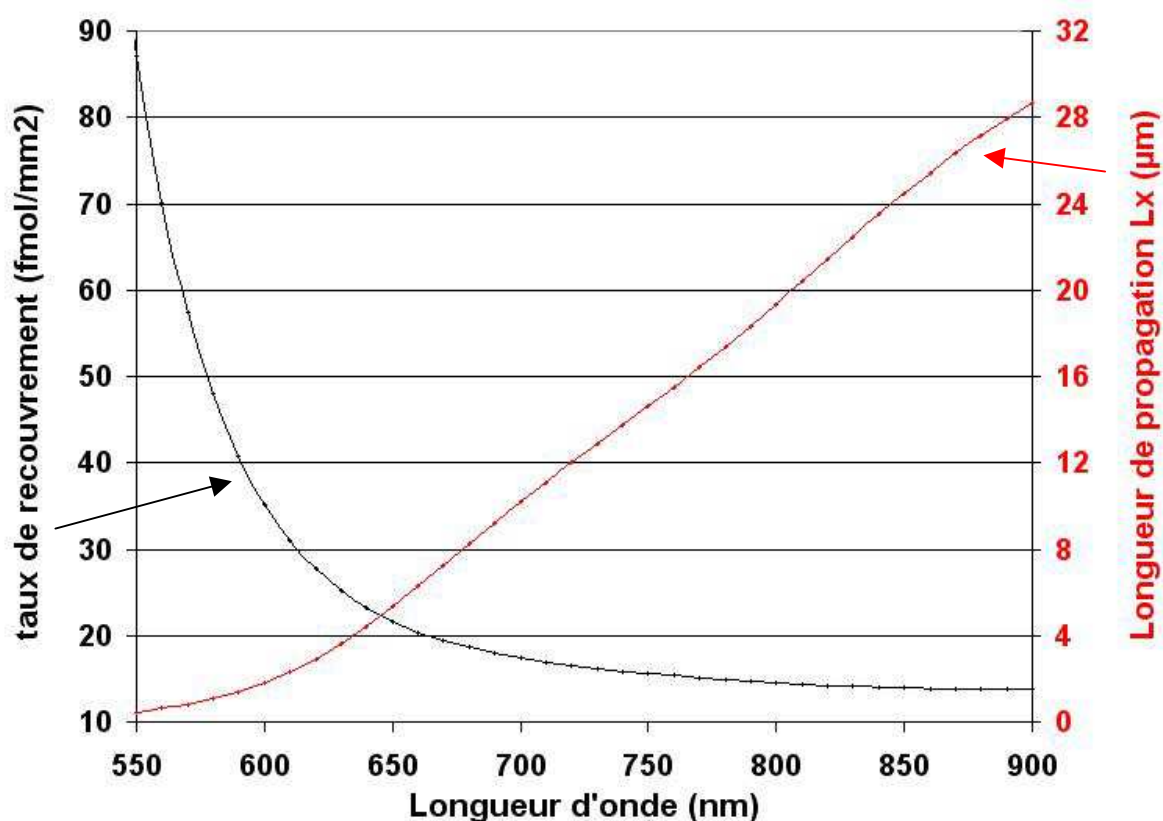


Figure 53 : Critères de choix de la longueur d'onde. La courbe rouge représente la valeur théorique de la longueur de propagation du plasmon de surface calculée d'après l'équation (I-13) dans le cas d'une interface entre un milieu métallique ($n_{or} = 0,13 + i \cdot 3,69$) et un milieu d'indice $n = 1,333$. La courbe noire est le taux de recouvrement correspondant à une variation de réflectivité de 1 % créée par une molécule de masse molaire $M = 6$ kDa, d'indice de réfraction $n = 1,41$ et d'incrément d'indice $\partial n / \partial C = 0,188$ mL/g (typiquement un oligonucléotide de 20 bases).

Sur notre montage, nous avons choisi une longueur d'onde autour de $\lambda = 650$ nm qui limite la résolution latérale à environ $5 \mu\text{m}$ et permet une mesure confortable d'environ 20 fmol/mm^2 d'oligonucléotides de 20 bases, ce qui semble un bon compromis en vue des applications envisagées.

II.2.1.2. Largeur spectrale, cohérence temporelle et divergence

Une source n'est pas simplement caractérisée par sa longueur d'onde. Une source réelle est aussi caractérisée, en dehors des considérations d'intensité, par sa largeur spectrale définissant sa cohérence temporelle, ainsi que sa divergence. La largeur spectrale vient du fait qu'une source n'émet pas une longueur d'onde mais un intervalle de longueurs d'ondes $\Delta\lambda$

autour d'une longueur d'onde centrale λ_0 . La cohérence temporelle sert à définir l'existence ou non d'une relation de phase entre les photons et donc d'interférences, et est caractérisée par la longueur de cohérence de la source L . Enfin la divergence, qui est plutôt une caractéristique du système comprenant la source et le système optique d'illumination, traduit le fait que la source n'émette pas un faisceau parfaitement parallèle mais un intervalle d'angles de largeur $2\cdot\Delta\alpha$.

La résonance des plasmons de surface étant définie pour un angle donné et une longueur d'onde donnée, le fait d'avoir plusieurs longueurs d'ondes et plusieurs angles d'incidence simultanément va influencer sur la sensibilité du biocapteur. Pour finir, la troisième caractéristique, à savoir la cohérence temporelle, va, quant à elle, intervenir dans l'imagerie. La longueur de cohérence L est liée à la largeur spectrale par la relation suivante [15] :

$$L = \frac{c}{\Delta\nu} = \frac{\lambda_0^2}{\Delta\lambda} \quad (\text{II-4})$$

Plus la source va être monochromatique (largeur spectrale faible), plus la longueur de cohérence va être élevée, ce qui va faciliter l'apparition d'interférences, phénomène non désiré lors de l'imagerie des biocapteurs. La grande longueur de cohérence des lasers ($L >$ quelques mètres) est à l'origine du fourmillement lumineux observé dans les figures obtenues («speckle»); ce phénomène est provoqué par des interférences aléatoires, les différences de marche provenant de la diffusion de la lumière par les impuretés du milieu (poussières de l'air) ou des différences d'indice de réfraction des milieux traversés. Ce phénomène peut toutefois être limité par l'utilisation d'un verre dépoli tournant, juste après la source, qui va fortement diminuer la cohérence spatiale du faisceau.

L'influence de la largeur spectrale et de la divergence du faisceau sur la sensibilité de la SPR a été étudiée dans le cas d'une source de longueur d'onde $\lambda = 650$ nm, incidente sur un prisme en SF11, d'angle au sommet $A_p = 32^\circ$, recouvert d'une couche d'1 nm de chrome et d'une couche de 48 nm d'or. La résonance des plasmons de surface se produit entre l'or et un milieu diélectrique d'indice de réfraction $n_c = 1,333$ et est détectée par interrogation en réflectivité (voir le paragraphe I.2.4). Dans les simulations qui suivent, la largeur spectrale et la divergence ont été matérialisées par une distribution uniforme des longueurs d'onde et des angles autour de leur valeur moyenne (une étude, non détaillée ici, considérant distribution gaussienne des longueurs d'onde donne des résultats quasiment identiques). La figure ci-

dessous illustre l'influence de la largeur spectrale : moins le faisceau sera monochromatique, plus le minimum de réflectivité à la résonance va être élevé (Figure 54A) et moins le biocapteur sera sensible aux interactions biologiques (Figure 54B).

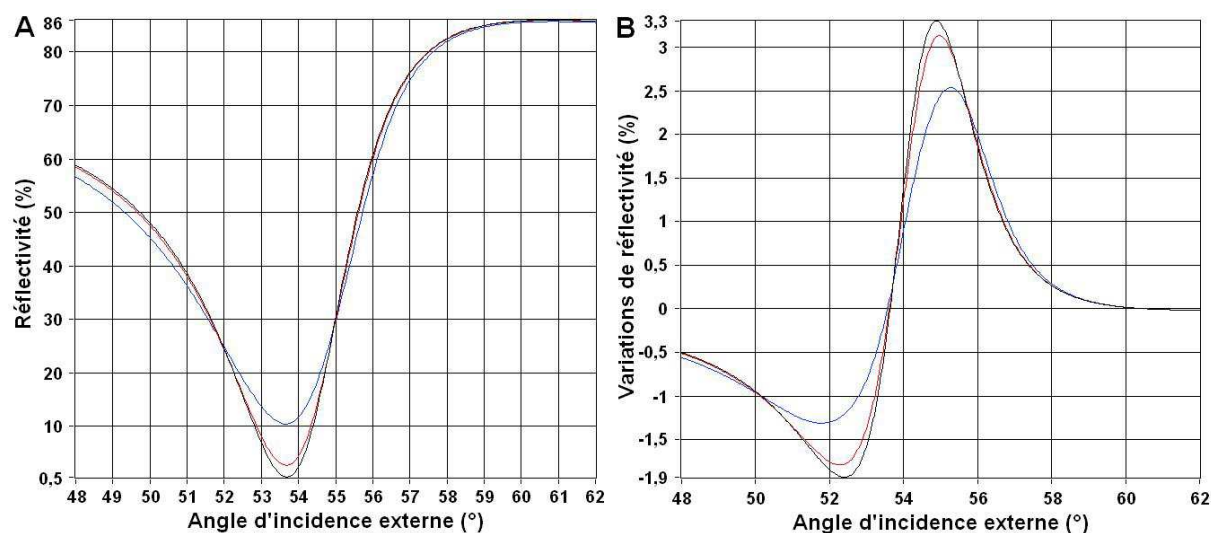


Figure 54 : Influence de la largeur spectrale de la source sur la résonance des plasmons de surface illustré dans le cas de 3 largeurs spectrales ($\Delta\lambda = 0$ nm $\rightarrow$ Noir, $\Delta\lambda = 20$ nm $\rightarrow$ Rouge, $\Delta\lambda = 50$ nm $\rightarrow$ Bleu). (A) Réflectivité, en polarisation TM et pour une longueur d'onde $\lambda = 650$ nm, entre un prisme en SF11 recouvert de 1 nm de chrome et de 48 nm d'or en contact avec un milieu liquide ($n_d = 1,333$) et (B) variations de réflectivité provoquée par la fixation sur l'or d'une couche biologique d'indice $n = 1,41$ et d'épaisseur 1 nm.

L'influence de la divergence du faisceau est globalement similaire, son augmentation provoquant une diminution de la sensibilité. Afin d'évaluer de manière plus quantitative l'effet de ces deux paramètres, la réponse du biocapteur dans le cas d'un faisceau idéal (monochromatique et parallèle) a été normalisée à 1, ce qui fait que nous allons pouvoir définir les réponses SPR dans les autres configurations relativement à cette réponse idéale. Dans le cas d'une largeur spectrale inférieure à $\Delta\lambda = 30$ nm et d'une demi-divergence inférieure à $\Delta\alpha = 12$ mrad ou 41 ' d'arc ($1^\circ = 60'$), la réponse relative du biocapteur est représentée dans la figure suivante.

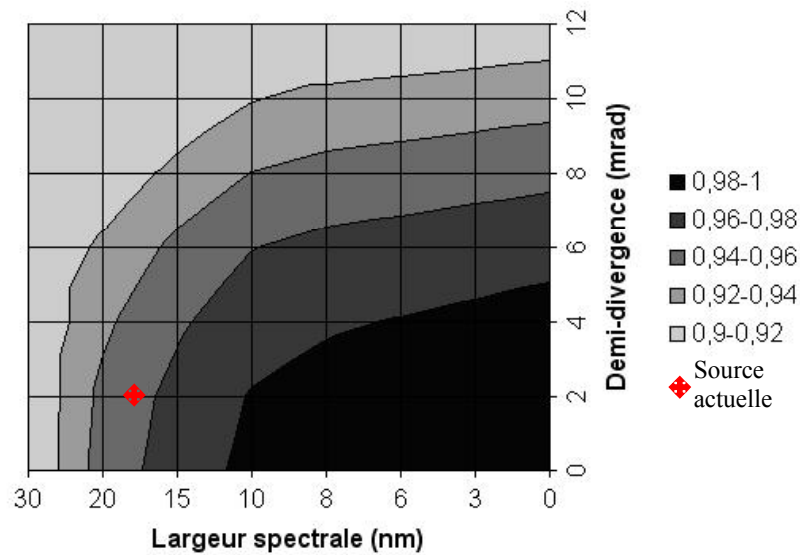


Figure 55 : Sensibilité théorique de la SPR en fonction de la largeur spectrale et de la divergence de la source. Ces valeurs ont été calculées à $\lambda = 650 \text{ nm}$ et normalisées à 1 pour une source monochromatique et parfaitement collimatée.

Comme indiqué sur la Figure 55, une source de largeur spectrale $\Delta\lambda = 18 \text{ nm}$ et de divergence $2\cdot\Delta\alpha = 4 \text{ mrad}$ (soit 14°) permet d'obtenir une réponse à 95 % de la réponse théorique. Cette source correspond à une diode LED à $\lambda = 650 \text{ nm}$ (dont nous avons mesuré le spectre, représenté dans la Figure 56) collimatée par deux objectifs de microscope. Cette source va donc permettre d'obtenir un biocapteur quasiment aussi sensible qu'un laser (5 % de perte en sensibilité) tout en ayant une longueur de cohérence $L = 24 \mu\text{m}$ (d'après l'équation (II-4)), ce qui évite tout phénomène d'interférences parasites nuisibles pour l'imagerie.

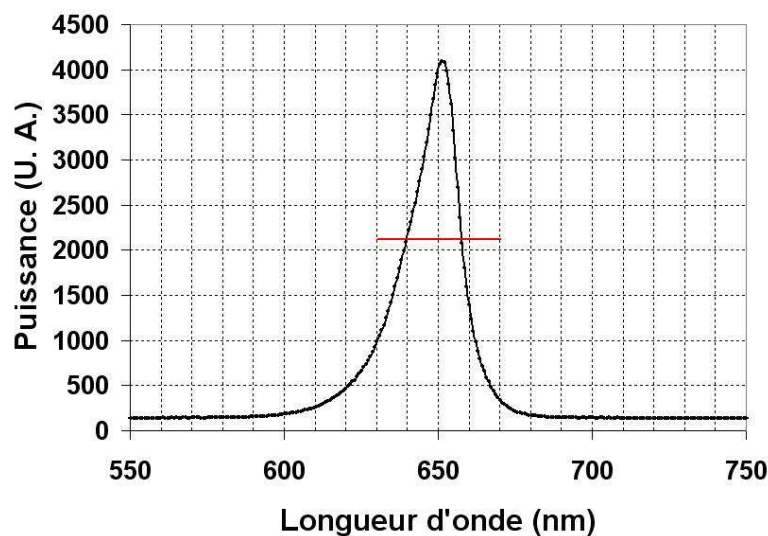


Figure 56 : Spectre de la diode LED sélectionnée pour le biocapteur SPR.

Une autre solution possible pour le choix de la source est un laser He-Ne, émettant à $\lambda = 632,8 \text{ nm}$. A cela, il faut ajouter un verre dépoli tournant pour éviter les interférences parasites et un système optique d'élargissement du faisceau pour éclairer simultanément tout le biocapteur. La solution basée sur une diode LED collimatée, moins compliquée à mettre en place et moins onéreuse tout en ne dégradant quasiment pas la sensibilité du biocapteur, a donc été retenue.

II.2.2. Balayage angulaire

D'après le protocole d'utilisation du biocapteur par imagerie SPR décrit dans le paragraphe I.2.4.1, une expérience commence par la mesure de la réflectivité en fonction de l'angle d'incidence. En considérant la largeur angulaire du pic d'absorption dû à la résonance des plasmons de surface à $\lambda = 650 \text{ nm}$, un **balayage de 14°** autour de l'angle de résonance est suffisant pour ensuite choisir l'angle de mesure de cinétique.

Pour éviter de faire tourner tout le bras source autour du prisme, nous avons choisi d'utiliser un miroir tournant, c'est-à-dire un miroir monté sur une rotation contrôlée par un moteur pas à pas. Un système optique conjuguant le prisme et le miroir est alors nécessaire pour que le prisme soit toujours éclairé pour les différentes incidences. Nous allons décrire, dans ce paragraphe, les propriétés nécessaires du miroir tournant ainsi que du système optique pour finaliser la partie illumination du biocapteur SPR.

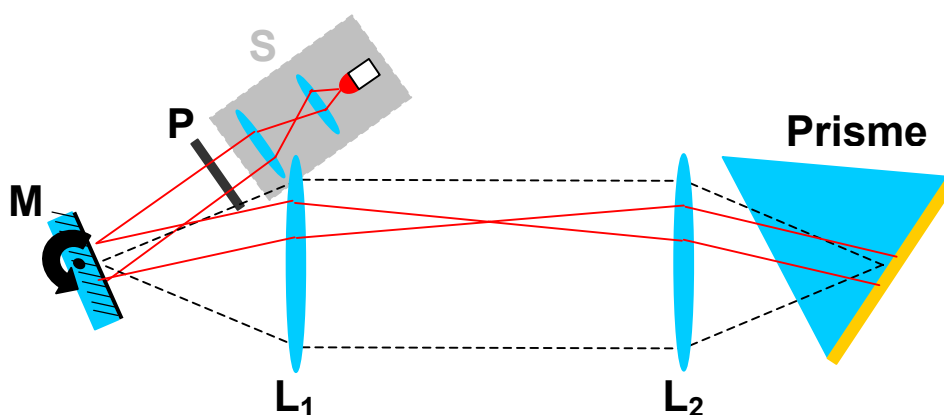


Figure 57 : Système optique d'illumination du biocapteur SPR couplé par prisme. (S) Diode LED ($\lambda = 650 \text{ nm}$), collimatée par deux objectifs de microscopes, telle que présentée dans le paragraphe précédent. (P) Polariseur. (M) Miroir tournant. (L_1 , L_2) Système afocal conjuguant le miroir et la base du **Prisme**, siège des interactions biomoléculaires.

Pour que le faisceau incident reste collimaté, le système optique conjuguant le miroir et la base du prisme doit être afocal. Le faisceau issu de la LED collimatée (S dans la Figure 57), de diamètre $\phi = 10$ mm, étant suffisamment large, nous avons choisi un système de grandissement $G_y = -1$ composé de deux doublets de même focale. Deux doublets de focale $f^* = 60$ mm et de diamètre $\phi = 30$ mm vont permettre d'accepter un débattement angulaire de $\pm 7^\circ$ du faisceau incident tout en limitant l'encombrement du système. Le choix de cette focale de 60 mm résulte d'un compromis entre la volonté de diminuer l'encombrement total du système et la nécessité de ménager un peu d'espace pour le positionnement du prisme, de son système de fixation et du dispositif de circulation des fluides (voir les sous-parties suivantes).

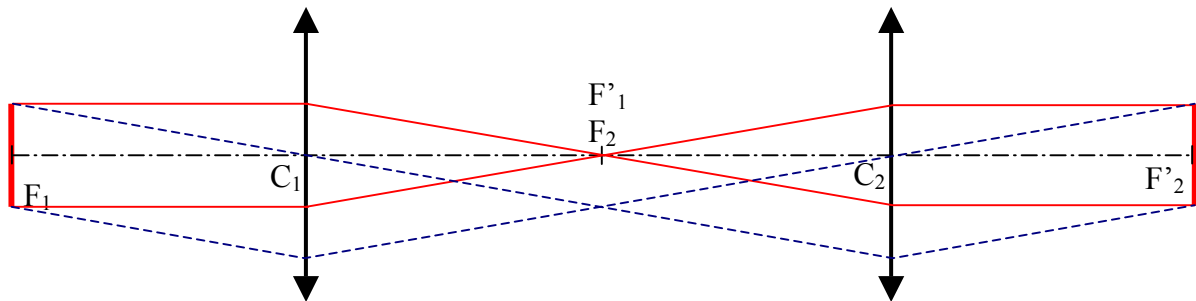


Figure 58 : Principe d'un système afocal tel que celui conjuguant le miroir tournant et la base du prisme. F_1 et F'_1 (F_2 et F'_2) sont les foyers de la 1^{ère} lentille (2nde lentille, respectivement). Un système afocal transforme un faisceau parallèle en un faisceau parallèle et s'obtient en superposant F'_1 et F_2 .

Pour que les 2 lentilles aient la même focale, elles doivent être issues de la même série (sinon la focale est connue avec une précision de $\pm 2\%$ [111], ce qui donne une imprécision de $\pm 4\%$ sur le grandissement) ou les focales doivent être mesurées précisément afin de connaître précisément le grandissement du système ($G_y = -f_2 / f_1$). Nous allons maintenant nous concentrer sur le défaut de positionnement des 2 lentilles l'une par rapport à l'autre que nous appellerons δx . En effet, le système n'est plus afocal si F'_1 et F_2 de la Figure 58 ne sont plus superposés.

Pour simplifier les calculs, nous allons utiliser les matrices de Jones (voir l'Annexe 2). Le système composé de L1 et de L2 avec un décalage δx entre F'_1 et F_2 équivaut donc, entre les plans passant par F_1 et par F'_2 , à :

$$\begin{pmatrix} 0 & f' \\ -1/f' & 0 \end{pmatrix} * \begin{pmatrix} 1 & \delta x \\ 0 & 1 \end{pmatrix} * \begin{pmatrix} 0 & f' \\ -1/f' & 0 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -1 & 0 \\ \delta x/f'^2 & -1 \end{pmatrix} \quad (\text{II-5})$$

Les rayons issus du miroir sont tous parallèles (la divergence de $\pm 2 \text{ mrad}$ est négligée). Lorsque le miroir est en position θ_0 , les rayons sont parallèles à l'axe optique ($\alpha = 0$). La source, non représentée ici, étant fixe, lorsque le miroir bouge d'un angle $\delta\theta$, l'inclinaison α des rayons augmente de $2 \cdot \delta\theta$.

Considérons un point A dans le plan focal objet de la première lentille de hauteur y et le rayon d'inclinaison α issu de ce point. Son image par le système optique étudié vaut :

$$\begin{pmatrix} -1 & 0 \\ \delta x/f'^2 & -1 \end{pmatrix} * \begin{pmatrix} y \\ \alpha \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -y \\ -\alpha + y \cdot \delta x/f'^2 \end{pmatrix} \quad (\text{II-6})$$

Puisque le système étudié n'est plus afocal, un faisceau collimaté ne sera plus parallèle en sortie de ce système, nous allons définir la grandeur G comme étant le rapport entre l'angle des rayons en sortie et l'angle des rayons incidents en fonction de la hauteur d'incidence y du rayon sur le plan focal objet. Ce rapport vaut alors :

$$G = -1 + \frac{y \cdot \delta x}{2 \cdot \delta\theta \cdot f'^2} \quad (\text{II-7})$$

Cette formule nous montre que, lorsque les foyers des deux lentilles ne sont pas superposés ($\delta x \neq 0$), l'inclinaison des rayons en sortie dépend de la hauteur y du rayon sur le plan focal objet de la première lentille. Seuls les rayons passant par F_1 ($y = 0$) sortiront avec une inclinaison $-\alpha$ comme dans le cas où le système est afocal. Dans tous les autres cas, l'inclinaison réelle du faisceau sera décalée par rapport à un système parfait de l'angle suivant :

$$\delta\alpha(y) = \frac{y \cdot \delta x}{f'^2} \quad (\text{II-8})$$

Ce décalage va se traduire, lors de la mesure initiale de la réflectivité du film d'or en fonction de l'angle d'incidence, par une dispersion apparente des conditions de résonance d'une extrémité à l'autre de la partie éclairée de l'interface (Figure 59). Cette dispersion n'est qu'apparente, car, pour une position du miroir, nous faisons correspondre un seul angle

d'incidence extérieur alors qu'en réalité, chaque point du faisceau aura une incidence différente.

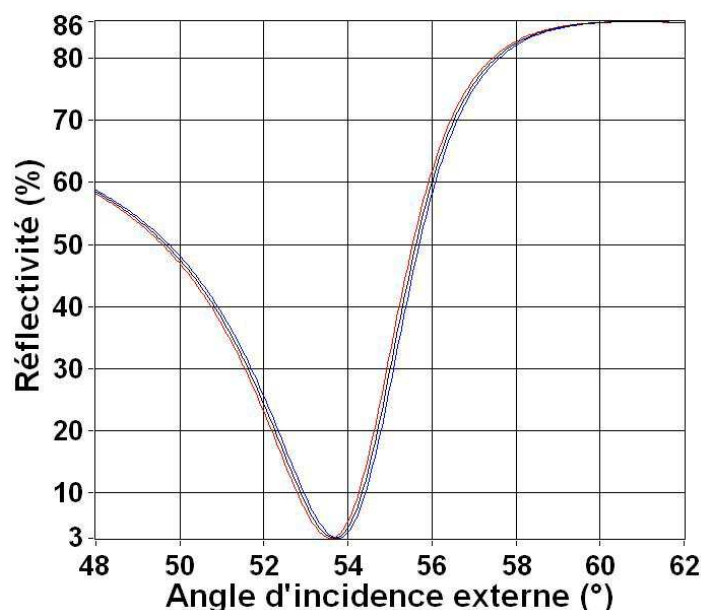


Figure 59: Réflectivité de l'interface or/liquide en fonction de l'angle d'incidence externe, au centre et aux extrémités de la zone illuminée par la diode LED à $\lambda = 650 \text{ nm}$ ($y = -5 \text{ mm}$, 0 , $+5 \text{ mm}$) dans le cas d'un décalage de 1 mm entre les 2 lentilles.

Cette dispersion des courbes de réflectivité pour une position donnée du miroir va induire dans l'étape suivante de l'expérience (cinétique) une dispersion des variations de réflectivité mesurée à angle fixe. En effet, si nous supposons que nous nous sommes placé à un angle de travail tel que la pente de la courbe de réflectivité, mesurée au centre de la zone éclairée, en fonction de l'angle d'incidence, soit maximale, cet angle ne correspond plus tout à fait à la pente maximale aux extrémités de la zone éclairée du fait du décalage illustré dans la Figure 59. Les variations de réflectivité mesurée sur ces extrémités, pour une même perturbation, seront donc nécessairement plus faibles. Dans la figure ci-dessous, nous avons illustré ce propos, dans le cas de la diode LED collimatée définie précédemment et illuminant une zone de 10 mm de diamètre, pour des défauts de positionnement des lentilles allant jusqu'à 2 mm (le défaut de positionnement réel restant bien inférieur à cette valeur).

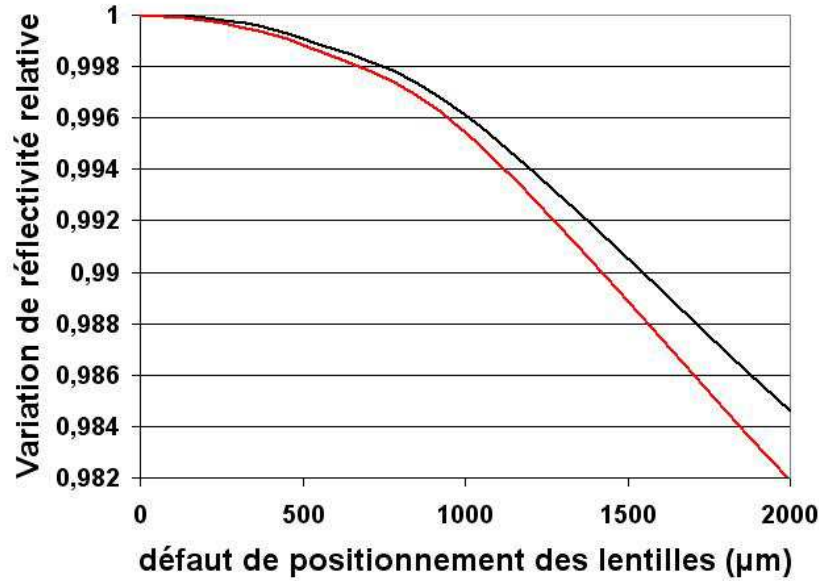


Figure 60 : Sensibilité SPR de l'interrogation en réflectivité aux extrémités de la zone illuminée par la diode LED à $\lambda = 650 \text{ nm}$ ($y = -5$ et $+5 \text{ mm}$) relativement à la sensibilité au centre de cette zone ($y = 0 \text{ mm}$) en fonction du défaut de positionnement des lentilles.

Comme illustré dans la Figure 60, pour une erreur de positionnement de $\pm 1 \text{ mm}$ des lentilles, cela nous donne une imprécision sur l'angle de mesure de : $\pm 1,3 \text{ mrad}$ entre la gauche et la droite du prisme conduisant à une dispersion des résultats de **0,5 %**. Compte tenu de cette imprécision de l'ordre du milliradian introduite par le système afocal et de la demi-divergence du faisceau $\Delta\alpha = 2 \text{ mrad}$ (sous-partie II.2.1.2), une précision de positionnement angulaire de $\pm 0,2 \text{ mrad}$ du moteur pas-à-pas sur lequel est fixé le miroir est largement suffisante.

Nous avons à présent défini les différents critères pratiques de conception de ce qui constitue le « bras source » de notre multicapteur SPR. Nous allons poursuivre la description du montage tout en suivant le faisceau lumineux, ce qui amène maintenant au capteur proprement dit, c'est-à-dire le prisme et le système fluidique.

II.2.3. Fluidique

Le système fluidique est le dispositif qui va permettre d'amener les cibles au contact des sondes fixées sur la surface d'or. Ce dispositif est constitué d'une pompe, de tubulures, de raccords et d'une cellule où vont se dérouler les interactions. Ce système doit être

biocompatible pour ne pas polluer les réactifs et le volume du circuit d'injection doit être le plus faible possible afin d'économiser les réactifs dont le prix de revient est assez élevé ou dont la disponibilité est limitée du fait qu'ils viennent de patients.

II.2.3.1. Pompe

Deux types de système d'injection sont couramment utilisés : ceux basés sur une pompe péristaltique et ceux basés sur une pompe pousse-seringue. Ces deux types de pompe, très différents, vont imposer le choix de la tubulure et des raccords.

Une pompe péristaltique est une pompe dans laquelle le fluide est acheminé par compression dans des tuyaux souples où il circule. Cet « aplatissement », en se déplaçant le long de la courbe centrale de la piste de la pompe, entraîne devant lui le contenu du tuyau; en même temps, le tuyau reprend sa forme derrière chaque rouleau et la puissante aspiration ainsi créée attire le fluide qui sera poussé par le rouleau suivant (Figure 61).

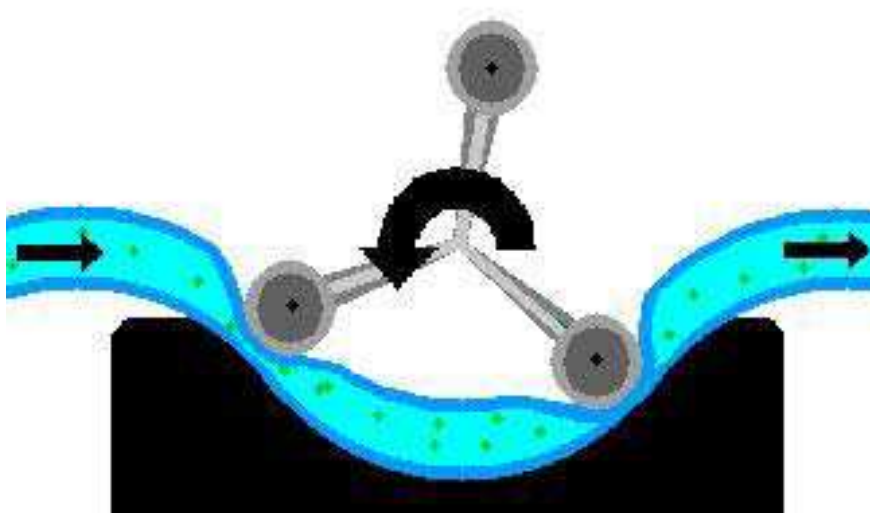


Figure 61 : Principe de fonctionnement d'une pompe péristaltique. Le fluide, contenant les analytes, se propage de la gauche vers la droite suite à la compression créée par le mouvement de rotation des rouleaux (3 à 12) de la pompe.

Les différents produits nécessaires à l'expérience sont préparés dans de petits tubes à essai. L'injection se fait alors simplement en immergeant l'extrémité du tube dans le tube à essais adéquat. Les avantages de ce type de pompe sont les suivants :

- Aucune partie de la pompe n'est en contact direct avec les différents produits injectés.
- L'injection peut fonctionner en circuit fermé en réinjectant ce qui sort de la cellule d'interactions dans le tube à essais.
- Les tuyaux souples sont simples d'utilisation.
- Son prix de revient est relativement faible (< 1 500 €).

Bien sûr, ce type de pompe a aussi des désavantages :

- La circulation du liquide se fait par à-coups résultants du passage d'un rouleau à l'autre sur le tube. Ces à-coups peuvent être plus ou moins prononcés suivant le nombre de rouleaux de la pompe.
- Le contrôle précis du débit dépend des réglages (pression des rouleaux sur le tuyau par exemple) et nécessite donc une calibration.

Une pompe pousse-seringue, comme son nom l'indique, est constituée d'une seringue et d'une translation motorisée contrôlant le mouvement du piston de cette seringue. Le liquide est alors « poussé » dans des tuyaux rigides. Les avantages de ce type de pompe sont les suivants :

- La circulation du liquide est sans à-coups, grâce à la translation continue du piston.
- La précision du débit est contrôlée très précisément grâce à la vitesse de translation du piston, ce qui permet une plus grande reproductibilité.

Par contre, les pompes pousse-seringue ont aussi quelques désavantages :

- Les différentes solutions doivent remplir la seringue donc, pour éviter toute contamination, il est nécessaire d'utiliser autant de seringues différentes que de produits.
- Les produits sortant de la cellule d'interactions ne peuvent être réinjectés.
- Son prix de revient est un peu plus élevé (> 2 000 €).

De plus, ces deux types d'injection ne sont pas facilement interchangeables car les tuyaux souples et leurs raccords sont conçus dans le système métrique tandis que les tuyaux rigides et leurs raccords sont conçus dans le système américain (en pouces). Notre choix s'est finalement porté sur les **pompes péristaltiques** car nous avons déjà à disposition dans l'équipe de recherche ce type de matériel. Notre pompe, de marque Gilson, pour des tuyaux de diamètre intérieur 0,19 mm, permet de faire varier le débit entre 8 $\mu\text{L}/\text{min}$ et 120 $\mu\text{L}/\text{min}$. Nous verrons, dans la partie suivante, en quoi le choix du débit est très important pour l'étude des cinétiques d'interaction (sous-partie II.3.3).

II.2.3.2. Injection des échantillons

Nous allons maintenant expliquer comment les échantillons sont injectés grâce à la pompe péristaltique. L'injection des analytes se fait au moyen d'une vanne à boucle centrale d'injection [51]. Cette vanne, à 2 positions, permet de ne faire passer que du tampon par la pompe pendant toute la réaction. En position 1, le tampon sort directement de la vanne en laissant la boucle, de volume fixe, libre pour y insérer les réactifs à l'aide d'une seringue. Ensuite, en position 2, ce volume prédéfini est introduit dans le circuit d'injection en faisant passer le tampon dans cette boucle. Suivant la taille de la boucle, nous pouvons faire passer différentes quantités d'analytes (50 μL , 100 μL , 250 μL ,...). Le principe de fonctionnement d'une vanne d'injection est illustré dans la Figure 62. Ce système, comprenant une pompe et une vanne, est couramment utilisé et forme le principe de base des systèmes FIA (Flow Injection Analysis : analyse de petites quantités de réactifs insérées dans un flux continu de solution tampon) [112]. Bien sûr, l'utilisation d'une telle vanne nous empêche à présent d'utiliser notre pompe péristaltique en circuit fermé.

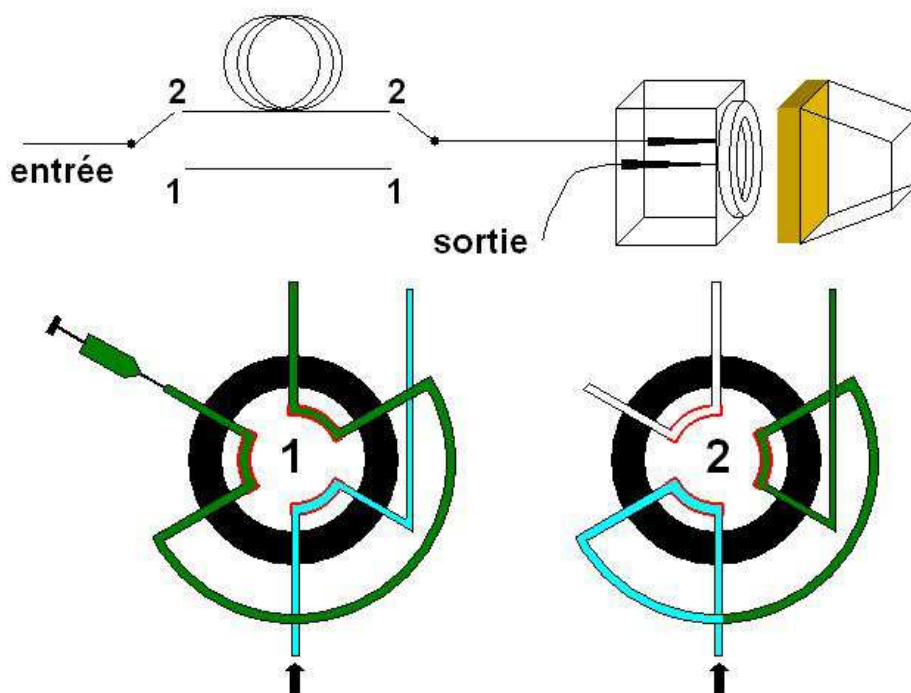


Figure 62 : Principe de fonctionnement d'une vanne à boucle d'injection centrale. En position 1, le tampon (bleu clair) est injecté dans la cellule. Pendant ce temps, la boucle peut être chargée avec un réactif (vert foncé) grâce à une seringue. En position 2, le tampon passe par la boucle préalablement chargée avant d'atteindre la cellule.

II.2.3.3. Cellule d'interactions

Pour finir la description du système fluide, nous allons maintenant décrire la cellule d'interactions. Elle est caractérisée par plusieurs propriétés : sa taille, sa forme ainsi que sa composition. Sa taille va définir le nombre maximal de plots que nous allons pouvoir analyser en parallèle, sa forme va définir l'écoulement des réactifs au niveau de l'interface tandis que le choix du matériau de composition de la cuve doit permettre une bonne biocompatibilité avec ces réactifs et une bonne étanchéité de la cellule.

La cellule d'interactions doit être la plus grande possible afin de pouvoir intégrer un maximum de plots dans notre capteur, mais, dans le même temps, sa taille va définir le volume de la cellule et, par voie de conséquence, la quantité de réactifs nécessaire pour l'analyse des interactions. Le choix de cette taille résulte donc d'un compromis. Nous avons choisi d'analyser des **matrices de plots** carrées de **5 mm x 5 mm**. Cela va nous permettre d'analyser simultanément suffisamment de plots dans le cadre des applications présentées dans le chapitre III.

La diagonale d'une matrice de 5 mm de côté mesurant 7,1 mm, nous avons conçu une cellule d'interactions cylindrique de diamètre $\phi = 8 \text{ mm}$, ce qui nous laisse une tolérance suffisante pour placer la matrice de plots au centre de la cellule. Cette cellule mesure une hauteur $h = 300 \text{ }\mu\text{m}$, ce qui fait un volume raisonnable de $V = 15 \text{ }\mu\text{L}$. L'injection se fait alors par une ouverture de diamètre 400 μm en bas de la cellule et la sortie par une autre ouverture de même diamètre en haut de cette cuve.

La validité de ce choix a ensuite été vérifiée en injectant successivement dans la cuve, au contact d'un prisme recouvert d'une couche mince d'or non-fonctionnalisée, de l'eau et du PBS, une solution aqueuse contenant quelques solutés (NaCl, KCL, ...). Les résultats de ce test sont représentés dans la Figure 63. Sur ces images, la cuve n'est pas circulaire à cause de l'anamorphose créée par le prisme et les images sont pivotées d'un quart de tour (le bas est à gauche de l'image tandis que le haut est à droite). Dans cette figure, sont représentées les images acquises au cours du temps lors de ces injections. A chaque image a été retirée l'image initiale du début de l'expérience. L'augmentation de réflectivité due à l'injection du PBS, d'indice de réfraction plus élevé que celui de l'eau, se traduit par un décalage de la valeur des pixels de l'image vers le blanc (1^{ère} ligne) tandis que l'injection d'eau dans une cuve remplie de PBS va décaler la valeur des pixels vers le noir (2^{ème} ligne).

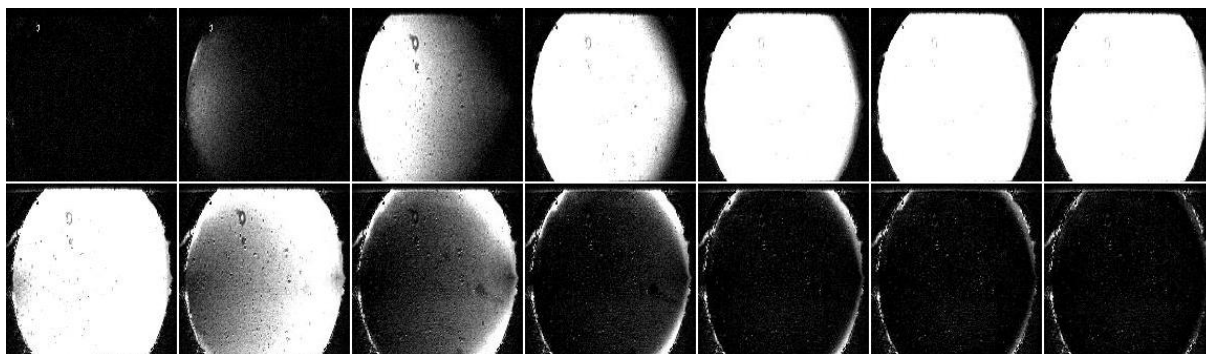


Figure 63 : Mélange des produits dans une cuve cylindrique observé par imagerie SPR. Ces 14 images sont obtenues en calculant la différence entre l'image acquise au temps t et l'image acquise au temps $t = t_0$ (début de l'expérience). Chaque image est pivotée de 90° , le bas de la cuve est à gauche et le haut à droite. 1^{ère} ligne : Injection de PBS (eau + solutés, $n_{\text{PBS}} > n_{\text{eau}}$) dans une cuve remplie d'eau. 2^{ème} ligne : Injection d'eau dans une cuve remplie de PBS.

Sur cette figure, nous voyons d'abord que la réflectivité en dehors de la cuve reste constante tout au long de l'expérience. Ensuite, nous voyons que le passage d'un milieu à un autre se fait de manière assez homogène avec tout de même un léger retard sur les bords latéraux (haut et bas sur chaque image) de la cuve. Enfin, sur les 3 dernières images des deux lignes de la Figure 63, un filet sur le haut de la cuve (à droite sur les images, sombre sur la 1^{ère} ligne, blanc sur la seconde) reste assez réfractaire au changement de milieu liquide. Cette partie de la cuve est une zone où le flux est quasiment nul, car située plus haut que le trou de sortie des liquides, et où les changements vont plutôt s'opérer par diffusion. Cette zone reste tout de même assez restreinte et ne perturbera pas une zone fonctionnalisée de 5 mm par 5 mm située au centre de la cuve.

Cette cuve cylindrique permet donc une circulation homogène des réactifs. Par la suite, toutes les expériences présentées ont été réalisées dans une cuve de 8 mm de diamètre et de 300 μm de hauteur taillée dans un bloc de 10 mm x 15 mm x 25 mm de téflon. Le téflon a plusieurs avantages : il est biocompatible et il est assez souple, ce qui facilite son usinage et ce qui permet aux parois de la cuve d'épouser la forme du prisme afin d'assurer une bonne étanchéité. Le plan de cette cuve en téflon est représenté dans la Figure 64. La paroi de la cellule est constituée d'un anneau en téflon et son fond du bloc massif de téflon. Cette cellule est ensuite fermée en appliquant le bloc de la Figure 64 contre le prisme recouvert d'une couche mince d'or. Deux trous coniques traversant le bloc de téflon servent à rentrer à force 2

aiguilles de seringue qui, connectées aux tuyaux souples, vont permettre l'entrée et la sortie des réactifs.

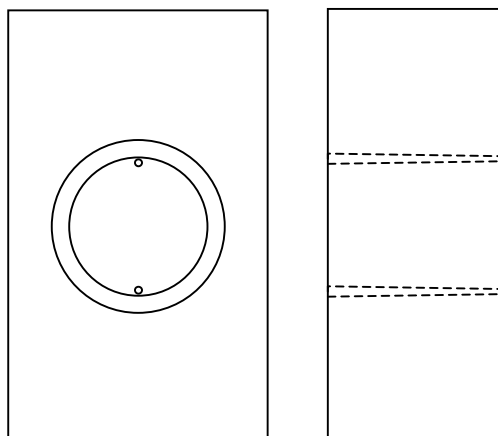


Figure 64 : Plan de la cuve en téflon servant de cellule d'interactions pour l'imagerie SPR. Cette cellule se résume à un anneau de téflon de diamètre intérieur 8 mm, de diamètre extérieur 10 mm et d'épaisseur 300 μm sur un bloc de 10 x 15 x 25 mm^3 percé de 2 trous coniques de diamètre 400 μm au niveau de la cellule pour l'entrée et la sortie des réactifs.

Le système fluide d'injection des différents liquides est maintenant complet. Il va permettre de faire circuler de manière homogène de faibles quantités de réactifs. Ce système va ensuite être adjoint au prisme que nous allons décrire dans la partie suivante.

II.2.4. Prisme

Le choix du prisme est très important pour notre système d'imagerie des plasmons de surface car c'est lui qui va déterminer la qualité de l'imagerie. Un prisme est défini par plusieurs paramètres : ses dimensions (l x L x H), ses angles et son matériau qui fixe l'indice de réfraction. Nous allons voir, dans cette partie, comment choisir ces différents paramètres.

II.2.4.1. Critères de sélection

D'après ce que nous avons vu précédemment, plusieurs restrictions sur le choix de ces paramètres apparaissent déjà. Tout d'abord, les dimensions extérieures de la cellule d'interactions nous imposent une largeur et une hauteur du prisme supérieures à 10 mm pour conserver une bonne étanchéité (partie II.2.3.3). Ensuite, pour des raisons de simplicité de fixation du prisme contre la cellule d'interactions, nous nous sommes restreints à des prismes isocèles, ce qui va répartir plus uniformément les forces de pression du prisme sur la cuve et ne pas perturber l'étanchéité. Cette condition, non obligatoire, réduit le nombre de paramètres

angulaires à un seul, l'angle au sommet, appelé ainsi par opposition à la face du prisme recouverte d'or que nous nommons base du prisme (cette nomenclature sera conservée par la suite). Enfin, pour que l'excitation des plasmons de surface soit possible à la longueur d'onde $\lambda = 650 \text{ nm}$, l'indice de réfraction du prisme n_p doit être supérieur à 1,435 (voir Figure 12, page 39). Par contre, une fois cette condition remplie, nous avons vu dans la partie I.2.5.1 que la sensibilité en réflectivité ne dépend pas de l'indice de réfraction du prisme. Le choix de ce paramètre reste alors libre.

II.2.4.1.1. Simplicité du système optique

Comme nous l'avons déjà expliqué plusieurs fois au cours de cette thèse, les différents capteurs sont placés sur la couche d'or au contact du prisme. Pour étudier simultanément et en temps réel les interactions se produisant sur ces différents plots, ces capteurs sont imagés sur une caméra CCD via un système optique adéquat. Ce système optique doit être le plus simple possible pour améliorer le confort de réglage et d'utilisation. Or, un système optique simple transforme un plan objet orthogonal à son axe optique en un plan image toujours orthogonal à son axe optique. Les rayons lumineux issus des capteurs fonctionnalisés sur la couche d'or traversent d'abord le prisme avant d'arriver sur le système optique. Une condition nécessaire à la simplicité du système optique est donc que le plan objet, c'est-à-dire l'image de la couche d'or par le prisme, soit perpendiculaire à l'axe optique (qui reste encore à définir) de ce système.

Puisque le protocole expérimental d'une expérience de mesure d'interactions biomoléculaires par imagerie SPR consiste à mesurer la réflectivité du système autour de l'angle de résonance des plasmons de surface puis, de mesurer les variations de réflectivité en temps réel à un angle fixe correspondant à l'angle de pente maximale de la courbe précédente, l'axe optique doit donc être choisi au voisinage de l'angle de résonance des plasmons de surface. Par la suite, nous avons choisi d'aligner l'axe optique selon l'angle de résonance des plasmons de surface sur l'eau (qui par la même occasion correspond, à une faible différence près, à l'angle de mesure des interactions en tampon PBS, que nous utilisons beaucoup pour les interactions présentées dans le chapitre III).

Si nous choisissons alors l'angle au sommet du prisme pour que la condition d'orthogonalité soit réalisée, un système afocal identique à celui du bras source suffit pour

l'imagerie. Les différents capteurs fonctionnalisant la couche d'or étant immobiles (seul le miroir tourne pour faire varier l'angle d'incidence des rayons), le système d'imagerie sera donc, par la même occasion, lui aussi immobile.

Si nous considérons l'ouverture numérique du système optique choisi qui va définir l'angle maximal des rayons incidents avec l'axe optique (8°) et le fait que nous mesurons la réflectivité sur une plage de 14° autour de l'angle de résonance des plasmon de surface (voir partie II.2.2), cela nous laisse une tolérance sur le choix de l'angle du prisme. Ces 3 courbes (condition d'orthogonalité et tolérances dues à l'ouverture numérique du système) sont représentées plus loin dans cette sous-partie.

II.2.4.1.2. Minimalisation des aberrations

Puisque nous avons deux paramètres (angle au sommet et indice du prisme) nous pouvons encore choisir une autre contrainte sur notre système. L'image de la couche d'or par le prisme varie avec l'angle d'incidence. Cela va introduire des aberrations dans le système optique (Figure 65).

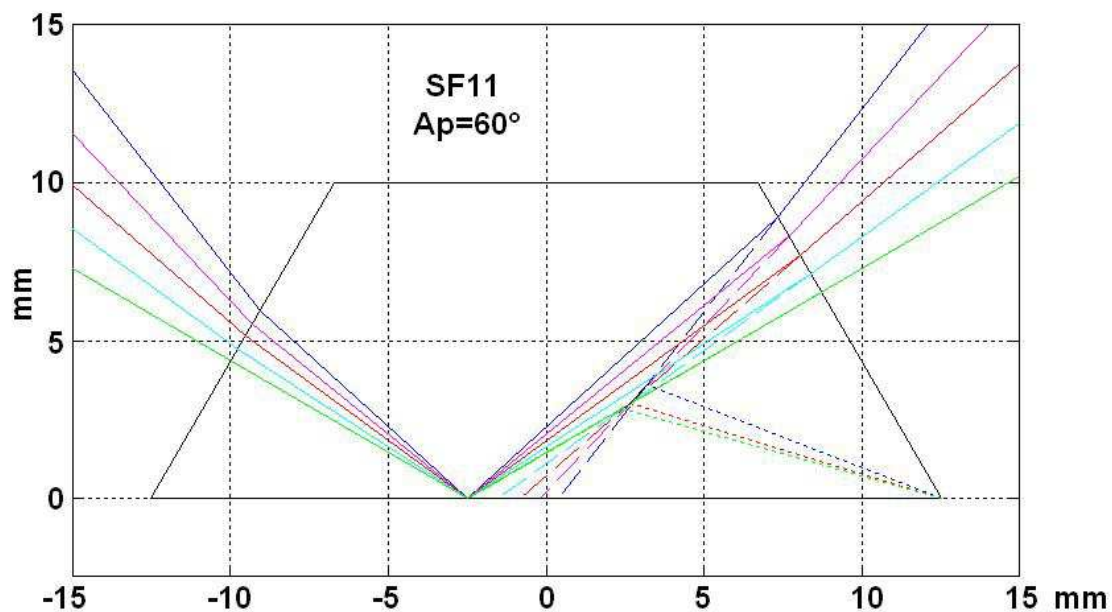


Figure 65 : Image d'un point de la base du prisme par la face de droite de ce même prisme. La configuration dessinée simule un prisme équilatéral en SF11 éclairé par une source monochromatique à $\lambda = 650 \text{ nm}$. Les différentes incidences, centrées autour de l'angle de résonance SPR entre l'or et l'eau, sont représentées en différentes couleurs : en trait plein, le rayon réel, en pointillés longs, le rayon virtuel (prolongement du rayon réel) et en pointillés courts, la position de l'image de la base du prisme.

Pour simplifier l'étude de ces aberrations, nous les avons décomposées en une composante transversale à l'axe optique et une composante longitudinale. La **composante longitudinale** va correspondre à un défaut de mise au point (variation de la position longitudinale de l'image) et donc à une image floue sur la caméra CCD. Pour que l'image reste tout de même nette, il faut que l'amplitude de ce défaut de mise au point, différent selon chaque incidence, soit plus petite que la profondeur de champ du système optique d'imagerie. Dans le cas d'un système optique afocal de grandissement $G_y = -1$, cette profondeur de champ est donnée par l'équation suivante (voir l'Annexe 2 sur la profondeur de champ) en fonction de l'inclinaison u des rayons, de la divergence $2 \cdot \alpha$ du faisceau et de la taille δy du pixel.

$$2 \cdot \delta x = \left(\frac{\cos^2 u - \sin^2 \alpha}{\sin(2 \cdot \alpha)} \right) \cdot 2 \cdot \delta y \quad (\text{II-9})$$

Pour calculer cette profondeur de champ du système, nous allons utiliser l'angle maximal des rayons sur la caméra : $u = 8^\circ$ (défini précédemment par l'ouverture numérique du système optique), une demi-divergence de $\alpha = 4 \text{ mrad}$ (mesurée en sortie du prisme pour la LED collimatée décrite dans la partie II.2.1) et des pixel de côté $\delta y = 13,4 \mu\text{m}$ (caméra CCD décrite dans la partie suivante II.2.5). L'application numérique nous donne une profondeur de champ $2 \cdot \delta x = \mathbf{3,3 \text{ mm}}$.

Sur la Figure 65, nous voyons que le défaut de mise au point, dû à la distance entre les différents plans image, est proportionnel à l'épaisseur de verre traversée. Plus l'épaisseur de verre traversée est importante et plus le défaut de mise au point sera donc important. Il est donc important d'avoir un prisme le plus petit possible (sans oublier la condition d'étanchéité du système cuve + prisme).

La **composante transversale** correspond à un décalage de la position transversale de l'image intermédiaire qui va varier avec l'angle d'incidence. Nous allons donc avoir une oscillation de cette image au cours de la mesure de la réflectivité autour de l'angle de résonance des plasmons de surface (Figure 66). Par contre, lors de l'étape suivante de suivi des variations de réflectivité à angle fixe, ce problème ne se pose plus. L'oscillation de l'image intermédiaire avec l'angle d'incidence ne doit pas faire sortir l'image finale de la zone active de la caméra CCD. Les capteurs étant placés sur une matrice carrée que le prisme

écrase dans une direction ($G_z = 1$ et $G_y \approx 0,5$), le ratio longueur sur largeur de l'image de ce carré vaut à peu près 2, tandis que celui de la plupart des caméras CCD vaut $4/3$. Une première précaution à prendre est donc de rendre parallèles les longueurs de la matrice CCD et de l'image. Pour ce faire, il faut faire pivoter la caméra de 90° . Ensuite, en choisissant le grandissement adéquat du système optique pour que la longueur de l'image occupe toute la longueur de la matrice CCD, cela laisse libre un tiers de la largeur de la matrice CCD soit une marge largement suffisante dans la direction des oscillations.

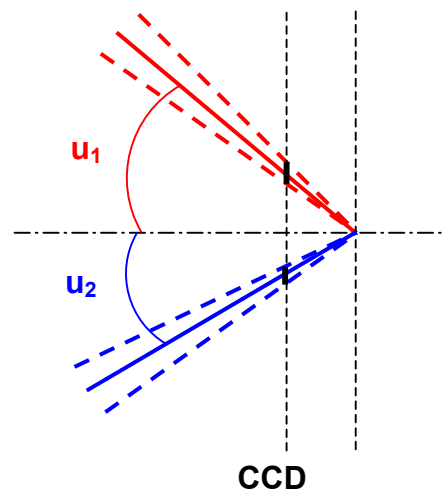


Figure 66 : Oscillation du point image dans le plan de la caméra CCD. 2 incidences différentes u_1 et u_2 sont représentées. Ces 2 faisceaux éclairent deux pixels différents de la CCD.

La seconde condition pour que le système optique d'imagerie reste simple est donc de minimiser ces aberrations. Nous avons représenté ces deux conditions sur la Figure 67. Les deux courbes bleues en haut de ce graphe représentent les conditions de minimalisation des composantes longitudinales et transversales des aberrations (leur légère différence de position est due à la précision du calcul). La courbe représentant les aberrations maximales acceptables compte tenu de la profondeur de champ est représentée en pointillé bleu. La courbe noire représente la condition de normalité de l'image intermédiaire du capteur par le prisme avec l'axe optique du système imageur (tolérances dues à l'ouverture numérique du système en pointillé noir).

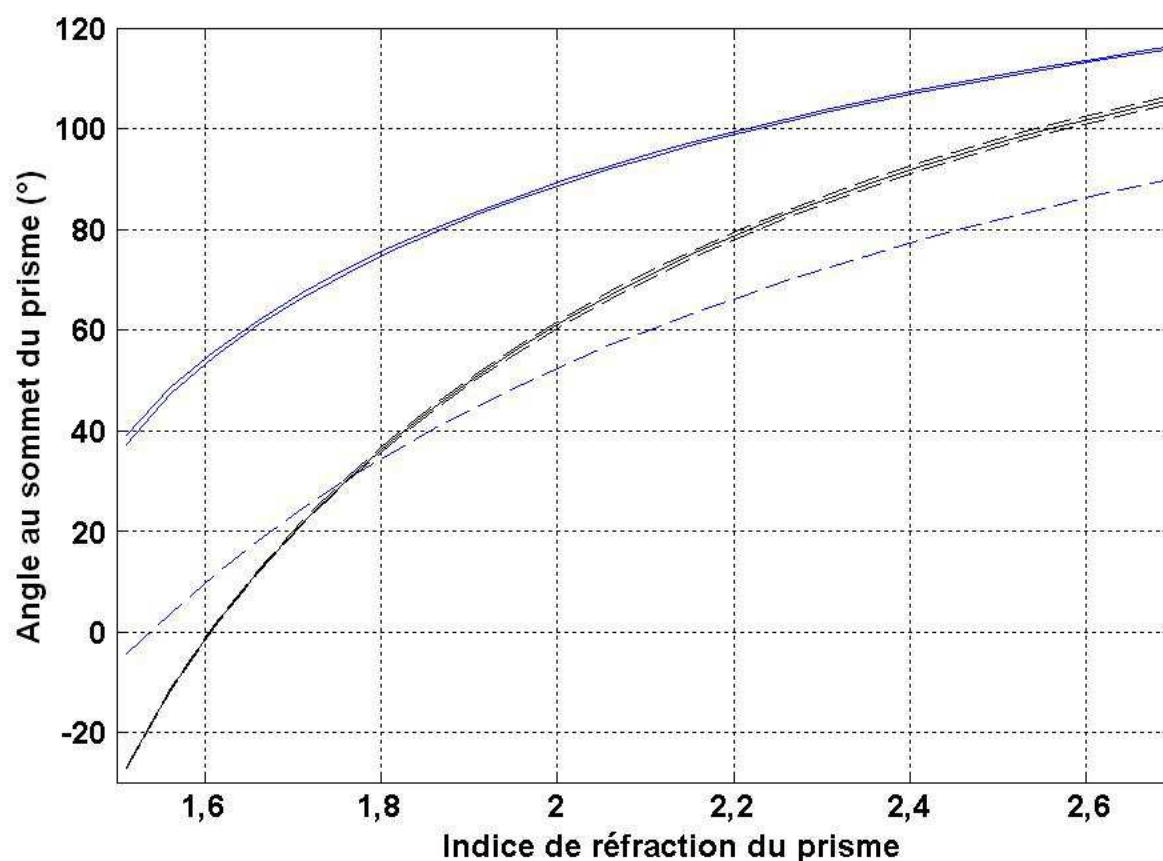


Figure 67 : Optimisation de l'angle et de l'indice du prisme pour l'imagerie SPR autour de l'angle de résonance entre l'or et l'eau à $\lambda = 650 \text{ nm}$. En noir, la condition de normalité à l'axe optique de l'image intermédiaire des capteurs par le prisme. En bleu, la condition minimisant les aberrations. En pointillés, les tolérances sur chacune de ces conditions.

Sur la Figure 67, nous voyons que les conditions d'orthogonalité et d'aberrations minimales ne peuvent pas être simultanément résolues, bien que ces conditions convergent lorsque l'indice augmente. Sur cette courbe, nous voyons qu'à partir d'un indice du prisme $n_p = 1,755$, il est possible de satisfaire les deux conditions dans la limite des tolérances précédemment définies. De plus, plus l'indice sera élevé et plus il sera possible de diminuer les aberrations et, donc, de diminuer les oscillations de l'image et d'augmenter la facilité du réglage du système. Cette condition nous laisse un choix théorique d'une vingtaine de verre dans le catalogue Schott (voir Annexe 4).

II.2.4.2. Simulation des différentes configurations

Maintenant que nous avons défini les critères théoriques pour le choix du prisme, il nous faut choisir de manière pratique la configuration du prisme que nous allons retenir pour le banc, en particulier la nature du matériau constituant ce prisme.

II.2.4.2.1. Limitations technologiques

Dans un premier temps, les plots étaient déposés sur une lame de verre recouverte d'un film mince d'or. Il fallait ensuite coupler la lame au prisme par une huile de couplage de même indice (Cargille™ [113]). Cette huile est toxique au delà de $n = 1,8$ ($\lambda = 589 \text{ nm}$) car elle contient alors de l'arsenic et sèche de plus en plus vite quand l'indice augmente. Nous nous sommes donc limités à des indices de prisme inférieurs à 1,8, ce qui nous laisse encore une dizaine de verres possibles (Annexe 4). Un dépôt de la couche d'or directement sur le prisme permet de s'affranchir de cette limitation et de choisir des indices plus élevés. Le prisme devient alors jetable et le coût de fabrication doit être pris en compte.

Verre	Indice ($\lambda_c = 656 \text{ nm}$)	Verre	Indice ($\lambda_c = 656 \text{ nm}$)
N-LAF34	1,7678	N-LASF44	1,79901
SF11	1,77599	N-LASF43	1,8002
SF56A	1,77605	N-LASF40	1,82745
N-SF56	1,77607	N-LASF41	1,82923
N-LAF33	1,78049	SFL57	1,83643
N-LAF21	1,78301	N-SF57	1,8365
N-LAF32	1,78934	SF57	1,8365
N-LAF36	1,7939	LASFN9	1,84256
N-LASF45	1,79436	N-LASF31	1,87429
N-SF6	1,79608	N-LASF46	1,89307
SF6	1,79609	SF66	1,91033

Tableau 3 : Indice des verres possibles pour la fabrication du prisme.

II.2.4.2.2. Choix de la configuration

Compte tenu de la disponibilité des matériaux et de leur prix, notre choix s'est finalement porté sur un prisme en **SF11** ($n = 1,777$ @ $\lambda = 650 \text{ nm}$) d'angle au sommet $A_p = 32^\circ$ et de largeur $l = 12 \text{ mm}$. La configuration retenue est dessinée ci-dessous dans la Figure 68.

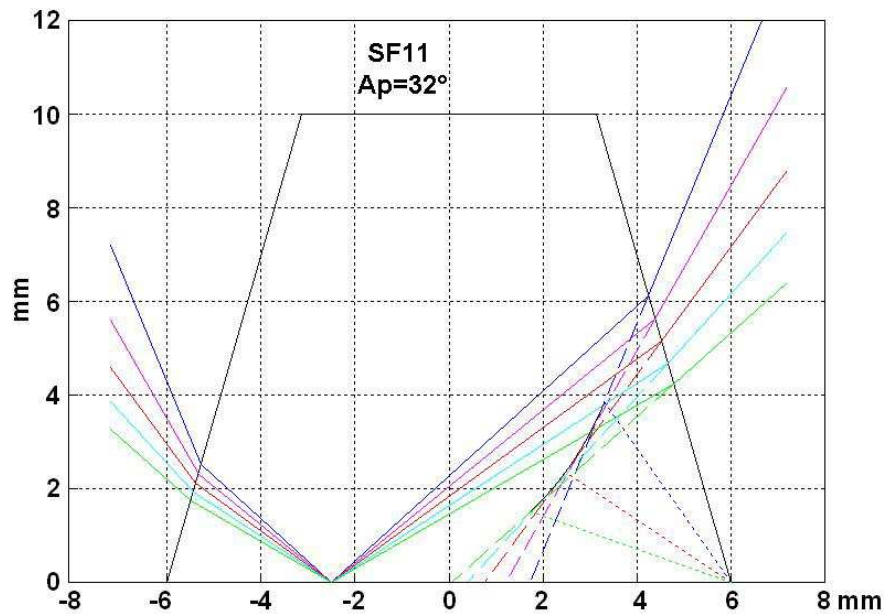


Figure 68 : Image d'un point de la base du prisme par la face de droite de ce même prisme. La configuration dessinée simule un prisme optimisé en SF11, d'angle au sommet $A_p = 32^\circ$, éclairé par une source monochromatique à $\lambda = 650 \text{ nm}$. Les différentes incidences, centrées autour de l'angle de résonance SPR entre l'or et l'eau, sont représentées en différentes couleurs : en trait plein, le rayon réel, en pointillés longs, le rayon virtuel (prolongement du rayon réel) et en pointillés courts, la position de l'image de la base du prisme.

Le rayon central (rouge) est perpendiculaire à l'image intermédiaire correspondante (pointillés courts rouges), ce qui va nous permettre d'utiliser le simple système afocal désiré.

II.2.5. Imagerie et caméra

Les critères précédents étant remplis, l'image des capteurs se fait par un système afocal de grandissement $G_y = -1$, identique au système optique du bras source, sur une caméra CCD. Pour des raisons de symétrie, ce système va nous permettre de mesurer la réflectivité en fonction de l'angle d'incidence sur une plage de 14° centrée autour de l'angle de résonance des plasmons de surface (entre l'or et l'eau à $\lambda = 650 \text{ nm}$). La courbe théorique de ce que devrait mesurer un tel système est représentée dans la Figure 69.

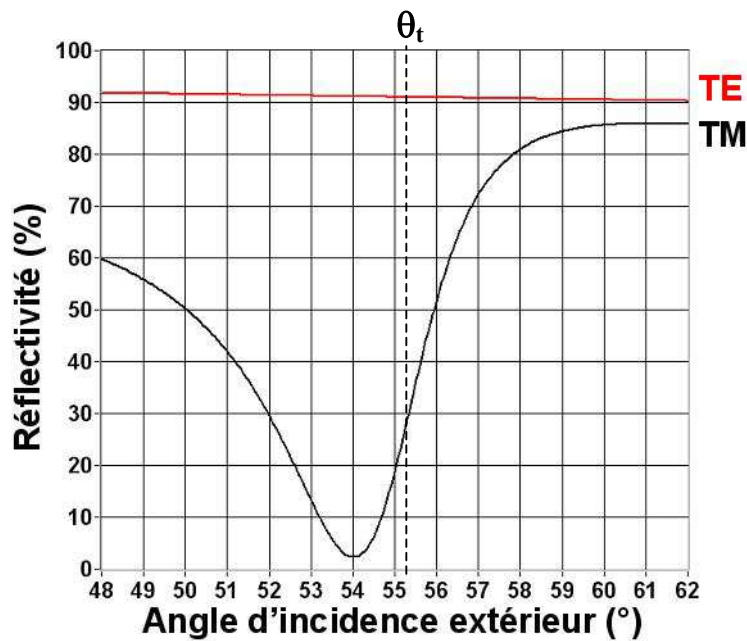


Figure 69 : Réflectivité en fonction de l'angle d'incidence extérieur de l'interface or/eau à $\lambda = 650 \text{ nm}$ pour un prisme en SF11 d'angle au sommet $A_p = 32^\circ$. La polarisation TE (TM) est représentée en rouge (noir). L'angle θ_t représente l'angle de travail en cinétique. Seuls ont été représentés les angles atteignables avec le système afocal décrit plus haut.

Le choix de la caméra CCD est important pour une quantification précise des interactions. Une caméra CCD est toujours accompagnée d'une carte d'acquisition pour exploiter l'image obtenue sur un ordinateur personnel. La caméra peut être analogique et, dans ce cas, la conversion analogique/numérique se fait au niveau de la carte d'acquisition ou numérique, ce qui veut dire que le signal sortant de la caméra est déjà numérisé. Le système (caméra + carte) va convertir le nombre de photons reçu par chaque pixel durant une exposition en niveaux de gris. Selon les caméras, la conversion se fait sur 256, 4 096 ou 65 536 niveaux, ce qui correspond, respectivement, à 8, 12 ou 16 bits. Notre choix s'est porté sur une **caméra 12 bits non refroidie** (Pixelfly de chez Photonlines [114]) pour plusieurs raisons. Tout d'abord, contrairement aux caméras 8 bits, dont la plupart est destinée à la visualisation d'images sur un écran, cette caméra 12 bits est avant tout destinée à une utilisation scientifique, c'est-à-dire à une quantification des images mesurées. Cela se traduit par une très bonne linéarité de la réponse en niveaux de gris en fonction de l'intensité incidente (Figure 70). De plus, 12 bits correspondent à 4096 niveaux de gris, ce qui va être beaucoup plus précis que les 256 niveaux habituels.

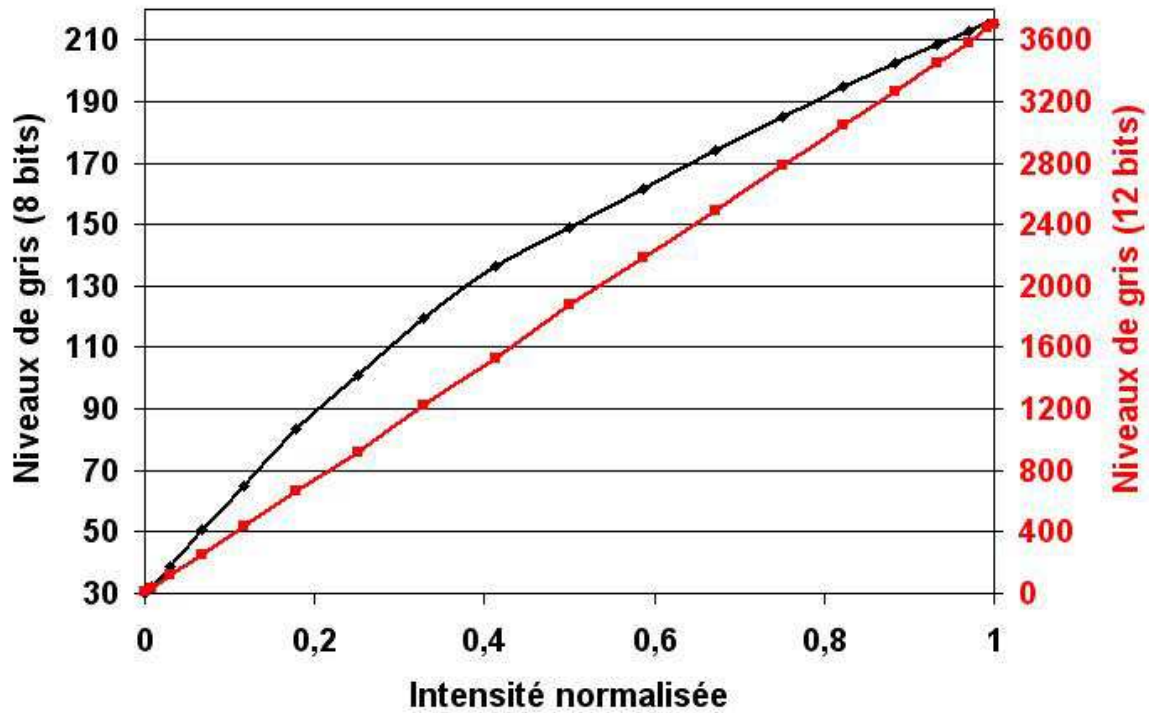


Figure 70 : Comparaison de la linéarité de la réponse d'une caméra 8 bits « de visualisation » et d'une caméra 12 bits « scientifique ».

Avant de justifier l'utilisation d'une caméra non refroidie, nous allons rappeler les différentes sources de bruit intervenant lors de l'utilisation d'une caméra CCD. Le bruit total sur une mesure peut être décomposé en bruit de photons (dû au signal lui-même), bruit thermique (dû à la matrice CCD) et bruit de lecture (dû à l'électronique).

$$B_{total} = \sqrt{P \cdot Q_e \cdot t + D \cdot t + N_r^2} \quad (\text{II-10})$$

avec P, le flux de photons incident sur la CCD (photons/pix/s), Q_e , le rendement quantique de la CCD, t, le temps d'intégration (s), D, le courant d'obscurité (e-/pix/s) et N_r , le bruit de lecture.

- **Bruit de photon** ($\sqrt{P \cdot Q_e \cdot t}$) : bruit intrinsèque à la source observée (ne dépend pas de l'instrument) égal à la racine carrée du nombre de photons reçus.
- **Bruit de lecture** (N_r) : bruit dû à l'efficacité du transfert de charges, qui intervient à chaque mesure, et qui est généralement compris entre 10 et 100 e-/pixel.

- **Bruit thermique** ($\sqrt{D \cdot t}$) ou **Courant d'obscurité** [115] : Bruit dû au nombre d'électrons générés spontanément durant la pose et la lecture, proportionnel au temps de pose, généralement compris entre 1 et 100 e/s à 20°C. Ce courant d'obscurité est le résultat d'imperfections ou d'impuretés dans le silicium. Ces sites induisent des états électroniques dans la bande interdite qui vont agir comme des marches entre la bande de valence et la bande de conduction du semi-conducteur, fournissant un chemin aux électrons de valence pour s'échapper dans la bande de conduction. Cette fuite va alors s'ajouter au signal mesuré sur le pixel. La génération du courant d'obscurité est un processus thermique (d'où l'appellation bruit thermique) où les électrons utilisent l'énergie thermique pour accéder à un état intermédiaire d'où ils vont être émis dans la bande de conduction. Pour cette raison, la manière la plus efficace de réduire le courant d'obscurité est de refroidir la CCD, ce qui va empêcher les électrons d'atteindre cet état intermédiaire. Ce bruit est divisé par 2 chaque fois que la caméra est refroidie de 6°.

D'autres sources possibles de bruit comme les fluctuations d'intensité de la source (limitées par une alimentation stabilisée) ou les fluctuations de la température ambiante influent aussi sur le signal mesuré.

La mesure des variations de réflectivité durant les interactions nécessite la mesure d'une grandeur de référence (voir la partie II.3.1). La grandeur choisie dans notre cas est la réflectivité en polarisation TE de la couche d'or. Le plasmon de surface n'étant excité qu'en mode TM, la réflectivité TE ne dépend pas des espèces déposées sur la lame d'or et constitue donc une bonne référence. Sachant que $R_{TE} \approx 90\%$ et que, dans les conditions habituelles, nous mesurons des variations de réflectivité autour de 25 % (voir Figure 69), si nous voulons utiliser toute la dynamique de la caméra, il faut que les 90 % de réflectivité créent un signal d'environ 4 000 niveaux de gris. Ce réglage s'effectue en choisissant judicieusement le temps d'intégration d'une image et en contrôlant sur l'histogramme des images acquises que nous sommes proches de la saturation sans l'atteindre. La caméra choisie permet une lecture des pixels par quatre en mode binning 2x2, chaque groupe mesurant $13,4 \times 13,4 \mu\text{m}$ et ayant une capacité de 60 000 électrons. Un temps d'acquisition d'environ 5 ms va générer ces 60 000 électrons par pixel dans le cadre de la mesure de la réflectivité TE. Nous allons pouvoir déduire de ces informations les différentes composantes du bruit total sur chaque pixel lors de la mesure des cinétiques d'interaction ($R_{TM} \approx 25\%$) :

$$\begin{aligned}
B_{\text{photon}} &= \sqrt{60000 \cdot \frac{25}{90}} \approx 130e^- \\
B_{\text{thermique}} &= \sqrt{D \cdot t} = \sqrt{3 \cdot 5 \cdot 10^{-3}} \approx 0,1e^- \\
10e^- &< B_{\text{lecture}} < 17e^-
\end{aligned} \tag{II-11}$$

L'équation (II-11) nous montre clairement que le bruit thermique est négligeable devant le bruit de photon. Dans un tel système où le flux incident est suffisamment élevé pour utiliser des temps d'acquisition très court, le bruit est essentiellement déterminé par le bruit de photon et le fait de refroidir la caméra n'apporte alors aucun gain en sensibilité.

Sachant que 60 000 e^- représentent 4096 niveaux, le bruit moyen de la caméra, dans les conditions d'utilisation en cinétique, vaut 9 niveaux de gris par pixel. Sur chaque plot fonctionnalisé, le bruit va varier selon la racine carrée du nombre de pixels et du nombre d'images moyennées pour faire un calcul de réflectivité. Une mesure expérimentale du bruit de la caméra seule nous montre que le bruit par plot suit bien cette loi mais jusqu'à une certaine valeur seulement (voir Annexe 5). Pour un plot imagé sur 25 pixels ($\approx 80 \mu\text{m}$ de diamètre) et dont chaque valeur de réflectivité est calculée à partir de 25 images acquises à la suite, le bruit moyen vaut 0,9 niveaux de gris. Si nous augmentons le nombre d'acquisitions ou la taille des plots, le bruit ne diminue plus. Dans les conditions habituelles d'utilisation, cela correspond à un bruit dû au système de détection de $\pm 0,02 \%$ de variation de réflectivité sur chaque plot. Cette valeur correspond à la sensibilité maximale du système, c'est-à-dire à un seuil de détection de 4 pg/mm^2 ($0,9 \text{ fmol/mm}^2$ pour un brin d'ADN de 15 bases ou un changement d'indice de la solution couvrante de $\Delta n = 8 \cdot 10^{-6}$).

II.2.6. Récapitulatif

Dans cette partie, nous avons présenté les différents critères permettant de définir les éléments constitutifs du dispositif expérimental d'imagerie SPR : la source, le balayage angulaire, la fluidique, le prisme, le système optique d'imagerie et la caméra. En résumé, notre système est composé d'une diode LED ($\lambda = 650 \text{ nm}$, $\Delta\lambda = 18 \text{ nm}$) dont le faisceau est collimaté par deux objectifs de microscope (divergence résiduelle $2 \cdot \Delta\alpha = 4 \text{ mrad}$). Ce faisceau, de diamètre $\phi = 10 \text{ mm}$ est dirigé vers un miroir plan monté sur une rotation motorisée dont la précision de positionnement vaut $\pm 0,01^\circ$ avec une répétabilité de $\pm 0,001^\circ$. Le miroir est conjugué avec la surface sensible sur la base du prisme via un

système afocal de grandissement transversal $G_y = -1$ composé de deux doublets achromatiques ($\phi = 30$ mm, $f^* = 60$ mm) et permet de faire varier l'angle d'incidence de $\pm 7^\circ$ autour d'une position centrale correspondant à l'angle de résonance SPR entre l'or et l'eau. Ensuite, le prisme en SF11, de largeur 12 mm et d'angle au sommet $A_p = 32^\circ$ a été conçu pour que l'imagerie de la surface sensible puisse se faire simplement par un système optique afocal, identique à celui décrit précédemment, sur la matrice de la caméra CCD 12 bits de dimension $8,4 \times 6,8$ mm². Cela suffit pour détecter simultanément tous les capteurs déposés sur une zone de 5×5 mm², placés au contact d'une cuve en téflon de diamètre intérieur $\phi_{\text{int}} = 8$ mm et de volume $V = 15$ μ L. Pour finir, l'injection des produits se fait au moyen d'une pompe péristaltique et d'une vanne d'injection à boucle centrale et un ordinateur permet le contrôle des différents paramètres de l'expérience, comme la position du miroir, seule partie mobile du montage, ainsi que l'analyse en temps réel des résultats (voir partie suivante). Ce montage est schématisé dans la figure ci-dessous.

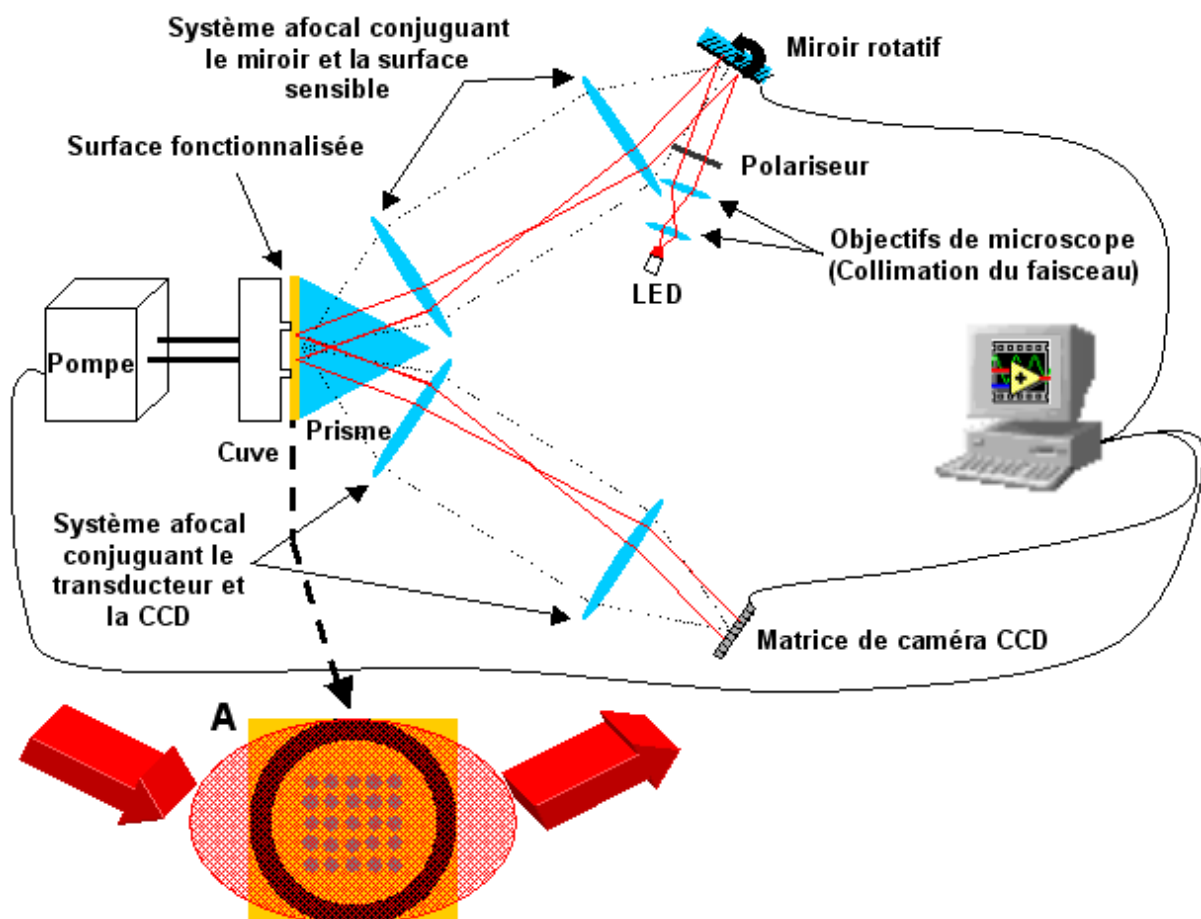


Figure 71 : Montage optique d'imagerie des plasmons de surface développé au laboratoire. Un faisceau rouge collimaté et polarisé TM illumine en entier la surface sensible délimitée par la cuve en Téflon, comme illustré dans le plan de coupe (A).

II.3. AUTOMATISATION ET TRAITEMENT DES DONNEES

Dans la partie précédente, nous avons construit un banc de mesure. Mais, son utilisation pratique nécessite une automatisation de l'acquisition des mesures et de leur traitement. En effet, pour l'instant, notre banc de mesure ne fait qu'acquérir des images dont la valeur de chaque pixel est proportionnelle à l'intensité reçue par le pixel correspondant de la caméra CCD. Pour une bonne interprétation de ces mesures, il nous faut les convertir en réflectivité, puis, par une modélisation adéquate, en quantité de matière déposée par unité de surface. Afin de profiter de l'avantage de mesure en temps réel de la SPR, il nous faut aussi développer une procédure d'étude des variations temporelles de la réflectivité pour caractériser les interactions biomoléculaires étudiées (calcul d'affinité). Enfin, nous terminerons cette partie par une explication simplifiée des différents algorithmes développés pour automatiser le suivi en temps réel de ces interactions et leur interprétation.

II.3.1. Caractérisation des lames

La mesure de la réflectivité de notre capteur en fonction de l'angle d'incidence permet d'en déduire les épaisseurs et les indices de réfraction des différentes couches qui le compose. Cette composition va nous donner un moyen, expliqué par la suite, de calculer la sensibilité réelle de notre capteur et donc de calculer les taux de recouvrement. Après avoir expliqué comment nous convertissons les niveaux de gris, issus des différents pixels de la caméra, en réflectivité, nous allons illustrer la caractérisation de la composition de notre capteur par un exemple réel.

II.3.1.1. Conversion des niveaux de gris en variation de réflectivité

Puisque nous avons vu que la réponse de la caméra CCD en fonction de l'intensité incidente est linéaire, il suffit d'acquérir deux images correspondant à deux réflectivités connues pour pouvoir, par une simple règle de trois, convertir les niveaux de gris de chaque pixel de la caméra en réflectivité.

La première image s'impose d'elle-même, c'est l'image acquise lorsque la diode LED, source lumineuse du montage, n'éclaire ni le prisme ni la caméra. Cette image, tenant compte

des sources éventuelles de lumière parasite est caractéristique d'une intensité réfléchie nulle. Ensuite, la seconde image ne doit pas dépendre de ce qui se trouve derrière la couche d'or. Il faut, pour cela, que les conditions de résonance de plasmon de surface ne soient plus remplies. La réflectivité ne dépend alors plus que de l'indice du prisme et des couches minces métalliques (indice et épaisseur du chrome et de l'or). Dans ces conditions, pour la même plage angulaire d'incidence autour de l'angle de résonance des plasmons de surface, nous sommes en réflexion totale. Cette image peut être obtenue en air [44], avant l'injection du liquide, en polarisation TM ou TE, ou, après injection du liquide en polarisation TE et va donc correspondre à une réflectivité élevée qui peut se calculer de manière théorique.

Pour chaque pixel d'une image acquise lors de l'expérience, nous pouvons alors convertir les niveaux de gris mesurés en réflectivité grâce à la relation suivante :

$$R_{Prisme,TM}(t) = \frac{(Niv_{TM}(t) - Niv_0) \cdot R_{Prisme,TE}}{(Niv_{TE} - Niv_0)} \quad (II-12)$$

avec $Niv_{TM}(t)$ le signal acquis par la caméra au cours de l'expérience, Niv_0 et Niv_{TE} les niveaux de gris de référence correspondant respectivement à la réflectivité nulle et à la réflectivité totale et $R_{Prisme,TE}$ la réflectivité théorique du prisme recouvert des couches minces métalliques.

Dans l'équation (II-12), ce que nous appelons R_{Prisme} correspond à la réflectivité totale du prisme qui tient compte des coefficients de transmission sur les faces d'entrée et de sortie du prisme comme illustré dans la Figure 72.

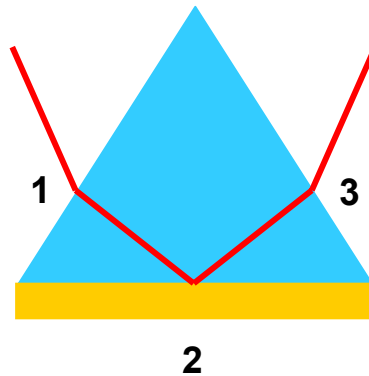


Figure 72 : Décomposition par interface de la réflectivité du prisme.

$$R_{Prisme} = T_1 \cdot R_2 \cdot T_3 = T_1^2 \cdot R.$$

Si nous voulons ne tenir compte que de la réflectivité au niveau de l'interface métal/diélectrique comme dans la partie I.2, l'équation (II-12) devient alors :

$$R_{TM}(t) = \frac{(Niv_{TM}(t) - Niv_0) \cdot R_{TE} \cdot T_{1,TE}^2}{(Niv_{TE} - Niv_0) \cdot T_{1,TM}^2} \quad (II-13)$$

avec R la réflectivité de la surface du prisme recouverte d'or et T_1 la transmission de la face d'entrée du prisme. Ces coefficients peuvent être facilement calculés grâce aux formules de l'Annexe 2.

Dorénavant lorsque nous parlerons de mesure de réflectivité lors d'une expérience, nous ferons référence à des grandeurs déduites des données brutes en niveaux de gris par l'équation (II-13).

II.3.1.2. Ajustement des courbes de réflectivité en fonction de l'incidence

La première étape d'une expérience d'imagerie SPR consiste en la mesure de la réflectivité de la couche métallique en fonction de l'angle d'incidence. Cette mesure sert tout d'abord à positionner le miroir à l'angle de travail en cinétique (I.2.4.1) mais va aussi servir à caractériser les indices et épaisseurs de la couche de chrome et de la couche d'or ainsi que l'indice du milieu couvrant. En supposant l'indice du prisme connu à une longueur d'onde donnée (coefficients de Sellmeier de l'Annexe 4), cela nous donne 7 paramètres à déterminer (2 indices de réfraction décomposés en partie réelle et partie imaginaire, 2 épaisseurs et l'indice, réel, du milieu couvrant) quand la lame d'or n'est pas fonctionnalisée, ce à quoi il faut rajouter 3 paramètres par couche biologique supplémentaire.

Afin d'illustrer le principe de la détermination de ces paramètres, nous allons étudier un exemple précis. Nous avons mesuré sur un banc SPR monocapteur, du type décrit dans la Figure 17 (page 44) fonctionnant avec un laser He-Ne, la réflectivité en fonction de l'angle d'incidence de la surface d'un prisme en SF11 semblable à ceux que nous utilisons habituellement pour nos expériences. La base de ce prisme est recouverte d'une couche de chrome de quelques nanomètres et d'une couche d'or d'environ 50 nanomètres. Sur la Figure 73, sont représentés les points de mesure en rouge et leur ajustement en noir (recherche des meilleurs paramètres par une procédure Matlab que nous avons développé). Cette courbe de réflectivité peut être divisée en trois parties distinctes notées 1,2 et 3 sur cette même figure.

La première partie (1), située autour de l'angle de réfraction limite θ_c , va permettre de retrouver l'indice de réfraction du milieu couvrant car cet angle ne dépend que des milieux extérieurs (le prisme d'indice connu et le milieu couvrant). D'après la définition de l'angle de réfraction limite (Annexe 2), $\theta_{c,i} = \text{asin}(n_c/n_p)$ et la relation entre θ_c et θ_i de l'équation (II-1), nous obtenons la relation suivante qui donne l'indice du milieu couvrant n_c en fonction de l'indice n_p et de l'angle au sommet A_p du prisme et de l'angle d'incidence externe de réfraction limite $\theta_{c,e}$.

$$n_c = \sqrt{n_p^2 - \sin^2\left(\theta_{c,e} - \frac{A_p}{2}\right)} \cdot \cos\left(\frac{A_p}{2}\right) - \sin\left(\theta_{c,e} - \frac{A_p}{2}\right) \cdot \sin\left(\frac{A_p}{2}\right) \quad (\text{II-14})$$

A.N. : $\theta_{c,e} = 65,6^\circ$ (Figure 73), $n_p = 1,7786$, $A_p = 32^\circ \Rightarrow n_c = 1,3352$.

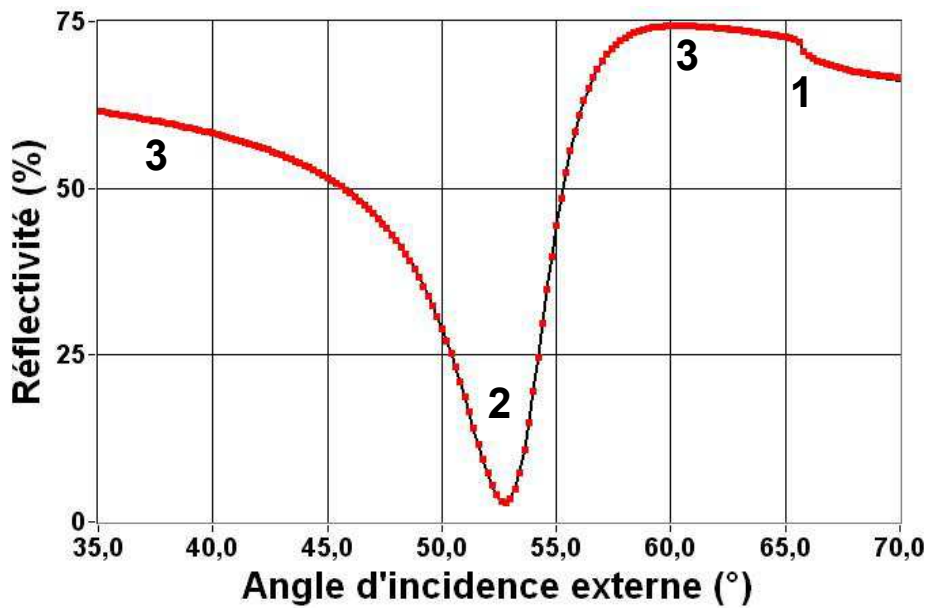


Figure 73 : Réflectivité, en polarisation TM et pour une longueur d'onde $\lambda = 632,8 \text{ nm}$, de la base d'un prisme en SF11 ($n = 1,7786$) recouvert de chrome et d'or en contact avec de l'eau. Les points rouges indiquent les mesures. La ligne noire indique l'ajustement obtenu par calcul de la réflectivité d'un empilement de couches minces.

La seconde partie (2), située autour de l'angle de résonance des plasmons de surface θ_{SPR} , va nous permettre de déterminer les 3 paramètres liés à la couche d'or puisque la largeur du pic d'absorption et sa position angulaire dépendent des indices réels et imaginaires de l'or

tandis que la réflectivité à l'angle de résonance dépend de l'épaisseur de métal. Tilkens *et al.* [116] ont montré que, dans le cas d'un système à 3 couches (prisme, or et liquide), lorsque la réflectivité est mesurée sur une plage angulaire suffisamment importante, c'est-à-dire en incluant les plateaux de part et d'autre du pic d'absorption, il n'y a qu'une seule combinaison d'indice (réel et imaginaire) et d'épaisseur qui permet d'ajuster la courbe mesurée. Nous ne sommes pas tout à fait dans cette configuration puisque nous avons besoin d'une couche ultramince de chrome pour permettre une bonne adhésion de l'or. Malgré tout, nous pouvons, comme nous allons le voir par la suite, déterminer sans ambiguïté l'indice de la couche d'or alors que son épaisseur va dépendre de celle de la couche de chrome.

Enfin, la troisième partie (3), comprenant les incidences en réflexion totale en dehors du pic d'absorption va permettre de déterminer l'épaisseur optique de la couche de chrome. Malheureusement, la mesure de la réflectivité en fonction de l'angle d'incidence ne permet pas de différencier précisément l'indice de réfraction et l'épaisseur de la couche de chrome. En effet, après plusieurs essais d'ajustement des mesures représentées sur la Figure 73 en partant de valeurs initiales différentes, nous avons obtenu des résultats qui, bien que se superposant quasi parfaitement avec ces mesures, donnent des indices et des épaisseurs de chrome très différentes. Afin d'illustrer cette dispersion, le Tableau 4 montre les résultats obtenus en supposant différentes épaisseurs de chrome.

PARAMETRES			RESULTATS					
n_p	n_c	$e_{Cr} (\text{\AA})$	η_{Cr}	κ_{Cr}	η_{Au}	κ_{Au}	$e_{Au} (\text{\AA})$	$10^3 \cdot eqm$
1,7786	1,3352	5	6,8023	4,5156	0,1985	3,5373	511,76	1,936
1,7786	1,3352	10	4,4593	3,5315	0,198	3,5371	507,39	1,893
1,7786	1,3352	13	3,6781	3,3459	0,1974	3,5368	504,25	1,853
1,7786	1,3352	15	3,2687	3,3011	0,197	3,5365	501,93	1,835
1,7786	1,3352	17	2,926	3,296	0,1965	3,5362	499,48	1,831
1,7786	1,3352	20	2,5203	3,321	0,1959	3,5359	495,75	1,846
1,7786	1,3352	25	2,0608	3,3634	0,195	3,5355	489,81	1,888
1,7786	1,3352	30	1,7638	3,3822	0,1944	3,5353	484,27	1,923
1,7786	1,3352	35	1,5566	3,3859	0,1939	3,5352	479	1,946
1,7786	1,3352	40	1,4034	3,3816	0,1935	3,5352	473,92	1,958
1,7786	1,3352	45	1,2853	3,3735	0,1931	3,5353	468,96	1,962

Tableau 4 : Résultats de l'ajustement des mesures illustrées dans la Figure 73 en fonction de l'épaisseur supposée de la couche de chrome ($n = \eta + i \cdot \kappa$, eqm : écart quadratique moyen entre les points mesurés et calculés).

Les différents ajustements obtenus dans le Tableau 4 confirment que l'indice de réfraction de l'or est bien déterminé quelle que soit l'épaisseur de chrome trouvée. L'épaisseur d'or varie quant à elle pour compenser les variations de réflectivité induites au niveau du pic d'absorption par les variations de l'épaisseur de chrome. L'étude de la valeur de l'écart quadratique moyen entre les points issus de la mesure et ceux issus du calcul en fonction de l'épaisseur de chrome montre tout de même un minimum permettant de supposer que l'épaisseur de chrome réelle dans le cas de notre exemple vaut $e_{Cr} = 1,7 \text{ nm}$ et celle de la couche d'or $e_{Au} = 50 \text{ nm}$. Les indices trouvés $n_{Cr} = 2,926 + i \cdot 3,296$ et $n_{Au} = 0,1965 + i \cdot 3,5362$ sont différents des indices que nous avons trouvés dans les articles de référence ($n_{Au} = 0,1741 + i \cdot 3,4197$ et $n_{Cr} = 3,1293 + i \cdot 3,3087$ à $\lambda = 632,8 \text{ nm}$) de l'Annexe 4 mais, ces références, valables dans le cas d'un matériau massif, ne donnent qu'une idée de l'indice de réfraction dans le cas d'une couche mince qui dépend des conditions de dépôt.

Pour finir, nous ferons remarquer que la détermination précise de l'épaisseur de la couche de chrome n'est pas fondamentale pour quantifier la sensibilité de notre biocapteur SPR. Ces différentes valeurs possibles, avec les différents paramètres ajustés leur correspondant, donnent non seulement quasiment rigoureusement la même courbe mais aussi la même sensibilité théorique en variation de réflectivité comme illustré dans le cas de $e_{Cr} = 1,5 \text{ nm}$ et de $e_{Cr} = 4 \text{ nm}$ dans la Figure 74.

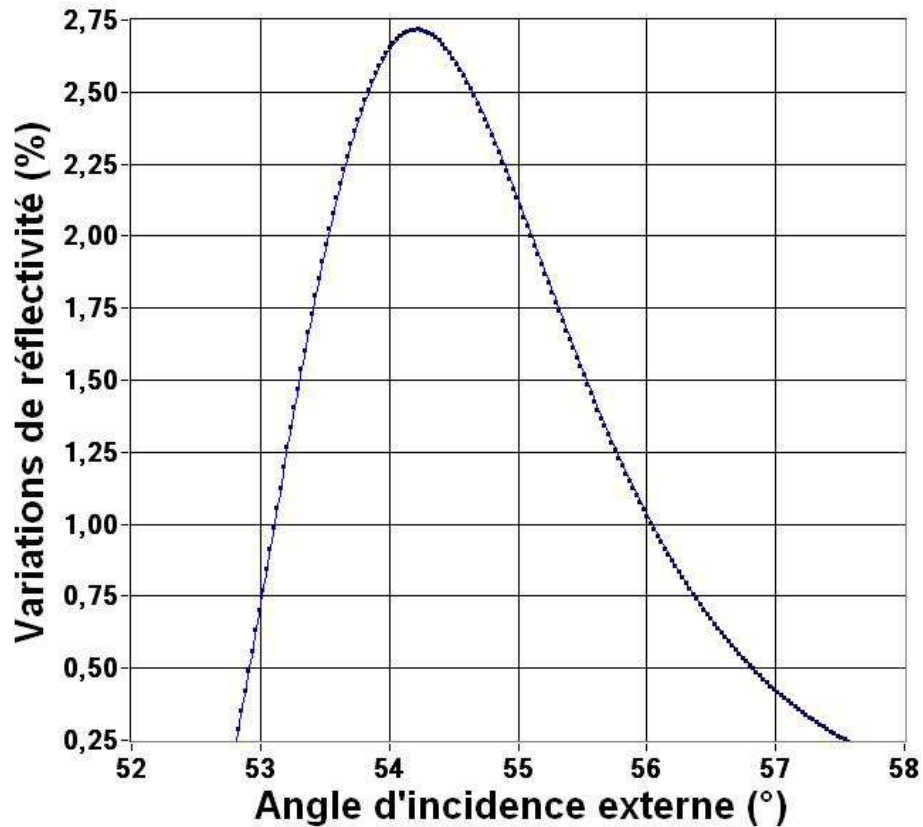


Figure 74 : Variation de réflectivité provoquée par l'adsorption d'une couche de 1 nm d'épaisseur d'ADN ($n_f = 1,41$) à l'interface entre un prisme en SF11 ($n_s = 1,7786$) recouvert d'une couche mince de chrome et d'une couche mince d'or dans un milieu liquide ($n_c = 1,3352$). La courbe bleue correspond à une épaisseur de chrome $e_{Cr} = 1,5$ nm et les points noirs à $e_{Cr} = 4$ nm. Les autres valeurs d'indice et d'épaisseur sont issues du Tableau 2.

Pour l'instant, cette caractérisation ne peut se faire pour l'instant que sur le monocapteur avec le laser He-Ne pour plusieurs raisons. L'excursion angulaire est plus importante et inclut l'angle de réfraction limite, ce qui n'est pas le cas sur notre montage d'imagerie SPR, ce qui permet d'établir les différents paramètres des couches avec plus de précision. De plus, le banc d'imagerie SPR, illuminé par une diode LED donne des courbes de réflectivité en fonction de l'angle d'incidence que nous ne pouvons ajuster sans tenir compte de la dispersion des métaux, ce qui n'est pas pris en compte à ce jour par la procédure Matlab développée durant la thèse.

II.3.2. Quantification des prises

Afin de pouvoir quantifier une interaction biomoléculaire, il est important de pouvoir passer de la grandeur optique mesurée à une grandeur biologique caractéristique de cette interaction. Cela constitue l'opération inverse de la transduction effectuée par le biocapteur SPR qui avait transformé la grandeur d'intérêt (biologique) en grandeur mesurable (optique). Les variations de réflectivité mesurée étant liées aux variations d'indice de réfraction et donc, de manière indirecte, aux changements de concentrations au voisinage de l'interface, nous allons tout naturellement convertir ces variations en quantité de matière déposée par unité de surface sur le transducteur, grandeur appelée Γ , le taux de recouvrement surfacique.

II.3.2.1. Conversion de ΔR en taux de recouvrement surfacique Γ

La conversion des variations de réflectivité en taux de recouvrement peut s'exprimer sous une forme assez complexe si nous appliquons rigoureusement les équations de Maxwell mais, Stenberg *et al.* [117] ont montré, par des simulations sans approximations basées sur ces équations de Maxwell que la réponse SPR varie de manière quasi-linéaire avec la concentration surfacique de protéines adsorbées et l'ont confirmé par des expériences avec des marqueurs radioactifs. Nous allons donc nous placer dans le régime où la réponse du capteur varie linéairement avec Γ . Cette approximation n'est valable que dans le cas où l'épaisseur de la couche formée est très petite devant la longueur de pénétration de l'onde évanescente dans le milieu couvrant ($e_b \ll L_z \approx 100$ nm) soit pour des épaisseurs de l'ordre de quelques nanomètres. Cela se traduit par la relation suivante [78] :

$$\Gamma = \frac{|n_c - n_b| \cdot e_b}{\partial n / \partial C} \quad (\text{II-15})$$

avec n_c , l'indice de réfraction du milieu couvrant, 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 $\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ (voir Annexe 4).

L'indice du milieu couvrant étant connu, l'indice et l'incrément d'indice de la molécule biologique étant des propriétés intrinsèques de cette molécule pouvant aussi être connues (soit par des mesures avec un réflectomètre d'Abbe par exemple ou dans des ouvrages de référence [69]), l'équation (II-15) lie le taux de recouvrement surfacique avec l'augmentation de l'épaisseur d'une couche biologique en formation. Dans le cas où les

propriétés optiques de la molécule biologique ne sont pas connues, une première approximation, avec $n_b = 1,41$ et $\partial n/\partial C = 0,19 \text{ cm}^3/\text{g}$ dans le cas d'oligonucléotides ou de protéines, donne un bon ordre de grandeur de Γ car l'incrément d'indice ne varie que très peu en fonction des protéines [118, 119].

Il ne nous reste maintenant plus qu'à trouver une relation, linéaire elle aussi pour de faibles épaisseurs, liant les variations de réflectivité à l'augmentation de l'épaisseur e_b du milieu biologique. Cette relation est obtenue par calibration du système de mesure. Cette calibration peut se faire, entre autres, par mesure de la réponse SPR en fonction du changement d'indice de réfraction global du milieu couvrant [48] ou par des simulations basées sur les courbes ajustées décrites dans la partie précédente.

- Changement d'indice de réfraction du milieu couvrant

Cette méthode consiste à injecter successivement dans la cellule d'interactions le tampon d'interaction puis un milieu liquide d'indice voisin ($\Delta n_c \approx 10^{-3}$) tel que le même tampon avec une dilution légèrement différente pour mesurer la réponse SPR induite par ce changement sur chaque plot. Ces deux solutions doivent être caractérisées précisément afin de connaître leur indice de réfraction à la longueur d'onde de travail. Pour une telle variation d'indice, la réponse (variation de réflectivité dans notre cas) est linéaire, ce qui nous permet de déduire la sensibilité SPR en fonction de l'indice du milieu couvrant que nous avons appelée $S_{P,R}$ dans le 1^{er} chapitre.

$$S_{P,R} = \frac{\Delta R_{Cal}}{n_{c,Cal} - n_c} \quad (\text{II-16})$$

avec ΔR_{Cal} la variation de réflectivité mesurée suite à l'injection du liquide de calibration d'indice de réfraction $n_{c,Cal}$ en remplacement du milieu couvrant d'indice n_c .

Cette grandeur $S_{P,R}$, mesurée sur chaque plot, va nous permettre de quantifier tout changement d'indice du milieu couvrant.

$$\Delta R = S_{P,R} \cdot (n - n_c) \quad (\text{II-17})$$

Nous devons maintenant convertir l'apparition, au cours de l'expérience, d'une couche biologique d'indice de réfraction n_b et d'épaisseur e_b en variation d'indice du milieu couvrant

pour utiliser cette calibration. Nous allons donc définir un indice effectif n_{eff} prenant en compte cette couche biologique ainsi que le milieu couvrant. Cet indice effectif va être calculé à partir d'une moyenne pondérée entre n_b et n_c . Logiquement, le poids de chaque indice va correspondre à l'intensité de l'onde évanescente à la distance donnée [48].

$$n_{eff} = \frac{1}{L_{Z_c}} \cdot \int_0^{\infty} n(z) \cdot \exp\left(-\frac{z}{L_{Z_c}}\right) \cdot dz \quad (II-18)$$

Sachant que $n(0 < z < e_b) = n_b$ et $n(e_b < z) = n_c$, nous obtenons :

$$n_{eff} = n_c + (n_b - n_c) \cdot \left[1 - \exp(-e_b/L_{Z_c})\right] \quad (II-19)$$

L'hypothèse initiale de l'approximation linéaire étant que $e_b \ll L_{Z_c}$, nous pouvons simplifier l'équation (II-19).

$$n_{eff} = n_c + \frac{(n_b - n_c) \cdot e_b}{L_{Z_c}} \quad (II-20)$$

La relation que nous cherchons à établir se déduit alors en combinant les équations (II-15), (II-17) et (II-20).

$$\Gamma = \frac{\Delta R \cdot L_{Z_c}}{S_{P,R} \cdot \partial n / \partial C} \quad (II-21)$$

Cette relation, très simple, va nous permettre de déduire le taux de recouvrement à partir des variations de réflectivité via trois paramètres. Le paramètre $S_{P,R}$ est obtenu par une mesure de calibration réalisable facilement ; le paramètre L_{Z_c} s'obtient grâce à la formule (I-12) et ne nécessite pas d'ajustement des courbes de réflectivité en fonction de l'angle d'incidence pour connaître l'indice de l'or car une précision de $\pm 10^{-2}$ sur cet indice ne change pas L_{Z_d} de plus de 1% ; enfin, le paramètre $\partial n / \partial C$ vaut $0,19 \text{ cm}^3/\text{g}$ pour toutes les protéines et les oligonucléotides comme indiqué précédemment.

- Simulations basées sur les ajustements des courbes de réflectivité

Une seconde méthode, qui peut être complémentaire à la précédente, pour déduire la valeur du taux de recouvrement surfacique Γ des mesures de variation de réflectivité consiste à ajuster les courbes de réflectivité en fonction de l'angle d'incidence obtenues sur chaque plot du biocapteur SPR en début d'expérience. Cet ajustement, décrit dans la partie II.3.1.2, détermine les indices et épaisseurs des différentes couches du capteur qui vont nous permettre de simuler numériquement un capteur SPR équivalent. Il suffit alors d'ajouter une couche de 1 nm d'épaisseur et de même indice n_b que la molécule biologique d'intérêt à ce capteur théorique et de calculer la nouvelle courbe de réflectivité. La différence de réflectivité $\Delta R(1 \text{ nm})$ entre les deux courbes à l'angle de travail en cinétique nous donne alors la sensibilité du biocapteur par nanomètre de couche biologique déposée.

Nous pouvons alors déduire directement la relation recherchée de l'équation (II-15).

$$\Gamma = \frac{|n_c - n_b| \cdot \Delta R}{\partial n / \partial C \cdot \Delta R(1 \text{ nm})} \quad (\text{II-22})$$

Cette relation, contrairement à l'équation (II-21), dépend de l'indice n_b du milieu biologique mais, cette dépendance reste assez faible car une surestimation de n_b va conduire dans la simulation à une surestimation de $\Delta R(1 \text{ nm})$ et, par voie de conséquence, à une sous-estimation de e_b (et vice-versa), ce qui globalement va compenser l'erreur introduite. Il reste que, pour pouvoir se servir de cette relation, les courbes de réflectivité en fonction de l'angle d'incidence au niveau de chaque plot doivent être ajustées, ce qui peut vite devenir laborieux.

Grâce à ces deux méthodes, utilisées indépendamment ou conjointement, nous pouvons maintenant convertir le signal mesuré en taux de recouvrement surfacique, c'est-à-dire que l'imagerie SPR permet de mesurer en temps réel la quantité de matière par unité de surface qui va se déposer sur chaque plot au cours de l'expérience.

Lorsqu'une expérience nécessite plusieurs étapes et que chaque étape est contrôlée par imagerie SPR, nous pouvons alors mesurer le taux de recouvrement pour chaque étape. Connaissant la masse molaire de chaque molécule injectée, nous pouvons en déduire le nombre de moles fixées par unité de surface à chaque étape, ce qui permet de calculer, par un simple rapport entre ces grandeurs, les rendements des interactions.

Par exemple, si le capteur est fonctionnalisé avec une espèce A, l'envoi d'une espèce B, connue pour interagir avec A, va se traduire par une certaine variation de réflectivité correspondant à un taux de recouvrement Γ_1 . Maintenant, si nous injectons l'espèce C, connue pour interagir avec B (mais sur un autre site de fixation que celui de l'interaction avec A), nous pouvons aussi en déduire le taux de recouvrement Γ_2 mais, de plus, nous pouvons alors aussi connaître le rendement ρ_2 de cette seconde interaction comme nous l'illustrerons dans le chapitre suivant.

$$\rho_2 = \frac{\Gamma_2 \cdot M_B}{\Gamma_1 \cdot M_C} \quad (\text{II-23})$$

avec M_B et M_C les masses molaires des espèces B et C respectivement.

Nous venons de voir différentes possibilités pour interpréter les réponses obtenues par notre banc d'imagerie SPR durant une expérience. Ces résultats peuvent être quantifiés et nous permettent d'obtenir le taux de recouvrement surfacique et le rendement de l'interaction, caractéristiques du résultat de l'interaction étudiée.

II.3.3. Etude des cinétiques

Les différentes quantifications détaillées dans la partie précédente ne tiennent pour l'instant pas compte de l'avantage de la possibilité de mesure en temps réel et donc d'étude de la dynamique des interactions. C'est cette étude de la dynamique que nous allons maintenant détailler.

II.3.3.1. Modèle théorique monovalent

Nous allons dans cette partie modéliser les données cinétiques afin de remonter à l'affinité entre deux molécules. Ce modèle suppose que les réactions mettent en jeu un ligand L et un analyte A qui vont interagir avec une stœchiométrie de un pour un [120].



avec k_{ass} la constante d'association de la réaction en $M^{-1}s^{-1}$ et k_{diss} la constante de dissociation de la réaction en s^{-1} .

Dans ces conditions, si la quantité de réactifs est connue, les données à l'équilibre peuvent être tracées selon un certain nombre d'algorithmes : quand un analyte A réagit avec un ligand L pour former un complexe AL, le taux de formation du complexe suit la loi suivante [118] :

$$\frac{d[AL]}{dt} = k_{ass} \cdot [A] \cdot [L] - k_{diss} \cdot [AL] \quad (II-25)$$

Dans le cas des biocapteurs, où une des deux espèces impliquées dans l'interaction est fixée sur une interface, le ligand correspond à ce que nous avons précédemment appelé la sonde et l'analyte à la cible. Plusieurs hypothèses simplifient cette formule : la proportionnalité entre concentration et réponse (voir les équations (II-21) et (II-22)), la concentration constante de A due à l'injection continue de réactifs en concentration suffisante pendant l'expérience et le fait que la concentration en ligand L est la différence entre la concentration totale de ligand et la concentration de ligands liés à un analyte.

$$\frac{dR}{dt} = k_{ass} \cdot C_i \cdot (R_{max} - R) - k_{diss} \cdot R \quad (II-26)$$

avec R la réponse du système, R_{max} la réponse correspondant à l'épuisement des ligands libres et C_i la concentration d'injection de l'analyte A.

- Analyse à l'équilibre

A l'équilibre, $\frac{dR}{dt}(t = \infty) = 0$ et $R = R_{eq}$. Soit $K_A = k_{ass} / k_{diss}$ la constante d'affinité entre L et A (en M^{-1}), l'équation (II-26) devient alors :

$$\frac{R_{eq}}{C_i} = K_A \cdot (R_{max} - R_{eq}) \quad (II-27)$$

La constante d'affinité K_A est alors la pente de la courbe R_{eq}/C_i en fonction de R_{eq} . Elle peut alors se mesurer en injectant différentes concentrations C_i d'analytes durant l'expérience. Les variations de R_{eq} avec cette concentration suivent une isotherme de Langmuir [121] que nous pouvons déduire de l'équation (II-27) :

$$R_{eq} = \frac{R_{max} \cdot C_i}{C_i + K_D} \quad (II-28)$$

avec $K_D = 1/K_A$ la constante de dissociation entre L et A (en M).

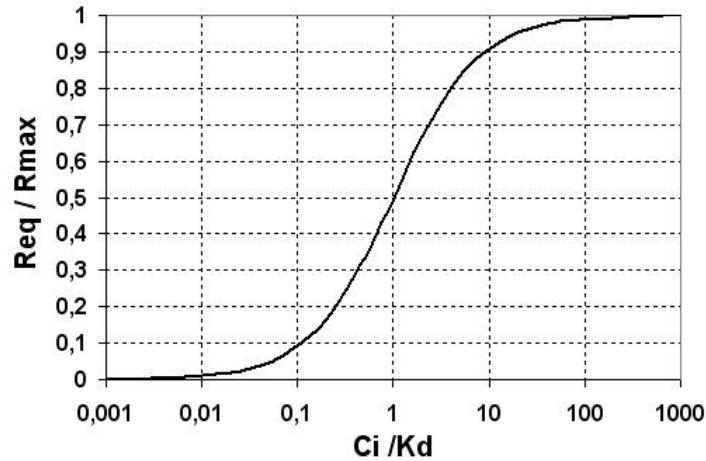


Figure 75 : Variations théoriques normalisées de la réponse à l'équilibre d'un biocapteur SPR en fonction de la concentration d'injection des analytes (normalisée par K_D).

La Figure 75 se décompose très nettement en trois parties :

- $C_i < 0,1 \cdot K_D$, la réponse à l'équilibre est quasi nulle car la concentration en analyte est trop faible, ce qui est difficile à détecter.
- $0,1 \cdot K_D < C_i < 10 \cdot K_D$, la réponse à l'équilibre varie linéairement avec la concentration en analyte.
- $10 \cdot K_D < C_i$, la réponse à l'équilibre vaut R_{max} , c'est la saturation de tous les ligands disponibles.

Il faut donc se limiter entre $0,1 \cdot K_D$ et $10 \cdot K_D$, domaine où les variations de C_i influenceront le plus le résultat de l'interaction. Pour des concentrations plus faibles, le signal ne sera pas détectable, tandis que pour des concentrations plus forte, le signal sera saturé et n'évoluera plus avec C_i . Un corollaire au choix de la gamme de concentration d'injection de l'analyte est qu'il est nécessaire d'avoir une idée préalable de la valeur de la constante d'affinité entre L et A pour pouvoir la mesurer dans de bonnes conditions.

- Analyse cinétique

Contrairement à l'analyse précédente, cette analyse est dynamique et nécessite une mesure en temps réel. En dehors de l'équilibre, l'équation (II-26) devient :

$$\frac{dR}{dt} = k_{ass} \cdot C_i \cdot R_{\max} - (k_{ass} \cdot C_i + k_{diss}) \cdot R \quad (II-29)$$

Ce modèle simple permet donc de prédire l'évolution temporelle de la réponse du système durant la phase d'injection de l'analyte (association) puis durant la phase de rinçage (dissociation) à partir de l'équation différentielle (II-29).

$$\begin{cases} R_a(t) = R_a(t_0) + (R_a(\infty) - R_a(t_0)) \cdot (1 - \exp[-k_{on} \cdot (t - t_0)]) & \text{(association)} \\ R_d(t) = R_d(\infty) + (R_d(t_1) - R_d(\infty)) \cdot (1 - \exp[-k_{off} \cdot (t - t_1)]) & \text{(dissociation)} \end{cases} \quad (II-30)$$

avec $k_{on} = k_{ass} \cdot C_i + k_{diss}$, la constante de montée de la réponse durant l'association et $k_{off} = k_{diss}$, la constante de descente de la réponse durant la dissociation, t_0 et t_1 indiquent respectivement le début de l'association et le début de la dissociation.

Nous pouvons simplifier cette formule en supposant qu'avant le début de l'association, la réponse est nulle ($R_a(t_0) = 0$) et que, si nous injectons l'analyte pendant un temps infini, nous arriverions à l'équilibre ($R_a(\infty) = R_{eq}$). De même, au bout d'un temps infini de dissociation, nous atteindrions un équilibre, ce qui signifie, d'après l'équation (II-26) avec $C_i = 0$, que $R_d(\infty) = 0$. D'où une formulation simplifiée de (II-30) :

$$\begin{cases} R_a(t) = R_{eq} \cdot (1 - \exp[-k_{on} \cdot (t - t_0)]) & \text{(association)} \\ R_d(t) = R_d(t_1) \cdot (1 - \exp[-k_{off} \cdot (t - t_1)]) & \text{(dissociation)} \end{cases} \quad (II-31)$$

Nous allons maintenant utiliser ce modèle pour déduire les constantes de l'interaction entre L et A à partir des courbes mesurées.

II.3.3.2. Ajustement des mesures en temps réel

D'après les équations (II-29) et (II-31), nous pouvons déduire 3 relations, décrivant la phase d'association, à ajuster :

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dR}{dt} = k_{on} \cdot R_{eq} - k_{on} \cdot R \\ \ln \left| \frac{dR}{dt} \right| = \ln(R_{eq} \cdot k_{on}) - k_{on} \cdot (t - t_0) \\ R = R_{eq} \cdot (1 - \exp[-k_{on} \cdot (t - t_0)]) \end{array} \right. \quad (II-32)$$

Les valeurs de R, mesurées en temps réel lors de l'expérience, sont entachées de bruit. Ce bruit, blanc, va voir sa composante haute fréquence amplifiée lors de la dérivation du signal. De même, les valeurs de cette dérivée étant très faibles, le bruit va de nouveau être amplifié lors de l'application du logarithme (asymptote verticale en zéro). Cette amplification du bruit va empêcher un bon ajustement linéaire des 2 premières équations de (II-32). Une solution à ce problème consiste en l'application d'un filtre passe-bas sur le signal mesuré R afin de couper les composantes haute fréquence du bruit tout en conservant le signal basse fréquence de l'interaction biologique. Dans la procédure Matlab que nous avons développée, nous utilisons un filtre de Butterworth de 3^{ème} ordre pour remplir ce rôle. Cette procédure, décrite dans l'algorithme ci-dessous (Figure 76), déduit k_{on} et R_{eq} des mesures par ces 3 ajustements différents et permet donc de vérifier la pertinence des résultats les uns par rapport aux autres.

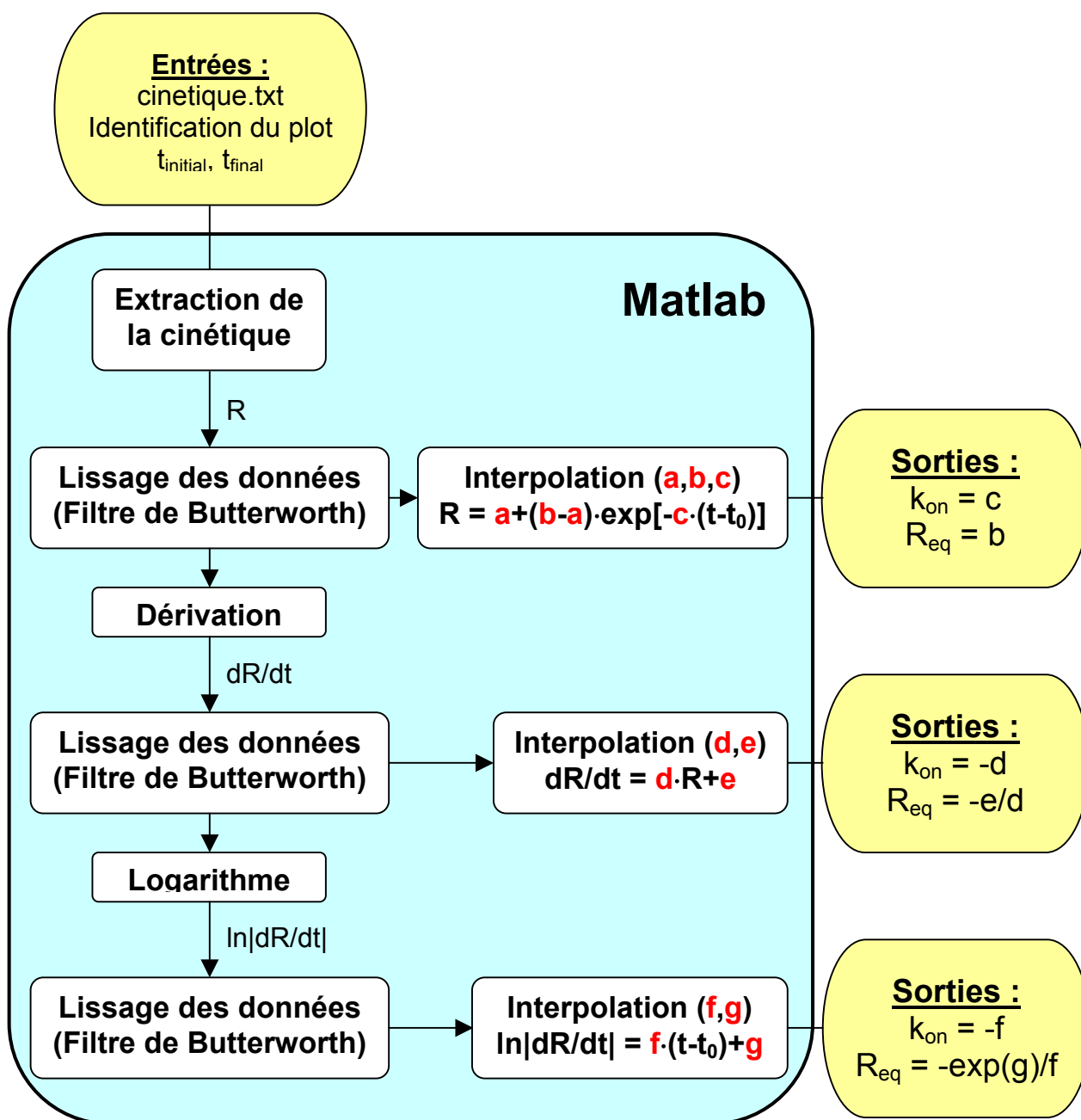


Figure 76 : Algorithme simplifié de la procédure Matlab développée en vue de déduire k_{on} et R_{eq} des données cinétiques acquises en temps réel.

En pratique, l'ajustement du logarithme de la dérivée reste assez aléatoire malgré les filtrages successifs des données, ce qui la rend assez inutile. Par contre, l'ajustement linéaire de la dérivée permet un contrôle visuel assez rapide de la pertinence du résultat. En effet, si la dérivée du signal ne varie pas linéairement avec R , cela se traduit visuellement par un coude

sur la droite et signifie soit que le modèle ne s'applique pas, soit que les bornes de l'intervalle d'ajustement (t_{initial} et t_{final}) ont été mal choisies.

II.3.3.3. Détermination des constantes d'affinité

- Détermination de K_A à partir de k_{on}

Ce problème se ramène de nouveau à un ajustement linéaire puisque $k_{\text{on}} = k_{\text{ass}} \cdot C_i + k_{\text{diss}}$ et $K_A = k_{\text{ass}} / k_{\text{diss}}$. Si nous utilisons plusieurs concentrations d'analyte, nous pouvons ainsi remonter théoriquement à k_{ass} et k_{diss} . Ces variations de concentration d'injection doivent se limiter entre $0,1 \cdot K_D$ et $10 \cdot K_D$, où les variations de C_i influenceront le plus le résultat de l'interaction. Pour des concentrations plus faibles, le signal ne sera pas détectable, tandis que pour des concentrations plus forte, le signal sera saturé et n'évoluera plus avec C_i (voir Figure 75). Mais, en pratique, k_{diss} ne peut être déterminé avec précision lorsqu'il est petit (ce qui arrive très souvent). Il faut alors mesurer la constante de dissociation k_{diss} en tampon durant l'étape de rinçage. L'algorithme décrit dans la Figure 76 fonctionne aussi pour cet ajustement. Les sorties de cet algorithme, correspondant à R_{eq} et k_{on} dans le cas de l'association, correspondront maintenant à $R_d(t_1)$ et k_{diss} dans le cas de la dissociation (selon les notations définies dans l'équation (II-31)).

Pour finir, nous calculons la constante d'affinité entre les deux molécules d'intérêt comme le rapport entre la pente de la droite $k_{\text{on}} = f(C_i)$ et la valeur moyenne de $k_{\text{off}} = f(C_i)$.

- Détermination de K_A à partir de R_{eq}

L'ajustment des courbes d'associations pour différentes concentrations d'injection d'analytes nous permet non seulement de déterminer k_{on} mais aussi R_{eq} . Cette valeur de la réponse du capteur à l'équilibre, fonction elle aussi de la concentration d'injection C_i , est directement liée à K_D (ou son inverse K_A) par la relation (II-28). L'ajustement des valeurs de R_{eq} en fonction de C_i (compris entre $0,1 \cdot K_D$ et $10 \cdot K_D$) par un isotherme de Langmuir ou l'ajustement linéaire de R_{eq}/C_i en fonction de R_{eq} (voir équation (II-27)) nous permet ainsi de remonter théoriquement à K_A et R_{max} , la réponse de saturation.

En résumé, nous avons globalement deux méthodes pour déterminer K_D , ces deux méthodes nécessitant l'injection de différentes concentrations bien choisies d'analytes. Une

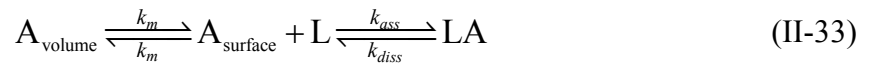
première grâce aux constantes de temps des exponentielles (k_{on} et k_{off}) déduites des mesures en temps réel, va nous donner K_D^{cin} par ajustement linéaire de ces valeurs en fonction de C_i tandis que la seconde, grâce aux réponses à l'équilibre déduites des mesures en temps réel, va nous donner K_D^{eq} par ajustement linéaire de $\frac{R_{eq}}{C_i} = f(R_{eq})$ ou par le tracé de l'isotherme de Langmuir. La possibilité de déterminer K_D par plusieurs méthodes doit alors nous inciter à vérifier la vraisemblance de nos résultats [121], tout d'abord en vérifiant que K_D^{eq} est bien voisin de $K_D^{cin} = \frac{k_{diss}}{k_{ass}}$, puis en vérifiant que la valeur de k_{diss} obtenue à partir de la régression linéaire de k_{on} en fonction de C_i correspond à celle de k_{diss} déterminée directement à partir de la courbe de dissociation.

II.3.3.4. Limitations du modèle

Le modèle que nous avons décrit dans la partie II.3.3.1, séduisant par sa simplicité, doit toutefois être utilisé avec précaution car il ne prend pas en compte les problèmes liés au transport de masse, aux changements de conformation, à l'encombrement stérique ou à la possibilité de modèles d'interaction plus complexes [122].

- Transport de masse [118]

Dans certains cas, le taux d'association mesuré lors d'une interaction peut refléter le transport de l'analyte vers la surface comme illustré par la Figure 77. La constante de transport de masse k_m dépend alors du flux ϕ d'injection de la solution, de la géométrie de la cellule d'interactions et du coefficient de diffusion des analytes et se traduit par une nouvelle formulation de l'interaction :



Sous des conditions de transport de masse, les valeurs apparentes de k_{ass} et de k_{diss} peuvent être réduites d'un large facteur (correspondant à la surestimation de la concentration locale en analytes près de la surface). Mais, ce facteur étant le même en association et en dissociation, le rapport de ces deux constantes reste donc, sous ces conditions, approximativement voisin de la vraie constante d'équilibre K_A .

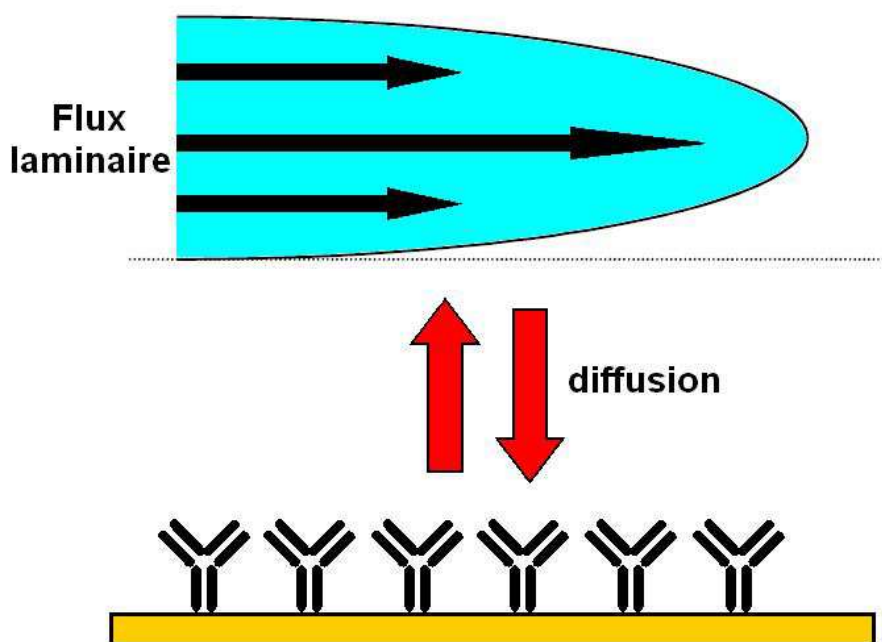


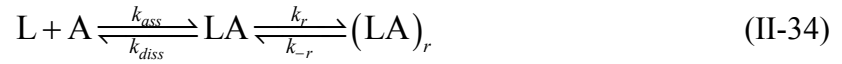
Figure 77 : Phénomène de transport de masse des analytes par diffusion du flux laminaire injecté par la pompe dans la cellule vers la surface d'or fonctionnalisée.

De plus, au fur et à mesure de la réaction, le nombre de sites libres sur les sondes disponibles pour l'interaction diminue et finalement, le taux d'association observé reflète alors de plus en plus le taux intrinsèque. Cette « constante » d'association va donc varier au cours de l'expérience, ce qui pose un problème pour l'ajustement des données par des mono-exponentielles (une seule constante de temps) et donc empêche une détermination fiable de la constante d'affinité.

Pour éviter les problèmes de transport de masse, la solution consiste d'abord à utiliser le débit le plus élevé possible durant l'expérience. Mais l'augmentation du flux d'analytes s'accompagne évidemment d'une augmentation de la consommation de produits biologiques, chers et/ou disponibles en petites quantités. Ensuite, il faut que la densité de sondes fixées soit la plus faible possible pour que le transport de masse ne limite pas la réaction. Mais, cette densité de sonde doit tout de même être suffisante pour que nous puissions détecter un signal fiable. Pour ces deux paramètres, il faut donc trouver un juste milieu qui va dépendre de l'application envisagée. Enfin, la géométrie de la cellule d'interactions doit être étudiée. Par exemple, une diminution de la hauteur de la cuve permet de limiter le temps de diffusion des cibles entre le flux laminaire et la surface du capteur (Figure 77).

- changement de conformation

Dans certains cas, après la fixation de l'analyte sur le ligand, le complexe formé peut changer de conformation (dans certaines interactions anticorps/antigène par exemple). La constante de temps de ce changement est supposée voisine dans les deux directions et, pour que l'analyte puisse se dissocier, le complexe doit d'abord revenir dans son premier état de liaison. Cela se traduit de nouveau par une nouvelle formulation de l'interaction :



Ce n'est pas immédiatement apparent qu'un changement de conformation puisse avoir un effet sur la réponse mesurée. En effet, la réponse que nous mesurons est proportionnelle à la masse déposée, or cette masse reste constante durant un changement de conformation. Ce changement perturbe la réponse de manière indirecte car l'existence de la seconde conformation va déplacer l'équilibre entre les analytes libres et ceux associés au ligand.

En utilisant le formalisme de la partie II.3.3.1, les deux réactions chimiques de la formule (II-34) peuvent se traduire par les équations différentielles suivantes où R, la réponse du système, est décomposée en R₁ pour la première conformation et en R₂ pour la seconde conformation du complexe formé.

$$\begin{cases} \frac{dR_1}{dt} = k_{ass} \cdot R_{max} \cdot C_i - (k_{ass} \cdot C_i + k_{diss} + k_r) \cdot R_1 + (k_{-r} - k_{ass} \cdot C_i) \cdot R_2 \\ \frac{dR_2}{dt} = k_r \cdot R_1 - k_{-r} \cdot R_2 \end{cases} \quad (II-35)$$

A l'équilibre, ces deux dérivées sont nulles et, sachant que R = R₁ + R₂, nous obtenons la relation suivante équivalente à l'équation (II-28) dans le cas du modèle monovalent simple :

$$R_{eq} = \frac{R_{max} \cdot C_i}{C_i + \frac{K_D \cdot k_{-r}}{k_r + k_{-r}}} \quad (II-36)$$

Par analogie avec la relation (II-28), nous allons appeler K_D' la constante de dissociation apparente lorsque la formation d'un complexe s'accompagne d'un changement de conformation.

$$K'_D = \frac{K_D \cdot k_{-r}}{k_r + k_{-r}} \quad (\text{II-37})$$

Lorsque nous utilisons le modèle simple monovalent théorique, nous allons donc surestimer la constante d'affinité entre le ligand et l'analyte (et inversement sous-estimer K_D).

- encombrement stérique et problèmes liés à la densité des sondes

Nous avons vu précédemment que, pour éviter que les problèmes de transport de masse influent sur la réaction, il faut que la densité de sondes fixées soit la plus faible possible tout en restant suffisante pour une détection fiable du signal. D'autres raisons s'ajoutent à cette nécessité d'une densité minimale.

Lorsque la densité des sondes est trop élevée, peuvent intervenir des problèmes d'encombrement stérique, c'est-à-dire que la grande proximité des sondes diminue l'accessibilité des cibles aux sites de fixation. Cela va conduire à une phase d'association plus lente. Le choix de la densité des sondes doit donc tenir compte a priori de l'encombrement du complexe sonde/cible et doit bien sûr ensuite faire l'objet d'une optimisation expérimentale.

Pendant la phase de rinçage, lorsque les cibles se dissocient des sondes, elles peuvent s'associer à nouveau avec une autre cible présente dans le voisinage, ce qui diminue la constante de dissociation apparente mesurée. Pour limiter cela, le débit utilisé pendant le rinçage doit être le plus élevé possible. De plus, selon le modèle monovalent théorique, la constante k_{off} mesurée durant le rinçage ne dépendant pas de la concentration d'injection C_i , il est judicieux de la mesurer après l'injection d'une concentration élevée ayant induit une réponse saturante [123]. Tous les sites disponibles des sondes étant occupés, la probabilité d'association des sondes venant de se dissocier sont alors très faibles et la constante mesurée est alors plus proche de la constante réelle.

- interactions complexes

Contrairement aux différentes limitations que nous avons déjà présentées qui n'empêchent pas d'utiliser le modèle simple monovalent, lors d'interactions complexes, il n'est plus possible d'ajuster la réponse du capteur par une simple exponentielle. Différents phénomènes peuvent être à l'origine de ces modèles plus complexes.

Tout d'abord, plusieurs ligands différents peuvent être fixés sur le même capteur (dans le cas d'anticorps polyclonaux par exemple) ou alors plusieurs sites de fixation d'un même ligand peuvent être également accessibles. Dans ce cas, il y aura autant d'affinités différentes qu'il y a de ligands ou de sites différents. La phase d'association est alors le résultat de différentes associations indépendantes. La cinétique reflète alors une somme d'interactions indépendantes avec des constantes différentes. Ensuite, un analyte peut avoir deux sites de fixation identiques (un anticorps par exemple). Lorsque l'un de ces deux sites s'est fixé sur un ligand, l'autre, toujours libre, peut alors se fixer avec un autre ligand dans le voisinage immédiat du premier complexe. La seconde interaction ne va pas se traduire par une augmentation de la réponse mais, comme pour le changement de conformation par un déplacement de l'équilibre. Ce type d'analytes bivalent va donc conduire à deux couples de constantes k_{ass} et k_{diss} différents pour ces deux étapes. Ce type d'interactions dites complexes reste très difficile à analyser en dehors du calcul de l'affinité dominante.

Bien entendu, toutes ces limitations ont été étudiées séparément mais peuvent intervenir simultanément pendant une interaction. En résumé, pour que nous puissions appliquer le modèle théorique monovalent, il faut une cellule d'interactions la moins profonde possible, un transducteur fonctionnalisé avec des sondes en densité suffisamment élevée pour avoir un signal et suffisamment faible pour limiter les effets du transport de masse et de l'encombrement stérique, injecter les sondes avec un débit le plus élevé possible compte tenu de l'augmentation de la consommation en produits biologiques que cela impose et injecter la solution de rinçage au débit maximal du système d'injection (pas de problème de consommation). Ces conditions initiales, déterminées a priori, doivent ensuite toutes faire l'objet d'une optimisation expérimentale pour chaque nouvelle application.

II.3.4. Automatisation

Une fois le banc d'imagerie SPR et les procédés de traitement des données mis au point, nous avons automatisé l'expérience sous Labview. Tout naturellement, cette automatisation s'est divisée en trois étapes : la mesure de la réflectivité en fonction de l'angle d'incidence, la mesure de la cinétique d'interaction et l'analyse des résultats.

Chaque partie de ce programme Labview est détaillée par la suite puis résumée sous la forme d'un algorithme simplifié. Enfin, l'interface résultante de ce programme développé au sein de notre équipe est représentée à la fin de cette partie.

Afin de simplifier la lecture de ces différents algorithmes, j'ai utilisé les conventions suivantes pour les différentes couleurs utilisées :

- Vert : procédure Labview,
- Bleu : procédure Matlab,
- Dégradé de rouge : opération manuelle de l'utilisateur,
- Jaune : principales entrées et sorties du programme,
- Blanc : opérations réalisées par le programme sans intervention de l'utilisateur.

Mais, avant de pouvoir effectuer tous ces calculs, il fallait tout d'abord reconnaître la matrice de plots déposée pour définir une zone d'intégration des valeurs mesurées sur chaque plot.

II.3.4.1. Reconnaissance des plots

Comme toutes les procédures décrites dans cette partie sur l'automatisation, celle-ci a été améliorée au fur et à mesure des besoins qui se dégageaient au cours des diverses expériences réalisées. Pour positionner les plots, nous pouvons utiliser les valeurs issue d'une expérience précédente sur le même capteur ou reconnaître les plots selon trois options différentes : grille, manuelle ou semi-automatique. Sur la page suivante est représenté un algorithme simplifié de la procédure utilisée pour reconnaître les plots déposés.

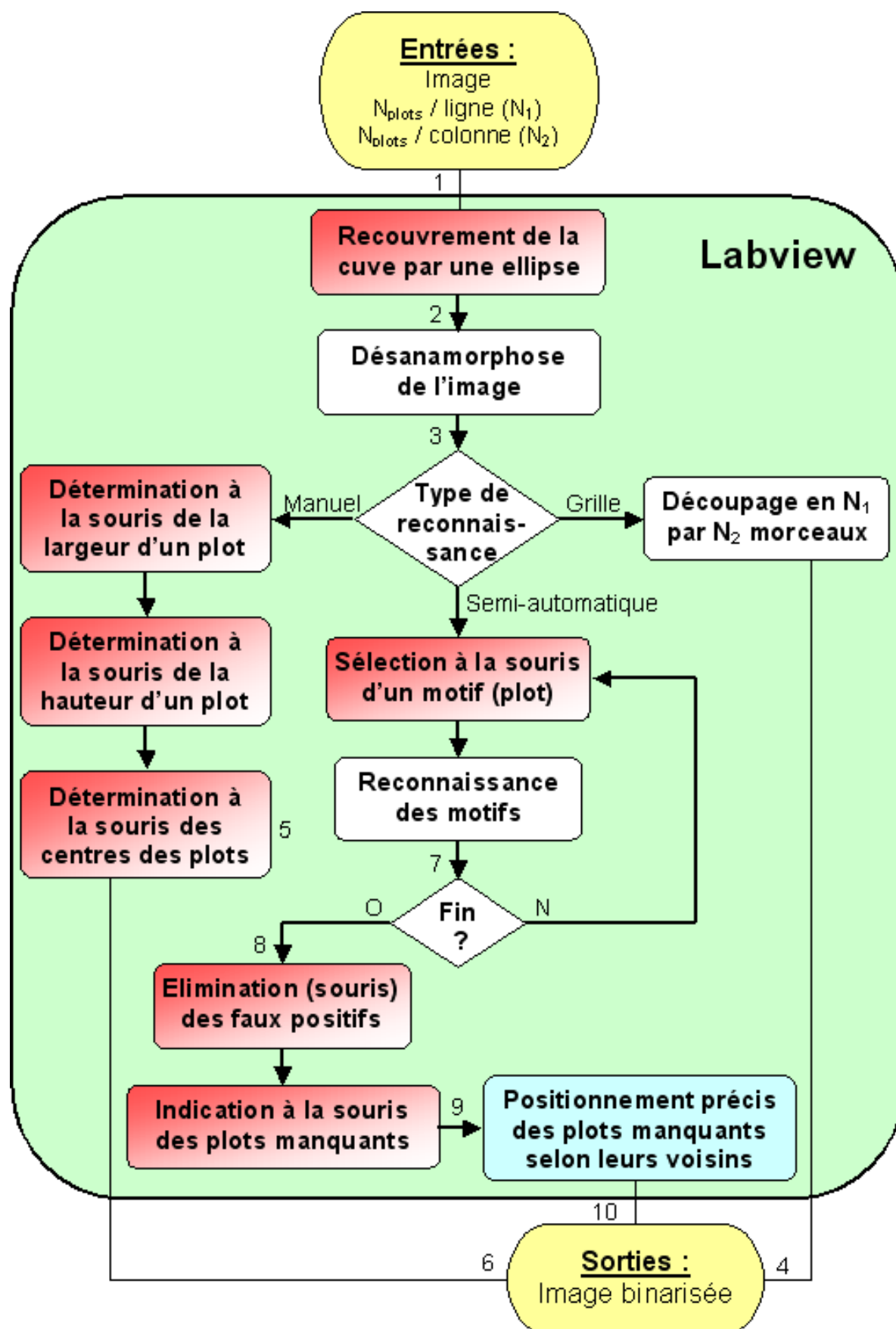


Figure 78 : Algorithme simplifié de la reconnaissance des plots.

Nous allons maintenant illustrer l'algorithme de reconnaissance des plots décrit dans la Figure 78 par un exemple : son application sur une image (Figure 79) issue d'une expérience réelle. Les nombres entre parenthèses sous chaque image correspondent aux nombres représentés sur l'organigramme de la Figure 78 et permettent d'illustrer la fonction des principales étapes de ce traitement.

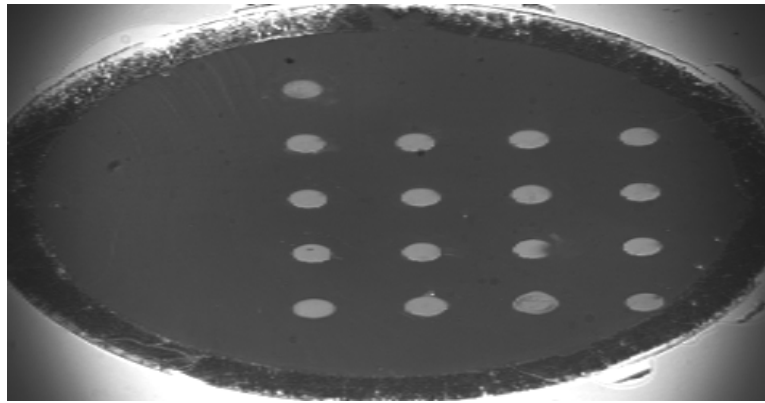


Figure 79 : Image non traitée acquise à l'angle de travail et en polarisation TM (1).

L'image ci-dessus, rectangulaire à cause du grandissement latéral du prisme différent selon la largeur et la hauteur, se décompose en plusieurs parties. Les quatre coins de l'image sont sombres car non éclairés. L'anneau noir marque la position de la cuve en téflon. A l'intérieur de cette cuve, la lame d'or est recouverte de liquide tandis qu'à l'extérieur, la lame d'or est au contact de l'air. A l'angle de travail en cinétique pour les plots, nous sommes très proche de l'angle de résonance des plasmons de surface pour l'interface or/liquide, ce qui explique le bon contraste entre les zones fonctionnalisées et l'or nu. Enfin, en dehors de la cuve, dans les parties éclairées, nous sommes très éloignés des conditions de résonance donc la réflectivité est totale.

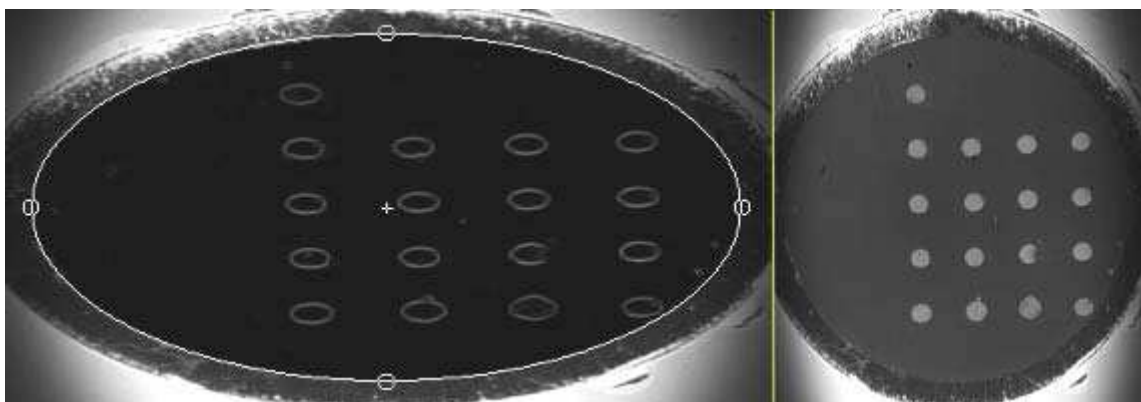


Figure 80 : Recouvrement de la cuve par une ellipse effectué par l'utilisateur (2) amenant à la désanamorphose de l'image grâce à la transformation de l'ellipse en cercle (3).

Puisque nous connaissons précisément les dimensions de la cellule d'interactions en téflon que nous utilisons sur le montage, le programme va utiliser le rapport entre les dimensions réelles et les dimensions sur l'image de la paroi intérieure de la cuve pour compenser les déformations dues au prisme. L'utilisateur va positionner et dimensionner une ellipse qui doit recouvrir le périmètre intérieur de la cuve et le programme désanamorphose l'image (Figure 80).

Cette opération préparatoire (et esthétique) étant terminée, nous allons maintenant passer à la reconnaissance des plots proprement-dite. Le logiciel développé propose trois possibilités nommées « grille », « manuel » et « semi-automatique » que nous allons maintenant détailler.

Avant de commencer la reconnaissance des plots, l'utilisateur entre dans le programme le nombre de plots par lignes (N_1) ainsi que le nombre de plots par colonnes (N_2) qu'il est censé retrouver sur l'image. Dans notre exemple, nous avons 17 plots et l'utilisateur a rentré les valeurs $N_1 = 4$ et $N_2 = 5$. Sur la première ligne, il n'y a physiquement qu'un seul plot, ce qui signifie qu'il y aura sur cette ligne trois zones de calcul de réflectivité sur la surface non fonctionnalisée, à savoir sur l'or.

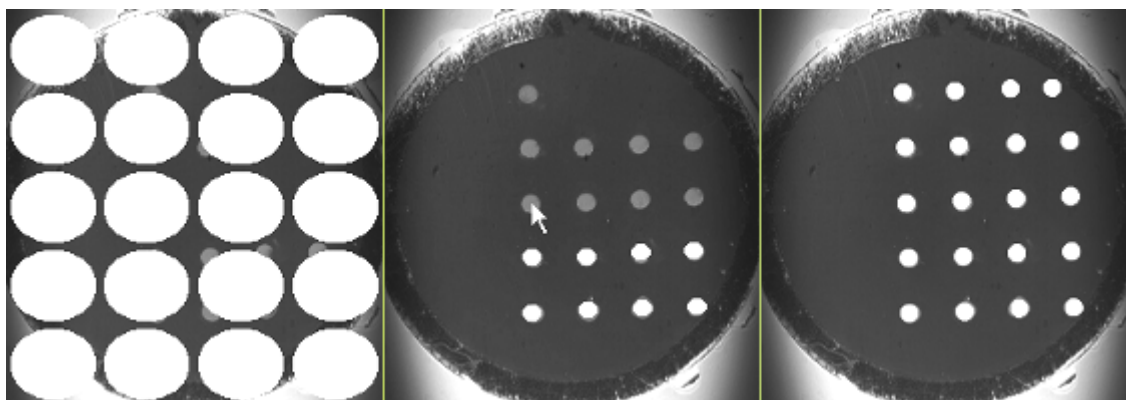


Figure 81 : De gauche à droite, découpage de l'image en grille (4) et positionnement par l'utilisateur des centres de chaque plot (5) amenant à l'image de droite (6).

L'option « grille » va tout simplement diviser l'image en 4 x 5 parties égales. Nous voyons sur la Figure 81 que cette opération est inappropriée pour notre exemple (inadéquation entre la position des zones d'intégration et celle des plots). Cette option est plutôt destinée à

l'étude d'un transducteur fonctionnalisé uniformément sur toute la surface. La localisation des zones d'intégration peut alors être choisie librement.

L'option « manuel », comme son nom l'indique, laisse l'utilisateur reconnaître lui-même les différents plots. Après avoir cliqué à la souris les extrémités horizontales d'un plot, puis ses extrémités verticales, l'utilisateur va cliquer chaque centre des plots présents sur la surface. Chaque clic va positionner sur l'image une ellipse (un quasi-cercle car les plots déposés sont censés être circulaires) en blanc (Figure 81). Cette option a l'énorme avantage de fonctionner quelle que soit la qualité de l'image et reste la solution préférentielle dans le cas de la reconnaissance d'un petit nombre de plots (inférieur à quelques dizaines). Par contre, la qualité du résultat dépend fortement de l'habileté de l'utilisateur et cette procédure devient vite rébarbative lorsque l'utilisateur doit positionner plusieurs centaines de plots. Nous nous sommes donc vus contraints de développer une reconnaissance automatisée des plots.

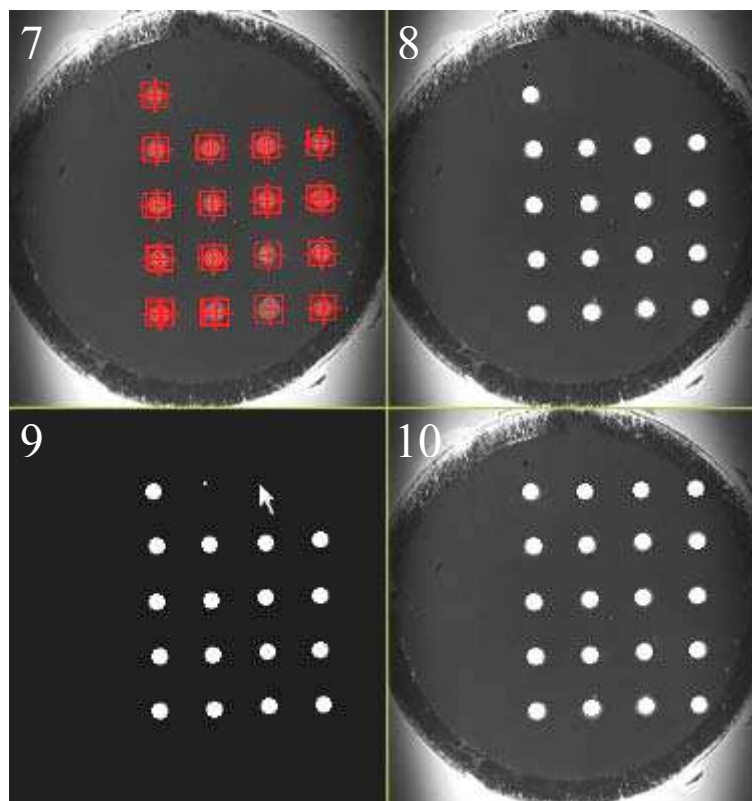


Figure 82 : Reconnaissance semi-automatique des plots consistant en une reconnaissance automatique des motifs décrits par l'utilisateur (7) suivie d'une élimination manuelle éventuelle des faux positifs (8), d'un positionnement approximatif des plots manquants à la souris (9) et d'une correction de la position de ces plots en fonction de celle des plots reconnus (6).

Après de nombreux essais infructueux de développement d'une reconnaissance totalement automatique des plots, nous nous sommes tournés vers une reconnaissance semi-automatique, c'est-à-dire que chaque étape du procédé de reconnaissance peut être contrôlée par l'utilisateur qui va corriger les erreurs survenant au cours des étapes automatiques. L'option « semi-automatique » permet donc à l'utilisateur de guider la reconnaissance des différents plots. La première étape consiste à définir à la souris un rectangle centré sur un plot et incluant ce plot, le programme va alors tenter de reconnaître sur l'image les motifs correspondant à la zone sélectionnée. Chaque zone reconnue est alors matérialisée par un rectangle rouge sur l'image comme sur la Figure 82-7. Cette première étape va permettre la reconnaissance d'un plus ou moins grand nombre de plots suivant l'homogénéité de la forme des plots. Cette première étape peut ensuite être répétée plusieurs fois pour reconnaître de nouveaux motifs et, par voie de conséquence, de nouveaux plots. Nous obtenons alors la Figure 82-7. Certains plots peuvent ne pas avoir été reconnus (ce n'est pas le cas dans notre exemple) tandis que d'autres plots peuvent être reconnus plusieurs fois comme les plots 1, 3 et 4 de la deuxième colonne de la Figure 82-7. Le programme, après avoir calculé la position moyenne des plots reconnus plusieurs fois, remplace les précédents rectangles rouges par des disques blancs matérialisant les plots (comme dans les deux options décrites précédemment). L'utilisateur peut alors modifier ce diamètre pour le faire correspondre au diamètre réel des plots (comme dans le cas de la reconnaissance manuelle, tous les disques ont le même diamètre). Ensuite, la deuxième étape consiste à cliquer avec la souris les zones reconnues par le programme ne correspondant pas à un plot afin de les éliminer. Nous obtenons alors la Figure 82-8. Pour finir, l'utilisateur clique approximativement à l'endroit où devrait se trouver un plot (Figure 82-9) et le programme va alors placer chaque plot manquant en l'alignant sur les autres plots de la même ligne et de la même colonne. L'image finale représentant la matrice des plots reconnus est représentée sur la Figure 82-10.

Quelque soit l'option choisie de reconnaissance des plots, cette procédure crée une image binarisée qui va définir la zone de calcul des signaux mesurés pour chaque plot. Nous allons donc maintenant décrire l'automatisation des différentes étapes d'une expérience type.

II.3.4.2. Mesure de la réflectivité en fonction de l'angle d'incidence

L'algorithme de mesure de réflectivité en fonction de l'angle d'incidence est divisée en trois parties reproduisant le processus de conversion des niveaux de gris de la caméra en réflectivité décrit précédemment dans la partie II.3.1.1. Cette mesure nécessite encore l'intervention de l'utilisateur puisque le polariseur n'a pas été motorisé, ce qui empêche l'automatisation du choix de la polarisation incidente.

Avant de démarrer cet algorithme, l'utilisateur rentre l'excursion angulaire qu'il veut balayer, l'angle d'incidence extérieur sur lequel est centré le balayage ainsi que le nombre de points de mesure qu'il veut effectuer. Ces données vont permettre au programme de calculer les différentes positions du miroir pour chaque mesure de réflectivité. Dans un premier temps, le miroir rotatif obture le faisceau source, ce qui permet de capturer une image du bruit de fond, correspondant à la réflectivité nulle. Puis, l'utilisateur positionne le polariseur en TE et le programme acquiert une image en polarisation TE pour chaque angle d'incidence prédéfini. Ces images vont correspondre à la référence de réflectivité haute pour chaque incidence. Ensuite, l'utilisateur positionne le polariseur en TM et, pour chaque angle d'incidence prédéfini, le programme acquiert une image en polarisation TM et la convertit, grâce aux deux références précédentes (0 et TE), en image de réflectivité TM. En utilisant l'image binarisée des plots obtenue par l'algorithme de la Figure 78, le programme calcule alors la réflectivité TM de chaque plot et l'inscrit dans un fichier texte. Pour finir, pour chaque plot, le programme calcule la dérivée de la courbe de réflectivité en fonction de la courbe d'incidence et en déduit l'angle de travail en cinétique par la position du maximum de cette dérivée. En sortie du programme, un angle de travail en cinétique, correspondant à la moyenne des valeurs calculées pour chaque plot, nous est alors proposé pour la phase suivante de l'expérience.

Cet algorithme est résumé dans la figure suivante :

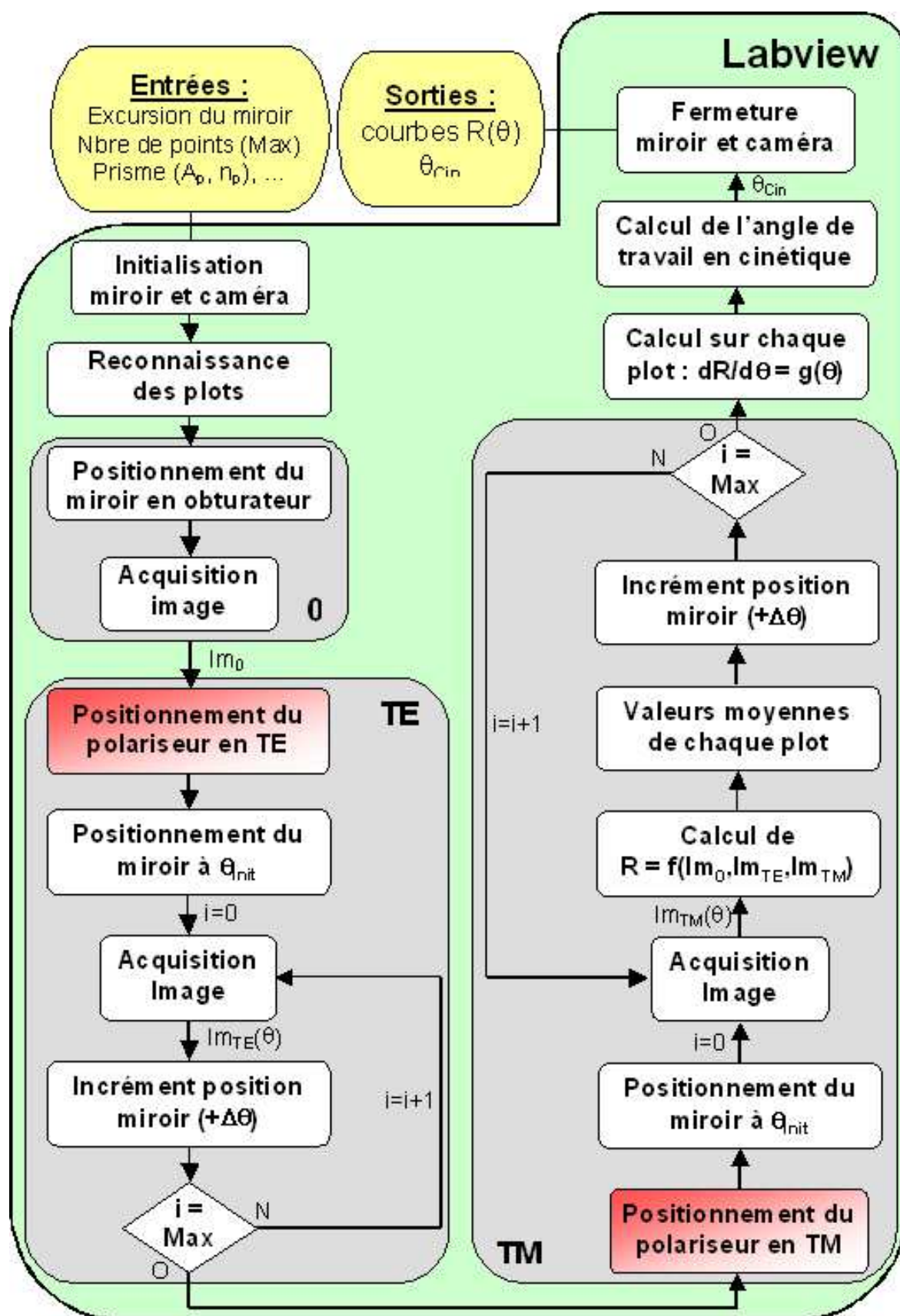


Figure 83 : Algorithme simplifié de la mesure réflectivité en fonction de l'incidence.

II.3.4.3. Mesure des cinétiques

Tout comme l'algorithme de mesure de réflectivité en fonction de l'angle d'incidence, l'algorithme de mesure des cinétiques est divisé en trois parties reproduisant le processus de conversion des niveaux de gris de la caméra en réflectivité et nécessite l'intervention de l'utilisateur pour tourner le polariseur.

Avant de démarrer cet algorithme, l'utilisateur rentre l'angle de travail en cinétique de son choix (généralement, celui qui est conseillé par l'algorithme précédent). Cela va permettre au programme de positionner le miroir à l'endroit où la sensibilité du capteur sera la meilleure. Dans un premier temps, le miroir rotatif obture le faisceau source, ce qui permet de capturer une image du bruit de fond, correspondant à la réflectivité nulle. Puis, l'utilisateur positionne le polariseur en TE et le programme, après avoir placé le miroir à l'angle de travail, acquiert une image en polarisation TE, correspondant à la référence de réflectivité haute. Ensuite, l'utilisateur positionne le polariseur en TM et c'est alors au moment où le programme déclenche le chronomètre que la mesure cinétique commence réellement. Chaque fois que le programme acquiert une image en polarisation TM, il lui associe la valeur lue simultanément sur le chronomètre. L'image est ensuite convertie, grâce aux deux références précédentes (0 et TE), en image de réflectivité TM. En utilisant l'image binarisée des plots obtenue par l'algorithme de la Figure 78, le programme calcule alors la réflectivité TM de chaque plot, l'inscrit dans un fichier texte et affiche en temps réel une sélection de ces réflectivité sur un graphe. Cette boucle de mesure de la réflectivité en fonction du temps continue jusqu'à ce que l'utilisateur décide de l'arrêter en fin d'expérience.

Cet algorithme est résumé dans la figure suivante :

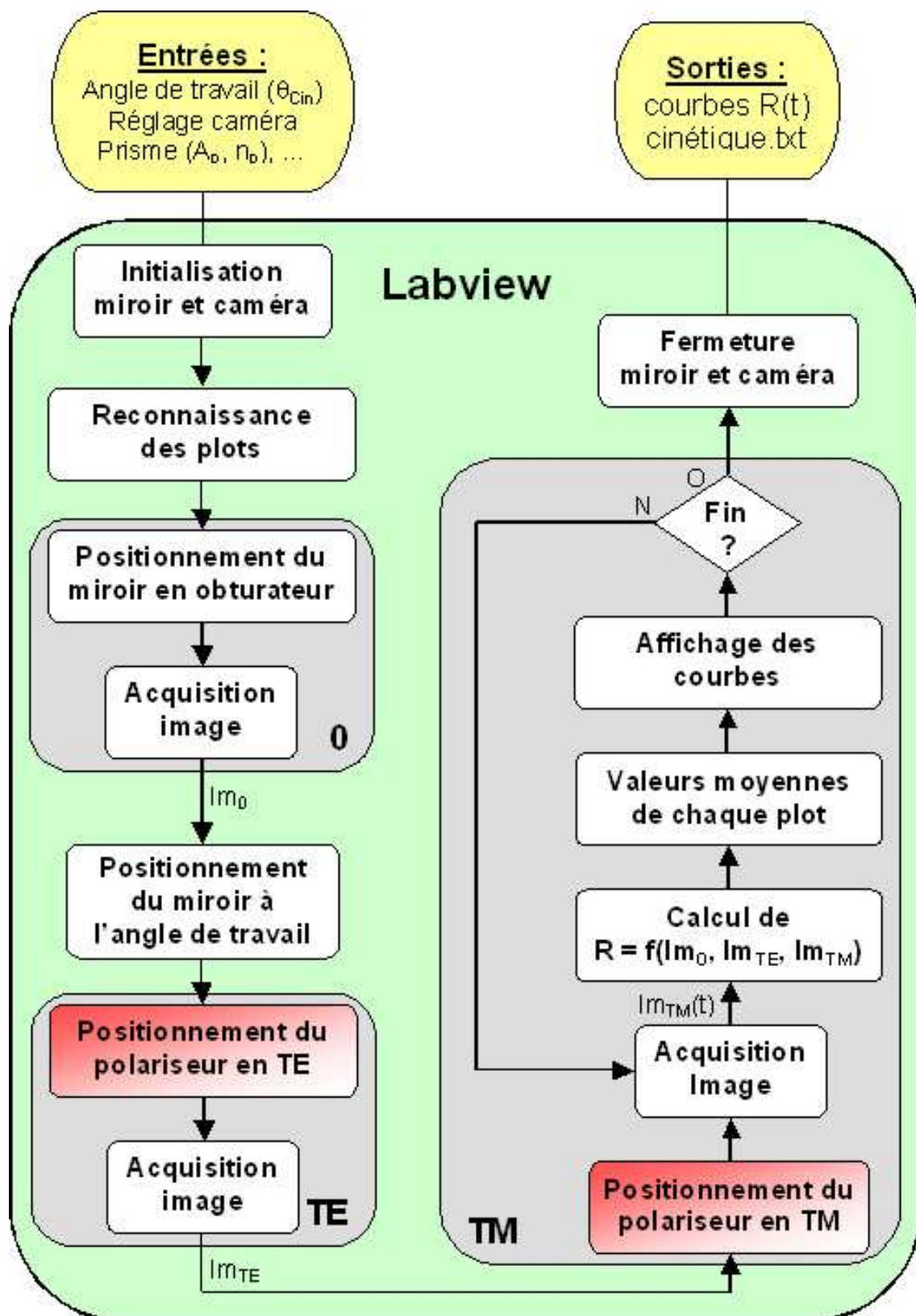


Figure 84 : Algorithme simplifié de la mesure des cinétiques.

II.3.4.4. Analyse des résultats

Pour finir, l'algorithme décrit ci-dessous permet d'analyser les fichiers textes issus des mesures cinétiques ou des mesures de réflectivité en fonction de l'incidence. L'utilisateur peut facilement calculer une variation de réflectivité entre deux positions données ou ajuster les courbes selon l'algorithme de la Figure 76.

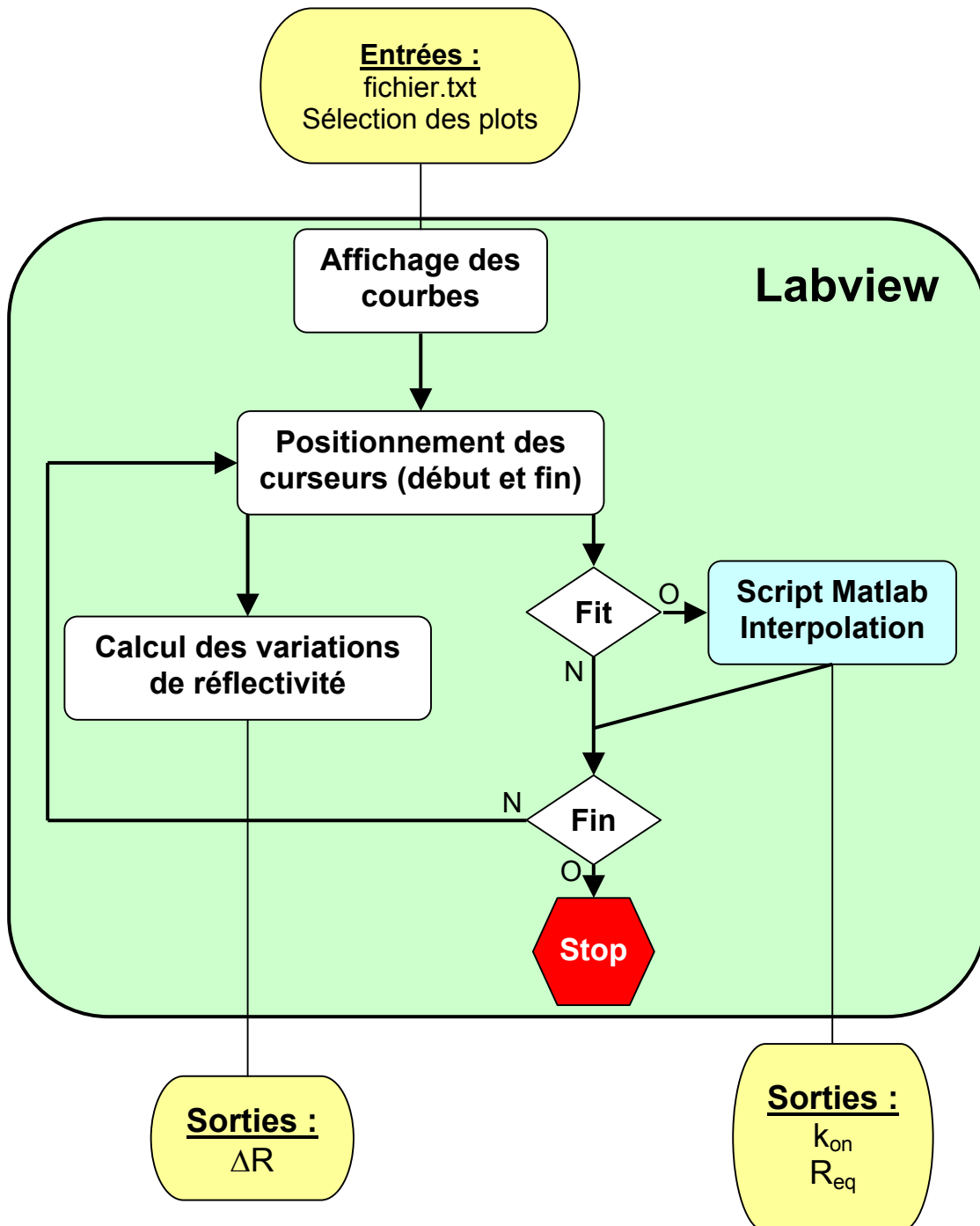


Figure 85 : Algorithme simplifié de l'analyse des résultats.

Les différents algorithmes présentés sont tous utilisable à partir de cette interface :

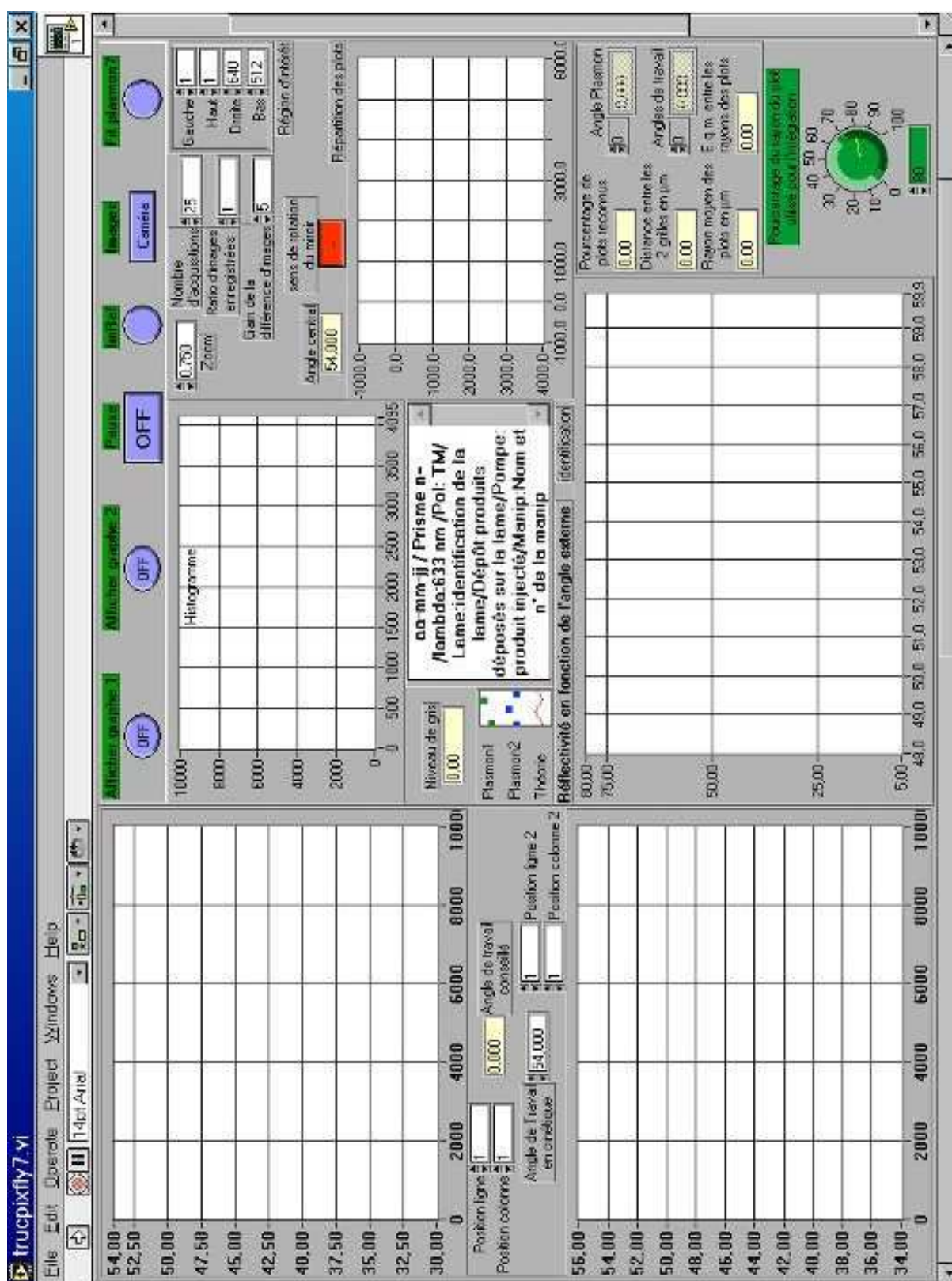


Figure 86 : Face avant du programme Labview, développé dans l'équipe, regroupant les algorithmes précédents.

II.4. CONCLUSION

Nous avons, dans ce chapitre, abordé les différentes considérations pratiques inhérentes au développement d'un biocapteur basé sur l'imagerie de résonance des plasmons de surface couplés par prisme, de la conception optique au traitement des données en passant par la chimie de fonctionnalisation de ce capteur.

Dans un premier temps, nous avons expliqué que, pour la préparation de l'interface métal/diélectrique, siège de la résonance des plasmons de surface, l'or est le métal qui présente le meilleur compromis entre sensibilité, biocompatibilité et possibilité de fonctionnalisation et que son adhésion sur le verre est facilitée par l'insertion d'une couche ultramince de chrome. Nous avons ensuite expliqué comment la technique d'électrocopolymérisation du pyrrole, développée au CEA de Grenoble permettait une fonctionnalisation simple, robuste et structurée en plots de la surface d'or avec différentes biomolécules (ADN, protéine, biotine, oligosaccharide).

Dans un deuxième temps, nous avons présenté les différents critères permettant de définir les éléments du dispositif expérimental d'imagerie SPR : la source, le balayage angulaire, la fluidique, le prisme, le système optique d'imagerie et la caméra. Nous avons montré que l'utilisation d'une diode LED était plus simple et moins coûteuse que celle d'un laser pour l'imagerie des plasmons de surface tout en conservant une sensibilité équivalente (baisse de 5 %). Ensuite, nous avons calculé une configuration de prisme (SF11, largeur 12 mm, angle au sommet $A_p = 32^\circ$) minimisant les aberrations et autorisant une imagerie simple de la surface sensible. Le système ainsi développé, compact et robuste, n'a qu'une seule partie mobile, le miroir permettant de faire varier l'angle d'incidence sur le capteur.

Enfin, nous avons décrit comment quantifier les mesures réalisées avec le banc de mesure. Nous pouvons calculer le taux de recouvrement surfacique de chaque plot, en particulier grâce à une calibration par des liquides d'indice de réfraction légèrement voisins. Nous pouvons aussi calculer les constantes d'affinité caractérisant une interaction grâce au modèle monovalent. Toutes ces mesures et analyses ont été rendues possibles par l'élaboration d'un logiciel Labview d'automatisation des expériences.

Il nous reste maintenant à mettre ce dispositif à l'épreuve des applications biologiques dans le chapitre suivant.

III. APPLICATIONS DE L'IMAGERIE SPR

Dans ce chapitre final, nous allons aborder les différentes applications abordées avec le biocapteur développé au cours de ma thèse. Ces différentes applications seront présentées dans l'ordre chronologique de leur réalisation pour une simple et bonne raison : le banc d'imagerie et son automatisation ont été développés progressivement en fonction des besoins ressentis lors des expériences. Tout au long de ce chapitre, l'interprétation des résultats reflète cette évolution.

Dans ce chapitre, illustrant les nombreuses possibilités du biocapteur développé, nous allons plus particulièrement décrire les interactions ADN/ADN à travers le cas du gène κ -ras, les interactions anticorps/antigène à travers le cas de l'hormone de grossesse humaine (hCG), les interactions ADN double brin/protéines à travers le cas de la protéine p53 et les interactions oligosaccharides/protéines à travers le cas de la chimiokine SDF-1 α .

III.1. ACIDES DESOXYRIBONUCLEIQUES

Avant de présenter les expériences effectuées avec l'ADN et leur interprétation, nous allons tout d'abord introduire quelques rappels sur l'ADN. Ces rappels sont simplement rédigés pour améliorer la compréhension des expériences réalisées et ne visent en aucun cas une description détaillée des phénomènes abordés.

III.1.1. Généralités

III.1.1.1. Structure de l'ADN

Les acides nucléiques sont les constituants principaux du noyau de la cellule. Ces molécules sont à la base d'un système de communication intermoléculaire très complexe et sont principalement divisés en deux types : les Acides RiboNucléiques (ARN) et les Acides DésoxyriboNucléiques (ADN). Ces derniers portent l'information génétique dans la cellule, sont capables d'autoréplication et de synthèse d'ARN et constituent les 23 paires de chromosomes présentes dans le noyau d'une cellule humaine.

L'ADN est composé de deux longues chaînes, ou brins, jointes par des liaisons hydrogène entre une multitude de petites molécules appelées bases. Un brin d'ADN est construit autour d'une structure de sucres phosphatés sur laquelle sont fixés chimiquement les bases. Ces bases sont au nombre de quatre et se divisent en deux types : les bases puriques comprenant l'Adénine (A) et la Guanine (G), et les bases pyrimidiques comprenant la Thymine (T) et la Cytosine (C). Ces bases ne peuvent s'apparier qu'entre bases complémentaires (A avec T et C avec G). Un brin d'ADN peut donc être considéré comme un empilement de nucléotides (un sucre phosphaté lié de manière covalente à une base). L'ordre de succession de ces nucléotides est à l'origine même du codage génétique, il détermine les caractéristiques héréditaires individuelles. Un double brin d'ADN est constitué de deux brins d'ADN complémentaires, c'est-à-dire de deux brins dont toutes les bases sont complémentaires, et est structuré en forme de double hélice (Figure 87).

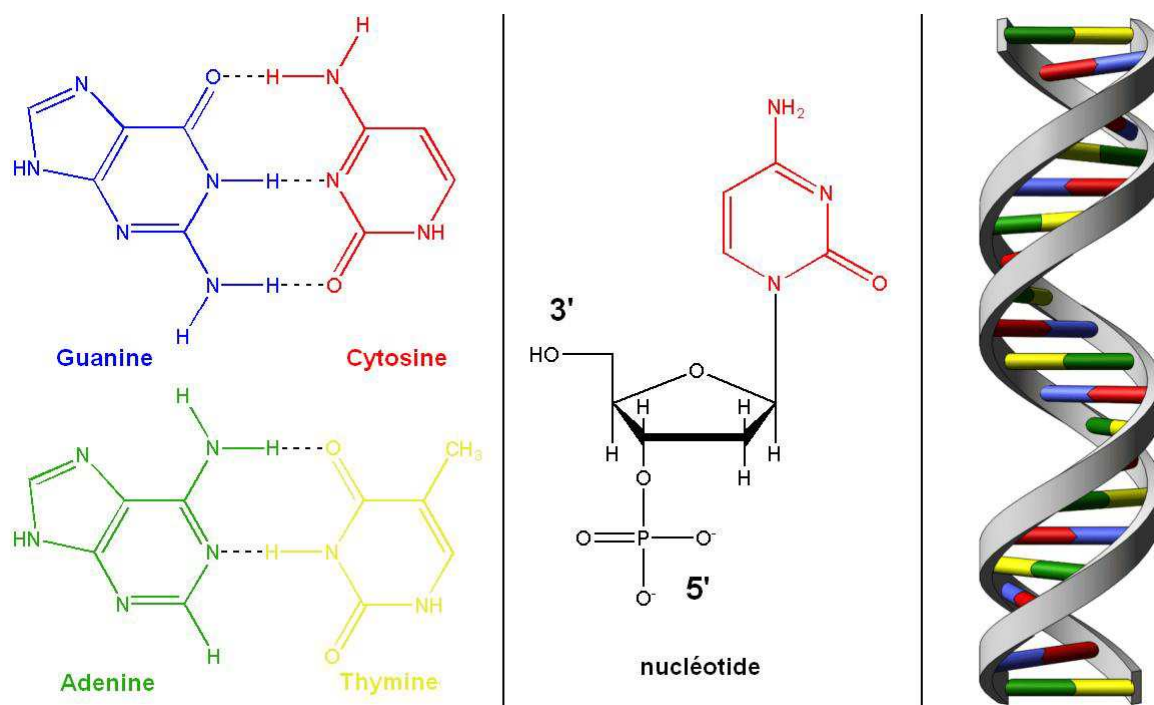


Figure 87 : Structure de l'ADN. De gauche à droite, les bases puriques (Guanine et Adénine), les bases pyrimidiques (Cytosine et Thymine), un exemple de nucléotide et un double brin d'ADN formé de deux brins d'ADN complémentaires. Chaque brin se décompose en une suite de briques élémentaires appelées nucléotides. Un nucléotide est composé d'une des 4 bases possibles liées à un groupement phosphate (5') et à un groupement hydroxyle (3') via un sucre (désoxyribose). Les bases s'apparient entre bases complémentaires par des liaisons hydrogènes représentées en pointillés sur cette figure (3 liaisons entre G et C, 2 entre A et T).

III.1.1.2. Hybridation et dénaturation

Au cours du cycle cellulaire, l'ADN ne se trouve pas toujours sous la forme de doubles brins. Pour les besoins, par exemple, d'une duplication (copie du double brin à l'identique lors de la division cellulaire) ou d'une transcription (copie d'un brin d'ADN en brin d'ARN), l'ADN subit une dénaturation pour se retrouver sous forme de simples brins. Puis, lorsque ces opérations sont finies, il retrouve sa forme de double brin par une hybridation des brins complémentaires entre eux.

Ces processus d'hybridation et de dénaturation (ou déshybridation) correspondent à la formation ou à la rupture des liaisons hydrogènes présentes entre les bases complémentaires du double brin d'ADN par le changement des propriétés du milieu où se trouve l'ADN, ce qui perturbe sa stabilité. Ces deux phases d'association/dissociation de l'ADN peuvent être reproduites *in vitro*, en particulier, en ce qui nous concerne, sur un biocapteur.

La stabilité d'un duplex d'ADN dépend du nombre de liaisons hydrogènes et donc, par voie de conséquence, du nombre de bases le constituant et de la fréquence en bases G et C puisque les bases G et C sont liées par trois liaisons hydrogènes tandis que les bases A et T sont liées par deux liaisons hydrogènes (Figure 87). Cette stabilité dépend aussi de la température et de la concentration ionique du milieu. La température de fusion (T_m), température moyenne à laquelle 50 % de l'ADN double brin considéré dans un milieu donné est dissocié, est un bon indicateur de cette stabilité. Un duplex sera d'autant plus stable que sa température est inférieure à la température de fusion.

Une puce à ADN est composée d'un substrat (un film mince d'or dans notre cas) sur lequel sont fixés de nombreux simples brins d'ADN différents et identifiés (ADN sondes). Lorsque cette puce est recouverte d'un milieu contenant un simple brin d'ADN (cible) et favorisant l'hybridation, ce simple brin va s'associer avec l'ADN sonde complémentaire. Le système de transduction sur lequel est fondé le biocapteur utilisé va alors nous permettre de repérer le plot où la cible s'est fixée et, par la même occasion, d'en déduire la séquence de bases constituant l'ADN cible. Ceci constitue le principe de reconnaissance de l'ADN.

Afin de rentabiliser l'utilisation d'une puce à ADN (au niveau coût mais aussi au niveau du temps de préparation d'une puce), il peut être intéressant de pouvoir utiliser plusieurs fois une même puce à ADN. Entre deux utilisations, il est nécessaire de dénaturer

les duplex précédemment formés. Deux méthodes sont principalement utilisées : la dénaturation thermique qui consiste à porter la puce à une température supérieure à la température de fusion et la dénaturation alcaline par injection de soude (NaOH) qui va modifier le pH du milieu (et diminuer le T_m en dessous de la température de travail).

III.1.1.3. Intérêt biomédical des puces à ADN

Comme nous venons de le voir dans la sous-partie précédente, les puces à ADN peuvent être utilisées pour décrypter une séquence d'ADN inconnue, c'est la technique de séquençage par hybridation, technique qui a connu un développement phénoménal ces dernières années dans le cadre du projet de séquençage du génome humain.

Lorsqu'un brin d'ADN voit une ou plusieurs de ses bases supprimées (délétion) ou remplacées par d'autres bases (mutation), il y a une perte de l'information génétique qui peut se traduire par un grand nombre de pathologies. Ces mutations font, à ce jour, l'objet de recherches accrues, notamment dans le domaine des maladies héréditaires [98,124], en infectiologie [125], en cancérologie [126] et en toxicologie [127]. A la différence de la technique de séquençage, la recherche de mutations s'appuie sur la connaissance a priori d'une séquence complémentaire dont une ou plusieurs des bases auraient été modifiées. Une puce à ADN pour la recherche de mutations comprend des sondes représentant la séquence sauvage (séquence non mutée) et les différentes mutations connues de cette séquence.

L'interaction d'un brin muté avec un brin complémentaire du brin sauvage (et vice-versa) est alors moins forte que dans le cas où les deux brins sont totalement complémentaires mais existe tout de même. Tout l'art de l'utilisation d'une puce à ADN consiste en la maximisation du contraste entre le signal provenant de l'hybridation de deux brins complémentaires et celui provenant d'un double brin avec un mésappariement (un couple de bases n'est pas complémentaire), aussi appelé SNP (Single Nucleotide Polymorphism). Le cas d'une délétion où toutes les bases situées après cette modification sont décalées et le cas d'une mutation de plusieurs bases sont évidemment plus aisés à différencier que le cas du SNP.

Grâce au banc de mesure en imagerie SPR que nous avons développé, nous avons réalisé une puce à ADN pour la détection de la mucoviscidose [98] dont les différentes séquences ont été optimisées pour faciliter la détection des SNP. Les protocoles

d'optimisation ainsi que les résultats obtenus avec cette puce, fonctionnalisée par auto-assemblage moléculaire (voir II.1.2.1) font l'objet du manuscrit de thèse de N. Bassil [128]. Afin d'illustrer la fonctionnalisation par électrocopolymérisation de l'ADN, la sélectivité de la mesure d'hybridation et la possibilité de détection des mutations ponctuelles, nous allons maintenant présenter les expériences que nous avons réalisées sur des oligonucléotides dont la séquence correspond à une partie du gène κ -ras lié à certains cancers [129].

III.1.2. Interactions ADN/ADN liées au gène κ -ras

Les expériences présentées dans cette partie ont été réalisées en collaboration avec E. Lopez-Crapez du groupe Marqueurs tumoraux du CRLC (Centre de Recherche et de Lutte contre le Cancer [130]) de Montpellier. Elles ont été réalisées au début de ma thèse, en 2001, époque à laquelle le banc de mesure n'avait pas encore été automatisé ni optimisé et ne permettait que des mesures qualitatives.

III.1.2.1. Description du matériel utilisé

Par rapport au banc décrit dans la partie II.2 (page 100), le changement d'incidence se fait grâce à une platine de rotation manuelle, le prisme est un prisme équilatéral ($A_p = 60^\circ$) en SF10 ($n = 1,72$ @ $\lambda = 650$ nm) et la caméra est une caméra analogique convertie en 8 bits. La procédure de conversion des niveaux de gris en variation de réflectivité n'avait pas encore été mise au point, ce qui fait que toutes les grandeurs mesurées sont en niveaux de gris ou, pour simplifier, en unités arbitraires (U.A.). Pour finir, les couches métalliques (chrome et or) n'étaient pas déposées directement sur le prisme mais sur des lames de microscope (BK7 $n = 1,514$ @ $\lambda = 650$ nm). Le couplage entre le prisme et la lame est alors réalisé par une huile d'indice de réfraction 1,515.

Pour ces expériences, la fonctionnalisation par électrocopolymérisation a été réalisée sur des lames dorées selon le protocole décrit dans la sous-partie II.1.2.2.3. Les dépôts réalisés au CEA de Grenoble, sont composés de 9 plots ($\phi \approx 700$ μ m) distincts de polypyrrole déposés par électrocopolymérisation ($U = 2$ V, $t = 125$ ms) d'une solution de tampon phosphate (pH = 7) contenant du pyrrole non greffé (20 mM) et des pyrroles-oligonucléotides (40 μ M). Cela correspond à un ratio d'un oligonucléotide pour 500 molécules de pyrrole. Les

différents oligonucléotides, longs de 15 bases, fixés sur les lames sont décrits dans le tableau suivant.

Nom de l'ODN	Extrémité	Modification	Séquence	Extrémité
N	5'	Pyr-(T) ₁₀ -	TGGAGCTGGTGGCGT	3'
M1	5'	Pyr-(T) ₁₀ -	TGGAGCT A GTGGCGT	3'
M2	5'	Pyr-(T) ₁₀ -	TGGAGCT C GTGGCGT	3'
M3	5'	Pyr-(T) ₁₀ -	TGGAGCT T GTGGCGT	3'
M4	5'	Pyr-(T) ₁₀ -	TGGAGCTG A TGGCGT	3'
M5	5'	Pyr-(T) ₁₀ -	TGGAGCTG C TGGCGT	3'
M6	5'	Pyr-(T) ₁₀ -	TGGAGCTG T TGGCGT	3'
CP	5'	Pyr-(T) ₁₀ -	CCTTGACGATACAGC	3'

Tableau 5 : Séquence des oligonucléotides correspondant à une partie du gène κ -ras (centrée sur le codon 12) et constituant les sondes du biocapteur. Ces séquences ont été modifiées en leur extrémité 5' par une chaîne de 10 Thymines (espaceur) suivie d'un groupe pyrrole pour la polymérisation.

Dans le Tableau 5, le premier oligonucléotide sonde appelé **N** correspond à la séquence native, c'est-à-dire sans mutations. Les oligonucléotides **M₁**, **M₂** et **M₃** représentent les trois mutations possibles de la base centrale de la séquence native **N** tandis que **M₄**, **M₅** et **M₆** sont les trois mutations possibles de la 9^{ème} base de **N**. L'oligonucléotide **CP** (Contrôle Positif) est une séquence de 15 bases présente sur une autre partie du gène κ -ras et totalement différente des 7 premières. Ces six mutations de **N** vont coder, après transcription, six acides aminés différents de l'acide aminé du code natif et vont donc conduire à des modifications de la protéine produite [131].

Les cibles utilisées au cours des expériences sont les oligonucléotides complémentaires (symbolisés par « * ») des sondes déposées ainsi qu'une séquence un peu plus longue et se détaillent ainsi :

Cible	Extr.	Séquence	Extr.
N*	3'	ACCTCGACCACCGCA	5'
M1*	3'	ACCTCGA T CACCGCA	5'
CP*	3'	GGAAGTGTATGTCTG	5'
Sg0	3'	CA ACCTCGACCACCGCA TCCGTTCTCAC GGAAGTGTATGTCTG	5'

Tableau 6 : Séquence des oligonucléotides complémentaires à certaines séquences du Tableau 5 et utilisés en tant que cible dans les expériences.

Les oligonucléotides cibles décrits dans le Tableau 6 sont injectés dans la cellule d'interactions à une concentration de 1 μ M dans un tampon PBS avec du Denhardt 1X et de l'ADN de sperme de saumon (10 mg/L). Le Denhardt combiné avec l'ADN de sperme de saumon est un agent bloquant, c'est-à-dire qu'il est destiné à limiter les interactions non spécifiques sur le biocapteur en saturant les différents sites possibles d'adsorption non spécifique des protéines, des sucres et de l'ADN. Toutes les expériences sont réalisées à température ambiante et à débit constant égal à 25 μ L/min.

Le protocole de l'expérience, inspiré du protocole type décrit dans la sous-partie I.2.4.1 (page 50), est le suivant :

- Injection du tampon dans la cuve en téflon jusqu'à stabilisation de la réflectivité (blocage de la lame par le Denhardt et l'ADN de sperme de saumon).
- Mesure de la réflectivité en fonction de l'angle d'incidence afin de déterminer l'angle de travail en cinétique (pente de la courbe mesurée maximale).
- Positionnement du miroir à l'angle de mesure déterminé précédemment.
- Injection en cuve des cibles à analyser (1 μ M) diluées dans le tampon.
- Injection du tampon pour le rinçage et pour mesurer dans le même milieu la différence de réflectivité due à l'interaction entre les sondes et les cibles.
- Injection d'eau pour éviter la neutralisation de la soude par le tampon.
- Injection de soude pour la déshybridation des doubles brins formés.
- Injection d'eau pour évacuer la soude.
- Injection du tampon afin de comparer le niveau de réflectivité avant l'interaction et après la régénération dans le même milieu.

III.1.2.2. But de l'expérience

Le but de ces expériences est tout d'abord de vérifier, sur le banc d'imagerie SPR, la spécificité de l'interaction entre oligonucléotides complémentaires par l'injection de la cible **CP*** totalement complémentaire de la sonde **CP** et ne correspondant pas du tout aux autres sondes. Ensuite, un autre but est de distinguer sans ambiguïté une mutation ponctuelle (SNP). Pour cela, nous allons injecter la cible **N*** et comparer les réponses du système sur la sonde totalement complémentaire **N** et sur les sondes mutées sur la 8^{ème} base (**M1**, **M2**, **M3**) ou sur la 9^{ème} base (**M4**, **M5**, **M6**).

Enfin, le but ultime de toutes les puces à ADN n'est pas de travailler sur des oligonucléotides synthétiques mais sur des fragments provenant de patients amplifiés par

PCR. Ces fragments d'ADN sont beaucoup plus longs que les oligonucléotides sondes utilisés. A température ambiante, qui est notre température de travail, différentes parties d'un même long fragment d'ADN peuvent facilement s'hybrider entre elles et ainsi former une structure secondaire (qui peut être calculée grâce au logiciel gratuit Mfold [132]). Ces interactions intramoléculaires peuvent limiter l'accès à la zone du fragment complémentaire des oligonucléotides sondes et entrer en compétition avec les interactions intermoléculaires [133]. Nous n'avons pas réalisé cette étude, très intéressante et assez complexe par les nombreux paramètres à optimiser mais, nous nous sommes contentés de l'analyse préparatoire d'un oligonucléotide de longueur intermédiaire **Sg0** (43 bases) comprenant la séquence complémentaire de **N** et la séquence complémentaire de **CP**.

III.1.2.3. Résultats

Le résultat de l'électrocopolymérisation des huit plots correspondant aux huit séquences du Tableau 5 ainsi que d'un plot composé uniquement de pyrrole est représenté sur la Figure 88. Sur cette figure, nous voyons l'image de la lame d'or insérée dans le banc SPR. Cette image a été acquise en polarisation TM lorsque les plots sont en eau et pour une incidence voisine de l'angle de travail en cinétique. Sur cette image, nous voyons une zone d'à peu près $4,5 \times 4,5 \text{ mm}^2$ où les plots ont un diamètre d'environ $700 \mu\text{m}$, sont disposés tous les $1,5 \text{ mm}$ et sont épais de 2 à 3 nm. L'état de développement du biocapteur au moment de cette expérience ne permettait pas une caractérisation plus précise des différents plots.

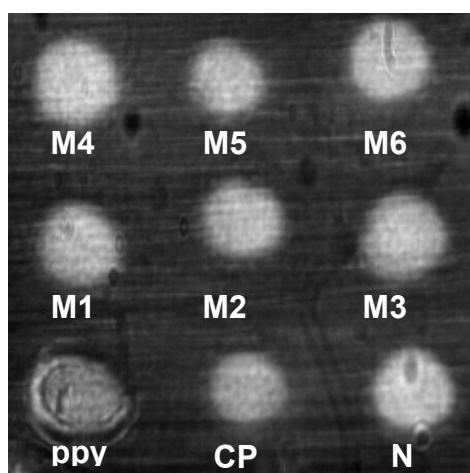


Figure 88 : Image SPR en eau des plots d'oligonucléotides pyrrolés décrits dans le Tableau 5 ainsi que du plot de polypyrrole (ppy).

III.1.2.3.1. Spécificité

Comme nous l'avons exposé dans les objectifs de cette expérience, nous allons commencer par vérifier la spécificité de notre biopuce. Cette biopuce contient principalement 2 séquences : **N** (et ses mutations) et **CP**. Nous allons injecter donc injecter la séquence complémentaire **CP*** pour vérifier qu'elle se fixe bien sur le plot de **CP** et qu'elle ne se fixe pas sur les autres plots. Les résultats de cette injection sont résumés dans la figure suivante.

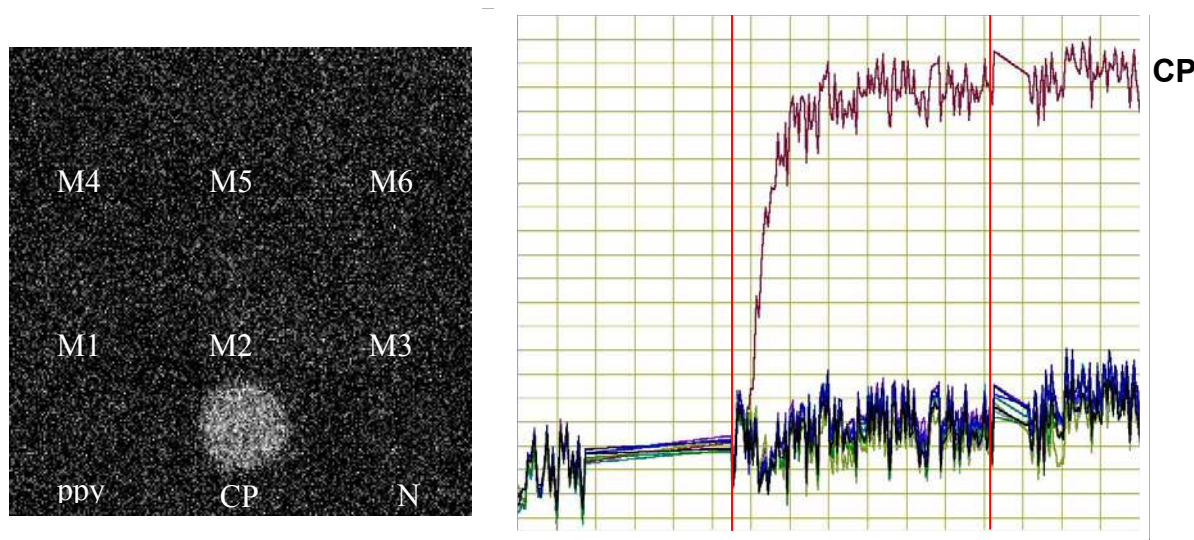


Figure 89 : Image de la différence de réflectivité due au passage de **CP*** et courbes de variation de réflectivité en fonction du temps correspondantes. Les deux barres verticales rouges matérialisent les transitions entre l'injection du tampon, du **CP*** (durant 7 minutes) et du tampon ainsi que les images utilisées pour la différence.

Sur la Figure 89 ainsi que sur toutes les figures suivantes représentant des variations de réflectivité en fonction du temps, les zones non bruitées des courbes tracées correspondent à l'intervalle de temps durant lequel nous changeons les produits en entrée de la pompe péristaltique. Durant cet intervalle, aucune image n'est acquise. La sélectivité est clairement démontrée au travers de la Figure 89 : seul le plot fonctionnalisé avec les sondes **CP** fixe l'oligonucléotide **CP***. Ni la surface d'or (en dehors des plots), ni le plot de polypyrrole, ni les plots fonctionnalisés avec les séquences étudiées (**N** et ses mutés) ne fixent cette séquence, ce qui se traduit sur cette figure par une réflectivité en tampon après injection du **CP*** équivalente à celle avant injection. Cela prouve que les interactions non spécifiques ont bien été limitées par la solution de Denhardt et l'ADN de sperme de saumon tandis que les interactions spécifiques n'ont pas été empêchées.

III.1.2.3.2. Détection de mutations ponctuelles

Comme nous l'avons exposé dans les objectifs de cette expérience, nous allons ensuite essayer de distinguer une mutation ponctuelle. Pour cela, nous allons injecter la cible **N*** et comparer les réponses du système sur la sonde totalement complémentaire **N** et sur les sondes mutées (**Mx**). Les résultats de cette injection sont résumés dans la figure suivante.

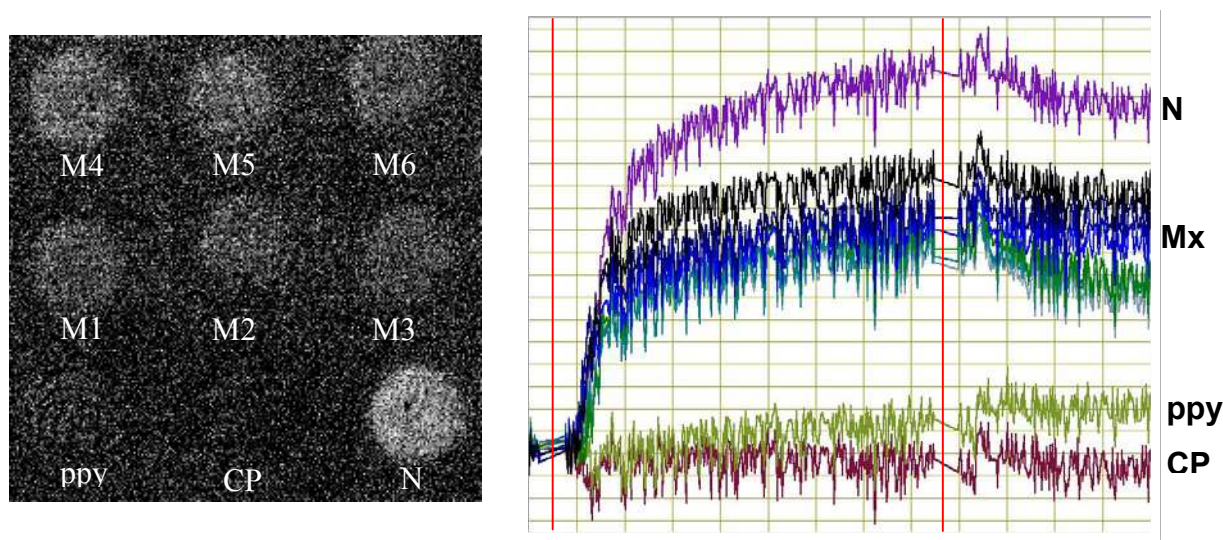


Figure 90 : Image de la différence de réflectivité due au passage de **N*** et courbes de variation de réflectivité en fonction du temps correspondantes. Les deux barres verticales rouges matérialisent les transitions entre l'injection du tampon, du **N*** (durant 12 minutes) et du tampon ainsi que les images utilisées pour la différence.

Les résultats de la Figure 90 sont aussi très clairs pour la discrimination de la séquence native **N*** : la variation de réflectivité est plus importante sur la séquence **N** totalement complémentaire que sur les séquences **Mx** mutées sur une base.

Notre système d'imagerie par résonance de plasmons de surface d'une surface d'or fonctionnalisée par électrocopolymérisation de pyrrole est donc un système viable pour la détection de mutations ponctuelles (SNP).

Après avoir régénéré la lame par injection de soude (détails dans la sous-partie III.1.2.3.4), nous pouvons compliquer cette détection en injectant maintenant la séquence **M1***. En effet, il devrait y avoir plusieurs types de réponse suivant les plots : la séquence totalement complémentaire **M1**, les séquences mutées sur une base (**N**, **M2**, **M3**) et les

séquences mutées sur 2 bases (**M4**, **M5**, **M6**). Cela se comprend aisément en comparant les séquences du Tableau 5. Voyons maintenant les résultats de cette injection.

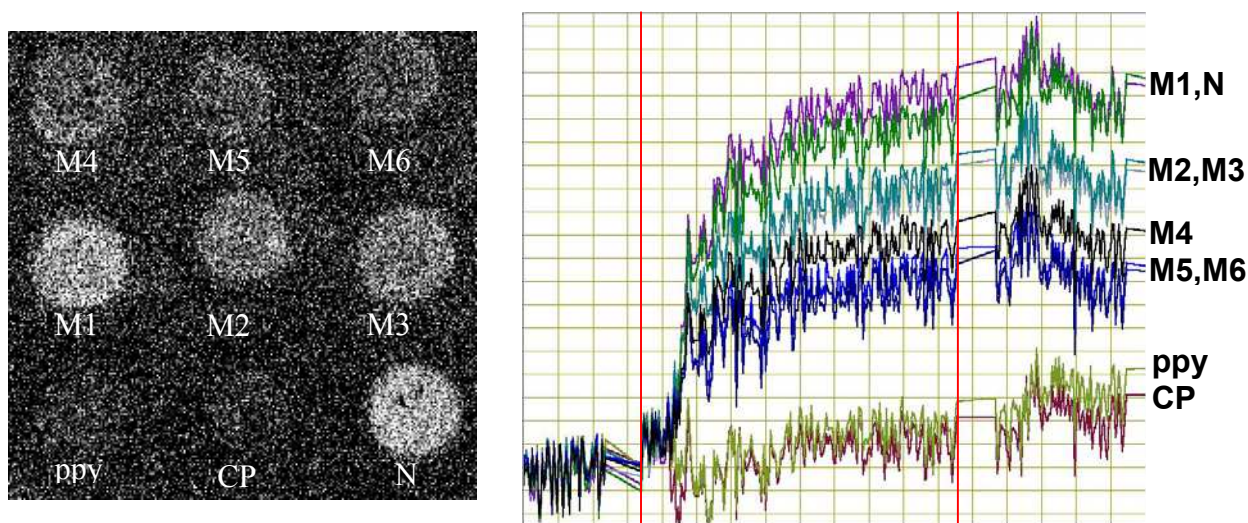


Figure 91 : Image de la différence de réflectivité due au passage de **M1*** et courbes de variation de réflectivité en fonction du temps correspondantes. Les deux barres verticales rouges matérialisent les transitions entre l'injection du tampon, du **M1*** (durant 8 minutes) et du tampon ainsi que les images utilisées pour la différence.

En ce qui concerne la détection de l'hybridation d'une séquence mutée **M1***, abstraction faite du plot **N** (nous allons y revenir dans le paragraphe suivant), les variations de réflectivité de la Figure 91 donnent comme prévu plusieurs paliers se détaillant, du plus fort signal au plus faible : **M1** (totalement complémentaire), **M2** et **M3** (mutation d'une base), **M4**, **M5** et **M6** (mutation de 2 bases), **ppv** et **CP** (non spécifique).

En comparant les résultats de l'injection de **N*** (Figure 90) et de **M1*** (Figure 91) sur les plots **N** et **M1**, nous pouvons nous demander pourquoi dans un cas la distinction **N/M1** est possible alors qu'elle ne l'est pas dans l'autre cas. Tout d'abord, il nous est apparu (voir aussi la thèse de N. Bassil [128]) que le problème n'est pas symétrique au niveau de la mutation : dans le cas de l'injection de **M1***, nous comparons un appariement complémentaire A/T (**M1/M1***) avec un appariement G/T (**N/M1***) tandis que dans le cas de l'injection de **N***, nous comparons un appariement complémentaire G/C (**N/N***) avec un appariement A/C (**M1/N***). Puisque l'appariement entre les bases G et C concerne trois liaisons hydrogènes alors que celui entre les bases A et T n'en concerne que deux (Figure 87), il semble logique que la distinction des plots **N** et **M1** soit plus facile dans le cas de l'injection de **N***. La

différence de résultats sur la détection de mutation lors du passage de la séquence **N*** et lors du passage de la séquence **M1*** peut aussi s'expliquer plus finement en calculant les températures de fusion des doubles brins formés durant l'hybridation (les duplex sont d'autant plus stables que la température de fusion est élevée). D'après le programme de calcul des températures de fusion entre deux brins d'ADN développé par John Santalucia *et al.* [134], ces températures valent :

T_m(°C)	N	M1	M2	M3	M4	M5	M6
N*	74,9	63,9	63,9	64,0	66,6	62,2	64,9
M1*	67,7	70,6	63,9	65,5	54,6	53,8	54,2
ΔT_m(°C)	N	M1	M2	M3	M4	M5	M6
N*	0	11	11	10,9	8,3	12,7	10,0
M1*	2,9	0	6,7	5,1	16	16,8	16,4

Tableau 7 : Température de fusion (T_m) des différents doubles brins formés sur le capteur lors de l'injection de **N*** et de **M1***. La seconde partie du tableau met en évidence les différences de stabilité entre le double brin formé et le double brin totalement complémentaire correspondant.

Les calculs présentés dans le Tableau 7 confirment bien la différence de discrimination des plots **N** et **M1** lors des différentes injections. Alors que la différence de T_m entre **N** et **M1** vaut 11° lors du passage de **N***, elle ne vaut plus que 2,9° lors du passage de **M1***, cela explique la plus grande difficulté à différencier les séquences **N** et **M1** dans le second cas. Nous confirmons aussi par ce calcul de T_m les différents groupes de courbes obtenus sur la Figure 90 (**N** et **Mx**) et sur la Figure 91 ((**N**, **M1**), (**M2**, **M3**) et (**M4**, **M5**, **M6**)).

Bien que la puce à ADN que nous avons utilisée pour nos expériences permette de reconnaître une séquence **N***, cette puce posera des problèmes s'il faut reconnaître une séquence **M1***. Ces problèmes ne sont pas liés au banc de mesure SPR ni à la chimie de fixation par électrocopolymérisation mais au choix des séquences déposées sur la puce et des conditions d'hybridation (température, concentration saline). Une optimisation de ces paramètres permettrait de développer et fiabiliser les phases d'hybridation et de dénaturation. Ce travail, nécessitant une étude approfondie, n'a pas été poursuivi durant cette thèse mais a été développé dans la thèse de Nathalie Bassil [128] dont nous avons déjà parlé plusieurs fois.

III.1.2.3.3. Vers un outil de diagnostic

La dernière étape que nous nous sommes fixés dans les objectifs de cette expérience, consiste en l'analyse préparatoire d'un oligonucléotide de longueur intermédiaire **Sg0** (43 bases) comprenant la séquence complémentaire de **N** et la séquence complémentaire de **CP**. Cette analyse, intermédiaire entre les oligonucléotides courts (15 bases) et les fragments PCR (100-200 bases), devrait servir de base à l'étude de fragment PCR issus de patients dans le cadre de l'élaboration d'un outil de diagnostic génétique. Les résultats de cette injection sont résumés dans la figure suivante.

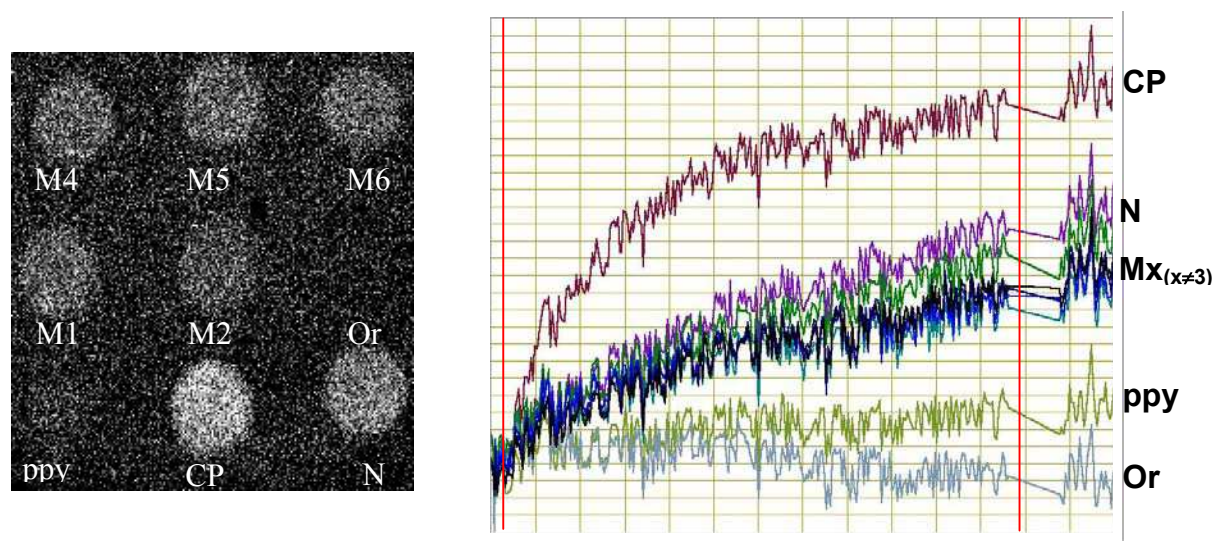


Figure 92 : Image de la différence de réflectivité due au passage de **Sg0** et courbes de variation de réflectivité en fonction du temps correspondantes. Les deux barres verticales rouges matérialisent les transitions entre l'injection du tampon, du **Sg0** (durant 10 minutes) et du tampon ainsi que les images utilisées pour la différence.

Cette étape n'a pas été réalisée sur la même lame d'or que les étapes précédentes. Sur celle-ci, un problème survenu lors de la fonctionnalisation du plot **M3** (2^{ème} ligne, 3^{ème} colonne) fait qu'il n'est pas présent sur la lame. La zone de calcul correspondant à ce plot fictif nous renseigne donc sur les variations de réflectivité sur l'or (d'où la courbe « or » sur la Figure 92).

Pour cette étape, nous nous attendions à ce que la séquence **Sg0**, contenant les séquences **N*** et **CP***, se fixe majoritairement sur les plots **CP** et **N** et qu'elle se fixe en quantité moindre sur les plots **Mx** contenant une mutation. Les résultats présentés dans la Figure 92 nous montrent tout d'abord que le plot **CP** subit la plus forte variation de

réflectivité. Ceci est peut-être dû à une plus grande accessibilité de la séquence **CP***, en comparaison avec la séquence **N***, ce que nous pouvons essayer de déduire des différentes structures secondaires de **Sg0** présentes en solution (Figure 93) et entrant en compétition avec l'hybridation de cette séquence sur le capteur.

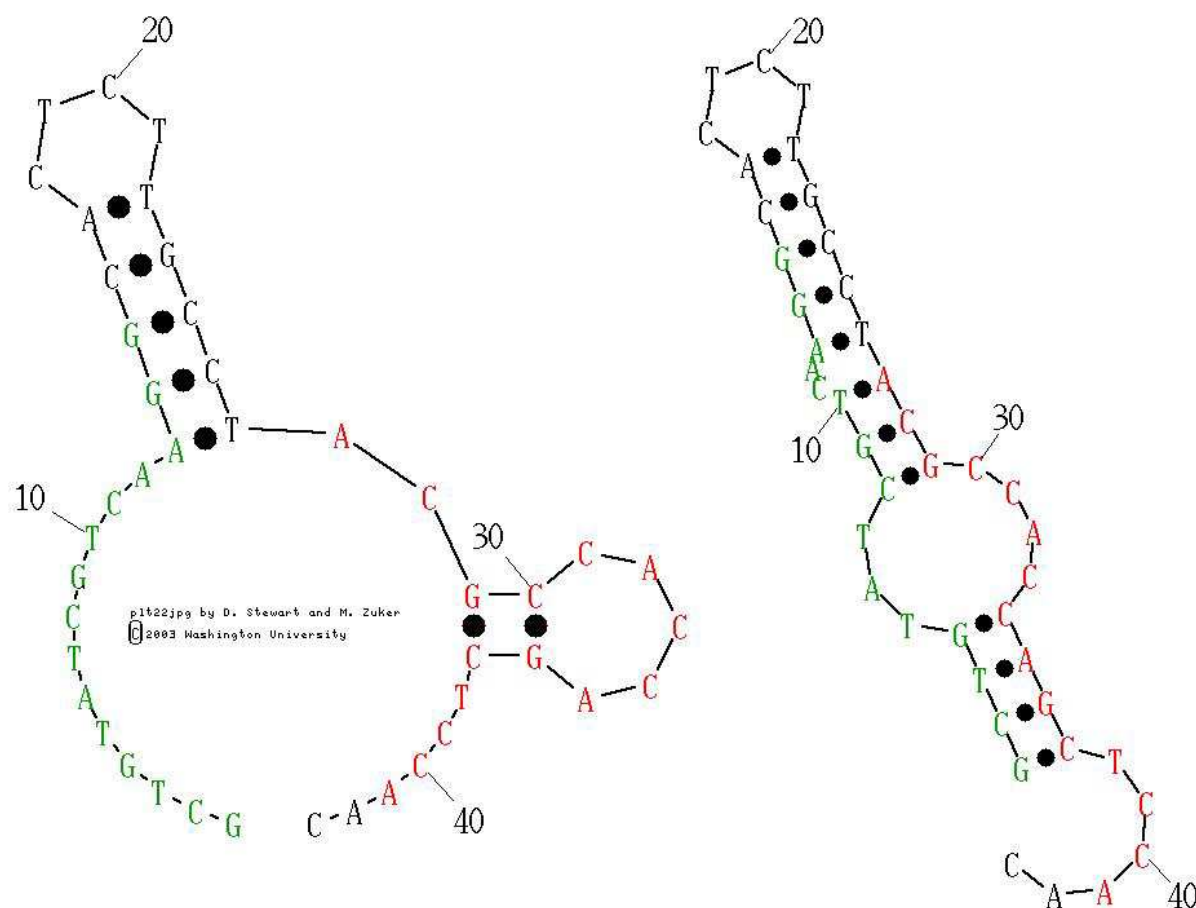


Figure 93 : Structures secondaires possibles de la séquence **Sg0** diluée dans un tampon PBS à $T = 20^\circ\text{C}$. Les bases de 1 à 15 en vert sont celles de la séquence **CP*** et celles de 27 à 41 en rouge correspondent à **N***. Ces structures ont été calculées avec Mfold [132].

Les résultats de la Figure 92 nous montrent aussi que nous arrivons aussi en limite de différenciation entre la séquence native **N** et les séquences mutées **Mx**. Le contraste entre ces différentes sondes s'est réduit avec l'allongement de la séquence complémentaire et arrive en limite de détection, ce qui confirme l'apparition supposée de problèmes de diagnostic lors de l'utilisation de longs fragments d'ADN et la nécessité d'optimiser les paramètres d'interaction déjà définis précédemment (nature de la sonde, concentration saline du tampon, température,...).

III.1.2.3.4. Dénaturation et réutilisation

Pour qu'une puce à ADN soit utilisable plusieurs fois, il faut dénaturer les doubles brins d'ADN formés au cours de l'expérience tout en préservant la fixation des sondes sur le biocapteur. La qualité de ce protocole peut très facilement être vérifiée par la mesure de la réponse de la puce lors de la répétition à l'identique de l'expérience ayant précédé la dénaturation. Un bon protocole de régénération est alors caractérisé par une réponse identique avant et après dénaturation.

Pour notre puce à ADN fonctionnalisée par électrocopolymérisation du pyrrole sur une couche d'or, nous avons choisi une déshybridation par le protocole eau / NaOH 25 mM/ eau car cette méthode a déjà été éprouvée de nombreuses fois en microscopie de fluorescence au CEA/DRFMC de Grenoble. Ce protocole fonctionne sur le banc d'imagerie SPR puisque nous avons pu utiliser la première lame plusieurs fois sans perte notable de signal (variations de réflectivité équivalentes dans la Figure 90 et la Figure 91) mais, fait inattendu, nous ne retrouvons pas, après déshybridation, le niveau initial de réflectivité de la lame. Ce résultat n'est pas en contradiction avec les mesures effectuées en microscopie de fluorescence, technique sensible à la seule étape incluant le fluorophore, c'est-à-dire l'hybridation des oligonucléotides marqués.

La mise en évidence de ce problème nous a conduit à mener une étude sur les conditions de déshybridation. En fin d'expérience, nous avons réalisé deux fois de suite le protocole de dénaturation avec de la soude à 25 mM puis une nouvelle fois avec de la soude à 100 mM pour montrer cette dérive. Sur cette lame, il n'y avait plus d'oligonucléotides fixés après le premier protocole de déshybridation (supposition due au fait que lors de nombreuses expériences, l'efficacité d'hybridation reste la même après ce protocole) alors que la dérive se reproduit lors du second et du troisième protocole sur les plots fonctionnalisés (Figure 94). Puisque cette dérive ne se retrouve pas sur l'or (données non montrées), nous avons pensé, grâce aux conseils avisés de T. Livache, à une reconfiguration possible du polypyrrole due à l'action de la soude. En effet, le remplacement des contre-ions dopants Cl^- par des contre-ions OH^- peut modifier la structure du polypyrrole [101,135]. Cette dérive, mise en évidence dans la Figure 94, nous empêche d'avoir une ligne de base stable et donc de mesurer les interactions biomoléculaires dans de bonnes conditions.

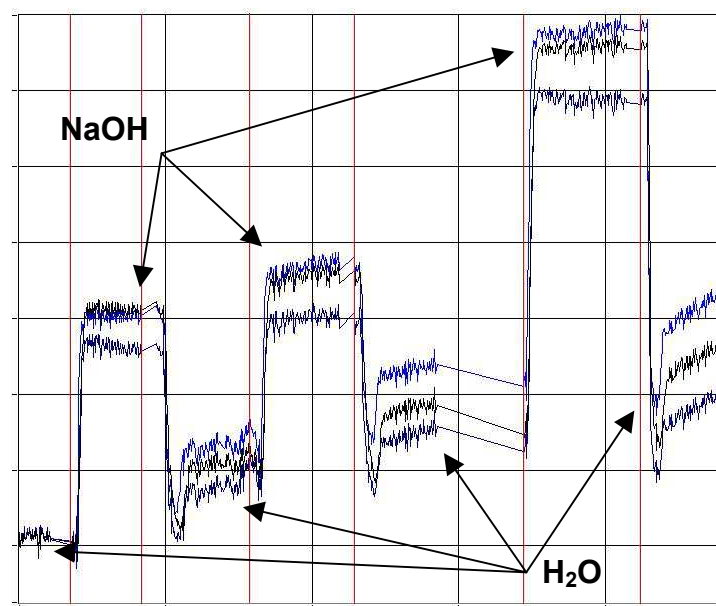


Figure 94 : Effet de l'injection de soude sur les zones fonctionnalisées du capteur. Cette courbe représente, pour trois plots de polypyrrole/oligonucléotide, les variations de réflectivité en fonction du temps provoquées par les injections successives d'eau et de soude, délimitées par les barres verticales rouges.

Afin d'essayer de limiter cette supposée reconfiguration du polypyrrole, nous avons tenté de nous replacer dans les mêmes conditions salines que celles du tampon lors de l'injection de la soude, c'est-à-dire que la soude a été diluée dans de l'eau contenant 137 mM de NaCl. Pour réaliser ces expériences, nous avons utilisé des lames d'or fonctionnalisées n'ayant jamais servi et n'ayant donc jamais été en contact avec des oligonucléotides cibles. Sur ces lames, nous avons directement réalisé les protocoles de dénaturation pour voir leurs effets sur les plots de polypyrrole. D'une part, nous avons réutilisé l'ancien protocole (eau / soude / eau) avec différentes concentrations de soude et, d'autre part, nous avons essayé le nouveau protocole (eau / soude + NaCl 137 mM / eau) toujours pour différentes concentrations de soude. Nous avons alors pensé aussi à remplacer l'eau par de l'eau salée, toujours à 137 mM, pour que la lame soit toujours dans les mêmes conditions salines mais cette piste n'a été vérifiée expérimentalement qu'une seule fois, a montré une dérive assez importante et a malheureusement été abandonnée sans approfondissements (résultats non montrés dans ce manuscrit). Les variations de réflectivité résultantes (mesurées sur une version ultérieure du banc de mesure) de ces différents protocoles de régénération sont représentées sur la Figure 95.

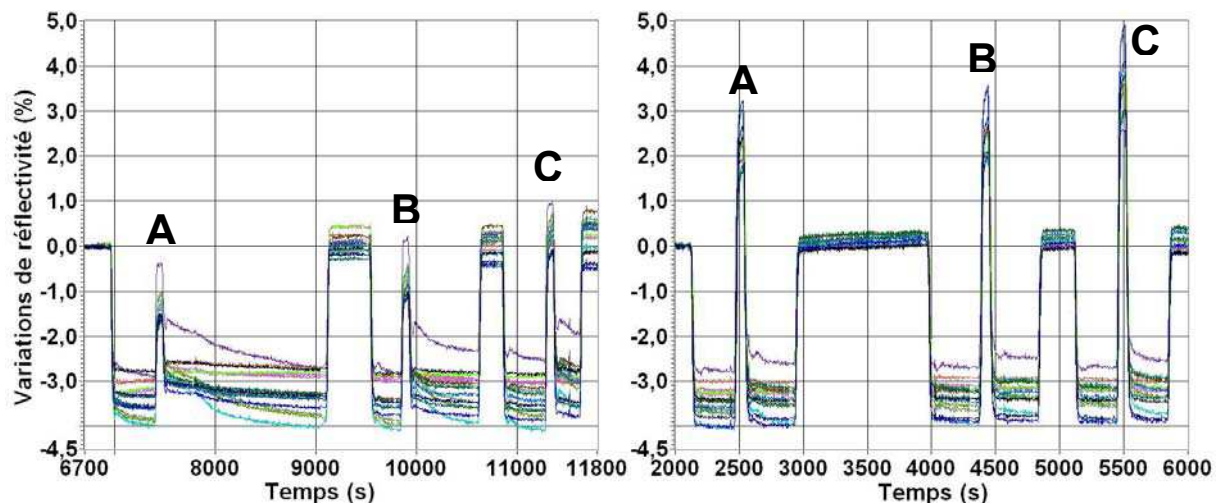


Figure 95 : Variations de réflectivité en fonction du temps provoquées par l'application de différents protocoles de dénaturation sur une lame d'or fonctionnalisée immergée en PBS. La référence des variations de réflectivité est la réflectivité initiale en PBS. A gauche, le protocole est eau / soude / eau pour différentes concentrations de soude (**A** : 25 mM, **B** : 50 mM, **C** : 100 mM). A droite, le même protocole est réalisé avec 137 mM de NaCl dans la solution de soude.

Les résultats de la Figure 95 confirment d'abord ceux de la Figure 94 et indiquent une dispersion de plus en plus importante du niveau de la ligne de base de réflectivité en PBS au fur et à mesure des injections de soude. Ensuite, l'adjonction de NaCl avec la soude a provoqué une diminution importante (d'un facteur trois sur la Figure 95) des longues dérives temporelles observées en eau avec le protocole précédent.

Nous avons donc adapté le protocole de régénération des puces à ADN utilisé en fluorescence au CEA de Grenoble pour l'utiliser sur notre dispositif SPR. Ce protocole consistant en l'injection d'eau suivi d'une solution de NaOH 50 mM et de NaCl 137 mM et d'une nouvelle injection d'eau permet de réutiliser de nombreuses fois (de l'ordre d'une dizaine) notre biocapteur fonctionnalisé avec des oligonucléotides par électrocopolymérisation.

III.1.2.4. Récapitulatif

En résumé, nous avons montré la spécificité de la mesure d'interaction entre oligonucléotides courts ($M = 4500$ Da) avec notre banc d'imagerie SPR fonctionnalisé par électrocopolymérisation. Nous avons aussi tenté de détecter des mutations ponctuelles, ce qui a bien fonctionné dans le cas de la séquence N* mais est resté ambigu dans le cas de la

séquence **M1***. Sans optimisation, la différence entre séquence complémentaire et séquence mutée n'est donc pas encore assez significative pour faire un diagnostic sûr. La tendance logique des résultats obtenus laisse tout de même envisager la possibilité de les distinguer en optimisant la concentration, la composition et la longueur des sondes ainsi que la composition du tampon. Lors d'une expérience semblable en microscopie de fluorescence [131], de tels résultats avaient été obtenus (la détection sans ambiguïté des SNP avait nécessité le passage à une température $T = 50^{\circ}\text{C}$ et l'ajout de chlorure de tetraméthylammonium à 1,8 M). De même, l'application de cette méthode à des séquences plus longues demande aussi une optimisation des conditions d'hybridation ainsi que l'illustrent les résultats obtenus avec la séquence **Sg0**. Malgré cela, toutes ces phases d'optimisation peuvent être accélérées grâce à l'imagerie qui permet d'analyser plusieurs réactions simultanément et à notre protocole de dénaturation qui permet de multiples utilisations d'une même lame.

III.2. PROTEINES

III.2.1. Contexte

Les protéines sont des molécules aux multiples propriétés remplissant un nombre considérable de fonctions comme la catalyse des réactions chimiques du métabolisme biologique (enzymes), le stockage de molécules (protéines de liaison), le transport actif ou passif d'un grand nombre de composés à travers les membranes (transporteurs, canaux), les communications cellulaires (hormones peptidiques, récepteurs), l'architecture et le mouvement (protéines du cytosquelette) et la reconnaissance du non-soi (anticorps)...

Alors que la puce à ADN sert principalement à quantifier le niveau d'expression des ARN à travers les interactions ADN/ARN mais aussi, plus minoritairement, à séquencer un brin d'ADN ou à détecter une modification de ce brin sans présumer de la fonction de ce brin ni de l'influence de la modification éventuelle, la puce à protéines peut permettre de quantifier la fonctionnalité des protéines. Un brin d'ADN, après transcription en ARN, sert à coder une protéine. Une puce à protéines, va alors permettre un criblage de toutes les cibles possibles d'une protéine donnée puis, dans le cas d'une protéine connue comme la p53, d'évaluer l'influence d'une mutation donnée du gène codant cette protéine sur sa fonctionnalité (modification de l'affinité entre p53 et ses différents ADN double-brins cibles) et donc sur de nombreuses maladies (la p53 est mutée dans plus de la moitié des cancers

humains). En conséquence, ces puces constituent un outil de choix pour la protéomique, qui est l'étude de l'ensemble des protéines fabriquées par les gènes et qui est le domaine qui a émergé suite au décodage du génome humain.

III.2.1.1. De l'ADN à la protéine : l'expression génétique

Afin de mieux comprendre les différents processus qui permettent, à partir d'une séquence d'ADN, d'obtenir une protéine fonctionnelle, nous allons essayer de donner un bref aperçu de ces différentes étapes résumées dans la Figure 96. L'information génétique (comme la structure d'une protéine par exemple) contenue dans une séquence ordonnée de nucléotides est regroupée sous forme de gènes. La présence d'un gène sur un brin d'ADN est toujours annoncée par la présence d'une séquence spéciale appelée promoteur, qui peut faire partie ou non de ce gène (la structure n'est pas générale). Ce promoteur est le site de fixation de l'ARN polymérase qui va initialiser l'expression du gène.

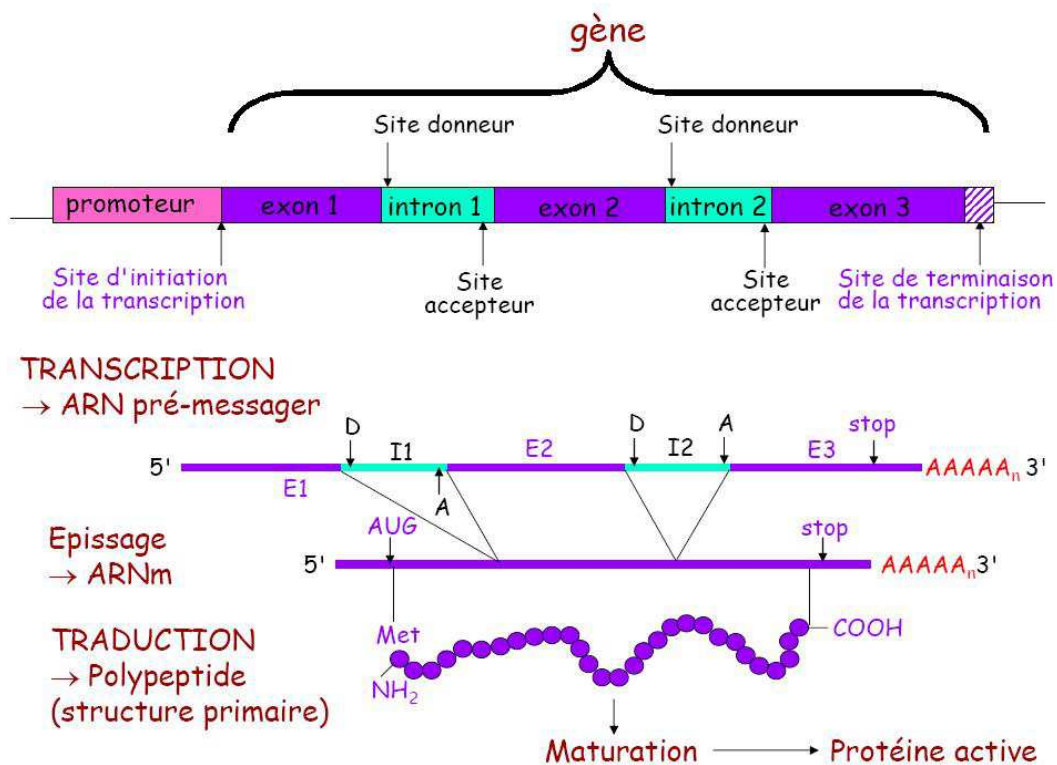


Figure 96 : Du gène eucaryote à la protéine. Un gène eucaryote, composé d'exons (séquences codantes) et d'introns (séquences non codantes) est toujours précédé d'un promoteur. Ce promoteur permet à l'ARN polymérase de se fixer sur le gène et d'initier la transcription. Le résultat de la transcription est un brin d'ARN pré-messenger qui, après excision des introns (épissage), est transformé en ARN messenger. Ce brin d'ADN est ensuite traduit en une chaîne polypeptidique qui, après maturation (formation d'une structure secondaire, tertiaire, ...), devient une protéine active.

Un gène eucaryote (provenant d'un organisme dont la ou les cellules ont un noyau) tel que celui qui est représenté dans la Figure 96 est composé de différentes parties, codantes (exons) ou non codantes (introns). La régulation de l'expression d'un gène se fait par l'intermédiaire de nombreux facteurs (protéines) qui, en se fixant sur ou près du promoteur, affectent (répression ou activation) l'initialisation de la transcription [136].

Lorsque l'initialisation de la transcription est activée, l'ARN polymérase, fixée sur le promoteur du gène, commence à parcourir le gène et à la transcrire en ARN pré-messager. Cet ARN pré-messager subit alors une étape d'épissage qui consiste à exciser les introns et réunir les exons pour le transformer en ARN messenger mature. L'ARN messenger se lit ensuite par groupe de trois bases appelés codons, chaque codon permettant, lors du processus de traduction, le positionnement d'un acide aminé (parmi 20 acides différents) donné dans une chaîne polypeptidique en voie de synthèse. Ce processus de traduction se produit, chez les eucaryotes, dans le cytoplasme de la cellule (en dehors du noyau) et commence par un codon d'initiation, le plus souvent AUG qui code une méthionine (Figure 96). Une fois l'ARNm dans le cytoplasme, il se fixe à un ribosome au niveau de ce codon qui va alors commencer, par l'intermédiaire d'un ARN de transfert, la traduction des codons en chaîne polypeptidique jusqu'à l'apparition d'un codon non-sens (codon ne correspondant à aucun acide aminé). Pour finir cette chaîne linéaire d'acides aminés se stabilise sous la forme d'une structure en trois dimensions (structure secondaire, tertiaire et quaternaire), caractéristique de sa fonctionnalité, c'est la maturation.

Une protéine est donc formée par une longue chaîne d'acides aminés (de cent à plusieurs centaines de milliers) associés les uns aux autres par des liaisons peptidiques. Ces liaisons chimiques s'établissent entre le groupement amine d'un aminoacide (NH_2) et le groupement carboxyle (COOH) d'un autre (Figure 96). Cela explique que les protéines soient orientées selon leur deux extrémités : le N-terminal et le C-terminal. Les protéines, généralement solubles dans l'eau, adoptent une conformation finale qui conditionne la fonction qu'elles rempliront.

Le processus, ici volontairement simplifié, d'expression génétique nous permet déjà de comprendre qu'une mutation de la séquence d'ADN influera différemment suivant sa position.

III.2.1.2. Le système immunitaire

Le système immunitaire joue un rôle essentiel dans la protection d'un organisme contre les agents pathogènes extérieurs. Ce système repose sur la différenciation du soi et du non-soi à travers la reconnaissance des antigènes (corps étranger, caractéristique du non-soi, de nature et de caractéristiques extrêmement diverses : protéines, acides nucléiques, lipides, molécules synthétiques, ...) par des anticorps. La découverte de ce système immunitaire représente une étape majeure de l'histoire contemporaine des sciences de la vie. Les répercussions de cette découverte ont par ailleurs largement dépassé le cadre de la recherche, pour faire naître une industrie chimique, pharmaceutique et biotechnologique très diversifiée. Nous allons nous limiter dans cette sous-partie, introductive aux expériences réalisées durant la thèse, à l'étude des interactions antigène-anticorps, en particulier pour les anticorps de type IgG. En effet, certains antigènes peuvent provoquer une réponse immunitaire, qui dépend des potentialités immunologiques de l'hôte, sous la forme d'une synthèse d'anticorps. L'efficacité de la réponse immunitaire est alors caractérisée par ces interactions antigène-anticorps.

III.2.1.2.1. Structure des immunoglobulines

Les anticorps sont des glycoprotéines, c'est-à-dire des protéines associées à des complexes hydrocarbonés (sucres). Ils font partie de la superfamille des immunoglobulines produites par les plasmocytes, et susceptibles de se lier de façon spécifique et non-covalente à un antigène. Les immunoglobulines sont divisées en cinq classes (IgA, IgD, IgE, IgG et IgM) mais nous allons nous limiter dans cette sous-partie aux immunoglobulines de type G qui représentent 80% des anticorps chez l'homme.

La structure de base de toutes les immunoglobulines se divise en quatre chaînes polypeptidiques (deux lourdes et deux légères), liées par des liaisons disulfides, qui se retrouvent sous la forme d'un "Y" (Figure 97). Les extrémités des bras de ce "Y", du côté N-terminal, sur les chaînes lourdes et légères, sont connues pour avoir une composition variable en acides aminés. Elles diffèrent aussi en longueur suivant les anticorps et sont principalement responsables de la spécificité et de l'affinité de la reconnaissance des antigènes cibles par les anticorps. Ces deux extrémités, qui sont les sites de combinaisons à l'antigène, sont aussi appelées paratopes (Figure 97) tandis que la partie de l'antigène reconnue par le paratope est appelée épitope. Une immunoglobuline possède deux paratopes identiques mais un antigène peut posséder différents épitopes et donc être reconnu par différents anticorps.

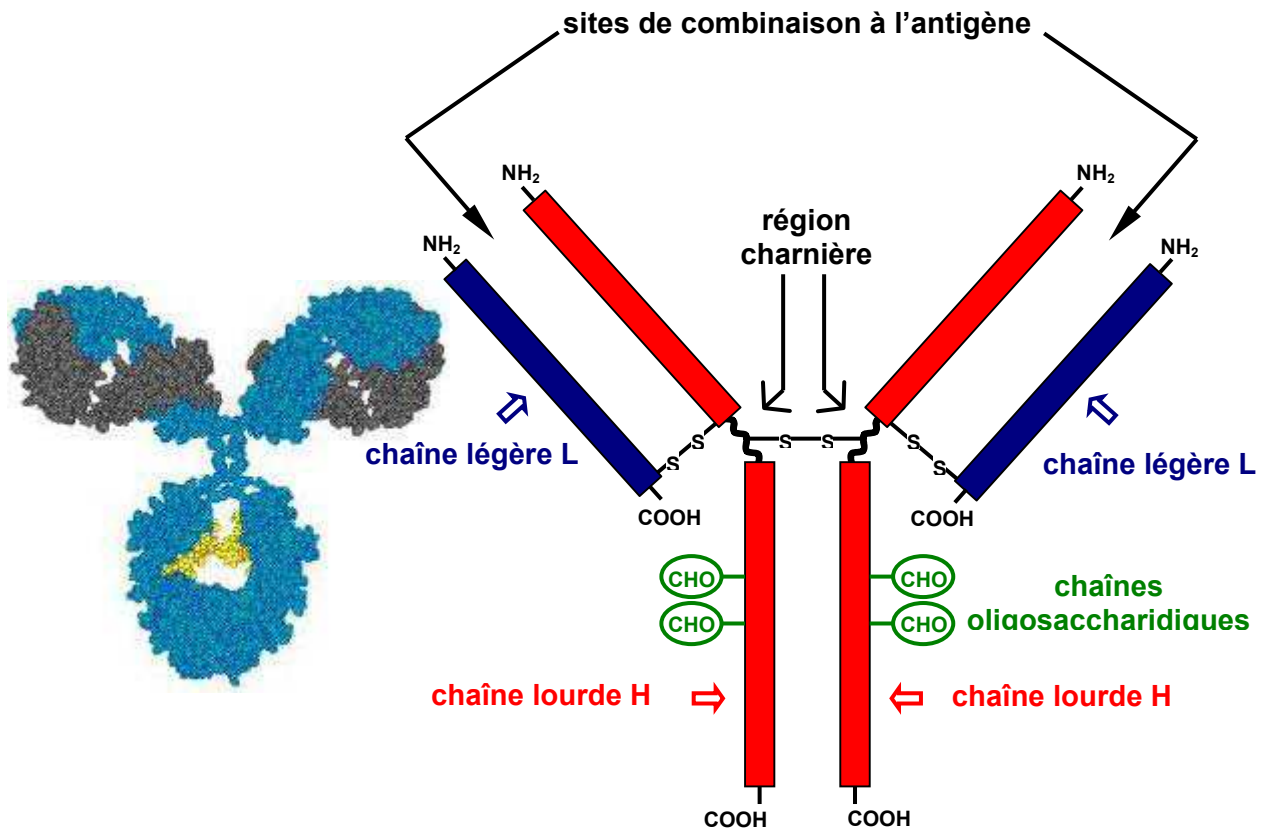


Figure 97 : Modélisation tridimensionnelle et structure correspondante d'une IgG. Cette immunoglobuline, composée de deux chaînes légères L et de deux chaînes lourdes H liées par des liaisons disulfides, possède deux sites de combinaisons à l'antigène ou paratopes.

Pour finir la description des immunoglobulines de type G, voici quelques données techniques. La masse molaire d'une molécule d'IgG vaut environ 150 kDa [137], sa valeur exacte dépendant de la composition en acides aminés du paratope. Une molécule d'IgG occupe un volume d'environ 15x5x5 nm³ mais ces dimensions peuvent changer grâce à la flexibilité de la région charnière (Figure 97), composée de cystéines (acide aminé).

III.2.1.2.2. Exemple de reconnaissance immune : les tests de grossesse

Les tests de grossesse sont pour la plupart basés sur la détection et le dosage d'une hormone, l'hormone chorionique gonadotrope humaine. En effet, cette hormone (hCG) est physiologiquement sécrétée par la femme uniquement pendant sa grossesse. Cette hormone, d'une masse moléculaire de 38 kDa, est composée de deux sous-unités α et β . Cette seconde

sous-unité est aussi produite par des tumeurs malignes dont elle constitue le marqueur. Présente chez un homme, elle constitue un diagnostic d'un cancer des testicules [138].

Chacune des deux sous-unités de l'hCG possède un épitope spécifique pouvant être reconnu par un anticorps différent [139], l'une par l'anticorps HT13 et l'autre par l'anticorps FBT10. Cette propriété de l'hCG peut être très intéressante dans le cas d'une détection par notre montage SPR car si le signal d'une interaction HT13/hCG mesuré est trop faible, il peut alors être amplifié par la méthode sandwich (décrite dans la sous partie I.2.6.2) avec l'anticorps FBT10, le rôle des deux anticorps pouvant être inversé [140].

Les tests de teneur de sérum en hCG sont fiables dès 48 heures après la conception. Le test d'urine est une méthode très populaire d'autodiagnostic puisque l'hCG peut être détectée dans les urines. Ce type de test est commercialisé par un grand nombre de compagnies pharmaceutiques qui revendiquent une détection sûre à 99% [141]. Nous avons choisi d'utiliser ce modèle très connu simplement pour valider la possibilité de fonctionnalisation de la surface avec des protéines par électrocopolymérisation et pour valider le suivi des interactions antigène-anticorps avec le banc d'imagerie SPR.

III.2.1.3. Cancer et contrôle du cycle cellulaire

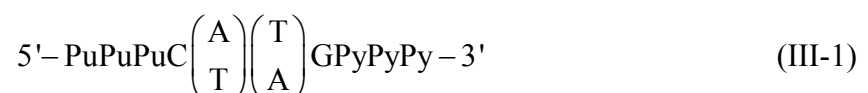
Maladie taboue longtemps considérée comme incurable, le cancer ou plutôt les cancers peuvent être aujourd'hui souvent combattus avec succès grâce aux progrès incessants de la recherche scientifique. Les nouveaux traitements et l'amélioration des conditions de vie des malades font espérer la multiplication des guérisons. Le cancer est en fait un terme général qui recouvre plus de cent maladies caractérisées par une prolifération incessante de cellules. L'ensemble des cellules cancéreuses forme une masse appelée tumeur qui peut atteindre, sans intervention médicale, plusieurs centimètres de diamètre. Les tumeurs se divisent en deux catégories, les tumeurs bénignes et les tumeurs malignes.

Une tumeur est une formation pathologique de tissu nouveau ressemblant au tissu normal adulte ou embryonnaire aux dépens duquel elle s'est développée, qui a tendance à persister et à s'accroître après l'arrêt des stimulus qui lui ont donné naissance, et qui échappe aux règles biologiques de la croissance et de la différenciation cellulaire. La plupart du temps, les tumeurs bénignes (angiomes, fibromes...) voient leur croissance cesser spontanément. Tandis que lorsqu'un cancer se déclare, cela signifie qu'une tumeur maligne s'est développée.

Cette tumeur se caractérise alors par une délimitation imprécise, une capacité d'envahissement des tissus et vaisseaux voisins et une tendance à disséminer par la production de métastases (foyers secondaires d'affection).

La protéine p53 joue un rôle crucial dans la réponse cellulaire aux dommages subis par l'ADN. En effet, c'est un facteur de transcription qui se regroupe sous forme de tétramères (groupe de quatre protéines) et qui se lie, par sa partie centrale, à des séquences spécifiques d'ADN activant ainsi l'expression de ses gènes cibles. Le produit de ces gènes induit soit un arrêt du cycle cellulaire, soit l'apoptose (suicide des cellules), protégeant ainsi les cellules contre les phénomènes de prolifération et donc de cancérisation. La protéine p53 est le produit d'un gène suppresseur de tumeur qui est muté dans plus de 50% des cancers humains : ces mutations faux-sens recouvrent plus de 1300 p53 mutantes différentes [142].

L'activation de la protéine p53, en réponse à un stress, conduit à la transcription de nombreux gènes qui contiennent un ou deux sites de reconnaissance de la p53 soit dans leur séquence promotrice (séquence au niveau de laquelle l'ADN polymérase se fixe et initie la transcription) ou intronique (séquence non codante du gène) [143]. L'interaction avec l'ADN est certainement une des activités les plus importantes bien qu'aussi une des moins bien connues de la protéine p53 [144] puisque, contrairement à d'autres facteurs de transcription, ses sites de reconnaissance sont extrêmement dégénérés [145] : aucun des gènes cibles de la p53 identifiés à ce jour ne contient la même séquence de reconnaissance [146]. Cette hétérogénéité pourrait en partie rendre compte de la variabilité de la réponse de la p53 en fonction du type et de l'intensité du stress. C'est aussi fortement probable que cette réponse soit modulée par d'autres protéines cellulaires. De manière empirique, une séquence consensus d'ADN simple brin a tout de même été définie pour correspondre au mieux à toutes les séquences reconnues par la p53 (bien que certains gènes cibles ne contiennent pas exactement cette séquence consensus). La protéine p53 se fixe donc sur deux copies contiguës de la séquence ADN consensus suivante [145] :



avec Pu, une base purique (G ou A) et Py, une base pyrimidique (C ou T).

Lorsque cette protéine p53 est mutée (ou plus exactement lorsqu'elle est exprimée par un gène muté), ses capacités d'interaction avec l'ADN restent complexes et n'ont pas encore été suffisamment explorées. Premièrement, il y a une hétérogénéité très marquée de la perte de fonctionnalité des différentes p53 mutantes en ce qui concerne leur capacité à reconnaître certains promoteurs de transcription, ce qui se traduit par différentes activités de transactivation. L'exemple le plus connu est celui du mutant H175P, qui ne reconnaît plus les promoteurs des gènes de l'apoptose comme bax, mais qui reconnaît ceux du gène antiprolifératif p21 [147]. Plusieurs études récentes ont montré que la majorité des protéines p53 mutées présentent divers degrés d'activité résiduelle de transactivation, ce qui pourrait rendre compte de la grande diversité phénotypique du comportement des tumeurs en réponse à une thérapie [148]. Il a également été montré que quelques protéines p53 mutantes pouvaient acquérir la capacité de reconnaître de nouvelles séquences d'ADN [149].

Nous avons essayé, durant la thèse, de quantifier la réactivité de la protéine p53 sauvage envers certaines cibles afin de servir de référence à une mesure ultérieure de fonctionnalité d'une protéine p53 issue d'un gène muté. L'étude de la fonctionnalité de ces protéines mutées devrait permettre, dans un futur proche, de connaître la gravité d'une mutation donnée du gène p53 et donc de mieux adapter les traitements des patients. Ainsi, alors que dans l'application précédente (sous-partie III.1.2), nous détectons la présence ou non d'une mutation sur le gène κ -ras susceptible d'induire une modification de la protéine codée par ce gène, dans l'application que nous allons présenter par la suite, le but est de mesurer les variations d'affinité entre la protéine p53 et ses différents ADN cibles en fonction de la mutation du gène codant la p53. En résumé, les puces à ADN permettent de détecter une anomalie génétique tandis que les puces à protéine permettent d'évaluer la gravité de cette anomalie.

III.2.2. Interactions anticorps/antigène liées à l'hormone de grossesse

Les expériences présentées dans cette partie ont été réalisées en collaboration avec Genoptics [63], jeune pousse développant un système d'imagerie SPR issue de précédents travaux de notre équipe de recherche. Elles ont été réalisées peu de temps après les expériences κ -ras décrites précédemment, ce qui se traduit par quelques améliorations du banc

de mesure, notamment en ce qui concerne la conversion du signal mesuré en variations de réflectivité.

III.2.2.1. Matériel et méthodes

Le dispositif expérimental que nous avons utilisé pour ces expériences est exactement le même que celui décrit dans la sous-partie III.1.2.1 avec prisme équilatéral en SF10 et lame dorée en BK7. Pour ces expériences, la fonctionnalisation par électrocopolymérisation a été réalisée sur des lames dorées selon le protocole décrit dans la sous-partie II.1.2.2.3. Les dépôts réalisés au CEA de Grenoble, sont composés de plusieurs plots ($\phi \approx 700 \mu\text{m}$) distincts de polypyrrole déposés par électrocopolymérisation ($U = 2 \text{ V}$, $t = 125 \text{ ms}$) d'une solution de tampon phosphate ($\text{pH} = 7$) contenant du pyrrole non greffé (20 mM) et des pyrroles-immunoglobulines (25 μM). Cela correspond à un ratio d'une IgG pour 800 molécules de pyrrole. Ces différents anticorps, de masse molaire 150 kDa, fixés sur les lames sont les suivants : **IgG polyclonale de lapin**, **IgG polyclonale d'humain** et **IgG anti-hCG monoclonale FBT10 issue de la souris** (anticorps monoclonal anti-hCG décrit dans la sous-partie III.2.1.2.2).

Les cibles utilisées au cours des expériences sont l'hormone de grossesse (**hCG**), **IgG anti-lapin polyclonale issue de la chèvre**, **IgG anti-hCG monoclonale issue du lapin** et **IgG anti-humain polyclonale issue de la souris**. Ces cibles vont nous servir à valider les modèles d'interactions décrits dans les trois figures suivantes.

- modèle IgG d'humain : un anticorps provenant d'un humain est reconnu comme un antigène par la souris.

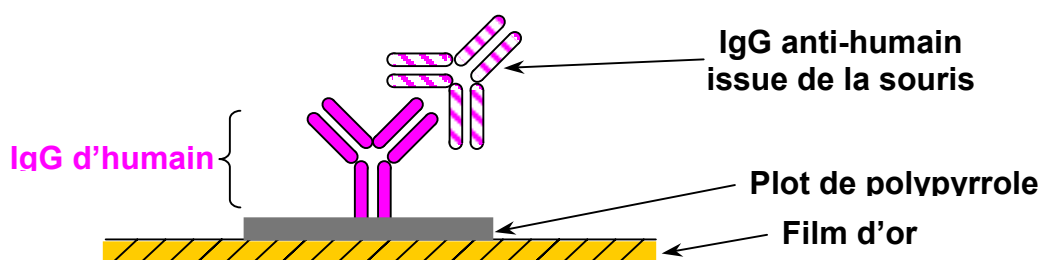


Figure 98 : Détection d'antigènes humains. Interaction entre une IgG polyclonale issue d'humain et une IgG anti-humaine polyclonale issue de la souris.

- modèle IgG de lapin : un anticorps provenant d'un lapin est reconnu comme un antigène par la chèvre.

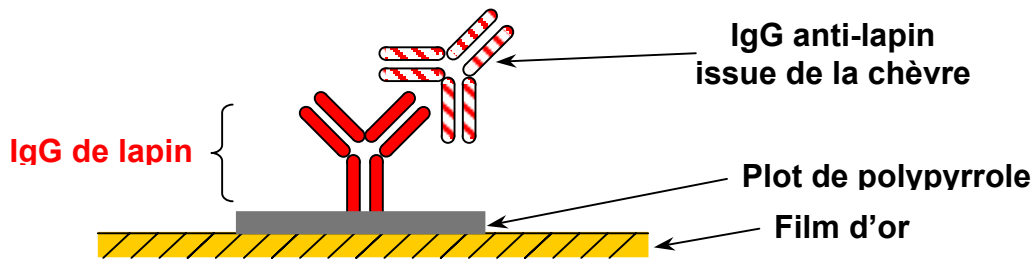


Figure 99 : Détection d'antigènes de lapin. Interaction entre une IgG polyclonale issue de lapin et une IgG anti-lapin polyclonale issue de la chèvre.

- modèle hormone hCG :

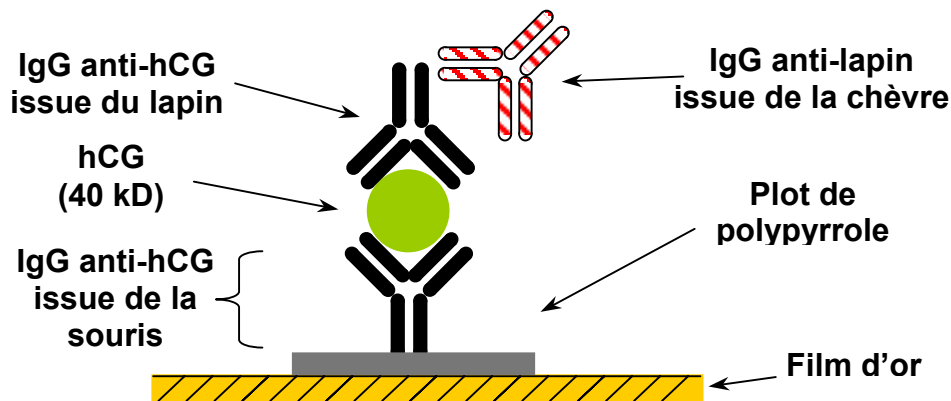


Figure 100 : Détection de l'hormone de grossesse et amplification par méthode sandwich.
Interaction primaire entre une IgG anti-hCG monoclonale issue de la souris et l'hCG.
Interaction secondaire entre l'hCG et une autre IgG anti-hCG monoclonale issue du lapin.
Interaction tertiaire entre une IgG anti-hCG monoclonale issue de lapin et une IgG anti-lapin polyclonale issue de la chèvre.

La présence éventuelle d'une cible biotylée, l'IgG anti-lapin polyclonale issue de la chèvre dans le cas de la Figure 100, permet une détection en microscopie de fluorescence par une étape supplémentaire d'interaction entre la biotine et la streptavidine marquée à la phycoérythrine [59, 150] qui est une molécule fluorescente et donc cela permet une comparaison des résultats selon plusieurs méthodes de mesure. Mais, dans le modèle de cette figure, la SPR devrait permettre d'analyser les différentes étapes alors que la microscopie de fluorescence, ne détectant que les molécules marquées, ne permet que d'extrapoler la construction à partir des résultats de l'étape finale.

Les expériences que nous allons analyser sont réalisées en tampon PBS avec de la BSA 1 % (m/v) et du tween 0,05 % (v/v). La BSA est une protéine destinée à limiter les interactions non spécifiques par saturation. Toutes les expériences sont réalisées à débit constant égal à 25 $\mu\text{L}/\text{min}$. Le protocole de l'expérience, inspiré du protocole type décrit dans la sous-partie I.2.4.1 (page 50), est le suivant :

- Injection du tampon dans la cuve en téflon jusqu'à stabilisation de la réflectivité (blocage de la lame par la BSA).
- Mesure de la réflectivité en fonction de l'angle d'incidence afin de déterminer l'angle de travail en cinétique (pente de la courbe mesurée maximale).
- Positionnement du miroir à l'angle de mesure déterminé précédemment.
- Injection en cuve des cibles à analyser diluées à différentes concentrations dans le tampon.
- Injection du tampon pour le rinçage et pour mesurer dans le même milieu la différence de réflectivité due à l'interaction entre les sondes et les cibles.
- Injection de la solution de dénaturation, solution contenant de la glycine 0,1 M et de l'acide chlorhydrique (pH = 2,3).
- Injection du tampon afin de comparer dans le même milieu le niveau de réflectivité avant l'expérience et celui après la régénération.

En utilisant ce protocole, nous comptons vérifier la réalisation des trois modèles différents décrits précédemment et leur spécificité pour confirmer la fonctionnalité de notre appareil d'imagerie SPR combiné au greffage par électrocopolymérisation dans le cadre d'interactions protéines/protéines.

III.2.2.2. Résultats

III.2.2.2.1. Détection d'antigènes humains et de lapins

Nous allons tout d'abord commencer par valider les deux modèles simples décrits dans la Figure 98 et la Figure 99, ce qui devrait illustrer la spécificité des interactions anticorps/antigène. Le résultat de l'électrocopolymérisation des trois plots correspondant à l'IgG polyclonale de lapin, à l'IgG polyclonale d'humain, à l'IgG anti-hCG monoclonale HT13 issue de la souris ainsi que d'un plot composé uniquement de pyrrole est représenté sur la Figure 101. Cette image a été acquise sur notre banc SPR en polarisation TM lorsque la cuve en téflon est remplie d'eau et pour une incidence voisine de l'angle de travail en cinétique.

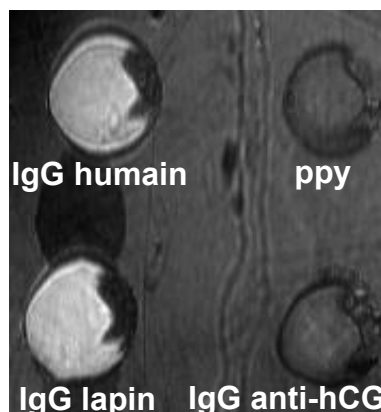


Figure 101 : Image SPR en eau des plots d'immunoglobulines pyrrolées et du plot de polypyrrole (ppy).

Sur le bord droit de chaque plot déposé sur cette lame, nous apercevons une portion d'anneau de contraste différent du reste du plot. Cet anneau est très sûrement dû à l'extrémité du cône de la micropipette utilisée pour l'électrocopolymérisation (sous-partie II.1.2.2.3). La marque sur les plots indique que cette extrémité était irrégulière et qu'une partie de l'extrémité de l'embout était en contact avec la lame. Ceci ne gêne en rien les mesures puisque les bords des plots ne sont pas pris en compte pour les mesures. Ci-dessous est représentée la même lame où seules les zones utilisées par le programme pour l'analyse sont visibles.

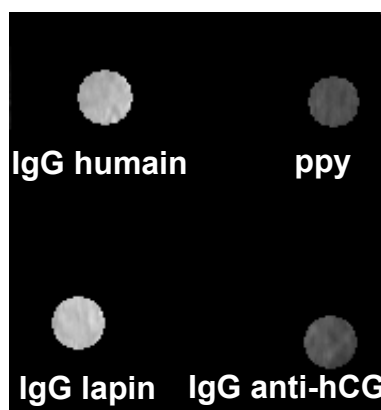


Figure 102 : Masque de calcul utilisé sur les images SPR des plots de la Figure 101.

Sur la Figure 102, nous voyons que les effets de bord ont disparu et que la zone d'intégration de chaque plot utilisée par le programme est assez homogène. Sur ces images, nous voyons aussi que les plots d'IgG polyclonaux (lapin et humain) sont plus contrastés, indiquant une plus grande épaisseur de ces plots et donc, a priori, une plus grande densité d'IgG déposée.

La première étape de notre expérience consistait donc à injecter les anticorps polyclonaux issus de la chèvre et dirigés contre les antigènes de lapin. Pour cette première étape, nous avons choisi une concentration d'injection de 2,2 nM. Les résultats de cette injection sont résumés dans la figure suivante.

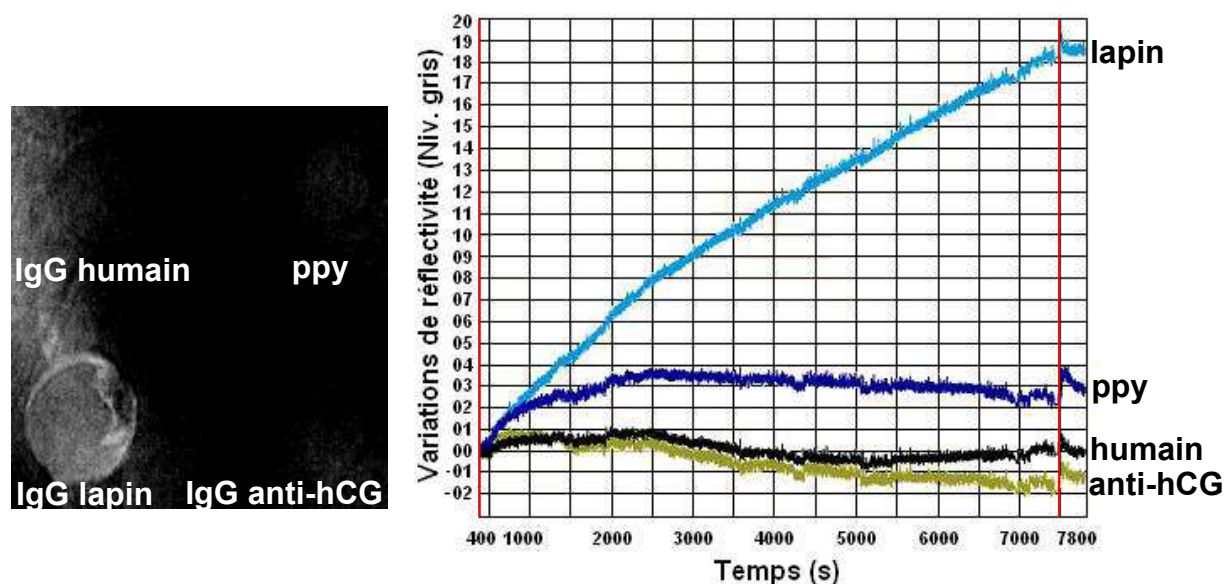


Figure 103 : Image de la différence de réflectivité due au passage de l'**IgG anti-lapin polyclonale issue de la chèvre** (2,2 nM) et courbes de variation de réflectivité en fonction du temps correspondantes. Les deux barres verticales rouges matérialisent les transitions entre l'injection du tampon, de l'**IgG** (durant 2 heures) et du tampon ainsi que les images utilisées pour la différence.

Le modèle IgG de lapin (Figure 99) a été testé pendant cette cinétique. Les résultats montrent que l'anticorps anti-lapin reconnaît bien l'IgG de lapin et qu'il ne reconnaît ni l'IgG anti-hCG FBT10 provenant de la souris ni l'IgG d'humain. Par contre, une légère fixation de cet anticorps s'est produite sur le polypyrrole non greffé, cette fixation est probablement due à une contamination du plot par de l'IgG de lapin lors du dépôt (mauvais rinçage du cône de pipette avant l'électrodéposition). Ces résultats, bien que laissant un doute sur le polypyrrole (qui a par la suite été levé lors d'expériences non présentées dans ce manuscrit), confirment la spécificité de l'interaction mais, le défaut de calibration du banc de mesure ne nous permettant pas de mesurer la réflectivité en pourcents, nous devons nous contenter pour l'instant de ces interprétations semi-quantitatives.

Bien que la concentration d'injection des anticorps (2,2 nM) soit inférieure à la concentration minimale détectable définie à la fin du premier chapitre (I.3.2), la détection de

l'interaction s'est faite sans aucune difficulté car cette concentration minimale détectable avait alors été définie pour un oligonucléotide de masse molaire $M_{ODN} = 4,5$ kDa alors que la masse molaire d'une immunoglobuline vaut $M_{IgG} = 150$ kDa. Malgré cela, l'utilisation d'une telle concentration d'injection nous place dans de mauvaises conditions pour un calcul d'affinité fondé sur l'ajustement des cinétiques : toutes les cibles en solutions passant à proximité des plots se fixent sur la sonde, nous sommes limités par le phénomène de transport de masse (décrit précédemment dans la sous-partie II.3.3.4, page 147), ce qui implique que l'hypothèse d'une concentration constante en analyte utilisée dans le modèle monovalent (voir II.3.3.1) n'est plus valable. Nous avons injecté l'anticorps pendant deux heures et, bien que la quantité totale injectée soit largement suffisante pour saturer le plot, l'équilibre n'était toujours pas atteint lorsque nous avons commencé le rinçage. Cette hypothèse de limitation par transport de masse est validée par l'injection d'une concentration plus importante d'IgG anti-lapin dans la sous-partie suivante résultant en une cinétique d'interaction totalement différente.

La seconde étape de notre expérience consistait ensuite à injecter les anticorps polyclonaux issus de la souris et dirigés contre les antigènes humains. Pour cette seconde étape, nous avons choisi une concentration d'injection de 400 pM. Les résultats de cette injection sont résumés dans la figure suivante.

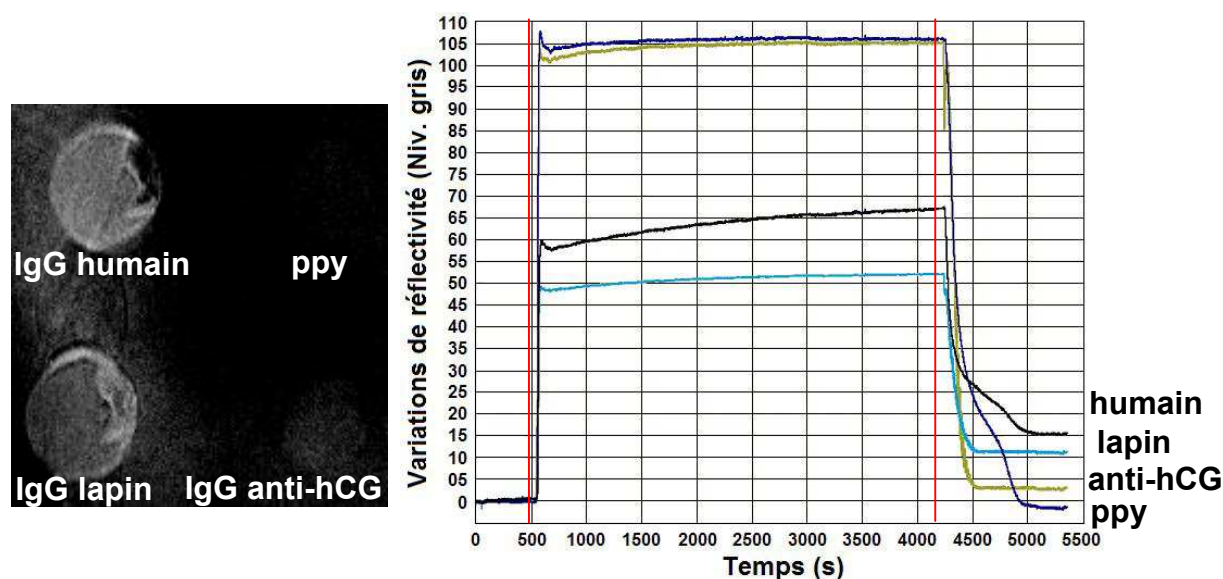


Figure 104 : Image de la différence de réflectivité due au passage de l'IgG anti-humain polyclonale issue de la souris (400 pM) et courbes de variation de réflectivité en fonction du temps correspondantes. Les deux barres verticales rouges matérialisent les transitions entre l'injection du tampon, de l'IgG (durant 1 heure) et du tampon. Les images utilisées pour la différence ont été choisies en tampon avant et après l'interaction.

Le modèle IgG d'humain (Figure 98) a été testé pendant la cinétique de la Figure 104. Le brusque saut de réflectivité à l'injection des cibles diluées dans le milieu d'interaction est dû à un changement d'indice du milieu couvrant et est compensé lors du retour en tampon pour le rinçage. Cette cinétique a été faite directement après la cinétique de la Figure 103, sans régénération puisque seul le plot contenant l'IgG de lapin avait réagi. Les résultats montrent que l'IgG anti-humain provenant de la souris a reconnu les immunoglobulines polyclonales d'humain mais s'est aussi fixée sur le plot IgG de lapin. Nous pouvons interpréter cela de deux façons : soit l'IgG de souris reconnaît l'IgG de lapin, soit cet anticorps reconnaît l'IgG anti-lapin provenant de la chèvre qui s'était fixé durant l'étape précédente sur ce plot. C'est ce qui est appelé réaction croisée en immunologie, c'est-à-dire que c'est la réaction d'un anticorps avec un antigène différent de celui qui en a induit la formation, due à des parentés antigéniques entre ces antigènes. Dans notre cas, les deux antigènes cibles de l'anticorps sont des immunoglobulines de type G qui, bien que provenant d'espèces différentes, sont en grande partie homologues [151]. D'autres expériences, dont les résultats ne sont pas exposés ici, ont été réalisées en microscopie de fluorescence au CEA de Grenoble et ont confirmé, dans la même configuration, la réaction croisée de l'anticorps anti-humain avec l'anticorps de lapin.

III.2.2.2.2. Détection de l'hormone de grossesse

Après les deux premières étapes préparatoires, qui ont montré que nos plots de protéines fonctionnalisés par électrochimie permettaient une étude des interactions anticorps/antigène de manière spécifique (en faisant attention aux réactions croisées possibles), nous allons maintenant présenter la dernière utilisation réalisée au cours de la thèse des puces fonctionnalisées avec des protéines pour valider le modèle hormone hCG décrit plus haut.

Pour cette expérience, nous avons utilisé une nouvelle lame dorée sur laquelle nous avons déposé 25 plots par électrochimie. Nous avons déposé deux espèces différentes : l'IgG polyclonale de lapin et l'IgG anti-hCG monoclonale FBT10 issue de la souris. Ces deux espèces sont représentées respectivement par les nombres 1 et 2 sur la Figure 105 qui illustre la disposition initiale des plots. Cette image a été acquise sur notre banc SPR en polarisation TM lorsque la cuve en téflon est remplie d'eau et pour une incidence voisine de l'angle de travail en cinétique.

1	2	2	2	1
2	1	1	1	1
2	1	2	2	2
2	1	1	1	2
1	2	2	2	1

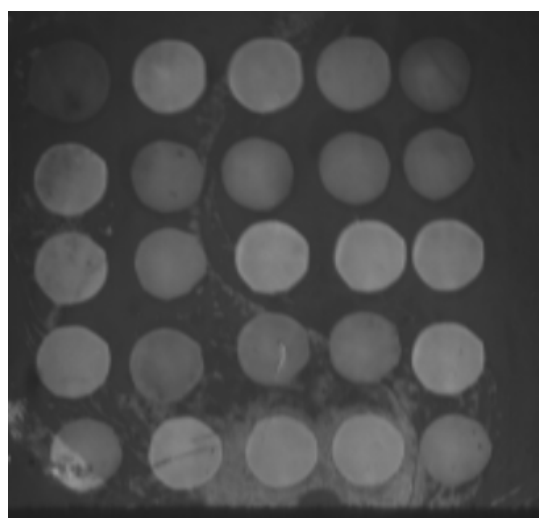


Figure 105 : Image SPR en eau des plots d'immunoglobulines pyrrolées. (1) représente les plots d'IgG polyclonale de lapin et (2) représente les plots d'IgG anti-hCG monoclonale FBT10 issue de la souris.

Contrairement aux expériences anticorps/antigène précédentes, nous sommes maintenant capables de convertir les niveaux de gris de l'image acquise par la caméra en variations de réflectivité ainsi que nous l'avons décrit dans la sous-partie II.3.1.1 (page 129). Nous avons aussi profité des deux essais précédents à faible concentration pour choisir une concentration d'injection des cibles plus adéquate, les différentes injections de cibles ont été effectuées avec une concentration voisine de 200 nM, soit avec des solutions cent fois plus concentrées que dans la Figure 103. Ces concentrations devraient nous permettre de nous retrouver dans des conditions plus favorables pour ajuster les cinétiques d'interaction selon le modèle monovalent développé dans le chapitre précédent (II.3.3).

Avant d'injecter l'hormone hCG, nous avons répété l'étape d'injection d'IgG anti-lapin polyclonale issue de la chèvre (réalisée avec le prisme précédent) mais à une concentration de 220 nM. Les résultats de cette injection sont résumés dans la Figure 106. Sur cette figure, les courbes cinétiques de l'or (en bleu) correspondent à des zones de calcul, de taille identique à celle des plots, situées sur des zones non fonctionnalisées de la lame et disposées sur une ligne au dessus et une ligne à droite de la matrice des plots déposés. Nous avons donc fait des mesures sur 11 plots fictifs d'or et 25 plots fonctionnalisés soit 36 plots en tout.

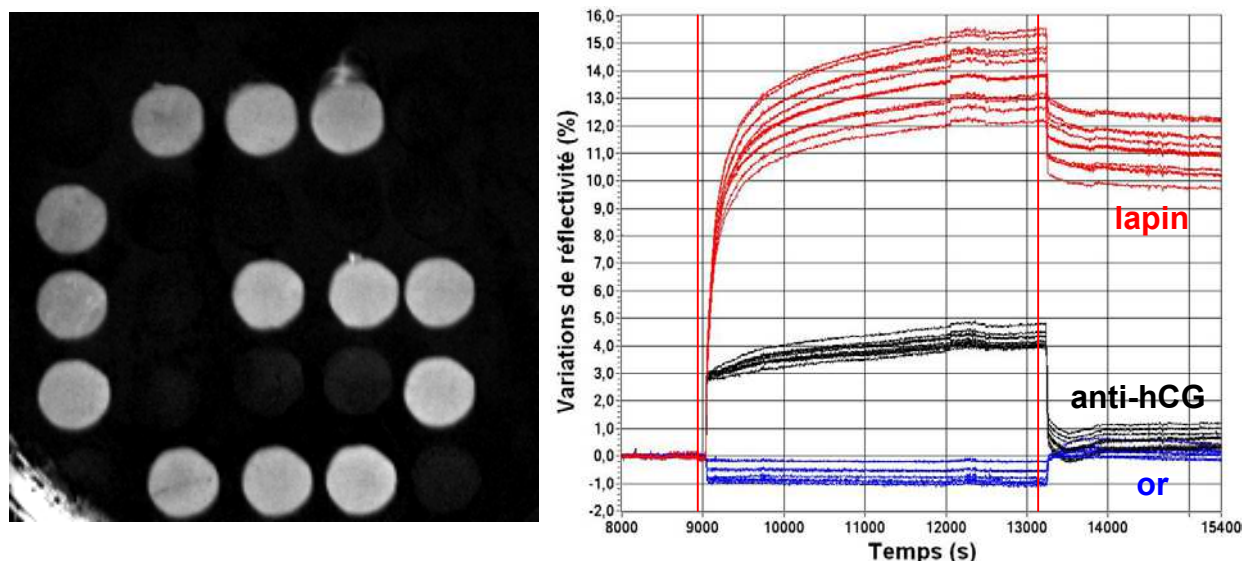


Figure 106 : Image de la différence de réflectivité due au passage de l'**IgG anti-lapin polyclonale issue de la chèvre** (220 nM) et courbes de variation de réflectivité en fonction du temps correspondantes. Les deux barres verticales rouges matérialisent les transitions entre l'injection du tampon, de l'**IgG** (durant 1 heure et 10 minutes) et du tampon. Les images utilisées pour la différence ont été choisies en tampon avant et après l'interaction.

Cette première injection sur cette nouvelle lame nous a permis de confirmer la spécificité de l'interaction anticorps/antigène entre l'IgG anti-lapin polyclonale issue de la chèvre et les antigènes (IgG polyclonale) issus du lapin. En effet, sur l'image différentielle de la Figure 106, nous voyons que seuls les plots d'IgG polyclonale de lapin ont fixé des cibles, ce que n'ont fait ni les plots d'or ni les plots d'IgG anti-hCG. De plus, la concentration en cibles utilisée (220 nM), beaucoup plus importante que précédemment, nous a permis de réduire le temps d'interaction puisque l'équilibre est quasiment atteint en une demi-heure. En utilisant l'équation (II-21) permettant de convertir les variations de réflectivité en taux de recouvrement et bien que nous n'ayons effectué aucune mesure préalable de calibration comme cette formule le requiert (voir II.3.2.1), nous pouvons estimer le taux de recouvrement surfacique Γ correspondant à la cinétique de la Figure 106 en remplaçant le coefficient issu de la calibration par sa valeur théorique. Les résultats de cette quantification ainsi que la dispersion des résultats sur les différents plots sont résumés dans le tableau suivant.

Plots	ΔR (%)	Γ (pg/mm ²)	Γ (fmol/mm ²)
IgG lapin	11 $\pm$ 0,8	1410 $\pm$ 100	9,4 $\pm$ 0,6
IgG anti-hCG	0,6 $\pm$ 0,3	75 $\pm$ 45	0,5 $\pm$ 0,3

Tableau 8 : Quantification des prises en **IgG anti-lapin polyclonale** ($M = 150$ kDa) sur les différentes sondes et dispersion correspondant aux plots fonctionnalisés avec la même espèce.

Après cette première injection préalable, la seconde étape de notre expérience sur cette lame consistait donc à réaliser les différentes injections pour vérifier la faisabilité du modèle hormone hCG (décrit Figure 100). Pour cette seconde étape, nous avons choisi des concentrations d'injection de 250 nM pour l'hCG, de 210 nM pour l'IgG anti-hCG et de 220 nM pour l'IgG anti-lapin. Les résultats de ces injections successives sont résumés dans la figure suivante.

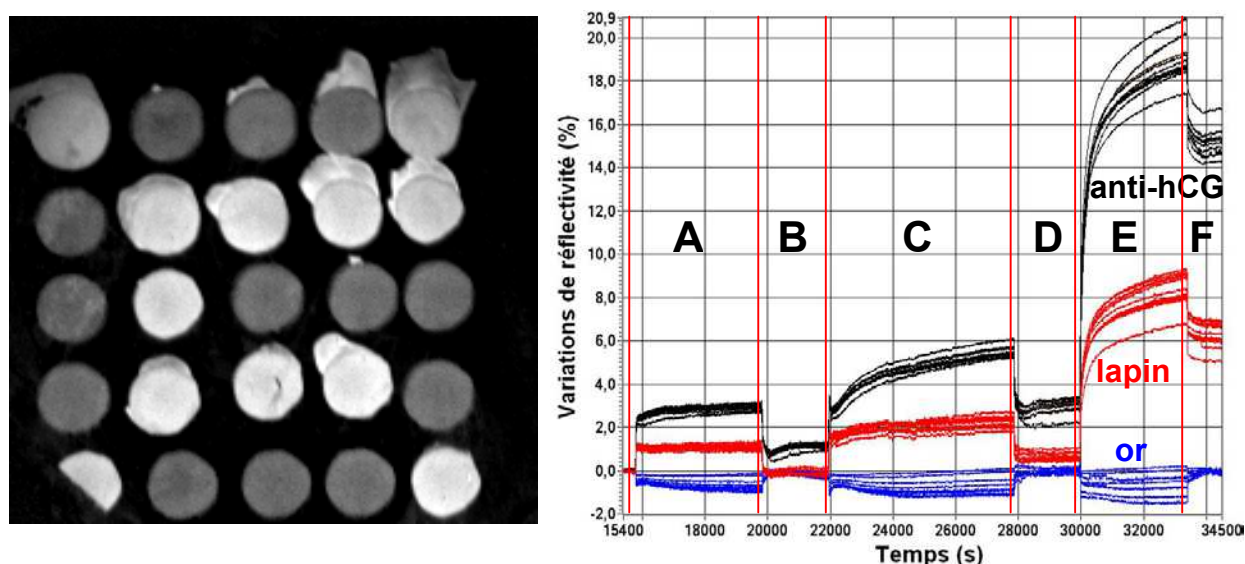


Figure 107 : Image de la différence de réflectivité et courbes de variation de réflectivité en fonction du temps dues au passage de : (A) **hCG** (250 nM), (B) tampon, (C) **IgG anti-hCG monoclonale issue du lapin** (210 nM), (D) tampon et (E) **IgG anti-lapin polyclonale issue de la chèvre** (220 nM). Les barres verticales rouges matérialisent les transitions entre l'injection du tampon et des différents réactifs avant le retour final en tampon (F). Les images utilisées pour la différence ont été choisies en tampon avant et après les interactions.

Sur la Figure 106, le retour en solution tampon (repéré par la lettre "B") suivant l'injection de l'hormone de grossesse (repérée par la lettre "A") montre une faible variation de réflectivité indiquant une fixation sur les plots d'IgG anti-hCG tandis que la fixation sur les autres plots, ou sur l'or, est nulle. La fixation d'hCG provoque une faible variation de

réflectivité car cette molécule est de faible poids moléculaires ($M_{hCG} = 38 \text{ kDa}$). Puisque nous connaissons des anticorps monoclonaux dirigés vers chacune des deux sous-unités composant l'hormone de grossesse humaine, nous pouvons amplifier le signal dû à la fixation de l'IgG anti-hCG FBT10 sur une sous-unité de l'hCG par l'injection d'une autre IgG anti-hCG dirigée vers l'autre sous-unité. Cette fixation d'une IgG issue du lapin, de masse molaire beaucoup plus importante que celle de l'hCG ($M_{IgG} = 150 \text{ kDa}$), suivie de l'injection de la même IgG dirigée contre le lapin que celle utilisée lors de la validation du modèle lapin de la Figure 99 a effectivement amplifié le signal de mesure qui est passé de $\Delta R = 1,2 \%$ à $\Delta R_t = 14,7 \%$. La conversion de ces différents résultats en taux de recouvrement surfacique est indiquée dans le tableau suivant.

Plots	Taux de recouvrement Γ (fmol/mm ²)		
	hCG	IgG anti-hCG	IgG anti-lapin
IgG lapin	$0 \pm 0,3$	$0,6 \pm 0,06$	$4,8 \pm 0,5$
IgG anti-hCG	$4,1 \pm 0,4$	$1,5 \pm 0,25$	$10,1 \pm 1,2$

Tableau 9 : Quantification des prises en hormone **hCG** ($M = 38 \text{ kDa}$) et en **IgG** ($M = 150 \text{ kDa}$) sur les différentes sondes et dispersion correspondant aux plots fonctionnalisés avec la même espèce.

Les résultats du Tableau 9 précisent ceux de la Figure 107. Les plots d'IgG de lapin n'ont pas fixé d'hCG mais quand même une très faible quantité d'IgG anti-hCG. Ces plots avaient déjà fixé des anticorps anti-lapin lors de la première injection sur cette lame mais ils en ont tout de même fixé une seconde fois, en quantité moins importante, lors de la dernière injection. Les plots d'IgG anti-hCG ont fixé 4 fmol/mm^2 d'hormone de grossesse. Une molécule d'hCG sur trois a ensuite fixé l'IgG anti-hCG (1 fmol/mm^2). Pour finir, ces plots ont fixé 10 fmol/mm^2 d'IgG anti-lapin, ce qui indiquerait un rapport de 7 molécules d'anticorps anti-lapin pour une molécule d'antigène de lapin. Bien sûr, la quantification de ces différentes étapes n'a été possible que par l'utilisation d'un système de mesure direct car l'utilisation d'un marqueur, de type fluorophore par exemple, nous aurait limité à une analyse globale à l'issue de toutes les injections.

III.2.2.3. Récapitulatif

En résumé, nous avons montré la spécificité de la mesure d'interaction entre anticorps et antigènes avec notre banc d'imagerie SPR fonctionnalisé par électrocopolymérisation.

Nous avons aussi montré que le greffage d'un groupe pyrrole à une immunoglobuline ne réduisait pas de manière notable sa fonctionnalité. Le fort poids moléculaire des protéines par rapport aux oligonucléotides utilisés dans l'application précédente a conduit à des mesures plus simples de signaux beaucoup plus importants, même pour des concentrations plus faibles en molécules cibles. Enfin, l'amélioration du banc de mesure nous a permis des mesures de variations de réflectivité en pourcents et donc une meilleure quantification des interactions.

III.2.3. Activité de liaison à l'ADN double-brin de la p53

Cette application a été développée dans le cadre d'une collaboration entre le laboratoire de Génomotoxicologie des Tumeurs de l'Institut Curie à Paris, dirigé par Thierry Soussi [152] pour la biologie (cette équipe est maintenant localisée à l'hôpital Tenon à Paris), l'équipe CREAB du CEA Grenoble [99] pour la chimie de surface et notre équipe [90] pour le système optique. Les différentes expériences que nous allons détailler sont le fruit d'une étroite collaboration entre deux post-doctorantes (Karen Brengel-Pesce pour le CEA et Delphine Capela pour l'institut Curie) et un doctorant (moi-même). Les résultats présentés dans cette partie ont fait l'objet d'une publication dans la revue internationale *Oncogene* [74].

III.2.3.1. Description du matériel utilisé

A partir de cette application, les expériences ont été réalisées sur le banc de mesure décrit dans la partie II.2 (page 100), c'est-à-dire que le changement d'incidence se fait maintenant grâce à une platine de rotation motorisée, le prisme est un prisme isocèle d'angle au sommet $A_p = 32^\circ$ en SF11 ($n = 1,776 @ \lambda = 650 \text{ nm}$) recouvert directement d'une couche d'or et la caméra est une caméra numérique 12 bits.

Les protéines p53 sauvage humaine que nous avons utilisées sont issues d'une surexpression par des baculovirus recombinants. Puisque la protéine p53 ne devient active que dans des conditions où l'organisme a été soumis à un stress (sous-partie III.2.1.3), il nous faut donc activer *in vitro* cette protéine pour qu'elle se fixe sur les séquences d'ADN double-brin spécifiques. Nous pouvons réaliser cette activation par la fixation d'un anticorps monoclonal HR231 [153] sur le C-terminal de la p53. Cette activation laisse libre la partie centrale de la protéine pour l'activité de liaison spécifique aux séquences ADN double-brin cibles de la p53.

Pour ces expériences, la fonctionnalisation par électrocopolymérisation a été réalisée directement sur les prismes dorés selon le protocole décrit dans la sous-partie II.1.2.2.3. Les dépôts réalisés au CEA de Grenoble, sont composés de différents plots ($\phi \approx 700 \mu\text{m}$) distincts de polypyrrole déposés par électrocopolymérisation ($U = 2 \text{ V}$, $t = 125 \text{ ms}$) d'une solution de tampon phosphate ($\text{pH} = 7$) contenant du pyrrole non greffé (20 mM) et des pyrroles-oligonucléotides à différentes concentrations. Ces différents oligonucléotides, appelés séquences zip, longs de 24 bases, sont décrits dans le tableau suivant.

Nom	Extrémité	Modification	Séquence	Extrémité
Zip 2	5'	Pyr-(T) ₁₀ -	CAGCACCTGACCATCGATCGCAGC	3'
Zip 4	5'	Pyr-(T) ₁₀ -	TGCGGGTACAGCACCTACCTTGCG	3'
Zip 6	5'	Pyr-(T) ₁₀ -	GACCGGTATGCGACCTGGTATGCG	3'
Zip 7	5'	Pyr-(T) ₁₀ -	TGCGATCGCAGCGGTAACCTGACC	3'
Zip 9	5'	Pyr-(T) ₁₀ -	GACCATCGTGCGGGTAGGTAGACC	3'

Tableau 10 : Séquence des oligonucléotides correspondant aux séquences zip et constituant les sondes du biocapteur. Ces séquences ont été modifiées en leur extrémité 5' par une chaîne de 10 Thymines (espaceur) suivie d'un groupe pyrrole pour la polymérisation.

Ces différentes sondes vont permettre une fonctionnalisation universelle de la puce comme nous allons l'expliquer dans la sous-partie suivante.

III.2.3.2. Puce à ADN universelle

En vue d'augmenter la polyvalence de notre biocapteur optique, nous avons utilisé une modification de la stratégie des zip-codes développée par N.P. Gerry *et al.* [154]. Chaque séquence zip-code est composée d'une séquence de 24 bases qui se divisent en 6 tétramères (groupe de 4 nucléotides) conçus pour que les zip-codes aient tous une température de fusion similaire et pour empêcher toute hybridation croisée entre les différentes séquences. De même, toutes les séquences pouvant s'auto-apparier (apparition de structures secondaires du type de la Figure 93) ont été éliminées. En clair, cette méthode permet de créer jusqu'à 1296 séquences zip-codes différentes qui, à $T = 65^\circ\text{C}$, s'hybrident spécifiquement à leur propre séquence complémentaire mais ne s'apparient pas du tout à aucune autre séquence zip-code complémentaire.

Pour nos expériences, nous nous sommes contentés d'utiliser 5 zip-codes différents dont la séquence est détaillée dans le Tableau 10. La séquence cible est alors un brin d'ADN partiellement double-brin composé d'une séquence double-brin cible de la p53 prolongée par une séquence simple-brin complémentaire de ces zip-codes. Un exemple de séquence cible et de sa sonde (zip-code) complémentaire est représenté dans le tableau suivant.

Nom	Séquence		
Zip 9	5' Pyr-(T) ₁₀ -	GACCATCGTGCGGGTAGGTAGACC	3'
BB9	5'	GGGCATGTCCGGGCATGTCC	3'
cZ9BB9	3'	CTGGTAGCACGCCCATCCATCTGGCCCGTACAGGCCCGTACAGG	5'

Tableau 11 : Exemple de cible modifiée pour se fixer sur une séquence zip-code sonde. Le double-brin d'ADN (partie droite en rouge des deux dernières lignes du tableau) est prolongé d'une séquence zip complémentaire qui va s'hybrider sur le zip-code (Zip 9) correspondant.

Cette technique présente plusieurs avantages. Premièrement, les ADN cibles peuvent être ôtées soit par chauffage soit par une solution alcaline (la solution que nous avons retenu, voir III.1.2.3.4), ce qui rend le capteur utilisable plusieurs fois. Deuxièmement, la séquence double-brin de la cible peut contenir n'importe quelle séquence d'ADN spécifique à un ligand donné (protéine ou autre) puisque la spécificité du biocapteur est définie par les séquences simple-brins complémentaires aux zip-codes. Enfin, cette méthode permet une fonctionnalisation en parallèle et sur le banc de mesure de tous les différents plots. La fonctionnalisation de la puce par des séquences spécifiques d'ADN double-brin peut donc être facilement contrôlée et quantifiée par imagerie SPR.

Voici les différentes séquences cibles spécifiques d'ADN double-brin utilisées pour nos expériences. Nous en avons étudiés cinq différentes dont les séquences sont détaillées dans le Tableau 12. **BB9** est une séquence artificielle correspondant parfaitement à la séquence consensus définie par la formule (III-1). **WAF1**, **mdm2** et **BAX** sont des séquences d'origine humaine, c'est-à-dire que ce sont des séquences cibles de la p53 naturellement présentes dans la cellule. Ces séquences ne correspondent pas parfaitement au modèle de la séquence consensus (les paires de bases ne correspondant pas sont en gras et en rouge dans le tableau). Enfin, **BB9M** est dérivée de la séquence consensus **BB9**, mutée sur quatre bases. Elle est utilisée en tant que contrôle négatif.

Nom	Séquence		
BB9	5'	GGGCATGTCCGGGCATGTCC	3'
cZ9BB9	3'	CTGGTAGCACGCCCATCCATCTGGCCCGTACAGGCCCGTACAGG	5'
WAF1	5'	GAACATGTCC CA ACATGTT G	3'
cZ2WAF1	3'	GTCGTGGACTGGTAGCTAGCGTCGCTTGTACAGG G TTGTACA AC	5'
mdm2	5'	GG T CAAGTTCAGACA C GTTC	3'
cZ6mdm2	3'	CTGGCCATACGCTGGACCATACGCCC AG TTCAAGTCTGT G CAAG	5'
BAX	5'	TC ACAAGTT A AGACAAGCCT	3'
cZ7BAX	3'	ACGCTAGCGTCGCCATTGGACTGG AG TGTTCA AT TCTGTTCGGA	5'
BB9M	5'	GGGCAG GA CCGGGCAG GA CC	3'
cZ4BB9M	3'	ACGCCCATGTCGTGGATGGAACGCCCCGT CCT GGCCCGT CCT GG	5'

Tableau 12 : Séquences cibles composées d'une partie simple-brin complémentaire à une séquence zip-code spécifique suivie d'un duplex long de 20 paires de bases correspondant au site de fixation de la p53. Les bases en rouge gras sont celles qui ne correspondent pas à la séquence consensus définie dans la relation (III-1).

III.2.3.3. But des expériences

Le but de l'expérience est de quantifier la fonctionnalité de la protéine p53 sauvage, à travers son affinité pour cinq séquences d'ADN double-brins cibles spécifiques de la p53, afin de servir de référence à une mesure ultérieure de fonctionnalité d'une protéine p53 issue d'un gène muté. Par la même occasion, nous voulons valider l'utilisation des zip-codes à température ambiante pour une activation à façon du capteur fonctionnalisé. Ces résultats doivent ensuite être comparés à des expériences équivalentes en microscopie de fluorescence et en électrophorèse en gel retard (ces dernières expériences réalisées par l'équipe de T. Soussi ne seront pas présentées ici).

Les différentes étapes réalisées pour atteindre ces buts, en imagerie SPR, sont schématisées dans la figure suivante.

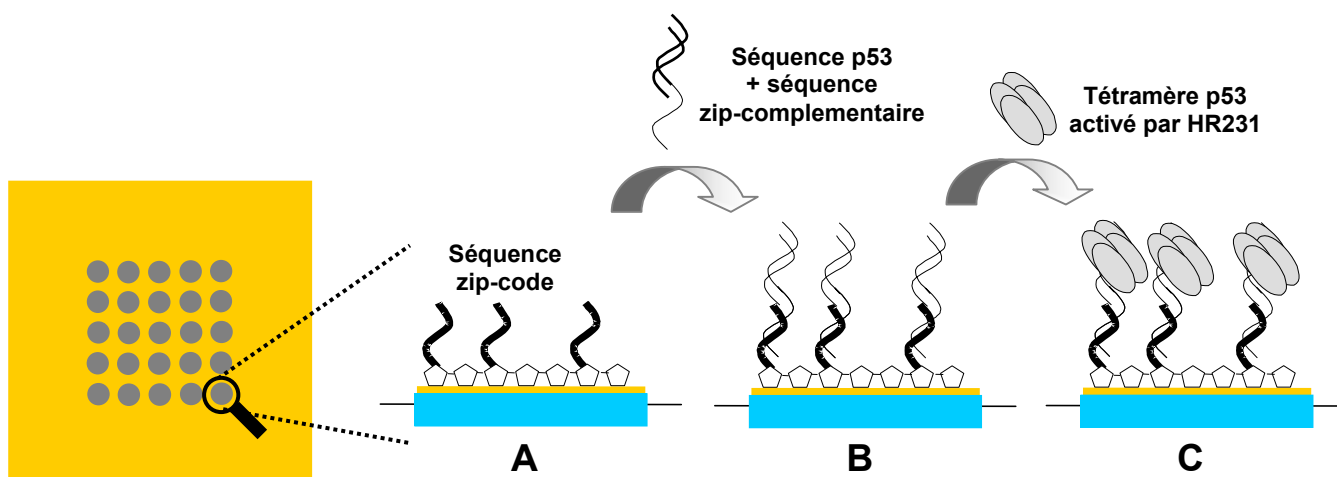


Figure 108 : Plan de la stratégie pour la détection de l'activité de liaison à l'ADN de la p53. Dans l'étape 1, le prisme doré est fonctionnalisé en différents endroits spécifiques sous la forme de plots circulaires. Sur chaque plot, l'oligonucléotide zip-code simple brin spécifique greffé à un groupe pyrrole est électropolymérisé sur la surface d'or. Dans l'étape 2 (de **A** à **B**), un mélange contenant les différentes séquences cibles de la p53, chacune étant prolongée par un simple brin complémentaire à un zip-code spécifique, est hybridé sur le capteur, ce qui conduit à une puce activée (illustré pour un plot sur la figure). Dans l'étape 3 (de **B** à **C**), la protéine p53 est injectée sur la surface de la puce où elle peut interagir simultanément avec les différents sites de fixation de la p53.

Ainsi que le résume la Figure 108, la détection en imagerie SPR de l'activité de liaison de la p53 avec ses séquences d'ADN double-brin spécifiques nécessite 3 étapes successives :

- **Etape 1** : Notre prisme est fonctionnalisé avec des plots de séquences zip-codes qui permettent un adressage simultané de tous les plots ainsi que la réutilisation de la lame par déshybridation des zips complémentaires.
- **Etape 2** : Les séquences ADN double-brin spécifiques de la protéine p53 prolongées par une séquence simple-brin zip complémentaire spécifique (voir Tableau 12) se fixent sélectivement sur le plot contenant le bon zip.
- **Etape 3** : La protéine p53 activée interagit simultanément avec toutes les séquences ADN double-brin spécifiques.

A ces trois étapes, s'ajoutent deux autres étapes qui vont permettre la détection des interactions entre ADN double-brin et p53 en microscopie de fluorescence (étapes non représentées sur la Figure 108). Ces étapes n'ont donc pas été réalisées en SPR.

- **Etape 4** : L'anticorps DO7 biotinylé, interagissant sélectivement avec le N-terminal de la p53 [155], confirme et amplifie l'étape 3.
- **Etape 5** : Cette dernière étape permet de fixer la streptavidine ($M_{SA} = 53$ kDa) marquée à la phycoérythrine ($M_{PE} = 240$ kDa) sur la biotine et donc de faire des mesures en fluorescence.

III.2.3.4. Protocole expérimental

Les différentes étapes de l'expérience sont réalisées en tampon HEPES (Hepes 10 mM pH = 8, EDTA 0,1 mM, $MgCl_2$ 5 mM, KCl 50 mM, DTT 2 mM, NP40 0,05 % (v/v), glycérol 10 % (v/v), spermidine 4 mM, BSA 0,2 g/L). La BSA (protéine) et la spermidine sont destinés à limiter les interactions non spécifiques, le glycérol permet la conservation de la protéine p53 à $-80^\circ C$, le NP40 est un surfactant (rôle équivalent au tween, utilisé dans les expériences précédentes), le DTT évite la formation de ponts disulfures, ce qui protège les groupes SH des protéines et l'EDTA empêche l'activité des DNases en chélatant les cations comme Mg^{2+} . Toutes ces expériences sont réalisées à débit constant égal à 25 $\mu L/min$.

Le protocole type de l'expérience est le suivant :

- Injection du tampon dans la cuve.
- Mesure de la réflectivité en fonction de l'angle d'incidence afin de déterminer l'angle de travail en cinétique (pente de la courbe mesurée maximale).
- Positionnement du miroir à l'angle de mesure déterminé précédemment.
- Injection en cuve des doubles brins d'ADN, prolongés par une séquence zip complémentaire, dilués dans le tampon HEPES.
- Pendant ce temps, nous activons la p53 dans un excès d'anticorps HR231, pendant 30 min et à température ambiante, dans un volume final de 300 μL .
- Injection du tampon pour le rinçage et pour mesurer dans le même milieu la différence de réflectivité due à l'hybridation des zip-codes.
- Injection en cuve des protéines p53 activées diluées dans le tampon.
- Injection du tampon pour le rinçage et pour mesurer dans le même milieu la différence de réflectivité due à l'interaction entre l'ADN double brin et la p53.
- Injection d'eau pour éviter la neutralisation de la soude par le tampon.
- Injection de la solution NaOH 50 mM + NaCl 60 mM pour déshybrider les zip-codes.
- Injection d'eau pour évacuer la soude.
- Injection du tampon afin de comparer le niveau de réflectivité avant l'interaction et après la régénération dans le même milieu.

III.2.3.5. Résultats

Les résultats que nous allons présenter sont la synthèse d'une série d'une dizaine d'expériences différentes. Les différentes séquences zip-codes utilisées étaient diluées à plusieurs concentrations lors du greffage par électrocopolymérisation : 15 nM, 30 nM, 60 nM, 125 nM, 250 nM, 0,5 μ M, 1 μ M, 2 μ M, 10 μ M et 40 μ M. Sachant que les pyrroles non greffés sont dilués à 20 mM lors du dépôt, ces différentes concentrations représentent des ratios d'un zip-code pour, respectivement, 1 280 000, 640 000, 320 000, 160 000, 80 000, 40 000, 20 000, 10 000, 2 000 et 500 molécules de pyrrole. Ces différents ratios sont beaucoup plus faibles que le ratio habituellement utilisé pour la mesure d'hybridation de brins d'ADN (comme dans la première application, partie III.1.2) mais le but de nos expériences était de mesurer l'interaction de la p53 avec les double-brins d'ADN et non pas l'hybridation de ces séquences d'ADN cibles, ce qui nécessite une nouvelle optimisation de la densité de greffage. Bien sûr, toutes les concentrations de greffage n'ont pas été utilisées au cours de la même expérience.

III.2.3.5.1. Hybridation des séquences zip-codes

Les séquences zip-codes ont été définies et optimisées à l'origine pour une hybridation à 65°C [154]. Puisque nous travaillons à température ambiante, la première propriété à vérifier est donc l'absence d'hybridation croisée entre les différentes sondes et cibles. Seule la vérification de cette spécificité des interactions nous permettra par la suite d'injecter toutes les séquences d'ADN cible simultanément. Les résultats de la vérification, menée en imagerie SPR, de la spécificité d'hybridation des séquences zip-codes sont illustrés sur la Figure 109. Lors de l'injection des ADN cibles dilués en tampon (0,5 μ M), les séquences cZ4BB9M complémentaires au zip 4 se sont fixées majoritairement sur les plots zip 4, de manière négligeable sur les plots zip 9 et ne se sont fixées ni sur l'or ni sur le polypyrrole (parties A et B de la Figure 109). Un résultat équivalent a été obtenu lors de l'injection des cibles cZ9BB9 complémentaires au zip 9 (parties C et D de la Figure 109). Ces deux injections confirment sans équivoque la spécificité de l'hybridation des séquences zip-codes à température ambiante.

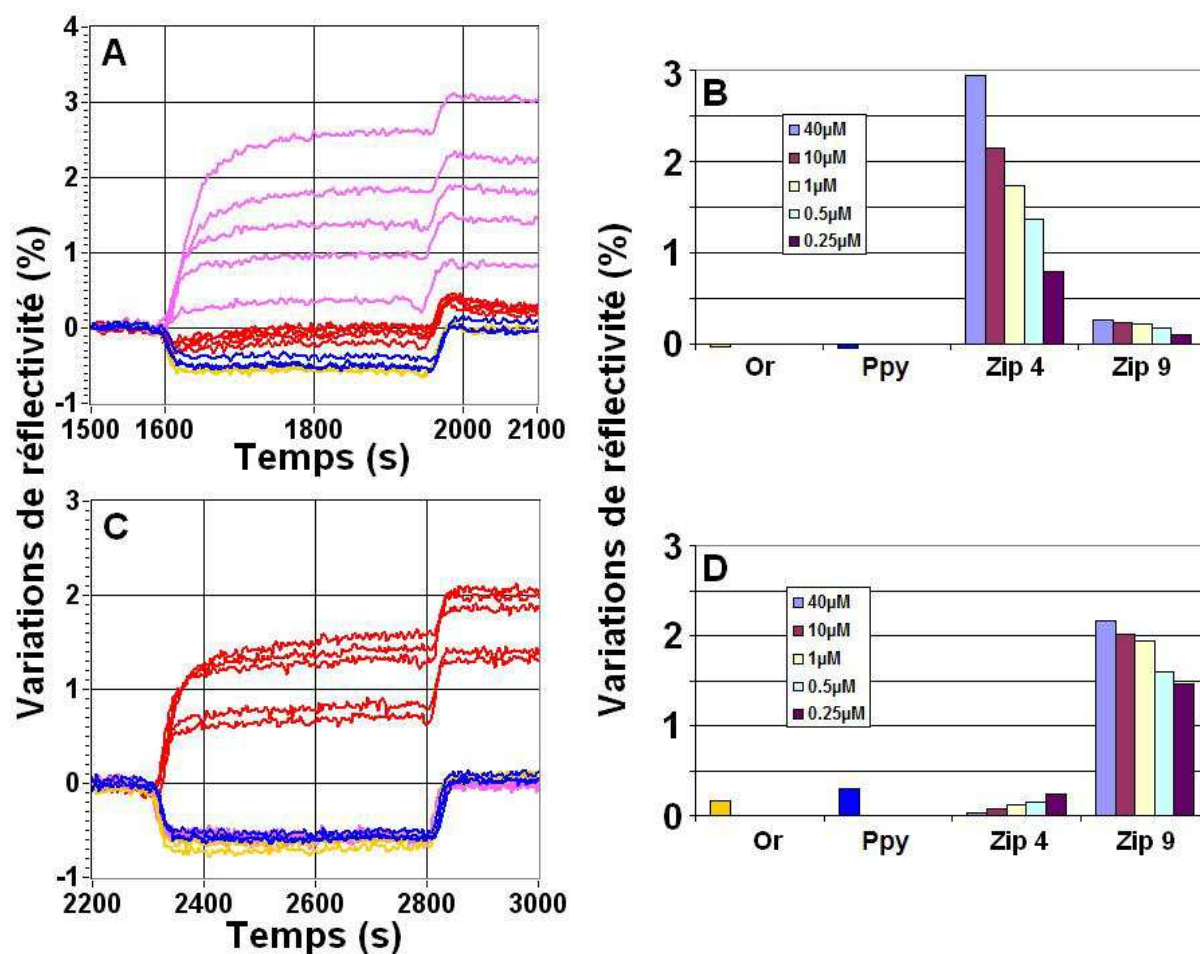


Figure 109 : Spécificité de l'hybridation des séquences zip-codes avec les AND cibles décrits dans le Tableau 12 à température ambiante ($T = 20^\circ\text{C}$). **A** et **C** : Cinétique de l'hybridation sur la surface d'or (jaune), les plots contrôles de polypyrrole (bleu), les séquences zip 4 (mauve) et les séquences zip 9 (rouge) pour différentes concentrations d'électrocopolymérisation sur la surface d'or ($0.25 \mu\text{M}$ à $40 \mu\text{M}$). Les séquences cibles injectées sont soit cZ4BB9M (ADN double-brin cible BB9M prolongé par une séquence complémentaire au zip 4) (**A**) soit cZ9BB9 (ADN double-brin cible BB9 prolongé par une séquence complémentaire au zip 9) (**C**). **B** et **D** : Quantification de la fixation déduite de **A** et **C**, respectivement.

Les résultats de la Figure 109 nous indiquent aussi que la variation de réflectivité provoquée par la fixation des ADN cibles augmentent avec la concentration de sondes utilisées pour l'électrocopolymérisation, indiquant que le système n'est pas saturé, ce que nous allons confirmer par la suite.

Après avoir montré la spécificité de l'hybridation, nous pouvons maintenant injecter toutes les cibles simultanément pour réaliser l'étape 2. Nous allons maintenant analyser

l'efficacité de l'hybridation de ces ADN cibles, d'abord en microscopie de fluorescence puis avec notre montage d'imagerie des plasmons de surface.

En utilisant des ADN cibles marquées avec une biotine, nous avons réalisé, au CEA de Grenoble, des expériences préliminaires en fluorescence pour détecter l'efficacité d'hybridation des cibles sur leur sonde correspondante. Cette détection se fait après fixation de streptavidine-phycoérythrine sur les biotines (technique que nous avons déjà mentionné plusieurs fois). Ces analyses d'intensité de fluorescence dues à l'hybridation des ADN cibles pour différentes concentrations de sondes sont résumées dans la Figure 110.

Hybridation des cibles

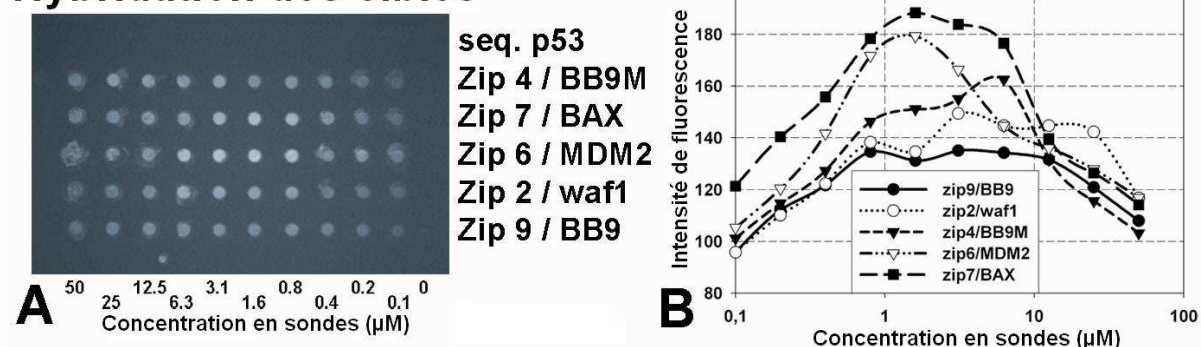


Figure 110 : Analyse en fluorescence de l'hybridation des ADN cibles (décrits dans le Tableau 12) pour une gamme de concentration en sondes (étape 2). (A) Photographie de la lame après hybridation. (B) Quantification de l'intensité de fluorescence de la lame.

Ces analyses en microscopie de fluorescence montrent que les différentes séquences zip-codes fixent de manière équivalente leurs cibles complémentaires. En effet, pour une concentration en sondes donnée, la dispersion des intensités de fluorescence est d'environ $\pm 10\%$, ce qui est une dispersion standard pour les puces à ADN [156, 157].

Ces analyses indiquent aussi que l'intensité de fluorescence augmente avec la concentration d'électrocopolymérisation des sondes jusqu'à une concentration de 2 µM. Cela veut simplement dire que plus la densité en zip-codes des plots est importante et plus la quantité d'ADN cibles fixée est importante. Au-delà de cette concentration, la chute de l'intensité de fluorescence est certainement due à un encombrement stérique de la streptavidine-phycoérythrine (la phycoérythrine seule se présente sous la forme d'un disque

de 11 nm de diamètre et de 6 nm d'épaisseur [158]), c'est-à-dire que lorsque l'un de ces fluorophores se fixe sur une biotine, il empêche alors l'accession aux biotines adjacentes.

Suite à ces expériences préparatoires en fluorescence, nous avons effectué les mêmes expériences en imagerie SPR. Cette fois, les ADN cibles n'ont plus besoin d'être marqués pour détecter l'efficacité d'hybridation des cibles sur leur sonde correspondante. Dans un premier temps, nous nous sommes limités à l'étude des plots fonctionnalisés avec les zip9 et zip4 (voir Tableau 10). Les valeurs des variations de réflectivité ont été mesurées après que l'équilibre soit atteint. Après moyennage de ces différents résultats, nous pouvons établir une courbe statistique de la variation de réflectivité due à l'hybridation des ADN double brin (64 bases au total) en fonction de la concentration volumique des plots utilisée lors de l'électrocopolymérisation des zip4 et zip9. Ces analyses de variations de réflectivité dues à l'hybridation des ADN cibles pour différentes concentrations de sondes sont résumées dans la Figure 111.

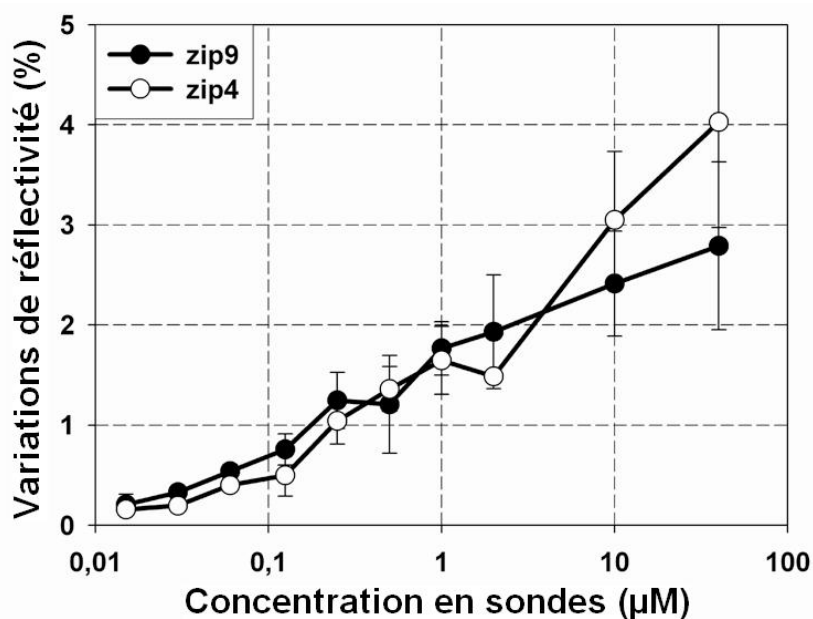


Figure 111 : Analyse en imagerie SPR de l'hybridation des ADN cibles (décrits dans le Tableau 12) pour une gamme de concentration en sondes (étape 2). Chaque barre d'erreur correspond à l'écart-type des réponses obtenues pour 2 à 11 expériences différentes.

Contrairement aux résultats obtenus en microscopie de fluorescence (Figure 110), ceux obtenus en SPR (Figure 111) montrent que la quantité d'ADN cibles hybridés augmente avec la concentration en sondes sur toute la gamme de concentrations utilisée. Ces résultats

indiquent donc que le système n'est pas saturé et confirment que la saturation en microscopie de fluorescence est due non pas à une saturation de la densité des ADN doubles-brins mais bien à celle de la streptavidine-phycoérythrine. Enfin, comme dans le cas des expériences sur les immunoglobulines, nous pouvons quantifier ces résultats afin de connaître la densité d'ADN cibles présente sur chaque plot. Ces densités, présentées dans le Tableau 13, vont nous permettre de calculer les rendements d'interaction de l'étape suivante.

Conc.(μ M)	0,015	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	10	40
$\Delta R(\%)$	0,18	0,26	0,47	0,63	1,14	1,28	1,71	1,71	2,73	3,41
$\Gamma(\text{fmol}/\text{mm}^2)$	1,2	1,75	3,1	4,2	7,6	8,6	11,4	11,4	18,25	22,8
$d(\text{nm})$	42,1	35,6	26,2	22,8	16,7	15,7	13,6	13,7	10,8	9,8

Tableau 13 : Quantification des prises moyennes en ADN cibles ($M = 19,2$ kDa) en fonction de la concentration (**Conc.**) de polymérisation des sondes. ΔR correspond à la moyenne des 2 courbes de la Figure 111. Γ est le nombre de cibles fixées par mm^2 . d est la distance moyenne, sur un plot, entre deux molécules cibles. Γ et d sont directement déduits de ΔR .

Les distances moyennes d entre les molécules d'ADN cibles doubles-brins, calculées dans le Tableau 13, nous indiquent que la chute de l'intensité de fluorescence observée dans la Figure 110 intervient quand la distance moyenne entre ces molécules devient inférieure à $d_{\min} = 13$ nm. Cela nous donne une indication sur l'espace nécessaire à la streptavidine-phycoérythrine pour se fixer à la biotine. Cette indication est tout à fait compatible avec les dimensions d'une molécule de phycoérythrine car légèrement supérieure au diamètre (11 nm [158]) de cette molécule.

Sachant que la structure en double-hélice de l'ADN double-brin mesure 2 nm de diamètre, nous aurions pu étudier de plus fortes concentrations en sondes pour augmenter la quantité d'ADN cible fixée et le signal mesuré mais, comme nous allons le voir par la suite, nous nous sommes limités à ces concentrations plus faibles pour éviter l'encombrement stérique qui se serait produit lors de l'étape 3 de fixation des p53 activées sur ces ADN cibles.

III.2.3.5.2. Reconnaissance des ADN cibles doubles-brins par la p53

Après avoir réalisé l'étape 2, nous allons maintenant analyser la fixation de la p53 sur certaine de ses ADN cibles spécifiques (étape 3), d'abord en microscopie de fluorescence puis avec notre montage d'imagerie des plasmons de surface. Nous avons réalisé, au CEA de

Grenoble, des expériences en fluorescence pour détecter cette fixation. Comme expliqué dans la sous-partie III.2.3.3, la détection se fait après les étapes 4 et 5 consistant en une fixation des anticorps DO7 biotinylés sur la p53 suivi d'une fixation de streptavidine-phycoérythrine sur les biotines. Ces analyses d'intensité de fluorescence dues à la fixation de la p53 sur les ADN cibles pour différentes concentrations de sondes sont résumées dans la Figure 112.

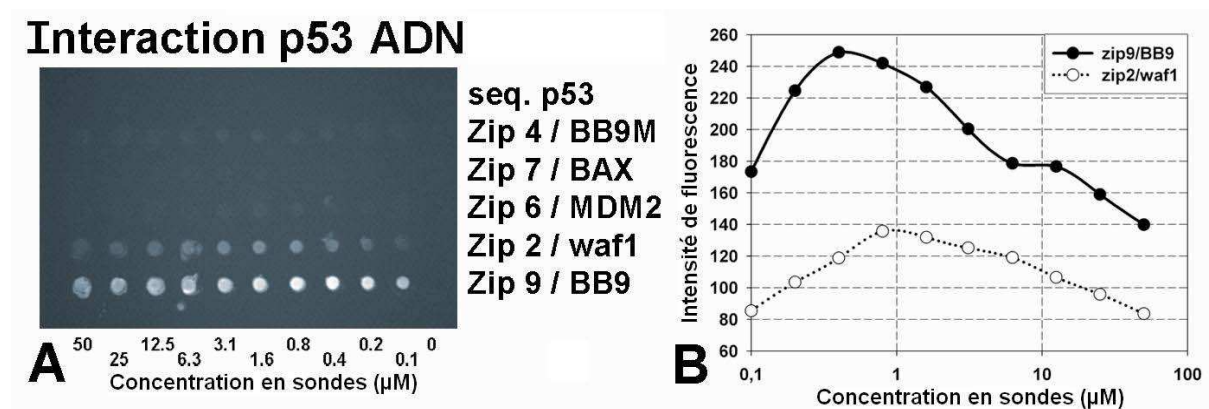
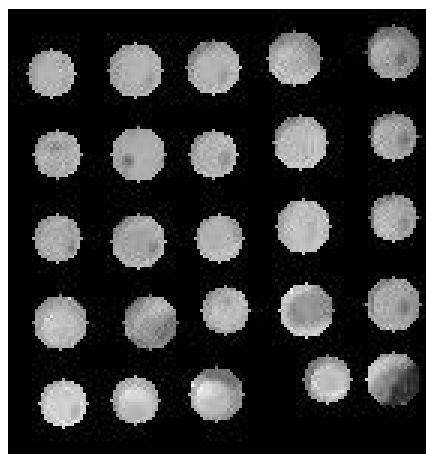


Figure 112 : Analyse en fluorescence des interactions p53 ADN doubles-brins (décrits dans le Tableau 12) pour une gamme de concentration en sondes (étape 3). (A) Photographie de la lame après interaction. (B) Quantification de l'intensité de fluorescence de la lame.

Ces analyses en microscopie de fluorescence montrent une fixation efficace de la p53 sur BB9 et, dans une moindre mesure, sur WAF1 mais aucune interaction significative n'a pu être détectée avec les autres ADN cibles (mdm2 et BAX). De plus, aucune interaction non spécifique n'a été détectée ni sur BB9M, ni sur la surface d'or, ni sur le polypyrrole non greffé (colonne de concentration nulle sur la Figure 112), ce qui indique que la protéine p53 ne montre pas de fixation non spécifique dans ces analyses. La fixation plus forte de la p53 sur BB9, en comparaison avec WAF1, était attendue d'après les résultats obtenus par électrophorèse en gel retard. Bien sûr, ces analyses en point final ne nous permettent pas d'effectuer des analyses cinétiques, c'est pourquoi nous allons recommencer ces analyses en imagerie de résonance des plasmons de surface.

Pour ces expériences, nous allons présenter les résultats obtenus sur le prisme décrit dans la figure suivante. Nous ne considérerons plus les séquences zip-codes mais directement les ADN cibles doubles-brins décrits dans la sous-partie III.2.3.2 (BB9, WAF1, mdm2, BAX et BB9M) puisque nous nous plaçons dans la situation où les étapes 1 et 2 ont déjà été réalisées et où les densités de fixation des ADN cibles sont connues. L'image des plots (de

diamètre voisin de 800 μm), représentée dans la Figure 113, a été acquise sur notre banc SPR en polarisation TM lorsque la cuve en téflon est remplie de tampon HEPES et pour une incidence voisine de l'angle de travail en cinétique. Seules les zones utilisées par le programme pour l'analyse y sont visibles.



BB9 2 μM	WAF1 2 μM	MDM2 2 μM	BAX 2 μM	BB9M 2 μM
BB9 1 μM	WAF1 1 μM	MDM2 1 μM	BAX 1 μM	BB9M 1 μM
BB9 0.5 μM	WAF1 0.5 μM	MDM2 0.5 μM	BAX 0.5 μM	BB9M 0.5 μM
BB9 250nM	WAF1 250nM	MDM2 250nM	BAX 250nM	BB9M 250nM
ppy	ppy	ppy	ppy	ppy

Figure 113 : Image SPR en tampon des plots de zip-codes pyrrolés, dont les parties non utilisées pour les analyses ont été masquées, et leur répartition. Les différentes concentrations indiquées sont celles des zip-codes lors de l'électrocopolymérisation. **ppy** représente un plot de polypyrrole sans biomolécule.

Après réalisation de l'étape 2 sur ce prisme, non représentée pour ce cas particulier car résumée de manière générale dans la Figure 111, nous avons injecté la protéine p53 (activée par les anticorps monoclonaux HR231) pendant 30 minutes (étape 3). Nous stoppons l'injection à 30 minutes, même si l'équilibre de réaction n'est pas atteint, pour éviter les problèmes associés avec l'instabilité thermique naturelle de la protéine p53 à température ambiante [159]. La protéine p53, dont la concentration d'injection a été estimée à $C_i = 2,1 \text{ nM}$ par dosage à l'Institut Curie de Paris, était injectée à un débit constant de 25 $\mu\text{L}/\text{min}$. Les résultats de cette injection sont résumés dans la figure suivante.

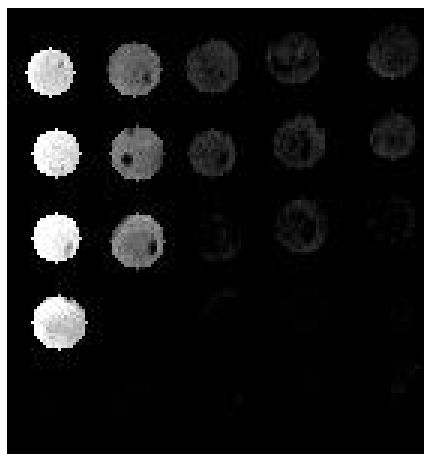


Figure 114 : Analyse en SPR des interactions p53 ADN doubles-brins. Image de la différence de réflectivité due au passage de la **p53** activée (2,1 nM) et courbes de variation de réflectivité en fonction du temps correspondantes (en rouge : **BB9**, en noir : **WAF1**, en vert : **mdm2**, en jaune : **BAX**, en mauve : **BB9M** et en bleu : **ppy**). Les deux barres verticales rouges matérialisent les transitions entre l'injection du tampon, de la **p53** (durant 20 minutes) et du tampon. Les images utilisées pour la différence ont été choisies en tampon avant et après l'interaction. Le saut de réflectivité entre la solution tampon et la solution tampon + BSA est due à une petite différence dans leurs indices de réfraction.

Durant l'étape 3, résumée dans la Figure 114, l'injection de la p53 a conduit à une détection non équivoque de la fixation de la protéine sur les séquences BB9 et WAF1 et à un signal beaucoup plus faible mais tout de même détectable avec mdm2. Comme pour les mesures en fluorescence, il n'y a eu de fixation non-spécifique ni sur les séquences BB9M ni sur le polypyrrole. En considérant que l'activation de la p53 (46 kDa) est effectuée en excès d'anticorps monoclonal HR231 (146 kDa), la masse molaire d'un tétramère p53 activé par deux IgG HR231 vaut 476 kDa. A partir de cette valeur et des variations de réflectivité mesurées en SPR, nous pouvons quantifier les résultats de la Figure 114 : le taux de recouvrement Γ de la protéine p53 vaut $3,3 \pm 0,25 \text{ fmol/mm}^2$ sur les plots de **BB9** et $1,5 \pm 0,1 \text{ fmol/mm}^2$ sur les plots de **WAF1**, ce qui correspond à une distance moyenne $d = 22,5 \pm 1 \text{ nm}$ entre les complexes **p53-BB9** et $d = 33,3 \pm 1 \text{ nm}$ entre les complexes **p53-WAF1**.

Ces différentes données provenant de l'étape 2 et de l'étape 3 vont maintenant nous permettre de calculer le rendement de fixation de la p53 sur les ADN cibles (Figure 115).

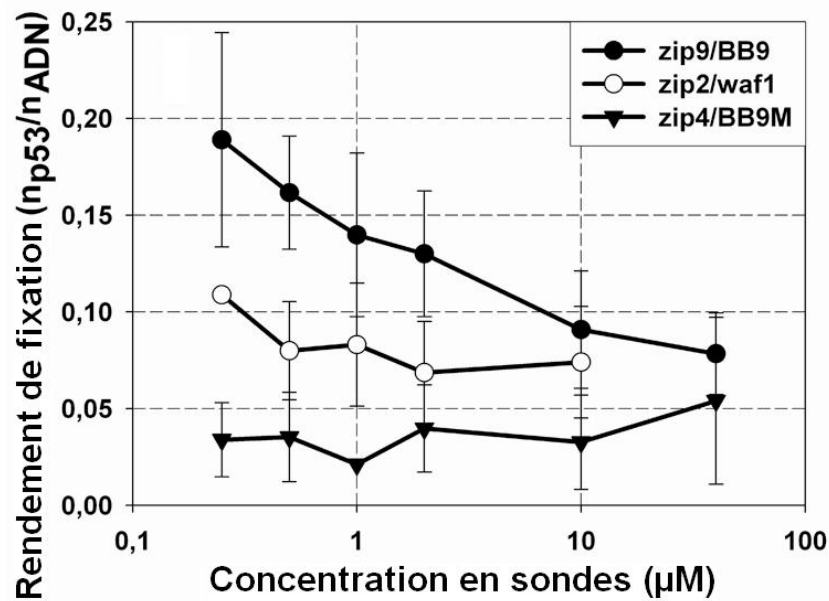


Figure 115 : Analyse en imagerie SPR du rendement de fixation de la p53 sur différentes séquences cibles. Ces courbes indiquent le nombre de molécules de p53 fixées par molécule d'ADN pour une gamme de concentration en sondes (étape 3). Chaque barre d'erreur correspond à l'écart-type des réponses obtenues pour 2 à 11 expériences différentes.

Le rendement de fixation de la p53 sur les ADN cibles, que nous avons synthétisés sur la Figure 115 pour les différentes expériences réalisées au cours de la thèse, est meilleur quand de faibles concentrations de sondes sont utilisées.

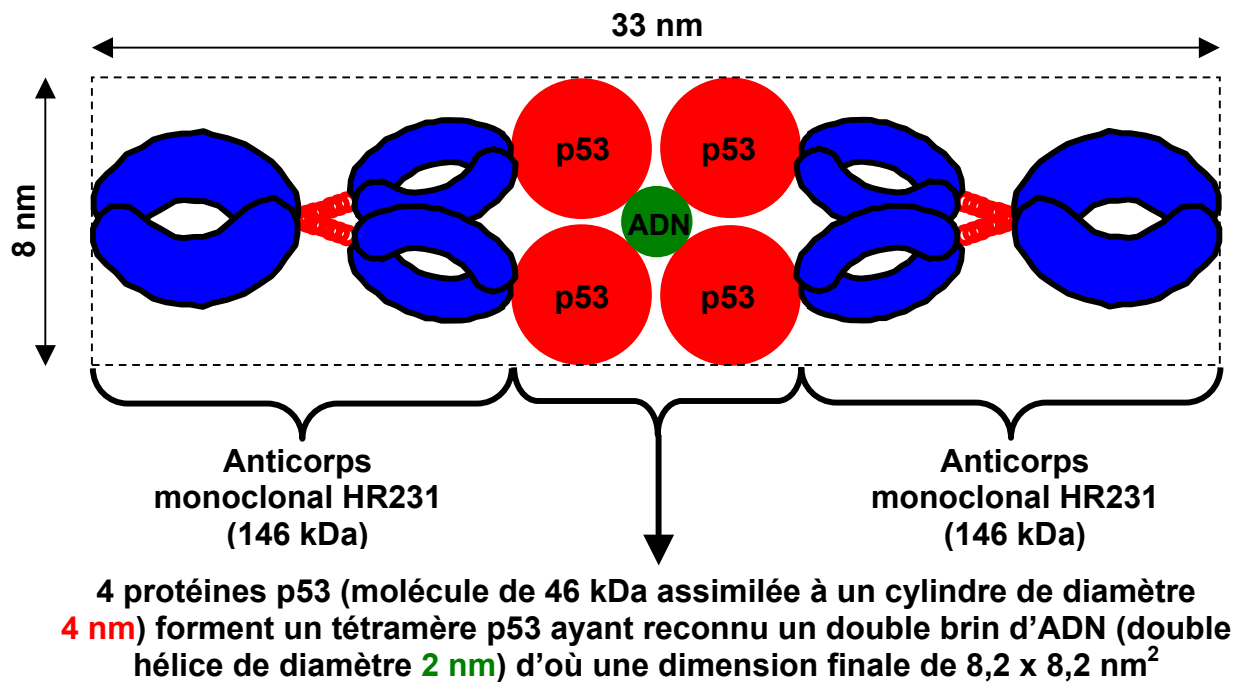


Figure 116 : Schéma d'un tétramère p53 activé par deux IgG monoclonales HR231.

Si nous considérons la géométrie des sondes et des cibles, nous pouvons essayer de comprendre ces valeurs de rendement de fixation. Très sommairement, les ADN doubles-brins peuvent être assimilés à un cylindre de diamètre 2 nm et la protéine p53 à un cylindre de diamètre 4 nm. Ces simplifications, jointes à la description des IgG de la sous-partie III.2.1.2.1, nous permettent d'évaluer approximativement les dimensions du tétramère p53 activé à 33 x 8 nm ainsi qu'illustré sur la Figure 116. En comparant la distance moyenne entre les doubles-brins d'ADN et la taille d'un complexe p53, nous voyons que, lorsqu'il est lié à un ADN cible, ce complexe masque trois à quatre autres ADN cibles. Cela signifie que le rendement de fixation saturante vaut 20 % pour une concentration de sondes de 2 μ M et vaut 25 % pour une concentration de sondes de 0,25 μ M. Pour les faibles concentrations de sondes, nous avons donc quasiment saturé les plots de séquences cibles BB9.

III.2.3.5.3. Calcul des affinités entre la p53 et les ADN cibles

Nous allons maintenant, à partir des cinétiques (celles de la Figure 114 mais aussi d'autres que nous n'avons pas présenté) acquises durant la fixation de la p53 sur les différentes séquences cibles, essayer de déduire des affinités. Tout d'abord, nous n'avons pu appliquer pleinement les méthodes préconisées dans la partie II.3.3 car nous n'avons utilisé qu'une seule et unique concentration d'injection de la protéine. En effet, comme nous l'avons expliqué dans le chapitre précédent, la qualité et la précision de la déduction des constantes d'affinité (K_A) à partir de l'ajustement des cinétiques est d'autant meilleure que nous utilisons de nombreuses concentrations d'injection, voisines de la valeur de la constante de dissociation ($K_D = 1/K_A$). La concentration d'origine de la p53 que nous pouvions utiliser pour nos expériences étant déjà très faible (2,1 nM), nous n'avons pas effectué de dilution supplémentaire.

Notre analyse ne porte que sur les plots contenant les séquences BB9 et WAF1 car la quantité de p53 fixée sur les plots de mdm2 était trop faible pour des analyses quantitatives et le signal sur les plots contenant les séquences WAF1 et BB9M était nul. Donc, pour les cinétiques des plots concernant BB9 et WAF1, nous avons utilisé le programme informatique développé au cours de la thèse et basé sur l'algorithme de la Figure 76 (page 145). Un exemple des résultats obtenus est illustré sur la Figure 117.

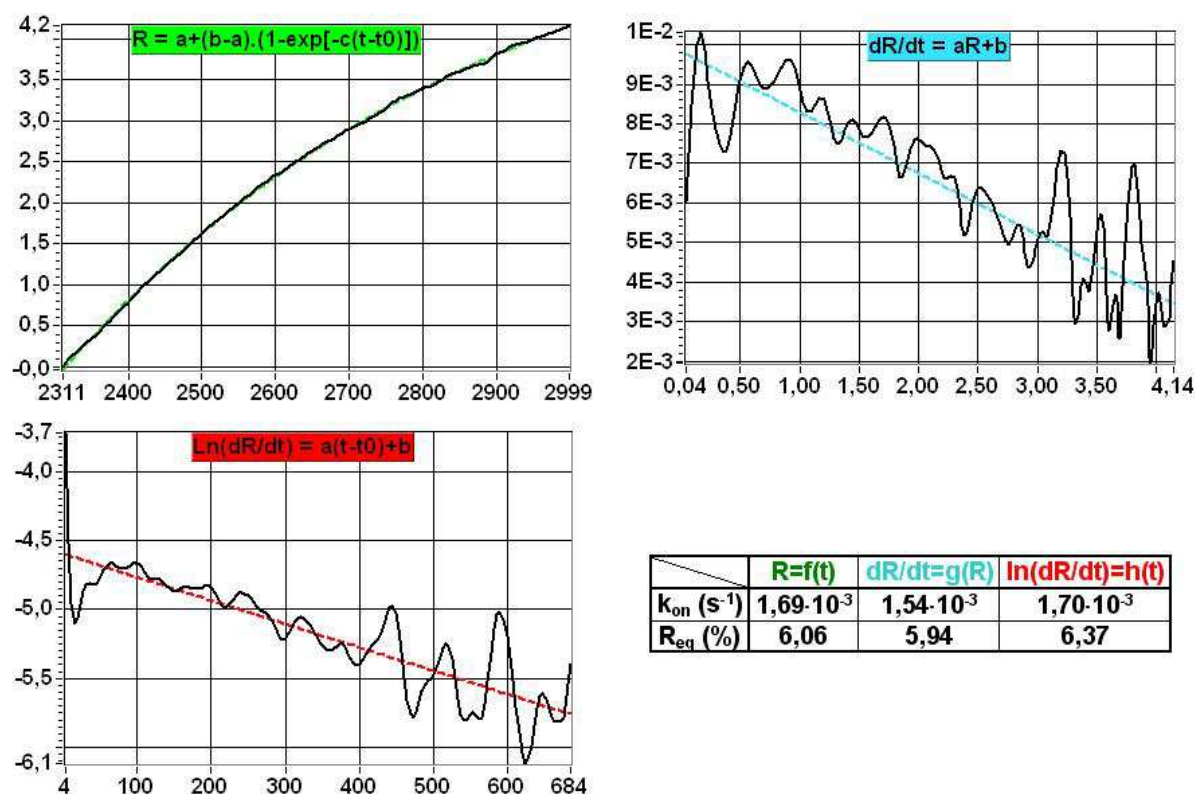


Figure 117 : Ajustements de la cinétique d'association de la p53 sur le plot BB9 dont les sondes sont concentrées à 250 nM. L'algorithme utilisé est celui décrit dans la Figure 76 ajustant la réflectivité par une exponentielle, sa dérivée et le logarithme de cette dérivée par des droites. Ces 3 méthodes donnent 3 valeurs de la constante de montée k_{on} et de la réponse à l'équilibre R_{eq} .

Les résultats de l'ajustement de la cinétique d'association de la p53 sur le plot BB9 250 nM nous donnent plusieurs renseignements. Le fait que cette cinétique puisse être ajustée par une courbe exponentielle, que sa dérivée varie linéairement avec la réflectivité et que le logarithme népérien de sa dérivée varie linéairement avec le temps indique très clairement que l'interaction suit le modèle monovalent simple (cf. II.3.3.1). La variation de réflectivité à l'équilibre déduite de ces ajustements vaut $\Delta R_{eq} = 6,1\%$, ce qui indique que nous avons quasiment atteint l'équilibre sur ce plot lors du rinçage (voir les variations de réflectivité de ce plot sur la Figure 114).

L'ajustement des phases d'association et de dissociation des différents plots basées sur ce modèle nous ont finalement permis de déterminer les constantes de dissociation ($K_D = 1/K_A$) des complexes BB9/p53 et WAF1/p53. L'ajustement des phases de dissociations étant beaucoup plus délicate que celle des phases d'association (d'où l'intérêt d'utiliser

plusieurs concentrations d'injection des protéines...), les valeurs obtenues sont données avec une incertitude assez conséquente mais courante pour ce type de mesures. Voici les grandeurs obtenues :

$$K_D(\text{BB9/p53}) = 0,9 \pm 0,5 \text{ nM}$$

$$K_D(\text{WAF1/p53}) = 3,5 \pm 1,5 \text{ nM}$$

Ces valeurs indiquent que l'affinité de la p53 pour BB9 est trois à cinq fois plus élevée que celle de la p53 pour WAF1. Les valeurs obtenues dans le cas de WAF1 sont similaires à celles obtenues en ultracentrifugation ($K_D = 0,83 \pm 1,4 \text{ nM}$) par P. Balagurumoorthy *et al.* [160]. De plus, d'autres études ont aussi montré que la fixation de p53 sur BAX est très faible comparée à celle sur WAF1 ou sur mdm2 et que la fixation de p53 sur WAF1 est de deux à cinq fois plus forte que sur mdm2 [161, 162], confirmant ainsi les différents résultats de nos études *in vivo*.

III.2.3.6. Récapitulatif

En résumé, nous avons montré comment réaliser une puce à ADN universelle réutilisable permettant une fonctionnalisation, en parallèle et contrôlée sur le banc de mesure, de tous les différents plots du capteur par n'importe quelle séquence d'ADN. Ce principe a été validé par la fonctionnalisation de capteurs avec des ADN doubles-brins cibles de la protéine p53. Nous avons ensuite montré la spécificité de la mesure d'interaction entre la p53 et ses ADN doubles-brins cibles avec notre banc d'imagerie SPR fonctionnalisé par électrocopolymérisation. Nous avons mis à profit la mesure de la fonctionnalisation pour calculer la stoechiométrie des interactions. Nous avons utilisé avec succès la modélisation des interactions monovalentes définie au chapitre précédent pour calculer les affinités entre p53 et ADN et ainsi initier une quantification de la fonctionnalité de cette protéine. Enfin, nous avons comparé nos résultats avec ceux obtenus en microscopie de fluorescence et dans la littérature.

III.3. OLIGOSACCHARIDES

III.3.1. Généralités

Bien que, comme nous l'avons expliqué dans les deux applications précédentes, les gènes et les protéines jouent un rôle capital dans les différents mécanismes cellulaires, deux autres catégories de molécules, les sucres et les lipides, sont elles-aussi essentielles. Les sucres (nous n'aborderons pas le cas des lipides) remplissent des fonctions très variées. Bien sûr, ce sont des molécules pourvoyeuses d'énergie mais elles jouent aussi un rôle structural, par exemple dans le cartilage. Les sucres peuvent aussi se combiner aux protéines et aux lipides sur la membrane cellulaire, participer aux communications intercellulaires ou au fonctionnement du système immunitaire, et certaines glycoprotéines ainsi formées peuvent même freiner la progression de certains cancers [163]. Ces sucres sont présents à la surface de toutes les cellules de l'organisme.

Les sucres, également appelés hydrates de carbone sont composés d'atomes de carbone, d'oxygène et d'hydrogène. Ils sont nommés selon le nombre d'unités de sucre (saccharides) qu'ils contiennent : monosaccharides, disaccharides, etc... De manière analogue aux brins d'ADN, nous parlerons aussi d'oligosaccharides et de polysaccharides. Ces hydrates de carbone peuvent s'associer à d'autres molécules pour former des glycoconjugués comme des glycoprotéines (les immunoglobulines de la partie précédente par exemple) ou des glycolipides.

Les sucres ont des structures bien plus compliquées que celles des chaînes d'ADN ou des protéines. Les quatre nucléotides constituant l'ADN et les vingt acides aminés que contiennent les protéines sont associés linéairement et reliés par la même liaison chimique. Au contraire, les quelques dix sucres simples présents dans les hydrates de carbone des mammifères se lient les uns aux autres en des points différents et constituent des structures aux ramifications complexes. Si nous prenons l'exemple de structures de quatre éléments, nous obtiendrons alors $4^4 = 256$ oligonucléotides ou $20^4 = 160\,000$ oligopeptides différents. En revanche, les sucres les plus simples de l'organisme peuvent s'assembler sous plus de quinze millions d'oligosaccharides de quatre éléments. Même si toutes ces combinaisons ne se rencontrent pas dans la nature, le nombre de possibilités reste considérable.

III.3.1.1. Les glycosaminoglycanes sulfatés (GAGs)

Les glycosaminoglycanes sulfatés sont une catégorie de sucres qui, notamment chez les mammifères, possèdent un rôle physiologique important dans des conditions pathologiques particulières comme la cancer, certaines maladies neuro-dégénératives et certaines infections microbiennes [164]. Ils se rencontrent à la surface des cellules eucaryotes où ils jouent un rôle dans la reconnaissance d'autres cellules. Les glycosaminoglycanes sulfatés, comme l'héparine ou les héparanes sulfates (HS), sont des polysaccharides linéaires, c'est-à-dire qu'ils sont constitués de longues chaînes de saccharides. Leur diversité structurale est une conséquence de la multitude de sites sulfatés présents sur une chaîne d'HS.

L'héparine (HP) et l'héparane sulfate (HS) sont des polymères linéaires, ayant comme unité de base répétée un disaccharide, constitué d'un acide glucuronique et d'une glucosamine N-acétylée. Dans ces chaînes, de longues séquences d'unités de base, homogènes et faiblement modifiées, alternent avec des séquences hypervariables constituées de modifications de l'unité de base (voir Figure 118).

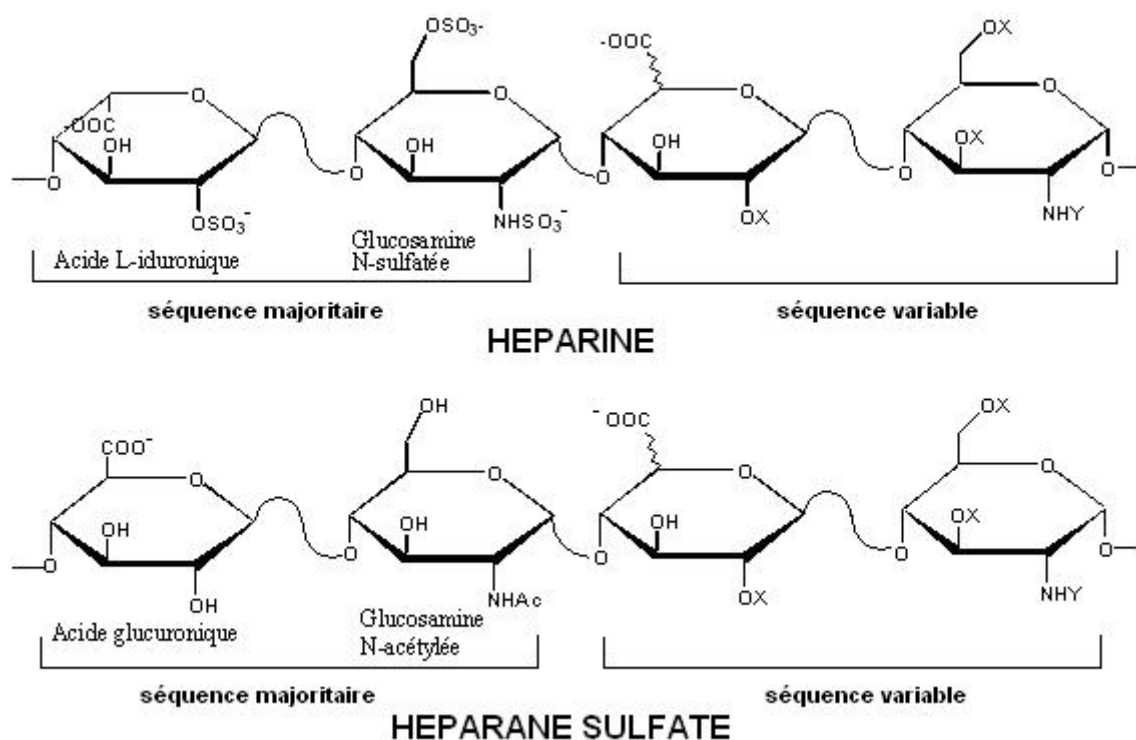


Figure 118 : Unités disaccharidiques répétées (majoritaire et minoritaire) dans l'héparine et l'héparane sulfate ($X = H$ ou SO_3^- , $Y = \text{Ac}$, SO_3^- ou H).

L'héparine est, parmi toutes les macromolécules biologiques connues, celle qui possède la plus grande densité de charges négatives en raison de sa haute teneur en groupes sulfates (2,7 SO_3^- par disaccharide en moyenne) et carboxylates (CO_2^-). L'héparine a un poids moléculaire compris entre 5 et 40 kDa, avec une masse moyenne de 15 kDa et une charge totale moyenne de -75.

Les héparanes sulfates ont une structure similaire à l'héparine mais ils sont moins substitués par des groupes sulfates et possèdent une plus grande partie variable, ce qui rend cette structure plus complexe que celle de l'héparine. Ils contiennent en moyenne un groupe sulfate par disaccharide. Leurs chaînes sont en général plus longues et ont un poids moléculaire compris entre 5 et 50 kDa avec une masse moyenne de 30 kDa.

La grande diversité structurale de l'héparine et des héparanes sulfates leur permet d'exercer un éventail de fonctions très diverses, essentiellement par le biais d'interactions directes avec de nombreuses protéines [165]. Ces interactions ont de nombreux effets et permettent, par exemple, de concentrer localement une molécule donnée, mais aussi de modifier son activité.

III.3.1.2. Rôle de la chimiokine SDF-1 α

De nombreuses cytokines intervenant dans les mécanismes de défense de l'hôte, comme IFN- γ ou SDF-1 α , ont une activité qui nécessite ou qui est améliorée par une interaction avec les glycosaminoglycanes sulfatés. Les chimiokines sont une sous-famille des cytokines, possédant une grande variété de fonctions, notamment l'activation cellulaire durant une inflammation. Elles se différencient en fonction des acides aminés Cystéine proches du N-terminal en 4 familles : CXC, CC, C et CX₃C (X étant un acide aminé quelconque entre les cystéines). De même, de nombreux virus (par exemple le VIH [166]) utilisent certains glycosaminoglycanes sulfatés pour s'adsorber à la surface cellulaire, étape nécessaire à l'entrée du virus dans la cellule.

Lors des processus d'infection par le VIH (rétrovirus responsable du SIDA), les récepteurs des chimiokines CCR5 et CXCR4 jouent le rôle de co-récepteurs pour le virus. Or, la chimiokine SDF-1 (Stromal Cell Derived Factor 1) étant le seul ligand connu pour CXCR4, cette chimiokine a la possibilité unique et sélective d'inhiber l'entrée des virus

d'immunodéficience humaine utilisant le co-récepteur CXCR4 [167]. En effet, l'occupation des récepteurs CXCR4 par SDF-1 empêche leur interaction avec le HIV et donc l'entrée des virus dans la cellule.

Cette chimiokine SDF-1 possède une affinité importantes pour certains glycosaminoglycanes sulfates ($K_d \approx 40$ nM) [168]. Les fonctions biologiques des chimiokines comme SDF-1 sont très probablement influencées par leur association avec ces glycosaminoglycanes sulfates. Il a été montré que la chimiokine SDF-1 α interagit spécifiquement avec les héparanes sulfates et que cette interaction est responsable de la liaison de SDF-1 α avec les récepteurs CXCR4 de la cellule [169].

En bref, il faut retenir que l'interaction entre glycosaminoglycanes sulfatés tels que l'héparine et les héparanes sulfates avec la chimiokine SDF-1 α joue un rôle important dans l'inhibition de l'infection des cellules par le VIH.

III.3.2. Interactions entre l'héparine HP6 et la chimiokine SDF-1 α

Cette application a été développée dans le cadre d'une collaboration entre l'équipe « interactions Protéines-Glycosaminoglycanes » du Laboratoire d'Enzymologie Moléculaire (LEM) de l'Institut de Biologie Structurale (IBS) à Grenoble, dirigée par Hugues Lortat-Jacob [170], pour la biologie, l'équipe CREAB du CEA Grenoble [99] pour la chimie de surface et notre équipe [90] pour le système optique. Les différentes expériences que nous allons détailler ont été menées avec Emilie Mercey dans le cadre de sa thèse sur la réalisation de puces à sucres au CEA Grenoble.

III.3.2.1. Matériel et méthodes

Comme pour l'application précédente, les expériences ont été réalisées sur le banc de mesure décrit dans la partie II.2 (page 100). Lors du dépôt, les prismes étudiés étaient en SF11 ($n = 1,776$), recouverts de chrome et d'or.

Pour ces expériences, la fonctionnalisation par électrocopolymérisation a été réalisée sur des lames dorées selon le protocole décrit dans la sous-partie II.1.2.2.3. Les dépôts réalisés au CEA de Grenoble, sont composés de plusieurs plots ($\phi \approx 700$ μ m) distincts de polypyrrole déposés par électrocopolymérisation ($U = 2$ V, $t = 125$ ms) d'une solution de

tampon phosphate (pH = 7) contenant du pyrrole non greffé (20 mM) et des pyrroles greffés à des oligosaccharides selon différentes concentrations.

Deux oligosaccharides différents ont été fonctionnalisés sur nos capteurs. Nous avons utilisé l'héparine HP6, disponible commercialement, pour valider les interactions héparine/SDF-1 et la chondroïtine sulfate (CS), un autre glycosaminoglycane que nous n'avons pas encore mentionné mais qui n'interagit pas avec la chimiokine SDF-1. Ce dernier oligosaccharide servira donc de contrôle négatif.

Les expériences décrites dans cette partie sont réalisées en tampon PBS 10 mM avec de la BSA 1 % (m/v) et du tween 0,05 % (v/v). La BSA est une protéine destinée à limiter les interactions non spécifiques. Toutes les expériences sont réalisées à débit constant égal à 30 μ L/min. Le protocole suivi durant l'expérience est le suivant :

- Injection du tampon dans la cuve en téflon jusqu'à stabilisation de la réflectivité (blocage de la lame par la BSA).
- Mesure de la réflectivité en fonction de l'angle d'incidence afin de déterminer l'angle de travail en cinétique (pente de la courbe mesurée maximale).
- Positionnement du miroir à l'angle de mesure déterminé précédemment.
- Injection de la protéine SDF-1 α diluée à différentes concentrations dans le tampon.
- Injection du tampon pour le rinçage et pour mesurer dans le même milieu la différence de réflectivité due à l'interaction entre la protéine et les sondes oligosaccharidiques.
- Injection de l'eau salée (NaCl 1 M) pour dénaturer les complexes protéine-sucre.
- Injection du tampon afin de comparer dans le même milieu le niveau de réflectivité avant l'expérience et celui après la régénération.

III.3.2.2. Greffage des sucres

La fonctionnalisation des puces à sucres se fait, comme pour les puces à ADN et les puces à protéine étudiées au cours de cette thèse, par électrocopolymérisation d'un mélange de pyrroles non greffés et de pyrroles greffés à un oligosaccharide. Pour réaliser cette fonctionnalisation, il faut donc auparavant construire les molécules « pyrrole-bras espaceur-sucre », ce qui fait l'objet d'études au CEA de Grenoble et qui est testé en résonance de plasmons de surface dans notre équipe.

Deux stratégies pour construire les molécules sont envisageables :

- construire la molécule « pyrrole-bras espaceur » puis coupler directement cette molécule au sucre ;
- construire séquentiellement la molécule « bras espaceur-sucre » puis coupler cette molécule au pyrrole.

Nous ne rentrerons pas dans le détail du choix des bras espaceurs et de l'élaboration de ces deux stratégies, prérogative du CEA mais nous contribuerons à caractériser leur efficacité.

Lors de nos expériences, nous avons utilisé différents bras espaceurs de longueur différente mais aussi d'hydrophobicité différente. Ces différents bras, détaillés dans la Figure 119, sont appelés, par hydrophobicité décroissante, PUH (long de 13 atomes), PCAH (21 atomes) et PUAH (16 atomes).

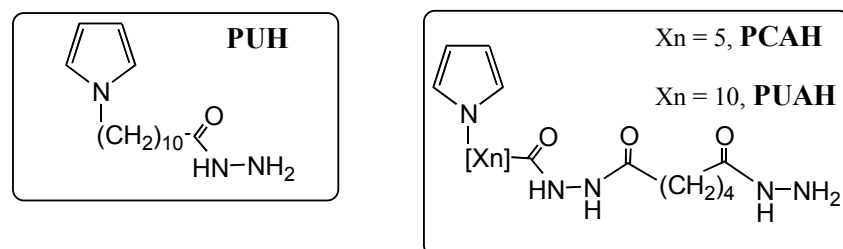


Figure 119 : Bras espaceurs, ici couplés à un pyrrole, utilisés pour le greffage des oligosaccharides. Ces bras ont une longueur de chaîne de 13 atomes (PUH), 16 atomes (PCAH) et 21 atomes (PUAH).

Le choix de ces bras espaceurs est important car, le polypyrrole étant chargé positivement et les héparanes sulfates comme l'héparine étant fortement chargés négativement, ceux-ci peuvent servir de contre-ions négatifs au pyrrole pour assurer son électroneutralité. Dans ce cas, ces oligosaccharides peuvent être collés voire même partiellement inclus dans le polymère, ce qui risque de gêner le bon déroulement des interactions.

Il nous faut aussi préciser un point important pour l'explication des résultats suivants. Les concentrations utilisées lors de l'électrocopolymérisation ne correspondent pas à la concentration de sucres greffés à un pyrrole mais à la concentration totale en sucres. Cela signifie que cette concentration comprend bien sûr les sucres greffés à un pyrrole mais aussi les sucres non greffés. Les concentrations indiquées lors de la description des différents plots sont donc à pondérer par les rendements de couplage pour une bonne compréhension. Ces rendements de couplage ont été mesurés par Emilie Mercey et sont réunis dans le tableau suivant pour indication.

Stratégie	Bras espaceur	Rendement (%)
« Pyrrole-bras espaceur »	PUH	21,7 ± 0,2
	PUAH	11,6 ± 0,2
	PCAH	14,0 ± 0,5
« bras espaceur-sucre »	PUAH	9,2 ± 0,4

Tableau 14 : Rendement de couplage entre l'héparine HP6 et les bras espaceurs.

III.3.2.3. But de l'expérience

Afin de pouvoir assigner à une séquence oligosaccharidique particulière une fonction biologique comme la reconnaissance et l'activation d'une protéine, le développement d'un système de puces oligosaccharidiques (ou puces à sucres) peu s'avérer très utile.

Dans un premier temps, un système modèle doit être validé, notamment en ce qui concerne les procédés de greffage des oligosaccharides sur la surface d'or. Nous allons donc essayer d'optimiser le signal mesuré lors d'interactions HP6/ SDF-1 α (voir Figure 120) en faisant varier les concentrations en sonde, en cible et la nature des bras espaceurs entre le pyrrole et le sucre.

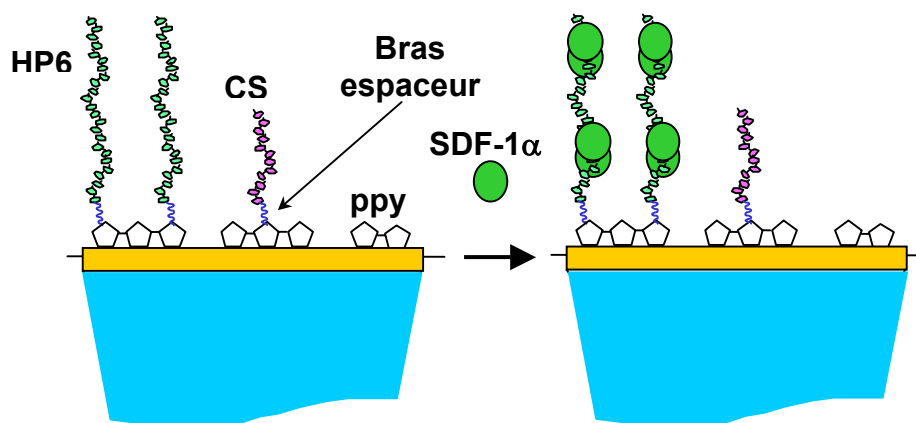


Figure 120 : Principe de la détection des interactions HP6/SDF-1 α en SPR.

Ces expériences vont permettre de mesurer l'affinité entre la protéine SDF-1 α et la chaîne de polysaccharides HP6 ainsi que la stoechiométrie de cette interaction. L'oligosaccharide HP6 comprend deux sites reconnus par SDF-1 α . De plus, cette protéine se dimérise sur ces sites, ce qui devrait porter à quatre le nombre de protéines fixées par sucre.

Cette étape préparatoire devrait, par la suite, conduire à une étude plus générale de la fonctionnalité des polysaccharides suivant leur composition.

III.3.2.4. Résultats

Pour cette expérience, nous allons présenter les résultats obtenus sur le prisme décrit dans la figure suivante. Nous avons déposé l'héparine HP6 couplée à différents bras espaceurs reliés au pyrrole. L'image des plots (de diamètre voisin de 800 μm), représentée dans la Figure 121, a été acquise sur notre banc SPR en polarisation TM lorsque la cuve en téflon est remplie de tampon et pour une incidence voisine de l'angle de travail en cinétique.

PCAH HP6 100 μM	PUAH HP6 100 μM	PUH HP6 100 μM	HP6 50 μM
PCAH HP6 25 μM	PUAH HP6 25 μM	PUH HP6 25 μM	PCAH CS 50 μM
PCAH HP6 6,25 μM	PUAH HP6 6,25 μM	PUH HP6 6,25 μM	ppy
PCAH HP6 1,56 μM	PUAH HP6 1,56 μM	PUH HP6 1,56 μM	ppy

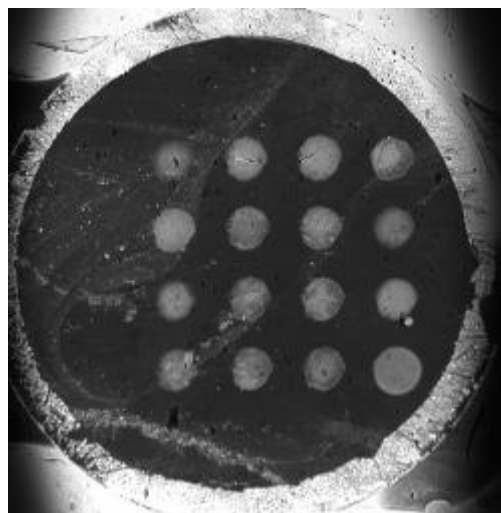


Figure 121 : Image SPR en tampon des plots d'oligosaccharides pyrrolés et leur répartition. **PCAH**, **PUAH**, **PUH** sont les différents bras espaceurs. **HP6** représente l'héparine et **CS** la chondroïtine sulfate. Les différentes concentrations indiquées sont celles des sucres (greffés à un pyrrole ou non suivant le rendement de couplage du bras espaceur) lors de l'électrocopolymérisation. **ppy** représente un plot de polypyrrole sans biomolécules. Le plot en haut à droite est composé d'**HP6** non greffé au pyrrole mais pris dans la matrice de polypyrrole.

III.3.2.4.1. Spécificité

Comme nous l'avons exposé dans les objectifs de cette expérience, nous allons commencer par vérifier la spécificité de notre puce à oligosaccharides. Cette biopuce contient deux oligosaccharides différents : **HP6** et **CS**. Nous allons injecter donc injecter la chimiokine SDF-1 α à différentes concentrations pour vérifier qu'elle interagit bien avec les plots d'**HP6** et qu'elle ne se fixe pas sur les autres plots. Avant de présenter une synthèse de ces différentes injections, nous allons tout d'abord examiner un exemple de cinétique où la protéine SDF-1 α est injectée à une concentration de 250 nM sur le capteur. Pour une meilleure lisibilité, nous

n'avons représenté, sur la Figure 122, que les cinétiques correspondant aux plots greffés à 100 μM .

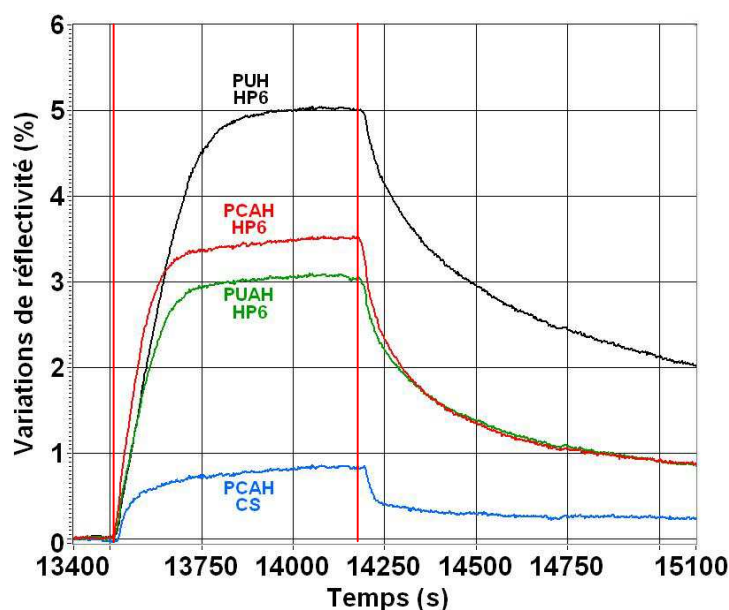


Figure 122 : Courbes de variation de réflectivité en fonction du temps correspondant à la fixation de la chimiokine SDF-1 α (250 nM) sur les plots d'héparine HP6 (100 μM) pour différents bras espaceurs (PUH, PCAH, PUAH). Les deux barres verticales rouges matérialisent les transitions entre l'injection du tampon, de la SDF-1 α (durant 12 minutes) et du tampon.

Les cinétiques de la Figure 122 nous donnent quelques indications sur la spécificité de l'interaction HP6/SDF-1 α . Pour cette concentration d'injection de la protéine (250 nM), la différenciation entre HP6 et CS se fait sans problème : avant rinçage, la variation de réflectivité due à la fixation de la protéine est beaucoup plus importante sur les plots HP6 que sur le plot CS. Par contre, durant le rinçage, la majorité des protéines fixées se dissocient, ce qui rend la différenciation entre HP6 et CS plus difficile. Le prise après rinçage est tout de même toujours différentiable sur la Figure 122 car nous y avons représenté les cinétiques d'interaction entre les plots les plus denses du capteur et la protéine injectée à une concentration assez élevée. Par la suite, lorsque les interactions vont se dérouler dans des conditions moins favorables, nous quantifierons la fixation de protéine avant rinçage pour profiter de l'amplitude maximale du signal.

Nous allons maintenant présenter une synthèse des variations de réflectivité avant rinçage provoquées par la fixation de la protéine SDF diluée à différentes concentrations.

Toutes ces injections ont été faites sur le même prisme grâce au protocole de dénaturation décrit précédemment. Les résultats de ces différentes injections sont résumés dans la figure suivante.

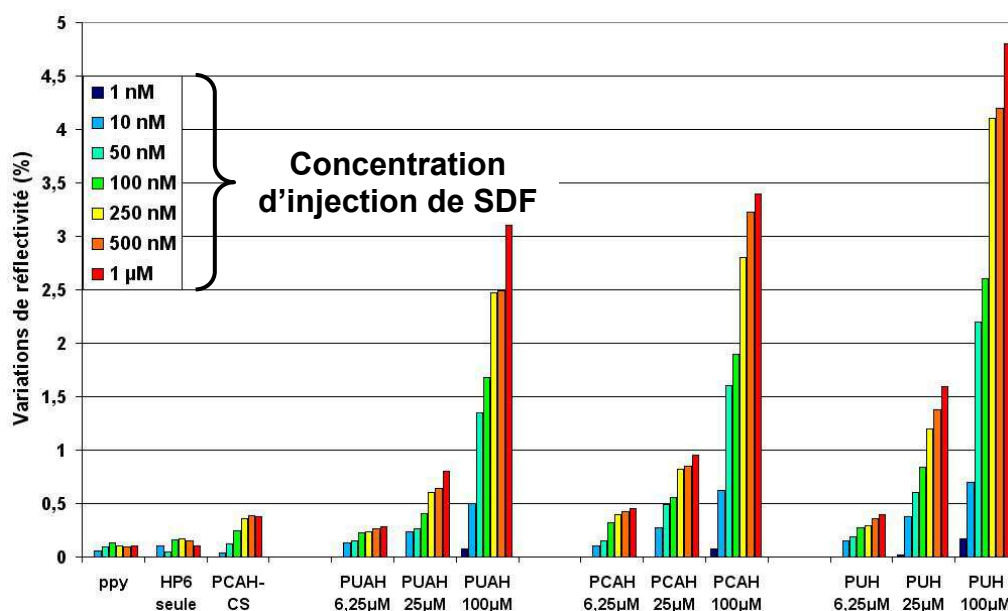


Figure 123 : Variations de réflectivité, avant rinçage, correspondant à la reconnaissance entre la protéine SDF-1 α et le sucre HP6 pour différentes concentrations de sondes (abscisses) et différentes concentrations d'injection de la protéine (couleurs).

Sur la Figure 123, les résultats obtenus sur les plots de concentration 1,56 μ M ne sont pas représentés car de trop faible amplitude et donc non significatifs. Cette figure illustre clairement la spécificité de l'interaction HP6/SDF-1 α pour des concentrations d'injection de la protéine SDF supérieures à 10 nM. En effet, pour ces concentrations, la fixation de la protéine SDF sur le polypyrrole et sur la chondroïtine sulfate, servant de contrôle négatif, est négligeable devant celle de la SDF sur les héparines HP6 couplées au pyrrole. De plus, les signaux spécifiques obtenus, résultant de l'interaction entre HP6 et SDF, augmentent avec la densité des sondes et avec la concentration des cibles injectées.

Sur le prisme étudié, nous avons aussi fonctionnalisé un plot avec de l'héparine HP6 non couplée au pyrrole. Cet oligosaccharide se retrouve simplement emprisonné dans la matrice de polypyrrole du plot. La fixation de la protéine SDF sur ce plot est du même ordre de grandeur que celle sur les plots de polypyrrole non greffés, ce qui confirme la nécessité d'utiliser un bras espaceur pour éloigner l'oligosaccharide étudié du polypyrrole.

Sur la Figure 122 comme sur la Figure 123, la quantité de protéine SDF fixée sur l'héparine HP6 semble être influencée par la nature du bras espaceur. Avant d'essayer d'interpréter ces résultats, il convient de tenir compte des rendements de couplage entre l'oligosaccharide et le bras espaceur (Tableau 14) puisque la concentration des plots indiquée est la concentration totale en sucres et seuls les sucres greffés à un pyrrole via un bras espaceur sont susceptibles d'interagir avec la protéine. Nous avons repris, dans la Figure 124, les résultats présentés dans la figure précédente mais pondérés par ce rendement de couplage.

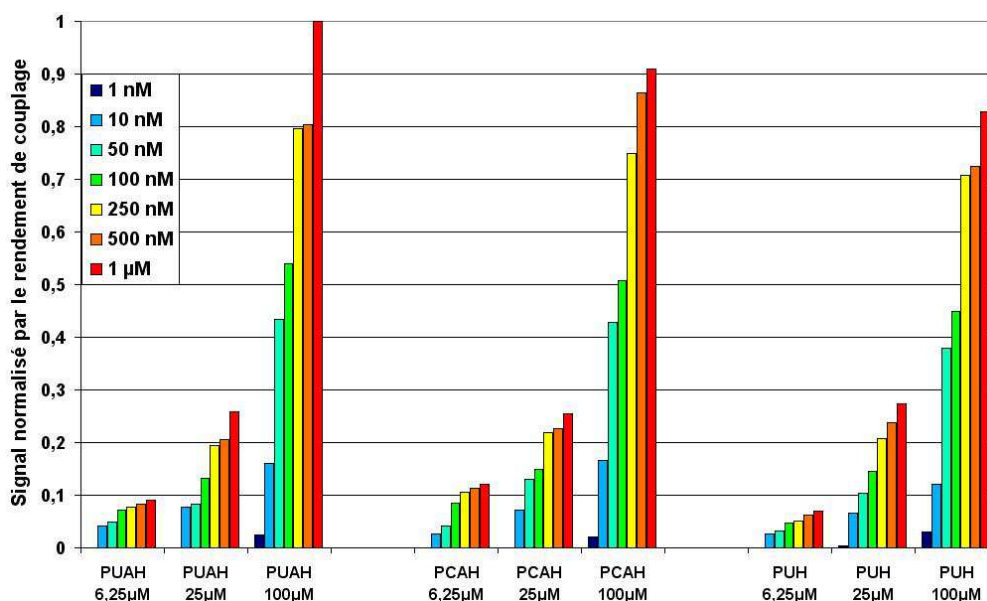


Figure 124 : Données de la Figure 123 normalisées par les rendements de couplage du Tableau 14. Les signaux de contrôle (polypyrrole, CS et HP6 non greffé), ne pouvant subir cette normalisation, n'ont pas été représentés.

Les résultats pondérés de la Figure 124 présentent nettement moins de dispersion en fonction des différents bras espaceurs que dans la Figure 123. Pour l'instant, en fonction des résultats obtenus, il est donc prématuré d'opter pour un bras espaceur plutôt qu'un autre. Les seules conclusions que nous pouvons tirer pour l'instant de ces mesures, vis-à-vis du bras espaceur, demeure que sa présence est nécessaire pour une bonne accessibilité de la chaîne oligosaccharidique et que les trois bras espaceurs étudiés (PCAH, PUAH et PUH) semblent équivalents.

III.3.2.4.2. Calcul des affinités

Les injections successives de différentes concentrations de la chimiokine SDF-1 α nous ont permis de vérifier la spécificité des interactions HP6/SDF-1 α en comparant les différentes variations de réflectivité résultantes. Nous pouvons aussi essayer d'utiliser les cinétiques obtenues pour calculer l'affinité entre sondes et cibles.

Nous allons profiter du fait que nous avons injecté plusieurs concentrations d'analyte pour mettre en application la méthode de calcul préconisée dans la sous-partie II.3.3, ce que nous n'avions pu faire pour les applications p53 où seule une concentration d'injection avait été utilisée. En bref, nous allons tout d'abord ajuster les phases d'association de chaque injection (50, 100, 250, 500 nM) pour tous les plots grâce à un programme basé sur l'algorithme de la Figure 76. L'ajustement linéaire de ces courbes en fonction de la concentration d'injection nous permet ensuite de déterminer la constante d'association k_{ass} (pente de la droite) et la constante de dissociation k_{diss} (ordonnée à l'origine de la droite). La constante d'affinité K_A est alors obtenue en faisant le rapport de ces deux grandeurs. La figure suivante représente les constantes de montée obtenues à partir des phases d'association.

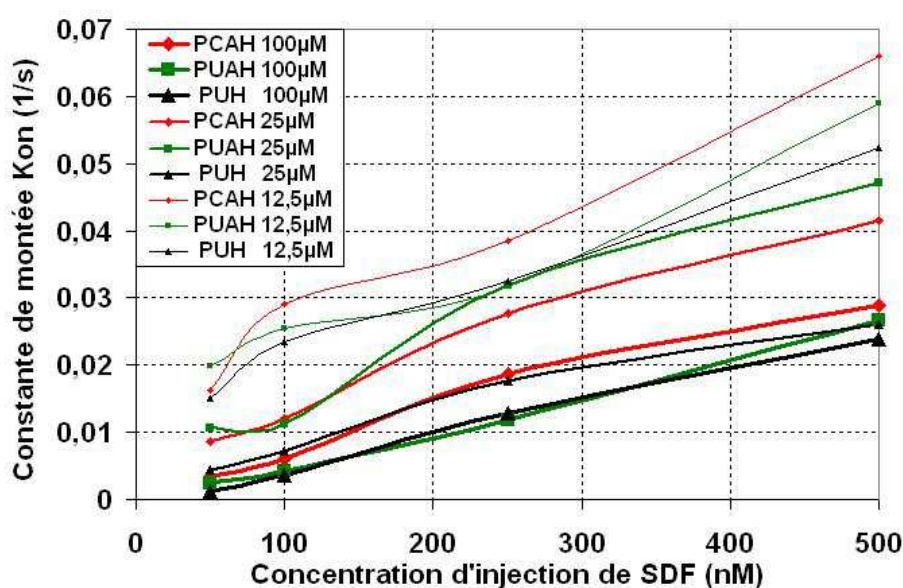


Figure 125 : Constantes de montée (k_{on}) issues de l'ajustement des phases d'association de l'héparine HP6 avec la protéine SDF-1 α sur les différents plots (identifiés par la nature du bras espaceur et leur concentration en sucre HP6) et pour différentes concentrations d'injection.

Les différentes valeurs de constantes de montée k_{on} illustrées dans la Figure 125 semblent, à première vue, varier linéairement avec la concentration d'injection des analytes comme prévu par la théorie. Ces valeurs issues des cinétiques en temps réel confirment aussi la relative indépendance de l'interaction mesurée avec la nature du bras espaceur. Par contre, la valeur des constantes de montée semble dépendre de la densité des plots, ce que nous allons confirmer par le calcul des constantes d'association et de dissociation regroupées dans le Tableau 15.

	12,5 μ M			25 μ M			100 μ M		
	PCAH	PUAH	PUH	PCAH	PUAH	PUH	PCAH	PUAH	PUH
$k_{ass}(1/(M \cdot s))$	$1,0 \cdot 10^5$	$8,5 \cdot 10^4$	$7,9 \cdot 10^4$	$7,4 \cdot 10^4$	$8,6 \cdot 10^4$	$4,9 \cdot 10^4$	$5,7 \cdot 10^4$	$5,4 \cdot 10^4$	$5,1 \cdot 10^4$
$k_{diss}(s^{-1})$	$1,4 \cdot 10^{-2}$	$1,5 \cdot 10^{-2}$	$1,3 \cdot 10^{-2}$	$5,7 \cdot 10^{-3}$	$5,9 \cdot 10^{-3}$	$2,9 \cdot 10^{-3}$	$1,3 \cdot 10^{-3}$	$-9,0 \cdot 10^{-4}$	$-1,1 \cdot 10^{-3}$

Tableau 15 : Valeur des constantes d'association et de dissociation issues de l'ajustement linéaire des courbes de la Figure 125.

Si nous excluons les valeurs du plot PUH 25 μ M, les constantes d'associations déduites de l'ajustement linéaire semblent relativement indépendantes de la nature des bras espaceurs. Globalement, nous pouvons même donner une valeur de la constante d'association entre l'héparine HP6 et la chimiokine SDF-1 α .

$$k_{ass}(HP6/SDF) = 7,1 \cdot 10^4 \pm 2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$$

La détermination de la constante de dissociation est toujours plus problématique que celle de la constante d'association. En effet, comme nous l'avons déjà expliqué dans la sous-partie II.3.3.4, lorsque les cibles se dissocient des sondes, elles peuvent s'associer à nouveau avec une autre cible présente dans le voisinage, ce qui diminue la constante de dissociation apparente mesurée. Selon le modèle monovalent théorique, la constante k_{off} mesurée durant le rinçage ne dépendant pas de la concentration d'injection C_i , il est judicieux de la mesurer après l'injection d'une concentration élevée ayant induit une réponse saturante [123]. Tous les sites disponibles des sondes étant occupés, la probabilité d'association des sondes venant de se dissocier sont alors très faibles et la constante mesurée est alors plus proche de la constante réelle.

Pour les mêmes raisons, plus la densité de sondes sur le plot sera faible, plus le phénomène de réassociation des complexes sera minoritaire et donc, plus la mesure de la

constante de dissociation sera proche de sa valeur réelle. Cette assertion est confirmée par le fait que les constantes de dissociation calculées dans le Tableau 15 sont d'autant plus élevées que la densité du plot est faible. C'est cette dispersion des valeurs de la constante de dissociation qui est, pour la plus grande partie, responsable du décalage des courbes de la Figure 125 en fonction de la densité des sondes. Nous ne conserverons donc que les valeurs issues des plots de concentration 12,5 μM pour estimer la valeur de cette constante de dissociation.

$$k_{\text{diss}}(\text{HP6/SDF}) = 1,4 \cdot 10^{-2} \pm 0,1 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$$

Cette valeur est légèrement supérieure à la valeur obtenue par ajustement de la phase de dissociation suivant l'injection de la protéine à 500 nM, qui est la concentration la plus forte que nous ayons utilisée, $k_{\text{diss}}(\text{HP6/SDF } 500 \text{ nM}) = 1,3 \cdot 10^{-2} \pm 0,2 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Nous pouvons donc maintenant estimer l'affinité entre HP6 et SDF-1 α en faisant le rapport des deux grandeurs précédentes.

$$K_D(\text{HP6/SDF}) = 195 \pm 50 \text{ nM}$$

La valeur que nous avons trouvée n'est pas en accord avec Amara *et al.* [169] qui ont estimé cette constante $K_D = 38,4 \text{ nM}$ avec la technologie Biacore. Ceci peut s'expliquer par une chimie de fixation différente et par une vitesse de circulation des cibles différente. Les calculs présentés ici illustrent la possibilité d'utiliser les cinétiques pour déterminer l'affinité entre les réactifs mais il reste encore de nombreux paramètres à optimiser comme le débit d'injection des protéines ou le densité des sondes sur les plots pour que ces calculs reflètent l'affinité réelle entre l'héparine et la chimiokine SDF-1 α .

III.3.2.4.3. Régénération

Les différentes injections de protéine SDF décrites précédemment ont toutes été réalisées sur le même prisme grâce au protocole de dénaturation défini dans la section « matériel et méthodes ». Ce protocole de dénaturation, consistant à injecter du NaCl 1 M dilué dans de l'eau, nous a permis d'utiliser le prisme fonctionnalisé, décrit dans la Figure 121, sept fois de suite pour la mesure de la spécificité de notre puce à sucre.

Le protocole de dénaturation, tel qu'il a été utilisé durant les expériences, a tout de même un inconvénient : lors du retour en tampon suivant l'injection d'eau salée, la stabilisation de la ligne de base prend plus de trente minutes, ce qui représente une durée plus importante que celle de l'interaction elle-même. Dans la figure suivante, nous avons repris les cinétiques de la Figure 122 suivies du protocole de dénaturation pour illustrer ce phénomène.

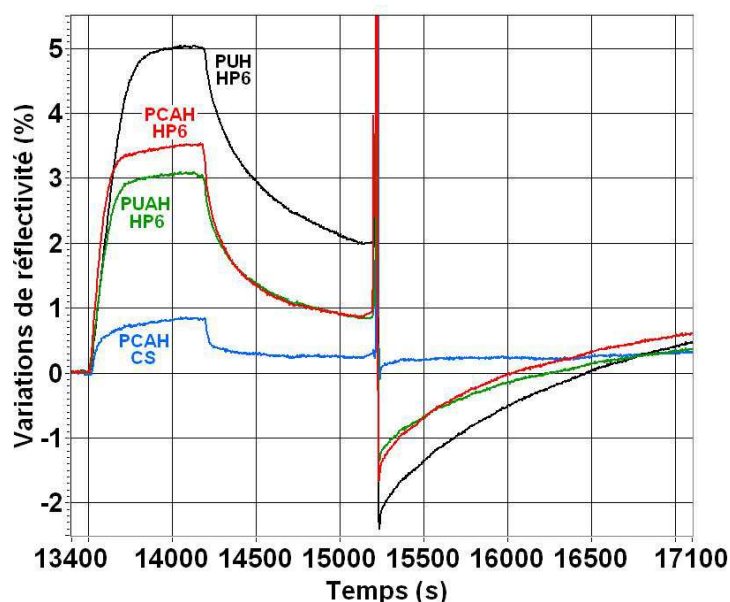


Figure 126 : Courbes de variation de réflectivité en fonction du temps correspondant à la fixation de la chimiokine SDF-1 α (250 nM) sur les plots d'héparine HP6 (100 μ M) suivie d'une brève injection (1 min matérialisée par le pic au milieu de la figure) d'eau salée (NaCl 1 M) pour dénaturer les protéines fixées et d'un retour en tampon. Cette figure reprend et prolonge les cinétiques de la Figure 122.

Sur la Figure 126, après l'injection de la solution salée dénaturante, il faut au moins une demi-heure pour que les plots d'héparine retrouvent une ligne de base stable mais le plot de chondroïtine sulfate retrouve quasiment instantanément une ligne de base stable. Bien que ces résultats ne soient pas représentés sur cette figure, les plots de polypyrrole non greffés retrouvent aussi leur stabilité instantanément.

Pour remédier à ce problème, nous avons fait des essais sur un nouveau prisme fonctionnalisé. Nous avons directement réalisé le protocole de dénaturation sur ce prisme n'ayant jamais été en contact avec la chimiokine SDF-1 α et nous avons observé le même phénomène de dérive que celui observé sur la Figure 126 (données non représentées). Nos soupçons se sont alors portés sur un constituant présent dans la solution tampon qui pourrait

interagir avec l'héparine : la BSA. Dans cette hypothèse, la solution de NaCl évacuerait la BSA des plots d'héparine et la « dérive » qui s'en suit serait due à nouveau au blocage de ces plots par le BSA présent dans le tampon tout au long de l'expérience. Pour vérifier cette supposition, à la suite du protocole de dénaturation réalisé sur le nouveau prisme, nous avons réalisé plusieurs cycles d'injection de protéine SDF suivis de dénaturation mais avec un tampon **sans BSA**. Les cinétiques obtenues sont représentées dans la Figure 127.

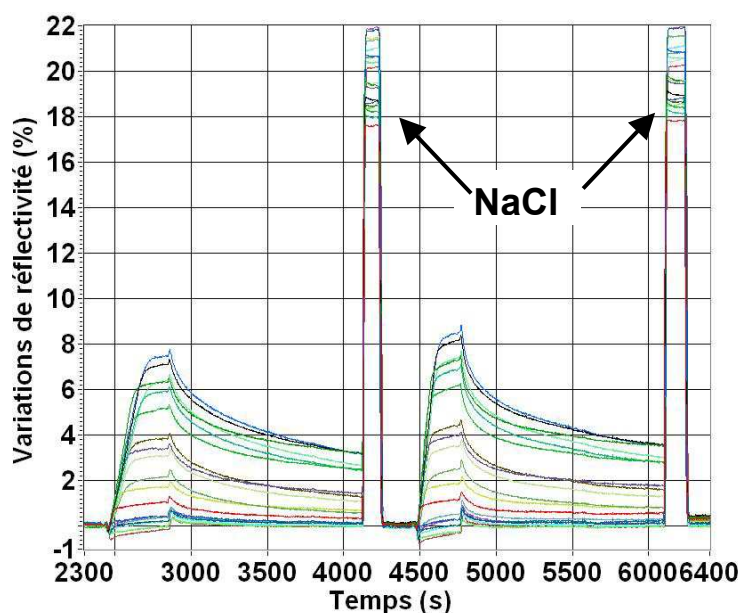


Figure 127 : Courbes de variation de réflectivité en fonction du temps correspondant à la fixation de la chimiokine SDF-1 α sur des plots d'héparine HP6 (association puis dissociation) suivie d'une brève injection (≈ 1 min) d'eau salée (NaCl 1 M) pour dénaturer les protéines fixées et d'un retour en tampon. Ce même protocole est repris deux fois entre $t = 2300$ s et $t = 4400$ s puis entre $t = 4400$ s et $t = 6400$ s. Le tampon utilisé tout au long de cette cinétique ne contient pas de BSA.

L'hypothèse d'une interaction entre le bloquant (la BSA) et l'héparine s'est donc révélée être la bonne hypothèse. En effet, sur la Figure 127, pour tous les plots, le retour en solution tampon, après l'injection de la solution salée dénaturante durant une à deux minutes, conduit immédiatement à un niveau de réflectivité stable et équivalent au niveau de réflectivité initial avant l'interaction d'intérêt. Ce nouveau protocole d'interaction va maintenant nous permettre d'utiliser nos puces à sucre de manière plus efficace.

III.3.2.5. Récapitulatif

En résumé, nous avons montré que le développement de la chimie de greffage d'un pyrrole sur un oligosaccharide via un bras espaceur adéquat réalisée au CEA de Grenoble a permis de réaliser une puce à sucres par électrocopolymérisation. Nous avons ensuite utilisé une telle puce pour montrer la spécificité de la mesure d'interaction entre l'héparine HP6 et la chimiokine SDF-1 α avec notre banc d'imagerie SPR. Nous avons utilisé avec succès la modélisation des interactions définie au chapitre précédent pour calculer l'affinité entre HP6 et SDF-1 α et montré l'importance de l'optimisation des conditions d'interaction pour la validité de ce calcul. Enfin, nous avons défini un protocole de dénaturation très simple et très rapide permettant de multiples réutilisations (au moins une dizaine) de la puce avec une bonne reproductibilité.

Conclusion

Le but de ce travail de thèse était le développement d'un système optique d'imagerie en résonance de plasmons de surface appliqué à l'analyse simultanée de multiples interactions biomoléculaires en temps réel et sa validation dans le cadre de diverses applications.

Nous avons commencé par comparer les performances de différents types de biocapteurs : les guides d'onde couplés par réseau, les interféromètres de Mach-Zehnder intégrés, les miroirs résonants, les microbalances à quartz, la résonance des plasmons de surface couplée par prisme ou par réseau, la microscopie de fluorescence et les tests ELISA. Nous avons surtout mis l'accent sur le calcul théorique de la sensibilité de la SPR couplée par prisme ou par réseau selon différentes méthodes de mesure : interrogation angulaire, spectrale ou en réflectivité. Mis à part les méthodes indirectes, plus sensibles mais nécessitant un marquage des réactifs, les différentes méthodes optiques présentées permettent d'obtenir, tout au moins en théorie, une résolution équivalente comprise entre $\Gamma = 1 \text{ pg/mm}^2$ et $\Gamma = 10 \text{ pg/mm}^2$. Le choix de la méthode de mesure dépend donc plus de sa facilité de sa mise en œuvre plutôt que de sa sensibilité. C'est pourquoi nous avons choisi d'utiliser l'imagerie en Résonance des Plasmons de Surface couplés par prisme et par interrogation en réflectivité (angle et longueur d'onde fixés), ce qui donne aussi la possibilité d'imager une surface fonctionnalisée avec de nombreux capteurs.

Ensuite, nous avons expliqué comment réaliser un biocapteur basé sur cette méthode, de la conception optique au traitement des données en passant par la chimie de fonctionnalisation du capteur. Nous avons notamment montré que, pour la préparation de l'interface métal/diélectrique, siège de la résonance des plasmons de surface, l'or est le métal qui présente le meilleur compromis entre sensibilité, biocompatibilité et possibilité de fonctionnalisation et que son adhésion sur le verre est facilitée par l'insertion d'une couche ultramince de chrome. Le choix de l'or est adapté pour fixer les sondes par la technique d'électrocopolymérisation du pyrrole, développée au CEA de Grenoble et qui permet une fonctionnalisation simple, robuste et structurée en plots de la surface d'or avec différentes biomolécules (ADN simple ou double brin, protéine, biotine, oligosaccharide).

A partir de cette interface fonctionnalisée, nous avons défini les éléments (la source, le balayage angulaire, la fluïdique, le prisme, le système optique d'imagerie et la caméra) formant un dispositif expérimental d'imagerie SPR compact et robuste, n'ayant qu'une seule partie mobile, le miroir qui permet de faire varier l'angle d'incidence sur le capteur. Entre autres, nous avons montré que l'utilisation d'une diode LED était plus simple et moins coûteuse que celle d'un laser pour l'imagerie des plasmons de surface tout en conservant une sensibilité équivalente (baisse de 5 %) et nous avons calculé une configuration de prisme (en SF11, de largeur 12 mm et d'angle au sommet $A_p = 32^\circ$) minimisant les aberrations et autorisant une imagerie simple de la surface sensible.

Une fois le banc de mesure monté, nous avons décrit comment quantifier ses mesures : par le calcul du taux de recouvrement surfacique de chaque plot, obtenu grâce à une mesure de calibration par des liquides d'indice de réfraction légèrement voisins ou par le calcul des constantes d'affinité caractérisant une interaction grâce au modèle monovalent théorique. Toutes ces mesures et analyses ont été automatisées grâce à l'élaboration d'un logiciel Labview.

A ce stade, nous avons rempli le premier objectif de cette thèse, à savoir le développement d'un système optique capable d'acquérir, en temps réel et en parallèle sur de nombreux plots, la réponse cinétique des interactions biologiques mesurées sans avoir recours à des marqueurs. La dernière partie de ce manuscrit était alors consacrée à la validation de ce biocapteur par sa confrontation à des applications biomédicales.

Grâce à notre banc d'imagerie SPR fonctionnalisé par électrocopolymérisation, nous avons pu suivre jusqu'à 196 interactions en parallèle sur une surface de $5 \times 5 \text{ mm}^2$. Nous avons pu vérifier la spécificité de la mesure d'interactions entre oligonucléotides courts ($M = 4500 \text{ Da}$), entre anticorps et antigènes, entre protéine et ADN double-brin et entre protéine et oligosaccharide grâce à ce banc. Ces applications nous ont permis de calculer les constantes d'affinité entre la protéine p53, impliquée dans de nombreux cancers humains, et certains de ses ADN doubles-brins cibles puis entre l'héparine et la chimiokine SDF-1 α , impliquée dans les mécanismes de défense cellulaire. Pour finir, pour chacun de ces différents types d'interaction, nous avons défini et testé un protocole de dénaturation afin de pouvoir utiliser plusieurs fois une même surface fonctionnalisée. Notre prototype de biocapteur peut donc servir de puce à ADN, de puce à protéines ou de puce à sucres, chacune de ces puces étant réutilisable.

Bien sûr, de nombreuses améliorations peuvent encore être apportées à ce système. Certaines sont déjà en cours de développement comme l'utilisation d'une source de longueur d'onde plus importante voire d'une source de lumière blanche (imagerie SPR multispectrale) pour augmenter la sensibilité de détection (étude menée par Pierre Lecaruyer). La sensibilité peut aussi être améliorée par l'adjonction de marqueurs fluorescents sur les cibles à condition d'utiliser la résonance des plasmons de surface pour exciter seulement les fluorophores présents au niveau de l'interface et ainsi conserver l'aspect temps réel des mesures. D'autres améliorations vont s'avérer très rapidement nécessaires pour profiter au maximum des mesures en temps réel. En effet, l'ajustement des cinétiques suivant le modèle monovalent, trop simpliste, ne reflète pas toujours la réalité. L'utilisation de modèles plus précis, tenant compte du transport de masse par exemple, devrait être une de nos priorités afin de mieux caractériser les interactions mesurées. Conjointement à cela, l'obtention d'un nombre de données toujours plus important issues des différentes expériences nécessite encore le développement de traitements bio-informatiques. Le développement d'un traitement automatisé pertinent de ces données, qui devrait rapidement progresser dans le cadre d'une collaboration de notre équipe avec l'Institut National des Télécommunications (INT) à Evry, permettra d'exploiter au mieux ces données. Pour finir, une autre perspective, à moyen terme, serait de miniaturiser le système pour limiter la quantité de réactifs biologiques utilisés qui ne sont pas toujours disponibles en grande quantité et améliorer sa portabilité. Cette miniaturisation passera par un couplage des plasmons de surface par réseau et une micro voire nanostructuration du capteur et de la fluidique d'injection des réactifs. Ces différentes améliorations devraient nous permettre d'étendre les applications de notre biocapteur aux analyses médicales d'échantillons provenant de patients. Mon post-doc en Allemagne s'inscrit dans le cadre de ces perspectives puisque je vais développer un biocapteur en spectroscopie de fluorescence excitée par des plasmons de surface qui seront couplés par des réseaux.

Annexes

Annexe 1. Glossaire

La rédaction de ce glossaire a été grandement facilitée par la consultation de deux dictionnaires en ligne sur Internet, l'un en français (le grand dictionnaire terminologique [171]) et l'autre en anglais (the dictionary.com [172]). Pour les termes spécifiques à l'immunologie, le « petit » dictionnaire d'immunologie en ligne d'Anne Decoster [173] a aussi été d'un grand secours.

Å (Angström) : Unité de mesure valant 10^{-10} mètres.

Aberration : Défaut affectant les images données par un système optique.

ADN : Acide DésoxyriboNucléique. Acide nucléique qui porte l'information génétique dans la cellule et qui permet, grâce à l'ARN-polymérase, la synthèse d'**ARN**. L'ADN est composé de deux longues chaînes de nucléotides, en forme de double hélice, jointes par des **liaisons hydrogène** entre les bases complémentaires (Adénine et Thymine ou Cytosine et Guanine).

Anamorphose : Déformation optique aboutissant à des rapports de grandissement différents selon la direction considérée dans l'objet.

Anticorps : **Immunoglobulines** synthétisées par un animal en réponse à la présence d'une substance étrangère, l'**antigène** et capables de se combiner spécifiquement avec cet **antigène** en vue de l'élimination des microorganismes pathogènes extracellulaires.

Antigène : Toute substance qui, injectée à un vertébré, est capable de susciter une réaction immunitaire spécifique (production d'**anticorps**).

Apoptose : Processus actif d'autodestruction par fragmentation de l'ADN de certaines cellules. Cette mort cellulaire peut être consécutive à une agression ou génétiquement programmée.

ARN : Acide RiboNucléique. Acide nucléique présent dans le cytoplasme composé, comme pour l'ADN, de quatre bases (Adénine, Uracile, Cytosine et Guanine). Il existe plusieurs types d'ARN, l'ARN de transfert chargé du transport des acides aminés lors de la synthèse des protéines, l'ARN ribosomique, constituant des ribosomes et site majeur de la synthèse protéinique et l'ARN messager, copie de l'ADN au niveau d'un gène.

Baculovirus : Virus infectant les larves d'insecte. Il permet de produire des protéines étrangères par infection de cellules d'insecte avec un virus modifié porteur du **gène** d'intérêt.

Binning : Le binning de pixels est une méthode où des pixels adjacents sont ajoutés pour former un superpixel. Cela permet d'augmenter le **SNR**, en ne créant qu'un bruit de lecture

par superpixel au lieu d'un par pixel. En contrepartie, cela diminue la résolution spatiale de la caméra.

Biocapteur : Dispositif où les interactions biologiques sont couplées à un **transducteur**.

Biotine : vitamine H. Molécule ayant une très grande affinité (10^{15} M^{-1}) pour l'avidine.

Bruit de photon : Bruit intrinsèque à la source lumineuse, indépendant de l'instrument de mesure et égal à la racine carrée de l'intensité mesurée.

BSA : Bovine Serum Albumin. Protéine bovine utilisée habituellement pour bloquer les sites non spécifiques de fixation des protéines.

Chaotropisme : Propriété de certaines substances (habituellement des ions comme SCN^- ou ClO_4^-), qui perturbent la structure de l'eau et favorisent de ce fait la solubilité des substances non polaires dans les **solvants** polaires (comme l'eau), le dépliement des protéines, etc....

Chimiokine : Sous-famille des **cytokines**, produites lors d'inflammations aiguës et chroniques. Ces protéines solubles de 60 à 80 acides aminés ont pour la plupart un rôle dans le chimiotactisme (mobilité) des globules blancs.

Cible : Espèce biologique en solution injectée pour interagir avec la **sonde** (convention utilisée dans les **biocapteurs**).

Codon : Unité du code génétique formée par un triplet de **nucléotides** azotés adjacents contenus dans l'**ARN** messager.

Collimaté : Rendu parallèle (souvent employé pour un faisceau lumineux).

Copolymérisation : **Polymérisation** de différents monomères ensemble.

Cytokine : Petite protéine émise par les cellules et ayant une action essentiellement locale sur la régulation de la réponse immunitaire et la communication intercellulaire.

Da : Dalton. Unité de masse molaire valant 1 g/mol.

Délétion : Perte d'une section du matériel génétique du chromosome pouvant aller d'un seul **nucléotide** à une section contenant un certain nombre de **gènes**.

Dénaturation : Altération d'une substance par des procédés physiques (chaleur) ou chimiques (pH). La dénaturation des protéines et des acides nucléiques s'obtient par rupture souvent irréversible des liaisons hydrogènes qui provoque une désorganisation de la structure secondaire des molécules sans modification de leur structure primaire. Elle s'accompagne généralement d'une perte de l'activité de la substance. Elle est aussi appelée déshybridation dans le cas de l'**ADN**.

Denhardt 1X : Solution composée de 0,02 % (m/v) **BSA**, 0,02 % (m/v) ficoll et de 0,02 % (m/v) polyvinylpyrrolidone.

Duplex : Double brin d'**ADN** composé de deux brins parfaitement complémentaires.

Dyn : Unité de force valant 10^{-5} Newtons soit $1\text{g}\cdot\text{cm}\cdot\text{s}^{-2}$.

Dynamique : Plage de variation de la grandeur d'intérêt pouvant être mesurée (voir **sensibilité et résolution**).

Electrophorèse : Technique physicochimique permettant la séparation de diverses substances contenues dans un mélange, grâce à leur différence de mobilité sous l'influence d'un champ électrique. Cette mobilité est fonction de la taille, de la forme et surtout de la charge électrique des molécules.

Electro(co)polymérisation : **(Co)polymérisation** contrôlée de manière électrochimique.

ELISA : « Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay » est un test de détection immunologique utilisant un enzyme, lié à un **anticorps** ou à un **antigène**, et servant de marqueur pour détecter une protéine spécifique.

Epaisseur optique : Grandeur égale au produit de l'épaisseur d'une couche par son indice de réfraction.

Epissage : Processus englobant l'excision des **introns** et la réunion des **exons** dans l'**ARN**.

Epitope : Structure présente à la surface de la molécule d'**antigène**, capable de se combiner à une seule molécule d'**anticorps**.

Eucaryote : Organisme dont la ou les cellules sont composées d'un noyau, délimité par une membrane nucléaire, de plusieurs chromosomes, d'un nucléole et d'organites intracytoplasmiques de structure complexe.

Exon : Fragment codant d'un **gène** qui persiste dans l'**ARN** mature.

Faux-sens (mutation) : Mutation qui remplace un **codon** spécifiant un acide aminé par un **codon** qui en spécifie un autre.

Gène : Séquence ordonnée de **nucléotides** qui occupe une position précise sur un chromosome déterminé et qui constitue une information génétique dont la transmission est héréditaire.

Glycine : Autre nom de l'acide aminoacétique. Un des 20 acides aminés entrant dans la composition des protéines.

hCG : Hormone chorionique gonadotrope humaine. Cette hormone est caractéristique de la grossesse humaine.

HPLC : High Pressure Liquid Chromatography. La Chromatographie Liquide de Haute Pression est une méthode de séparation d'un mélange de composés basée sur leurs différentes propriétés physiques, comme la polarité, la charge et la taille.

Hybridation : Association de chaînes d'acides nucléiques simple brin pour former des doubles brins (**duplex**).

IFN- γ : Interféron gamma. Les interférons (α , β et γ) sont des **cytokines** produites par les cellules infectées et bloquant le cycle de multiplication du virus dans les cellules saines.

IgG : Immunoglobuline de type G. Les immunoglobulines désignent l'ensemble des globulines sériques constituant les **anticorps**. Les IgG forment le composant majoritaire (80%) des **anticorps**.

Immunocapteur : **Biocapteur** analysant des interactions immunochimiques entre un **antigène** et son **anticorps** spécifique.

Intron : Fragment non codant d'un **gène**, souvent de grande taille, situé entre deux **exons**.

Liaison hydrogène : Faible force d'attraction entre un atome électronégatif et un atome d'hydrogène lui-même uni par une liaison covalente à un second atome électronégatif.

Mésappariement : Non appariement entre un ou plusieurs couples de bases non complémentaires au sein d'un **ADN** double brin.

Monoclonal (anticorps) : **anticorps** issu d'un clone cellulaire unique. L'isolement de cette lignée clonale permet la sécrétion d'un anticorps unique (par exemple un anticorps monoclonal anti-A issu d'un organisme B).

Nucléotide : Nom courant donné aux constituants de base de l'**ADN** ou de l'**ARN**, formé d'une base azotée liée à un sucre (ribose ou désoxyribose) et à un phosphate.

ODN : OligoDésoxyNucléotide. Voir **oligonucléotide**.

Oligonucléotide : Séquence d'**ADN** contenant un faible nombre de **nucléotides** obtenue par synthèse.

Oligosaccharide : Chaîne contenant un faible nombre de saccharides. Sucre formant un composant structurel essentiel des cellules vivantes.

Ouverture numérique : Quantité invariante caractérisant un système optique. Elle est égale au produit de l'indice de l'objet par le sinus de l'angle le plus incliné sur l'axe optique.

p53 : Protéine qui joue un rôle crucial dans la réponse cellulaire aux dommages subis par l'**ADN**. Cette protéine est mutée dans plus de la moitié des cancers humains.

Paratope : Partie variable de la molécule d'**anticorps**, qui est capable de reconnaître l'**antigène** et qui constitue le site de combinaison spécifique avec l'**épitope** de cet **antigène**.

Péristaltique (pompe) : Pompe dans laquelle le fluide est acheminé par compression dans des tuyaux souples où il circule.

PBS : Phosphate Buffer Saline. Solution tamponnée composée de NaCl (137 mM), de KCl (2,7 mM) et de **tampon** phosphate 0,01 M (pH = 7,4)

PCR : Polymerase Chain Reaction (Amplification en chaîne par polymérase). Technique d'amplification *in vitro* de séquences d'**ADN**. Cette technique peut amplifier une séquence spécifique d'**ADN** sans limitations et permet d'obtenir, à partir d'un échantillon complexe et peu abondant, d'importantes quantités d'un fragment d'**ADN** spécifique et de longueur définie.

pI : point isoélectrique. pH auquel la molécule, dans une solution, ne se déplacera plus dans un champ électrique parce qu'elle n'a plus une charge électrique nette. Lorsque le pH de la solution est supérieur au pI de la molécule, celle-ci est chargée négativement et inversement.

pKa : Le pKa ou opposé du logarithme de la constante acide d'ionisation est défini dans un milieu aqueux comme la capacité d'un groupe ionisable de donner un proton (H^+). Lorsque le pH de la solution est supérieur au pKa de la molécule, sa forme basique est majoritaire alors que dans le cas contraire, c'est la forme acide qui est majoritaire.

Polarisation TE (ou s ou $\perp$) : Transverse Electrique. Le champ électrique est perpendiculaire au plan d'incidence défini par la direction du faisceau incident et la normale à l'interface.

Polarisation TM (ou p ou //) : Transverse Magnétique. Le champ magnétique est perpendiculaire au plan d'incidence.

Polyclonal (anticorps) : un **anticorps** polyclonal issu d'un organisme A est obtenu en collectant les **anticorps** présents dans cet organisme.

Polymère : Molécule composée d'une répétition d'unités relativement simples (monomères) liées entre elles.

Polymérisation : Procédé consistant à combiner plusieurs molécules identiques (monomères) pour former un **polymère**.

Promoteur : Séquence d'**ADN** que doit reconnaître l'**ARN** polymérase pour que soit initiée la transcription, qui se déroule ensuite sous le contrôle de cette enzyme.

Protéomique : étude du niveau d'expression et de la fonctionnalité des protéines d'un organisme.

Purique (base) : Substance azotée dont la structure comprend un noyau purine, qui entre dans la composition des **nucléotides**. L'adénine (A) et la guanine (G) sont les deux bases rencontrées dans les acides nucléiques.

Pyrimidique (base) : Substance azotée dont la structure dérive d'un noyau pyrimidine, entrant dans la constitution des **nucléotides**. Les bases pyrimidiques qui constituent les acides

nucléiques sont la cytosine (C), la thymine (T) présente dans l'**ADN** et l'uracile (U) présente dans l'**ARN**.

QCM : Quartz Cristal Microbalance. La microbalance à quartz est un capteur basé sur la mesure de variations de fréquence d'oscillation liées aux variations de masse.

Recombinant : Matériel produit par ingénierie génétique.

Résolution : Valeur minimale de la grandeur d'intérêt, liée au **SNR**, pouvant être mesurée sans ambiguïté (voir **sensibilité** et **dynamique**).

R.I.U. : Refractive Index Unit. L'indice de réfraction est une grandeur sans unité mais cette « unité » permet une meilleure compréhension de l'homogénéité d'une formule.

SAW : Surface Acoustic Waves. Ondes de surface acoustiques utilisées dans le cadre des microbalances à quartz.

Sensibilité : Coefficient de proportionnalité entre la grandeur mesurée et la grandeur d'intérêt (voir **dynamique** et **résolution**).

SDF-1 α : Stromal Cell Derived Factor 1alpha. Chimiochine antivirale qui est l'unique ligand naturel du récepteur CXCR4, l'un des deux principaux corécepteurs du **VIH** présents sur la membrane cellulaire.

SNP : Single Nucleotide Polymorphism. Substitution d'une base par une autre sur un brin d'**ADN**.

SNR : Signal to Noise Ratio. Rapport signal sur bruit. Le signal se détecte d'autant plus facilement que le SNR est élevé.

Soluté : Espèce dissoute présente en faible quantité dans le **solvant**.

Solvant : Substance, généralement liquide, dans laquelle sont dissous les **solutés**.

Sonde : Espèce biologique fixée à l'interface solide du **biocapteur** pour reconnaître la **cible**.

SPR : Surface Plasmon Resonance. La résonance des plasmons de surface est le sujet principal de ce manuscrit.

Tampon : Système formé par une solution d'un sel d'acide fort avec une base faible, ou d'un sel d'acide faible avec une base forte, dont le pH varie peu lors de l'addition d'un produit basique ou acide. Solution dont le rôle est de maintenir les molécules biologiques dans des conditions particulières de pH.

Taux de recouvrement (Γ) : Grandeur mesurée par les **biocapteurs** optiques correspondant à la quantité de matière par unité de surface s'étant déposée sur le transducteur.

Température de fusion (T_m) : Température moyenne à laquelle 50 % de l'**ADN** double brin est dissocié. Cette température dépend de la composition des brins et du milieu.

TIRS : Total Internal Reflection Spectrometry. La spectrométrie de réflexion interne totale peut être utilisée comme un **biocapteur** optique.

Transcription : Copie de l'information génétique de l'**ADN** à l'**ARN** des cellules.

Transducteur : Élément transformant un signal d'un type donné en un signal d'un autre type (par exemple un signal biologique en signal optique ou électrique).

Tween : Détergent, surfactant permettant d'améliorer la mouillabilité des surfaces.

VIH : Rétrovirus responsable du SIDA.

Annexe 2. Rappels d'optique

- Indice de réfraction

La lumière se propage en ligne droite dans les milieux diélectriques à une vitesse constante. Cette vitesse, caractéristique du milieu traversé, détermine l'indice de réfraction n pour une longueur d'onde donnée. Cet indice est défini par la relation suivante :

$$n(\lambda) = \frac{c}{v} \quad (\text{II-1})$$

avec c , la vitesse de la lumière dans le vide et v , la vitesse de la lumière dans le milieu.

- Loi de Snell-Descartes

Au passage d'un milieu 1 d'indice de réfraction n_1 vers un milieu 2 d'indice n_2 , la direction de propagation d'un faisceau lumineux suit la relation suivante :

$$n_1 \cdot \sin \theta_1 = n_2 \cdot \sin \theta_2 \quad (\text{II-2})$$

avec θ_1 (resp. θ_2) l'angle entre le faisceau dans le milieu 1 (resp. 2) et la normale à l'interface entre les deux milieux.

- Angle de réfraction limite

Si nous appliquons la loi de Snell-Descartes (II-2) à l'interface entre le milieu d'incidence d'indice de réfraction n_1 et un milieu d'indice de réfraction n_2 ($n_2 < n_1$), nous pouvons calculer les angles définis par rapport à la normale à l'interface du faisceau réfléchi θ_r et du faisceau transmis θ_t en fonction de celui du faisceau incident θ_i . Comme la réflexion se fait dans le même milieu que le milieu incident, nous en déduisons que $\theta_r = \theta_i$. L'angle du faisceau transmis avec la normale vaut :

$$\theta_t = \arcsin \left(\frac{n_1}{n_2} \cdot \sin \theta_i \right) \quad (\text{II-3})$$

D'après cette équation, pour que le faisceau transmis existe, il faut que le terme à l'intérieur de l'arcsinus soit inférieur à 1. L'angle d'incidence maximal au-delà duquel il n'y a plus de faisceau transmis est appelé angle de réfraction limite et se déduit de l'équation (II-3).

$$\theta_c = \arcsin\left(\frac{n_2}{n_1}\right) \quad (\text{II-4})$$

Deux cas peuvent alors se présenter. Quand l'angle d'incidence θ_i du faisceau est supérieur à l'angle limite θ_c , nous sommes en réflexion totale (faisceau rouge sur la Figure 128). Quand il est inférieur à l'angle limite, le faisceau incident se décompose alors en une partie réfléchi et une partie réfractée (faisceau vert sur la Figure 128).

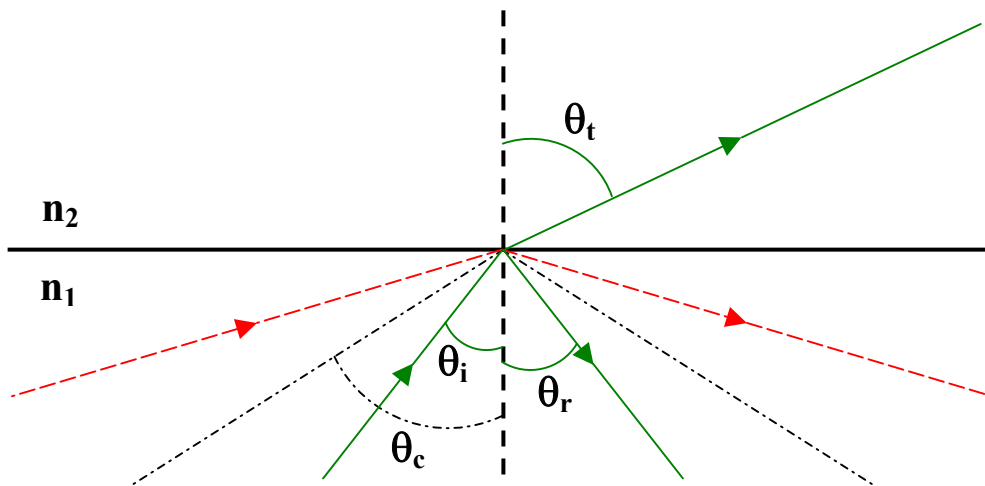


Figure 128 : Loi de Snell-Descartes et angle de réfraction limite θ_c lors du passage d'un milieu 1 d'indice élevé à un milieu 2 d'indice de réfraction plus faible. Le faisceau en pointillés (rouge) est entièrement réfléchi tandis que le faisceau en trait plein (vert) est partiellement transmis.

- Polarisation

Un faisceau lumineux peut être considéré comme une onde électromagnétique. Un faisceau lumineux est donc caractérisé par sa direction mais aussi par son champ électrique et son champ magnétique. Ces champs $\vec{E}$ et $\vec{B}$ sont orthogonaux et contenus dans le plan normal à la direction de propagation du faisceau. Lorsque ces champs n'ont aucune orientation particulière (le champ de chaque photon a une orientation différente), le faisceau est dit non polarisé.

Dans le cas d'un faisceau incident sur l'interface entre deux milieux, comme illustré sur la Figure 128, deux polarisations remarquables sont à noter :

- Polarisation TE (ou s ou $\perp$) : Transverse Electrique. Le champ électrique est perpendiculaire au plan d'incidence défini par la direction du faisceau incident et la normale à l'interface.
- Polarisation TM (ou p ou $//$) : Transverse Magnétique. Le champ magnétique est perpendiculaire au plan d'incidence.

Toute polarisation peut se décomposer en une combinaison de ces deux polarisations.

- Coefficients de réflexion et de transmission

Lorsque l'angle d'incidence du faisceau est inférieur à l'angle de réfraction limite, nous avons décrit dans les pages précédentes que la faisceau se décomposé en une partie réfléchie et une partie transmise. Il nous faut maintenant définir selon quelles proportions se fait cette décomposition grâce aux coefficients de réflexion et de transmission. Les coefficients de réflexion (resp. de transmission) d'un faisceau lumineux dans un milieu 1 vers un milieu 2 correspondent au rapport entre l'amplitude incidente et l'amplitude réfléchie (resp. transmise) et valent, selon la polarisation :

- Polarisation TE :

$$r_{TE} = \frac{n_1 \cdot \cos \theta_1 - n_2 \cdot \cos \theta_2}{n_1 \cdot \cos \theta_1 + n_2 \cdot \cos \theta_2} \quad (\text{II-5})$$

$$t_{TE} = \frac{2 \cdot n_1 \cdot \cos \theta_1}{n_1 \cdot \cos \theta_1 + n_2 \cdot \cos \theta_2}$$

- Polarisation TM :

$$r_{TM} = \frac{n_1 \cdot \cos \theta_2 - n_2 \cdot \cos \theta_1}{n_1 \cdot \cos \theta_2 + n_2 \cdot \cos \theta_1} \quad (\text{II-6})$$

$$t_{TM} = \frac{2 \cdot n_1 \cdot \cos \theta_1}{n_1 \cdot \cos \theta_2 + n_2 \cdot \cos \theta_1}$$

Des coefficients similaires sont définis pour les rapports d'énergie. Ces coefficients de transmission T et de réflexion R en énergie se déduisent des coefficients en amplitude t et r , indépendamment de la polarisation, selon la relation suivante :

$$R = r^2$$

$$T = \frac{n_2 \cdot \cos \theta_2}{n_1 \cdot \cos \theta_1} \cdot t^2 \quad (\text{II-7})$$

Le principe de la conservation de l'énergie se traduit alors par $\mathbf{R} + \mathbf{T} = \mathbf{1}$.

- Guide d'onde

Un guide d'onde est composé d'un film mince diélectrique d'indice élevé n_1 (structure guidante) encadrée de deux milieux diélectriques d'indices de réfraction n_2 plus faible. Un faisceau lumineux guidé par réflexions totales successives peut être représenté par plusieurs rayons lumineux appelés également modes.

Considérons un rayon lumineux se propageant dans l'air, faisant un angle θ' avec l'axe du guide, pénétrant dans la structure guidante d'indice n_1 . D'après la loi de Snell-Descartes (relation (II-2)), nous pouvons écrire :

$$\sin \theta' = n_1 \cdot \cos \theta \quad (\text{II-8})$$

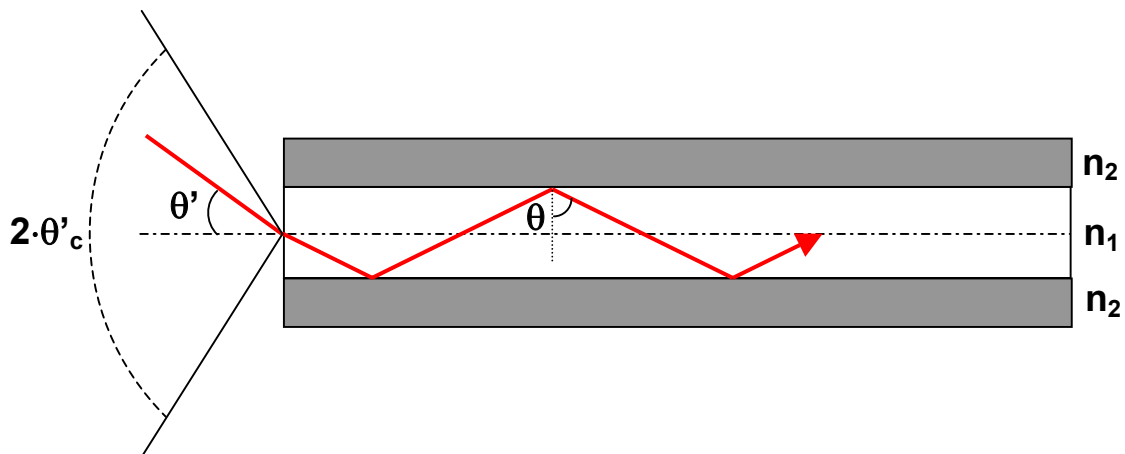


Figure 129 : Transmission d'un rayon lumineux à travers un guide d'onde.

Pour un rayon d'incidence inférieure à θ_c (angle critique) dans le guide d'onde, la réflexion dans le milieu d'indice n_1 n'est pas totale et, après plusieurs réflexions, le guidage est interrompu. Cela entraîne l'existence d'un **cône d'acceptance** vérifiant :

$$2 \cdot \theta'_c = 2 \cdot \arcsin(n_1 \cdot \cos \theta_c) \quad (\text{II-9})$$

Soit, en combinant cette équation avec la relation (II-4) :

$$2 \cdot \theta'_c = 2 \cdot \arcsin(\sqrt{n_1^2 - n_2^2}) \quad (\text{II-10})$$

Tout faisceau incident situé dans ce cône d'angle $2 \cdot \theta'_c$ va donc être guidé et se propager par réflexions totales. L'équation (II-10) nous montre que plus le contraste d'indice entre les couches sera élevé, plus le cône d'acceptance sera évasé et plus il sera facile d'injecter de la lumière dans le guide. A chaque inclinaison θ va alors correspondre un groupe de rayons auquel un mode peut être associé. Chaque mode est caractérisé par sa vitesse de phase V_p liée à l'angle θ , correspondant à sa vitesse de propagation selon l'axe du guide, définie par :

$$V_p = \frac{c}{n_1 \cdot \sin \theta} \quad (\text{II-11})$$

Par analogie avec la relation (II-1), nous appelons alors **indice effectif** n_{eff} la grandeur $n_1 \cdot \sin \theta$. Cet indice effectif correspond à un milieu fictif où l'onde lumineuse, se propageant parallèlement à la direction du guide, avancerait à la même vitesse que l'onde réelle se propageant par réflexions successives dans le guide. Cet indice effectif tient compte des indices de réfraction des milieux encadrant la structure guidante à travers la valeur de l'angle θ que nous allons maintenant définir pour chaque mode de propagation.

En considérant un rayon lumineux confiné à l'intérieur d'un guide, les ondes planes associées aux rayons parallèles AB et CD interfèrent.

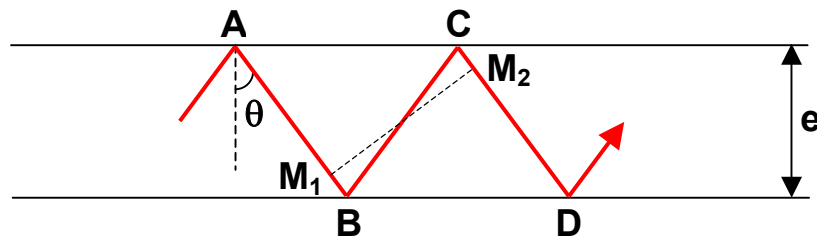


Figure 130 : Confinement d'un mode à l'interface entre deux milieux.

Le déphasage entre les ondes associées aux rayons AB et CD vaut dans ce cas :

$$\Delta\varphi = k \cdot n_1 \cdot (M_1 B + BC + CM_2) + 2 \cdot \phi_b + 2\phi_c \quad (\text{II-12})$$

avec $2 \cdot \phi_b$ ($2 \cdot \phi_c$), le déphasage dû à la réflexion totale au point B (C), respectivement

$$(\phi_{TE,1 \rightarrow 2} = \arctan \left(\frac{\sqrt{n_1^2 \cdot \sin^2 \theta - n_2^2}}{n_1 \cdot \cos \theta} \right) \text{ et } \phi_{TM,1 \rightarrow 2} = \arctan \left(\frac{n_1 \cdot \sqrt{n_1^2 \cdot \sin^2 \theta - n_2^2}}{n_2^2 \cdot \cos \theta} \right)).$$

Pour que l'onde se propage, les interférences doivent être constructives, c'est-à-dire que le déphasage doit être multiple de 2π .

$$2 \cdot k \cdot n_1 \cdot \cos \theta \cdot e + 2 \cdot \phi_b + 2 \cdot \phi_c = 2 \cdot m \cdot \pi \quad (\text{II-13})$$

Pour une valeur de m donnée, il n'y a au plus qu'un seul angle d'incidence θ qui satisfait à l'équation (II-13). La forme du champ électromagnétique associé au rayon lumineux guidé pour une valeur de m constitue donc le **mode guidé d'ordre m** . En ajustant le paramètre e correspondant à l'épaisseur du guide, le nombre d'ordres guidés peut être limité. Pour chaque mode guidé d'ordre m correspond une **épaisseur de coupure** $e_{c,m}$ en dessous de laquelle ce mode ne peut être couplé dans le guide. Cette épaisseur vaut :

$$e_{c,m} = \left| \frac{m \cdot \pi - (\phi_b + \phi_c)}{k \cdot n_1} \right| \quad (\text{II-14})$$

Pour des épaisseurs de guide comprises entre $e_{c,0}$ et $e_{c,1}$, nous parlons alors de **guide monomode** (cette notion dépend de la polarisation).

- Méthode de Rouard

Cette méthode permet de calculer les coefficients de réflexion lorsque le faisceau est incident sur un empilement de couches minces, en fonction des indices de réfraction et des épaisseurs de ces couches. A partir de la connaissance du facteur de réflexion à l'interface entre deux milieux (e_{p-1} , n_{p-1}) et (e_p , n_p), nous remontons au facteur de réflexion de l'ensemble de l'empilement par une formule de récurrence sur les interfaces. Les différents milieux sont définis dans le sens de propagation du faisceau comme illustré dans la figure suivante (5 milieux et 4 interfaces). Le but de cette méthode est de calculer le coefficient $r_{0,p}$ tenant compte des $p-1$ interfaces.

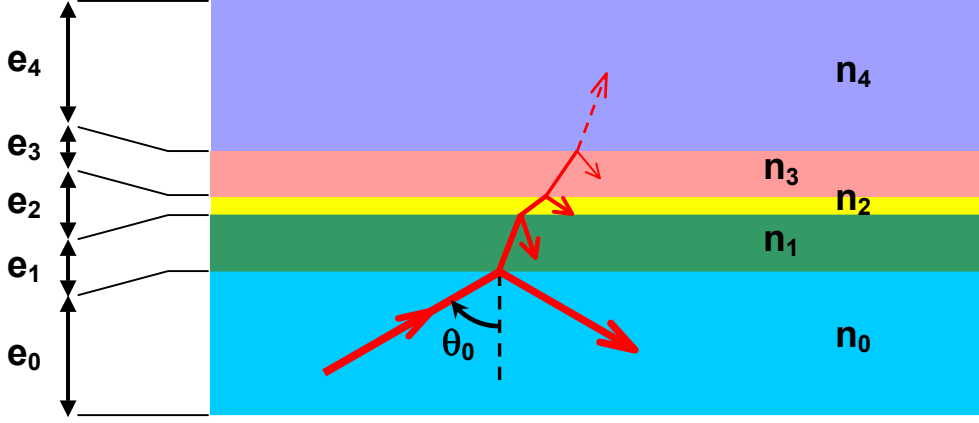


Figure 131 : Faisceau incident sur un empilement de couches d'indices différents et d'épaisseurs différentes sous l'incidence initiale θ_0 .

Soit $r_{p-1,p}$ le facteur de réflexion en amplitude d'un faisceau issu d'un milieu $p-1$ sur un milieu p . Suivant la polarisation, l'expression de ce coefficient est décrite plus haut dans les équations (II-5) en polarisation TE et (II-6) en polarisation TM. Les différents angles de réfraction (θ_p) intervenant dans ces coefficients sont déduits de la loi de Snell-Descartes.

Nous appliquons une récurrence qui tient compte des multiples réflexions entre deux interfaces à partir de la dernière interface. Le coefficient de réflexion entre la couche $p-2$ et la couche p (en tenant compte de la couche $p-1$ intermédiaire) vaut :

$$r_{p-2,p} = \frac{r_{p-2,p-1} + r_{p-1,p} \cdot e^{j\varphi_{p-1}}}{1 + r_{p-2,p-1} \cdot r_{p-1,p} \cdot e^{j\varphi_{p-1}}} \quad (\text{II-15})$$

où $\varphi_p = \frac{2\pi}{\lambda} \cdot 2 \cdot n_p \cdot e_p \cdot \cos \theta_p$ est le déphasage introduit par une aller-retour dans le milieu p .

Finalement, par récurrence, nous arrivons à l'expression suivante :

$$r_{0,p} = \frac{r_{0,1} - r_{1,p} \cdot e^{j\varphi_1}}{1 + r_{0,1} \cdot r_{1,p} \cdot e^{j\varphi_1}} \quad (\text{II-16})$$

A l'aide de ce formalisme par récurrence et d'un ordinateur, nous sommes capables de calculer la réflexion et la transmission d'un empilement de plusieurs couches minces.

- Optique géométrique

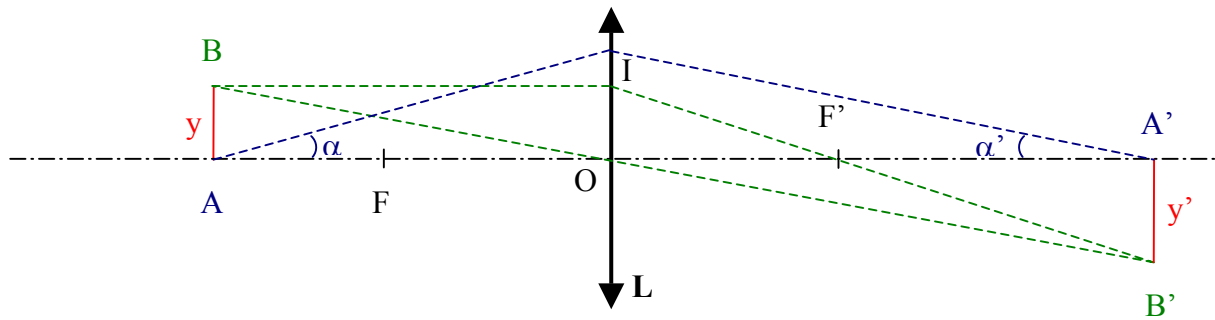


Figure 132 : Imagerie du segment AB en un segment $A'B'$ par la lentille L . (F) Point focal objet de la lentille. (F') Point focal image de la lentille.

Sur la Figure 132, est représenté le schéma général de conjugaison d'une lentille. L'axe (FF') est appelé **axe optique** de la lentille, le plan passant par F et perpendiculaire à l'axe optique est appelé **plan focal objet** tandis que celui passant par F' est appelé **plan focal image**. Un faisceau incident parallèle à l'axe optique sort de la lentille en passant par le point focal image, un faisceau incident passant par le point focal objet sort de la lentille parallèle à l'axe optique tandis qu'un faisceau passant par le centre de la lentille n'est pas dévié.

Si nous notons $x = \overline{OA}$ $x' = \overline{OA'}$ $f' = \overline{OF'}$, $y = \overline{AB}$ $y' = \overline{A'B'}$ et $\alpha = \widehat{OAI}$ $\alpha' = \widehat{OA'I}$, la **formule de conjugaison** d'une lentille reliant x à x' s'écrit :

$$\frac{1}{x'} - \frac{1}{x} = \frac{1}{f'} \quad (\text{II-17})$$

Le **grandissement transversal** est défini par le rapport entre la taille de l'image et celle de l'objet $G_y = \frac{y'}{y}$ et le **grossissement** par le rapport entre les angles que font le rayon incident coupant l'axe au niveau de l'objet et le rayon sortant coupant l'axe au niveau de l'image avec l'axe optique $\gamma = \frac{\alpha'}{\alpha}$. Lorsque les milieux d'incidence et de sortie sont identiques, nous avons la relation suivante : $G_y \cdot \gamma = 1$. L'**ouverture numérique** est égale au produit de l'indice du milieu où est situé l'objet par le sinus de l'angle le plus incliné sur l'axe optique (dans l'air, $N = \sin u$). Dans les cas où u est petit, N peut être approximé par la formule suivante : $N = \frac{D}{2 \cdot f'}$ avec D le diamètre de la lentille.

Un moyen d'étudier les rayons traversant une lentille est d'utiliser le **formalisme de Jones**. Dans ce formalisme matriciel, un rayon, à une abscisse donnée, est décrit par deux paramètres : son ordonnée y et son inclinaison α alors qu'une lentille est décrite par une matrice transformant le rayon incident décrit dans le plan focal objet en un rayon transmis décrit dans le plan focal image.

- Un rayon est caractérisé par son ordonnée y et son angle d'inclinaison α : $\begin{pmatrix} y \\ \alpha \end{pmatrix}$
- La matrice de Jones d'une lentille entre ses 2 plans focaux vaut :

$$L_{f'} = \begin{pmatrix} 0 & f' \\ -1/f' & 0 \end{pmatrix}$$
- La matrice de Jones d'une translation x selon l'axe optique (le rayon traverse une épaisseur x d'un même milieu) vaut : $T_x = \begin{pmatrix} 1 & x \\ 0 & 1 \end{pmatrix}$.

- Profondeur de champ

Dans un système optique, nous pouvons nous convaincre facilement que si nous nous positionnons à la distance x' de la lentille, nous n'aurons nets que les objets situés à la distance x de la lentille, x étant donné par l'équation (II-17). Il n'y a donc qu'une distance qui procure une netteté parfaite. Pour pouvoir parler de profondeur de champ, nous sommes obligés de permettre une certaine tolérance quant à la netteté de l'image. Dans une image floue, chaque point de l'objet donne un petit disque lumineux. Nous allons considérer que l'image est nette lorsque le diamètre de ce disque est inférieur à une certaine tolérance e . Dans le cas d'un système d'imagerie sur une caméra CCD, cette tolérance e va être fixée à la dimension d'un pixel, qui est l'élément de base de constitution de l'image.

Dans le cas qui nous intéresse, c'est-à-dire un système afocal d'ouverture numérique $N = \sin u$ et de grandissement $G_y = -1$, le faisceau lumineux est collimaté avant le système optique et ressort donc collimaté. Ce faisceau n'est en fait pas rigoureusement parallèle mais est caractérisé par un angle de divergence $2\cdot\alpha$. C'est cette divergence qui va nous permettre de calculer la profondeur de champ δx en fonction de la taille δy du pixel de la caméra CCD comme illustré sur la Figure 133.

Cette figure représente la tolérance de positionnement du pixel de la caméra CCD par rapport au plan focal image. Puisque le système étudié est de grandissement $G_y = -1$, cette représentation est équivalente à la tolérance du positionnement du plan objet donnant une image nette sur un pixel situé dans le plan focal image.

Dans le triangle ABC, nous avons la relation suivante :

$$\cos(u - \alpha) = \frac{\delta x}{AC} \quad (\text{II-18})$$

Figure 133 : Profondeur de champ $2 \cdot \delta x$ d'un système afocal d'imagerie sur des pixels de côté δy . u représente l'inclinaison des rayons et $2 \cdot \alpha$ la divergence du faisceau.

Dans le triangle ACD, nous avons la relation suivante :

$$\frac{\delta y}{\sin(2 \cdot \alpha)} = \frac{AC}{\cos(u + \alpha)} \quad (\text{II-19})$$

En combinant les relations (II-18) et (II-19), nous pouvons en déduire la profondeur de champ dans ces conditions particulières :

$$2 \cdot \delta x = \left(\frac{\cos^2 u - \sin^2 \alpha}{\sin(2 \cdot \alpha)} \right) \cdot 2 \cdot \delta y \quad (\text{II-20})$$

Dans l'équation (II-20), nous voyons que plus les rayons sont inclinés ($u \rightarrow \pi/2$), plus la profondeur de champ sera faible.

Annexe 3. Equations de Maxwell

Cette annexe présente un calcul formel fondé sur les équations de Maxwell de la constante de propagation des plasmons de surface ainsi qu'une démonstration de la nécessité d'un faisceau polarisé TM incident sur l'interface entre un milieu diélectrique et un milieu métallique pour que le plasmon de surface puisse se propager.

Equations de Maxwell dans un milieu non magnétique ($\mu_r = 1$) :

$$\begin{cases} \vec{\nabla} \cdot \vec{E} = 0 & \vec{\nabla} \cdot \vec{H} = 0 \\ \vec{\nabla} \wedge \vec{E} = -\mu_0 \frac{\partial \vec{H}}{\partial t} & \vec{\nabla} \wedge \vec{H} = \varepsilon_0 \varepsilon_r \frac{\partial \vec{E}}{\partial t} \end{cases} \quad (\text{III-1})$$

En combinant ces équations, nous pouvons en déduire l'équation de propagation du champ magnétique dans un matériau non magnétique :

$$\vec{\nabla}^2 \cdot \vec{H} - \frac{\varepsilon_r}{c^2} \frac{\partial^2 \vec{H}}{\partial t^2} = 0 \quad (\text{III-2})$$

avec $c = (\varepsilon_0 \mu_0)^{-1/2}$.

Dans le cas d'ondes planes, les champs peuvent s'écrire sous la forme suivante :

$$\begin{cases} \vec{H} \\ \vec{E} \end{cases} = \frac{\vec{H}_0}{E_0} \exp i(k_x x + k_z z - \omega t) \quad (\text{III-3})$$

Dans ces conditions, les équations de Maxwell (III-1) deviennent :

$$\begin{cases} k_x E_x + k_z E_z = 0 & k_x H_x + k_z H_z = 0 \\ -k_z E_y = \mu_0 \omega H_x & k_z H_y = \varepsilon_0 \varepsilon_r \omega E_x \\ k_z E_x - k_x E_z = \mu_0 \omega H_y & k_x H_z - k_z H_x = \varepsilon_0 \varepsilon_r \omega E_y \\ k_x E_y = \mu_0 \omega H_z & k_x H_y = -\varepsilon_0 \varepsilon_r \omega E_z \end{cases} \quad (\text{III-4})$$

De même, l'équation de propagation (III-2) devient :

$$k_x^2 + k_z^2 - \frac{\varepsilon_r \omega^2}{c^2} = 0 \quad (\text{III-5})$$

Nous allons maintenant étudier les conditions de propagation d'une onde évanescente des deux cotés d'une interface entre un milieu 1 de permittivité ε_1 et un milieu 2 de permittivité ε_2 . Cette interface est représentée sur la figure suivante :

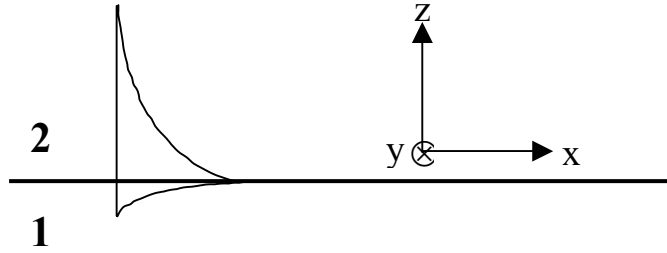


Figure 134 : Onde de surface à l'interface entre deux milieux.

Comme indiqué sur la Figure 134, l'onde se propage selon l'axe des x donc k_x est un réel positif et est évanescente selon l'axe des z donc k_z est un imaginaire pur ($k_z = i \cdot k_z'$). De plus, dans le milieu 1, z est négatif donc k_z' est négatif alors que, dans le milieu 2, z est positif donc k_z' est positif.

Sur l'interface ($z = 0$), d'après les équations de Maxwell, nous avons une continuité des composantes tangentielles des champs, d'où les relations suivantes :

$$\begin{cases} E_{x,0}^1 \exp i(k_x^1 x - \omega t) = E_{x,0}^2 \exp i(k_x^2 x - \omega t) \\ E_{y,0}^1 \exp i(k_x^1 x - \omega t) = E_{y,0}^2 \exp i(k_x^2 x - \omega t) \\ H_{x,0}^1 \exp i(k_x^1 x - \omega t) = H_{x,0}^2 \exp i(k_x^2 x - \omega t) \\ H_{y,0}^1 \exp i(k_x^1 x - \omega t) = H_{y,0}^2 \exp i(k_x^2 x - \omega t) \end{cases}$$

Ces conditions à l'interface nous donnent les relations suivantes :

$$\begin{cases} E_{x,0}^1 = E_{x,0}^2 = E_{x,0} & E_{y,0}^1 = E_{y,0}^2 = E_{y,0} \\ H_{x,0}^1 = H_{x,0}^2 = H_{x,0} & H_{y,0}^1 = H_{y,0}^2 = H_{y,0} \\ k_x^1 = k_x^2 = k_x \end{cases} \quad (\text{III-6})$$

En combinant l'équation (III-4) avec l'équation (III-6), nous obtenons :

$$\left\{ \begin{array}{ll} k_z^1 E_{z,0}^1 = k_z^2 E_{z,0}^2 = -k_x E_{x,0} & k_z^1 H_{z,0}^1 = k_z^2 H_{z,0}^2 = -k_x H_{x,0} \\ k_z^1 E_{y,0} = k_z^2 E_{y,0} = -\mu_0 \omega H_{x,0} & (k_z^1 / \varepsilon_1) H_{y,0} = (k_z^2 / \varepsilon_2) H_{y,0} = \varepsilon_0 \omega E_{x,0} \\ k_z^1 E_{x,0} - k_x E_{z,0}^1 = k_z^2 E_{x,0} - k_x E_{z,0}^2 = \mu_0 \omega H_{y,0} & (k_x H_{z,0}^1 - k_z^1 H_{x,0}) / \varepsilon_1 = (k_x H_{z,0}^2 - k_z^2 H_{x,0}) / \varepsilon_2 = \varepsilon_0 \omega E_{y,0} \\ H_{z,0}^1 = H_{z,0}^2 = (k_x / \mu_0 \omega) E_{y,0} & \varepsilon_1 E_{z,0}^1 = \varepsilon_2 E_{z,0}^2 = -(k_x / \varepsilon_0 \omega) H_{y,0} \end{array} \right. \quad (\text{III-7})$$

Supposons dans un premier temps que $E_{y,0}$ soit non nul. Nous déduisons les relations suivantes des 2 premières lignes de (III-7) :

$$\left\{ \begin{array}{l} k_z = k_z^1 = k_z^2 = -\frac{\mu_0 \omega H_{x,0}}{E_{y,0}} \\ E_{z,0} = E_{z,0}^1 = E_{z,0}^2 = -\frac{k_x}{k_z} E_{x,0} \\ H_{z,0} = H_{z,0}^1 = H_{z,0}^2 = -\frac{k_x}{k_z} H_{x,0} \\ H_{y,0} = E_{x,0} = 0 \end{array} \right. \quad (\text{III-8})$$

L'autre relation contenant $E_{y,0}$ provenant de la 3^{ème} ligne de (III-7) devient :

$$(k_x H_{z,0} - k_z H_{x,0}) / \varepsilon_1 = (k_x H_{z,0} - k_z H_{x,0}) / \varepsilon_2 = \varepsilon_0 \omega E_{y,0} \quad (\text{III-9})$$

Or, sachant que $\varepsilon_1 \neq \varepsilon_2$ et que $E_{y,0} \neq 0$, cette équation devient sans solution. La propagation d'une onde de surface nécessite donc que $E_{y,0}$ soit nul. Une onde de surface ne peut donc pas être excitée par une polarisation TE. Cela explique le premier point : **un plasmon de surface est excité par une polarisation TM.**

Dorénavant, nous supposerons que $E_{y,0} = 0$. Les relations (III-7) deviennent :

$$\left\{ \begin{array}{ll} k_z^1 E_{z,0}^1 = k_z^2 E_{z,0}^2 = -k_x E_{x,0} & 0 = 0 = 0 \\ H_{x,0} = 0 & (k_z^1 / \varepsilon_1) H_{y,0} = (k_z^2 / \varepsilon_2) H_{y,0} = \varepsilon_0 \omega E_{x,0} \\ k_z^1 E_{x,0} - k_x E_{z,0}^1 = k_z^2 E_{x,0} - k_x E_{z,0}^2 = \mu_0 \omega H_{y,0} & 0 = 0 = 0 \\ H_{z,0}^1 = H_{z,0}^2 = 0 & \varepsilon_1 E_{z,0}^1 = \varepsilon_2 E_{z,0}^2 = -(k_x / \varepsilon_0 \omega) H_{y,0} \end{array} \right. \quad (\text{III-10})$$

Cela nous conduit à l'équation caractéristique d'une onde de surface entre deux milieux :

$$\frac{k_z^1}{k_z^2} = \frac{\varepsilon_1}{\varepsilon_2} \quad (\text{III-11})$$

Comme expliqué précédemment, sachant que $k_z = i \cdot k'_z$ et que k'^1_z et k'^2_z sont de signes opposés, cela implique que les permittivités des deux milieux doivent elles aussi être de signe opposé. Cela explique le deuxième point : **un plasmon de surface ne peut être excité qu'entre un milieu métallique et un milieu diélectrique.**

Nous allons maintenant calculer la composante longitudinale k_x du vecteur d'onde de l'onde de surface à partir de l'équation (III-5) et des conditions limites à l'interface (III-6).

$$\begin{cases} k_x^2 = \varepsilon_1 \left(\frac{\omega}{c} \right)^2 - (k_z^1)^2 \\ k_x^2 = \varepsilon_2 \left(\frac{\omega}{c} \right)^2 - (k_z^2)^2 \end{cases} \quad (\text{III-12})$$

En combinant cette équation avec la relation (III-11), nous obtenons la valeur de k_{SPR} .

$$k_{SPR}^2 = \left(\frac{\varepsilon_m \cdot \varepsilon_d}{\varepsilon_m + \varepsilon_d} \right) \cdot \left(\frac{\omega}{c} \right)^2 \quad (\text{III-13})$$

avec $\varepsilon_m = \varepsilon_1$ la permittivité du milieu métallique et $\varepsilon_d = \varepsilon_2$ la permittivité du diélectrique.

Pour les métaux, la permittivité est complexe et peut s'écrire sous la forme $\varepsilon_m = \varepsilon_{mr} + \varepsilon_{mi}$. Dans le cas où $|\varepsilon_{mr}| \gg \varepsilon_{mi}$, nous pouvons approximer k_{SPR} de la manière suivante :

$$k_{SPR} = \sqrt{\frac{\varepsilon_{mr} \cdot \varepsilon_d}{\varepsilon_{mr} + \varepsilon_d}} \cdot \frac{\omega}{c} \quad (\text{III-14})$$

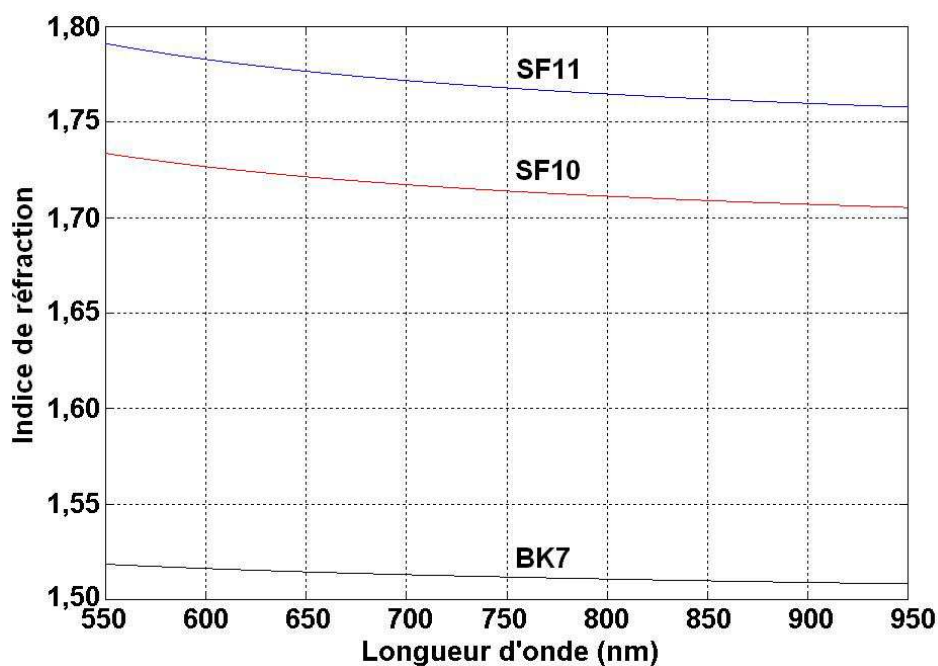
Annexe 4. Table des indices de réfraction

- Equations de Sellmeier pour les verres

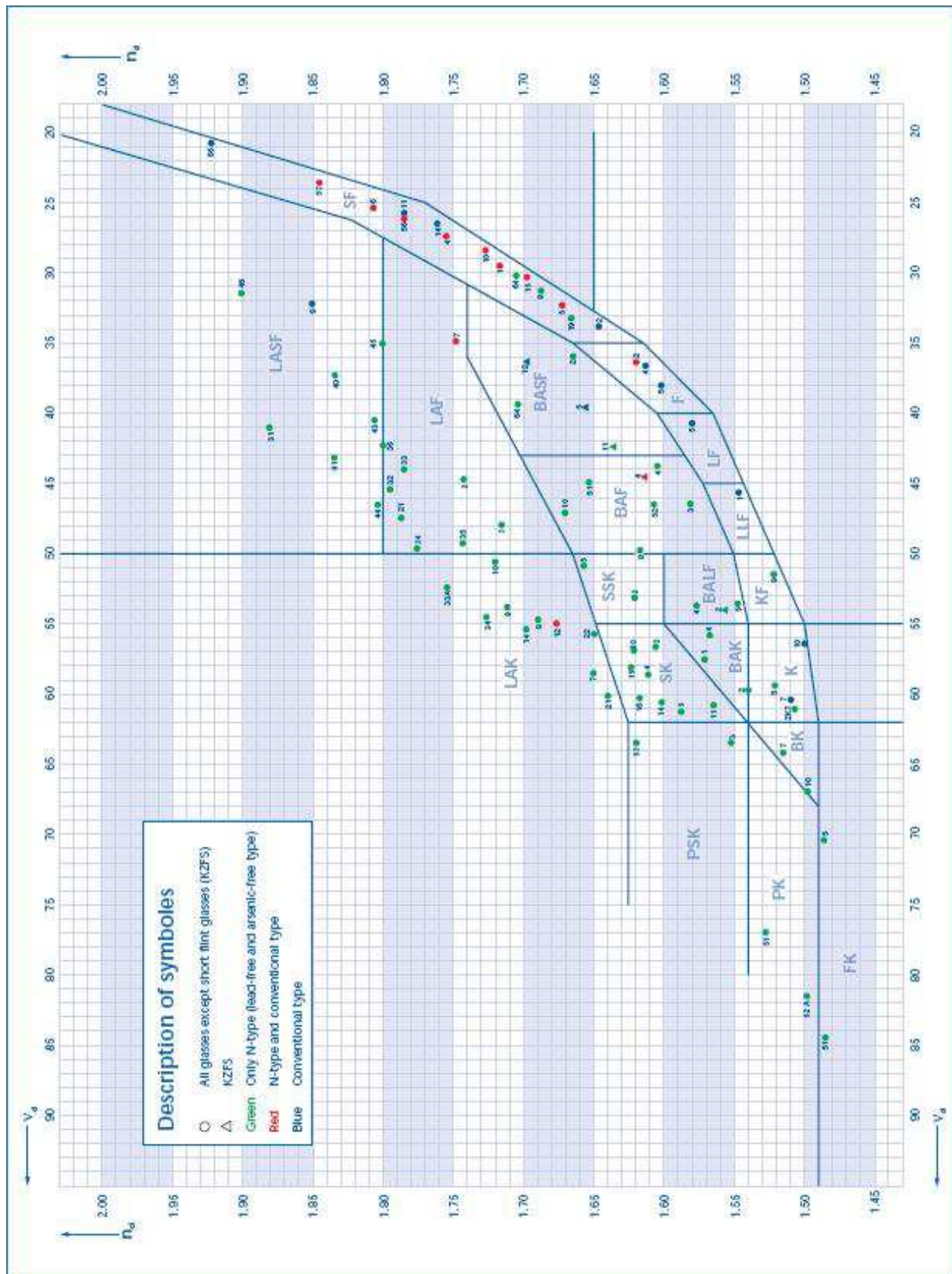
Dans l'équation suivante, n représente l'indice de réfraction du verre, λ la longueur d'onde en μm et les A_i et B_i sont les coefficients de Sellmeier. Cette formule permet de calculer les indices de réfraction pour chaque longueur d'onde comprise entre 365 nm et 2325 nm avec une précision d'environ $\pm 5 \cdot 10^{-6}$.

$$n^2 = 1 + \frac{A_1 \cdot \lambda^2}{\lambda^2 - B_1} + \frac{A_2 \cdot \lambda^2}{\lambda^2 - B_2} + \frac{A_3 \cdot \lambda^2}{\lambda^2 - B_3}$$

Verre	A_1	A_2	A_3	B_1	B_2	B_3
BK7	1,03961212	0,231792344	1,01046945	0,0060007	0,0200179	103,560653
SF10	1,61625977	0,25922933	1,07762317	0,0127535	0,05819840	116,607680
SF11	1,73848403	0,31116897	1,17490871	0,0136069	0,06159605	121,922711

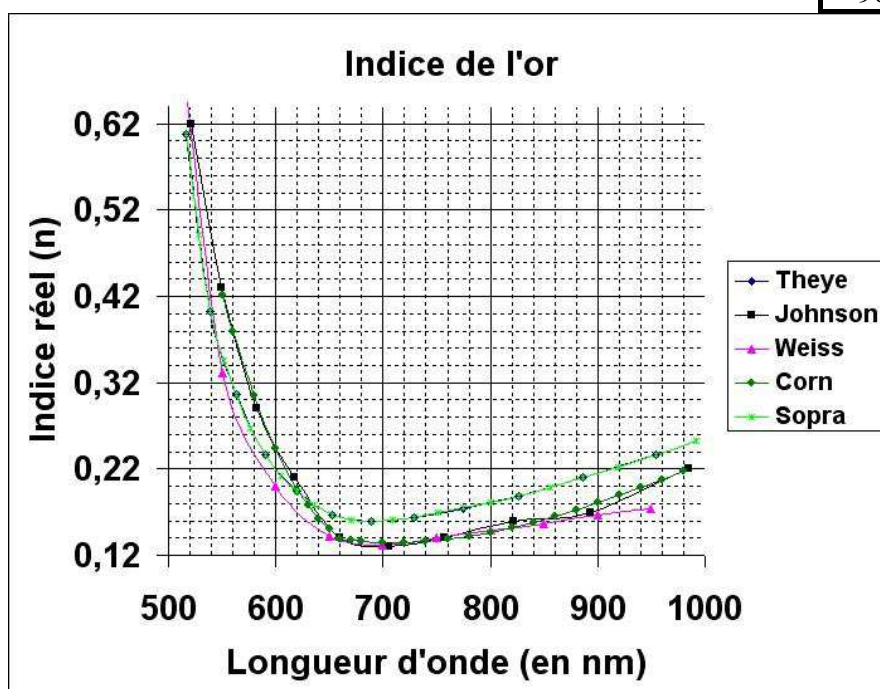


- Diagramme d'Abbe [174]



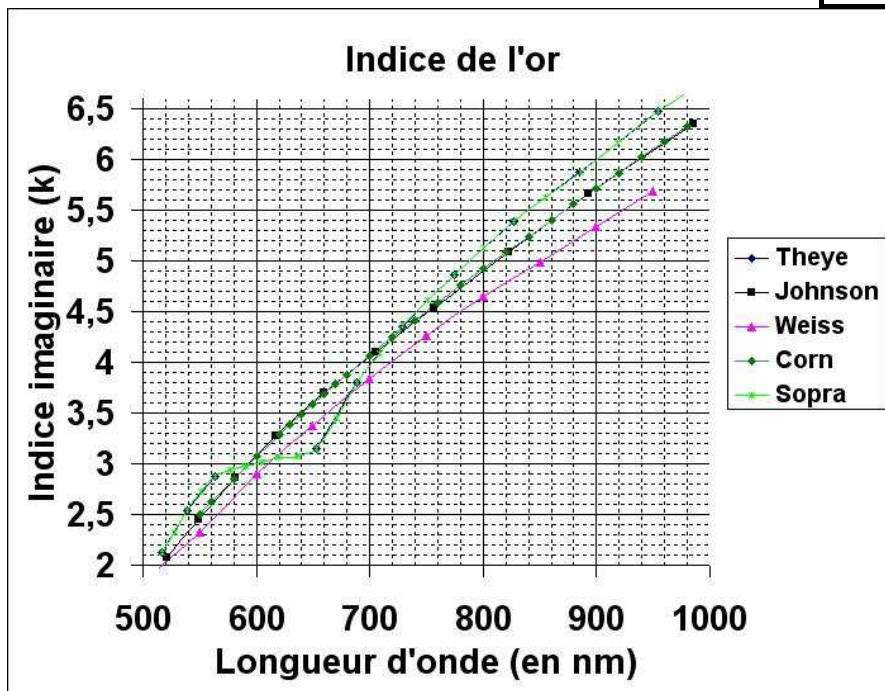
- Partie réelle de l'indice de l'or ($n_{or} = n + i \cdot k$)

λ (nm)	n [39]	λ (nm)	n [175]	λ (nm)	n [176]	λ (nm)	n [177]	λ (nm)	n [178]
516,6	0,608	516,621	0,608	521	0,62	500	0,840	550	0,421
539,1	0,402	527,613	0,492	549	0,43	550	0,331	560	0,379
563,6	0,306	539,083	0,402	582	0,29	600	0,200	580	0,305
590,4	0,236	551,062	0,346	617	0,21	650	0,142	600	0,244
619,9	0,194	576,693	0,268	660	0,14	700	0,131	620	0,196
652,6	0,166	590,424	0,236	705	0,13	750	0,140	630	0,178
688,8	0,160	604,824	0,212	757	0,14	800	0,149	640	0,162
729,3	0,164	619,945	0,194	822	0,16	850	0,157	650	0,150
774,9	0,174	635,841	0,178	893	0,17	900	0,166	660	0,139
826,6	0,188	652,574	0,166	985	0,22	950	0,174	670	0,137
885,6	0,210	670,211	0,161					680	0,136
953,7	0,236	688,828	0,160					700	0,135
		708,509	0,161					720	0,135
		729,347	0,164					740	0,136
		751,448	0,170					760	0,139
		774,931	0,176					780	0,142
		799,929	0,181					800	0,147
		826,593	0,188					820	0,152
		855,097	0,198					840	0,158
		885,636	0,210					860	0,165
		918,437	0,222					880	0,173
		953,762	0,236					900	0,181
		991,912	0,253					920	0,189
								940	0,198
								960	0,208
								980	0,218



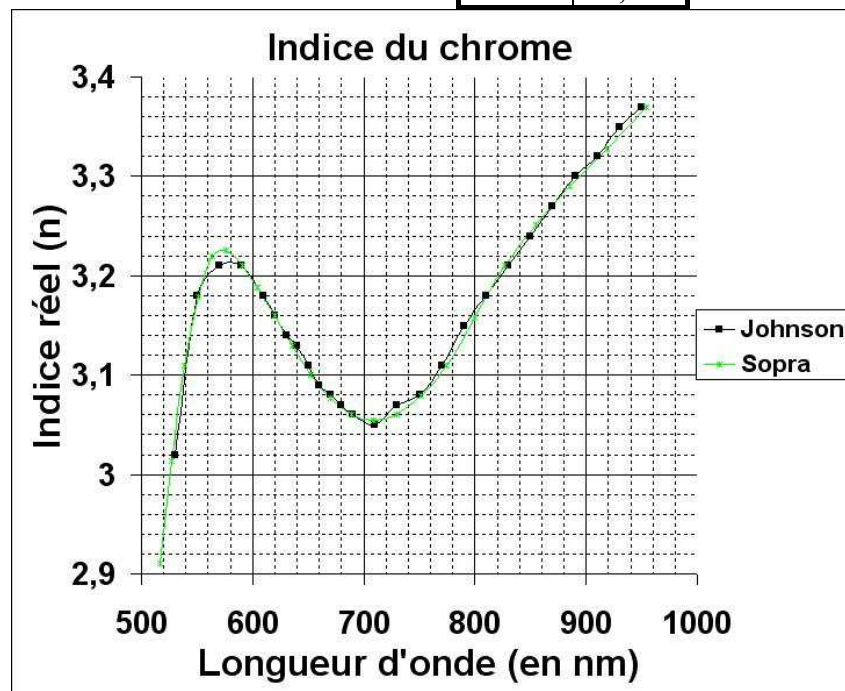
- Partie imaginaire de l'indice de l'or ($n_{or} = n + i \cdot k$)

λ (nm)	k [39]	λ (nm)	k [175]	λ (nm)	k [176]	λ (nm)	k [177]	λ (nm)	k [178]
516,6	2,12	516,621	2,12	521	2,081	500	1,84	550	2,5059
539,1	2,54	527,613	2,3262	549	2,455	550	2,324	560	2,625
563,6	2,88	539,083	2,54	582	2,863	600	2,897	580	2,8555
652,6	3,15	551,062	2,7306	617	3,272	650	3,374	600	3,0763
688,8	3,8	576,693	2,88	660	3,697	700	3,842	620	3,2883
729,3	4,35	590,424	2,9406	705	4,103	750	4,266	630	3,3912
774,9	4,86	604,824	2,97	757	4,542	800	4,654	640	3,4923
826,6	5,39	619,945	3,015	822	5,083	850	4,993	650	3,5916
885,6	5,88	635,841	3,06	893	5,663	900	5,335	660	3,6892
953,7	6,47	652,574	3,07	985	6,35	950	5,691	670	3,7852
		670,211	3,15					680	3,8796
		688,828	3,4458					700	4,0643
		708,509	3,8					720	4,2438
		729,347	4,0877					740	4,4187
		751,448	4,357					760	4,5896
		774,931	4,6102					780	4,7571
		799,929	4,86					800	4,9215
		826,593	5,1258					820	5,0833
		855,097	5,39					840	5,243
		885,636	5,6312					860	5,4008
		918,437	5,88					880	5,5572
		953,762	6,1681					900	5,7123
		991,912	6,47					920	5,8665
								940	6,0201
								960	6,1731
								980	6,3259



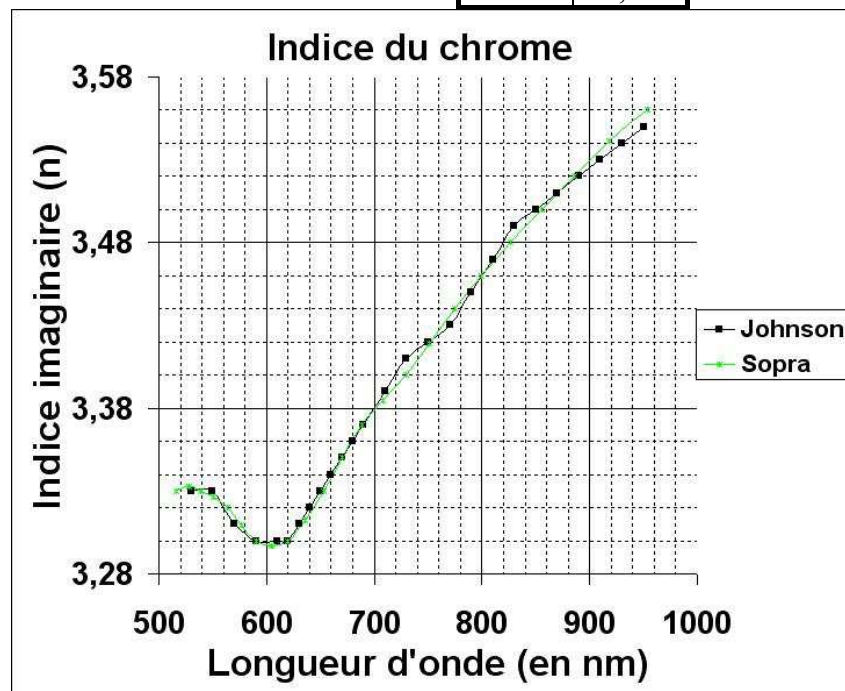
- Partie réelle de l'indice du chrome ($n_{Cr} = n + i \cdot k$)

λ (nm)	n [175]	λ (nm)	n [179]
516,6211	2,91	530	3,02
527,613	3,013125	550	3,18
539,0829	3,11	570	3,21
551,0625	3,178125	590	3,21
563,5866	3,22	610	3,18
576,6933	3,225	620	3,16
590,4241	3,21	630	3,14
604,8247	3,188125	640	3,13
619,9453	3,16	650	3,11
635,8413	3,129375	660	3,09
652,574	3,1	670	3,08
670,2111	3,07625	680	3,07
688,8281	3,06	690	3,06
708,5089	3,054375	710	3,05
729,3474	3,06	730	3,07
751,4488	3,07875	750	3,08
774,9316	3,11	770	3,11
799,9294	3,158125	790	3,15
826,5937	3,21	810	3,18
855,097	3,25125	830	3,21
885,6361	3,29	850	3,24
918,4375	3,326875	870	3,27
953,762	3,37	890	3,3
		910	3,32
		930	3,35
		950	3,37



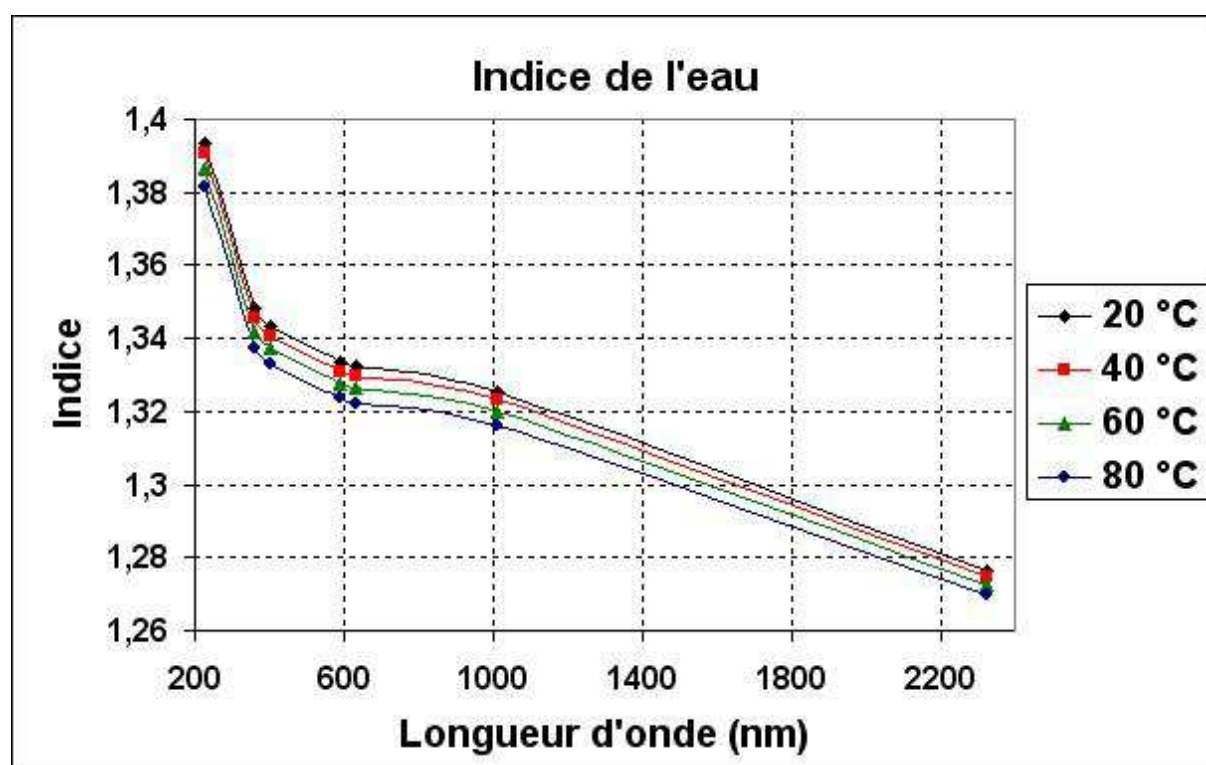
- Partie imaginaire de l'indice du chrome ($n_{Cr} = n + i \cdot k$)

λ (nm)	n [175]	λ (nm)	n [179]
516,6211	3,33	530	3,33
527,613	3,3325	550	3,33
539,0829	3,33	570	3,31
551,0625	3,32625	590	3,3
563,5866	3,32	610	3,3
576,6933	3,30938	620	3,3
590,4241	3,3	630	3,31
604,8247	3,29688	640	3,32
619,9453	3,3	650	3,33
635,8413	3,3125	660	3,34
652,574	3,33	670	3,35
670,2111	3,35	680	3,36
688,8281	3,37	690	3,37
708,5089	3,385	710	3,39
729,3474	3,4	730	3,41
751,4488	3,41938	750	3,42
774,9316	3,44	770	3,43
799,9294	3,46	790	3,45
826,5937	3,48	810	3,47
855,097	3,5	830	3,49
885,6361	3,52	850	3,5
918,4375	3,54125	870	3,51
953,762	3,56	890	3,52
		910	3,53
		930	3,54
		950	3,55



- Indice de l'eau [40]

T(°C) \ λ(nm)	226,5	361,05	404,41	589	632,8	1013,98	2325,42
0	1,39468	1,34912	1,34431	1,33447	1,33321	1,32626	1,27663
10	1,39439	1,34885	1,34404	1,33422	1,33296	1,32604	1,27663
20	1,39353	1,34809	1,34329	1,33350	1,33224	1,32537	1,27627
30	1,39224	1,34696	1,34218	1,33243	1,33118	1,32437	1,27563
40	1,39062	1,34554	1,34078	1,33108	1,32985	1,32309	1,27476
50	1,38869	1,34387	1,33914	1,32950	1,32827	1,32158	1,27371
60	1,38652	1,34197	1,33728	1,32770	1,32648	1,31986	1,27248
70	1,38410	1,33988	1,33522	1,32572	1,32451	1,31796	1,27110
80	1,38148	1,33760	1,33297	1,32355	1,32236	1,31589	1,26958
90	1,37865	1,33515	1,33056	1,32123	1,32004	1,31366	1,26792
100	1,37564	1,33253	1,32798	1,31874	1,31757	1,31128	1,26612



- Indice des milieux liquides [69]

- En première approximation, pour l'eau :

$$\frac{\partial n}{\partial T}(\text{H}_2\text{O}) = -1,1 \cdot 10^{-4} \text{ deg}^{-1} \quad (\text{IV-1})$$

- Pour la plupart des liquides organiques :

$$-6,0 \cdot 10^{-4} \leq \frac{\partial n}{\partial T} \leq -3,0 \cdot 10^{-4} \text{ deg}^{-1} \quad (\text{IV-2})$$

- Pour la plupart des liquides, une variation de pression de 1 atm ($1,013 \cdot 10^5$ Pa) induit une augmentation de l'indice de $3 \cdot 10^{-5}$:

$$\frac{\partial n}{\partial P} = 3,0 \cdot 10^{-5} \text{ atm}^{-1} \quad (\text{IV-3})$$

L'indice n d'une solution se définit en fonction de l'indice du solvant n_0 et de la concentration c (g/ml) du soluté.

$$\Delta n = n - n_0 = a_1 \cdot c + a_2 \cdot c^2 \quad (\text{IV-4})$$

L'expression « incrément spécifique d'indice de réfraction » ou, plus simplement, incrément d'indice, désigne la limite de $\Delta n/c$ lorsque c tend vers 0 pour une longueur d'onde λ_0 et une température T_0 données.

$$\nu = \frac{\partial n}{\partial c} = \lim_{c \rightarrow 0} \left(\frac{\Delta n}{c} \right)_{\lambda_0, T_0} \quad (\text{IV-5})$$

Nous en déduisons alors l'expression couramment utilisée dans le cadre de solutés « suffisamment » dilués :

$$n = n_0 + \nu \cdot c \quad (\text{IV-6})$$

Le tableau suivant donne quelques valeurs de ν pour certaines espèces biologiques [69] :

Soluté	Solvant	v (ml/g)			T(°C)	Référence
		$\lambda = 436 \text{ nm}$	$v(\lambda)$	$\lambda = 546 \text{ nm}$		
B.S.A.	H ₂ O	0,195	/	/	/	Edelhoch (1960)
	H ₂ O	0,1954	0,1869 (578)	0,1883	/	Perlman & Longworth (1948)
	H ₂ O	0,193	0,183 (589)	0,188	25	McMeekin (1964)
	0,1 M NaCl; pH 5,2	0,1924	/	0,1854	25	Halwer (1951)
	Aq.; tampon phosphate; pH 7	0,189	/	0,185	20	Jaenicke (1968)
Caséine	H ₂ O	/	0,181 (?)	/	/	Payens & Heremans (1969)
Dextran	H ₂ O	0,154	/	0,151	/	Senti (1955)
	H ₂ O	0,1518	0,1476 (578)	0,1481	25	Zebec (1958)
H.S.A.*	H ₂ O	0,1938	0,1854 (578)	0,1863		Perlman & Longworth (1948)
Ovalbumine	H ₂ O	0,185	0,178 (589)	0,181	25	McMeekin (1964)
Poly- α -AA [†]	diméthylformamide	0,116	/	/	25-30	Eliezer & Silberberg (1967)
PEG [‡] (600)	H ₂ O	/	0,128 (589)	/	25	Heller & Pugh (1960)
PEG (4000)	H ₂ O	/	0,134 (589)	/	25	Heller & Pugh (1960)
PEG (9000)	H ₂ O	/	0,134 (589)	/	25	Heller & Pugh (1960)
PEG (31000)	H ₂ O	/	/	0,135	25	Elias & Lys (1966)
ADN	H ₂ O	0,188	/	/	/	Reichmann (1954)
	H ₂ O	0,191	/	/	/	Alexander & Stacey (1954)
	0,2 M NaCl	/	/	0,185	/	Butler (1959)
	0,5 M NaCl; tampon phosphate; pH 7,1	0,186	/	/	/	Schurz & Gruber (1969)
	1 M NaCl	/	/	0,174	20	Bernedi (1961)

Pour être plus précis, il faut aussi tenir compte des variations de v avec la longueur d'onde. Par exemple, pour le sel et le chlorure de potassium, cela donne à $T = 25 \text{ °C}$ [180] :

$$\frac{\partial v}{\partial \lambda}(\text{NaCl}) = -4.10^{-5} \text{ ml} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{nm}^{-1} \quad (\text{IV-7})$$

$$\frac{\partial v}{\partial \lambda}(\text{KCl}) = -3.10^{-5} \text{ ml} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{nm}^{-1} \quad (\text{IV-8})$$

* H.S.A. : Human Serum Albumin (albumine humaine).

† A.A. : Acide Aminé.

‡ P.E.G. : Poly Ethylène Glycol.

Annexe 5. Etude du bruit de la caméra CCD

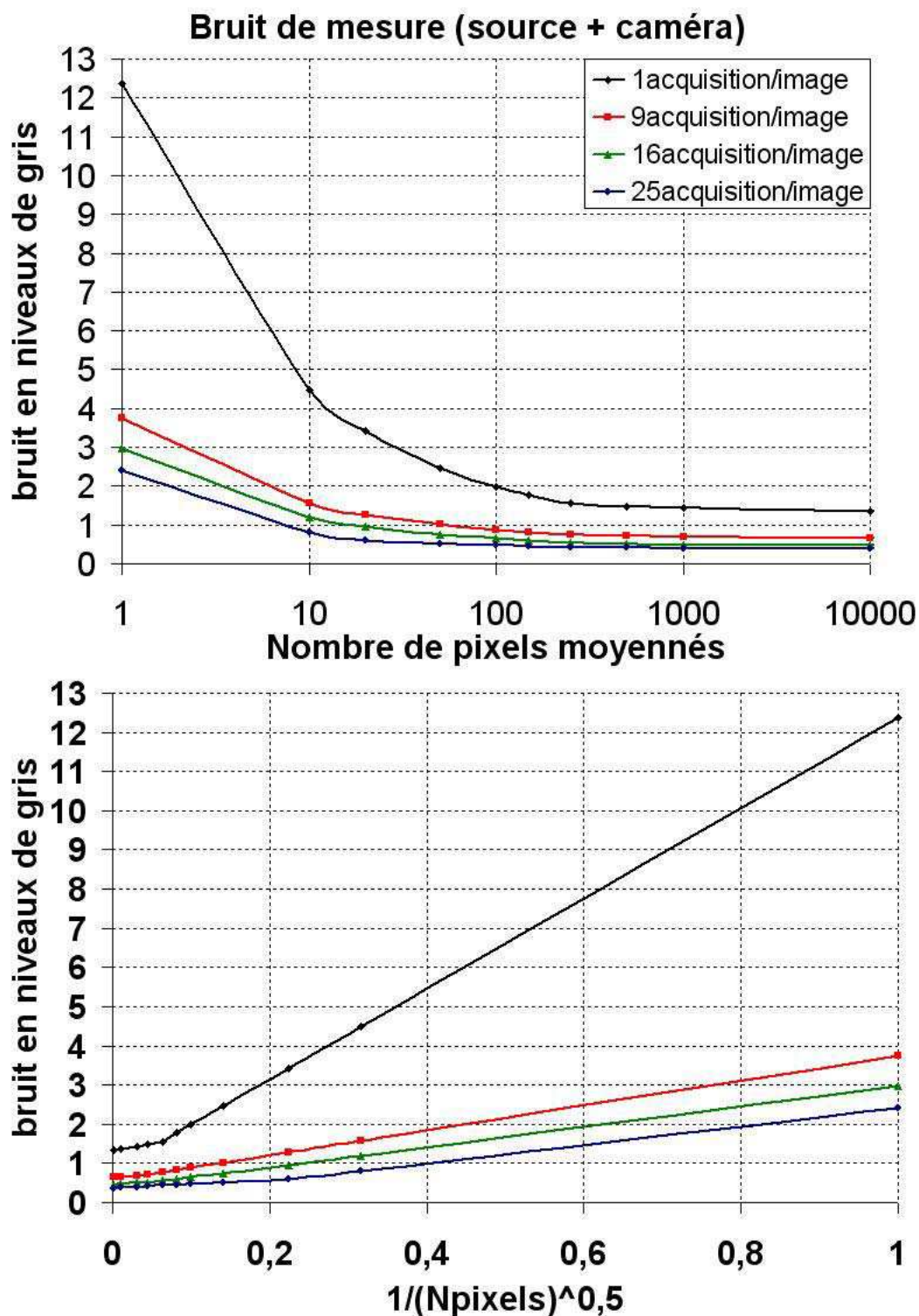


Figure 135 : Bruit de la caméra CCD 12bits (Pixelfly) éclairée directement par la source lumineuse du montage SPR en fonction du nombre de pixels (moyennage spatial) et du nombre d'acquisitions (moyennage temporel) utilisé pour un calcul. Les conditions de mesure reproduisent le bruit de photon obtenu pendant une cinétique d'interaction.

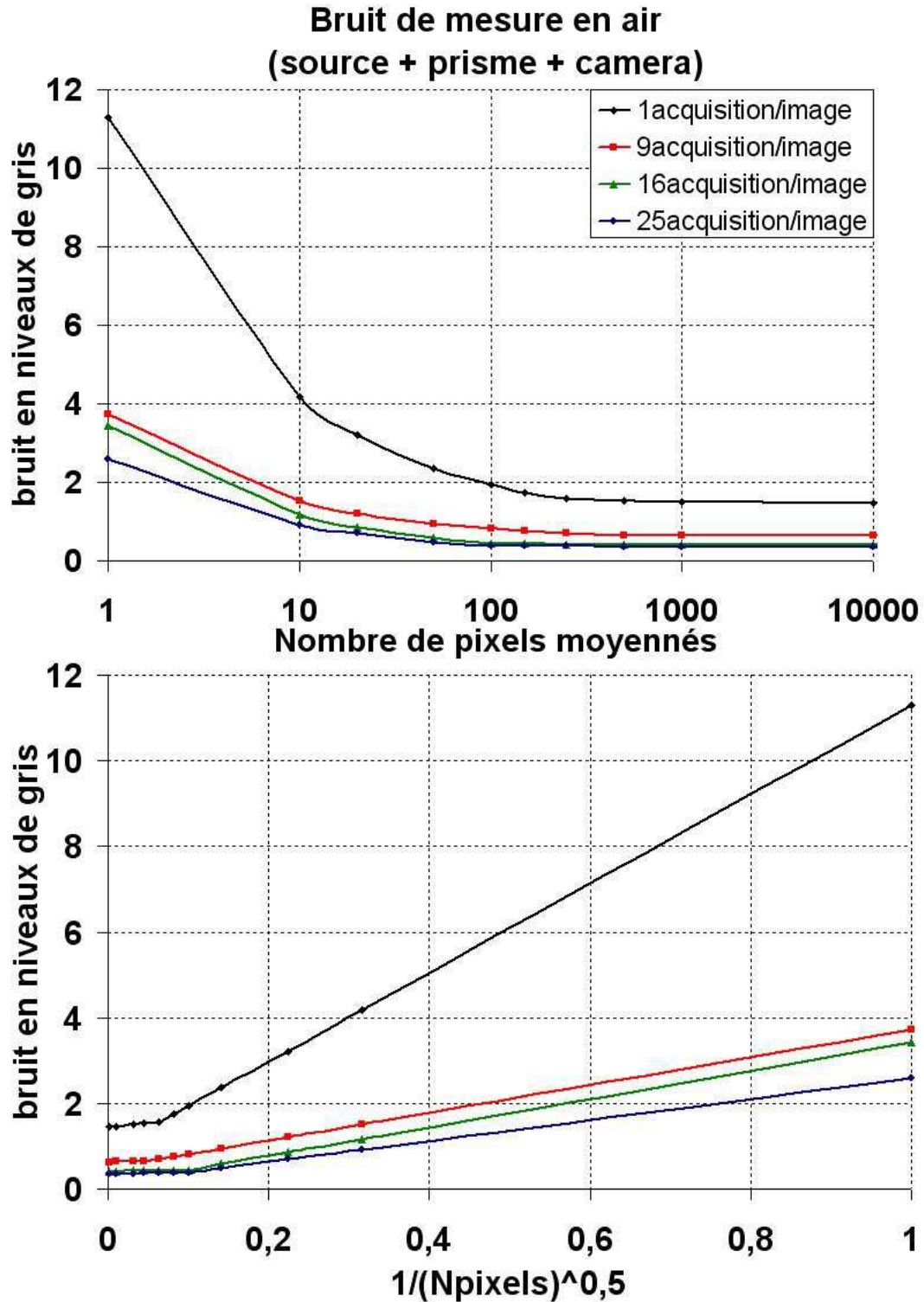


Figure 136 : Bruit de la caméra CCD 12bits (Pixelfly) éclairée par la source lumineuse à travers le montage SPR (matrice de capteurs en air) en fonction du nombre de pixels (moyennage spatial) et du nombre d'acquisitions (moyennage temporel) utilisé pour un calcul. Les conditions de mesure reproduisent le bruit de photon obtenu pendant une cinétique d'interaction.

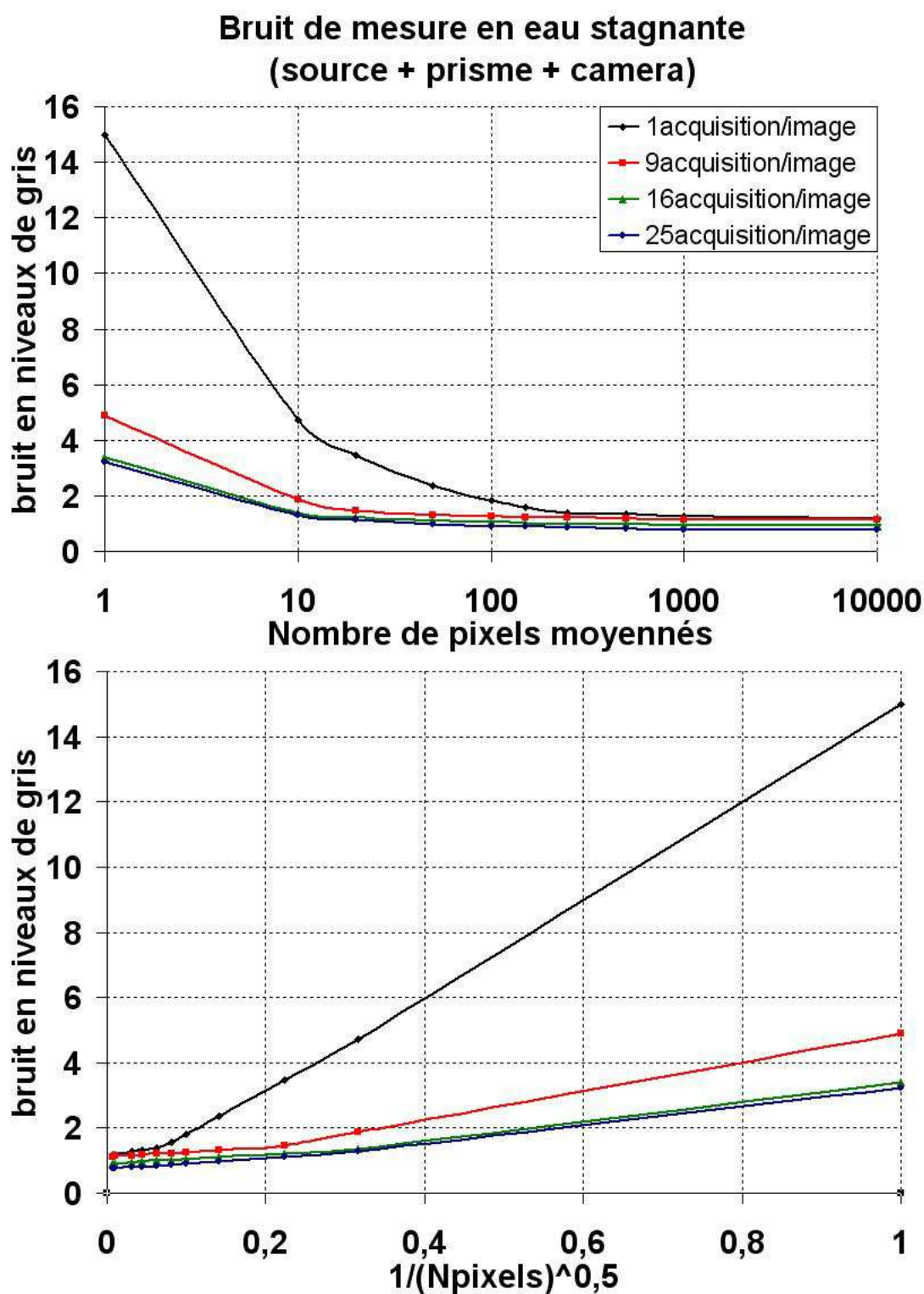


Figure 137 : Bruit de la caméra CCD 12bits (Pixelfly) éclairée par la source lumineuse à travers le montage SPR (matrice de capteurs en eau) en fonction du nombre de pixels (moyennage spatial) et du nombre d'acquisitions (moyennage temporel) utilisé pour un calcul. Les conditions de mesure reproduisent le bruit de photon obtenu pendant une cinétique d'interaction.

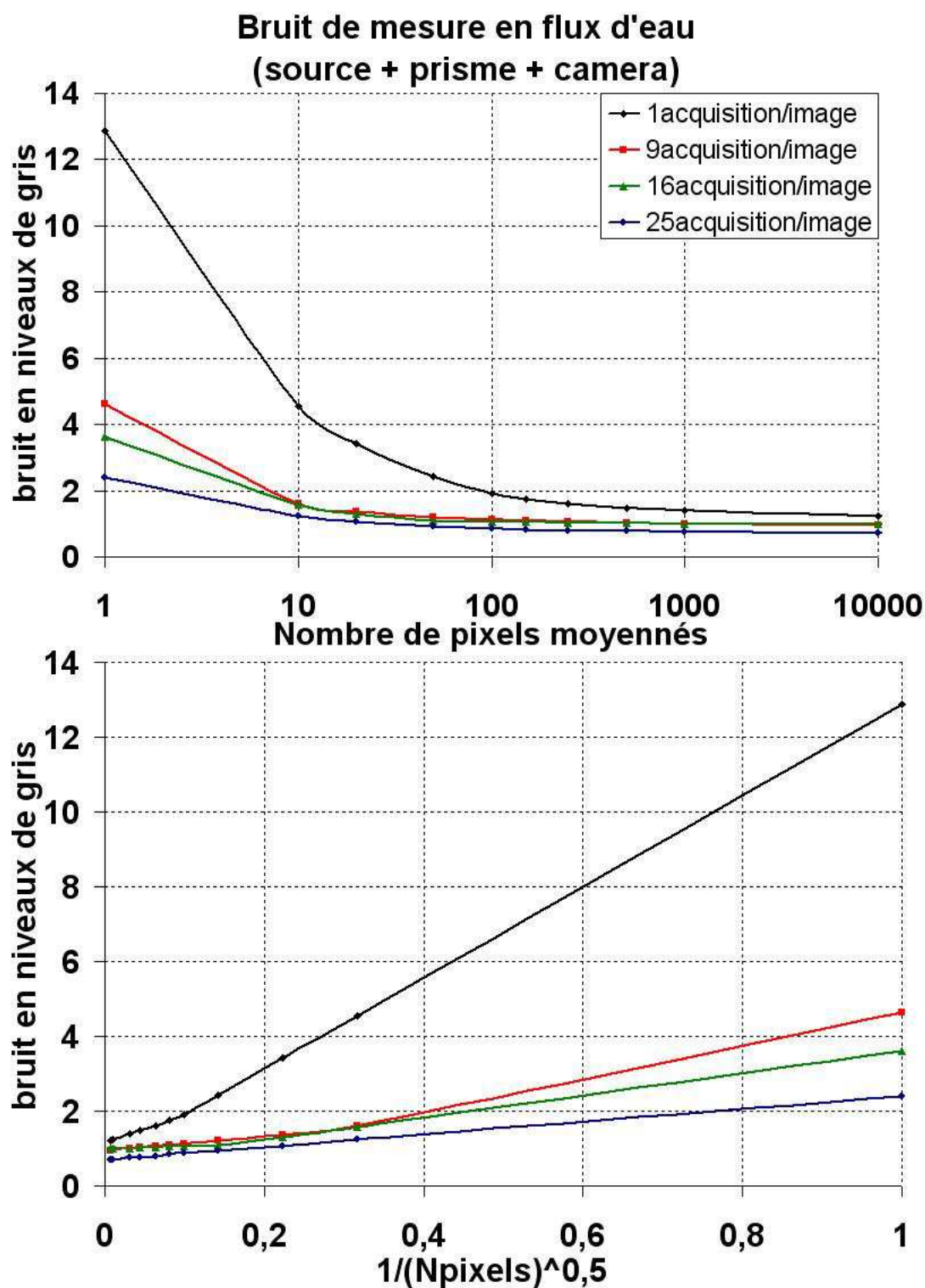


Figure 138 : Bruit de la caméra CCD 12bits (Pixelfly) éclairée par la source lumineuse à travers le montage SPR (matrice de capteurs sous circulation d'eau) en fonction du nombre de pixels (moyennage spatial) et du nombre d'acquisitions (moyennage temporel) utilisé pour un calcul. Les conditions de mesure reproduisent le bruit de photon obtenu pendant une cinétique d'interaction.

Les 4 figures précédentes illustrent les mesures de bruit effectuées pour caractériser la caméra CCD 12 bits Pixelfly [114] illuminée par la diode LED à $\lambda = 650 \text{ nm}$ (partie II.2.1) du montage SPR. Sur chaque figure, le bruit représenté correspond à l'écart-type sur une centaine de mesures effectuées successivement. Chaque figure se décompose en deux graphes identiques représentés différemment : celui du haut montre la diminution du bruit grâce au moyennage spatial et au moyennage temporel tandis que celui du bas montre que le bruit est inversement proportionnel à la racine carrée du nombre de pixels utilisés pour faire une mesure. Puisque, comme indiqué dans la partie II.2.5, lors d'une étude de cinétique d'interaction, la réflectivité, avec notre configuration, varie autour de $R = 25 \%$ alors que nous avons réglé notre caméra pour être proche de la saturation en polarisation TE ($R = 90 \%$ $\Leftrightarrow$ 4 096 Niveaux de gris), le signal mesuré par la caméra varie donc autour de 1 100 niveaux de gris. Notre caméra est alors limitée par le bruit de photon. Il est donc important pour caractériser le bruit du système d'acquisition de se placer au même point de fonctionnement que dans les conditions réelles d'utilisation, ce que nous avons fait pour élaborer les 4 figures précédentes.

- Figure 135 et Figure 136

Pour ces deux figures, la mesure du bruit a été faite en dehors des conditions de résonance des plasmons de surface, soit à cause de l'absence de prisme (Figure 135), soit parce que les capteurs sont restés en air de remplir la cellule d'interactions d'eau (Figure 136). L'intensité de la source lumineuse a donc été modifiée pour que le signal incident donne le même bruit de photon.

Dans les deux configurations, (source + caméra) et (source + prisme + caméra), le bruit mesuré est le même et est inversement proportionnel à la racine carrée du nombre de mesures utilisées pour faire un calcul. Cette proportionnalité se vérifie quand $0,1 \leq 1/\sqrt{n_{\text{pixel}}} \leq 1$, c'est-à-dire pour un nombre de pixels inférieur à 100. Au delà, le bruit ne suit plus cette loi et devient quasiment constant. Une source possible de ce bruit résiduel peut être l'inhomogénéité spatiale de la source. Ce bruit résiduel, quand le nombre de pixels moyennés tend vers l'infini, va constituer la limite de détection de notre système. Si nous considérons que le bruit ne diminue plus au delà d'un moyennage spatial sur 100 pixels et d'un moyennage temporel sur 25 images, la résolution de notre système vaut :

$$\Delta Niv.gris_{min}(air) = \pm 0,45 \Rightarrow \Delta R_{min}(air) = \pm 0,01\% \quad (V-1)$$

- Figure 137 et Figure 138

Pour ces deux figures, la mesure du bruit a été faite à l'angle de pente maximale de la courbe de résonance des plasmons de surface entre une couche d'or non fonctionnalisée et l'eau, la cellule d'interactions étant simplement remplie d'eau (Figure 137), où l'eau circulant à débit constant (25 μ L/min) (Figure 138). Cette fois-ci, la source lumineuse n'a pas besoin d'être modifiée pour que le signal incident donne le même bruit de photon.

Dans les deux configurations, (eau statique) et (eau dynamique), le bruit mesuré est le même et est inversement proportionnel à la racine carrée du nombre de mesures utilisées pour faire un calcul. Ici aussi, cette proportionnalité se vérifie quand $0,1 \leq 1/\sqrt{n_{pixel}} \leq 1$, c'est-à-dire pour un nombre de pixels inférieur à 100. Au delà, le bruit ne suit plus cette loi et devient quasiment constant. Si nous considérons que le bruit ne diminue plus au delà d'un moyennage spatial sur 100 pixels et d'un moyennage temporel sur 25 images, la résolution de notre système vaut :

$$\Delta Niv.gris_{min}(eau) = \pm 0,9 \Rightarrow \Delta R_{min}(eau) = \pm 0,02\% \quad (V-2)$$

Le simple fait d'avoir introduit de l'eau au niveau du capteur, qu'elle soit immobile ou en circulation, a doublé le bruit de mesure de notre système. C'est donc cette valeur de la résolution du système de détection que nous prendrons en considération par la suite.

-
- ¹ **Validation of the use of field effect transistors for extracellular signal recording in pharmacological bioassays**, C.K. Yeung, S. Ingebrandt, M. Krause, A. Hoffenhäusser, W. Knoll, *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, **2001**, *45*, 207–214.
- ² **Electrochemical immunosensor for the detection of atrazine**, M.A. Lopez, F. Ortega, E. Dominguez, I. Katakis, *J. Mol. Recognit.*, **1998**, *11*, 178–181.
- ³ **An approach to conductometric immunosensor based on phthalocyanine thin film**, T.A. Sergeeva, N.V. Lavrik, A.E. Rachkov, Z.I. Kazantseva, A.V. El'skaya, *Biosens. Bioelectron.*, **1998**, *13*, 359–369.
- ⁴ **Regenerable biosensor platform: a total internal reflection fluorescence cell with electrochemical control**, A.N. Asanov, W.W. Wilson, P.B. Oldham, *Anal. Chem.*, **1998**, *70*, 1156–1163.
- ⁵ **Kinetics of prothrombin-mediated binding of lupus anticoagulant antibodies to phosphatidylserine-containing phospholipid membranes: an ellipsometric study**, G.M. Willems, M.P. Janssen, P. Comfurius, M. Galli, R.F.A. Zwaal, E.M. Bevers, *Biochemistry*, **2002**, *41*, 14357–14363.
- ⁶ **A multilayer grating-based evanescent wave sensing technique**, W.A. Challener, J.D. Edwards, R.W. McGowan, J. Skorjanec, Z. Yang, *Sens. Actuators B*, **2000**, *71*, 42–46.
- ⁷ **Specific bio-recognition reactions observed with an integrated Mach-Zehnder interferometer**, M. Weisser, G. Tovar, S. Mittler-Neher, W. Knoll, F. Brosinger, H. Freimuth, M. Lacher, W. Ehrfeld, *Biosens. Bioelectron.*, **1999**, *14*, 405–411.
- ⁸ **Surface Plasmon Resonance-Based Immunoassays**, W.M. Mullet, E.P.C. Lai, J.M. Yeung, *Methods*, **2000**, *22*, 77–91.
- ⁹ **The resonant mirror: a novel optical biosensor for direct sensing of biomolecular interactions. Part II: Applications**, P.E. Buckle, R.J. Davies, T. Kinning, D. Yeung, P.R. Edwards, D. Pollard-Knight, *Biosens. Bioelectron.*, **1993**, *8*, 355–363.
- ¹⁰ **Quartz crystal microbalances for quantitative biosensing and characterizing protein multilayers**, J. Rickert, A. Brecht, W. Göpel, *Biosens. Bioelectron.*, **1997**, *12*, 567–575.
- ¹¹ **Covalent bound sensing layers on surface acoustic wave (SAW) biosensors**, N. Barie, M. Rapp, *Biosens. Bioelectron.*, **2001**, *16*, 979–987.
- ¹² **Measuring protein-protein interactions**, J.H. Lakey, E.M. Ragget, *Curr. Opin. Struc. Biol.*, **1998**, *8*, 119–123.
- ¹³ **Immunosensors-principles and applications to clinical chemistry**, P.B. Lippa, L.J. Sokoll, D.W. Chan, *Clin. Chim. Acta*, **2001**, *314*, 1–26.
- ¹⁴ **Differential SPR immunosensing**, C.E.H. Berger, J. Greve, *Sens. Actuators B*, **2000**, *63*, 103–108.
- ¹⁵ **Principles of optics: Electromagnetic Theory of Propagation, Interference and Diffraction of Light**, M. Born, E. Wolf, *Pergamon press (London)* **1959**.
- ¹⁶ **Integrated optical difference interferometer as immunosensor**, C. Stamm, W. Lukosz, *Sens. Actuators B*, **1996**, *31*, 203–207.
- ¹⁷ **Integrated optical chemical and direct biochemical sensors**, W. Lukosz, *Sens. Actuators B*, **1995**, *29*, 37–50.
- ¹⁸ **A design for improving the sensitivity of a Mach-Zehnder interferometer to chemical and biolocal measurements**, Z.M. Qi, N. Matsuda, K. Itoh, M. Murabayashi, C.R. Lavers, *Sens. Actuators B*, **2002**, *81*, 254–258.

- ¹⁹ **A label-free affinity sensor with compensation of unspecific protein interaction by a highly sensitive integrated optical Mach-Zehnder interferometer on silicon**, F. Brosinger, H. Freimuth, M. Lacher, W. Ehrfeld, E. Gedig, A. Katerkamp, F. Spener, K. Cammann, *Sens. Actuators B*, **1997**, *44*, 350–355.
- ²⁰ **The resonant mirror: a novel optical biosensor for direct sensing of biomolecular interactions. Part I: Principle of operation and associated instrumentation**, R. Cush, J.M. Cronin, W.J. Stewart, C.H. Maule, J. Molloy, N.J. Goddard, *Biosens. Bioelectron.*, **1993**, *8*, 347–354.
- ²¹ **Approche théorique de la transduction optique**, P. Guédon, « Etude de systèmes optiques pour l'analyse directe, en temps réel et en parallèle, d'interactions biomoléculaires », *thèse de doctorat spécialité Optique*, Université Paris VI, **2000**, 7–61.
- ²² <http://www.affinity-sensors.co.uk/technol.htm>
- ²³ **Comparison of reflectometric interference spectroscopy with other instruments for label-free optical detection**, C. Hänel, G. Gauglitz, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2002**, *372*, 91–100.
- ²⁴ **Kinetic Measurements of DNA Hybridization on an Oligonucleotide-Immobilized 27-MHz Quartz Crystal Microbalance**, Y. Okahata, M. Kawase, K. Niikura, F. Ohtake, H. Furusawa, Y. Ebara, *Biosens. Bioelectron.*, **1998**, *70*, 1288–1296.
- ²⁵ **Détection de l'hybridation par microbalance à quartz**, N. Lassalle, « Etude et caractérisation par techniques in situ, de couches électroactives destinées à l'hybridation de l'ADN pour l'élaboration de capteurs et de biopuces », *Thèse de docteur de l'INPG*, Université de Grenoble, **2001**, 86–104.
- ²⁶ **Commercial quartz crystal microbalances – theory and application**, C.K. O'Sullivan, G.G. Guilbault, *Biosens. Bioelectron.*, **1999**, *14*, 663–670.
- ²⁷ **A self-assembled monolayer-based piezoelectric immunosensor for rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7**, X.L. Su, Y. Li, *Biosens. Bioelectron.*, **2004**, *19*, 563–574.
- ²⁸ **Rapid monitoring of recombinant protein products: a comparison of current technologies**, K.N. Baker, M.H. Rendall, A. Patel, P. Boyd, M. Hoare, R.B. Freedman, D.C. James, *Trends Biotech.*, **2002**, *20*, 149–156.
- ²⁹ **The origins of Beer's law**, H.G. Pfeiffer, H.A. Liebhafsky, *J. Chem. Educ.*, **1951**, *28*, 123.
- ³⁰ **Subwavelength patterns and high detection efficiency in fluorescence correlation spectroscopy using photonic structures**, P.F. Lenne, E. Etienne, H. Rignault, *Appl. Opt.*, **2002**, *80*, 4106–4108.
- ³¹ **Complement hybridization from solution to surface-attached probe-oligonucleotides observed by surface-plasmon-field-enhanced fluorescence spectroscopy**, T. Liebermann, W. Knoll, P. Sluka, R. Herrmann, *Colloids Surf. A*, **2000**, *169*, 337–350.
- ³² <http://www.affymetrix.com>
- ³³ **On a remarkable case of uneven distribution of light in a diffraction grating spectrum**, R.W. Wood, *Phil. Magm.*, **1902**, *4*, 396–402.
- ³⁴ **The theory of anomalous diffraction gratings and of quasi-stationary waves on metallic surfaces (Sommerfeld's waves)**, U. Fano, *J. Opt. Soc. Am.*, **1941**, *31*, 213–222.
- ³⁵ **Excitation of surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection**, A. Otto, *Z. Physik*, **1968**, *216*, 398–410.
- ³⁶ **Radiative decay of non-radiative surface plasmons excited by light**, E. Kretschmann, H. Raether, *Z. Naturforsch.*, **1968**, *23A*, 2135–2136.
- ³⁷ **Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing**, B. Liedberg, C. Nylander, I. Lundström, *Sens. Actuators*, **1983**, *4*, 299–304.

-
- ³⁸ <http://www.biacore.com/home.lasso>.
- ³⁹ **Investigation of the Optical Properties of Au by Means of Thin Semitransparent Films**, M.L. Theye, *Phys. Rev. B*, **1970**, 2, 3060–3078.
- ⁴⁰ **Refractive Index of Water and Steam as Function of Wavelength, Temperature and Density**, P. Schiebener, J. Straub, J.M.H. Levelt-Sengers, J.S. Gallagher, *J. Phys. Chem. Ref. Data*, **1990**, 19, 677–717.
- ⁴¹ **Surface plasmon resonance sensors based on diffraction gratings and prism couplers: Sensitivity comparison**, J. Homola, I. Koudela, S.S. Yee, *Sens. Actuators B*, **1999**, 54, 16–24.
- ⁴² **Real time sensing of specific molecular binding using surface plasmon spectroscopy**, P. Pfeifer, U. Aldinger, G. Schwotzer, S. Diekmann, P. Steinrücke, *Sens. Actuators B*, **1999**, 54, 166–175.
- ⁴³ **Multilayer system for a high-precision surface plasmon resonance sensor**, K. Matsubara, S. Kawata, S. Minami, *Opt. Lett.*, **1990**, 15, 75–77.
- ⁴⁴ **A commercial solution for surface plasmon sensing**, J. Melendez, R. Carr, D.U. Bartholomew, K. Kukanskis, J. Elkind, S. Yee, C. Furlong, R. Woodbury, *Sens. Actuators B*, **1996**, 35–36, 212–216.
- ⁴⁵ <http://www.ti.com/spreeta>
- ⁴⁶ **Integrated analytical sensors: the use of the TISPR-1 as a biosensor**, J.L. Elkind, D.I. Stimpson, A.A. Strong, D.U. Bartholomew, J.L. Melendez, *Sens. Actuators B*, **1999**, 54, 182–190.
- ⁴⁷ <http://www.windsor-ltd.co.uk/ibis.htm>
- ⁴⁸ **Quantitative interpretation of the response of surface plasmon resonance sensors to adsorbed films**, L.S. Jung, C.T. Campbell, T.M. Chinowsky, M.N. Mar, S.S. Yee, *Langmuir*, **1998**, 14, 5636–5648.
- ⁴⁹ **Spectral surface plasmon resonance biosensor for detection of staphylococcal enterotoxin B in milk**, J. Homola, J. Dostalek, S. Chen, A. Rasooly, S. Jiang, S.S. Yee, *Int. J. Food Microbiol.*, **2002**, 75, 61–69.
- ⁵⁰ **Characterization of surface plasmon resonance wavelength by changes of protein concentration on protein chips**, J.S. Yuk, S.J. Yi, H.G. Lee, H.J. Lee, Y.M. Kim, K.S. Ha, *Sens. Actuators B*, **2003**, 94, 161–164.
- ⁵¹ **Compact surface plasmon resonance-transducers with spectral readout for biosensing applications**, I. Stemmler, A. Brecht, G. Gauglitz, *Sens. Actuators B*, **1999**, 54, 98–105.
- ⁵² **Surface plasmon microscopy**, B. Rothenhausler, W. Knoll, *Nature*, **1988**, 332, 615–617.
- ⁵³ **Surface plasmon resonance imaging measurements of DNA hybridization adsorption and streptavidin/DNA multiplayer formation at chemically modified gold surfaces**, C.E. Jordan, A.G. Frutos, A.J. Thiel, R.M. Corn, *Anal. Chem.*, **1997**, 69, 4939–4947.
- ⁵⁴ **Measuring particle-substrate distance with surface plasmon resonance microscopy**, T. Zhang, H. Morgan, A.S.G. Curtis, M. Riehle, *J. Opt. A*, **2001**, 333–337.
- ⁵⁵ **A surface plasmon resonance array biosensor based on spectroscopic imaging**, M.J. O'Brien, V.H. Perez-Luna, S.R.J. Brueck, G.P. Lopez, *Biosens. Bioelectron.*, **2001**, 16, 97–108.
- ⁵⁶ **Imaging surface plasmon resonance system for screening affinity ligands**, P.R. Morrill, R.B. Millington, C.R. Lowe, *J. Chromatogr. B*, **2003**, 793, 229–251.
- ⁵⁷ **Multispot parallel on-line monitoring of interfacial binding reactions by surface plasmon microscopy**, M. Zizlsperger, W. Knoll, *Progr. Colloid Polym. Sci.*, **1998**, 109, 244–253.

-
- ⁵⁸ **Surface plasmon resonance imaging measurements of DNA and RNA hybridization adsorption onto DNA microarrays**, B.P. Nelson, T.E. Grimsrud, M.R. Liles, R.M. Goodman, R.M. Corn, *Anal. Chem.*, **2001**, *73*, 1–7.
- ⁵⁹ **Polypyrrole based DNA hybridization assays: study of label free detection processes versus fluorescence on microchips**, T. Livache, E. Maillart, N. Lassalle, P. Mailley, B. Corso, P. Guédon, A. Roget, Y. Lévy, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2003**, *32*, 687–696.
- ⁶⁰ <http://www.ibis-spr.nl/products/spr/index.htm>
- ⁶¹ <http://www.gwcinstruments.com/>
- ⁶² <http://www.htsbiosystems.com/>
- ⁶³ <http://www.genoptics-spr.com/>
- ⁶⁴ **Characterization and Optimization of a Real-Time, Parallel, Label-Free, Polypyrrole-Based DNA Sensor by Surface Plasmon Resonance Imaging**, P. Guédon, T. Livache, F. Martin, F. Lesbre, A. Roget, G. Bidan, Y. Lévy, *Anal. Chem.*, **2000**, *72*, 6003–6009.
- ⁶⁵ **Dark-field surface plasmon resonance microscopy**, A.N. Grigorenko, A.A. Beloglazov, P.I. Nikitin, C. Kuhne, G. Steiner, R. Salzer, *Opt. Commun.*, **2000**, *174*, 151–155.
- ⁶⁶ **Phase properties of a surface plasmon resonance from the viewpoint of sensor applications**, V.E. Kochergin, A.A. Beloglazov, M.V. Valeiko, P.I. Nikitin, *Quantum Electron.*, **1998**, *28*, 444–448.
- ⁶⁷ **Surface plasmon resonance interferometry for biological and chemical sensing**, P.I. Nikitin, A.A. Beloglazov, V.E. Kochergin, M.V. Valeiko, T.I. Ksenevich, *Sens. Actuators B*, **1999**, *54*, 43–50.
- ⁶⁸ **Surface plasmon resonance interferometer for bio- and chemical-sensors**, A.V. Kabashin, P.I. Nikitin, *Opt. Commun.*, **1998**, *150*, 5–8.
- ⁶⁹ **Light scattering from polymer solutions**, M.B. Huglin, *Academic press (N.Y.)* **1972**.
- ⁷⁰ **Rapid method for detection of point mutations using mismatch binding protein (MutS) and an optical biosensor**, M. Gotoh, M. Hasebe, T. Ohira, Y. Hasegawa, Y. Shinohara, H. Sota, *Gen. Anal.: Biomol. Engineering*, **1997**, *14*, 47–50.
- ⁷¹ **Mass spectrometry-based proteomics**, R. Aebersold, M. Mann, *Nature*, **2003**, *422*, 198–207.
- ⁷² **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**, D. Nedelkov, R.W. Nelson, *Biosens. Bioelectron.*, **2001**, *16*, 1071–1078.
- ⁷³ **How biotinylation can interfere with recognition: a surface plasmon resonance study of peptide-antibody interactions**, J.C. Peter, J.P. Briand, J. Hoebeke, *J. Immunol. Methods*, **2003**, *274*, 149–158.
- ⁷⁴ **Versatile analysis of multiple macromolecular interactions by SPR imaging: application to p53 and DNA interaction**, E. Maillart, K. Brengel-Pesce, D. Capela, A. Roget, T. Livache, M. Canva, Y. Lévy, T. Soussi, *Oncogene*, **2004**, in press.
- ⁷⁵ **Spying on HIV with SPR**, R.L. Rich, D.G. Myszka, *Trends Microbiol.*, **2003**, *11*, 124–133.
- ⁷⁶ **Antibody affinity measurements**, A. Azimzadeh, M.H. Van Regenmortel, *J. Mol. Recogn.*, **1990**, *3*, 108–116.
- ⁷⁷ **Analysis of the DNA-binding domain of Escherichia coli DnaA protein**, F. Blaesing, C. Weigel, M. Welzeck, W. Messer, *Mol. Microbio.*, **2000**, *36*, 557–569.

-
- ⁷⁸ **Ellipsometry as a tool to study the adsorption behavior of synthetic and biopolymers at the air-water interface**, J.A. De Feijter, J. Benjamins, F.A. Veer, *Biopolymers*, **1978**, *17*, 1759–1772.
- ⁷⁹ **Gold thin-film electrodes: an EQCM study of the influence of chromium and titanium adhesion layers on the response**, J.C. Hoogvliet, W.P. Van Bennekom, *Electrochim. Acta*, **2001**, *47*, 599–611.
- ⁸⁰ **Detection of DNA Hybridization Using the TISPR-1 Surface Plasmon Resonance Biosensor**, K. Kukanskis, J. Elkind, J. Melendez, T. Murphy, G. Miller, H. Garner, *Anal. Biochem.*, **1999**, *274*, 7–17.
- ⁸¹ **Micro-array detection system for gene expression products based on surface plasmon resonance imaging**, Y. Xinglong, W. Dongsheng, W. Dingxin, O.Y. Jian-Hua, Y. Zibo, D. Yonggui, L. Wei, Z.X. Sheng, *Sens. Actuators B*, **2003**, *91*, 133–137.
- ⁸² **Formation, Spectroscopic Characterization, and Application of Sulfhydryl-Terminated Alkanethiol Monolayers for the Chemical Attachment of DNA onto Gold Surfaces**, E.A. Smith, M.J. Wanat, Y. Cheng, S.V.P. Barreira, A.G. Frutos, R.M. Corn, *Langmuir*, **2001**, *17*, 2502–2507.
- ⁸³ **Detection of nitrogen dioxide by means of a gold film in a surface-plasmon resonance scheme**, P.I. Nikitin, A.A. Beloglazov, A.N. Grigorenko, A.I. Savchuk, P.M. Anokhin, J.D. Wright, *Tech. Phys. Lett.*, **1997**, *23*, 920–922.
- ⁸⁴ **Bimetallic Layers Increase Sensitivity of Affinity Sensors Based on Surface Plasmon Resonance**, S.A. Zynio, A.V. Samoylov, E.R. Surovtseva, V.M. Mirsky, Y.M. Shirshov, *Sensors*, **2002**, *2*, 62–70.
- ⁸⁵ **A surface plasmon resonance-based immunosensor for highly sensitive detection of morphine**, G. Sakai, K. Ogata, T. Uda, N. Miura, N. Yamazoe, *Sens. Actuators B*, **1998**, *49*, 5–12.
- ⁸⁶ **Immobilization of proteins to a carboxymethyldextran-modified gold surface for biospecific interaction analysis in surface plasmon resonance sensors**, B. Johnsson, S. Lofas, G. Lindquist, *Anal. Biochem.*, **1991**, *198*, 268–277.
- ⁸⁷ **Biomolecule immobilization on electrode surfaces by entrapment or attachment to electrochemically polymerized films. A review**, S. Cosnier, *Biosens. Bioelectron.*, **1999**, *14*, 443–456.
- ⁸⁸ **Self-assembled monolayers for biosensors**, T. Wink, S.J. Van Zuilen, A. Bult, W.P. Van Bennekom, *Analyst*, **1997**, *122*, 43–50.
- ⁸⁹ **Traitement chimique de la surface**, N. Bassil, « titre en cours », thèse de doctorat spécialité Optique, Université Paris XI, **2004**, en cours de rédaction.
- ⁹⁰ <http://www.iota.u-psud.fr/~brun/moic/MOIC.html>
- ⁹¹ http://ulyse.glv-t-cnrs.fr/lrp/cadre_equipes.htm
- ⁹² **Streptavidin arrays as supramolecular architectures in surface-plasmon optical sensor formats**, W. Knoll, M. Zilzlsperger, T. Liebermann, S. Arnold, A. Badia, M. Liley, D. Piscevic, F.J. Schmitt, J. Spinke, *Coll. Surf. A*, **2000**, *161*, 115–137.
- ⁹³ **Surface plasmon resonance measurement of binding and dissociation of wild-type and mutant streptavidin on mixed biotin-containing alkylthiolate monolayers**, L.S. Jung, K.E. Nelson, C.T. Campbell, P.S. Stayton, S.S. Yee, V. Perez-Luna, *Sens. Actuators B*, **1999**, *54*, 137–144.
- ⁹⁴ **Efficient methods for attaching non-radioactive labels to the 5' ends of synthetic oligodeoxyribonucleotide**, S. Agrawal, C. Chiistodoulou, J.M. Gait, *Nucleic Acids Res.*, **1986**, *14*, 6227–6245.

- ⁹⁵ **Structure of SAMs generated from functionalized thiols on gold**, K. Tamada, J. Nagasawa, F. Nakanishi, K. Abe, M. Hara, W. Knoll, T. Ishida, H. Fukushima, S. Miyashita, T. Usui, T. Koini, T.R. Lee, *Thin solid films*, **1998**, 327–329, 150–155.
- ⁹⁶ **A Multistep Chemical Modification Procedure To Create DNA Arrays on Gold Surfaces for the Study of Protein-DNA Interactions with Surface Plasmon Resonance Imaging**, J.M. Brockman, A.G. Frutos, R.M. Corn, *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 8041–8051.
- ⁹⁷ <http://www.genetix.com/productpages/Instruments/X2000.htm>
- ⁹⁸ **One hundred spots parallel monitoring of DNA interactions by SPR imaging of polymer-functionalized surfaces applied to the detection of cystic fibrosis mutations**, N. Bassil, E. Maillart, M. Canva, Y. Lévy, M.C. Millot, S. Pissard, R. Narwa, M. Goossens, *Sens. Actuators B*, **2003**, 94, 313–323.
- ⁹⁹ http://www-drifmc.cea.fr/SI3M/web_si3m/
- ¹⁰⁰ **Electrochemical polymerization of pyrrole**, A.F. Diaz, K.K. Kanazawa, G.P. Gardini, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1979**, 14, 635–636.
- ¹⁰¹ **Influence of inserted anions on the properties of polypyrrole**, F.T.A. Vork, B.C.A.M. Schuermans, E. Barendrecht, *Electrochim. Acta*, **1990**, 35, 567–575.
- ¹⁰² **Preparation of a DNA matrix via an electrochemically directed copolymerization of pyrrole and oligonucleotides bearing a pyrrole group**, T. Livache, A. Roget, E. Dejean, C. Barthet, G. Bidan, R. Teoule, *Nucleic Acids Res.*, **1994**, 22, 2915–2921.
- ¹⁰³ **Electropolymerization as a Versatile Route for Immobilizing Biological Species onto Surfaces**, G. Bidan, M. Billon, K. Galasso, T. Livache, G. Mathis, A. Roget, L.M. Torres-Rodriguez, E. Vieil, *Appl. Biochem. Biotech.*, **2000**, 89, 183–193.
- ¹⁰⁴ **Electroconducting polymers for the construction of DNA or peptide arrays on silicon chips**, T. Livache, H. Bazin, P. Caillat, A. Roget, *Biosens. Bioelectron.*, **1998**, 13, 629–634.
- ¹⁰⁵ **In situ atomic force microscopy study of polypyrrole synthesis and the volume changes induced by oxidation and reduction of the polymer**, M.F. Suarez, R.G. Compton, *J. Electroanal. Chem.*, **1999**, 462, 211–221.
- ¹⁰⁶ **Comparison by QCM and photometric enzymatic test of the biotin-avidin recognition on a biotinylated polypyrrole**, A. Dupont-Filliard, M. Billon, S. Guillerez, G. Bidan, *Talanta*, **2001**, 55, 981–992.
- ¹⁰⁷ **Reversible oligonucleotide immobilization based on biotinylated polypyrrole film**, A. Dupont-Filliard, A. Roget, T. Livache, M. Billon, *Anal. Chim. Acta*, **2001**, 449, 45–50.
- ¹⁰⁸ **Electropolymerisable pyrrole-oligonucleotide: synthesis and analysis of ODN hybridization by fluorescence and QCM**, N. Lassalle, A. Roget, T. Livache, P. Mailley, E. Vieil, *Talanta*, **2001**, 55, 993–1004.
- ¹⁰⁹ **Polypyrrole electrospotting for the construction of oligonucleotide arrays compatible with a surface plasmon resonance hybridization detection**, T. Livache, P. Guédon, C. Brakha, A. Roget, Y. Lévy, G. Bidan, *Synth. Metals*, **2001**, 121, 1443–1444.
- ¹¹⁰ **Resolution in surface plasmon microscopy**, C.E.H. Berger, R.P.H. Kooyman, J. Greve, *Rev. Sci. Instrum.*, **1994**, 65, 2829–2836.
- ¹¹¹ www.mellesgriot.com
- ¹¹² **Progress in monitoring, modelling and control of bioprocesses during the last 20 years**, K. Schügerl, *J. Biotechnol.*, **2001**, 85, 149–173.
- ¹¹³ <http://www.cargille.com/>
- ¹¹⁴ <http://www.photonlines.com/>
- ¹¹⁵ <http://www.kodak.com/global/en/digital/ccd/publications/applicationNotes.jhtml>

- ¹¹⁶ **Uncertainties in the values obtained by surface plasmon resonance**, B.G. Tilkens, Y.F. Lion, Y.L. Renotte, *Opt. Eng.*, **2000**, *39*, 363–373.
- ¹¹⁷ **Quantitative determination of surface concentration of protein with surface plasmon resonance using radiolabeled proteins**, E. Stenberg, B. Persson, H. Roos, C. Urbaniczky, *J. Colloid. Interface Sci.*, **1991**, *143*, 513–526.
- ¹¹⁸ **Kinetic analysis of monoclonal antibody-antigen interactions with a new biosensor based analytical system**, R. Karlsson, A. Michaelsson, L. Mattsson, *J. Immunol. Methods*, **1991**, *145*, 229–240.
- ¹¹⁹ **Principles of biosensing with an extended coupling matrix and surface plasmon resonance**, B. Liedberg, I. Lundström, E. Stenberg, *Sens. Actuators B*, **1993**, *11*, 63–72.
- ¹²⁰ **Antibody affinity measurements**, A. Azimzadeh, M.H. Van Regenmortel, *J. Mol. Recog.*, **1990**, *3*, 108–116.
- ¹²¹ **Kinetics analysis of biosensor data: elementary tests for self-consistency**, P. Schuck, A.P. Minton, *Trends Biochem. Sci.*, **1996**, *21*, 458–460.
- ¹²² <http://home.hccnet.nl/ja.marquart/SPRpages.htm>
- ¹²³ **Determination of Association Rate Constants by an Optical Biosensor Using Initial Rate Analysis**, P.R. Edwards, R.J. Leatherbarrow, *Anal. Biochem.*, **1997**, *246*, 1–6.
- ¹²⁴ **Oligonucleotide ligation assay-based DNA chip for multiplex detection of single nucleotide polymorphism**, J.Y. Deng, X.E. Zhang, Y. Mang, Z.P. Zhang, Y.F. Zhou, Q. Liu, H.B. Lu, Z.J. Fu, *Biosens. Bioelectron.*, **2004**, *19*, 1277–1283.
- ¹²⁵ **A role for arrays in clinical virology: fact or fiction?**, J.P. Clewley, *J. Clin. Virol.*, **2004**, *29*, 2–12.
- ¹²⁶ **DNA microarray analysis in malignant lymphomas**, C. Schwaenen, S. Wessendorf, H.A. Kestler, H. Dohner, P. Lichter, M. Bentz, *Ann. Hematol.*, **2003**, *82*, 323–332.
- ¹²⁷ **Application of DNA microarray to toxicological research**, T. Shioda, *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, **2004**, *23*, 13–31.
- ¹²⁸ **Réalisation d'une puce à ADN**, N. Bassil, « titre en cours », thèse de doctorat spécialité Optique, Université Paris XI, **2004**, en cours de rédaction.
- ¹²⁹ **K-ras gene mutation as a pathogenetic and diagnostic marker in human cancer**, E.R. Fearon, *J. Natl Cancer Inst.*, **1993**, *85*, 1978–1980.
- ¹³⁰ <http://www.valdorel.fnclcc.fr/recherche/index.htm>
- ¹³¹ **K-ras Mutation Detection by Hybridization to a Polypyrrole DNA Chip**, E. Lopez-Crapez, T. Livache, J. Marchand, J. Grenier, *Clin. Chem.*, **2001**, *47*, 186–194.
- ¹³² **Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction**, M. Zuker, *Nucleic Acids Res.*, **2003**, *31*, 3406–3415.
- ¹³³ **The impact of nucleic acid secondary structure on PNA hybridization**, B.A. Armitage, *Drug Discov. Today*, **2003**, *8*, 222–228.
- ¹³⁴ <http://ozone2.chem.wayne.edu/Hyther/hythermain.html>
- ¹³⁵ **Volume Change in Polypyrrole Studied by Atomic Force Microscopy**, E. Smela, N. Gadegaard, *J. Phys. Chem. B*, **2001**, *105*, 9395–9405.
- ¹³⁶ **Fundamentally Different Logic of Gene Regulation in Eukaryotes and Prokaryotes**, K. Struhl, *Cell*, **1999**, *98*, 1–4.
- ¹³⁷ **Characterization and analysis of thermal denaturation of antibodies by size exclusion high-performance liquid chromatography with quadruple detection**, W.K. Hartmann, N. Saptharishi, X.Y. Yang, G. Mitra, G. Soman, *Anal. Biochem.*, **2004**, *325*, 227–239.

-
- ¹³⁸ **Development of human chorionic gonadotropin subunit-beta promoter-based toxic gene therapy for testicular cancer**, T. Shirakawa, A. Gotoh, Z. Zhang, C. Kao, L.W.K. Chung, T.A. Gardner, *Urology*, **2004**, 63, 613–618.
- ¹³⁹ **Immunochemical mapping of a specific domain on human choriogonadotropin using anti-protein and anti-peptide monoclonal antibodies**, J.M. Bidart, F. Troalen, C.J. Bohuon, G. Hennen, D.H. Bellet, *J. Biol. Chem.*, **1987**, 262, 15483–15489.
- ¹⁴⁰ **The ISOBM TD-7 Workshop on hCG and related molecules. Towards user-oriented standardization of pregnancy and tumor diagnosis: assignment of epitopes to the three-dimensional structure of diagnostically and commercially relevant monoclonal antibodies directed against human chorionic gonadotropin and derivatives**, P. Berger, C. Sturgeon, J.M. Bidart, E. Paus, R. Gerth, M. Niang, A. Bristow, S. Birken, U.H. Stenman, *Tumor Biol.*, **2002**, 23, 1–38.
- ¹⁴¹ **Detection of early pregnancy forms of human chorionic gonadotropin by home pregnancy test devices**, S.A. Butler, S.A. Khanlian, L.A. Cole, *Clin. Chem.*, **2001**, 47, 2131–2136.
- ¹⁴² **Significance of TP53 mutations in human cancer: a critical analysis of mutations at CpG dinucleotides**, T. Soussi, C. Beroud, *Hum. Mutat.*, **2003**, 21, 192–200.
- ¹⁴³ **Surfing the p53 network**, B. Vogelstein, D. Lane, A.J. Levine, *Nature*, **2000**, 408, 307–310.
- ¹⁴⁴ **Global approaches to protein-protein interactions**, G. Drewes, T. Bouwmeester, *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **2003**, 15, 199–205.
- ¹⁴⁵ **Definition of a consensus binding site for p53**, W.S. El-Deiry, S.E. Kern, J.A. Pientenpol, K.W. Kinzler, B. Vogelstein, *Nat. Genet.*, **1992**, 1, 45–49.
- ¹⁴⁶ **p53 tagged sites from human genomic DNA**, T. Tokino, S. Thiagalingam, W.S. El-Deiry, T. Waldman, K.W. Kinzler, B. Vogelstein, *Hum. Mol. Gen.*, **1994**, 3, 1357–1542.
- ¹⁴⁷ **A mutant p53 that discriminates between p53-responsive genes cannot induce apoptosis**, M. Friedlander, Y. Haupt, C. Prives, M. Oren, *Mol. Cell. Biol.*, **1996**, 16, 4961–4971.
- ¹⁴⁸ **Functional mutants of the sequence-specific transcription factor p53 and implications for master genes of diversity**, M.A. Resnick, A. Inga, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2003**, 100, 9934–9939.
- ¹⁴⁹ **Specific binding of MAR/SAR DNA-elements by mutant p53**, B.F. Muller, D. Paulsen, W. Deppert, *Oncogene*, **1996**, 12, 1941–1952.
- ¹⁵⁰ **Estimation of the relative affinity of B cell receptor by flow cytometry**, T. Shimizu, M. Oda, T. Azuma, *J. Immunol. Methods*, **2003**, 276, 33–44.
- ¹⁵¹ **Antigenic cross-reactions among immunoglobulin of diverse vertebrates (elasmobranchs to man) detected using xenoantisera**, J.J. Marchalonis, S.F. Schluter, H.Y. Yang, V.S. Hohman, K. McGee, L. Yeaton, *Comp. Biochem. Phys. A*, **1992**, 4, 675–687.
- ¹⁵² <http://p53.curie.fr/>
- ¹⁵³ **Immunohistochemical analysis of the p53 oncoprotein on paraffin sections using a series of novel monoclonal antibodies**, J. Bartek, J. Bartkova, J. Lukas, Z. Staskova, B. Vojtesek, D.P. Lane, *J. Pathol.*, **1993**, 169, 27–34.
- ¹⁵⁴ **Universal DNA Microarray Method for Multiplex Detection of Low Abundance Point mutations**, N.P. Gerry, N.E. Witowski, J. Day, R.P. Hammer, G. Barany, F. Barany, *J. Mol. Biol.*, **1999**, 292, 251–262.

- ¹⁵⁵ **An Immunochemical Analysis of the Human Nuclear Phosphoprotein-p53 - New Monoclonal Antibodies and Epitope Mapping Using Recombinant-p53**, B. Vojtesek, J. Bartek, C.A. Midgley, D.P. Lane, *J. Immunol. Methods*, **1992**, *151*, 237–244.
- ¹⁵⁶ **Manufacturing DNA microarrays of high spot homogeneity and reduced background signal**, F. Diehl, S. Grahlmann, M. Beier, J.D. Hoheisel, *Nucleic Acids Res.*, **2001**, *29*, e38.
- ¹⁵⁷ **Immobilization of single-stranded DNA fragments to solid surfaces and their repeatable specific hybridization: covalent binding or adsorption?**, V. Dugas, G. Depret, Y. Chevalier, X. Nesme, E. Souteyrand, *Sens. Actuators B*, **2004**, *in press*.
- ¹⁵⁸ **Chrystal Structure of R-phycoerythrin from *Polysiphonia urceolata* at 2.8 Å Resolution**, W.R. Chang, T. Jiang, Z.L. Wan, J.P. Zhang, Z.X. Yang, D.C. Liang, *J. Mol. Biol.*, **1996**, *262*, 721–731.
- ¹⁵⁹ **Allosteric regulation of the thermostability and DNA binding activity of human p53 by specific interacting proteins**, S. Hansen, T.R. Hupp, D.P. Lane, *J. Biol. Chem.*, **1996**, *271*, 3917–3924.
- ¹⁶⁰ **Four p53 DNA-binding domain peptides bind natural p53-response elements and bend the DNA**, P. Balagurumorthy, H. Sakamoto, M.S. Lewis, N. Zambrano, G.M. Clore, A.M. Gronenborn, E. Appella, R.E. Harrington, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1995**, *92*, 8591–8595.
- ¹⁶¹ **Differential transactivation by the p53 transcription factor is highly dependent on p53 level and promoter target sequence**, A. Inga, F. Storici, T.A. Darden, M.A. Resnick, *Mol. Cell. Biol.*, **2002**, *22*, 8612–8625.
- ¹⁶² **Groups of p53 target genes involved in specific p53 downstream effects cluster into different classes of DNA binding sites**, H. Qian, T. Wang, L. Naumovski, C.D. Lopez, R.K. Brachmann, *Oncogene*, **2002**, *21*, 7901–7911.
- ¹⁶³ **Protein-carbohydrate interaction: learning lessons from nature**, S.J. Williams, G.J. Davies, *Trends Biotech.*, **2001**, *19*, 356–362.
- ¹⁶⁴ **Emerging views of heparan sulfate glycosaminoglycan structure/activity relationships modulating dynamic biological functions**, Z. Shriver, D. Liu, R. Sasisekharan, *Trends Cell. Biol.*, **2002**, *12*, 71–77.
- ¹⁶⁵ **Heparin sequencing brings structure to the function of complex oligosaccharides**, M.A. Nugent, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2000**, *97*, 10301–10303.
- ¹⁶⁶ **HIV-1 attachment: another look**, S. Ugolini, I. Mondor, Q.J. Sattenteau, *Trends Microbiol.*, **1999**, *7*, 144–149.
- ¹⁶⁷ **Optimal inhibition of X4 HIV isolates by the CXC chemokine stromal cell-derived factor 1 alpha requires interaction with cell surface heparan sulfate proteoglycans**, A. Valenzuela-Fernandez, T. Palanche, A. Amara, A. Magerus, R. Altmeyer, T. Delaunay, J.L. Virelizier, F. Baleux, J.L. Galzi, F. Arenzana-Seisdedos, *J. Biol. Chem.*, **2001**, *276*, 26550–26558.
- ¹⁶⁸ **Structural diversity of heparan sulfate binding domains in chemokines**, H. Lortat-Jacob, A. Grosdidier, A. Imbert, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2002**, *9*, 1229–1234.
- ¹⁶⁹ **Stromal cell-derived factor-1alpha associates with heparan sulfates through the first beta-strand of the chemokine**, A. Amara, O. Lorthioir, A. Valenzuela, A. Magerus, M. Thelen, M. Montes, J.L. Virelizier, M. Delepierre, F. Baleux, H. Lortat-Jacob, F. Arenzana-Seisdedos, *J. Biol. Chem.*, **1999**, *274*, 23916–23925.
- ¹⁷⁰ <http://www.ibs.fr/content/ibs/presentation/lab/lem/interractions/>
- ¹⁷¹ http://www.granddictionnaire.com/btml/fra/r_motclef/index1024_1.asp
- ¹⁷² <http://dictionary.reference.com/>

-
- ¹⁷³ <http://anne.decoaster.free.fr/immuno/dico/dicoimmu.htm>
- ¹⁷⁴ http://www.schott.com/optics_devices/english/download/index.html
- ¹⁷⁵ <http://www.sopra-sa.com/index2.htm>
- ¹⁷⁶ **Optical Constants of the Noble Metals**, P.B. Johnson, R.W. Christy, *Phys. Rev. B*, **1972**, *6*, 4370–4379.
- ¹⁷⁷ K. Weiss, *Z. Naturforsch. A*, **1948**, *3*, 143.
- ¹⁷⁸ <http://corndog.chem.wisc.edu/fresnel/audata.txt>
- ¹⁷⁹ **Optical constants of transition metals: Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, and Pd**, P.B. Johnson, R.W. Christy, *Phys. Rev. B*, **1974**, *9*, 5056–5070.
- ¹⁸⁰ <http://macro.lsu.edu/HowTo/dndc.doc>

Résumé de la thèse en français :

Les besoins actuels grandissants pour l'analyse des interactions biomoléculaires nécessitent le développement de systèmes automatisés à forte capacité et haut débit comme la microscopie de fluorescence qui reste une méthode de prédilection. Bien que les méthodes directes (sans marquage des molécules à analyser) présentent une sensibilité plus faible que celles utilisant des marqueurs, leurs nombreux avantages (suivi en temps réel, préparation simplifiée des échantillons) sont des atouts d'importance pour l'analyse quantitative des interactions biomoléculaires. En outre, l'imagerie en résonance des plasmons de surface permet de mesurer simultanément de nombreuses interactions comme les méthodes avec marqueurs. Pour élaborer un tel dispositif, nous avons d'abord identifié les différents paramètres critiques, susceptibles d'être améliorés, comme la nature de la couche métallique. L'utilisation du capteur ainsi développé repose en grande partie sur la chimie de surface: nous avons choisi la synthèse électrochimique de films de polypyrrole qui permet, de manière contrôlée et structurée, une fonctionnalisation simple et robuste de plots contenant diverses molécules. Parallèlement, nous avons développé un programme d'acquisition d'images dont le traitement permet de suivre en temps réel les réactions biomoléculaires sur chaque plot et d'en extraire constantes d'association, de dissociation et d'affinité entre molécules. Enfin, nous avons démontré les possibilités d'application de ce système à l'étude de maladies héréditaires ou du cancer à travers des interactions ADN/ADN (K-ras), ADN/protéines (p53), protéines/protéines (hCG) et oligosaccharides/protéines (HP6/SDF-1).

Résumé de la thèse en anglais :

The current growing requirements, in the field of biomolecular interactions analysis, require the development of automated high throughput systems like fluorescence microscopy that remains the method of choice. Although direct methods (without labeling of the molecules to be analyzed) have a lower sensitivity than those using labels, their many advantages (real time monitoring, simplification of the sample preparation) are of importance for biomolecular interactions quantitative analysis. Moreover, the surface plasmon resonance imaging allows simultaneous measurements of many interactions like the methods with labels. To implement such a device, we identified its various critical parameters, likely to be improved, like the nature of the metal layer. The use of the thus developed sensor relies largely on surface chemistry: we have chosen the electrochemical synthesis of polypyrrole films that allows, in a controlled and structured manner, a simple and robust functionalization of spots containing various molecules. In parallel, an adequate home-developed software, including acquisition of images whose processing allows the real time monitoring of the biomolecular reactions occurring on each spot and the extraction of their association rate, dissociation rate and affinity constant between molecules. Lastly, we demonstrated the application possibilities of this system to the study of hereditary diseases or cancer through DNA/DNA (K-ras), DNA/protein (p53), protein/protein (hCG) and oligosaccharide/protein interactions (HP6/SDF-1).