

Université de Montréal

Développement de biocapteurs pour le diagnostic portable d'antibiotiques et de HER2

par Marie-Pier Dinél

Département de chimie
Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures et postdoctorales
en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.) en chimie

Novembre 2018

© Marie-Pier Dinél, 2018

Résumé

Présentement, le milieu hospitalier utilise des tests analytiques demandant de longues périodes d'analyses et nécessitant plusieurs spécialistes en chimie ou biochimie. En plus de ralentir le traitement des patients et leur guérison, cela accroît considérablement les dépenses des hôpitaux. Il est ainsi essentiel que la recherche se penche sur le développement de nouvelles techniques d'analyse plus rapides, plus simples et tout aussi sensibles que celles employées en ce moment. Les biocapteurs ont le potentiel de remplir ces critères et s'inscrivent donc comme des candidats sérieux quant à l'amélioration des techniques analytiques en milieu hospitalier. Cette technologie peut devenir accessible au grand public en plus d'être rapide, portable et précise. Ainsi, dans le cadre de ce mémoire, divers biocapteurs innovateurs de diagnostic portable développés pour la détection de biomolécules seront présentés.

Étant donné le fléau mondial de la résistance bactérienne développée envers plusieurs des antibiotiques existants, le développement de biocapteurs pour ces molécules fût priorisé. De plus, le traitement par antibiotiques nécessite un suivi très minutieux afin de s'assurer que les concentrations sanguines n'excèdent pas l'étroite gamme thérapeutique que possèdent ces médicaments puisque de sévères effets secondaires peuvent en découler. En premier lieu, les aminoglycosides furent analysés à l'aide d'un essai compétitif réalisé par spectroscopie de résonance des plasmons de surface. Ainsi, les aminoglycosides entrent en compétition pour se lier au récepteur protéique du biocapteur avec des analogues de pyrrolo-[1,5-*a*]pyrazine actifs fonctionnalisés à des nanoparticules d'or. Secondement, un biocapteur de fluorescence fût construit afin de quantifier la vancomycine dans le cadre de la compétition internationale SensUs. L'équipe BiosensUM dont j'ai été la cheffe de projet a développé un essai compétitif où la vancomycine de l'échantillon et la vancomycine marquée par l'isothiocyanate de fluorescéine sont en compétition pour le site de liaison de l'anticorps monoclonal anti-vancomycine. Cet essai se déroule à l'intérieur d'une cellule qui s'insère dans l'appareil de fluorimétrie. Une application mobile permet, par la suite, d'obtenir les résultats.

Finalement, un instrument hybride de spectroscopie de résonance des plasmons de surface et d'électrochimiluminescence fût construit en collaboration avec le laboratoire du Dr. Polo de l'Institut National de Cancérologie (CRO) Aviano en Italie. Un biocapteur couplant ces

deux techniques fût ensuite développé pour un biomarqueur du cancer du sein, le domaine extracellulaire de la protéine transmembranaire HER2.

Mots-clés : Biocapteur, Spectroscopie de résonance des plasmons de surface, SPR, Fluorescence, Électrochimiluminescence, ECL, Antibiotiques, Aminoglycosides, Vancomycine, Biomarqueur du cancer du sein, HER2, Instrument de diagnostic portable, Nanoparticules.

Abstract

In hospitals, analytical tests requiring long analysis and qualified personnel are currently used. This situation is considerably slowing down the treatment and the recovery of patients and increasing hospital expenses. Therefore, it is essential that researchers focus on the development of new analytical techniques that are faster, simpler and as sensitive as current methods. It is in this context that biosensors are the perfect candidates to improve technologies in the healthcare system. Biosensors can be fast, precise and portable devices that can be easily used by the public. Thus, as part of this masters' thesis, innovative point-of-care biosensors for biomolecules will be presented.

The development of biosensors for antibiotics was prioritized because of the global healthcare problem of the bacterial resistance developed toward these molecules. In addition, antibiotic treatment requires close monitoring to ensure the dose is within the narrow therapeutic range, to avoid severe side effects or underdosing. As a first example, aminoglycosides were analyzed using a surface plasmon resonance competitive assay. Thus, aminoglycosides competed with active pyrrolo-[1,5-*a*]pyrazine analogs functionalized on gold nanoparticles to bind the protein receptor on the biosensor. Secondly, a fluorescence biosensor was built to monitor vancomycin for the SensUs Competition. The BiosensUM team, for which I was the leader, has developed a competitive assay where sample vancomycin and fluorescein isothiocyanate-labeled vancomycin compete to bind the anti-vancomycin antibodies on the surface. This test occurred in a microfluidic chip placed in a custom-made fluorimeter. A mobile application was used to extract the results.

Finally, an instrument combining surface plasmon resonance and electrochemiluminescence was built in collaboration with Dr. Polo from the National Cancer Institute (CRO) Aviano in Italy. A biosensor coupling these two techniques was developed to monitor a biomarker of breast cancer, the extracellular domain of the HER2 transmembrane protein.

Keywords : Biosensor, Surface Plasmon Resonance, SPR, Fluorescence, Electrochemiluminescence, ECL, Antibiotics, Aminoglycosides, Vancomycin, Breast Cancer Biomarker, HER2, Point-of-care Instrument, Nanoparticles.

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	iv
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures	ix
Liste des sigles et des abréviations	xii
Remerciements.....	xv
1 Chapitre 1 : Introduction.....	1
1.1 Préambule	1
1.1.1 Mise en contexte	1
1.1.2 Objectifs de recherche & Approche proposée	2
1.1.3 Plan du mémoire	3
1.2 Cibles biologiques visées.....	3
1.2.1 Antibiotiques.....	3
1.2.1.1 Aminoglycosides.....	3
1.2.1.2 Vancomycine	4
1.2.2 Biomarqueur du cancer du sein.....	5
1.2.2.1 Domaine extracellulaire de HER2 (ECD HER2).....	5
1.3 La résonance des plasmons de surface.....	7
1.3.1 Historique.....	7
1.3.2 Théorie de la SPR	8
1.3.3 L'instrumentation SPR.....	11
1.3.4 Théorie du plasmon de surface localisé	14
1.4 Nanoparticules d'or.....	15
1.4.1 Historique.....	15
1.4.2 Synthèse et caractérisation des nanoparticules	16
1.4.3 Propriétés des nanoparticules.....	19
1.5 Techniques bioanalytiques – Biocapteurs.....	21
1.5.1 Biocapteurs SPR	21

1.5.2	Biocapteurs LSPR.....	23
1.6	Luminescence	24
1.6.1	Spectroscopie de fluorescence	26
1.6.2	Électrochimiluminescence	26
1.7	Conclusion	28
2	Chapitre 2 : Essai compétitif SPR pour la détection d'aminoglycosides.....	30
2.1	Méthode expérimentale.....	30
2.1.1	Appareils utilisés.....	30
2.1.2	Nanoparticules	31
2.1.2.1	Synthèse de nanoparticules d'or sphériques	31
2.1.2.2	Synthèse de nanotiges d'or	32
2.1.2.3	Synthèse de nanoparticules d'or quasi-sphériques	33
2.1.2.4	Fonctionnalisation des nanoparticules d'or avec les analogues.....	33
2.1.2.5	Fonctionnalisation des nanobilles d'oxyde de silice avec les analogues	34
2.1.2.6	Caractérisation des NPs	34
2.1.2.7	Test d'agrégation des NPs	34
2.1.3	Essai SPR.....	34
2.1.3.1	Prisme d'or.....	34
2.1.3.2	SAMs	35
2.1.3.3	Essai compétitif SPR.....	35
2.2	Design de l'essai biologique compétitif.....	36
2.3	Nanoparticules d'or.....	41
2.3.1	Fonctionnalisation des nanoparticules avec les analogues	41
2.3.2	Stabilisation des nanoparticules d'or	42
2.3.2.1	Optimisation de la charge des NPs	42
2.3.2.2	Optimisation de la stabilité des AuNP@PAA	44
2.3.2.3	Optimisation de l'agent stabilisateur et la forme des NPs	47
2.4	Essai compétitif.....	50
2.4.1	Résultats préliminaires.....	50
2.4.2	Reproductibilité.....	54
2.5	Conclusion	55

3	Chapitre 3 : Combinaison de la SPR et l'électrochimiluminescence pour la détection du biomarqueur du cancer du sein HER2	57
3.1	Historique.....	57
3.2	Méthode expérimentale.....	58
3.2.1	Essais sandwich en SPR.....	58
3.2.2	Tests ECL.....	59
3.3	Essai biologique	60
3.4	Résultats préliminaires – SPR.....	61
3.5	Ru(bpy) ₃ ²⁺ et co-réactifs	63
3.6	Prototypage de l'instrument ECL	64
3.6.1	Électrodes.....	64
3.6.2	Cellules fluidiques	65
3.6.4	Collection de la luminescence	66
3.7	Résultats préliminaires – ECL	68
3.7.1	Combinaison de la SPR et l'ECL : Impact sur la SPR	68
3.7	Conclusion	71
4	Chapitre 4 : Développement d'un biocapteur pour la détection de la vancomycine dans le cadre de la compétition étudiante internationale SensUs	73
4.1	Compétition internationale SensUs.....	73
4.1.1	Présentation de SensUs 2018.....	73
4.1.2	Présentation de BiosensUM 2018.....	74
4.1.3	Mon apport à BiosensUM.....	76
4.2	Méthode expérimentale.....	77
4.2.1	Synthèse, purification et caractérisation de la vancomycine-FITC	77
4.2.2	Test 96-puits.....	78
4.2.3	Microscopie.....	78
4.2.4	Tests sur le prototype	79
4.3	Biocapteur	79
4.3.1	Design de l'essai biologique	80
4.3.2	Présentation de l'instrument développé.....	80
4.3.2.1	Microfluidique	81

4.3.2.2	Tête de fluorescence	82
4.3.2.3	Programmation – Application mobile.....	83
4.3.3	Développement de l’essai compétitif.....	84
4.3.3.1	Synthèse et caractérisation de la vancomycine-FITC.....	84
4.3.3.2	Fluorimétrie – 96 puits.....	85
4.3.3.3	Microscopie de fluorescence.....	86
4.3.3.4	FlowsensUM.....	87
4.4	Avantages de notre technologie	88
4.5	BiosensUM à la compétition SensUs 2018.....	89
4.6	Conclusion	90
5	Chapitre 5 : Conclusions et Perspectives	92
	Bibliographie.....	96
	Annexe A – Images TEM des NPs quasi-sphériques	i
	Annexe B – Document des résultats de BiosensUM 2018	ii
	Annexe C – « Contrer ces bactéries qui résistent », Marie-Pier Dinel	xix
	Annexe D – Caractérisation de la vancomycine-FITC	xx

Liste des tableaux

Tableau I.	Synthèse des AuNP@PAA et AuNP@citrate.....	31
Tableau II.	Déplacement de la bande plasmonique SPR par essai direct des divers analogues d'aminoglycosides ainsi que de la tobramycine et la néomycine à une concentration de 150 μ M dans un tampon d'acétate de sodium 10 mM à pH 4 lors de leur interaction avec la protéine Eis.	40
Tableau III.	Stabilité des nanoparticules selon leur charge	43
Tableau IV.	Stabilisation des AuNP@PAA avec la cystéamine à diverses concentrations.	45
Tableau V.	Comparaison des nanoparticules AuNP@PAA avec les différents analogues 2 .	45
Tableau VI.	Stabilité des AuNP@PAA@cystéamine avec les analogues 2 dans divers tampons.	46
Tableau VII.	Résumé des caractéristiques des différentes NPs synthétisées et testées à titre de compétiteur pour le développement du biocapteur SPR pour les aminoglycosides.	50
Tableau VIII.	Déplacements SPR pour l'essai sandwich du ECD HER2 avec l'anticorps MGR2 à titre de récepteur et l'anticorps MGR3 comme anticorps secondaire.....	62
Tableau IX.	Déplacements SPR pour l'essai sandwich du ECD HER2 avec le trastuzumab à titre de récepteur et les anticorps MGR2 et MGR3 comme anticorps secondaires.	62
Tableau X.	Présentation des membres de BiosensUM 2018 ainsi que leurs principales tâches effectuées dans le projet. ⁹³	75

Liste des figures

Figure 1.	Famille des aminoglycosides	4
Figure 2.	Structure de la vancomycine.....	5
Figure 3.	La protéine HER2 est composée du domaine extracellulaire (ECD), du domaine transmembranaire et du domaine de la tyrosine kinase. Les anticorps thérapeutiques soient le trastuzumab et le pertuzumab peuvent se lier au domaine extracellulaire du HER2. ¹⁴	6
Figure 4.	A) Propagation des plasmons de surface à l'interface du milieu et du film métallique, B) Champ électrique évanescent résultant de l'excitation des plasmons de surface. ²⁵	8
Figure 5.	Schéma simplifié des vecteurs d'onde de la lumière dans l'air (k_{air}) et dans un prisme de verre (k_{prisme}) et du vecteur d'onde des plasmons de surface (k_{spp}). ²⁸	10
Figure 6.	Signal d'absorption du plasmon de surface d'un film d'or de 50 nm adhérent par 3 nm de chrome au prisme de forme Dove dans de l'eau désionisée à 18 mΩ (courbe bleue, $n = 1,33$) et dans une solution aqueuse de sucrose (courbe rouge, $n = 1,34$) avec un instrument SPR classique (P4-SPR) possédant un angle fixe de 72,6 degrés. ³⁰	11
Figure 7.	A) Instrument SPR à interrogation de l'angle incident. B) Instrument SPR classique de configuration Kretschmann à interrogation de la longueur d'onde. ²⁵	12
Figure 8.	A) Instrument P4-SPR accompagné d'un ordinateur portable de 9 pouces étant seule alimentation nécessaire pour l'appareil SPR. B) Cellule fluïdique comportant 4 canaux dont 3 analytiques ainsi qu'un canal de référence et un prisme de forme Dove recouvert d'un nanofilm d'or. ³³	14
Figure 9.	Schéma de l'excitation du plasmon de surface localisé par la lumière visible. ^{30, 35}	15
Figure 10.	Effet de la forme (A) et de la taille (B) de nanoparticules d'or sur les spectres LSPR. ^{42, 43}	19
Figure 11.	Spectres UV-vis représentant l'agrégation de nanoparticules d'or. Le changement de couleur du rouge au mauve est bien visible à l'œil nu. ⁴⁴	20
Figure 12.	Méthodes de détection employées pour les biocapteurs SPR.....	23
Figure 13.	Le diagramme de Jablonski représentant les divers processus d'excitation et d'émission radiative et non-radiative.....	25

Figure 14.	Méthode de détection employée pour les biocapteurs ECL.....	28
Figure 15.	A) Schéma de l'essai compétitif entre les aminoglycosides et leurs analogues fonctionnalisés sur des nanoparticules d'or pour la liaison à la protéine Eis sur la surface du prisme d'or. B) Schéma de la réponse attendue lors de l'essai compétitif ; important signal SPR en absence d'antibiotiques (courbe bleue) et faible déplacement de la bande plasmonique en présence d'amynoglycosides (courbe verte).....	37
Figure 16.	Analogues composés de la base pyrrolo-[1,5- <i>a</i>]pyrazine dont la molécule 1 qui porte un thiol et les molécules 2a-d qui comptent une amine primaire.....	38
Figure 17.	Structure cristalline du complexe de la protéine Eis (EisC204A), la coenzyme A et la tobramycine.....	39
Figure 18.	A) Structure cristalline du complexe entre un monomère de la protéine Eis (EisC204A), la coenzyme A et la molécule à base de pyrrolo-[1,5- <i>a</i>]pyrazine	40
Figure 19.	Synthèse des analogues 2 thiolés permettant l'attachement aux nanoparticules d'or	42
Figure 20.	Comparaison de sensorgrammes SPR selon le fonctionnement ou non du compétiteur pour le biocapteur d'aminoglycosides	52
Figure 21.	Déplacement de la bande plasmonique SPR pour l'essai compétitif avec divers compétiteurs en présence et en absence d'aminoglycosides.....	53
Figure 22.	Reproductibilité des essais compétitifs à une concentration fixe de néomycine (150 µM) pour les NPs : AuNPs quasi-sphériques, nanotiges et NPs magnétiques.....	55
Figure 23.	Schéma de l'essai sandwich du ECD HER2 pour une technologie combinant la SPR et l'ECL	61
Figure 24.	Électrodes imprimées sur le prisme SPR.....	65
Figure 25.	ECL en présence de Ru(bpy) ₃ ²⁺ 1 mM.	67
Figure 26.	Spectre de voltampérométrie cyclique de la solution aqueuse de Ru(bpy) ₃ ²⁺ 1 mM, TPrA 15 mM et Tween 20 2% vs Ag/Ag ⁺	68
Figure 27.	Spectrogramme SPR obtenu lors de l'électrochimiluminescence de Ru(bpy) ₃ ²⁺ 1 mM, TPrA 15 mM et Tween 20 2% dans le PBS 1X.....	69
Figure 28.	Comparaison des canaux SPR afin d'optimiser la collection de la luminescence de l'ECL	70
Figure 29.	Équipe BiosensUM 2018 et leur prototype FlowsensUM	76

Figure 30.	Schéma du biocapteur pour la vancomycine développé par BiosensUM.....	80
Figure 31.	Schéma de la microfluidique développée. ⁹³	82
Figure 32.	Prototypes du FlowsensUM.....	83
Figure 33.	Schéma du système informatique d'acquisition et de traitement des données .	84
Figure 34.	Schéma de synthèse de la vancomycine-FITC développée à partir des travaux de Supuran. ^{93, 98}	85
Figure 35.	Spectres de fluorescence de la vancomycine-FITC dans le tampon d'analyse et spectre d'émission de la vancomycine excitée à 480 nm. ⁹³	85
Figure 36.	Courbe d'étalonnage de la fluorescence de la vancomycine-FITC liée à l'anticorps monoclonal anti-vancomycine avec une longueur d'onde d'excitation de 480 nm et d'émission de 525 nm. ⁹³	86
Figure 37.	Essai compétitif par microscopie de fluorescence en présence de 0,065 mg/mL de vancomycine-FITC représentant 65% et de divers pourcentages de vancomycine pour le récepteur, l'anticorps monoclonal anti-vancomycine, lié à la surface du support. ⁹³	87
Figure 38.	Résultats analytiques de BiosensUM à SensUs 2018.....	90
Figure 39.	Nanoparticules quasi-sphériques	i
Figure 40.	Spectre de masse de la vancomycine-FITC purifiée par chromatographie liquide en mode préparatif	xx

Liste des sigles et des abréviations

- ADN : Acide désoxyribonucléique
- APD : Photodiode à avalanche – *avalanche photodiode*
- AuNP : Nanoparticule d'or
- AuNP@citrate : Nanoparticule d'or enrobée de citrate
- AuNP@PAA : Nanoparticule d'or enrobée de poly(allylamine)
- BSA : Albumine de sérum bovin
- CTAB : Bromure d'hexadécyltriméthylammonium
- $\Delta\lambda_{\text{SPR}}$: Déplacement de la bande plasmonique
- DLS : Diffusion de lumière dynamique – *dynamic light scattering*
- ECD HER2 : Domaine extracellulaire de l'anticorps HER2
- ECL : Électrochimiluminescence
- EDC : Hydrochlorure de *N*-(3-diméthylaminopropyl)-*N*'-éthylcarbodiimide
- Eis : *Enhanced intracellular survival protein*
- ELISA : Méthode immuno-enzymatique ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay*
- ϵ : Constante diélectrique
- E_{spp} : Champ électrique évanescent
- FITC : Isothiocyanate de fluorescéine
- IR : Infrarouge
- k_{spp} : Vecteur d'onde des plasmons de surface
- λ : Longueur d'onde
- LED : Diode électroluminescente
- LSPR : Plasmons de surface localisés – *localized surface plasmon resonance*
- MES : Acide 2-éthanosulfonique
- MHA : Acide 16-mercaptohexadécanoïque
- MRSA : *Staphylococcus aureus* résistante à la méticilline
- n : Indice de réfraction
- NHS : *N*-hydroxysuccinimide
- NP : Nanoparticule
- PAA : Poly(allylamine)

POC : Diagnostic portable – *point-of-care*

RGB : Rouge, Vert, Bleu – *Red, Green, Blue*

RIU : Unité d'indice de réfraction

Ru(bpy)₃ : Tris(2,2'-bipyridyl)dichlororuthénium(II) hexahydraté

SAM : Monocouche auto-assemblée – *self-assembled monolayer*

SERS : Diffusion Raman augmentée en surface – *surface-enhanced Raman scattering*

SP : Plasmon de surface – *surface plasmons*

SPP : Polariton de plasmon de surface – *surface plasmon polaritons*

SPR : Spectroscopie de résonance des plasmons de surface – *surface plasmon resonance*

TEM : Microscopie électronique en transmission

TM : Transverse magnétique

TPrA : Tripropylamine

TRIS : Trishydroxyméthylaminométhane

À ma tante Denise,

Remerciements

La présentation aujourd'hui de ce mémoire ne représente que la pointe de l'iceberg des deux dernières années que j'ai passé à travailler sur mon projet de maîtrise. Plusieurs actrices et acteurs que je tiens à remercier personnellement m'ont permis de réaliser tout ce chemin et de vivre toutes ces expériences inoubliables.

Sans mon directeur de recherche qui a toujours cru en moi et qui n'a jamais hésité à me confier de nouveaux projets, je n'aurais pu en apprendre autant et ressortir de cette aventure grandie. Merci Jean-François de m'avoir accompagnée et accordé ta confiance tout au long de ces dernières années. Je n'aurais pu être plus prête à affronter de nouveaux défis sans ton support. Merci à mon acolyte de laboratoire, Ben (Benjamin Charron), qui a toujours eu une oreille attentive pour mes commérages. Désolé de t'abandonner pour les quelques années restantes à ton doctorat, tu n'as malheureusement pas réussi à me convaincre. Merci à tous les membres du groupe Masson qui se sont succédé les dernières années et dont j'ai eu le plaisir de travailler à leur côté : Kristy McKeating qui fût une merveilleuse superviseure, mes stagiaires, Laurianne Gravel Tatta, Frédéric Fournelle et Sophie Wesolowski, Alexandra Aubé, Philippe Blain, Julien Breault-Turcot, Thibault Brulé, Natalia Bukar, Julien Coutu, Maxime Couture, Simon Forest, Geneviève Granger, Pr. Long Hong, Jérémie Labrecque-Carbonneau, Simon Laporte, Mengdi Lu, Félix Lussier, Hugo-Pierre Poirier-Richard, Trevor Théoret, Gregory Wallace, Haifeng Zhou, Hu Zhu, Syed Akif et Xingjuan Zhao.

Merci à mes hôtes italiens qui m'ont si bien accueillie lors de mon séjour dans leur petit coin de pays à Aviano, Federico Polo, Maria Domenica Alvau, Ottavia Bellotto et Stefano Tartaggia.

Merci à mes collègues et ami.e.s que j'ai découverts avec le projet BiosensUM, Godefroy Borduas, Elizabeth Elder, Frédéric Fournelle, Jean-Antoine Gauthier Cyr, Laurianne Gravel Tatta, Zoubaire Moustaine, Antoine Nkaye, Abdelhakim Qbaich, Madline Sauvage. On a fait une équipe de feu!

Merci aux organismes de financement qui m'ont supportée lors de la réalisation de ma maîtrise, le CRSNG, le FQRNT ainsi que la FESP de l'Université de Montréal.

Merci à mes ami.e.s de chimie que je connais depuis mon tout premier jour. Lorsque je pense à mon parcours à l'Université de Montréal, ce n'est que des moments en votre compagnie qui surgissent à ma mémoire : mes chères binômes de laboratoire, nos longues soirées d'étude, nos passages mémorables aux Jeux de Chimie (on ne se tannera jamais de se les raconter), nos belles soirées où vous finissiez tou.te.s sur mon sofa et les lendemains en classe ou en laboratoire où le manque de sommeil sautait aux yeux (et au nez). Je suis très honorée d'avoir eu le plaisir de passer toutes ces aventures en compagnie de scientifiques si prometteur.se.s! Gros câlin à Alexe ma française voyageuse préférée (Alexandra Gellé), Steph Madame la Présidente (Stéphanie Gallant), notre boloss en chef Cricri (Christophe Brais-Lachance) et mon BFF de dernière session JC (Jean-Christophe Grenier-Petel)!

Parce que, pendant ma maîtrise, je me suis lancée dans un des plus fous défis de ma vie, je tiens à remercier ma gang de cocobes de U24 avec qui j'ai eu l'honneur de pagayer aux Championnats canadiens de bateau-dragon 2017 et aux CCWC 2018 à Szeged. Merci à mes coachs qui m'ont toujours encouragée, Le Kha Pham, Hong Tong, Victor Trinh et Paul Pham et à ma buddy Julie Pham. N'oubliez jamais que vous êtes toujours plus fortes que ce que vous pensez girls!

Je dois aussi remercier ma meilleure amie depuis toujours, Kim (Kim Pinot-Fournier), qui a appris à connaître la petite Marie-Pier bien gênée et intravertie de l'époque et l'a aidé à s'ouvrir. Merci d'avoir parvenue à me faire sortir de mes livres (ou du moins un minimum). Notre amitié est à l'épreuve de tout.

Mon parcours académique a commencé bien avant mon arrivée à l'université et, depuis le tout début, mes parents, Diane Lapierre et Yvon Dinel, ont toujours été là pour me soutenir et m'aider dans ce long processus, tout comme ma chère Denise à qui je dédie cet ouvrage. Si je suis ici aujourd'hui, c'est grâce à vous. Sincères mercis avec amour. Et toi, sœur (Pascale Dinel) que dire d'autre que je t'aime d'un amour inconditionnel.

Merci à la chimie d'avoir mis sur mon chemin mon âme sœur, Minh Nguyen. Celui qui m'a toujours soutenue dans les moments plus difficiles et dans les meilleurs. Ma vie ne serait pas la même sans mon minou qui illumine mes journées et propage tout cet amour. Je t'aime.

1 Chapitre 1 : Introduction

1.1 Préambule

1.1.1 Mise en contexte

Depuis les dernières décennies, maints biocapteurs ont été développés afin d'améliorer la qualité de vie mondiale. Ces biocapteurs sont couramment employés pour réaliser le suivi de molécules cibles dans divers domaines tels l'environnement, l'industrie agroalimentaire ainsi que le milieu médical. Ces technologies sont adaptées pour maintes applications dont la détection de matériaux explosifs, de substances illégales, de produits dopants et de biomarqueurs. Parmi les cibles biologiques visées, les médicaments, les protéines et l'ADN sont notamment comptés.¹⁻³ Les biocapteurs bien connus dans notre société sont le glucomètre ainsi que le test de grossesse. Ces technologies sont facilement accessibles et compréhensibles au grand public en plus d'être rapides, portatives et précises. Ces deux exemples reflètent bien le potentiel des biocapteurs et l'importance du développement de nouveaux capteurs pour notre société.

En ce moment, la grande majorité des tests analytiques réalisés en hôpitaux demandent de nombreuses ressources tant monétaires et temporelles qu'humaines. D'imposants appareils tels des spectromètres de masse et des spectrophotomètres opérés par des spécialistes dans les laboratoires sont nécessaires pour réaliser les tests biologiques. Cela résulte en des analyses demandant plusieurs heures avant d'obtenir les résultats. Dans le milieu médical, chaque minute compte. Il est alors primordial d'améliorer les techniques existantes et d'intégrer de nouvelles méthodes plus rapides et tout aussi précises. C'est dans cette optique que les instruments de diagnostic portable (*point-of-care* – POC) dont les biocapteurs font partie sont en constant développement. Ces petits appareils portables permettent donc de réaliser les analyses directement dans la chambre du patient. Le personnel médical peut ainsi diagnostiquer une maladie ou ajuster le traitement d'un patient beaucoup plus rapidement qu'auparavant.

1.1.2 Objectifs de recherche & Approche proposée

Lors de l'administration d'un médicament à un patient, tout est calculé afin de s'assurer que le médicament fasse l'effet escompté. Cependant, l'absorption des médicaments dans l'organisme peut changer drastiquement d'un patient à l'autre rendant ainsi la tâche difficile pour les spécialistes en milieu hospitalier. Lors de l'utilisation d'un médicament, il est essentiel que la concentration de celui-ci dans l'organisme demeure dans la gamme thérapeutique afin de s'assurer du bon fonctionnement de la médication. Si la concentration sanguine devient trop élevée, d'importants effets secondaires pourront être encourus. Cette situation n'est pas désirée puisqu'elle n'améliore pas la situation du patient mais l'aggrave. À l'inverse, si la concentration est trop faible, le remède ne fera pas effet et donc ne guérira pas le patient en plus de favoriser le développement de résistances bactériennes dans le cas d'antibiotiques. Dans certains cas, tel l'antibiotique vancomycine, la gamme thérapeutique est très étroite ce qui rend ardue la réalisation du dosage adéquat. Il est alors essentiel de réaliser un suivi constant de la concentration d'antibiotique dans l'organisme du malade. Avec les techniques présentement disponibles, cela n'est pas adéquat puisque l'analyse demande des heures ce qui est beaucoup trop long pour permettre au personnel médical d'ajuster de manière appropriée le dosage du patient. Il devient alors fondamental de développer de nouvelles techniques de détection rapide, sensible et efficace pour ces molécules.

Dans le cadre des travaux présentés dans ce mémoire, la spectroscopie de résonance des plasmons de surface (SPR) fût la technique centrale pour développer de nouveaux biocapteurs opérant en mode POC. Il s'agit d'une technique utilisant le principe de champ évanescent permettant ainsi de suivre la variation de l'indice de réfraction du milieu avoisinant la surface d'analyse composée d'un film métallique de quelques nanomètres auquel le récepteur captant l'analyte est attaché. La SPR permet donc de réaliser la détection sans marquage de biomolécules et ce à de très faibles concentrations en milieu plasmique ou sanguin (limite de détection variant entre 0,1 ng/mL et 25 µg/mL selon l'analyte et l'essai utilisés).⁴ Grâce à son efficacité et son aspect portable, la SPR se démarque et s'inscrit comme une technologie de mise pour le développement de biocapteurs médicaux.

1.1.3 Plan du mémoire

Dans le présent mémoire, diverses stratégies afin de réaliser la détection d'antibiotiques sont présentées. La première partie se base sur l'utilisation du SPR portable P4-SPR développé par le groupe du Pr. Jean-François Masson et la compagnie Affinité Instruments.⁵ À l'aide de ce SPR, un biocapteur visant la détection d'antibiotiques aminoglycosides est développé utilisant un essai compétitif combiné à une technique d'accroissement du signal SPR afin d'abaisser la limite de détection des analytes. Dans la seconde section, l'adaptation du P4-SPR afin de permettre la réalisation en parallèle de SPR ainsi que d'électrochimiluminescence sur le même échantillon est présentée. Cette nouvelle technologie est confirmée à l'aide du développement d'un essai pour la détection du domaine extracellulaire de HER2 (ECD HER2) utilisant le complexe de chlorure de tris(2,2'-bipyridyl)dichlororuthénium(II) hexahydraté ($\text{Ru}(\text{bpy})_3\text{Cl}_2$) à titre de molécule électrochimiluminescente. Et, finalement, le projet BiosensUM développant un biocapteur pour l'antibiotique vancomycine est présenté. Ce chapitre s'inscrit dans la réalisation d'un projet d'équipe menant à la participation à la compétition étudiante internationale SensUs à Eindhoven aux Pays-Bas les 7 et 8 septembre 2018.

Avant la présentation de mes travaux, une introduction exhaustive vous est présentée afin d'établir les concepts de base nécessaires à la compréhension du mémoire. Elle compte notamment la présentation des cibles biologiques choisies, la théorie de la SPR et des nanoparticules d'or en plus de l'explication du concept de biocapteurs.

1.2 Cibles biologiques visées

1.2.1 Antibiotiques

1.2.1.1 Aminoglycosides

La streptomycine, de la famille des aminoglycosides, fût l'un des premiers antibiotiques développés et utilisés cliniquement afin d'effectuer le traitement à large spectre d'infections bactériennes à Gram négatif dans les années 1940. Ce fût notamment le premier médicament capable de guérir la tuberculose.⁶ La famille des antibiotiques aminoglycosides utilisés en

clinique compte plus d'une dizaine de molécules dont la néomycine, la tobramycine, la kanamycine et l'amikacine. (Figure 1) Elles sont toutes caractérisées par la présence de sucres aminés liés par une liaison glycosidique à un cyclitol dibasique et d'au minimum deux groupements aminés. C'est cette structure spécifique qui permet aux antibiotiques d'altérer la synthèse peptidique des bactéries. L'aminoglycoside se lie à la sous-unité 30S des ribosomes des cellules bactériennes et bouleverse l'élongation de la protéine en affectant le processus de traduction.^{6,7}

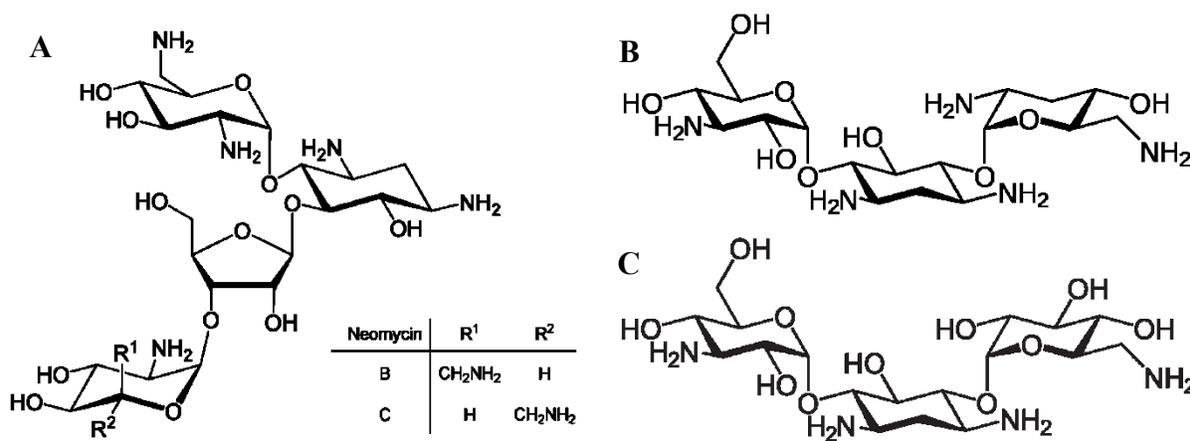


Figure 1. Famille des aminoglycosides : Néomycine (A)⁸, Tobramycine (B), Kanamycine (C)

Ces antibiotiques sont employés à des concentrations thérapeutiques maximales de 25 µg/mL. En cas de sous-utilisation, les bactéries vont acquérir de la résistance envers ces antibiotiques, ce qui représente un danger de santé publique mondiale. À l'inverse, à trop grande concentration, les aminoglycosides créent de sévères effets secondaires puisqu'ils peuvent affecter la synthèse des protéines des cellules humaines. Cela résulte en cas de néphrotoxicité, d'ototoxicité irréversible ainsi qu'une possible toxicité neuromusculaire.^{6, 7, 9, 10} Ces conséquences graves expliquent l'importance de réaliser un suivi adéquat des concentrations d'aminoglycosides chez un patient et de développer un biocapteur POC pour faciliter ce processus.

1.2.1.2 Vancomycine

La vancomycine est un glycopeptide ayant des propriétés antibactériennes. (Figure 2) Cet antibiotique a longtemps été considéré comme un antibiotique de dernier ressort puisqu'il

est un des seuls à pouvoir agir sur les infections à Gram négatif causées par des bactéries multi-résistantes telles la *Staphylococcus aureus* résistante à la méticilline (MRSA).^{11, 12} La vancomycine affecte la synthèse de la membrane cellulaire bactérienne en se liant aux peptides D-Ala-D-Ala. Ce blocage du peptidoglycane mène à l'inhibition de la réticulation de la paroi bactérienne et donc à la mortalité des bactéries.^{12, 13} Les concentrations thérapeutiques de la vancomycine se situent entre généralement 10 et 20 µg/mL. Comme c'est le cas pour les aminoglycosides, une concentration hors de cette gamme a de très importantes conséquences. Une d'entre elles est déjà visible avec l'apparition de la résistance à la vancomycine chez certaines bactéries MRSA dû à la surutilisation et l'utilisation inappropriée de cet antibiotique. La communauté mondiale s'inquiète particulièrement à cause du danger que représente cette résistance bactérienne aux antibiotiques de dernier recours.^{11, 12} Encore une fois, il est essentiel de réaliser le suivi de la vancomycine chez les patients afin de contrer ces problèmes. Pour cela, il est nécessaire de développer de nouvelles techniques innovatrices d'analyse de la vancomycine chez les patients.

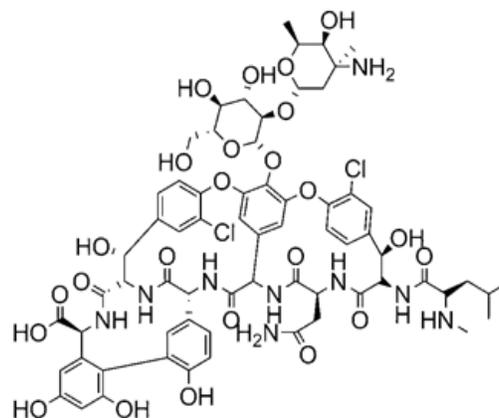


Figure 2. Structure de la vancomycine

1.2.2 Biomarqueur du cancer du sein

1.2.2.1 Domaine extracellulaire de HER2 (ECD HER2)

Le cancer du sein représente le cancer le plus fréquent chez la femme. Il est sous-divisé en quatre types se caractérisant par leurs différents biomarqueurs ainsi que par leurs traitements distincts. Il est alors essentiel de s'assurer que le diagnostic soit approprié pour traiter adéquatement la patiente. Dans près de 15% des cas, le cancer résulte de la surexpression du

récepteur de facteur de croissance épidermique HER2. (Figure 3) Cette protéine transmembranaire est composée des deux principales parties : le domaine extracellulaire (ECD HER2) ainsi que le récepteur lié à la membrane. À la suite d'un clivage par une protéase, le ECD HER2 est libéré dans les vaisseaux sanguins. La partie de la protéine HER2 restante devient près de cent fois plus cancérigène que la protéine complète précédente aidant à la propagation du cancer. Cela se reflète dans l'analyse des biomarqueurs présents pour les patientes avec des métastases puisque 45% d'entre elles surexpriment le ECD HER2 dans leur sérum. Présentement, le suivi des métastases du cancer du sein est réalisé en quantifiant l'antigène carcinoembryonnaire ou bien l'antigène 15-3 malgré le fait que ces cibles n'ont pas fait leurs preuves. Il est donc essentiel de développer de nouveaux moyens de suivi des métastases du cancer du sein. C'est alors que le ECD HER2 sanguin se dessine comme un candidat prometteur. Le ECD HER2 serait un excellent biomarqueur pour suivre la progression du cancer des patientes, la récurrence de la maladie ainsi que le traitement thérapeutique pour le sous-type du cancer du sein où le HER2 est surexprimé.¹⁴

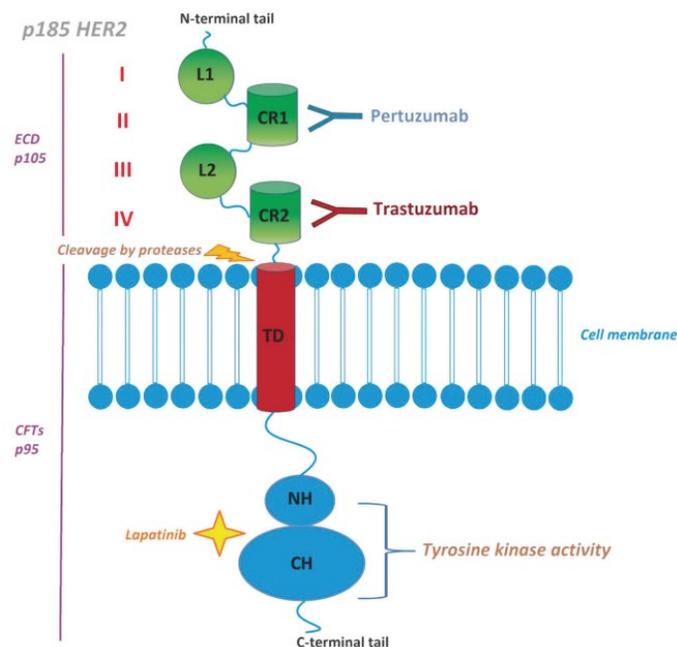


Figure 3. La protéine HER2 est composée du domaine extracellulaire (ECD), du domaine transmembranaire et du domaine de la tyrosine kinase. Les anticorps thérapeutiques soient le trastuzumab et le pertuzumab peuvent se lier au domaine extracellulaire du HER2.¹⁴

1.3 La résonance des plasmons de surface

1.3.1 Historique

Bien que les technologies résultant de la résonance des plasmons de surface soient employées couramment depuis le dernier quart de siècle, cette découverte date du début du 20^{ème} siècle. En 1902, Wood nota ce phénomène pour la première fois ; la réflexion de lumière blanche sur un réseau de diffraction recouvert d'une couche de métal menait à l'observation d'un patron de bandes lumineuses et sombres variant selon la longueur d'onde de la lumière et la polarisation.¹⁵ Cette anomalie ne pût être expliquée théoriquement qu'à la présentation de la théorie des réseaux de diffraction de Lord Rayleigh vers 1907.¹⁶ Au milieu du 20^{ème} siècle, un des principes fondamentaux de la résonance des plasmons de surface fût présenté lorsque Bohm et Pines dévoilèrent la possibilité que les électrons oscillent sur une surface telle un film métallique mince. Cette excitation des électrons de la bande de conduction expliquait ainsi les pertes d'énergie des électrons dans ces milieux.¹⁷ Ce n'est qu'en 1968 que le phénomène de la résonance des plasmons de surface ne fût complètement élucidé par Otto.¹⁸ En parallèle, Kretschmann et Raether développèrent les premiers instruments SPR où l'excitation du plasmon de surface est possible grâce à l'utilisation d'une réflexion totale atténuée du faisceau lumineux sur un prisme d'indice de réfraction supérieure à celle de l'air.¹⁹ Même après toutes ces années, la configuration de Kretschmann demeure une des techniques les plus populaires pour le développement d'une instrumentation SPR.²⁰ Ce fût d'ailleurs cette configuration qu'utilisa Liedberg pour réaliser les premiers tests de biodétection avec la technologie SPR dans les années 1980.²¹ Depuis, plusieurs appareils SPR ont été développés et commercialisés afin de rendre cette technologie disponible. Parmi ceux-ci, on compte notamment la multinationale General Electric avec ses systèmes Biacore.^{22, 23} Cette augmentation de l'accessibilité aux instruments SPR a permis d'accroître le nombre de publications utilisant la SPR et le nombre de biocapteurs SPR développés permettant ainsi à cette technologie de rayonner dans maints domaines tels l'environnement, la santé mondiale ainsi que la sécurité nationale.¹

1.3.2 Théorie de la SPR

La spectroscopie de résonance des plasmons de surface (SPR) est une technique basée sur l'excitation des plasmons de surface (*surface plasmons - SP*) par le champ électromagnétique de la lumière. Ces plasmons de surface représentent des oscillations de charges à la surface d'un métal impliquant les électrons libres de sa bande de conduction.²⁴ Leur excitation va générer des polaritons de plasmon de surface (*surface plasmon polaritons – SPP*) qui se propagent longitudinalement à l'interface métal-diélectrique (dans le plan XY). Ces SPPs possèdent un champ électrique évanescent (E_{spp}) décroissant exponentiellement en s'éloignant de la surface (dans le plan X) et permettant de sonder le milieu situé au-dessus du film métallique. (Figure 4) La SPR est ainsi sensible à la constante diélectrique du milieu (ϵ_D) adjacent le film métallique et donc à son indice de réfraction (n_D).

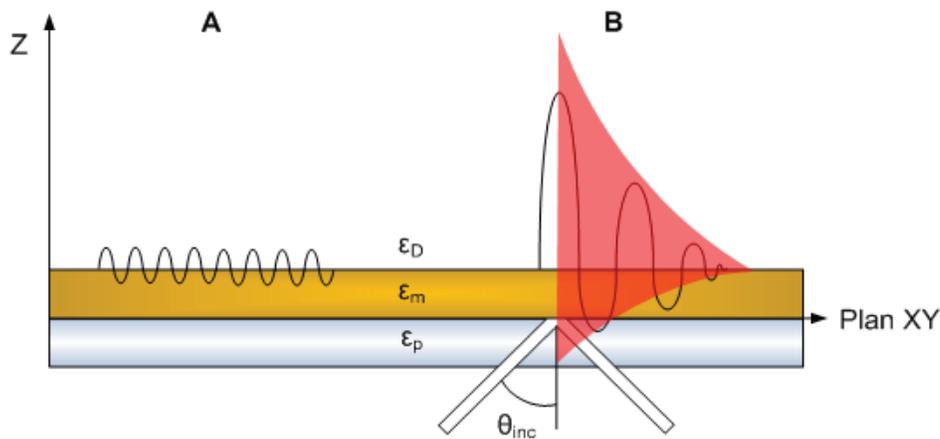


Figure 4. A) Propagation des plasmons de surface à l'interface du milieu et du film métallique, B) Champ électrique évanescent résultant de l'excitation des plasmons de surface.²⁵

Le vecteur d'onde du plasmon de surface est donc transverse magnétique (TM) ce qui signifie que son champ magnétique se déplace parallèlement au film métallique soit sur le plan XY, alors que le champ électrique du plasmon de surface se propage perpendiculairement à la surface et donc pénètre dans le milieu au-dessus du film.²⁶ L'onde des plasmons de surface (k_{spp}) respecte l'équation 1 :

$$k_{sp} = \frac{2\pi}{\lambda} \sqrt{\frac{\varepsilon_m \varepsilon_D}{\varepsilon_m + \varepsilon_D}} \quad (1)$$

Où λ est la longueur d'onde de la lumière incidente et ε_m le coefficient diélectrique du métal.

Ce sont donc les photons polarisés en p qui interagissent avec les plasmons de surface. Cependant, il faut que cette interaction respecte certaines conditions précises pour permettre aux plasmons de surface de se propager dans le milieu. En premier lieu, il est essentiel que la constante diélectrique du métal (ε_m) possède une portion réelle négative ainsi qu'une portion imaginaire positive comme le précise l'équation 2. La valeur absolue de la constante diélectrique du film métallique doit également être supérieure à la constante diélectrique du milieu. Ce sont deux propriétés que les métaux tels l'argent et l'or possèdent.

$$\varepsilon_m = \varepsilon' + i\varepsilon'' \quad \text{où} \quad \varepsilon' < 0, \quad \varepsilon'' > 0 \quad (2)$$

Où ε' représente la portion réelle et ε'' la proportion imaginaire.

Deuxièmement, la résonance entre les vecteurs d'onde de la lumière et du plasmon de surface est requise. En observant la courbe du vecteur d'onde de la lumière (k_x – équation 3) traversant un milieu comme l'air ainsi que celle de vecteur d'onde du plasmon de surface à la figure 5, il est possible de conclure que ces deux tendances ne parviendront jamais à atteindre un point commun permettant le couplage de k_x et k_{spp} puisque la valeur de k_x sera toujours supérieure à celle de k_{spp} . Il est donc impératif d'accroître le momentum du vecteur de la lumière afin de permettre sa résonance avec l'onde des plasmons de surface. Pour cela, il faut élever l'indice de réfraction du milieu où le rayon lumineux voyage ($\varepsilon = n^2$) en utilisant, par exemple, un prisme de verre BK7. Ainsi, la pente du vecteur d'onde du photon diminuera et mènera à un point commun avec l'onde des plasmons de surface permettant la résonance des vecteurs.²⁴ Le faisceau lumineux sera donc en réflexion totale interne avant d'atteindre la surface métallique où le photon sera absorbé par le plasmon de surface ainsi excité. Ce plasmon excité sonde ensuite le milieu au-dessus du film métallique sur une distance de pénétration d'environ 200 nm.²⁷ Cette distance varie selon la surface métallique employée c'est-à-dire le type de métal ainsi que ses caractéristiques telles l'épaisseur et la rugosité.

$$k_x = \frac{2\pi}{\lambda} \sqrt{\varepsilon} (\sin \theta_{inc}) \quad (3)$$

Où θ_{inc} est l'angle d'incidence.

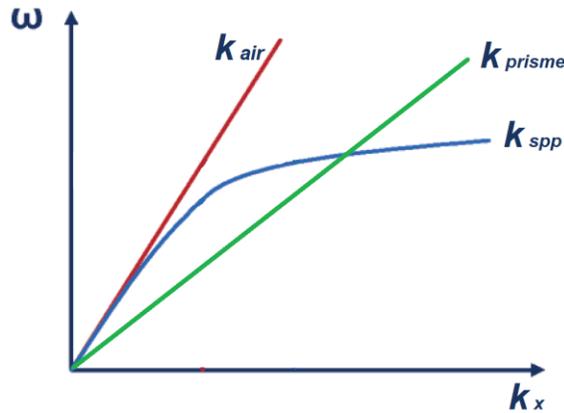


Figure 5. Schéma simplifié des vecteurs d'onde de la lumière dans l'air (k_{air}) et dans un prisme de verre (k_{prisme}) et du vecteur d'onde des plasmons de surface (k_{spp}).²⁸

Le signal SPR résultant de cette technique se dessine comme un graphique présentant la relation entre le rapport des intensités réfléchies polarisées et la longueur d'onde ou bien l'angle d'incidence selon le montage de l'instrument SPR employé. Dans la figure 6, le signal SPR typique d'un instrument à interrogation des longueurs d'onde est présenté. L'axe y représente le rapport de l'intensité lumineuse polarisée en p et de l'intensité lumineuse polarisée en s à la suite de l'interaction de la source lumineuse avec l'échantillon. Un minimum d'intensité de la lumière réfléchiée est observé lorsque les photons sont absorbés et mènent à l'excitation des plasmons de surface. La longueur d'onde de la lumière correspondant à ce minimum est spécifique à la constante diélectrique (ε_D) de l'échantillon contenu dans le milieu situé au-dessus du film métallique. Un accroissement de cette constante diélectrique découlant notamment de l'accumulation d'analyte dans la distance de pénétration cause un déplacement bathochromique du minimum (selon l'équation 1) dû à la nécessité d'un photon d'énergie plus faible pour obtenir la résonance des vecteurs d'ondes du métal et du milieu adjacent. La grande résolution du suivi des variations de la constante diélectrique du liquide sous-jacent (10^{-6} à 10^{-7} RIU) explique les basses limites de détection atteintes par cette technique (jusqu'à 10^{-12} M).²⁹

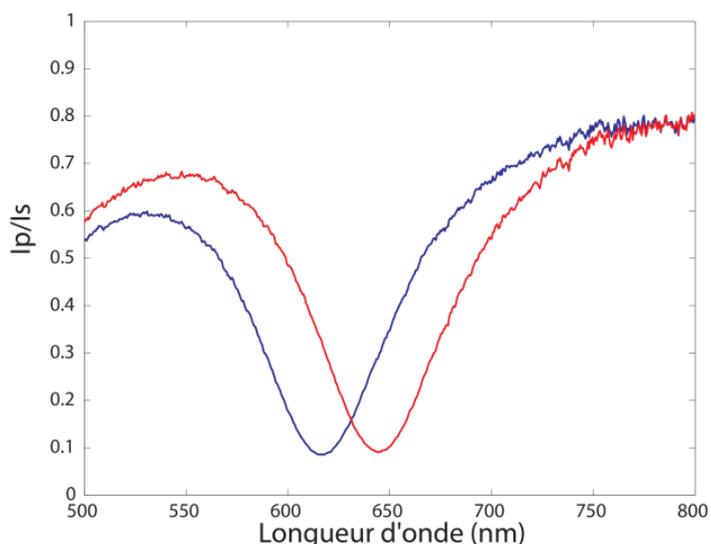


Figure 6. Signal d'absorption du plasmon de surface d'un film d'or de 50 nm adhérent par 3 nm de chrome au prisme de forme Dove dans de l'eau désionisée à 18 mΩ (courbe bleue, $n = 1,33$) et dans une solution aqueuse de sucrose (courbe rouge, $n = 1,34$) avec un instrument SPR classique (P4-SPR) possédant un angle fixe de 72,6 degrés.³⁰

Les métaux les plus communément utilisés pour réaliser de la SPR sont l'argent et l'or à cause de leur bande plasmonique présente dans le visible.³¹ Malgré le fait que l'utilisation de l'argent résulte en une meilleure résolution dû à sa bande plasmonique plus fine, l'or est le métal fréquemment employé. Contrairement à son concurrent, l'or ne subit pas d'oxydation à l'air (Ag_2O étant inactif en SPR) et réagit spontanément avec le groupement thiol afin de former les monocouches menant à son utilisation à titre de biocapteurs. L'épaisseur optimale pour former un film d'or sensible et de bonne résolution est d'environ 50 nm.³²

1.3.3 L'instrumentation SPR

Divers types d'instruments SPR existent et possèdent chacun leurs avantages et inconvénients. En se référant à l'équation 3 de la section 1.3.2 (p.10), il est important de remarquer que deux variables peuvent changer soient la longueur d'onde de la source lumineuse ou bien l'angle incident. Il est alors nécessaire de fixer l'une de ces deux valeurs afin d'analyser la variation de la seconde. Ainsi, deux types d'instruments SPR ont été développés : un instrument à longueur d'onde fixe où l'angle d'incidence est sondé (Figure 7A) ainsi qu'un

instrument à angle incident fixe permettant d'examiner la longueur d'onde des photons absorbés par les plasmons de surface (Figure 7B).

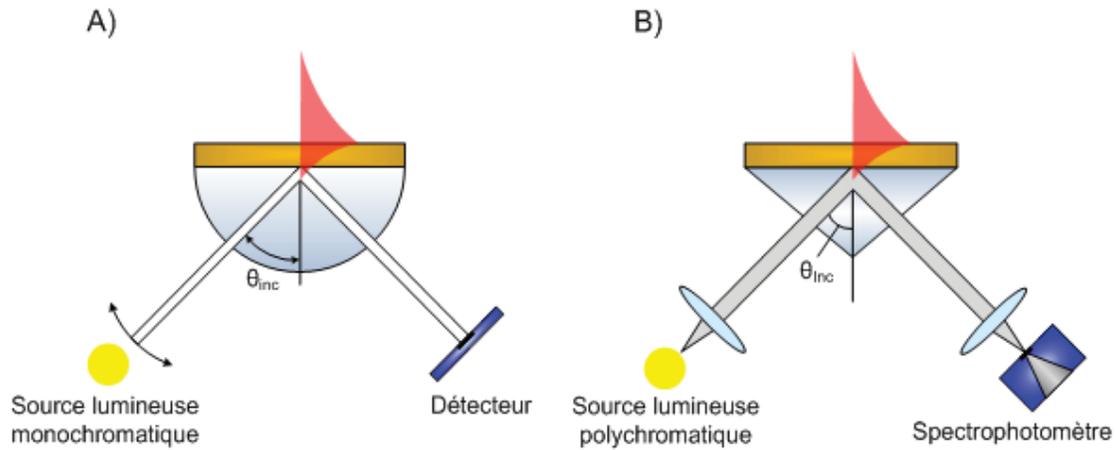


Figure 7. A) Instrument SPR à interrogation de l'angle incident. B) Instrument SPR classique de configuration Kretschmann à interrogation de la longueur d'onde.²⁵

Dans le cas d'un appareil SPR à interrogation de l'angle incident, la source lumineuse est monochromatique conservant ainsi la longueur d'onde constante et permettant d'examiner l'angle menant à l'excitation des plasmons de surface. Pour sonder les angles, il existe deux techniques. La meilleure option consiste à focaliser la source via de multiples angles sur un même point et de collecter le tout sur une barrette de diodes puisqu'il s'agit d'une technique significativement plus rapide que de la seconde qui demande à faire une rotation du faisceau incident mécaniquement. Ainsi, il est possible d'obtenir une résolution temporelle d'un peu moins d'une seconde. Également, cette technique permet d'atteindre une résolution dans le 10^{-7} unité d'indice de réfraction (RIU) lorsque le montage est optiquement aligné à la perfection.²⁹ L'instrument de General Electric, le Biacore, fonctionne justement avec cette technologie.^{22, 23}

Pour le SPR de configuration Kretschmann à interrogation de la longueur d'onde, l'angle d'incidence est fixé alors que la longueur d'onde maximale d'excitation des plasmons de surface est examinée.²⁰ Une source lumineuse polychromatique telle la lumière blanche est dirigée vers un prisme triangulaire où la réflexion totale interne se produit et dirige la lumière réfléchie vers un spectrophotomètre. La source polychromatique utilisée va induire une légère diminution de la résolution par rapport à l'instrument SPR à angle fixe passant de 10^{-7} à 10^{-6} RIU. Ce

phénomène s'explique par la dispersion spectrale de la lumière polychromatique dans le prisme causant un élargissement de la bande plasmonique. Ce désavantage peut être compensé par l'excellente résolution temporelle de cette configuration ainsi que par sa simplicité. Cet appareil peut facilement être miniaturisé.

La technologie SPR représente une technique sécuritaire et peu coûteuse afin de réaliser des analyses biomédicales dû à l'absence de sources lumineuses dangereuses telles les lasers communément employés en spectroscopie Raman ou en fluorimétrie. Cette faible intensité lumineuse est possible puisque ce facteur influence de manière négligeable la précision des mesures. La sensibilité de cette technique dépend uniquement du déplacement de la bande plasmonique et non de l'intensité des photons réfléchis.

Dans le cadre de ce mémoire, la SPR classique à angle fixe a été utilisée afin de développer un biocapteur basé sur le déplacement bathochromique de la bande plasmonique ($\Delta\lambda_{SPR}$). La configuration de Kretschmann à angle fixe a été choisie puisqu'il s'agit de l'instrument SPR favorisant au maximum l'aspect POC avec sa miniaturisation, sa portabilité ainsi que son faible coût.

L'instrument SPR utilisé, le P4-SPR, a été développé par le groupe de recherche du Pr. Jean-François Masson et est maintenant commercialisé par Affinité Instruments.⁵ (Figure 8) Cet appareil portatif est de la taille d'un mini-ordinateur portable et ne nécessite que l'alimentation par port USB de l'ordinateur principal pour fonctionner. Le prisme de forme Dove inséré à l'intérieur de l'instrument est composé d'un film d'or de 50 nm dont la déposition est consolidée avec l'ajout d'une couche adhésive de quelques nm de chrome sous celle-ci. Sur ces prismes, une monocouche auto-assemblée (*self-assembled monolayer* – SAM) avec un groupement thiol est attachée afin de permettre la liaison du récepteur du biocapteur. Une cellule fluidique composée de quatre canaux, trois canaux analytiques ainsi qu'un canal de référence, est ajoutée sur le prisme fonctionnalisé afin de réaliser les mesures avec le P4-SPR. Un volume minimal de 250 μ L est nécessaire afin de réaliser une injection dans l'appareil. Ce volume pourrait facilement être réduit en utilisant une cellule fluidique de plus petit volume ainsi qu'en réduisant le volume mort des tubes et injecteurs manuels.

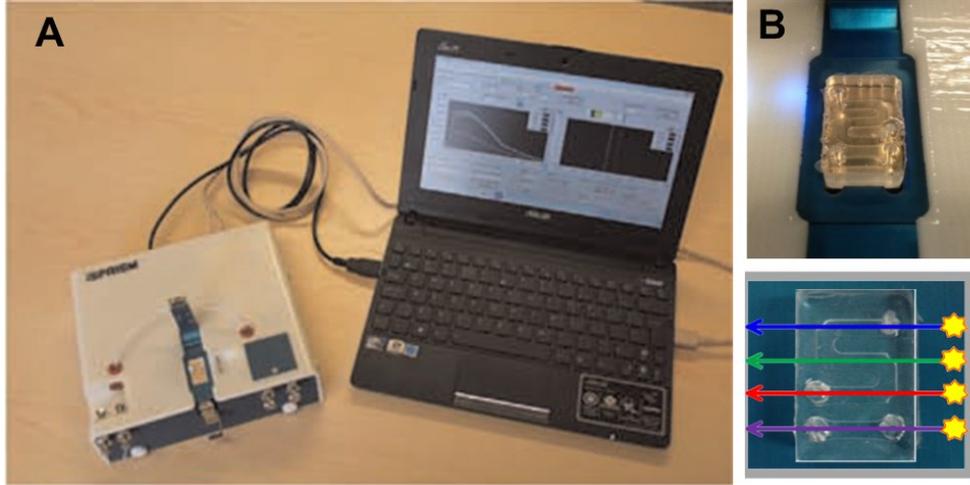


Figure 8. A) Instrument P4-SPR accompagné d'un ordinateur portable de 9 pouces étant seule alimentation nécessaire pour l'appareil SPR. B) Cellule fluïdique comportant 4 canaux dont 3 analytiques ainsi qu'un canal de référence et un prisme de forme Dove recouvert d'un nanofilm d'or.³³

1.3.4 Théorie du plasmon de surface localisé

Les plasmons de surface localisés (*localized surface plasmon resonance* - LSPR) sont supportés par un métal noble lorsque la surface disponible pour la propagation des plasmons de surface est inférieure à la distance de propagation de ceux-ci. Typiquement, ce phénomène est perceptible pour des nanoparticules (NPs) et des nanomatériaux métalliques (de taille inférieure au micromètre) dont la taille est plus petite que la longueur d'onde de la lumière visible. Ainsi, les oscillations des électrons de la bande conductrice des métaux sont produites par les photons et ce selon divers modes menant à la formation de dipôles électriques.^{34, 35} (Figure 9) Le champ électrique de la lumière entre alors en résonance avec les dipôles des nanoparticules pour certaines longueurs d'onde précises ou bien gammes de longueurs d'onde. L'absorption des photons pour une certaine longueur d'onde suit l'équation 4. Cette excitation est également indépendante de l'orientation des photons puisque la taille des NPs est inférieure à la longueur d'onde de ceux-ci.²⁴

$$E(\lambda) = \frac{24\pi^2 N a^3 \varepsilon_D^{3/2}}{\lambda \ln(10)} \left[\frac{\varepsilon''_m}{(\varepsilon'_m + \chi \varepsilon_D)^2 + (\varepsilon''_m)^2} \right] \quad (4)$$

Où E est le coefficient d'extinction des nanoparticules à une certaine longueur d'onde λ pour un nombre N de particules de taille a , ε_D est la constante diélectrique du milieu, χ est le

facteur associé à la forme des nanoparticules et ϵ'_m et ϵ''_m sont respectivement les composantes réelle et imaginaire de la constante diélectrique du métal.

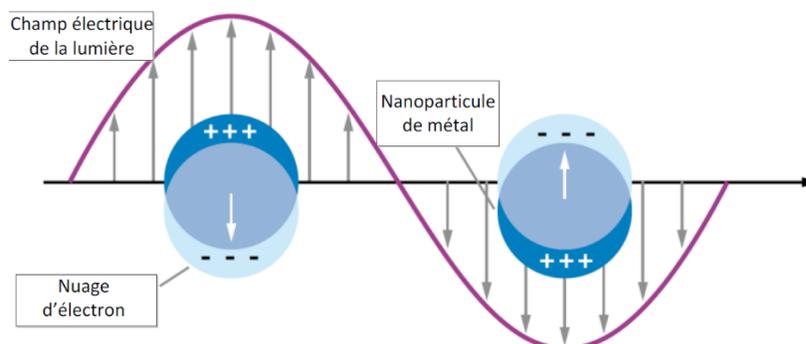


Figure 9. Schéma de l'excitation du plasmon de surface localisé par la lumière visible.^{30, 35}

Comparativement à la SPR classique, la LSPR ne nécessite pas de prismes de verre, ce qui facilite son utilisation. Les plasmons de surface localisés peuvent être supportés par des nanoparticules libres en solution ou bien immobilisées sur une surface. Le confinement du champ électrique à proximité des nanoparticules mène à une amplification du champ électrique autour des NPs, c'est-à-dire dans les 5 à 15 nm entourant celles-ci. Cette amplification de l'intensité du champ électrique permet de réaliser de manière plus sensible le suivi du déplacement de la constante diélectrique du milieu adjacent les NPs. Le couplage du phénomène LSPR avec la SPR conventionnelle permet d'accroître considérablement la sensibilité de cette technique jusqu'à plus de 1000 fois. Les longueurs d'onde auxquelles la LSPR se produit dépendent de plusieurs facteurs tels la forme, la taille et la nature des nanoparticules ainsi que leur arrangement dans l'environnement. Ces éléments vont affecter la distance de relaxation des plasmons de surface et ainsi leur longueur d'onde d'absorption et de dispersion des photons.²⁴

1.4 Nanoparticules d'or

1.4.1 Historique

L'histoire des nanoparticules a commencé près de 5 siècles avant Jésus-Christ alors que les premières techniques d'extraction de l'or ont été découvertes en Égypte. À partir de cette trouvaille, les peuples égyptiens, romains et asiatiques ont commencé à employer ce métal sous ses différentes formes dont les nanoparticules d'or à cause de leur coloration caractéristique.

Les nanoparticules d'or ont été employées pour la réalisation de verre de rubis, comme colorant pour le verre et la céramique ainsi que pour ses propriétés médicinales proférées.³⁶ Bien entendu, ses propriétés médicinales telles que présentées il y a plusieurs siècles ne sont pas approuvées actuellement par la communauté scientifique. Cependant, les nanoparticules d'or sont maintenant employées en médecine à titre de traceurs biologiques ou bien pour induire la mort de cellules cancéreuses.³⁷ L'icône de l'utilisation des nanoparticules dans l'art ancienne restera la coupe romaine de Lycurgus datant du 4^{ème} siècle après Jésus-Christ. Cette coupe est constituée de nanoparticules métalliques d'or et d'argent d'environ 60 nm lui conférant ses propriétés LSPR si caractéristiques. Lorsqu'illuminée par l'intérieur de la coupe, soit par transmission, elle possède une couleur rougeâtre, alors que, lorsque la lumière est réfléchi sur les parois extérieures de la coupe, elle est colorée d'un ton vert.³⁶

Bien que les nanoparticules fussent utilisées pendant plusieurs siècles dans le milieu artistique, ce n'est qu'en 1857 que les premières études sur le sujet apparurent. Faraday synthétisa des nanoparticules d'or par réduction du sel de chlorure d'or(III) en utilisant un système à deux phases avec du phosphore et du disulfure de carbone gazeux. Il remarqua également la dépendance existante entre la taille des NPs ainsi que leur couleur lorsqu'elles interagissent avec la lumière. C'est quelques années plus tard, soit en 1861, que Graham attribua le terme de colloïdes aux NPs.³⁶

Les nanoparticules sont des particules généralement métalliques de taille entre 1 et 100 nm. Les NPs d'or sont celles les plus stables à ce jour et possèdent une chimie de surface simple. Elles sont employées dans plusieurs domaines émergents tels les nanomatériaux et les nanotechnologies. Elles se démarquent pour le développement de biocapteurs, de microélectroniques, en microscopie ainsi que pour la détection de molécule unique.

1.4.2 Synthèse et caractérisation des nanoparticules

Diverses techniques ont été développées afin de réaliser la synthèse de NPs d'or. Uniquement les plus populaires et pertinentes à ce mémoire seront présentées ci-dessous. Toutefois, les différentes étapes de synthèse des NPs demeurent les mêmes pour toutes. En premier lieu, la nucléation se produit, suivi de la croissance des NPs et finalement de la maturation de celles-ci. C'est l'étape de la croissance qui sera déterminante pour l'obtention de

la forme finale de la NP. La cristallinité de la NP va varier selon l'adsorption spécifique de l'agent stabilisant. Ainsi, des NPs anisotropiques telles les nanotiges résulteront de l'application de forces de croissance dans une seule direction bien précise. Les NPs sont rarement composées uniquement de métal, elles sont entourées d'agents stabilisants chargés à leur surface afin d'accroître leur stabilité électrostatique et ainsi prévenir leur agrégation et leur croissance. Également, c'est cet agent qui permet de fonctionnaliser les NPs, soit d'ajouter un élément de reconnaissance biologique à leur surface afin de les utiliser notamment dans le développement de biocapteurs.

La synthèse développée par Turkevitch en 1951 pour la synthèse de nanoparticules d'or sphériques via la technique de réduction de citrate demeure une des plus utilisées encore aujourd'hui.³⁸ Les NPs chargées négativement sont produites suite à la réduction de l'or(III) en or(0) en présence de citrate. Il est possible de contrôler la taille de celles-ci en variant le ratio de citrate et de sel d'or(III) ainsi que les conditions réactionnelles. Plus la quantité de citrate est importante, plus les nanoparticules sphériques seront de petite taille. Ensuite, pour réaliser la fonctionnalisation de ces NPs, il est généralement nécessaire de faire un échange de ligands à la surface des NPs dont avec des molécules thiolées qui s'attachent facilement à la surface d'or.³⁹

Une seconde synthèse populaire est la technique par croissance de germe puisqu'elle permet un meilleur contrôle de la distribution de tailles des NPs (entre 10 et 15%). Il s'agit d'une technique nécessitant plusieurs étapes de croissance des nanoparticules qui s'avèrent plus efficace afin de réduire les risques de nucléation secondaire menant à une plus grande distribution des tailles des NPs. Ainsi, de très petites nanoparticules d'un à trois nanomètres sont synthétisées par réduction. Ces germes seront ensuite utilisés comme points de croissance lors de l'ajout de sel d'or(III) et d'agents réducteurs pour faire grossir les NPs à la taille désirée. Bien entendu, plus d'or(III) est ajouté à l'étape de croissance, plus les NPs synthétisées seront de grande taille. C'est cette technique qui est employée pour réaliser la synthèse de nanotiges.³⁹

D'autres techniques de synthèse permettent d'obtenir l'agent stabilisant désiré dès la synthèse sans avoir besoin de passer via un échange de ligands avec des NPs de citrate. La méthode de Brust-Schiffrin développée en 1994 permet notamment de synthétiser des NPs possédant un groupement thiol à sa surface. Le sel d'or(III), un agent réducteur (NaBH_4) ainsi que le thiol sont alors mélangés. Comme pour les autres techniques, le ratio Au(III) et agent

stabilisant thiolé contrôle la taille des NPs produites. Cette synthèse permet notamment le développement de NPs solubles dans des solvants organiques lorsqu'une molécule hydrophobe est liée au groupement thiol sur les NPs. Une synthèse *in situ* de NPs recouvertes d'une couche de polymères est aussi possible via la réduction du sel d'or(III).³⁹

Une fois les NPs synthétisées, il est nécessaire de réaliser leur caractérisation afin de déterminer précisément leur taille, leur forme, leur densité de charge ou bien leurs propriétés optiques. La microscopie électronique en transmission (TEM) est très populaire afin de visualiser les nanoparticules en 2D. Elle permet de déterminer la distribution de tailles observées ainsi que la forme exacte des NPs. Cependant, la TEM est une technique dispendieuse et nécessitant des spécialistes. Ainsi, des chercheurs ont développé une technique alternative peu coûteuse basée sur la spectroscopie UV-vis permettant de déduire la taille de nanoparticules sphériques ainsi que leur concentration en solution. En comparant l'absorbance de la bande plasmonique avec l'absorbance à 450 nm à l'aide des tableaux développés par le Dr. Haiss, il est possible d'obtenir ces informations.⁴⁰ La spectroscopie UV-vis permet aussi de déterminer la ou les bandes plasmoniques des NPs tout en émettant un jugement sur l'anisotropie des particules synthétisées. La diffusion de lumière dynamique (*Dynamic Light Scattering* – DLS) mesure la charge sur les NPs due aux agents stabilisants. Ainsi, il est possible de juger de la stabilité des NPs en examinant leur répulsion électrostatique. La mesure de la taille des NPs est cependant moins conseillée et surévaluée puisqu'elle tient compte de l'environnement hydrodynamique entourant la NP.

L'avantage de l'emploi des NPs vient du fait qu'elle amplifie le signal de l'analyte ligand pour diverses techniques dû à son champ électrique localisé. Parmi celles-ci, on compte la spectroscopie Raman (avec le phénomène SERS (*surface-enhanced Raman scattering* – diffusion Raman augmentée en surface)), la spectroscopie infrarouge (IR) et la fluorescence. Certaines conditions sont à respecter pour pouvoir observer ce phénomène. Notamment, dans le cas de l'IR, le moment dipolaire de la liaison active doit être aligné avec le champ électrique de la NP afin d'observer un accroissement du signal, alors que, pour la fluorescence, la distance entre la NP et l'analyte est primordiale. Si la molécule fluorescente est trop près de la NP (≤ 10 nm), elle sera éteinte à cause du transfert d'énergie non-radiatif de l'état excité vers la NP. Ainsi, afin de s'assurer d'avoir de l'accroissement du signal fluorescent, il faut que l'analyte soit au

moins à 10 nm de distance afin que l'accroissement localisé du champ électrique mène à une augmentation des probabilités de l'excitation du fluorophore.

1.4.3 Propriétés des nanoparticules

La théorie de Mie explique de manière approfondie les divers paramètres affectant les plasmons de surface localisés des nanoparticules métalliques. Dans cette section, seulement les conclusions les plus importantes et pertinentes à ce mémoire seront présentées.⁴¹ En premier lieu, la bande plasmonique des différentes nanoparticules métalliques ainsi que sa largeur dépendent de maints paramètres tels que la forme, la nature du métal noble et sa constante diélectrique, la température et l'indice de réfraction du milieu. La figure 10 démontre bien cette variation des longueurs d'onde de la bande plasmonique pour des nanosphères et nanotiges d'or de différentes tailles.⁴²

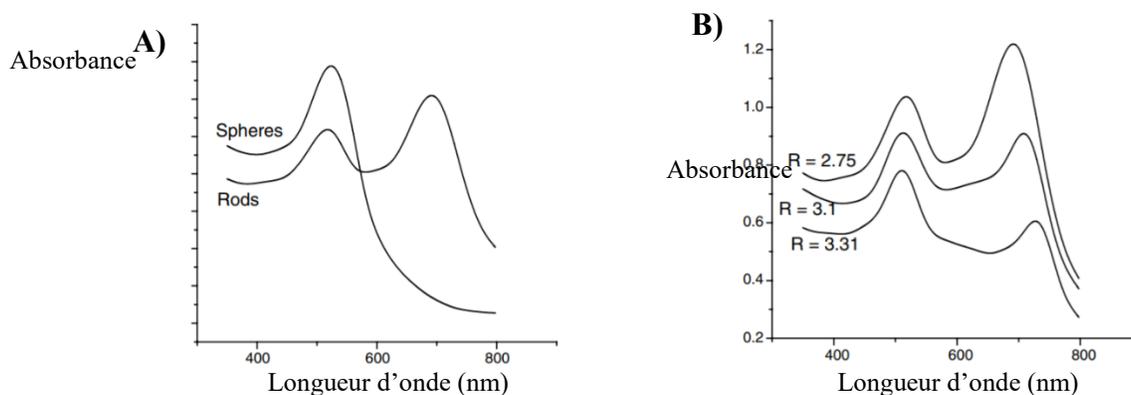


Figure 10. Effet de la forme (A) et de la taille (B) de nanoparticules d'or sur les spectres LSPR.^{42, 43}

La forme des NPs va jouer un rôle important quant au nombre de bandes plasmoniques présentes. Dès qu'il s'agit d'une particule anisotrope, il n'y aura pas qu'une bande unique. Les électrons oscillants vont avoir différentes distances à parcourir selon leurs directions menant à des modes longitudinal et transversal distincts. Également, la taille des NPs a un impact sur la bande plasmonique, comme observé dans la figure 10. Plus le diamètre est important, plus les électrons vont parcourir une longue distance et donc avoir une énergie plus faible résultant en une longueur d'onde LSPR plus élevée.⁴¹ Selon la théorie de Mie, les particules de moins de 3 nm possèdent une largeur de bande plus grande à cause des effets de taille quantique du dipôle. De plus, les nanoparticules plus petites que 2 nm n'ont pas de bande plasmonique pour cette

même raison.³⁹ La présence de ligands autour des nanoparticules affecte aussi à la hausse la taille des NPs et donc la bande plasmonique. Les propriétés électroniques des ligands influencent le milieu diélectrique et, bien entendu, l'énergie de la bande plasmonique. Par exemple, la pyridine qui est une molécule π -accepteur va diminuer la densité électronique et donc baisser l'énergie de l'oscillation des électrons résultant en un accroissement de la longueur d'onde des plasmons de surface localisés (*localized surface plasmons* – LSP).⁴¹

L'agrégation est un phénomène où des nanoparticules sont déstabilisées électrostatiquement et forment des agrégats. Ce phénomène est caractérisé par l'apparition d'une bande plasmonique vers 680 nm dû à l'accroissement de la taille des agrégats de NPs. (Figure 11) L'instabilité des NPs est possible lorsque la charge à la surface de celles-ci n'est plus assez importante pour permettre leur répulsion et qu'elles commencent à s'approcher. Une fonctionnalisation des NPs ou bien un changement du pH (affectant la protonation des agents stabilisateurs et donc leurs charges) peuvent mener à ce phénomène.³⁶ L'agrégation est une stratégie notamment utilisée pour le développement de biocapteurs LSPR.

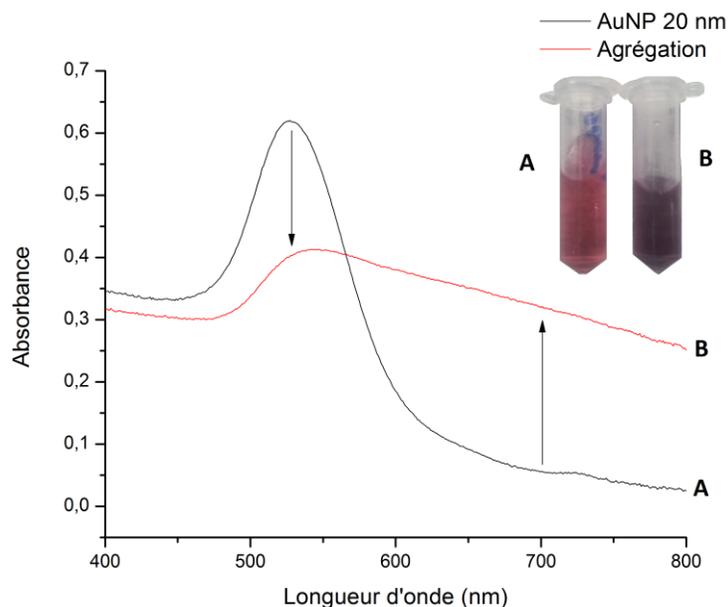


Figure 11. Spectres UV-vis représentant l'agrégation de nanoparticules d'or. Le changement de couleur du rouge au mauve est bien visible à l'œil nu.⁴⁴

1.5 Techniques bioanalytiques – Biocapteurs

Un biocapteur est un outil analytique permettant de mesurer un signal chimique ou biologique. Cet instrument repose sur la transduction du signal biochimique provenant d'une réaction spécifique en un signal détectable tel électrochimique, optique, massique ou bien thermique.⁴⁵ Des biocapteurs ont été développés pour la détection de maintes molécules biologiques comme des brins d'ADN⁴⁶, des enzymes⁴⁷, des anticorps⁴⁷, des aptamères⁴⁸, des cellules⁴⁵ et de petites molécules telles le glucose. Un biocapteur est composé de plusieurs parties. En premier lieu, le capteur doit être équipé d'un élément de reconnaissance qui pourra lier l'analyte d'intérêt. La réponse chimique résultant de la liaison entre le récepteur et l'analyte sera convertie en signal mesurable par le capteur. Le signal numérique peut alors être amplifié avant d'être collecté et analysé par un ordinateur.⁴⁵

1.5.1 Biocapteurs SPR

Typiquement, un biocapteur SPR de type classique est composé d'une monocouche auto-assemblée fixée au film métallique déposé sur le prisme et sur laquelle le récepteur est attaché. Puisque la technologie SPR ne varie que selon l'indice de réfraction du milieu et donc indirectement selon la masse déposée sur la surface métallique, l'utilisation d'un élément de reconnaissance pour permettre la détection spécifique d'un analyte est essentielle.² Il s'agit du seul moyen de différencier l'analyte des autres molécules présentes en solution. C'est ce même élément qui offre une si grande versatilité aux biocapteurs SPR. Aucun marquage n'est nécessaire permettant ainsi de réduire au minimum les risques d'altération de la structure des éléments de reconnaissance et donc la spécificité et la réactivité de ceux-ci.^{32, 49, 50} L'adsorption non-spécifique de molécules à la surface des biocapteurs peut venir causer problème. La SPR n'est pas en mesure de distinguer les molécules s'adhérant à la surface alors si des molécules indésirables s'adsorbent sur le film métallique, il ne sera pas possible de les différencier des molécules désirées. L'optimisation de la SAM devient alors un enjeu essentiel pour s'assurer de la spécificité du biocapteur et son utilisation avec des matrices biologiques complexes telles le plasma et le sang. Le choix de la monocouche appropriée dépend de la matrice du milieu puisque les interactions des molécules de la matrice avec la surface seront différentes d'une SAM à l'autre. Par exemple, dans le lysat cellulaire, les monocouches hydrophobes permettent de

réduire l'adsorption non-spécifique⁵¹ alors que, pour le sérum comportant des protéines biologiques, les chaînes peptidiques polaires ou ioniques se sont avérées les plus efficaces selon les travaux du Dr. Olivier R. Bolduc.⁵² De plus, les SAMs font le pont entre la surface métallique et l'élément de reconnaissance. La molécule composant la SAM est bifonctionnalisée ; d'un côté un groupement thiol est présent pour permettre la liaison sur la surface d'or et de l'autre un acide carboxylique permettant de réaliser la chimie nécessaire pour relier le récepteur. Deux techniques sont communément employées : le couplage peptidique impliquant une amine libre du récepteur ainsi que l'acide carboxylique de la SAM ou bien l'attache via une étiquette histidine (*his-tag*, suite libre de six histidines) sur la monocouche.^{53, 54}

Il existe quatre types d'essais biologiques pour l'instrumentation SPR.² Le cas le plus simple est l'essai direct. (Figure 12A) L'élément de reconnaissance est attaché à la surface du biocapteur alors que l'analyte vient s'y lier. Cependant, puisque la sensibilité des biocapteurs SPR dépend du changement de masse dans la zone d'interrogation des plasmons de surface, les grosses molécules de masse molaire supérieure à 10 kDa sont plus faciles à analyser par cette première technique. L'essai sandwich permet de réduire la masse des molécules détectées jusqu'à 5 kDa tout en accroissant la spécificité et la limite de détection. (Figure 12B) Les premières étapes sont les mêmes que pour l'essai direct, puis, une seconde molécule de reconnaissance est incubée. Cependant, pour pouvoir effectuer cet essai, l'analyte doit posséder plusieurs sites de liaison avec des éléments de reconnaissance différents. Deux autres stratégies existent pour les molécules de plus faibles masses molaires (< 5kDa) nécessitant une technique d'analyse plus sensible: l'essai compétitif et l'essai inhibitif. Dans le cas de l'essai compétitif, l'élément de reconnaissance se trouve à la surface du film métallique. (Figure 12C) Une compétition pour les sites de reconnaissance limités s'effectue entre l'analyte provenant de l'échantillon et un compétiteur (l'analyte ou son analogue) fixé sur une particule accroissant ainsi sa réponse SPR. Contrairement aux techniques précédentes, la relation entre la réponse et la concentration de l'analyte est inversement proportionnelle. Finalement, l'essai inhibitif nécessite une première incubation de l'analyte de concentration inconnue avec l'élément de reconnaissance. (Figure 12D) Cette solution est passée au-dessus du capteur où l'analyte ou son analogue est fixé. Les éléments de reconnaissance libres se lient alors au récepteur soit la

molécule de l'analyte du biocapteur. Ainsi, une réponse inversement proportionnelle à la concentration de l'analyte incubé est obtenue.^{2, 29}

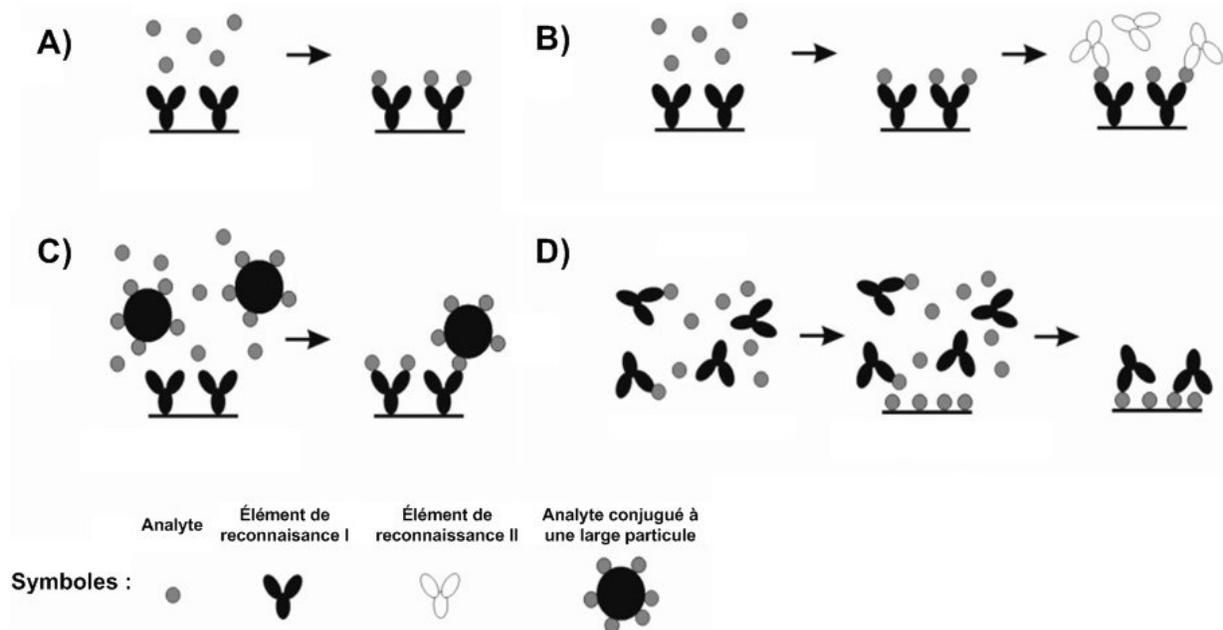


Figure 12. Méthodes de détection employées pour les biocapteurs SPR A) Essai direct, B) Essai sandwich, C) Essai compétitif, D) Essai inhibitif²⁹

Les biocapteurs SPR se démarquent sur plusieurs points dont leur sensibilité. Comme mentionné précédemment, ils possèdent une très grande versatilité du fait qu'ils ne nécessitent pas de marquage.^{32, 49, 50} Les analyses sont réalisées en temps réel et ce à l'aide d'instruments miniaturisés et à diagnostic rapide (POC).² Malgré tout, il demeure un défi de réaliser la détection de molécules à faible masse molaire dans des matrices biologiques dû à la présence d'adsorption non-spécifique et le faible changement d'indice de réfraction du milieu en présence de l'analyte. Le développement d'essais à multiples analytes s'avère aussi très complexe avec cette technique différenciant difficilement les molécules.⁵⁵

1.5.2 Biocapteurs LSPR

Les capteurs LSPR sont basés sur deux différents principes : l'agrégation colloïdale et le déplacement LSPR dû à la variation de l'indice de réfraction.⁵⁰ Les capteurs développés à partir de la technique d'agrégation des NPs sont d'origine colorimétrique c'est-à-dire qu'un changement de couleur caractéristique s'y produit. Cette altération de la couleur d'un rouge à

un bleu/mauve de la solution est même visible à l'œil nu. Ces capteurs sont très sensibles et ne nécessitent pas de marquage. Le premier exemple d'un tel biocapteur remonte à 1996 lorsque Chad A. Mirkin a réalisé la détection de simples brins d'ADN à l'aide de nanoparticules d'or.⁴⁶ Deux différentes nanoparticules étaient fonctionnalisées avec deux simples brins d'ADN non-complémentaires. Un troisième simple brin d'ADN était composé de deux sections respectivement complémentaires aux deux simples brins d'ADN présents sur les nanoparticules. L'ajout de ce tiers simple brin d'ADN apparié menait à la liaison des nanoparticules et donc à leur agrégation en solution causant le changement colorimétrique. Bien entendu, si un simple brin non-complémentaire est ajouté aux NPs, aucun changement n'était perçu. De plus, cette réaction est réversible et les NPs peuvent être resuspendues en augmentant la température.⁵⁰

Les biocapteurs LSPR basés sur le changement d'indice de réfraction sont moins sensibles que ceux découlant de l'agrégation colloïdale. Par exemple, dans le cas des nanotiges, un déplacement de 366 nm/RIU est possible alors que, pour les nanoparticules d'or sphériques, il ne s'agit que de 76,4 nm/RIU.⁵⁰ Malgré tout, cette technique permet la détection simultanée de plusieurs analytes (*multiplexing*) ainsi que la miniaturisation de l'instrument.

Étant donné la sensibilité plus accrue des biocapteurs SPR comparativement aux biocapteurs LSPR, c'est cette technique qui fût employée afin de développer un biocapteur pour les antibiotiques aminoglycosides sous la forme d'un essai compétitif présenté dans le chapitre 2.

1.6 Luminescence

Le diagramme de Jablonski explique les différents phénomènes de luminescence possibles dont la fluorescence et la phosphorescence. (Figure 13) La molécule passe de l'état fondamental S_0 vers l'état singulet S_1 ou S_2 dû à l'excitation de son électron par une source lumineuse ou bien électriquement. L'électron à haute énergie peut alors relaxer de manière radiative via la fluorescence en passant de l'état singulet à l'état fondamental en éjectant un photon très rapidement dû au respect des règles de sélection de la mécanique quantique. L'électron excité peut également passer de l'état singulet à l'état triplet par une conversion inter-systèmes. L'électron va ensuite relaxer par phosphorescence qui est un phénomène radiatif plus lent que la fluorescence et d'énergie plus faible à cause de l'inversion de spin nécessaire pour

respecter le modèle quantique. Dû aux relaxations vibrationnelles non-radiatives ainsi qu'aux conversions internes, l'énergie d'émission est inférieure à l'énergie d'excitation des photons. Cette différence d'énergie s'appelle le déplacement de Stokes.^{56,57}

Même si l'énergie fournie à l'électron est assez pour l'exciter jusqu'à l'état singulet S_2 , son émission ne sera pas nécessairement à partir de cet état. Il y a une certaine proportion des électrons qui, par conversion interne, ramènera son énergie au niveau vibrationnel 0 de l'état S_1 . Cela s'explique par le faible temps de vie d'un électron à l'état singulet S_2 qui est d'environ 10^{-12} secondes comparativement à l'état singulet S_1 qui se situe entre 10^{-5} secondes et 10^{-10} secondes. Ce court temps de vie diminue les probabilités que l'émission à partir de l'état singulet S_2 se produise.^{56,57}

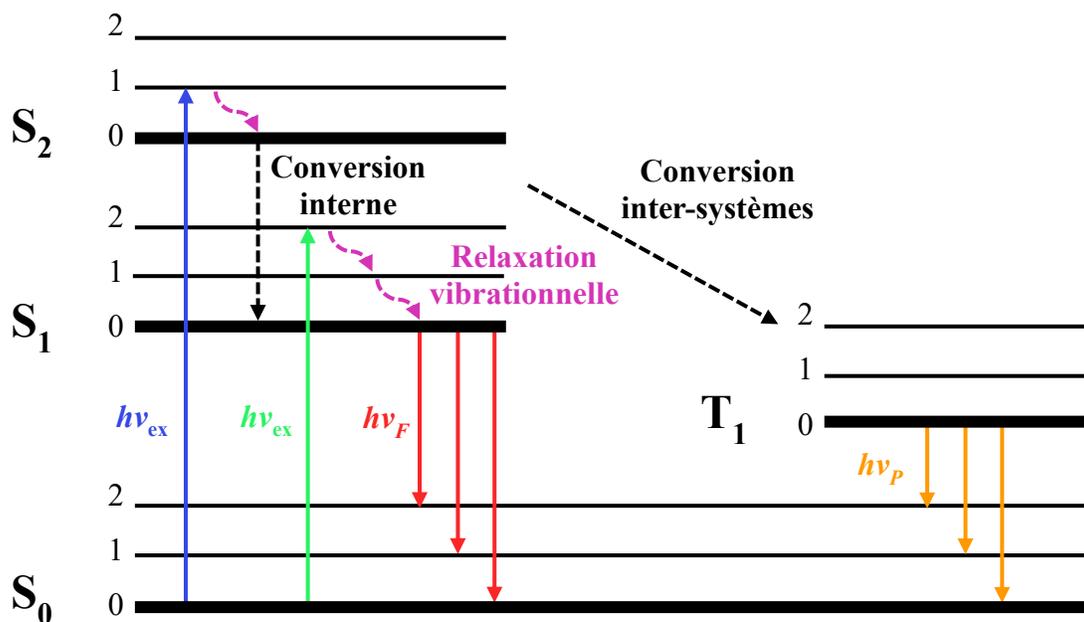


Figure 13. Le diagramme de Jablonski représentant les divers processus d'excitation et d'émission radiative et non-radiative. L'absorption d'énergie (flèches bleue et verte), la conversion interne (flèche pointillée noire), la relaxation vibrationnelle (flèche rosée), la fluorescence (flèches rouges), la conversion inter-systèmes (flèche pointillée noire) et la phosphorescence (flèches orangées) y sont notamment présentés.

1.6.1 Spectroscopie de fluorescence

La spectroscopie de fluorescence est une méthode analytique fortement employée à cause de sa grande sensibilité et de sa versatilité. Elle est utilisée comme détecteur en chromatographie, en imagerie cellulaire et biomoléculaire⁵⁸, pour la reconnaissance de molécules dans des échantillons biologiques notamment par ELISA⁵⁹ et pour le développement d'interrupteurs moléculaires.^{60, 61}

Pour qu'une molécule soit en mesure de fluorescer, elle doit respecter certaines conditions qui se reflètent dans le design de la molécule. Elle possède une grande aromaticité et conjugaison afin de rigidifier et aplanir celle-ci de manière à minimiser la dissipation d'énergie due aux vibrations. Les molécules fluorescentes possèdent des spectres d'excitation et d'émission caractéristiques à leur structure. Il est alors possible de réaliser des mesures multiples (*multiplexing*) si les fluorophores sont sélectionnés de manière à posséder des spectres d'émission ne se superposant pas.

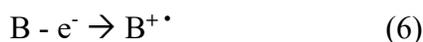
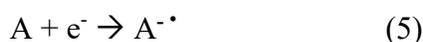
La perte de fluorescence induite par photoblanchiment est également un facteur à observer afin de s'assurer que la molécule ne perde pas de sa fluorescence après maints cycles. Cette diminution du signal résulte en une diminution de la sensibilité de la technique ce qui n'est pas désirée. Malgré tout, la spectroscopie de fluorescence demeure une technique analytique très sensible étant donné le faible signal de fond généré puisqu'uniquement une faible proportion des molécules parvient à remplir les conditions de fluorescence.

1.6.2 Électrochimiluminescence

L'électrochimiluminescence (ECL) est une technique analytique combinant les technologies de l'électrochimie et l'optique. Ainsi, une réaction électrochimique menant à un état excité va conduire à la production de luminescence lors de la relaxation radiative de la molécule excitée. L'ECL rassemble les avantages des deux techniques qui la composent. Elle possède le contrôle de l'électrochimie tant du point de vue du lieu où se produit la luminescence que son moment exact ainsi que la grande sensibilité de la luminescence. De plus, l'ECL est insensible à certains facteurs qui affectent habituellement la fluorescence. Il n'est pas nécessaire

d'avoir de source lumineuse pour cette technique et la dispersion de la luminescence est moindre ce qui permet de diminuer le signal de fond et donc d'accroître la sensibilité de la méthode.⁶²

Le complexe de Ru(bpy)₃²⁺ fût le premier exemple de molécule répondant à la technique d'électrochimiluminescence en 1972 par Tokel et Bard.⁶³ Depuis, plusieurs complexes métalliques, les nanoparticules d'oxyde de silice⁶⁴ ainsi que les points quantiques⁶⁵ se sont avérés à être des molécules électrochimiluminescentes. Celles-ci possèdent divers chemins de luminescence passant par l'annihilation d'ions ou bien le processus de co-réactifs. Dans le cas de l'annihilation, un transfert énergétique d'électrons se produit à la suite de l'oxydation et la réduction des réactifs selon le cheminement des équations 5 à 8.



Dans le cas de l'ECL avec les co-réactifs, la luminescence est générée en une seule étape de potentiel nécessitant uniquement l'oxydation ou la réduction des deux espèces. Les intermédiaires produits vont interagir avec la molécule luminescente pour l'amener à l'état excité avant qu'elle relaxe en émettant des photons. Parmi les co-réactifs les plus communs, on compte l'oxalate, la tripropylamine et le persulfate.⁶²

L'ECL est une technique très puissante employée dans plusieurs domaines tels le diagnostic clinique, la surveillance de l'industrie alimentaire, de l'eau et de l'environnement afin de suivre les biomolécules telles l'ADN, les anticorps, les antigènes, les peptides et les aptamères.^{62, 66} Divers types d'essais ECL sont couramment employés pour le développement de biocapteurs. Ceux-ci sont analogues aux essais biologiques qui ont été expliqués précédemment pour la SPR dans la section 1.5.1.^{62, 66, 67} (Figure 12)

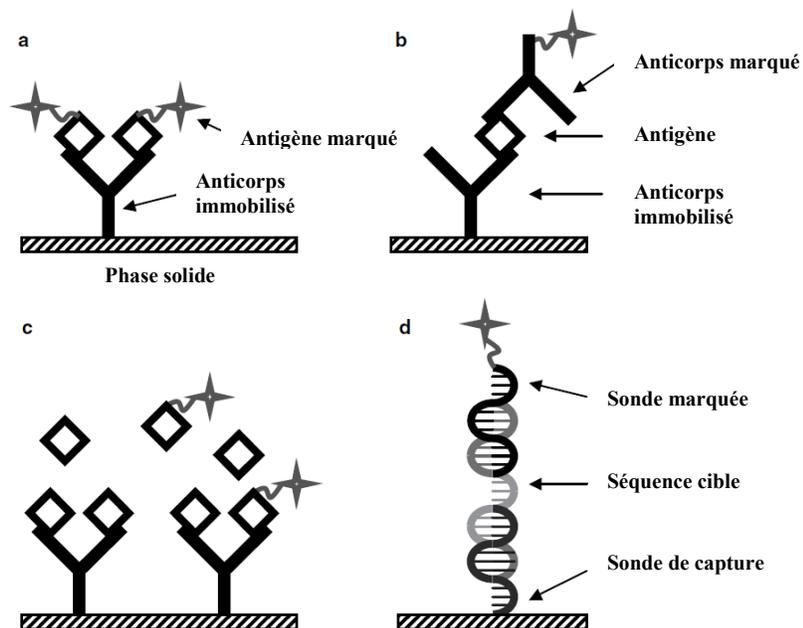


Figure 14. Méthode de détection employée pour les biocapteurs ECL. A) Essai direct, B) Essai sandwich, C) Essai compétitif, D) Biocapteur d'ADN^{62, 67}

1.7 Conclusion

Pour conclure, diverses notions essentielles à la lecture de ce mémoire ont été expliquées dans le cadre de ce chapitre. Les diverses cibles biologiques visées soient les aminoglycosides, la vancomycine ainsi que le ECD HER2 ont premièrement été présentées. L'importance de leur suivi via de nouveaux biocapteurs innovateurs a été démontrée. Les fondements des techniques analytiques employées telles la SPR, l'ECL et la fluorescence ont ensuite été élaborés. Grâce à leurs avantages respectifs, elles ont été sélectionnées pour le développement de nouveaux biocapteurs à application médicale. Les nanoparticules d'or ont également été présentées puisqu'elles possèdent des avantages plasmoniques considérables employés pour le biocapteur SPR d'aminoglycosides du chapitre 2. Finalement, les principes d'un biocapteur et ses divers essais possibles ont conclus cette présentation des notions nécessaires à la compréhension de ce mémoire.

Les trois chapitres suivants vont donc porter respectivement sur le développement d'un biocapteur SPR à base d'un essai compétitif pour les aminoglycosides (chapitre 2), sur la combinaison des technologies SPR et ECL pour réaliser le suivi du HER2 chez les patientes atteintes du cancer du sein (chapitre 3) puis sur le développement d'un biocapteur novateur pour

la détection de la vancomycine plasmique dans le cadre de la compétition internationale SensUs (chapitre 4).

2 Chapitre 2 : Essai compétitif SPR pour la détection d'aminoglycosides

Je fus la principale responsable des expériences présentées dans ce chapitre ainsi que du traitement des données. L'élaboration du principe de l'essai fut réalisée avec Pr. Jean-François Masson ainsi que Kristy S. McKeating PhD⁶⁸, qui était ma superviseuse de stage lors des quatre premiers mois de travail sur cette étude qui dura plus d'un an et demi finalement. La synthèse des analogues employés fut réalisée par Atafeh Garzan PhD du groupe de Sylvie Garneau-Tsodikova de l'Université de Kentucky aux États-Unis.⁶⁹ Le groupe du Pr. Garneau-Tsodikova nous a aussi fourni les protéines Eis exprimées dans la souche *E. coli* (BL21 (DE3)).

Comme expliqué dans la section 1.2.1.1, les aminoglycosides sont des antibiotiques qui ont de graves conséquences sur la santé des patients lorsque les doses thérapeutiques ne sont pas respectées. Ces situations peuvent résulter notamment en de l'ototoxicité ou bien de la néphrotoxicité.^{9, 10} Ces effets sérieux démontrent bien l'importance de réaliser un suivi assidu de la concentration sanguine de ces antibiotiques chez les patients. Les tests réalisés présentement dans le système hospitalier pour l'accompagnement des patients traités aux aminoglycosides sont réalisés en laboratoire et demandent une grande période de temps résultant ainsi en un suivi inadéquat. Ce chapitre porte donc sur le développement d'une technique d'analyse des aminoglycosides de type POC permettant de réaliser les tests directement dans la chambre du patient et ce plus rapidement. Ainsi, un traitement plus personnalisé sera donné au patient permettant du même coup de diminuer les effets secondaires reliés à la prise de ces antibiotiques.

2.1 Méthode expérimentale

2.1.1 Appareils utilisés

La spectroscopie par UV-vis est réalisée avec le *Cary 100 Bio UV-visible spectrophotometer* de Varian. L'appareil de DLS est le *Zetasizer Malvern instruments*. Le microscope électronique en transmission est le *Philips Tecnai 12*. Le pulvérisateur cathodique

utilisé pour la déposition des nanocouches métalliques est le *Cressington coating system 308R*. L'instrument SPR employé est le P4-SPR d’Affinité Instrument.

2.1.2 Nanoparticules

2.1.2.1 Synthèse de nanoparticules d’or sphériques

La synthèse de manière traditionnelle des nanoparticules d’or sphériques est la suivante. La verrerie utilisée est lavée avec de l’*aqua regia* pendant 20 minutes puis rincée abondamment avec de l’eau désionisée à 18,2 MΩ jusqu’à neutralisation complète. Cette première étape est essentielle pour toutes les synthèses de nanoparticules. Le sel de trihydrate de chlorure d’or(III) est dissout dans 10 mL d’eau désionisée à 18,2 MΩ puis ajouté à 500 mL d’eau désionisée à 18,2 MΩ avant d’être portée à ébullition. Ensuite, l’agent stabilisateur préalablement dissout dans 10 mL d’eau désionisée à 18,2 MΩ est ajouté. (Tableau I) La solution est conservée à ébullition pendant 15 minutes et passe du jaune, au noir puis au rouge caractéristique des nanoparticules d’or.⁶⁸

Tableau I. Synthèse des AuNP@PAA et AuNP@citrate

NP	HAuCl ₄ · 3H ₂ O	Agent stabilisateur	Quantité du stabilisateur
AuNP@citrate 20 nm	50 mg	Citrate de sodium dihydraté	75 mg
AuNP@PAA 38 nm	50 mg	Poly(allylamine) 10% wt	400 µL
AuNP@citrate 5 nm	50 mg	Citrate de sodium dihydraté	150 mg

Dans le cas de nanoparticules d’or magnétiques, il est nécessaire d’utiliser une synthèse passant par la croissance d’un cœur magnétique puis de le recouvrir d’une couche d’or. Une

solution de NaOH 1,5 M (250 mL) est chauffée à 50°C et une solution de chlorure de fer(II) tétrahydraté 0,4 M, de chlorure de fer(III) hexahydraté 0,8 M et d'acide chlorhydrique 0,4 M y est ajoutée goutte à goutte. Le mélange est chauffé 20 minutes avant d'être refroidi à température ambiante. Les nanoparticules sont lavées à l'eau et au HNO₃ 0,1M avant d'être chauffées dans une solution de HNO₃ 0,1M (125 mL) à 90°C pendant 40 minutes. Une fois refroidis, les cœurs magnétiques sont lavés à trois reprises avec de l'eau puis conservés dans de l'eau désionisée à 18,2 MΩ (500 mL). Pour recouvrir les nanoparticules d'oxyde de fer avec une nanocouche d'or, il faut mélanger le sel d'or (HAuCl₄ 5 mM, 5 mL) avec le glucose (2,5 g) et avec la solution préparée précédemment de Fe₂O₃ et soniquer le mélange pendant 30 minutes pour s'assurer que la solution est bien homogène. Elle est ensuite chauffée pendant deux heures à 60°C puis lavée et resuspendue dans de l'eau (5 mL) une fois refroidie.⁷⁰

La synthèse de nanoparticules d'or de L-cystéine esterméthylée a été réalisée par la technique de multiples croissances de germes.⁷¹ Des nanoparticules de moins de 2 nm de diamètre sont synthétisées puis grossies par de multiples étapes de croissance des NPs. Le sel d'or(III) (0,5 mM, 77 mL) et la L-cystéine esterméthylée (144 mM, 750 μL) sont mélangés avant que le NaBH₄ (144 mM, 270 μL) froid soit rapidement ajouté faisant passer la solution d'un jaune pâle à un brun foncé. Les nanoparticules formées doivent être utilisées dans l'heure suivante. La prochaine étape consiste à la croissance des nanoparticules et peut être réalisée successivement à plusieurs reprises. Aux nanoparticules précédentes, du sel de chlorure d'or(III) (0,5 mM, 50 mL), de la L-cystéine esterméthylée (51,6 mM, 490 μL) et de l'hydroxylamine (115,8 mM, 330 μL) sont ajoutés et mélangés pendant une nuit complète faisant passer la solution de brun à rouge.

2.1.2.2 Synthèse de nanotiges d'or

Tout comme les nanoparticules précédentes, la croissance des nanotiges d'or passe par un processus de croissances multiples à partir de germes. Une solution homogène incolore de bromure d'hexadécyltriméthylammonium (CTAB) (0,2 M, 125 mL) est préparée dans un bain-marie à 30°C. La synthèse des nanoparticules commence avec l'ajout de HAuCl₄ (0,5 mM, 5 mL) à 5 mL de solution de CTAB formant une solution jaune intense. L'addition de NaBH₄ froid (10 mM, 600 μL) fait passer le mélange de jaune à brun orangé. Ensuite, la croissance

anisotropique des nanoparticules d'or est réalisée. Du AgNO_3 (4 mM, 1,5 mL) et du CTAB (0,2M, 50 mL) sont mélangés avant l'ajout de HAuCl_4 (1 mM, 50 mL) suivi de l'acide ascorbique (0,4 mM, 700 μL) formant une solution incolore. Finalement, les nanoparticules (120 μL) précédemment formées sont ajoutées à la solution et agitées toute la nuit à 30°C menant à la formation des nanotiges d'un rouge bourgogne. Avant leur utilisation, les nanoparticules doivent être lavées avec de l'eau afin d'éliminer le CTAB en excès en solution.

2.1.2.3 Synthèse de nanoparticules d'or quasi-sphériques

De petites nanoparticules d'or entourées de citrate (AuNP@citrate 5 nm) sont préparées selon la technique présentée dans la section 2.1.2.1. Elles passent ensuite à travers trois synthèses de croissance afin de former des nanoparticules quasi-sphériques. La première étape consiste au mélange des nanoparticules d'or préalablement préparées (100 μL), de NaOH (100 mM, 5 μL), de sel de chlorure d'or (10 mM, 25 μL), d'acide ascorbique (100 mM, 5 μL) et de CTAB saturé (900 μL) dans un bain-marie à 30°C. La même étape de croissance est répétée à deux reprises avec le mélange précédemment obtenu (2^{ème} croissance : identique à la première ; 3^{ème} croissance : tous les volumes sont multipliés par un facteur de 10). Les nanoparticules sont conservées deux heures dans le bain-marie avant d'être lavées à deux reprises avec de l'eau.

2.1.2.4 Fonctionnalisation des nanoparticules d'or avec les analogues

L'acide 16-mercaptohexadécanoïque (MHA) (1,00 g, 3,47 mmol, 1,0 Éq.) est dissout dans 20 mL de 1,4-dioxane. Le N_α - N_α -dicyclohexylcarbodiimide (0,77 g, 3,7 mmol, 1,1 Éq.) et le N -hydroxysuccinimide (NHS) (0,40 g, 3,5 mmol, 1,0 Éq.) sont ajoutés au mélange de dioxane et mélangés à température ambiante pendant 4 heures. Le dicyclohexylurée solide est éliminé par filtration par gravité et le filtrat possédant le produit de la réaction est conservé, évaporé puis solubilisé dans le diméthylformamide à une concentration de 1 mM. Un mélange 1 : 1 NHS-MHA (1 mM) : Analogue **2** (1 mM) est agité pendant une nuit à température ambiante. Cette solution (90 μL) est ajoutée avec des AuNPs (910 μL) et agitée pendant une nuit à température ambiante. La solution de NPs est centrifugée (6 000 rpm, 10 min) puis resuspendue dans le solvant désiré.

2.1.2.5 Fonctionnalisation des nanobilles d'oxyde de silice avec les analogues

Des billes de 200 nm de diamètre d'oxyde de silice fonctionnalisées avec des acides carboxyliques terminaux sont employées. Elles sont activées (920 μL à des concentrations entre 0,00545 mg/mL à 5,45 mg/mL) avec l'ajout d'un mélange de EDC (2 mg/mL, 10 μL) et de NHS (2 mg/mL, 25 μL) pendant une heure. Les analogues **2** (1 mM, 45 μL) portant une amine primaire sont ensuite ajoutées à la solution agitée toute la nuit. Les nanobilles fonctionnalisées sont finalement lavées avec une solution aqueuse.

2.1.2.6 Caractérisation des NPs

Les NPs sont caractérisées à l'aide de diverses techniques analytiques soient la spectroscopie UV-vis, la DLS et la TEM. Dans le cas de la spectroscopie UV-vis, une gamme de 400 nm à 800 nm est employée ce qui permet l'utilisation de cuvettes de plastique. Pour la DLS, les mesures sont réalisées à 25°C en mode *Zeta* pour la prise du potentiel zêta, la mobilité et la conductivité et en mode *Size* pour déterminer le diamètre dynamique des nanoparticules. L'appareil de TEM employé, le *FEI Tecnai 12*, est équipé d'une caméra XR280 avec un temps d'exposition de 1 200 ms et utilisé à un potentiel de 80 kV.

2.1.2.7 Test d'agrégation des NPs

Le suivi de la bande plasmonique est réalisé par spectroscopie UV-vis pour des solutions de nanoparticules dans un certain tampon et en présence d'aminoglycosides. L'antibiotique employé est la tobramycine ou bien la néomycine à des concentrations de 150 μM . L'accroissement de l'absorbance à 680 nm caractéristique de l'agrégation des nanoparticules est examiné et comparé à l'absorbance au maximum de la bande plasmonique afin de juger de la stabilité des nanoparticules ($A_{\lambda_{\text{max}}}/A_{680 \text{ nm}}$).

2.1.3 Essai SPR

2.1.3.1 Prisme d'or

Les prismes de forme Dove de 20 mm x 12 mm sont lavés avec une solution piranha pendant une heure avant d'être rincés à l'eau désionisée à 18,2 M Ω puis entreposés dans l'éthanol. Pour la déposition, les prismes sont séchés puis mis sous vide dans le pulvérisateur

cathodique. Une couche adhésive de 1 nm de chrome suivi de 50 nm d'or, plasmoniquement actif, sont déposés sur les prismes.

2.1.3.2 SAMs

Sur un prisme d'or, une solution de 1 mg/mL de peptide thiolé 3-MPA-LHDLHD-OH synthétisé par Alexandra Aubé⁷² dans du *N,N*-diméthylformamide est appliquée pendant une nuit à l'abris de la lumière. Les prismes sont ensuite lavés à l'eau désionisée à 18,2 MΩ puis à l'éthanol avant d'être séchés et conservés jusqu'à 3 mois dans le noir.

2.1.3.3 Essai compétitif SPR

Le prisme d'or fonctionnalisé avec la monocouche peptidique est inséré dans l'appareil P4-SPR. Une chambre fluïdique de PDMS comportant trois canaux d'analyse (essai compétitif avec antibiotique) et un canal de référence (essai compétitif sans aminoglycoside) est ajoutée au-dessus du prisme avant que le socle ne soit fermé afin de permettre une étanchéité du tout et prohiber les fuites pouvant perturber les analyses SPR. Avant le début des analyses, la monocouche est réhydratée avec de l'eau désionisée à 18,2 MΩ et l'instrument stabilisé. Afin de réaliser la liaison du récepteur au biocapteur, une solution d'hydrochlorure de *N*-(3-diméthylaminopropyl)-*N'*-éthylcarbodiimide (EDC) (39 mg/mL, 200 mM) et de NHS (14 mg/mL, 122 mM) est injectée dans l'instrument SPR afin d'activer la surface et maintenue pendant 5 minutes. Après un lavage de PBS 1X, la protéine Eis (100 μM) dans du PBS @ pH 4,5 est liée à la surface par un couplage peptidique pendant 15 minutes. Les sites activés où le récepteur ne s'est pas lié sont inactivés à l'aide d'éthanolamine 1M à pH 8,5 pendant 10 minutes. L'essai compétitif peut alors être fait puisque le biocapteur est prêt. Ainsi, dans les trois canaux analytiques, un mélange de NPs fonctionnalisées avec les analogues **2** avec l'aminoglycoside (150 μM) dans le tampon choisi est ajouté, alors que, dans le canal de référence, uniquement les NPs sont injectées. Les interactions avec la protéine Eis à la surface du biocapteur de ces mélanges sont analysées pendant 30 minutes avant que la surface soit lavée. Les déplacements des bandes plasmoniques des compétiteurs sont ensuite analysés.

2.2 Design de l'essai biologique compétitif

Étant donné que la tobramycine ne démontre quasi aucun déplacement de la bande plasmonique en solution tampon et puisque les aminoglycosides sont de petites molécules généralement de moins de 1 kDa, il est essentiel d'utiliser une technique d'accroissement du signal afin de pouvoir distinguer ces antibiotiques dans des matrices complexes comportant plus d'adsorption non-spécifique qu'en solution tampon.. Étant donné la faible masse molaire des analytes dans cette expérience par rapport à la sensibilité de la méthode, la technique de l'essai compétitif fut choisie afin de réaliser la quantification des aminoglycosides en matrices biologiques. (Figure 15A) Ainsi, un analogue des analytes est attaché à une nanoparticule d'or afin d'accroître significativement le signal SPR par effet de masse et de couplage plasmonique lorsque lié au récepteur. Une compétition entre la liaison de l'analyte de faible masse molaire ainsi que celle de l'analogue amplifié à la protéine Eis (*enhanced intracellular survival*) sur la surface métallique permet de quantifier les aminoglycosides grâce à la différence du signal plasmonique des deux molécules. Cette technique résulte en une courbe où la concentration d'antibiotiques est inversement proportionnelle à la réponse du biocapteur. Ainsi, à faible concentration d'aminoglycosides, le signal obtenu est important puisqu'il résulte majoritairement de la réponse plasmonique de l'analogue attaché à la nanoparticule d'or. Inversement, à haute concentration d'antibiotiques, la réponse du biocapteur résultera principalement de la liaison des analytes menant à un faible déplacement plasmonique. (Figure 15B)

Pour que cette technologie fonctionne, il est nécessaire de travailler avec un analogue d'aminoglycoside (compétiteur) ainsi qu'un récepteur adéquats. Pour l'élément de reconnaissance, la protéine Eis isolée à partir de la bactérie *E. coli* (BL21 (DE3)) qui la surexprime a été utilisée. La protection conférée aux bactéries par Eis résulte d'une régulation à la hausse provenant d'une mutation de l'information génétique des cellules bactériennes afin de répondre à l'attaque constante des aminoglycosides.⁷³ L'enzyme Eis se nomme aussi acétyltransférase d'aminoglycoside puisque cela reflète parfaitement bien sa fonction principale qui est de multiacétyler les aminoglycosides afin d'éliminer leur activité antibactérienne et donc de permettre aux bactéries de survivre.⁷⁴ Ainsi, les bactéries ont développé une résistance bactérienne aux aminoglycosides.

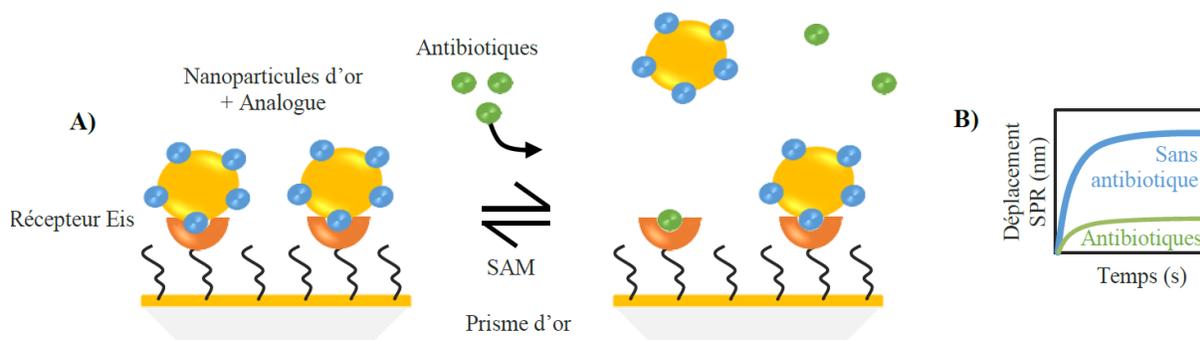


Figure 15. A) Schéma de l'essai compétitif entre les aminoglycosides et leurs analogues fonctionnalisés sur des nanoparticules d'or pour la liaison à la protéine EIS sur la surface du prisme d'or. B) Schéma de la réponse attendue lors de l'essai compétitif ; important signal SPR en absence d'antibiotiques (courbe bleue) et faible déplacement de la bande plasmonique en présence d'amynoglycosides (courbe verte).

Par exemple, une fois que la kanamycine est acétylée, elle n'est plus en mesure de se lier à la sous-unité 30S du ribosome, altérant complètement son activité antimicrobienne.^{73, 75} Une des stratégies afin de contourner cette résistance consiste à développer des molécules permettant de réaliser l'inhibition de l'acétylation des aminoglycosides.⁶⁹ Plusieurs types d'inhibiteurs ont déjà fait leurs preuves quant à leur efficacité à réduire l'activité des protéines EIS. Parmi ceux-ci, on compte le 1,2,4-triazino[5,6*b*]indole-3-thioether⁷⁶, les centres hétérocycliques de l'isothiazole S,S-dioxyde⁷⁷, les molécules à base de sulfonamide⁷⁸, le méthyle 4H-furo-[3,2*b*]-pyrrole-5-carboxylate⁷⁹ et le 3-(1,3-dioxolano)-2-indolinone⁷⁹. Ces inhibiteurs représentent d'excellents candidats pour agir à titre de compétiteur pour le biocapteur d'antibiotiques en développement.

Pour cette étude, ce sont les molécules à base de pyrrolo-[1,5-*a*]pyrazine qui ont été sélectionnées dû à leur excellente efficacité et au fait qu'elles se lient au même site de liaison que les aminoglycosides. Elles ont été synthétisées et analysées par Atafeh Garzan du groupe du Pr. Garneau-Tsodikova.⁶⁹ (Figure 16) Par exemple, ces molécules possédant des concentrations inhibitrices médianes d'aussi peu que $0.064 \pm 0.008 \mu\text{M}$ ont permis de rétablir l'efficacité de la kanamycine contre les bactéries.⁶⁹ Le site de liaison de cette famille d'inhibiteurs a été identifié comme étant le même que celui où les aminoglycosides s'attachent à l'enzyme EIS tout comme pour les inhibiteurs de type isothiazole S,S-dioxyde.^{69, 77} L'analyse de la comparaison entre la présence de la tobramycine et d'une molécule de la famille des

pyrrolo-[1,5-*a*]pyrazine dans la cavité de l'Eis en présence de sa coenzyme A permet une compréhension complète des forces permettant leur liaison. (Figures 17 et 18) L'attraction électrostatique entre le corps pyrrolo-[1,5-*a*]pyrazine chargé positivement et la charge négative du site de liaison des aminoglycosides dans la cavité du Eis s'avère essentielle à la liaison de l'inhibiteur à la protéine, alors que, le groupement phényl situé à l'opposé de ce corps chargé vient accroître les interactions hydrophobes avec le site de liaison. Il est aussi important de remarquer les multiples interactions π - π participant à l'attachement de ces molécules à l'Eis.⁶⁹ Ainsi, la protéine Eis choisie à titre de récepteur moléculaire est en mesure de lier les différents aminoglycosides examinés dans ce chapitre ainsi que les analogues possédant la base de pyrrolo-[1,5-*a*]pyrazine.

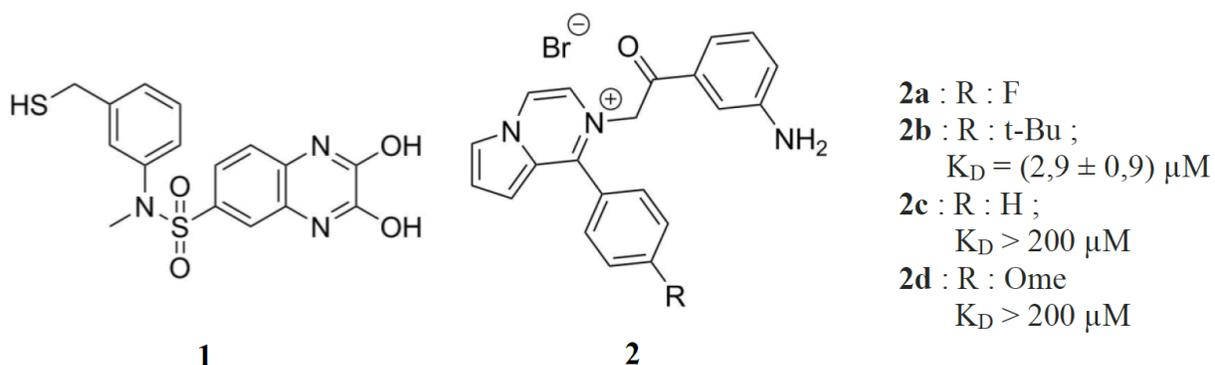


Figure 16. Analogues composés de la base pyrrolo-[1,5-*a*]pyrazine dont la molécule **1** qui porte un thiol et les molécules **2a-d** qui comptent une amine primaire.

Cependant, puisque les interactions entre des molécules peuvent être affectées par l'attachement à une surface versus lorsqu'elles sont en solution, il est nécessaire de vérifier l'activité de la protéine Eis liée à la monocouche auto-assemblée du film d'or. Pour ces tests, les différents analogues synthétisés ainsi que certains antibiotiques ont été examinés par essai direct en SPR. Les résultats du tableau II démontrent que la protéine Eis est bel et bien active même lorsqu'attachée à la surface par couplage peptidique. Des déplacements de la bande plasmonique SPR de plus de 1 nm sont excellents pour des molécules avec de si faibles masses molaires (environ 0,5 kDa).

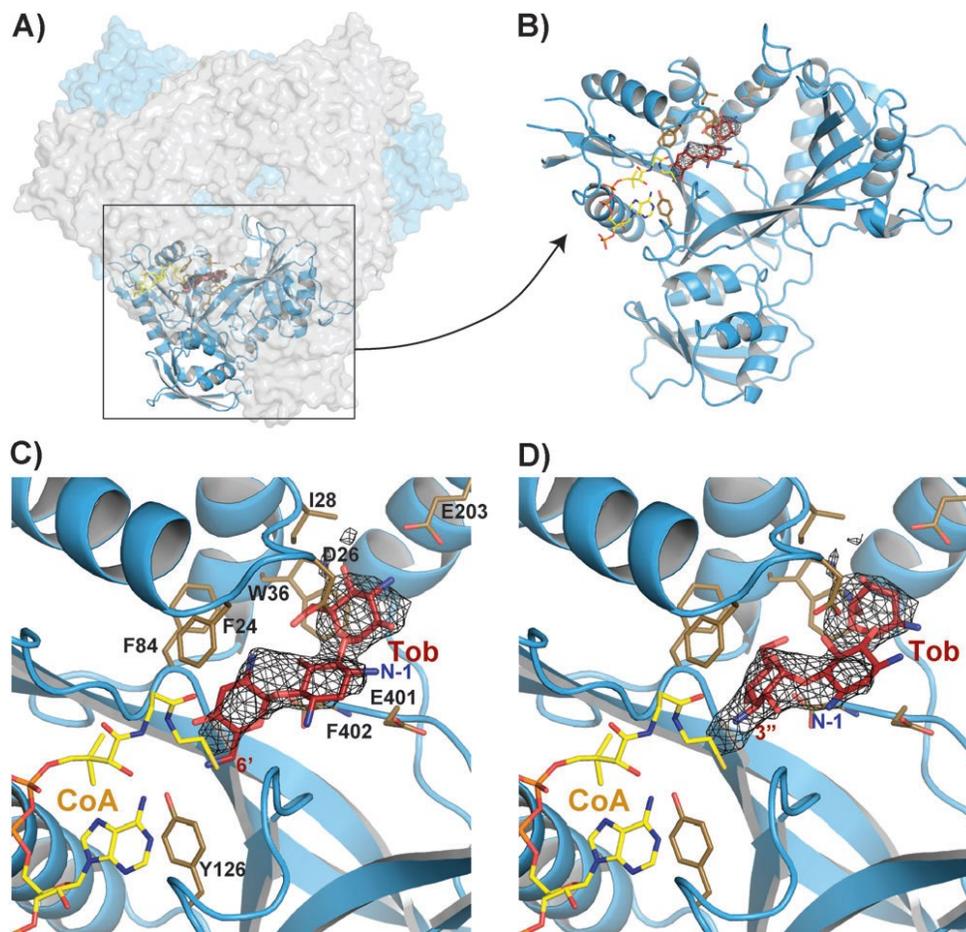


Figure 17. Structure cristalline du complexe de la protéine Eis (EisC204A), la coenzyme A et la tobramycine. A) Hexamère de Eis où un des monomères (en bleu) liant la tobramycine est en représentation de type ruban, B) Vue de haut du monomère possédant le site actif du Eis liant la tobramycine en représentation de type ruban, C) Vue de haut de la conformation menant à l'acétylation en position 6' de la tobramycine, D) Vue de haut de la conformation menant à l'acétylation en position 3'' de la tobramycine.⁷⁵

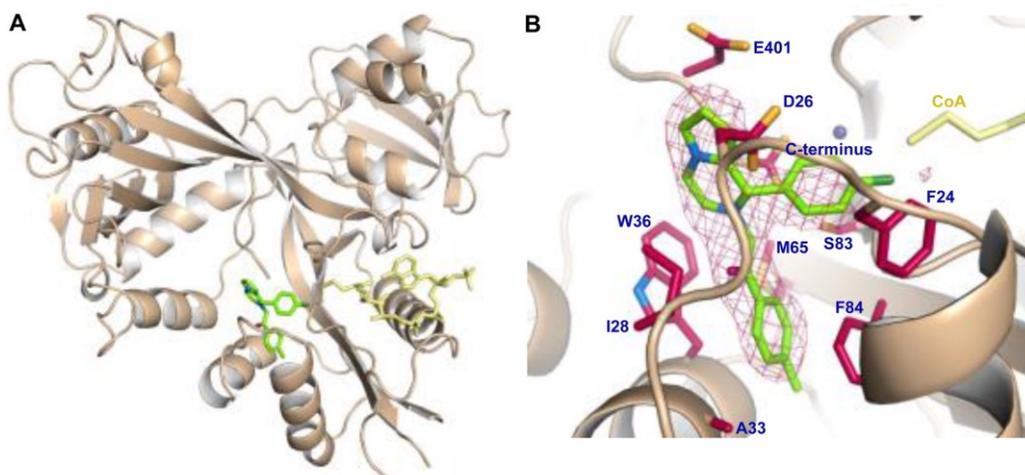


Figure 18. A) Structure cristalline du complexe entre un monomère de la protéine Eis (EisC204A), la coenzyme A et la molécule à base de pyrrolo-[1,5-*a*]pyrazine, B) Vue du site actif où la molécule de pyrrolo-[1,5-*a*]pyrazine est liée à la protéine Eis.⁶⁹

Tableau II. Déplacement de la bande plasmonique SPR par essai direct des divers analogues d'aminoglycosides ainsi que de la tobramycine et la néomycine à une concentration de 150 μ M dans un tampon d'acétate de sodium 10 mM à pH 4 lors de leur interaction avec la protéine Eis.

Molécule	Déplacement plasmonique
2a	(2,2 \pm 0,1) nm
2b	(1,3 \pm 0,1) nm
2c	(1,2 \pm 0,2) nm
2d	(0,78 \pm 0,02) nm
Tobramycine	(0,45 \pm 0,06) nm
Néomycine	(0,10 \pm 0,07) nm

2.3 Nanoparticules d'or

Afin que ce type de biocapteur soit efficace, il est essentiel que la distinction entre la présence de l'analyte antibiotique et la liaison du compétiteur soit possible. Pour cela, il faut développer un compétiteur efficace qui parvient à accroître significativement le signal SPR pour obtenir une meilleure sensibilité. Ainsi la prochaine section portera sur le développement et l'amélioration de maintes nanoparticules afin d'identifier le compétiteur optimal.

2.3.1 Fonctionnalisation des nanoparticules avec les analogues

Pour développer les différents compétiteurs, il n'est pas seulement nécessaire de synthétiser des nanoparticules mais il faut également lier les analogues d'aminoglycosides à celles-ci. Heureusement, la chimie de surface des nanoparticules d'or est plus accessible et rapide que plusieurs autres métaux. Par exemple, le groupement thiol s'attache spontanément à la surface des nanoparticules en délogeant les agents stabilisants. Ce principe d'échange de ligands permet alors d'attacher à l'aide de peu d'étapes de synthèse les analogues d'aminoglycosides aux nanoparticules. Dans le cas de l'analogue **1**, la molécule comporte un groupement thiol permettant de tout simplement l'ajouter à une solution de nanoparticules afin que celle-ci se lie à leur surface instantanément. Pour les analogues **2**, la fonctionnalisation sur leur support nécessite quelques étapes préliminaires supplémentaires. Afin de permettre leur attachement, il est nécessaire de synthétiser un ligand comportant un groupement thiolé. La figure 19 présente la stratégie utilisée pour atteindre cet objectif. Un couplage peptidique entre l'amine primaire des analogues **2** ainsi que l'acide carboxylique terminal du ligand thiolé a été choisi. Une fois mis en solution avec ce nouvel analogue thiolé, les nanoparticules sont fonctionnalisées et prêtes à être employées comme compétiteur pour le biocapteur.

Afin de s'assurer que les nanoparticules ont bel et bien été fonctionnalisées avec les différents analogues, il est nécessaire de réaliser des études spectroscopiques. Ainsi, en comparant la bande plasmonique des nanoparticules-analogues avec celle des nanoparticules non fonctionnalisées, il est possible de juger de l'attachement des analogues. La présence de molécules dans l'environnement diélectrique de la nanoparticule cause un léger déplacement bathochromique de la bande d'absorption des plasmons de surface localisés. Également, la diffusion dynamique de la lumière permet aussi de s'assurer que la liaison des analogues est

adéquate en examinant la charge entourant les nanoparticules. Il est impératif d'examiner si les NPs-analogues ne subissent pas d'aggrégation car cela viendrait biaiser les résultats SPR de l'essai compétitif, d'où l'importance du suivi par spectroscopie UV-vis ainsi que par DLS.

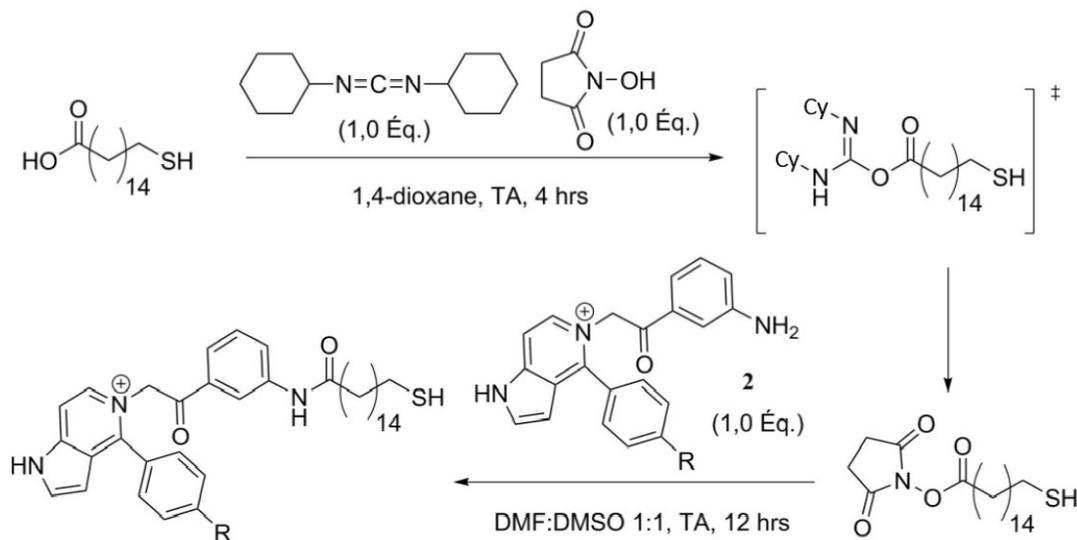


Figure 19. Synthèse des analogues **2** thiolés permettant l'attachement aux nanoparticules d'or

2.3.2 Stabilisation des nanoparticules d'or

2.3.2.1 Optimisation de la charge des NPs

Afin de conserver les nanoparticules stables en solution, il faut porter une attention particulière à la charge de celles-ci afin de s'assurer que les répulsions électrostatiques sont assez importantes pour les empêcher de s'agréger. Puisque les aminoglycosides sont des molécules polycationiques, il est nécessaire de vérifier si ceux-ci peuvent s'acclimater dans un milieu contenant des nanoparticules chargées négativement sans causer leur agrégation ou si des nanoparticules positives sont préférables. Ainsi, deux types de NPs de charge opposée ont été synthétisées à l'aide d'une technique similaire afin d'analyser l'effet de ce paramètre : des nanoparticules d'or recouvertes de citrate (AuNP@citrate) (charge négative)³⁸ et des nanoparticules d'or de poly(allylamine) (AuNP@PAA) (charge positive). (Les synthèses des différentes nanoparticules sont présentées dans la section 2.1.2) Par convention, les nanoparticules possédant un potentiel zêta, en valeur absolue, plus élevé que 30 mV sont considérées comme stables. En observant le tableau III, il est possible de conclure que seules

les nanoparticules positives sont stables en présence d'antibiotiques puisqu'elles présentent un potentiel zêta de plus de 40 mV comparativement aux nanoparticules chargées négativement qui se retrouvent avec un potentiel zêta de seulement -11 mV en présence d'aminoglycosides.

Tableau III. Stabilité des nanoparticules selon leur charge

Technique spectroscopique	Conditions	AuNP@PAA (+)	AuNP@citrate (-)
DLS	AuNPs	(51,5 ± 5,6) mV	(-30,1 ± 0,3) mV
	AuNPs@2a	(44,4 ± 1,5) mV	(-30,5 ± 2,0) mV
	AuNPs@2a + Aminoglycosides 150 µM	(42,5 ± 3,3) mV (Néomycine)	(-11,4 ± 4,0) mV (Tobramycine)
UV-vis	AuNPs	526 nm	528 nm
	AuNPs@2a	528 nm	532 nm
	AuNPs@2a + Tobramycine 150 µM	529 nm	547 nm (↑ A _{680 nm})

Autant les nanoparticules positives que négatives sont stables à la suite de l'ajout de l'analogue **2a** à leur surface comme le démontre le faible déplacement de la bande plasmonique en spectroscopie UV-vis ainsi que la faible variation des charges à la surface des NPs mesurée par DLS. En revanche, dès l'ajout de la tobramycine ou bien de la néomycine, une différence entre les deux types de NPs se dessine. Les AuNP@PAA ne subissent que très peu de variation alors que les AuNP@citrate ont un important déplacement bathochromique et une augmentation de l'absorbance vers 680 nm en UV-vis et une chute de la charge à leur surface en DLS. Comme présenté précédemment, un tel déplacement en UV-vis est caractéristique de l'agrégation de NPs tout comme la chute drastique de la charge à leur surface causant une perte de répulsion électrostatique. Ainsi, les NPs chargées négativement ne sont pas stables en présence d'aminoglycosides et donc ne sont pas de bonnes candidates comme compétiteur pour le

biocapteur. La suite du développement du biocapteur se concentre alors sur la synthèse de nanoparticules positives stables dont les formes et les agents stabilisateurs sont variés.

2.3.2.2 Optimisation de la stabilité des AuNP@PAA

Afin d'accroître la stabilité des nanoparticules d'or recouvertes de poly(allylamine), un aminothiols a été ajouté lors de la fonctionnalisation des NPs avec les divers analogues. La cystéamine devrait alors accroître la charge à la surface des nanoparticules et ainsi améliorer la stabilité de celles-ci. Différents ratios de cystéamine et de l'analogue **2a** ont été testés afin de trouver celui permettant la meilleure stabilisation. (Tableau IV) Deux facteurs ont été analysés afin de juger de la stabilité des nanoparticules synthétisées. La charge à leur surface est le premier indicateur de la stabilité ou non des nanoparticules. Plus leur charge est importante, meilleure est leur stabilité. Ensuite, l'analyse du taux d'agrégation des nanoparticules est réalisée en comparant l'absorbance de la bande plasmonique avec celle à 680 nm qui est caractéristique de la formation d'agrégats métalliques. Ainsi, plus le rapport $A_{\lambda_{\max}}/A_{680 \text{ nm}}$ est important, plus l'échantillon plasmonique est stable. En ce qui concerne les résultats du tableau IV, l'accroissement de la stabilité des nanoparticules est évident avec l'ajout de la cystéamine dû à l'accroissement de près de 10 mV de la charge à leur surface et avec la diminution de la proportion de nanoparticules agrégées absorbant vers 680 nm. Dès que la quantité de cystéamine atteint le rapport 14 : 1 (Cystéamine : Analogue **2a**), cette stabilisation est significative. Ainsi, le ratio 14 : 1 cystéamine : analogue **2a** a été choisi pour continuer les tests puisqu'il permet d'optimiser la stabilisation des nanoparticules tout en permettant de maintenir un bon nombre d'analogues sur les nanoparticules.

Il est également nécessaire de se questionner par rapport à l'impact des divers analogues sur la stabilité des nanoparticules. En observant le tableau V, il est possible d'en conclure que ce facteur n'a que très peu d'impact sur la stabilité des AuNP@PAA puisque les variations de charge mesurée en DLS ainsi que les rapports d'absorbance de la bande plasmonique versus les hautes longueurs d'onde caractéristiques à l'agrégation des NPs ne sont pas significatives. Ainsi, tous les analogues synthétisés par Atafeh Garzan peuvent être employés pour la construction du biocapteur.

Tableau IV. Stabilisation des AuNP@PAA avec la cystéamine à diverses concentrations.

Ratio	DLS	$A_{\lambda_{max}}/A_{680 \text{ nm}}$
Cystéamine : Analogue 2a thiolé		
0 : 1	(44,4 ± 1,5) mV	8,8
1 : 1	(41,9 ± 3,3) mV	8,9
9 : 1	(48,7 ± 3,8) mV	12,1
14 : 1	(51,7 ± 4,1) mV	12,3
29 : 1	(53,4 ± 4,2) mV	12,7
89 : 1	(48,0 ± 3,8) mV	14,2

Tableau V. Comparaison des nanoparticules AuNP@PAA avec les différents analogues 2.

Analogue	DLS	$A_{\lambda_{max}}/A_{680 \text{ nm}}$
2a	(44,4 ± 1,5) mV	8,8
2b	(38,3 ± 3) mV	13,0
2c	(36,9 ± 2,9) mV	11,9
2d	(45,8 ± 3,6) mV	11,8

Ensuite, le tampon dans lequel l'essai compétitif se produit a été analysé afin de s'assurer que les nanoparticules seules et en présence d'aminoglycosides soient stables. Parmi les multiples tampons testés, l'acétate de sodium 10 mM à un pH de 4,5 et l'eau se sont avérés excellents pour conserver la stabilité des nanoparticules en solution mais seulement l'acétate de sodium est parvenu à l'être également en présence de tobramycine et de néomycine (Tableau

VI). Ainsi, ce nouveau type de nanoparticule d'or de poly(allylamine) stabilisées par de la cystéine et fonctionnalisées avec les analogues **2** en solution tamponnée d'acétate de sodium pourra passer à la prochaine étape consistant à son essai à titre de compétiteur SPR présenté dans la section 2.4.1.

Tableau VI. Stabilité des AuNP@PAA@cystéamine avec les analogues **2** dans divers tampons.

Tampon	Antibiotique	$\Delta\lambda_{\text{LSPR}}$	État
HEPES 50 mM @ pH 7,5	-	525 nm → 529 nm 4 nm	Instable
MES 50 mM @ pH 6,6	-	524 nm → 525 nm 1 nm	± Stable
PBS 1X @ pH 7,3	-	587 nm → 632 nm 45 nm	Instable
PBS @ pH 4,5	-	524 nm → 550 nm 26 nm	Instable
H₂O	-	525 nm → 525 nm 0 nm	Stable
Bicarbonate de sodium @ pH 10,5	-	524 nm → 550 nm 26 nm	Instable
Glycine @ pH 10	-	524 nm → 550 nm 26 nm	Instable

Tampon	Antibiotique	$\Delta\lambda_{\text{LSPR}}$	État
Acétate de sodium 10 mM @ pH 4,0	-	524 nm \rightarrow 524,5 nm 0,5 nm	Stable
H ₂ O	Tobramycine 150 μ M	524 nm \rightarrow 534 nm 10 nm	Instable
Acétate de sodium 10 mM @ pH 4,0	Tobramycine 150 μ M	524 nm \rightarrow 525 nm 1 nm	Stable
Acétate de sodium 10 mM @ pH 4,0	Néomycine 150 μ M	524,7 nm \rightarrow 525,0 nm 0,3 nm	Stable

2.3.2.3 Optimisation de l'agent stabilisateur et la forme des NPs

Parmi les nanoparticules positives dont la synthèse a été testée, quatre d'entre elles n'ont pas mené à des nanoparticules assez stables pour se rendre jusqu'aux tests par SPR sans s'agréger au préalable. Une synthèse de nanoparticules de L-cystéine esterméthylée a été tentée c'est-à-dire la méthode de Chen.⁸⁰ La L-cystéine esterméthylée a été ajoutée à des NPs@citrate ce qui a causé leur agrégation. Ensuite, trois différentes techniques de synthèse pour former des nanoparticules d'or de cystéamine ont été essayées. La première consistait à un transfert de phase en deux étapes.⁸¹ Premièrement, une solution de toluène contenant de l'octadécylamine était ajoutée à des nanoparticules de citrate ce qui causait le transfert des NPs en phase organique. La phase organique est récupérée et lavée avant qu'un aminothiols, la cystéamine, en solution aqueuse y soit ajouté ramenant les NPs cationique en solution aqueuse. La stabilité de ces nanoparticules de cystéamine s'est avérée très faible puisqu'en moins d'une journée elles étaient agrégées.

La technique de Malhotra consiste à ajouter les NPs de citrate directement dans une solution très concentrée de cystéamine pour permettre un transfert rapide des agents stabilisateurs tout en conservant une charge assez grande sur les nanoparticules pour les

stabiliser.⁸² En solution concentrée de cystéamine, les nanoparticules étaient stables et présentaient une bande plasmonique autour de 522 nm. Cependant, leur lavage a causé leur déstabilisation et donc leur agrégation. Ces nanoparticules n'ont donc pas pu être utilisées à titre de compétiteurs en SPR.

Finalement, la méthode inspirée de Feng qui consistait à l'oxydation de l'or(III) en or(0) par le borohydrure de sodium en présence d'un aminothiols chargé a été testée.⁸³ Les nanoparticules de cystéamine de 8 nm de diamètre se sont avérées stables mais uniquement sur une très courte période de temps ce qui n'a malheureusement pas permis leur utilisation à titre de compétiteur pour l'essai biologique. Des tests DLS et UV-vis ont permis de déterminer leur bande plasmonique dont le maximum se situait à 522 nm et leur charge de $(38,6 \pm 2,2)$ mV avant fonctionnalisation.

Ensuite, quatre nouvelles synthèses de nanoparticules d'or ont été réalisées et ont mené à la formation de compétiteurs potentiels pour le biocapteur SPR. La méthode de croissance de nanoparticules d'or de L-cystéine esterméthylée développée par Guo⁷¹ consiste en la germination de nanoparticules de petite taille recouverte de L-cystéine esterméthylée dont la croissance est réalisée, par la suite, en ajoutant de l'agent stabilisateur, du sel d'or et de l'hydroxylamine. Les nanoparticules cationiques formées se sont avérées à être très petites soit d'environ 5 nm. Lorsque fonctionnalisées, la bande plasmonique de ces nanoparticules passe de 518 nm à 528 nm avec l'analogue **2c** démontrant ainsi son attachement à la surface des NPs. Étant donné la bonne stabilité de ces NPs fonctionnalisées, elles ont été testées pour l'essai compétiteur SPR. Par la suite, le CTAB a été employé dans le développement de deux types de synthèses à croissance multiple de NPs anisotropiques c'est-à-dire les NPs quasi-sphériques⁸⁴ ainsi que les nanotiges⁸⁵. Dans le cas des nanoparticules quasi-sphériques, les premières nanoparticules synthétisées sont recouvertes de citrate et croissent à trois reprises afin de s'assurer que les nanoparticules forment des quasi-sphères et ne se développent pas que d'un seul côté et deviennent des bâtonnets. En analysant les images TEM prises (Annexe A – Images TEM des NPs quasi-sphériques) de ces nanoparticules, il est possible d'observer que les NPs synthétisées ne sont pas de tailles et de formes aussi constantes que désiré. La majorité d'entre elles sont des quasi-sphères alors qu'environ 12% possèdent plus une forme de nanotiges que de sphérique. Cette variation de la forme affecte également la taille des NPs mesurée ; elle varie

de 30 nm à 40 nm de diamètre moyen. Cela se reflète également dans le spectre d'absorption où la bande plasmonique est plus large et dont le maxima est de 546 nm avant fonctionnalisation. Lorsque fonctionnalisées avec les divers analogues **2**, la bande d'absorption des plasmons de surface localisés accroît vers 550 nm. Quant aux nanotiges, elles résultent de la simple croissance, en présence de CTAB, de nitrate d'argent, d'acide ascorbique et de sel d'or(III), de petites nanoparticules de CTAB. Elles sont anisotropiques à cause des deux différentes distances que peuvent parcourir les électrons dans celles-ci. Cette taille de 30 nm par 10 nm mène à l'obtention de deux bandes plasmoniques à 579 nm (la plus intense) et 548 nm. Lorsque fonctionnalisées, ces bandes vont subir un déplacement bathochromique d'une dizaine de nanomètres. Il est donc possible d'analyser ces deux types de NPs de CTAB, quasi-sphériques et longitudinales, par SPR pour l'essai compétitif. Finalement, des nanoparticules d'or avec un cœur d'oxyde de fer(III) ont été formées. L'intérieur de Fe_2O_3 est premièrement synthétisé puis recouvert d'or. Ces nanoparticules possèdent la même chimie de surface que les nanoparticules d'or traditionnelles donc les thiols y sont facilement attachés et, en plus, elles sont magnétiques. Il est donc possible d'utiliser un aimant pour effectuer les lavages ou bien pour accélérer le déplacement des NPs. L'ajout d'un aimant sous le prisme SPR peut alors accélérer l'attachement du compétiteur magnétique à la surface du biocapteur pour les aminoglycosides.

En plus de ces quatre nouveaux types de NPs synthétisés, des nanoparticules d'oxyde de silice ont été fonctionnalisées avec les divers analogues d'aminoglycosides. Cette initiative visait à déterminer si le fait d'utiliser des nanoparticules métalliques affectait le biocapteur développé. Puisque le matériau des nanoparticules a changé, il était nécessaire de repenser la fonctionnalisation de celles-ci. La chimie des thiols n'étant pas possible, l'approche de la liaison peptidique a été empruntée. Ainsi, les nanoparticules d'oxyde de silice de 200 nm de diamètre possédant des pores de 4 nm et des fonctions carboxyliques à leur surface ont été activées par EDC/NHS puis mises en contact avec les analogues possédant une amine primaire. Ainsi, l'analogue peut se lier à la surface des particules d'oxyde de silice qui agira comme compétiteur pour les tests du biocapteur SPR.

Ainsi, le tableau VII résume bien les caractéristiques des nanoparticules, avant et après leur fonctionnalisation, qui sont des candidates intéressantes pour l'essai compétitif et dont leurs capacités SPR seront démontrées dans la prochaine section.

Tableau VII. Résumé des caractéristiques des différentes NPs synthétisées et testées à titre de compétiteur pour le développement du biocapteur SPR pour les aminoglycosides.

Nom des NPs	Agent stabilisateur	Taille	λ_{LSPR} maximale	DLS
AuNP@PAA	PAA	38 nm	526 nm 528 nm (2a)	(51,5 ± 5,6) mV (44,4 ± 1,5) mV (2a)
AuNP@PAA + Cystéamine	PAA + Cystéamine	38 nm	528 nm (2a)	(51,7 ± 4,1) mV (2a)
AuNP, méthode de Guo ⁷¹	L-cystéine esterméthylée	5 nm	518 nm 528 nm (2c)	-
AuNP quasi-sphérique ⁸⁴	CTAB	(36 ± 7) nm	546 nm 551 nm (2a) 550 nm (2c)	50 mV
Nanotiges ⁸⁵	CTAB	50 nm x 5 nm	579 nm 589 nm (2c) (anisotropique)	-
Fe ₂ O ₃ @Au ⁷⁰	Glucose	-	466 nm	-
SiO ₂ NP	-	200 nm	-	-

2.4 Essai compétitif

2.4.1 Résultats préliminaires

À la suite des études ayant mené au développement de diverses nanoparticules stables porteuses des analogues des aminoglycosides, les capacités de ces nanoparticules à agir à titre

de compétiteur pour l'essai développé en SPR ont été analysées. Ainsi, les sept différentes nanoparticules présentées au tableau VII ont été analysées par SPR lorsque seules avec le récepteur Eis à la surface du biocapteur ainsi qu'en présence de néomycine à une concentration de 150 μM . Deux cas de figure sont ressortis de cette analyse. En premier lieu, certaines nanoparticules compétitives en présence d'antibiotiques réagissent en s'aggrégant, comme c'est le cas à la figure 20A puisque l'ajout de tobramycine mène à une croissance du déplacement SPR. Également, une seconde famille de nanoparticules réagit comme prévu à l'essai, contrairement aux précédentes, et démontre une perte de signal en présence d'antibiotiques (figure 20B). La figure 21 présente les résultats obtenus pour l'ensemble des nanoparticules testées. Une première analyse révèle qu'uniquement trois types de nanoparticules testées ont mené aux résultats attendus c'est-à-dire à un déplacement SPR plus important dû à l'unique présence des nanoparticules fonctionnalisées avec l'analogue interagissant avec le récepteur du biocapteur qu'en présence de néomycine. Cela signifie que quatre des nanoparticules n'ont pas réagi tel que prévu. Premièrement, il est possible de comparer les nanoparticules recouvertes uniquement de poly(allylamine) ainsi que celles ayant subi l'ajout de cystéamine pour les stabiliser. Cet ajout ne semble pas avoir amélioré les interactions entre le compétiteur et le récepteur à la surface puisque son signal a diminué drastiquement. Cette diminution du déplacement SPR jusqu'à aussi peu que 0,58 nm mène à une valeur aussi faible que celles obtenues pour la détection directe des analogues et des aminoglycosides en solution. (Tableau II) De plus, les deux nanoparticules composées de PAA semblent subir une agrégation en présence d'aminoglycosides lorsqu'injectées dans l'instrument SPR comme le démontre le déplacement bathochromique important sur la figure 20A et représentative d'une agrégation de NPs. L'ajout de la cystéamine à titre d'agent stabilisateur a toutefois permis de diminuer l'importance de cette agrégation lorsque les deux types de nanoparticules de PAA sont comparés en compagnie de néomycine. Ainsi, il est possible de conclure que les nanoparticules de PAA ne peuvent constituer un compétiteur adéquat puisqu'elles ne sont pas en mesure d'interagir avec les protéines Eis présentes sur la surface. Cela peut s'expliquer par le grand volume qu'occupe le polymère PAA et l'écrantage que celui-ci peut causer aux molécules des analogues. Ainsi, cet encombrement stérique empêche les analogues de se lier à la surface et de causer un déplacement significatif de la bande plasmonique du biocapteur.

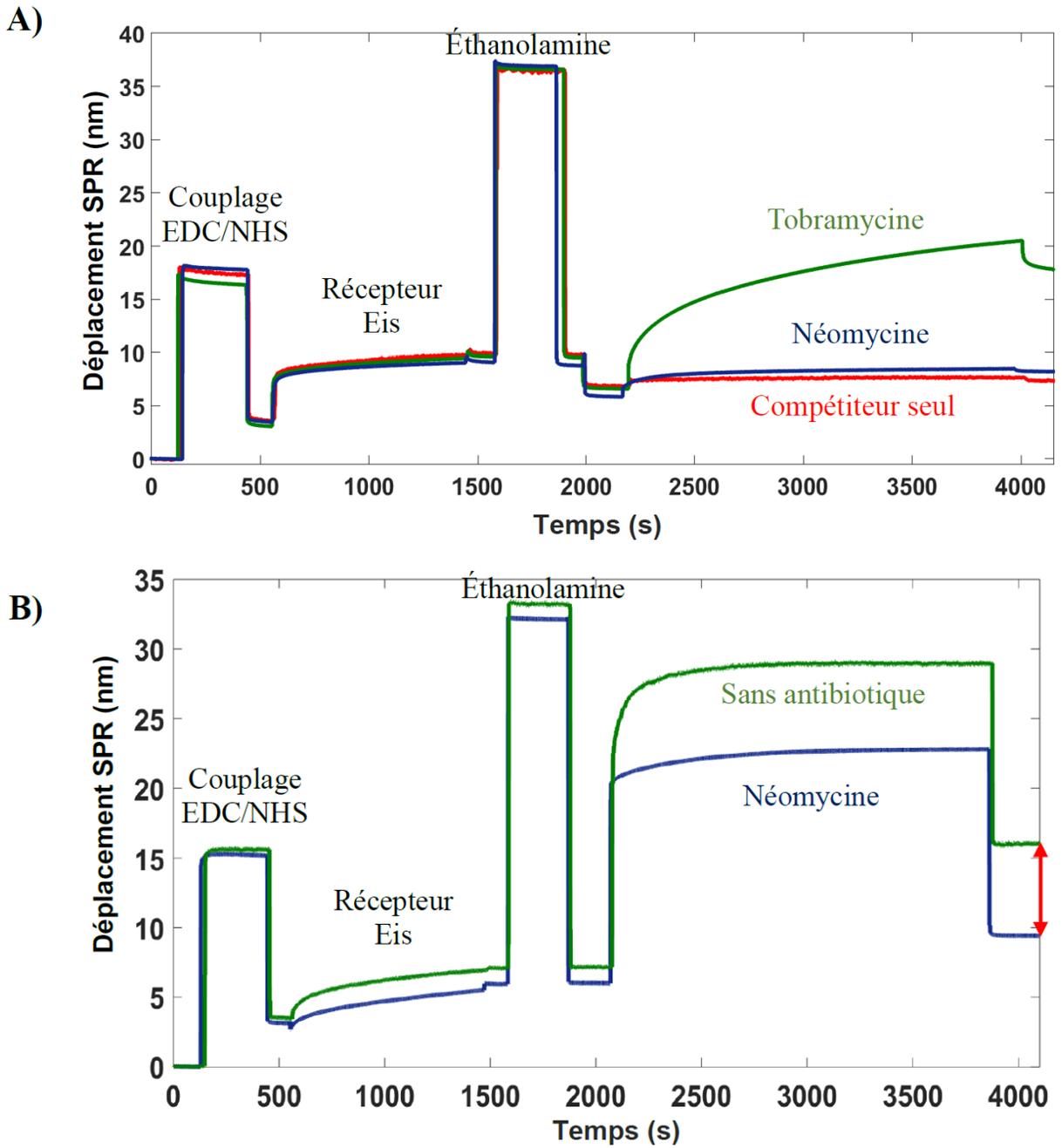


Figure 20. Comparaison de sensorgrammes SPR selon le fonctionnement ou non du compétiteur pour le biocapteur d'aminoglycosides A) Sensorgrammes SPR des AuNP@PAA + Cystéamine en présence et en absence d'antibiotique. Le signal SPR avec les aminoglycosides est plus important que celui uniquement des nanoparticules, B) Sensorgrammes SPR des AuNPs quasi-sphériques : le signal est plus grand lorsque seulement les nanoparticules compétitrices sont présentes. Ces NPs permettent alors au biocapteur compétitif d'être fonctionnel.

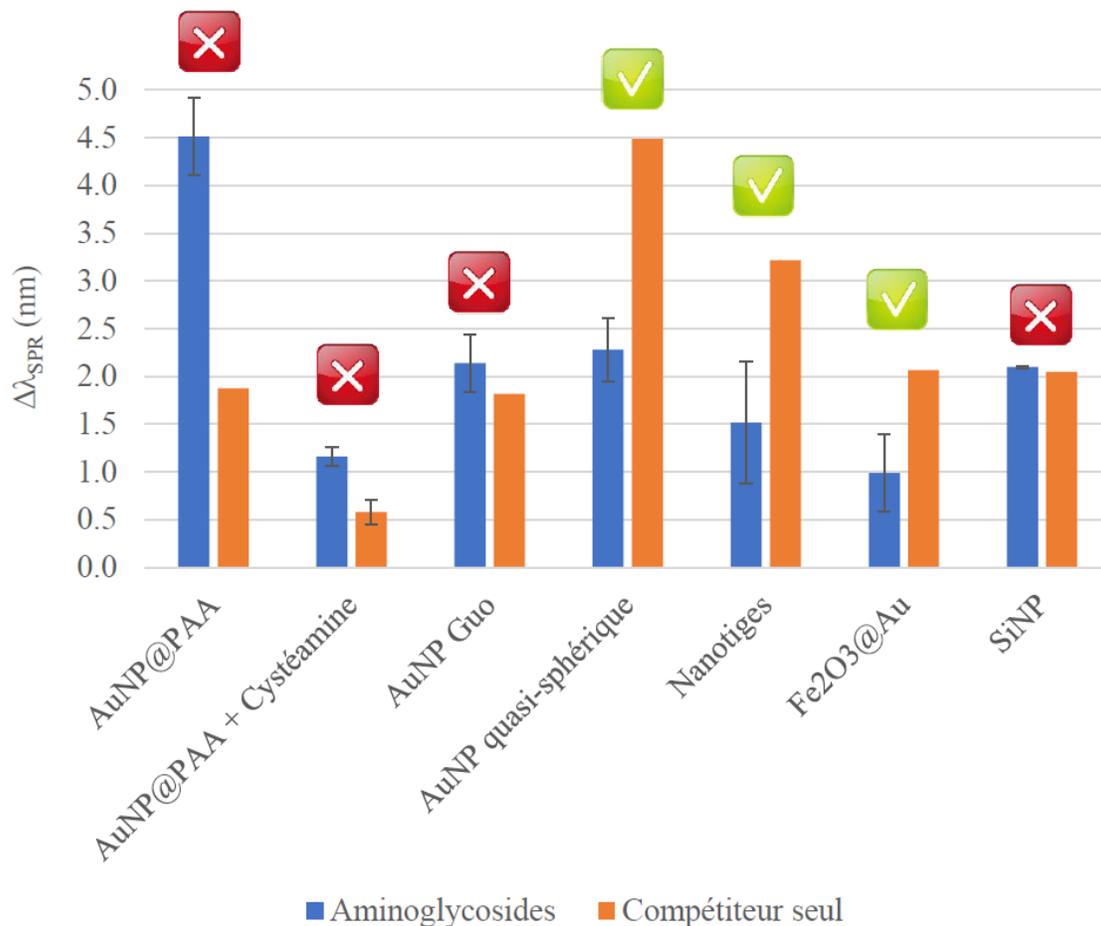


Figure 21. Déplacement de la bande plasmonique SPR pour l'essai compétitif avec divers compétiteurs en présence et en absence d'aminoglycosides. Seules les nanoparticules AuNP quasi-sphériques, les nanotiges ainsi que les nanoparticules magnétiques répondent correctement au biocapteur.

Tout comme les nanoparticules précédentes, les nanoparticules de L-cystéine esterméthylée de Guo ne respectent pas plus le principe de base du biocapteur visé. Encore une fois, le déplacement SPR en présence d'aminoglycosides est plus grand que celui des NPs seules ce qui rend ces NPs inutilisables pour le biocapteur. Pour ce qui est des nanoparticules recouvertes de CTAB, c'est-à-dire les nanotiges et les nanoparticules quasi-sphériques, ainsi que des nanoparticules magnétiques recouvertes d'or, elles semblent

réagir de manière semblable avec le récepteur. Elles ont un comportement tel qu'attendu c'est-à-dire qu'elles possèdent un déplacement bathochromique plus important en présence uniquement des nanoparticules qu'avec des aminoglycosides. Une chute d'environ 50% du signal est obtenu lors de l'ajout de néomycine 150 μ M. Cependant, en comparant les trois résultats, les nanoparticules quasi-sphériques semblent plus sensibles que les nanotiges puisqu'elles mènent à un signal plasmonique plus grand. Finalement, les nanoparticules d'oxyde de silice ne permettent pas d'obtenir une différence de signal entre l'absence ou non d'antibiotiques en solution. Le fait que les nanoparticules menaient à la même réponse SPR peu importe la quantité d'aminoglycosides présente auraient pu provenir d'interactions non-spécifiques avec la surface qui ne seraient que très peu affectées par la concentration d'antibiotiques. Ainsi, pour vérifier cette hypothèse, des nanoparticules non-fonctionnalisées donc n'interagissant qu'avec la surface du biocapteur de manière non-spécifique ont été testées. Cependant, leur signal s'est avéré très différent du résultat obtenu précédemment. Il était près de 5 fois plus important. Cette piste fût alors éliminée et les résultats ne purent être expliqués.

Maintenant que toutes les nanoparticules ont été testées, les trois réagissant adéquatement au biocapteur, les NPs quasi-sphériques, les nanotiges et les NPs magnétiques peuvent passer à la prochaine étape qui consiste à vérifier la reproductibilité des résultats obtenus.

2.4.2 Reproductibilité

Bien que les nanoparticules d'or quasi-sphériques, les nanotiges d'or ainsi que les nanoparticules magnétiques aient réagit de manière adéquate lors de l'essai compétitif, il est essentiel de confirmer leur efficacité et reproductibilité. Ainsi, un triplicata de l'essai compétitif dans les mêmes conditions fût réalisé pour chacune de ces nanoparticules et est présenté dans la figure 22. Le premier élément à observer est le fait que les déplacements SPR varient de façon significative pouvant passer de plus de 8 nm à aussi peu que 3 nm pour deux expériences identiques. Cette différence pouvant provenir de la variation du nombre de nanoparticules dans les échantillons, le ratio entre le déplacement SPR en présence d'antibiotiques et le déplacement dû au compétiteur seul fût comparé. Encore une fois, aucune tendance ne se dessine non plus avec cette analyse. Ainsi, les essais compétitifs réalisés avec les diverses nanoparticules n'ont

pas mené au développement d'un biocapteur possédant des résultats reproductibles malgré les maintes optimisations des éléments le composant.

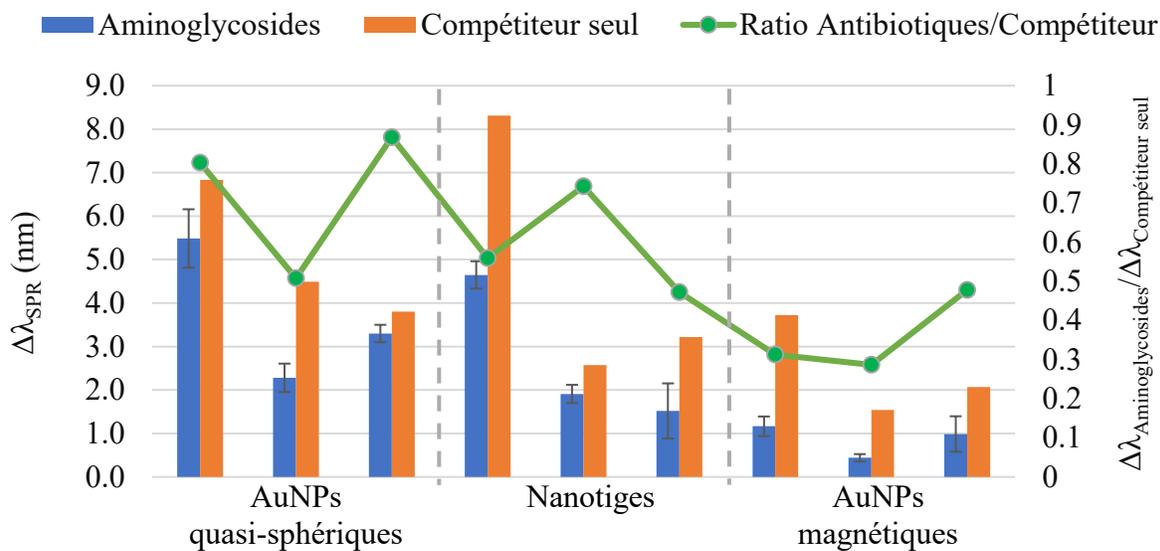


Figure 22. Reproductibilité des essais compétitifs à une concentration fixe de néomycine ($150 \mu\text{M}$) pour les NPs : AuNPs quasi-sphériques, nanotiges et NPs magnétiques.

2.5 Conclusion

Ce chapitre portait sur le développement d'un biocapteur permettant de réaliser la détection d'antibiotiques aminoglycosides plus rapidement et sensiblement que les techniques actuelles tout en respectant les principes de POC. Cette technologie est essentielle afin de protéger la population étant donné le développement rapide de la résistance microbienne à l'échelle mondiale dû à une utilisation non-personnalisée et inappropriée des antibiotiques et les effets secondaires sévères qu'occurrent une déviation de la gamme thérapeutique des aminoglycosides. Puisque la détection directe des aminoglycosides en SPR n'est pas possible, il a été nécessaire de se tourner vers un essai compétitif menant à une sensibilité accrue en milieu biologique. Ainsi, une compétition entre les antibiotiques présents dans l'échantillon ainsi qu'un analogue lié à une particule accroissant la réponse SPR pour le récepteur est mise sur pied. La protéine Eis possédant un site de liaison commun pour les aminoglycosides et les analogues d'aminoglycosides à base de pyrrolo-[1,5-*a*]pyrazine a été utilisée comme récepteur à la surface du film métallique du capteur.

L'optimisation des compétiteurs, soient des nanoparticules où les analogues étaient fonctionnalisés, a été nécessaire afin d'obtenir des biocapteurs pour l'essai compétitif. Autant la charge de celles-ci, l'ajout de molécules stabilisantes, la nature des agents stabilisants ainsi que la forme des nanoparticules ont été étudiés dans ce chapitre. Finalement, sept différents types de nanoparticules stables en présence d'aminoglycosides ont été testés pour l'essai compétitif SPR. De ce nombre, seulement trois NPs, soient les nanoparticules quasi-sphériques, les nanotiges d'or ainsi que les nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer(III) recouvertes d'une couche d'or, ont démontré le principe désiré du biocapteur. Le déplacement de leur bande plasmonique était plus important en présence uniquement du compétiteur qu'avec de la néomycine ce qui signifie que les nanoparticules liées à la surface sont moindres puisque les aminoglycosides de faible masse leur font compétition pour la liaison à la protéine Eis. Ensuite, il a été découvert que ce biocapteur optimisé ne permettait pas d'obtenir des résultats reproductibles. Il était alors impossible de penser réaliser une courbe d'étalonnage afin de quantifier les aminoglycosides avec ces biocapteurs. Il est alors nécessaire de continuer l'optimisation de ce biocapteur afin d'accroître la reproductibilité et, ainsi, de réaliser une courbe d'étalonnage menant à la quantification des aminoglycosides dans un milieu biologique. Certaines pistes peuvent encore être considérées afin d'expliquer les divers problèmes obtenus lors du développement de cet essai. Notamment, il est à envisager que le choix de la protéine Eis n'est peut être pas optimal et que les interactions décrites entre les antibiotiques ou les analogues et la protéine soient significativement affectées par sa liaison à la surface du biocapteur. Cependant, les divers types d'attachement à la surface de la protéine Eis testés, par liaison peptidique ou bien par une étiquette histidine, n'ont pas permis de régler cette problématique.

3 Chapitre 3 : Combinaison de la SPR et l'électrochimiluminescence pour la détection du biomarqueur du cancer du sein HER2

Ce chapitre s'inscrit dans le cadre d'un échange étudiant réalisé à l'Institut National de Cancérologie (CRO) d'Aviano en Italie dans le groupe de recherche de Dr. Federico Polo. Cet échange faisait partie du projet de coopération entre l'Italie et le Québec coordonné par les Pr. Masson et Polo, financé par le Ministère des relations internationales et de la francophonie. En plus des travaux présentés dans ce mémoire et réalisés par moi-même avec Pr. Masson et Polo, le projet a été continué par Dr. Stefano Tartaggia du CRO Aviano qui développa un essai immunologique complet pour le suivi du biomarqueur du cancer de sein, le domaine extracellulaire de l'anticorps HER2 (ECD HER2), en SPR. Il compara cet essai entre l'appareil commercial Biacore ainsi que l'instrument P4-SPR portatif du laboratoire du Pr. Masson. Sophie Wesolowski, stagiaire au baccalauréat en chimie à l'Université de Montréal, a aussi travaillé sur la conception d'un nouveau support optique et électrochimique employé pour la seconde série de tests.

3.1 Historique

La spectroscopie de résonance des plasmons de surface ainsi que l'électrochimiluminescence sont deux techniques couramment employées pour le développement de biocapteurs. Leur grande sensibilité, leur simplicité d'utilisation ainsi que leur aspect POC en font des candidats idéaux. Certains couplages de la technique ECL avec d'autres technologies dont l'électrophorèse capillaire, l'analyse par injection en flux ainsi que la microextraction sur phase solide ont déjà été réalisés.^{67, 86} L'utilisation du principe de la résonance des plasmons de surface a commencé à être exploité au début des années 2000 conjointement avec l'ECL. La première démonstration de la combinaison de ces deux phénomènes consistât en l'utilisation de la molécule électrochimiluminescente excitée comme source d'énergie permettant l'excitation des plasmons de surface d'une nanocouche métallique d'or de 50 nm sur un prisme de verre.⁸⁷ Cette nouvelle technologie a notamment été employée

afin de réaliser un biocapteur pour l'oxygène.⁸⁸ L'accroissement du signal ECL par les plasmons de surface localisés de nanoparticules d'or a aussi été démontré.^{89, 90} Cependant, une seule technique présente le couplage complet de la SPR et de l'ECL. De la thiocholine est fixée sur une surface d'or agissant comme film de propagation des plasmons de surface et d'électrode de travail. Cette monocouche a été développée afin d'agir comme co-réactif pour le Ru(bpy)₃²⁺ lors de l'ECL. Ainsi, la formation de la monocouche est analysée en SPR puis l'ECL de Ru(bpy)₃²⁺ est réalisée à la surface du film. Cet article de Kurita datant de 2012 démontre l'utilisation possible de la SPR et par la suite de l'ECL pour ce type de système.⁹¹

Ainsi, ce chapitre vise à développer un biocapteur immunologique réalisant en parallèle les analyses ECL et SPR pour la détection d'un biomarqueur du cancer du sein. Au meilleur de mes connaissances, jusqu'à maintenant, il n'y a pas de littérature démontrant le couplage de l'ECL et la SPR à des fins immunologiques et ce de manière simultanée. En réalisant la combinaison de ces deux techniques analytiques, il sera possible d'obtenir une mesure redondante permettant d'augmenter la confiance envers les résultats. Au final, cette nouvelle technologie va permettre de combiner les avantages des deux techniques employées soit la grande sensibilité de l'ECL ainsi que l'analyse en temps réel de la SPR.

3.2 Méthode expérimentale

3.2.1 Essais sandwich en SPR

Les prismes de forme Dove fonctionnalisés utilisés pour les tests SPR sont préparés selon les protocoles 2.1.3.1 et 2.1.3.2. Le protocole de cet essai sandwich est semblable à celui du chapitre 2 de la section 2.1.3.3. Ainsi, le prisme d'or recouvert par la monocouche peptidique est inséré dans l'instrument P4-SPR. Une chambre fluide à quatre canaux de PDMS est placée sur le prisme d'or. La monocouche est hydratée avec de l'eau avant que l'anticorps primaire soit immobilisé par couplage EDC/NHS. Plusieurs récepteurs ont été testés : le trastuzumab, le pertuzumab, le MGR2 et le MGR3. Le ECD HER2 (à différentes concentrations dans le PBS 1X à pH 6,0) est injecté à la surface du biocapteur et conservé pendant 30 minutes avant d'être lavé avec du tampon. L'anticorps secondaire (MGR2 ou MGR3 à 2 µg/mL dans le PBS 1X à pH 7,3) est ensuite ajouté et conservé pendant 30 minutes. Du tampon PBS 1X à pH 7,3 est

utilisé pour la référence. Les déplacements des bandes plasmoniques des couples d'anticorps de reconnaissance primaire et secondaire sont ensuite analysés.

Dans le cas des tests d'adsorption non-spécifique, le protocole est le même que celui présenté au paragraphe précédent à l'exception de l'étape de l'ajout de l'analyte, le ECD HER2, qui n'est pas réalisée.

3.2.2 Tests ECL

L'impression des électrodes sur le prisme du P4-SPR est nécessaire en premier lieu. Pour cela, les prismes SPR de forme Dove de 20 mm x 12 mm sont nettoyés avec une solution piranha puis rincés avec de l'eau et de l'éthanol où ils sont entreposés avant le dépôt des métaux. Afin de s'assurer qu'il n'y ait pas de contamination entre les électrodes, des membranes différentes de 2 mm d'épaisseur de PDMS avec la forme adéquate sont appliquées sur le prisme lors des dépositions consécutives de chrome (1 nm) et d'argent (50 nm) puis de chrome (1 nm) et d'or (50 nm).

La solution de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ est préparée fraîchement avant chacune des mesures. Deux solutions mères distinctes du co-réactif et de la molécule électrochimiluminescente sont réalisées préalablement. La tripropylamine (57 μL , 30 mM) est mélangée avec le Tween 20 2% (200 μL dans une solution totale de 10 mL) préalablement à sa solubilisation dans le tampon de PBS 1X à un pH de 7,3. Le $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ (2 mM) est également solubilisé dans le Tween 20 2% (200 μL) avant que le tampon de PBS 1X soit ajouté (9 800 μL). Un mélange homogène 1 : 1 de ces solutions mères est utilisé pour les mesures ECL.

La cellule de couplage de l'ECL et la SPR est montée. Pour cela, le support à prisme est imprimé en polymère et isolé de manière qu'il n'y ait pas de fuite sous le prisme bloquant le signal SPR. La solution de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 1 mM, TPrA 15 mM et Tween 20 2% dans le PBS 1X est ajoutée sur le prisme de manière que les trois électrodes soient immergées dans celle-ci. Les électrodes sont reliées au potentiostat afin de pouvoir appliquer le potentiel nécessaire pour l'ECL du luminophore. Le potentiel est balayé par voltampérométrie cyclique de 0,4 V vers 1,4 V puis retourne à 0,4 V à une vitesse de 200 mV/s pour deux segments. La collection de la luminescence s'effectue à l'aide d'une caméra Canon EOS REBEL T2i avec les paramètres suivants : ISO-6400, f/6.3, 1/20 sec.

3.3 Essai biologique

Le domaine extracellulaire de la protéine HER2 est un biomarqueur sanguin intéressant pour l'identification et le suivi à court et long terme de nombreux cancers du sein puisque sa surexpression est caractéristique dans le cas d'un cancer du sein sur quatre. Bien que des techniques ELISA existent déjà pour la quantification du ECD HER2, le développement d'un biocapteur plus efficace et POC serait favorable pour permettre un suivi personnalisé des patientes. Le couplage des technologies de la spectroscopie de résonance des plasmons de surface ainsi que de l'électrochimiluminescence est une option pertinente pour le développement de ce biocapteur. L'idée principale portait sur un essai sandwich dont l'anticorps secondaire serait marqué par le complexe de ruthénium(II) ($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$) représenté à la figure 23. Ainsi, le biocapteur permettrait l'analyse par SPR en suivant l'attachement de l'anticorps secondaire au HER2 ainsi que l'analyse via ECL de l'émission du complexe de ruthénium(II) situé sur une nanoparticule attachée à ce même anticorps secondaire. L'identification des anticorps optimaux est présentée dans la section suivante (section 3.4). Quatre candidats ont été retenus soient le trastuzumab et le pertuzumab qui sont des médicaments anti-cancéreux basés sur des anticorps ainsi que les anticorps monoclonaux épitope-spécifique MGR2 et MGR3 qui se lient tous à des épitopes différents de HER2. L'utilisation du trastuzumab et du pertuzumab pour la réalisation d'un essai sandwich peut en revanche causer des problèmes pour l'identification du ECD HER2 sanguin puisque les anticorps déjà liés à ces médicaments ne seraient pas détectés par le biocapteur.

Ce chapitre présente le travail réalisé sur chacune des techniques puis les défis de sa combinaison. Ainsi, les efforts de développement de l'aspect SPR du biocapteur vont premièrement être présentés. Ensuite, le travail quant au fonctionnement de l'aspect ECL de la technologie sera démontré. Finalement, il sera question des problématiques résultant de la combinaison de la SPR et l'ECL.

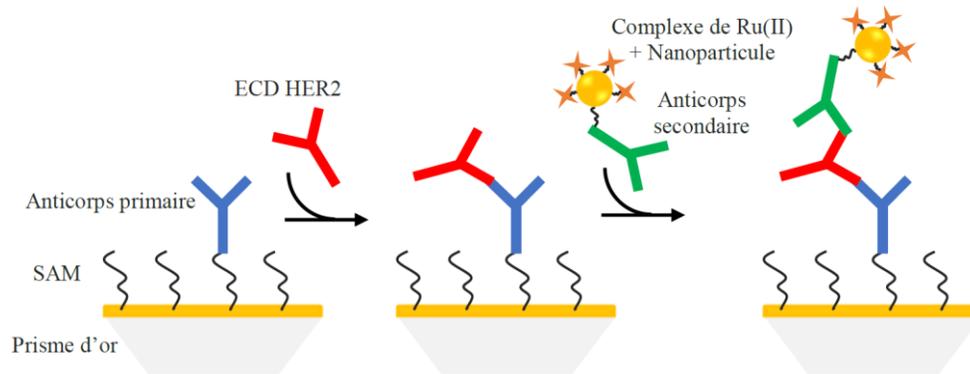


Figure 23. Schéma de l'essai sandwich du ECD HER2 pour une technologie combinant la SPR et l'ECL.

3.4 Résultats préliminaires – SPR

Ainsi, divers couples d'anticorps primaires et secondaires ont été testés pour le développement de l'essai sandwich du ECD HER2 en SPR. Parmi les diverses combinaisons possibles trois d'entre elles ont premièrement été réalisées. En premier lieu, la combinaison des anticorps MGR2 et MGR3 a été testée. (Tableau VIII) Cependant, son utilisation ne sera pas possible puisque l'emploi du MGR2 à titre de récepteur ne permet pas de réduire suffisamment l'adsorption non-spécifique du MGR3 à la surface du biocapteur. Le contrôle négatif avec le MGR3 a donné un signal SPR équivalent au contrôle positif. Ainsi, la distinction du signal provenant de la liaison du MGR3 au HER2 n'est pas possible. Ensuite, le trastuzumab a agi à titre de récepteur sur la monocouche auto-assemblée peptidique du récepteur. Les anticorps MGR2 et MGR3 ont pu être étudiés successivement puisqu'ils se lient à des épitopes différents et donc n'altèrent pas les résultats obtenus. (Tableau IX) Dans ce cas, l'essai est bel et bien concluant puisque l'utilisation de l'anticorps secondaire a permis d'accroître le signal comparativement à la liaison seule du HER2. De plus, le test d'adsorption non-spécifique a démontré que les anticorps MGR2 et MGR3 ne s'adsorbent pas à la surface en l'absence du ECD HER2 mais bien uniquement à l'analyte. Le MGR2 s'est avéré plus efficace que le MGR3 qui causait un déplacement SPR plus faible. De plus, le MGR3 n'est pas disponible commercialement ce qui complique son utilisation en laboratoire et son utilisation dans des applications commerciales.

Tableau VIII. Déplacements SPR pour l'essai sandwich du ECD HER2 avec l'anticorps MGR2 à titre de récepteur et l'anticorps MGR3 comme anticorps secondaire.

	MGR2 (Récepteur)	ECD HER2 (Analyte)	MGR3 (Anticorps secondaire)
Concentration	50 µg/mL	10 µg/mL	54 µg/mL
Essai standard	(2,1 ± 0,4) nm	(0,01 ± 0,04) nm	(1,7 ± 0,2) nm
Test d'adsorption non-spécifique	(4,4 ± 1,2) nm	-	(1,63 ± 0,01) nm

Tableau IX. Déplacements SPR pour l'essai sandwich du ECD HER2 avec le trastuzumab à titre de récepteur et les anticorps MGR2 et MGR3 comme anticorps secondaires.

	Trastuzumab (Récepteur)	ECD HER2 (Analyte)	MGR2 (Anticorps secondaire)	MGR3 (Anticorps secondaire)
Concentration	50 µg/mL	1 000 ng/mL	2 µg/mL	2 µg/mL
Essai standard	(7,3 ± 0,8) nm	(0,44 ± 0,06) nm	(1,5 ± 0,2) nm	(0,8 ± 0,1) nm
Test d'adsorption non-spécifique	(6,2 ± 0,1) nm	-	(0,01 ± 0,03) nm	(0,2 ± 0,1) nm

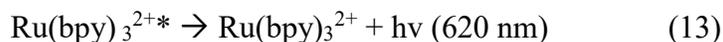
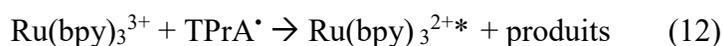
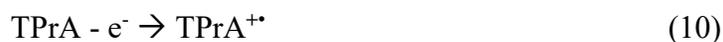
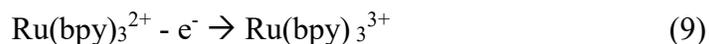
Dr. Stefano Tartaglia du CRO d'Aviano, Italie a ensuite pris la relève sur l'aspect du développement du biocapteur SPR. À la suite de l'essai des combinaisons d'anticorps restantes, il est parvenu à la conclusion que l'utilisation du pertuzumab et du trastuzumab permettait d'obtenir les meilleures performances analytiques. L'ajout d'une nanoparticule liée à l'anticorps secondaire a aussi permis d'accroître l'efficacité du biocapteur. C'est cette même nanoparticule

qui, pour la suite du projet, sera utilisée comme point d'attache pour le complexe de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ pour réaliser le couplage définitif de la SPR et l'ECL. Cependant, le choix de ces anticorps utilisés en tant que médicaments apporte des contraintes quant aux types de HER2 que l'essai sandwich est en mesure de quantifier. Les ECD HER2 préalablement liés à ces médicaments ne seront pas mesurés par l'essai développé. Ainsi, la concentration totale de HER2 présente dans le plasma d'une patiente ne pourra être connue mais bien la quantité qui n'est pas traitée par la médication.

Également, les performances de l'essai développé avec l'instrument P4-SPR a été comparée avec un appareil commercial soit le Biacore. Les résultats obtenus pour les deux technologies se sont avérés équivalents. Ainsi, les performances du P4-SPR ont pu être confirmées.

3.5 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ et co-réactifs

La découverte du tripropylamine (TPrA) en tant que co-réactif menant à l'électrochimiluminescence des complexes de ruthénium(II) a été faite en 1990 par Jonathan Leland.⁹² Depuis, le TPrA s'est inscrit comme le co-réactif de base pour le complexe $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ étant donné sa grande efficacité. Le mécanisme de fonctionnement de cette électrochimiluminescence est présenté à l'aide des équations 9 à 13. Ainsi, le complexe de ruthénium(II) ainsi que le TPrA sont oxydés électrochimiquement. Le produit de l'oxydation du TPrA (TPrA^{+}) possédant un temps de vie très court va rapidement se déprotonner au carbone- α et former un agent intermédiaire très fortement réducteur (TPrA^{\bullet}). Cet agent va donc réduire et exciter le complexe de ruthénium(III) qui va ensuite relaxer de manière radiative en éjectant un photon vers 620 nm.^{62, 67, 86}



Pour que le TPrA soit fonctionnel à titre de co-réactif, il est nécessaire qu'il soit dans un milieu aqueux possédant un pH au minimum de 5,5. Le pH optimal est d'environ 7,5. Cette contrainte rend le TPrA le candidat idéal pour la réalisation d'essai biologique étant donné que le pH optimal d'analyse correspond au pH des tampons biologiques généralement employés lors de tests immunologiques.^{62, 67} L'ajout de surfactants en solution permet d'accroître jusqu'à 50 fois l'intensité de l'ECL émise par le complexe métallique. L'efficacité de cet accroissement du signal dépend de la polarité de surfactant choisi.⁸⁶

Le couple de TPrA et de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ a été choisi pour cette expérience étant donné sa fiabilité reconnue et sa capacité à performer en milieu biologique. L'ajout de Tween 20 à titre de surfactant a aussi permis d'accroître la réponse lumineuse mais également d'améliorer la solubilité du TPrA.

3.6 Prototypage de l'instrument ECL

L'instrumentation nécessaire pour la réalisation d'électrochimiluminescence est assez simple. Un appareil d'électrochimie conventionnel composé de trois électrodes et d'un potentiostat ainsi que d'un photodétecteur (APD, caméra CCD, etc.) sont indispensables pour l'ECL. De plus, dans le cas de réactions par co-réactifs, la présence d'oxygène n'affecte que très peu les performances de luminescence du $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ ce qui facilite le développement d'un instrument ECL couplé à l'instrument du P4-SPR qui est présenté dans la section suivante.⁶⁷ Un des grands défis de cette hybridation des techniques vient du fait que l'instrument SPR est composé presque entièrement de matériaux conductibles accroissant alors considérablement les risques de courts-circuits du système ECL. Afin de réduire ce risque, certaines pièces ont été imprimées en polymère à l'aide d'une imprimante 3D et placées dans l'instrument à la place de celles en aluminium.

3.6.1 Électrodes

L'idée initiale consista au dépôt des électrodes à la surface du prisme SPR. Ainsi, le film d'or nécessaire à la réalisation de l'essai SPR serait également l'électrode de travail, ce qui concorde avec l'essai biologique développé puisque l'anticorps secondaire portant l'élément électrochimiluminescent serait tout près de cette électrode. Ainsi, trois électrodes furent

dessinées puis imprimées sur le prisme de verre servant de capteur pour la SPR en fonction de la conception de l'appareil P4-SPR. L'électrode de travail a dû s'inscrire sur les trois canaux d'analyse de l'instrument SPR afin d'avoir une meilleure stabilité des résultats SPR et un triplicata à chaque prise de mesure. La contre-électrode est faite en or alors que l'électrode de référence est en argent. Cette différence de métaux a causé un défi technique lors de la déposition des métaux par le pulvérisateur cathodique. Deux masques, un pour chacun des métaux employés, ont été conçus afin de permettre leur déposition appropriée et le bon fonctionnement des électrodes. (Figure 24A) Des rubans collants de Cu/Ni sont apposés sur ces électrodes imprimées afin de les relier au potentiostat.

À la suite du premier essai de ces électrodes innovatrices, une problématique oubliée fût remarquée. Il est nécessaire que la contre-électrode soit minimalement d'une surface 10 fois plus grande que l'électrode de travail du système électrochimique pour que cela fonctionne. La contre-électrode d'or imprimée fût alors mise de côté et un fil métallique de platine puis d'or fût employé et incorporé au système de fluide de l'appareil SPR. (Figure 24B)

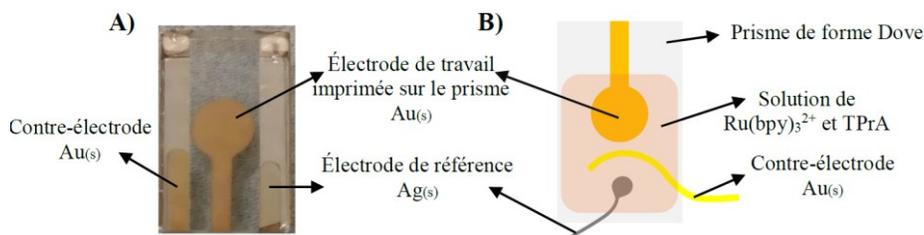


Figure 24. Électrodes imprimées sur le prisme SPR A) Première version, B) Schéma de la seconde version du trio d'électrodes employées lors des essais en ECL.

3.6.2 Cellules fluidiques

La première cellule fluide employée fût une chambre rectangulaire reliant tous les canaux analytiques et permettant de mettre en contact la solution de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ avec les trois électrodes. La contre-électrode fût insérée à l'intérieure de la cellule par l'entrée de la fluide dans la chambre. Cependant, à cause de la présence de Tween 20, un surfactant, dans la solution de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$, plusieurs bulles étaient formées et compliquaient considérablement les manipulations lors des injections. Par manque de temps, nous n'avons pas pu concevoir une nouvelle fluide permettant une meilleure cohabitation de la SPR et l'ECL mais il s'agit d'un

des projets pour la continuité de cette hybridation des techniques. Le prisme a plutôt été scellé dans le support afin de s'assurer que la solution ne s'infiltrait pas sous le prisme et ne bloquait les faisceaux lumineux essentiels à la SPR en absence de cellule fluidique. (Figure 24B)

3.6.4 Collection de la luminescence

La technique de collection de la lumière émise par le complexe de ruthénium(II) est primordiale pour le bon fonctionnement de l'essai d'ECL. En premier lieu, une photodiode à avalanche (APD) a été utilisée pour suivre la luminescence du $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$. (Figure 25B) Cependant, l'instrument optique semblait défaillant puisque nous étions capables de percevoir la luminescence à l'œil nu et que l'APD avait beaucoup de difficulté à la lire. La figure 25 illustre bien cette différence, d'un côté (figure 25A), le signal obtenu lors de l'électrochimiluminescence par l'APD est présenté alors que de l'autre (figure 25C), la photographie de ce que nous percevions à l'œil nu est présentée. Bien entendu, la variation de quelques unités de luminescence de l'APD qui se différencie à peine du bruit de fond n'est pas du tout normal pour ce type de technologie. Après l'ajustement du focus et des changements de lentilles, le problème n'a pas pu être réglé d'où l'hypothèse que l'APD est la cause de cette défaillance.

Ainsi, le détecteur a dû être changé. Une caméra de photographie de la marque Canon a alors été employée pour faire le suivi de la luminescence. (Figure 25D) Il est possible d'extraire l'intensité du signal lumineux à l'aide du logiciel *ImageJ* et ainsi de traiter adéquatement les photos prises lors de l'expérience. Cette technique permet d'obtenir des données d'excellente qualité comme le démontre la figure 25C présentant la luminescence de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 1 mM en présence de TPrA 15 mM. En plus de nous permettre de suivre le signal d'ECL, elle nous permet aussi d'observer l'environnement autour de celui-ci et particulièrement comment la source lumineuse nécessaire à la SPR vient possiblement interférer avec les mesures d'ECL. C'est alors cette technologie qui fût choisie pour vérifier la cohabitation des techniques SPR et ECL sur l'instrument développé. Cependant, une fois tous les phénomènes résultant du couplage de l'ECL et la SPR observés et compris, nous pourrions nous tourner vers une caméra scientifique pour réaliser les mesures d'ECL plutôt qu'une caméra de photographie afin d'accroître la sensibilité de la collection de l'ECL.

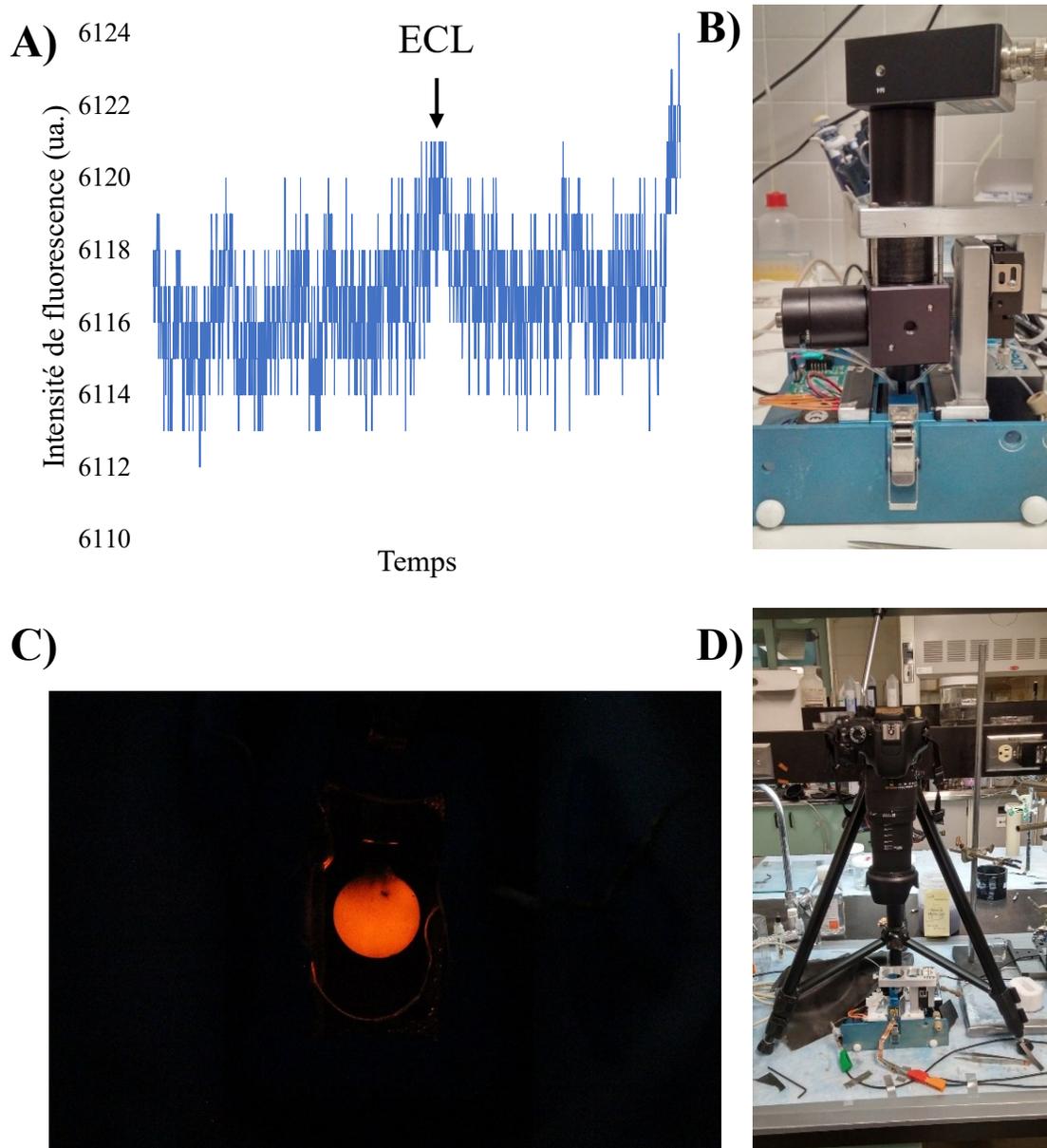


Figure 25. ECL en présence de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 1 mM. A) Signal numérique de l'APD, B) Montage de l'instrument composé du P4-SPR et d'une technologie d'ECL avec collection par APD, C) Photographie de la luminescence observée, D) Montage de l'instrument avec la caméra Canon pour collecter les photons émis.

3.7 Résultats préliminaires – ECL

Ainsi, en employant les diverses optimisations réalisées pour les électrodes, la cellule fluide ainsi que la collection de la luminescence, l'obtention de résultats d'électrochimiluminescence pour le complexe de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ en présence de son co-réactif, la tripropylamine, a été réalisé. La réaction est confirmée à l'aide de la voltampérométrie cyclique permettant l'oxydation du complexe de ruthénium(II) et du co-réactif (Figure 26) nécessaire afin que l'observation de luminescence soit possible. (Figure 25C)

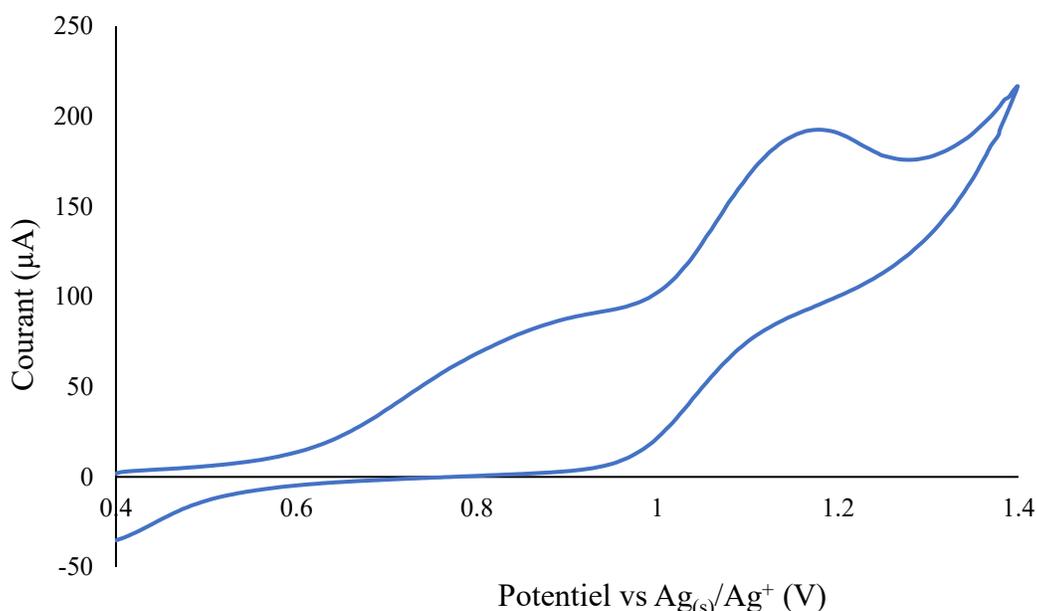


Figure 26. Spectre de voltampérométrie cyclique de la solution aqueuse de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 1 mM, TPrA 15 mM et Tween 20 2% vs Ag/Ag^+ . L'oxydation du $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ se situe à 1,2 V alors que la TPrA se fond dans celle de l'eau.

3.7.1 Combinaison de la SPR et l'ECL : Impact sur la SPR

Comme démontré préalablement dans la littérature, les plasmons de surface sont en mesure d'affecter l'ECL.⁸⁷⁻⁹¹ Ainsi, l'hypothèse que l'ECL est également en mesure d'interagir avec la SPR a été proposée et examinée. Les résultats SPR ont alors été observés lors des expériences d'ECL. En premier lieu, la forme de la bande plasmonique ne semble pas affectée lors de l'application de potentiel et lors de l'émission de luminescence. Ainsi, à première vue, les photons émis vers 620 nm par le complexe de ruthénium(II) ne semblent pas coupler avec les plasmons de surface du film d'or de l'électrode de travail excités vers 630 nm. Cependant,

lors de l'expérience, un déplacement bathochromique de la bande plasmonique se produit. (Figure 27) Un pic d'environ 6 nm apparaît lorsque le potentiel est appliqué puis le signal redescend mais à un niveau supérieur à celui précédent. L'augmentation accrue de la longueur d'onde d'absorbance des photons semble provenir de l'application d'un potentiel puisque, même dans une solution ne comptant pas d'agent électrochimiluminescent, ce saut est observé. L'accroissement du signal plafonnant à la suite du saut de la bande plasmonique et du phénomène d'ECL signifie possiblement que ce phénomène mène à l'obtention de molécules s'adsorbant à la surface d'or. L'origine de ces molécules n'a pas été identifiée mais il a été confirmé que cela ne provient pas de la solution tampon avec du Tween 20 puisque ce phénomène ne s'est pas présenté lors des contrôles de l'ECL.

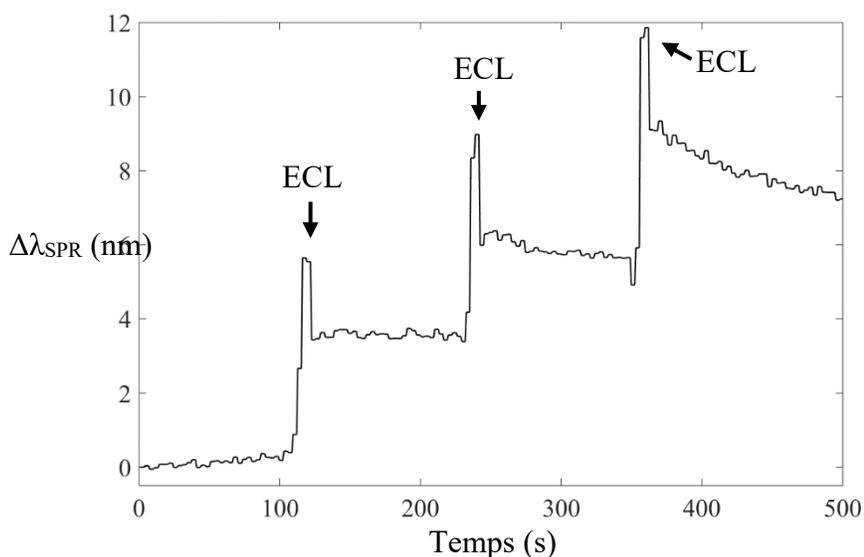


Figure 27. Spectrogramme SPR obtenu lors de l'électrochimiluminescence de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 1 mM, TPrA 15 mM et Tween 20 2% dans le PBS 1X.

L'interférence possible des lumières d'excitation des plasmons de surface est un élément important à vérifier quant à l'efficacité de l'acquisition de l'électrochimiluminescence du complexe de Ru(II). De la manière que l'instrument P4-SPR est programmé, il est possible d'illuminer tous les canaux d'analyse successivement ou uniquement un d'entre eux en permanence. Pour les expériences réalisées, les canaux furent illuminés en alternance pour pouvoir observer leur effet sur l'observation de la luminescence. Le premier élément à noter est le fait que seuls les canaux du milieu (B et C) mènent à l'obtention d'une bande plasmonique

adéquate dû à la forme de l'électrode de travail d'or conçue. L'analyse de l'illumination des canaux aux extrémités (A et D) n'est donc pas pertinente. Étant donné les maintes conditions pouvant affecter l'efficacité des canaux B et C dont la taille du prisme de forme Dove, la déposition de l'électrode de travail par pulvérisation cathodique et l'appareil SPR employé, l'analyse suivante, afin de déterminer lequel des deux canaux est optimal, est unique à chaque cas. En observant la figure 28 comparant les résultats d'ECL selon l'illumination des canaux SPR B et C, il est possible de conclure que le canal C semble optimiser la collection de la luminescence dans ce cas-ci. Le signal de fond pour le canal B (figure 28A) est bien plus important que celui du canal C (figure 28C) et l'illumination par ECL est plus forte dans le canal C (figure 28D) que B (figure 28C). De plus, le canal C était mieux que le canal B pour l'obtention de résultats SPR sensibles.

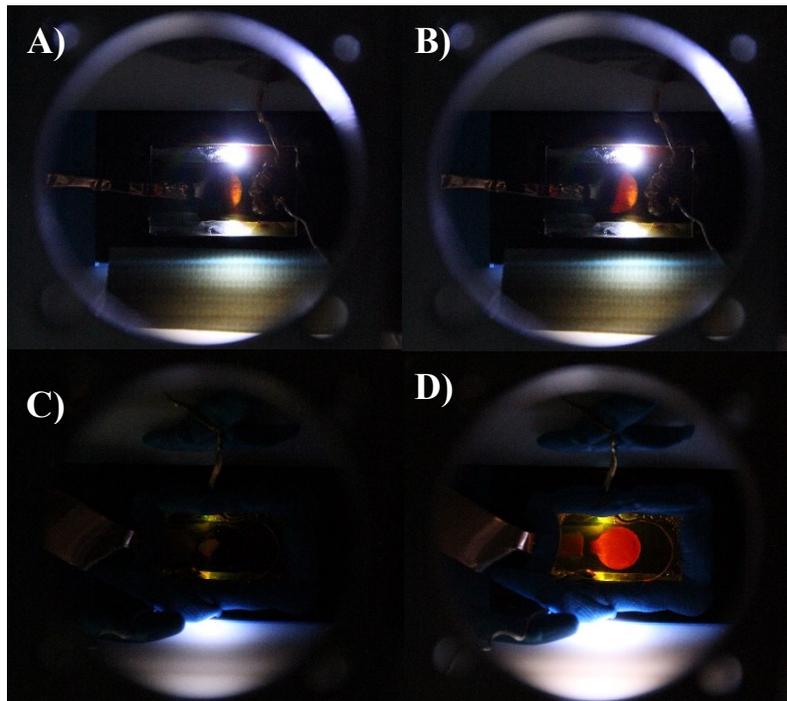


Figure 28. Comparaison des canaux SPR afin d'optimiser la collection de la luminescence de l'ECL. Canal B : A) Bruit de fond causé par l'illumination du canal B du SPR, B) Lecture de l'ECL lors de l'illumination du canal B. Canal C : C) Bruit de fond causé par l'illumination du canal C du SPR, D) Lecture de l'ECL lors de l'illumination du canal B.

Ainsi, afin d'accroître la collection de l'ECL, de minimiser l'interférence lumineuse provenant de l'instrument SPR ainsi que d'augmenter la sensibilité de l'essai SPR, le canal C a

été choisi pour la poursuite des études. Les prochaines étapes consistent à la réalisation d'un étalonnage en ECL afin de s'assurer que la méthode de détection employée est fonctionnelle à de plus faibles concentrations de complexe de ruthénium(II).

3.7 Conclusion

Lors de ce chapitre, les innovations quant au développement d'un nouveau biocapteur couplant les technologies de la spectroscopie de résonance des plasmons de surface ainsi que l'électrochimiluminescence ont été présentées. Ce biocapteur combiné est essentiel puisque les techniques actuelles de détection des cancers du sein ne sont pas efficaces. Le domaine extracellulaire du HER2 fût alors choisi à titre de biomarqueur dû à sa surexpression sanguine lors de maints cancers du sein avec métastases. Ce type d'instrument hybride est un des premiers développés et appliqués pour la biodétection au meilleur de mes connaissances. Un système réalisant les analyses SPR et ECL consécutives existe déjà mais ne s'adaptait pas au biocapteur désiré. En premier lieu, un essai sandwich SPR a été développé en collaboration avec Stefano Tartaglia du CRO Aviano. De mon côté, après une première optimisation de l'essai, un capteur employant le trastuzumab comme récepteur ainsi que les anticorps MGR2 et MGR3 comme anticorps secondaires s'est avéré fonctionnel. Le travail afin de continuer cette optimisation de Stefano Tartaglia a ensuite permis de mener à un essai sandwich où l'analyte se trouve entre le trastuzumab et le pertuzumab et qui a été testé sur le P4-SPR ainsi que le Biacore. En second lieu, l'appareil hybride a été construit puis vérifié à l'aide d'un système ECL. Le couple du complexe $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ ainsi que la tripropylamine a été sélectionné à cause de son efficacité prouvée et son potentiel à émettre de la luminescence en milieu biologique. Finalement, l'optimisation de ce premier prototype comportait une électrode de travail imprimée sur le prisme et agissant à titre de film d'or plasmoniquement actif ainsi qu'une électrode de référence et une contre-électrode baignant dans la solution du complexe luminescent et son co-réactif déposée sur le prisme bien étanche. L'ECL du complexe de ruthénium(II) fût par la suite collectée par une caméra de photographie. Ce système fit ses preuves en permettant d'observer l'électrochimiluminescence et le voltampérogramme attendus. En utilisant ce type de caméra plutôt qu'un détecteur standard, il est possible d'observer tout l'environnement autour de cet instrument hybride et non uniquement de collecter les photons émis. C'est ainsi que le canal C

a été déterminé comme optimum pour les tests SPR et ECL dans les conditions instrumentales employées pour réaliser les tests.

Maintenant que le couplage entre la SPR et l'ECL a été démontré, il reste encore certaines améliorations à apporter à l'instrument SPR & ECL avant de permettre la réalisation de la quantification du ECD HER2 via un biocapteur basé sur un essai sandwich détecté par SPR et ECL simultanément. Parmi ceux-ci, on compte l'utilisation d'un détecteur analytique plutôt qu'une caméra de photographie, la réalisation d'une courbe de calibration du complexe ainsi que son implémentation à l'essai SPR déjà existante.

4 Chapitre 4 : Développement d'un biocapteur pour la détection de la vancomycine dans le cadre de la compétition étudiante internationale SensUs

4.1 Compétition internationale SensUs

SensUs est une compétition internationale étudiante visant le développement de biocapteurs pour l'amélioration de la santé mondiale. La compétition SensUs se déroule annuellement à l'Université technologique d'Eindhoven à Eindhoven aux Pays-Bas et fût fondée en 2016 par le Pr. Menno Prins. Elle vise l'encouragement du développement de biocapteurs innovateurs permettant la personnalisation des traitements médicaux et ce dans une atmosphère amicale et éducative. Cette médecine individuelle passe inévitablement par les biocapteurs permettant le suivi de la santé du patient à l'aide de systèmes portables et précis. Chaque année, un enjeu médical international ainsi que son biomarqueur sont sélectionnés pour la compétition. Ainsi, les étudiantes et les étudiants travaillent en collaboration avec les milieux académique et industriel afin de développer un biocapteur innovateur pour la santé publique mondiale. Ces biocapteurs sont jugés par des membres de la communauté académique, industrielle et hospitalière sur plusieurs facettes dont leur performance analytique, leur potentiel de commercialisation ainsi que leur aspect créatif. Au cours des éditions précédentes, le nombre d'équipes représentant leur pays passa de 5 à 10 en moins de deux ans et la créatinine ainsi que le biomarqueur NT-proBNP des maladies cardiaques ont été ciblés. Grâce à la compétition SensUs, les étudiantes et étudiants sont amenés à échanger socialement et scientifiquement tout en développant des collaborations internationales.

4.1.1 Présentation de SensUs 2018

Dans le cadre de SensUs 2018, 13 équipes de partout dans le monde représentant plus de 150 étudiantes et étudiants des premier et deuxième cycles se sont retrouvées à Eindhoven. La compétition visait le développement d'un biocapteur innovateur permettant le suivi de la vancomycine, antibiotique de dernier recours. La problématique entourant l'accroissement de

la résistance aux antibiotiques par les bactéries a mené à ce projet puisqu'un suivi personnalisé du traitement des patients permettrait de ralentir ce fléau mondial. C'est ainsi que les équipes ont travaillé durant une année complète sur ce projet.

SensUs 2018 voulait également amener les étudiantes et étudiants à penser plus loin, à adapter leur prototype aux besoins du milieu et à réfléchir au côté entrepreneurial du développement d'un biocapteur. Ils ont donc porté une attention particulière à l'interaction entre les étudiantes et étudiants et les compagnies. Un événement de réseautage et d'ateliers ainsi que des conférences sur le développement de startups ont été présentés au campus des hautes technologies d'Eindhoven (*High Tech Campus Eindhoven*).

L'organisation de SensUs impose plusieurs paramètres quant au développement du biocapteur afin de l'actualiser au maximum. Ainsi, des contraintes de temps (maximum de 5 minutes par échantillon), de quantité (volume maximal de 20 μ L et dilution maximale de 10 fois) et de taille (80 cm x 80 cm x 50 cm) ont notamment été imposées.

4.1.2 Présentation de BiosensUM 2018

L'équipe BiosensUM de l'Université de Montréal, Polytechnique Montréal et HEC Montréal représentant le Canada participa pour la première fois à la compétition SensUs en 2018. Il s'agit d'une équipe multidisciplinaire composée d'étudiantes et étudiants provenant de divers domaines scientifiques : chimie, biochimie, physique, information, génie biomédical, génie chimique et du domaine des affaires. Ces 10 étudiantes et étudiants proviennent des premier et deuxième cycles. Les membres, leur titre ainsi que leur apport respectif sont présentés dans le tableau X. (Figure 29) BiosensUM développa un biocapteur nommé FlowsensUM capable de détecter la vancomycine plasmique.

BiosensUM fût supporté par plusieurs organismes universitaires tant financièrement que scientifiquement pour lui permettre de participer à SensUs 2018. Parmi ceux-ci, nous comptons le Vice-rectorat aux études et affaires étudiantes de l'Université de Montréal, le Vice-rectorat aux affaires internationales et à la Francophonie de l'Université de Montréal, la Faculté des arts et sciences de l'Université de Montréal, le Département de chimie de l'Université de Montréal, l'Institut de recherche en immunologie et en oncologie de l'Université de Montréal, le Département de génie chimique de Polytechnique Montréal, le Département de physique de

l'Université de Montréal, le Département de biochimie et médecine moléculaire de l'Université de Montréal, le Département d'informatique et de recherche opérationnelle de l'Université de Montréal, la Fondation ASEQ, le Centre de chimie en flux continu (programme FONCER) de l'Université de Montréal ainsi que sa coordonnatrice scientifique, Vanessa Kairouz, le Centre régional de spectrométrie de masse du Département de chimie de l'Université de Montréal ainsi que nos deux partenaires industriels, *Creative Diagnostics* et *ALine microfluidic solutions*.

Tableau X. Présentation des membres de BiosensUM 2018 ainsi que leurs principales tâches effectuées dans le projet.⁹³

Nom	Titre	Contribution principale
Marie-Pier Dinel	Cheffe d'équipe	Supervise tous les aspects du projet et participe activement aux analyses en laboratoire
Madline Sauvage	VP Sciences	Participe activement aux analyses analytiques en laboratoire
Jean-Antoine Gauthier Cyr	VP Technologies	Fait le lien entre l'équipe scientifique et l'équipe technologique
Zoubaire Moustaine	VP Ingénierie	Spécialiste en microfluidique
Antoine Nkaye	VP Entrepreneuriat	Principal responsable de l'aspect entrepreneurial du projet
Frédéric Fournelle	Membre de l'équipe scientifique	A participé au développement du biocapteur et aux tests en laboratoire
Elizabeth Elder	Membre de l'équipe scientifique	Impliquée dans le développement de l'essai et l'écriture scientifique
Laurianne Gravel Tatta	Membre de l'équipe scientifique	Conception de l'essai et développement des protocoles analytiques
Abdelhakim Qbaich	Membre de l'équipe technologique	Spécialiste en programmation
Godefroy Borduas	Membre de l'équipe technologique	A participé à la conception et l'écriture du système d'acquisition de données
Pr. Jean-François Masson	Superviseur	A aidé avec les aspects scientifiques, technologiques et entrepreneuriaux
Pr. Delphine Bouilly	Collaboratrice	A aidé avec les aspects scientifiques



Figure 29. Équipe BiosensUM 2018 et leur prototype FlowsensUM. De la gauche vers la droite : Marie-Pier Dinél, Antoine Nkaye, Laurianne Gravel Tatta, Elizabeth Elder, Frédéric Fournelle, Madline Sauvage, Godefroy Borduas, Zoubaire Moustaine, Abdelhakim Qbaich et Jean-Antoine Gauthier Cyr.
Crédit photo : Bart van Overbeeke.

4.1.3 Mon apport à BiosensUM

Le projet de SensUs 2018 s’inscrivait parfaitement dans mon cheminement universitaire étant donné la thématique ainsi que le biomarqueur choisi. Puisque les travaux principaux de ce mémoire portaient sur le développement d’un biocapteur SPR pour une famille d’antibiotiques, le développement d’un biocapteur pour l’antibiotique vancomycine me semblait un défi tout fait dans mes cordes. Étant donné mon expérience dans le domaine, ma présence aux cycles supérieurs, mon accès aux différentes plateformes du Département de chimie ainsi que mon leadership démontré par mon implication étudiante et sportive, j’ai été sélectionnée à titre de cheffe d’équipe de BiosensUM 2018. En plus de m’assurer du suivi administratif et financier de l’équipe, j’ai passé plusieurs mois à travailler exclusivement sur le projet de BiosensUM au laboratoire. J’ai participé activement au développement de l’essai biologique ainsi que la méthode de détection, j’ai synthétisé, purifié et caractérisé le compétiteur fluorescent, j’ai agi à titre de point d’ancrage pour les différentes sections de notre équipe afin que la communication intra-équipe soit adéquate et efficace, j’ai travaillé en laboratoire avec des membres de l’équipe scientifique et technique afin de réaliser les tests analytiques pour notre biocapteur, j’ai travaillé

avec l'équipe entrepreneuriale afin de déterminer les besoins du marché et je me suis assurée des communications et de la publicisation de BiosensUM auprès des réseaux sociaux et des plateformes d'information québécoises telles LaPresse+. Mon apport à BiosensUM 2018 tant au niveau de la gestion de l'équipe que scientifiquement est significatif et suffisant pour que ces travaux soient présentés dans ce mémoire.

Dans le cadre de ce projet, j'ai notamment écrit un article de vulgarisation scientifique concernant les mesures gouvernementales prises afin de freiner la résistance antimicrobienne qui s'avère représenter une problématique mondiale cruciale.⁹⁴ (Annexe C – «Contrer ces bactéries qui résistent», Marie-Pier Dinel)

4.2 Méthode expérimentale

4.2.1 Synthèse, purification et caractérisation de la vancomycine-FITC

La vancomycine hydrochlorée (40 mg, 27,6 μmol , 1 Éq.) est solubilisé dans du diméthylsulfoxyde (1 mL) et mis sous agitation dans un vial fermé. Du bicarbonate de sodium (3,4 mg, 0,9 Éq.), de l'isothiocyanate de fluorescéine (10,7 mg, 1 Éq.) et de l'eau (1 mL) sont ajoutés au mélange. La solution orangée est agitée toute la nuit puis analysée par spectrométrie de masse afin de s'assurer de la formation de la vancomycine-FITC ($[\text{M}+2\text{H}]^{2+} = 920,9 \text{ m/z}$) (Annexe D – Caractérisation de la vancomycine-FITC). La vancomycine-FITC est purifiée par chromatographie liquide en mode préparatif utilisant la colonne XSelect@HSS PFP OBD 5 μm 19 mm x 100 mm. L'élution utilisée est de 24 mL/min passant de 30 : 70 à 70 : 30 MeOH : H₂O + acide formique 0,1% en 11 minutes. La collection de la vancomycine-FITC se fait selon le fragment de $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ de 920,9 m/z.

Les spectres d'émission et d'excitation de la vancomycine-FITC ont été pris dans un mélange de 10 mg/L dans un tampon de phosphate 0,1 M, chlorure de sodium 0,15 M, Tween 0,05% à un pH de 7,2 avec 6% d'éthanol. L'émission de la vancomycine est testée dans les mêmes conditions.

4.2.2 Test 96-puits

Incuber l'anticorps monoclonal anti-vancomycine (Invitrogen, # MA1-25796) (6 µg/mL dans le tampon de recouvrement de carbonate de sodium 0,2 M à un pH de 9,4) pendant toute une nuit sous agitation à 4°C avec la plaque 96-puits en polystyrène avec fond plat et opaque entre les puits. La plaque est lavée sous agitation à trois reprises pendant 5 minutes avec le tampon de lavage phosphate 0,1 M, chlorure de sodium 0,15 M et Tween 0,05% à un pH de 7,2. La plaque est incubée une nuit à 4°C avec le tampon de blocage (tampon de lavage + 2% BSA). Ensuite, trois lavages avec du tampon de lavage sous agitation sont réalisés. Un triplicata de la gamme d'étalonnage de la vancomycine-FITC (0,01 mg/mL à 0,1 mg/mL) est incubé sur la plaque pendant une heure sous agitation et dans le noir. La plaque est agitée pendant cinq minutes avec le tampon de lavage à trois reprises. Finalement, les tests de fluorescence sont réalisés dans le tampon de lavage.

4.2.3 Microscopie

La plaque de verre est lavée dans l'éthanol puis dans de l'eau. Elle est incubée dans une solution de poly-L-lysine 0,01% pendant 30 minutes à température ambiante. La plaque est séchée au four à 60°C pendant une heure. L'anticorps monoclonal anti-vancomycine (6 µg/mL dans du PBS 1X) est incubé pendant une nuit sous agitation à 4°C. La plaque est lavée à trois reprises pendant 5 minutes avec le tampon de lavage PBS 1X avec du Tween 0,05%. Le tampon de blocage (tampon de lavage + 2% BSA) est ajouté et agité pendant une heure à température ambiante. La plaque est lavée à trois reprises avec le tampon de lavage pendant 5 minutes. Les solutions de vancomycine et de vancomycine-FITC sont incubées avec la plaque dans le tampon de lavage pendant une nuit sous agitation à 4°C dans le noir. Des concentrations de 10 mg/L à 100 mg/L sont employées pour la vancomycine alors que la concentration de vancomycine-FITC est fixée à 65 mg/L pour tous les échantillons. La plaque est lavée trois fois avec le tampon de lavage puis laissée sécher à température ambiante. La plaque passe maintenant au microscope de fluorescence où le pourcentage de l'aire de la surface qui est fluorescente est analysé.

4.2.4 Tests sur le prototype

Une solution de EDC/NHS (4 mg/8 mg) dans du tampon MES 0,5 M à un pH de 6,3 (500 μ L) est ajoutée aux billes de polystyrène fonctionnalisées avec des groupements carboxyliques (100 μ L, 25 mg/10 mL) et incubée sous agitation pendant 45 minutes à température ambiante. Les billes sont ensuite lavées avec du tampon PBS 1X avant d'être resuspendues dans une solution d'anticorps monoclonal d'anti-vancomycine (100 μ g) dans du PBS 1X. La solution est incubée à température ambiante pendant 3 heures sous agitation. Les billes sont lavées comme précédemment puis resuspendues avec 200 μ L de glycine 25 mM dans du PBS 1X pour 30 minutes. Les billes sont lavées puis resuspendues dans du PBS 1X puis conservées pour une journée.⁹⁵

Les billes fonctionnalisées avec les anticorps (10 μ L) sont injectées dans la microfluidique. Du tampon est injecté afin de s'assurer que les billes soient bien placées dans la zone de détection. Un mélange de vancomycine et de vancomycine-FITC est injecté dans la fluidique avec un flux d'environ 20 μ L/s pendant 20 secondes. Un temps de réaction de 3 minutes est nécessaire avant de laver avec du PBS 1X. Des concentrations de 10 mg/L à 100 mg/L sont employées pour la vancomycine alors que la concentration de vancomycine-FITC est fixée à 65 mg/L pour tous les échantillons. La microfluidique est ensuite insérée dans le prototype afin de récolter la fluorescence émise.

4.3 Biocapteur

L'importance de la création d'un biocapteur pour la vancomycine s'explique par son étroite gamme thérapeutique (entre 10 mg/L et 20 mg/L). Ainsi, lorsque les doses médicales excèdent ces recommandations, de sévères effets secondaires apparaissent. Et inversement, si le traitement est à de trop faibles concentrations, l'antibiotique ne sera pas efficace et les bactéries vont développer une résistance à cet antibiotique de dernier recours, ce qui n'est pas du tout désiré. Traditionnellement, la vérification du dosage ne se fait qu'avant la réception de la quatrième dose ce qui est très tardif dans le traitement. Cela s'explique par l'inefficacité des méthodes de quantification de la vancomycine en milieu hospitalier. Ainsi, BiosensUM a voulu développer un biocapteur portatif, rapide et sensible afin de régler ces problématiques.

4.3.1 Design de l'essai biologique

Un essai compétitif de fluorescence fût développé pour permettre la détection de la vancomycine plasmique. Une gamme dynamique de 1 mg/L à 100 mg/L est visée afin de s'assurer d'englober la gamme thérapeutique. Ainsi, la compétition se produit pour un anticorps monoclonal anti-vancomycine fixé sur des microbilles de polystyrène. Une vancomycine fluorescente synthétisée, la vancomycine-isothiocyanate de fluorescéine (FITC), entre en compétition avec la vancomycine de l'échantillon qui ne génère pas de fluorescence à la longueur d'onde d'excitation employée (480 nm). (Figure 30) Un suivi de la concentration de vancomycine plasmique est alors possible en suivant la fluorescence de l'essai qui, en présence croissante de vancomycine, va diminuer.

4.3.2 Présentation de l'instrument développé

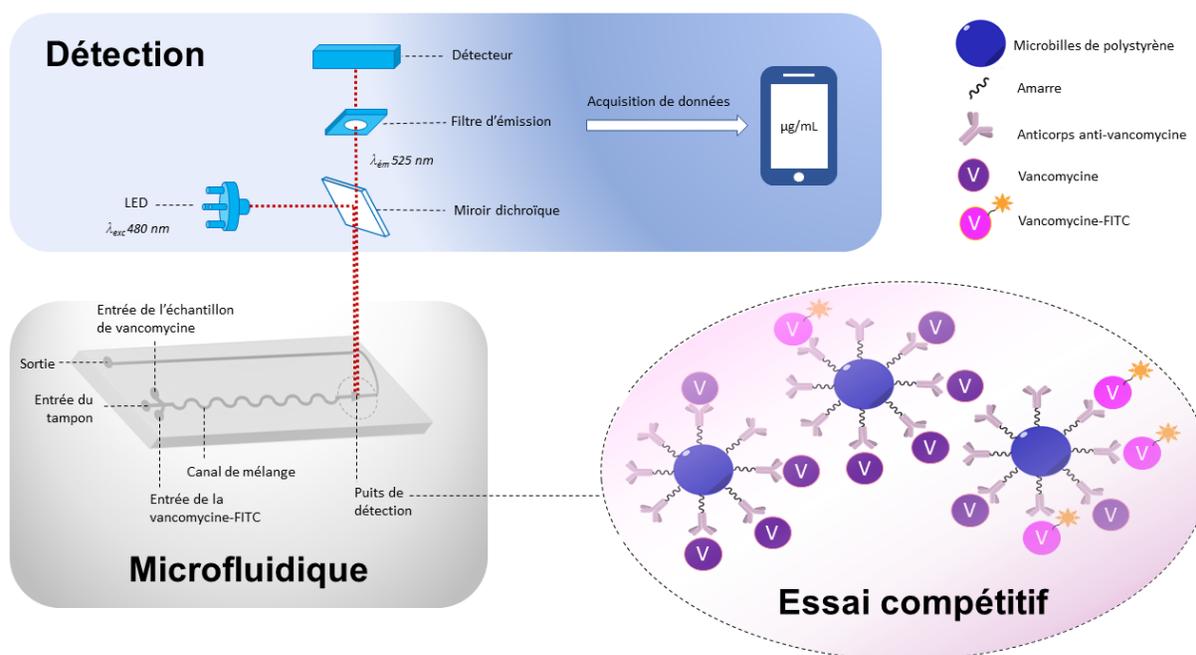


Figure 30. Schéma du biocapteur pour la vancomycine développé par BiosensUM. Un essai compétitif entre l'échantillon de vancomycine et la vancomycine fluorescente synthétisée tient place dans la microfluidique. La fluorescence est activée par l'utilisation d'une photodiode puis collectée par le détecteur.⁹³

Afin de réaliser le suivi de la fluorescence de la vancomycine-FITC et donc de la concentration de vancomycine plasmique, BiosensUM a développé un appareil de détection. Celui-ci est composé de trois parties principales soient la microfluidique où l'essai compétitif prend place, la tête de fluorescence où la réponse de l'essai est collectée ainsi que le matériel informatique permettant la conversion numérique et l'interprétation des données. Finalement, la concentration mesurée de vancomycine de l'échantillon s'affiche sur une application mobile permettant le suivi des dossiers médicaux des patients. (Figure 30)

4.3.2.1 Microfluidique

L'utilisation d'une microfluidique à usage unique pour notre biocapteur comporte plusieurs avantages économiques et scientifiques. Un tel support mène à la réduction du volume d'échantillon et de réactifs nécessaire permettant de rencontrer certains critères de chimie verte et de réduire le coût d'utilisation de notre technologie tout en accroissant la rapidité de l'essai.⁹⁶ La microfluidique de notre prototype FlowsensUM a été conçue afin d'accueillir les microbilles portant l'essai compétitif fluorescent et de les piéger dans la zone de détection. Les dimensions de la microfluidique font en sorte que les billes de 60 μm demeurent au site de détection puisqu'elles ne sont pas en mesure de continuer dans le conduit dû à la diminution de sa hauteur. La microfluidique dessinée comporte trois ports d'entrée permettant l'injection de l'échantillon de vancomycine, de la vancomycine-FITC compétitrice ainsi que le flux continu de tampon dans celle-ci. La présence de flux continu permet de diminuer le nombre de manipulations à réaliser et l'automatisation du tout. L'utilisation de valves d'injection ainsi que le développement d'un pousse-seringue automatisé auraient permis la réalisation de cela. Cependant, BiosensUM n'a pas eu le temps d'implanter toutes ces technologies sur l'appareil. Le pousse-seringue fût construit et les valves préparées mais une surpression dans les microfluidiques dû au type d'entrées a empêché l'utilisation de ce matériel et du principe de flux continu pour les tests analytiques. À la suite de l'injection des divers réactifs, les canaux s'unifient et passent dans le canal de mélange permettant aux réactifs d'arriver à des concentrations constantes au puits de détection où se situe les microbilles porteuses du récepteur. (Figure 31)

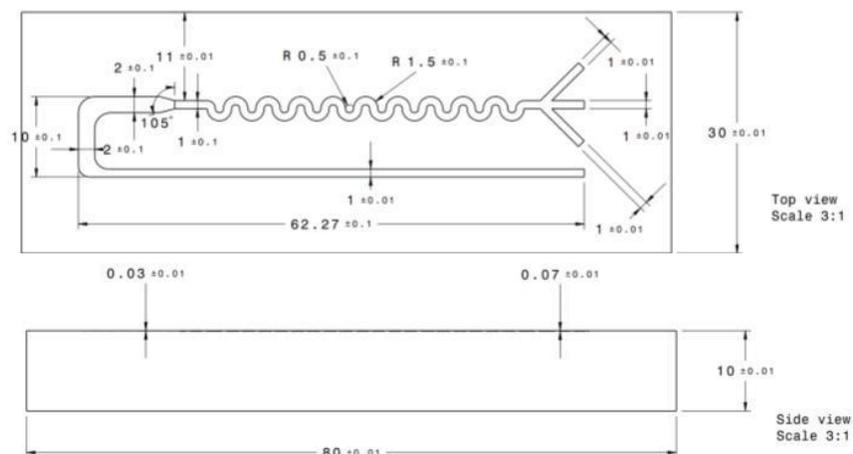


Figure 31. Schéma de la microfluidique développée.⁹³

Les microfluidiques ont été dessinées par BiosensUM et usinées par *Aline Microfluidic Solutions* via un processus de couche par couche. Elles ont également été recouvertes afin d'accroître le signal de fluorescence de l'essai d'un mélange de copolymères de cyclo-oléfines.⁹⁷

4.3.2.2 Tête de fluorescence

La microfluidique est insérée dans l'instrument afin de lire la fluorescence émise par la vancomycine-FITC compétitionnant avec la vancomycine pour la liaison à l'anticorps. Une photodiode de 480 nm accompagnée d'un collimateur est employée afin de focaliser sur le puit de détection comportant les microbilles à la suite d'une réflexion sur le miroir dichroïque. La fluorescence émise par la vancomycine-FITC est ensuite récoltée par le détecteur après avoir traversé le miroir dichroïque. En premier lieu, le détecteur était une photodiode à avalanche (APD) qui transformait tout le signal reçu et ce indépendamment de la longueur d'onde en signal électrique. (Figure 32A) Cependant, à la suite d'une erreur humaine, le détecteur APD a subi une surtension lorsque BiosensUM était aux Pays-Bas et ce la veille de la compétition analytique. C'est ainsi qu'un second prototype fût développé à la dernière minute. La caméra d'un téléphone intelligent a été employée afin de capter la fluorescence émise par la vancomycine-FITC et d'en déduire la concentration de vancomycine de l'échantillon de plasma humain. (Figure 32B)

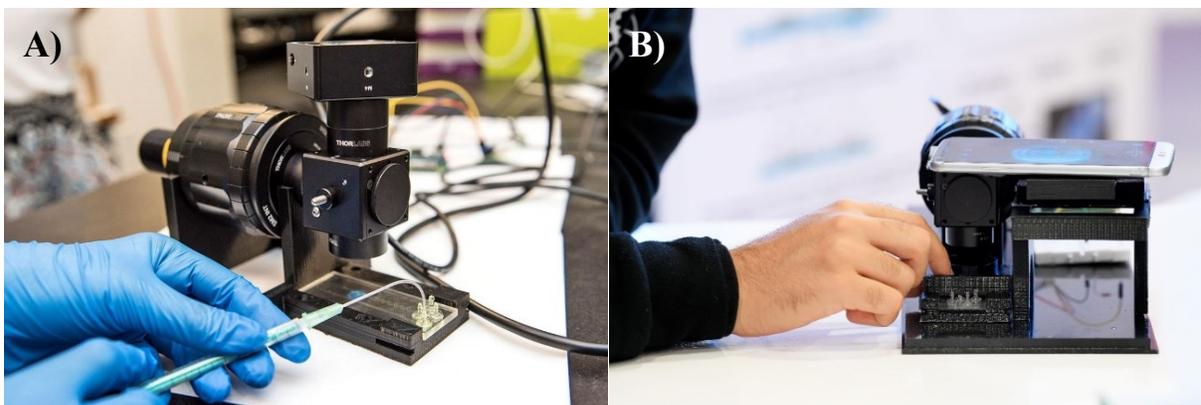


Figure 32. Prototypes du FlowsensUM A) Version initiale avec une photodiode à avalanche (APD), B) Version d'urgence avec une caméra de téléphone cellulaire. Crédits photo : A) Amélie Philibert, B) Bart van Overbeke.

4.3.2.3 Programmation – Application mobile

Pour le premier prototype, une fois que l'information analytique était transformée en signal électrique par l'APD, elle était lue par un oscillateur digital puis entreposée dans le Raspberry Pi. C'est ce micro-ordinateur qui réalisait les calculs de conversion du signal de fluorescence en concentration de vancomycine et qui les transférait à l'application mobile développée par BiosensUM. Cette application permettait de contrôler entièrement l'instrument en passant par l'allumage de la photodiode, la réception des concentrations de vancomycine et même le suivi des patients. (Figure 33) Pour le second prototype, puisque le tout a été développé la veille de la compétition, le travail n'est pas aussi exhaustif et complet que le premier. L'application a dû être abandonnée à cause du manque de temps pour la reprogrammation de celle-ci. Les images de la caméra cellulaire ont été traitées de manière à produire une matrice RGB (Rouge, Vert, Bleu – *Red, Green, Blue*) où l'intensité des pixels verts, correspondant à l'émission de la fluorescence vers 525 nm, a été extraite. Un étalonnage de cette intensité en fonction de la concentration de vancomycine de l'échantillon a alors été réalisé.

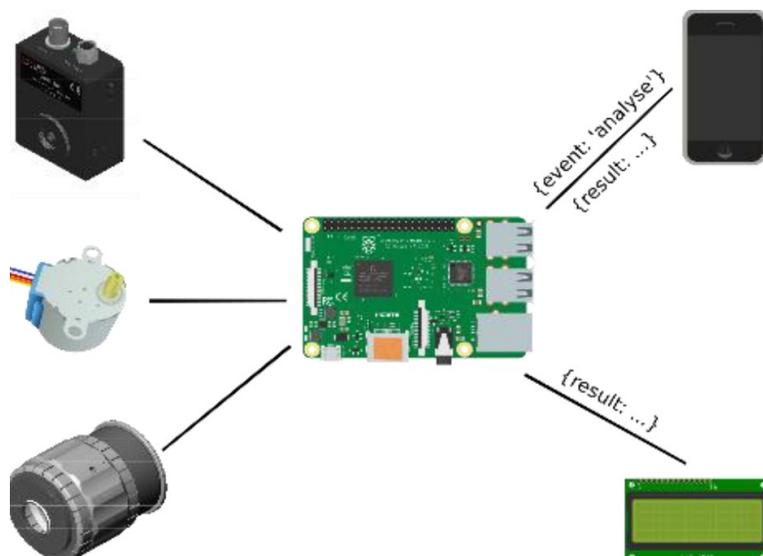


Figure 33. Schéma du système informatique d'acquisition et de traitement des données. Les éléments à gauche du Raspberry Pi sont contrôlés à partir de celui-ci alors que ceux à droite représentent les différentes manières d'affichage des résultats de l'essai compétitif.⁹³

4.3.3 Développement de l'essai compétitif

4.3.3.1 Synthèse et caractérisation de la vancomycine-FITC

La vancomycine-FITC nécessaire à l'essai compétitif a été synthétisée par une réaction spontanée en solution basique.⁹⁸ L'unique amine primaire présente sur un glucide de la vancomycine réagit avec le groupement isothiocyanate de l'isothiocyanate de fluorescéine pour former un groupement d'isothiourée. (Figure 34) La vancomycine-FITC est ensuite purifiée par chromatographie liquide en mode préparatif jusqu'à un taux de pureté de 98%. (Section 4.2.1) Elle a également été caractérisée par spectrométrie de masse (Annexe D – Caractérisation de la vancomycine-FITC) et par fluorescence. (Figure 35) Tel qu'attendu, les spectres d'excitation et d'émission de la vancomycine-FITC ont été pris et ont permis de déterminer les longueurs d'onde optimales comme étant 480 nm pour l'excitation et 525 nm pour l'émission. Du même coup, la non-émission de la vancomycine à la suite d'une excitation à 480 nm ainsi que celle du plasma humain ont été confirmées. Ainsi, la vancomycine marquée par le fluorophore FITC est synthétisée et purifiée avant d'être employée comme compétiteur pour le biocapteur de vancomycine.

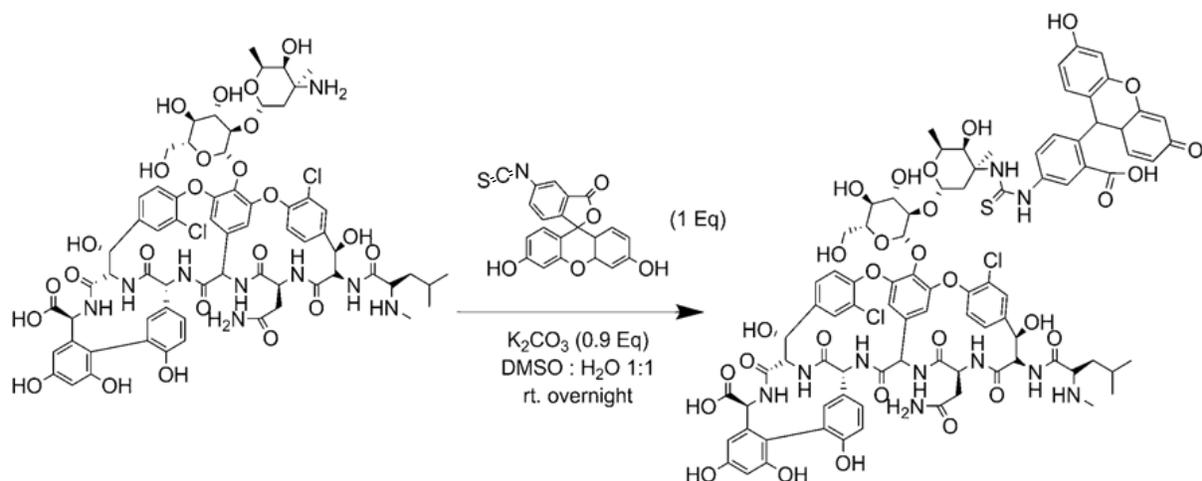


Figure 34. Schéma de synthèse de la vancomycine-FITC développée à partir des travaux de Supuran.^{93, 98}

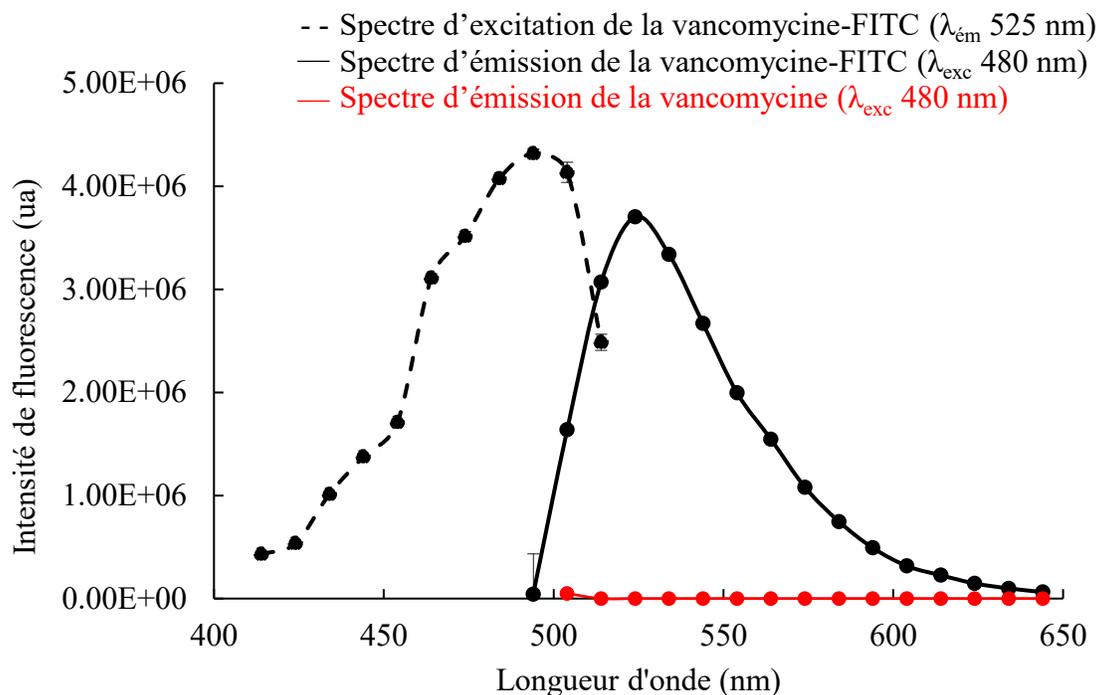


Figure 35. Spectres de fluorescence de la vancomycine-FITC dans le tampon d'analyse et spectre d'émission de la vancomycine excitée à 480 nm.⁹³

4.3.3.2 Fluorimétrie – 96 puits

En premier lieu, la liaison de la vancomycine-FITC au récepteur a été confirmée. Une courbe d'étalonnage permettant de déterminer la sensibilité de la réponse de la vancomycine-

FITC a été réalisée en fluorimétrie avec un appareil commercial de 96 puits. (Figure 36) Ainsi, il est confirmé que la vancomycine-FITC est en mesure de se lier à l'anticorps monoclonal anti-vancomycine tout comme la vancomycine et qu'un essai compétitif peut alors être fait. Le fluorimètre employé pour cette expérience ne permettait pas d'ajuster le focus en z du point de la détection et était construit pour la détection d'ELISA (méthode immuno-enzymatique ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay*). Ainsi, la détection n'était pas du tout optimale. Le signal de fluorescence reçu était plus faible que celui réel ce qui a causé l'impossibilité de tester l'essai compétitif avec cette technique. Il devenait nécessaire de trouver une technique où l'ajustement du focus sur la surface de détection était possible.

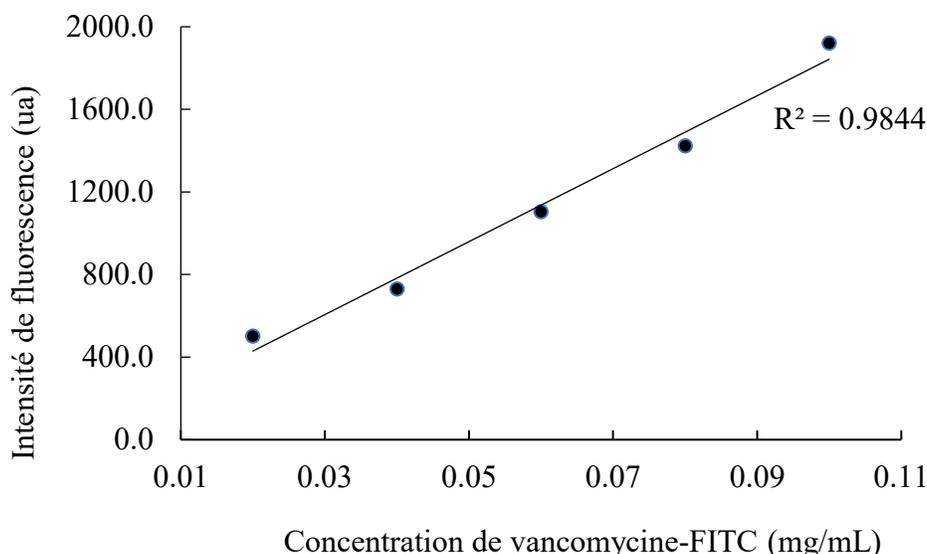


Figure 36. Courbe d'étalonnage de la fluorescence de la vancomycine-FITC liée à l'anticorps monoclonal anti-vancomycine avec une longueur d'onde d'excitation de 480 nm et d'émission de 525 nm.⁹³

4.3.3.3 Microscopie de fluorescence

C'est ainsi que l'utilisation d'un microscope de fluorescence s'est révélée comme l'option la plus favorable pour tester l'essai compétitif avant de l'intégrer à notre prototype. Avec cette technique, un focus approprié sur la surface de l'essai compétitif a été réalisé et a permis de confirmer sa viabilité. (Figure 37) Comme prédit, lorsque la proportion de vancomycine est faible par rapport à la vancomycine-FITC, la fluorescence est plus importante et recouvre une plus grande partie de la zone de détection, alors que, dès l'atteinte de 1 : 1

vancomycine : vancomycine-FITC, le signal faiblit considérablement. Ainsi, à l'aide de cet essai en microscopie de fluorescence, la différence de signal en présence et en absence de vancomycine a pu être décelée ce qui permet de confirmer le fonctionnement de l'essai compétitif conçu.

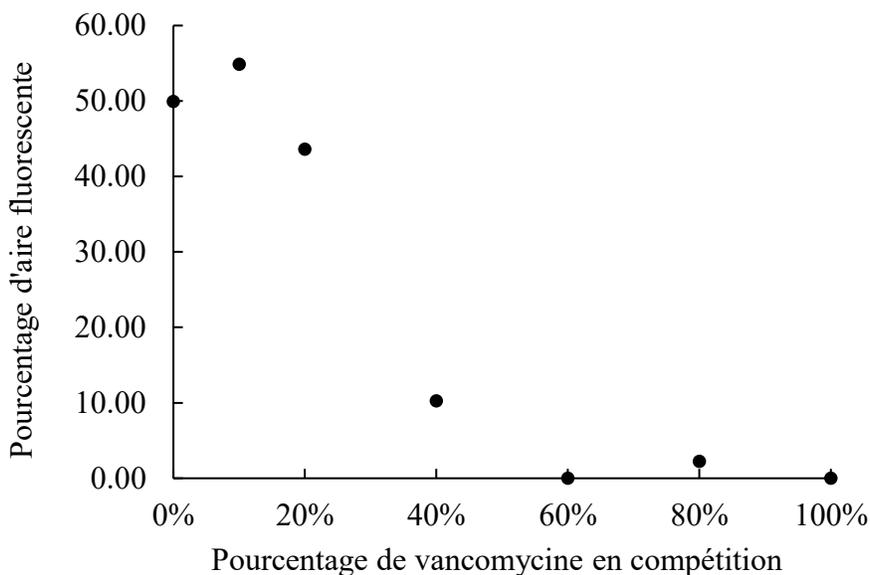


Figure 37. Essai compétitif par microscopie de fluorescence en présence de 0,065 mg/mL de vancomycine-FITC représentant 65% et de divers pourcentages de vancomycine pour le récepteur, l'anticorps monoclonal anti-vancomycine, lié à la surface du support.⁹³

4.3.3.4 FlowsensUM

Maintenant que l'essai compétitif a été confirmé par microscopie de fluorescence, il est possible de passer aux tests sur notre appareil, le FlowsensUM. En premier lieu, un test d'étalonnage de la vancomycine-FITC libre en solution a été réalisé afin de s'assurer que le signal perçu est significativement différent du bruit de fond. Malgré le fait que nous utilisions des concentrations allant jusqu'à 1 mg/mL de vancomycine-FITC, nous ne sommes pas parvenus à réaliser une courbe d'étalonnage se différenciant du bruit de fond. Plusieurs tests avec les microbilles fonctionnalisées avec le récepteur, la vancomycine-FITC uniquement ou avec la vancomycine ont été réalisés mais à chaque fois le même problème est survenu. Nous en sommes venus à maintes hypothèses expliquant l'inefficacité de notre fluorimètre. Premièrement, nous suspectons la diode d'être trop peu puissante et instable ce qui causerait la

génération d'une faible fluorescence et d'une variation importante de celle-ci. L'addition d'un photomultiplicateur a alors été envisagée pour accroître le signal perçu mais n'a pu être appliqué dû au manque de temps. Finalement, nous avons remis en question le bon fonctionnement de notre détecteur. Lors de l'illumination du détecteur avec de la lumière blanche ou un laser, il était en mesure de collecter l'information et d'atteindre la saturation mais dès que nous utilisons des fluorophores commerciaux tels la FITC à haute concentration, le signal chutait drastiquement et ce à un point quasi non discernable du bruit de fond. Le temps ne nous a pas permis de vérifier ce paramètre avant notre départ pour la compétition SensUs aux Pays-Bas puisque la réception d'un nouveau détecteur prenait plusieurs semaines que nous n'avions pas. Cependant, nous avons été en mesure d'observer la fluorescence en utilisant la caméra d'un téléphone cellulaire ce qui accroît l'hypothèse du mauvais fonctionnement de l'APD menant à une importante décroissance de sa sensibilité.

4.4 Avantages de notre technologie

Présentement, les techniques utilisées pour réaliser le suivi de la concentration plasmique de la vancomycine nécessitent un niveau élevé d'expertise dans le domaine de la bioanalytique, beaucoup de temps et sont très coûteuses. Des spécialistes doivent réaliser les expériences en laboratoire avec les échantillons sanguins allant jusqu'à 5 mL recueillis par les infirmières. De plus, 2 heures sont nécessaires avant de connaître la concentration plasmique de la vancomycine dans le corps du patient. Ce patient est habituellement très malade puisqu'il s'agit d'un antibiotique de dernier recours administré uniquement aux malades dont les infections persistent et s'aggravent dû à la résistance antimicrobienne des bactéries. Ainsi, les technologies actuelles ralentissent le traitement des patients à la vancomycine dû au long temps d'attente avant l'obtention des résultats de quantification ce qui affecte grandement la santé des patients et coûte très cher au milieu hospitalier.

Avec le prototype que BiosensUM a présenté, plusieurs désavantages des techniques actuelles peuvent être éliminés. Avec FlowsensUM qui est un appareil de type POC dont portable et de petite taille, il serait possible de réaliser les tests analytiques directement dans la chambre du patient et ce par l'infirmière responsable. Aucun personnel spécialisé ne serait nécessaire puisqu'il s'agit d'une technique simple, rapide et accessible pour tous. Ainsi,

plusieurs professionnels auparavant essentiels à l'analyse sanguine des échantillons de vancomycine ne sont plus impliqués dans ce processus permettant ainsi de réduire considérablement le temps d'attente du patient. Également, l'emploi de microfluidique permet de réduire le volume de l'échantillon sanguin nécessaire pour les tests à moins de 20 μL mais aussi les réactifs chimiques et biologiques pour les tests. C'est cette même microfluidique qui fait diminuer le temps de réaction à 5 minutes plutôt que celui précédent se chiffrant à près de 2 heures. Un des grands atouts de FlowsensUM est son application mobile qui le rend très convivial et simple d'utilisation pour tous.

Cette diminution de la durée de temps d'analyse permet d'améliorer la médication des patients traités avec la vancomycine et donc la satisfaction des clients hospitalisés. Cette amélioration de leur état de santé et la diminution du personnel spécialisé en laboratoire résultent en d'importantes économies.

4.5 BiosensUM à la compétition SensUs 2018

SensUs 2018 fût la première participation à la compétition pour l'équipe de BiosensUM. À la suite de quelques problèmes de livraison aux Pays-Bas, nous avons reçu notre biocapteur en pièces uniquement la veille de la compétition analytique. Pour ajouter à ce comble de malheurs, notre détecteur n'a pas supporté la variation de potentiel européenne et a brisé au même moment. Ne possédant plus d'APD convertissant notre signal fluorescent en voltage, nous avons dû innover à moins de 12 heures de la compétition en se tournant vers l'utilisation de la caméra d'un téléphone cellulaire afin de collecter la fluorescence. Une analyse de la matrice RGB et l'extraction de l'intensité des pixels verts (émission vers 525 nm) par notre équipe informatique a permis de fournir un appareil fonctionnel pour la compétition analytique du lendemain. La figure 38 représente nos résultats obtenus avec notre nouveau prototype non-optimisé à caméra cellulaire lors de la compétition de SensUs 2018 pour la détection d'échantillons de vancomycine dans du plasma humain. De plus, lors de l'événement, quatre présentations orales discutant des aspects techniques et entrepreneuriaux ont été réalisées. J'ai réalisé notamment une d'entre elles.

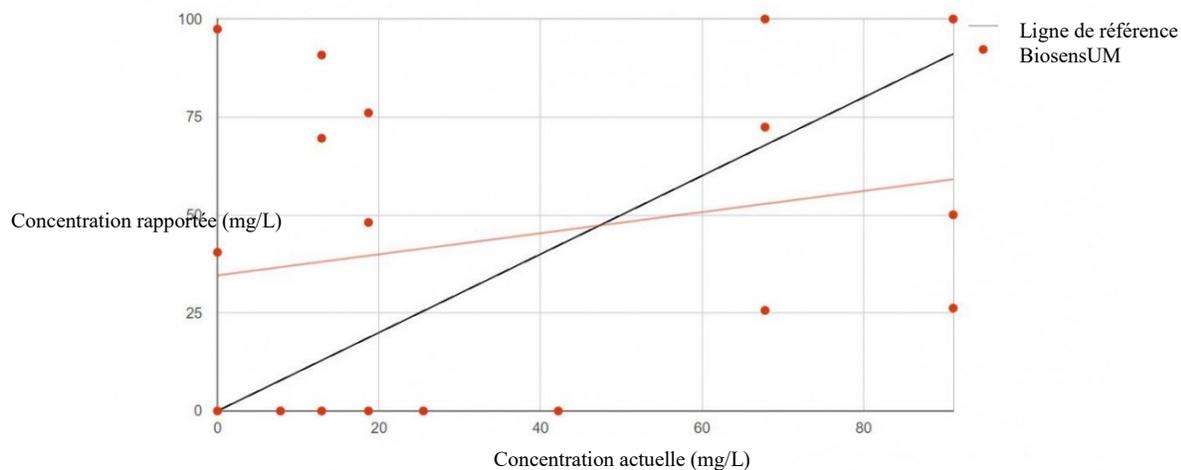


Figure 38. Résultats analytiques de BiosensUM à SensUs 2018. La concentration rapportée est comparée à la concentration de vancomycine plasmique réelle dans les échantillons reçus.⁹⁹

L'événement fût diffusé en direct sur le Web. Au total, plus de 10 000 visiteurs provenant de 80 pays ont assisté à la compétition et parmi ceux-ci plus de 4 000 personnes ont voté pour leur équipe favorite. Parmi ce nombre, 521 votes ont été alloués à l'équipe de BiosensUM.

Finalement, BiosensUM ne ressort pas de la compétition SensUs avec les grands honneurs mais il s'est tout de même démarqué avec sa persévérance et sa ténacité reconnues par l'organisation de SensUs 2018 lors de la cérémonie de fermeture. Tous les membres de BiosensUM ressortent de cette expérience grandis scientifiquement et socialement.

4.6 Conclusion

Pour résumer, BiosensUM développa un biocapteur innovateur de diagnostic portable pour la vancomycine et fût l'équipe étudiante représentant le Canada et l'Université de Montréal à la compétition internationale SensUs en septembre 2018 à Eindhoven aux Pays-Bas. Le prototype comportait trois grandes composantes ; l'essai de fluorescence consistait en une compétition entre la vancomycine de l'échantillon plasmique ainsi que la vancomycine-FITC synthétisée et purifiée pour le site de liaison à l'anticorps monoclonal anti-vancomycine ; la microfluidique conçue par BiosensUM permettait de réduire le temps d'analyse, la quantité des réactifs chimiques et biologiques nécessaires et d'accroître la simplicité du biocapteur ; l'appareil de fluorescence et l'application mobile développés rendent l'instrument très convivial

et simple d'utilisation. Ce biocapteur innovateur permet d'améliorer considérablement les pratiques en matière de détection de vancomycine. Les deux longues heures, l'importante quantité de sang et les maints spécialistes en laboratoire auparavant nécessaires pour l'obtention de la concentration plasmique de vancomycine ne sont plus d'actualité. Maintenant, avec FlowsensUM, l'infirmière peut réaliser les tests moins invasifs directement dans la chambre du patient et obtenir les résultats en moins de 5 minutes. Tout cela permet d'améliorer la santé du patient plus rapidement et représente d'importantes économies pour les milieux hospitaliers.

L'efficacité de la vancomycine-FITC synthétisée fût confirmée par fluorimétrie tout comme le principe de l'essai compétitif par microscopie de fluorescence. L'application au FlowsensUM de l'essai développé n'a pas pu être possible à cause des problèmes rencontrés avec le détecteur. Malgré tout, les avancées technologiques réalisées par BiosensUM dans le domaine des biocapteurs de vancomycine sont significatives tout comme leur première participation à la compétition SensUs.

5 Chapitre 5 : Conclusions et Perspectives

En ce moment, d'importantes ressources sont nécessaires à la réalisation de tests analytiques en hôpitaux. Maints professionnels scientifiques opèrent des appareils imposants et spécialisés afin de pouvoir faire un suivi biologique adéquat auprès des professionnels de la santé par rapport à l'état de leurs patients. Ces techniques nécessitent de longues heures d'analyse biochimique avant d'obtenir les informations essentielles pour la continuité des traitements des malades ou pour leur diagnostic. Étant donné que ce processus est très lent et que les patients n'ont pas toujours la santé nécessaire pour se permettre cette attente, il est primordial que la recherche se tourne vers de nouvelles techniques analytiques sensibles, rapides et efficaces en milieu hospitalier. Depuis les dernières décennies, plusieurs biocapteurs ont été développés afin de répondre à cette problématique. Parmi ceux-ci, on compte notamment le fameux glucomètre permettant le suivi personnalisé et rapide du taux de glucose des diabétiques. Les biocapteurs sont des options de mise pour l'application dans le milieu hospitalier puisqu'ils sont des instruments à diagnostic portable conviviaux permettant au personnel médical plutôt qu'aux spécialistes analytiques de réaliser les tests en toute simplicité et rapidité directement dans la chambre du patient. C'est ainsi que, dans cette optique, les travaux réalisés dans ce mémoire s'inscrivaient.

Diverses techniques analytiques furent employées afin de réaliser le développement de nouveaux biocapteurs possédant la technologie du POC. En premier lieu, la spectroscopie de résonance des plasmons de surface fût utilisée étant donné son aspect portable, sa détection sans marquage de biomolécules ainsi que sa sensibilité dans les matrices biologiques. Un biocapteur SPR d'aminoglycosides fût alors développé dans le chapitre 2. La quantification des antibiotiques dont la famille des aminoglycosides et la vancomycine font partis est essentielle afin de réduire les effets secondaires ainsi que les risques de développement de résistance bactérienne. Dès que la concentration d'aminoglycosides dépasse son étroite gamme thérapeutique, ce médicament cause de la néphrotoxicité et de l'ototoxicité sévères aggravant la situation des patients et compliquant leur guérison. Le suivi très minutieux de ces antibiotiques est donc nécessaire. Le biocapteur développé afin de permettre la quantification des aminoglycosides consistât en un essai compétitif SPR puisqu'il s'agit d'une technique

permettant d'accroître la sensibilité de la réponse pour des molécules de faibles masses molaires (près de 1 000 kDa). Ainsi, l'analyte entre en compétition avec un analogue possédant des capacités d'interactions avec la protéine Eis et fonctionnalisé sur une nanoparticule pour se lier au récepteur Eis se trouvant à la surface du capteur. À la suite de l'optimisation des nanoparticules employées comme compétiteurs passant notamment par leur charge, leur agent de stabilisation et leur forme, le bon fonctionnement de cet essai fût confirmé. Cependant, la reproductibilité de celui-ci fût remise en question ce qui empêcha la réalisation d'une courbe d'étalonnage pour les différents aminoglycosides étudiés. Il est alors nécessaire de continuer à travailler sur le développement et l'optimisation de ce biocapteur afin d'accroître sa reproductibilité et de permettre son utilisation pour réaliser le suivi de la concentration sanguine d'aminoglycosides. Plusieurs sources causant ce problème ont été envisagées dont la disponibilité du site actif pour les aminoglycosides et les analogues lorsque la protéine Eis est attachée à la surface du biocapteur, la technique d'attachement de la protéine à la surface d'or ainsi que les interactions entre les nanoparticules où les analogues sont liés et le récepteur.

Dans le cadre du chapitre 3, le prototypage d'un instrument hybride combinant la spectroscopie de résonance des plasmons de surface ainsi que l'électrochimiluminescence fût conçu et appliqué à la réalisation d'un biocapteur SPR-ECL pour un biomarqueur du cancer du sein. Il s'agit d'un des premiers instruments couplant la SPR et l'ECL développés dans la communauté scientifique. L'arrimage de ces deux technologies permet l'obtention d'une technique possédant les avantages de chacune. Ainsi, il est possible de réaliser des essais en temps réel grâce à la SPR tout en possédant une excellente sensibilité par l'ECL. De plus, l'ECL ne subit pas de variation de sa réponse lors de présence d'adsorption non-spécifique comparativement à la SPR. Ainsi, il sera possible d'avoir une redondance pertinente des résultats en utilisant cette nouvelle technologie SPR-ECL. Sa configuration fût premièrement confirmée à l'aide de l'intégration d'un système ECL dans l'appareil P4-SPR. À la suite de l'optimisation des électrodes, de la cellule fluidique ainsi que de la technique de collection de l'électrochimiluminescence, l'ECL fût réalisée et confirmée pour le complexe de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ et la tripropylamine étant donné leur grande efficacité en milieu biologique. La SPR fût également suivie lors de ces tests.

Cette technologie de SPR-ECL fût employée afin de faire le suivi du biomarqueur du cancer du sein soit le domaine extracellulaire de la protéine HER2. La surexpression de ce domaine est caractéristique aux cancers du sein possédant des métastases. Il est donc possible de suivre la croissance du cancer et de vérifier sa récurrence à l'aide du biomarqueur de cette maladie. Un essai sandwich SPR a premièrement été développé en collaboration avec Stefano Tartaglia. Différents couples d'anticorps primaires et secondaires furent analysés. Les tests préliminaires présentés dans ce mémoire démontraient que le couple trastuzumab et MGR2 répondait adéquatement à l'essai développé. Par la suite, un couple démontrant de meilleures performances analytiques a été choisi par Stefano c'est-à-dire le trastuzumab et le pertuzumab. Afin de transposer cet essai sur l'instrument SPR-ECL, il est uniquement nécessaire de marquer l'anticorps secondaire avec un groupement électrochimiluminescent actif tel le $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ et d'ajouter son co-réactif, la tripropylamine, dans le milieu.

Ce projet est encore en constant développement. Plusieurs éléments sont toujours nécessaires à réaliser et à optimiser avant d'obtenir un instrument convivial et un biocapteur applicable. Parmi ceux-ci, on compte notamment l'optimisation de la collection de la luminescence en employant un spectrophotomètre relié à l'aide d'une fibre optique ainsi que la réalisation de l'essai SPR-ECL couplé.

En conclusion, le chapitre 4 porta sur le développement d'un biocapteur pour la vancomycine, un antibiotique. Tout comme les aminoglycosides, s'assurer que le traitement est adéquat et demeure dans la gamme thérapeutique est primordial. La variation trop importante des concentrations sanguines de vancomycine cause de graves conséquences aux patients d'où l'importance de suivre attentivement l'administration de ce médicament aux malades. Le biocapteur fût basé sur une technique de fluorescence permettant d'obtenir une bonne sensibilité et construit entièrement par l'équipe BiosensUM. L'essai compétitif développé consistait à la compétition pour les anticorps monoclonaux anti-vancomycine entre les molécules de vancomycine provenant de l'échantillon plasmique du patient ainsi que la vancomycine fluorescente marquée par une fluorescéine isothiocyanate. Cet essai se déroula sur des microbilles de polystyrène où les récepteurs sont liés à l'intérieure d'une microfluidique conçue par notre équipe. Celle-ci permet de réduire considérablement les volumes d'échantillon et de réactifs nécessaires. L'instrument de fluorimétrie où la microfluidique est insérée est contrôlé

par une application mobile. Tous ces aspects permettent de simplifier les analyses au maximum et ainsi de suivre la concentration de vancomycine présente dans le plasma des patients et ce en moins de 5 minutes avec une technique peu invasive.

Ce projet fût réalisé dans le cadre de la compétition internationale étudiante SensUs présentée en septembre 2018 à Eindhoven aux Pays-Bas. En tant que cheffe de projet de l'équipe BiosensUM représentant l'Université de Montréal et le Canada à la compétition SensUs, j'ai participé activement au développement scientifique du biocapteur et aux analyses réalisées en laboratoire. Tout comme la multitude de chercheurs travaillant sur le développement de nouveaux biocapteurs biomédicaux permettant d'améliorer la santé des patients en accélérant les processus, les rendant plus sensibles et plus abordables, la compétition SensUs s'inscrit dans un mouvement mondial visant à promouvoir la science et le développement de nouvelles technologies innovantes. Encore plusieurs maladies ne sont pas traitées adéquatement et divers médicaments ne sont pas suivis correctement, laissant place à libre imagination pour le développement de nouveaux biocapteurs permettant d'améliorer la santé mondiale.

Bibliographie

1. Shankaran, D. R.; Gobi, K. V.; Miura, N., Recent advancements in surface plasmon resonance immunosensors for detection of small molecules of biomedical, food and environmental interest. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2007**, *121* (1), 158-177.
2. Xu, X.; Ye, Z.-Z.; Wu, J.; Ying, Y.-B., Application and Research Development of Surface Plasmon Resonance-based Immunosensors for Protein Detection. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* **2010**, *38* (7), 1052-1059.
3. Brulé, T.; Granger, G.; Bukar, N.; Deschênes-Rancourt, C.; Havard, T.; Schmitzer, A. R.; Martel, R.; Masson, J.-F., A field-deployed surface plasmon resonance (SPR) sensor for RDX quantification in environmental waters. *Analyst* **2017**, *142* (12), 2161-2168.
4. Khodami, M.; Berini, P., Low detection limits using sandwich and inhibition assays on long-range surface plasmon waveguide biosensors. *Sensors and Actuator B: Chemical* **2018**, *273*, 1156-1161.
5. Bolduc, O. R.; Live, L. S.; Masson, J. F., High-resolution surface plasmon resonance sensors based on a dove prism. *Talanta* **2009**, *77* (5), 1680-1687.
6. Becker, B.; Cooper, M. A., Aminoglycoside Antibiotics in the 21st Century. *ACS Chemical Biology* **2013**, *8* (1), 105-115.
7. Mingeot-Leclercq, M.-P.; Glupczynski, Y.; Tulkens, P. M., Aminoglycosides: Activity and Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1999**, *43* (4), 727.
8. Co., L. L. LEAPChem Supplies Neomycin sulfate (1405-10-3) N. http://www.leapchem.com/news2_cid_34_id_195.html.
9. Mingeot-Leclercq, M.-P.; Tulkens, P. M., Aminoglycosides: Nephrotoxicity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1999**, *43* (5), 1003.
10. Brummett, R. E.; Fox, K. E., Aminoglycoside-induced hearing loss in humans. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1989**, *33* (6), 797.
11. Enright, M. C.; Robinson, D. A.; Randle, G.; Feil, E. J.; Grundmann, H.; Spratt, B. G., The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2002**, *99* (11), 7687-7692.
12. Yarlagadda, V.; Sarkar, P.; Manjunath, G. B.; Haldar, J., Lipophilic vancomycin aglycon dimer with high activity against vancomycin-resistant bacteria. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2015**, *25* (23), 5477-5480.
13. Neu, H. C., The Crisis in Antibiotic Resistance. *Science* **1992**, *257* (5073), 1064-1073.
14. Perrier, A.; Gligorov, J.; Lefevre, G.; Boissan, M., The extracellular domain of Her2 in serum as a biomarker of breast cancer. *Laboratory Investigation* **2018**, *98* (6), 696-707.
15. Wood, R. W., XLII. On a remarkable case of uneven distribution of light in a diffraction grating spectrum. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science* **1902**, *4* (21), 396-402.
16. Rayleigh, L., III. Note on the remarkable case of diffraction spectra described by Prof. Wood. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science* **1907**, *14* (79), 60-65.
17. Pines, D.; Bohm, D., A Collective Description of Electron Interactions: II. Collective vs Individual Particle Aspects of the Interactions. *Physical Review* **1952**, *85* (2), 338-353.

18. Otto, A., Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection. *Zeitschrift für Physik A Hadrons and nuclei* **1968**, 216 (4), 398-410.
19. Kretschm.E; Raether, H., RADIATIVE DECAY OF NON RADIATIVE SURFACE PLASMONS EXCITED BY LIGHT. *Zeitschrift Fur Naturforschung Part a-Astrophysik Physik Und Physikalische Chemie* **1968**, A 23 (12), 2135-&.
20. Kretschmann, E., Die Bestimmung optischer Konstanten von Metallen durch Anregung von Oberflächenplasmaschwingungen. *Zeitschrift für Physik A Hadrons and nuclei* **1971**, 241 (4), 313-324.
21. Liedberg, B.; Nylander, C.; Lunström, I., Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. *Sensors and Actuators* **1983**, 4, 299-304.
22. O'Shannessy, D. J.; Brigham-Burke, M.; Peck, K., Immobilization chemistries suitable for use in the BIAcore surface plasmon resonance detector. *Analytical Biochemistry* **1992**, 205 (1), 132-136.
23. Malmborg, A.-C.; Borrebaeck, C. A. K., BIAcore as a tool in antibody engineering. *Journal of Immunological Methods* **1995**, 183 (1), 7-13.
24. Zayats, A. V.; Smolyaninov, I. I.; Maradudin, A. A., Nano-optics of surface plasmon polaritons. *Physics Reports* **2005**, 408 (3), 131-314.
25. Breault-Turcot, J. Développement d'outils analytiques pour la détection de biomolécules directement dans des fluides sanguins. Université de Montréal, 2015.
26. Reather, H., *Surface Plasmons on Smooth and Rough Surfaces and on Gratings*. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, 1988; Vol. 111.
27. Jung, L. S.; Campbell, C. T.; Chinowsky, T. M.; Mar, M. N.; Yee, S. S., Quantitative interpretation of the response of surface plasmon resonance sensors to adsorbed films. *Langmuir* **1998**, 14 (19), 5636-5648.
28. Srituravanich, W.; Fang, N.; Sun, C.; Luo, Q.; Zhang, X., Plasmonic Nanolithography. *Nano Letters* **2004**, 4 (6), 1085-1088.
29. Homola, J., Surface Plasmon Resonance Sensors for Detection of Chemical and Biological Species. *Chemical Reviews* **2008**, 108 (2), 462-493.
30. Couture, M. Étude des propriétés plasmoniques de réseaux de nanotrous. Université de Montréal, 2012.
31. Homola, J.; Yee, S. S.; Gauglitz, G., Surface plasmon resonance sensors: review. *Sensors and Actuators B: Chemical* **1999**, 54 (1), 3-15.
32. Homola, J., Present and future of surface plasmon resonance biosensors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2003**, 377 (3), 528-539.
33. Zhao, S. S.; Bukar, N.; Toulouse, J. L.; Pelechacz, D.; Robitaille, R.; Pelletier, J. N.; Masson, J. F., Miniature multi-channel SPR instrument for methotrexate monitoring in clinical samples. *Biosensors & Bioelectronics* **2015**, 64, 664-670.
34. Liz-Marzán, L. M., Tailoring Surface Plasmons through the Morphology and Assembly of Metal Nanoparticles. *Langmuir* **2006**, 22 (1), 32-41.
35. Willets, K. A.; Van Duyne, R. P., Localized surface plasmon resonance spectroscopy and sensing. *Annual Review of Physical Chemistry* **2007**, 58, 267-297.
36. Ghosh, S. K.; Pal, T., Interparticle Coupling Effect on the Surface Plasmon Resonance of Gold Nanoparticles: From Theory to Applications. *Chemical Reviews* **2007**, 107 (11), 4797-4862.
37. Arvizo, R.; Bhattacharya, R.; Mukherjee, P., Gold nanoparticles: opportunities and challenges in nanomedicine. *Expert Opinion on Drug Delivery* **2010**, 7 (6), 753-763.

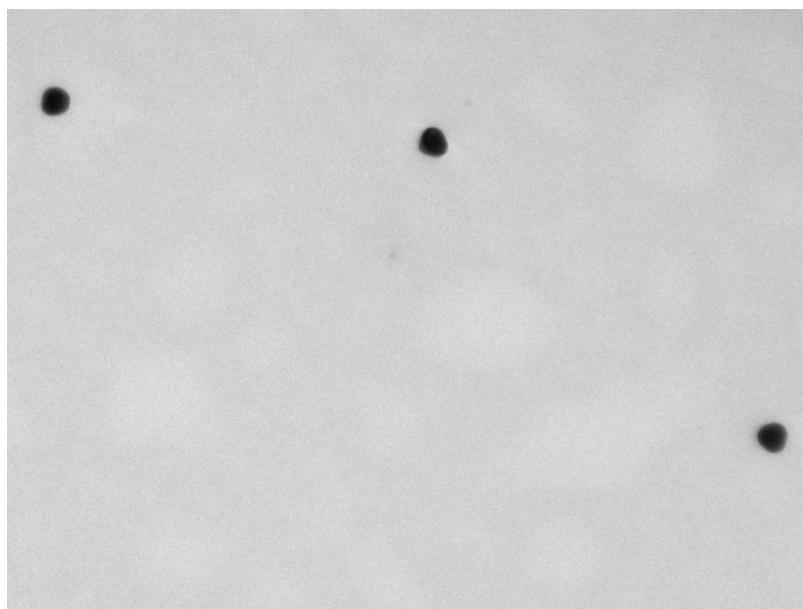
38. Turkevich, J.; Stevenson, P. C.; Hillier, J., A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discussions of the Faraday Society* **1951**, *11* (0), 55-75.
39. Daniel, M. C.; Astruc, D., Gold nanoparticles: Assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chemical Reviews* **2004**, *104* (1), 293-346.
40. Haiss, W.; Thanh, N. T. K.; Aveyard, J.; Fernig, D. G., Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV-Vis Spectra. *Analytical Chemistry* **2007**, *79* (11), 4215-4221.
41. Moores, A.; Goettmann, F., The plasmon band in noble metal nanoparticles: an introduction to theory and applications. *New Journal of Chemistry* **2006**, *30* (8), 1121-1132.
42. El-Brolossy, T. A.; Abdallah, T.; Mohamed, M. B.; Abdallah, S.; Easawi, K.; Negm, S.; Talaat, H., Shape and size dependence of the surface plasmon resonance of gold nanoparticles studied by Photoacoustic technique. *European Physical Journal-Special Topics* **2008**, *153*, 361-364.
43. Anker, J. N.; Hall, W. P.; Lyandres, O.; Shah, N. C.; Zhao, J.; Van Duyne, R. P., Biosensing with plasmonic nanosensors. *Nature Materials* **2008**, *7* (6), 442-453.
44. Dinel, M.-P. *Bio-détection d'antibiotiques aminoglycosides à l'aide de nanoparticules d'or fonctionnalisées via spectroscopie par résonance des plasmons de surface*; Université de Montréal, 2015.
45. Vo-Dinh, T.; Cullum, B., Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **2000**, *366* (6-7), 540-551.
46. Mirkin, C. A.; Letsinger, R. L.; Mucic, R. C.; Storhoff, J. J., A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials. *Nature* **1996**, *382* (6592), 607-609.
47. Hock, B., Antibodies for immunosensors - A review. *Analytica Chimica Acta* **1997**, *347* (1-2), 177-186.
48. Jayasena, S. D., Aptamers: An emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. *Clinical Chemistry* **1999**, *45* (9), 1628-1650.
49. Homola, J., *Surface plasmon resonance (SPR) biosensors and their applications in food safety and security*. 2006; Vol. 216, p 101-118.
50. Sepúlveda, B.; Angelomé, P. C.; Lechuga, L. M.; Liz-Marzán, L. M., LSPR-based nanobiosensors. *Nano Today* **2009**, *4* (3), 244-251.
51. Bolduc, O. R. Monocouches peptidiques auto-assemblées et applications dans le domaine des biocapteurs de résonance de plasmon de surfaces. Université de Montréal, 2011.
52. Bolduc, O. R.; Masson, J.-F., Monolayers of 3-Mercaptopropyl-amino Acid to Reduce the Nonspecific Adsorption of Serum Proteins on the Surface of Biosensors. *Langmuir* **2008**, *24* (20), 12085-12091.
53. Zhen, G. L.; Falconnet, D.; Kuennemann, E.; Voros, J.; Spencer, N. D.; Textor, M.; Zurcher, S., Nitriiotriacetic acid functionalized graft copolymers: A polymeric interface for selective and reversible binding of histidine-tagged proteins. *Advanced Functional Materials* **2006**, *16* (2), 243-251.
54. Bolduc, O. R.; Lambert-Lanteigne, P.; Colin, D. Y.; Zhao, S. S.; Proulx, C.; Boeglin, D.; Lubell, W. D.; Pelletier, J. N.; Féthière, J.; Ong, H.; Masson, J.-F., Modified peptide monolayer binding His-tagged biomolecules for small ligand screening with SPR biosensors. *Analyst* **2011**, *136* (15), 3142-3148.

55. Fan, X.; White, I. M.; Shopova, S. I.; Zhu, H.; Suter, J. D.; Sun, Y., Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: A review. *Analytica Chimica Acta* **2008**, *620* (1), 8-26.
56. Lakomicz, J. R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Plenum Press: New York and London, 1986.
57. Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Crouch, S. R., *Principles of Instrumental Analysis*. Thomson Higher Education: États-Unis, 2006.
58. Petryayeva, E.; Algar, W. R.; Medintz, I. L., Quantum Dots in Bioanalysis: A Review of Applications across Various Platforms for Fluorescence Spectroscopy and Imaging. **2013**, *67* (3), 215-252.
59. Yolken, R. H.; Stopa, P. J., Enzyme-linked fluorescence assay: Ultrasensitive solid-phase assay for detection of human rotavirus. *Journal of Clinical Microbiology* **1979**, *10* (3), 317-321.
60. Modi, S.; M. G, S.; Goswami, D.; Gupta, G. D.; Mayor, S.; Krishnan, Y., A DNA nanomachine that maps spatial and temporal pH changes inside living cells. *Nature Nanotechnology* **2009**, *4*, 325.
61. Ranallo, S.; Prévost-Tremblay, C.; Idili, A.; Vallée-Bélisle, A.; Ricci, F., Antibody-powered nucleic acid release using a DNA-based nanomachine. *Nature Communications* **2017**, *8*, 15150.
62. Consier, S., *Electrochemical Biosensors*. Boca Raton : CRC Press: 2013.
63. Tokel, N. E.; Bard, A. J., Electrogenerated chemiluminescence. IX. Electrochemistry and emission from systems containing tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(II) dichloride. *Journal of the American Chemical Society* **1972**, *94* (8), 2862-2863.
64. Ding, Z.; Quinn, B. M.; Haram, S. K.; Pell, L. E.; Korgel, B. A.; Bard, A. J., Electrochemistry and Electrogenerated Chemiluminescence from Silicon Nanocrystal Quantum Dots. **2002**, *296* (5571), 1293-1297.
65. Myung, N.; Ding, Z.; Bard, A. J., Electrogenerated Chemiluminescence of CdSe Nanocrystals. *Nano Letters* **2002**, *2* (11), 1315-1319.
66. Miao, W., Electrogenerated Chemiluminescence and Its Biorelated Applications. *Chemical Reviews* **2008**, *108* (7), 2506-2553.
67. Xu, X.-H. N., *New Frontiers in Ultrasensitive Bioanalysis : Advanced Analytical Chemistry Applications in Nanotechnology, Single Molecular Detection, and Single Cell Analysis*. John Wiley & Sons, inc: 2007.
68. McKeating, K. S.; Couture, M.; Dinel, M.-P.; Garneau-Tsodikova, S.; Masson, J.-F., High throughput LSPR and SERS analysis of aminoglycoside antibiotics. *Analyst* **2016**, *141* (17), 5120-5126.
69. Garzan, A.; Willby, M. J.; Ngo, H. X.; Gajadeera, C. S.; Green, K. D.; Holbrook, S. Y. L.; Hou, C.; Posey, J. E.; Tsodikov, O. V.; Garneau-Tsodikova, S., Combating Enhanced Intracellular Survival (Eis)-Mediated Kanamycin Resistance of Mycobacterium tuberculosis by Novel Pyrrolo[1,5-a]pyrazine-Based Eis Inhibitors. *ACS Infectious Diseases* **2017**, *3* (4), 302-309.
70. Bao, F.; Yao, J.-L.; Gu, R.-A., Synthesis of Magnetic Fe₂O₃/Au Core/Shell Nanoparticles for Bioseparation and Immunoassay Based on Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Langmuir* **2009**, *25* (18), 10782-10787.
71. Guo, J.; Armstrong, M. J.; O'Driscoll, C. M.; Holmes, J. D.; Rahme, K., Positively charged, surfactant-free gold nanoparticles for nucleic acid delivery. *RSC Advances* **2015**, *5* (23), 17862-17871.

72. Aubé, A.; Breault-Turcot, J.; Chaurand, P.; Pelletier, J. N.; Masson, J.-F., Non-specific Adsorption of Crude Cell Lysate on Surface Plasmon Resonance Sensors. *Langmuir* **2013**, *29* (32), 10141-10148.
73. Zaunbrecher, M. A.; Sikes, R. D.; Metchock, B.; Shinnick, T. M.; Posey, J. E., Overexpression of the chromosomally encoded aminoglycoside acetyltransferase eis confers kanamycin resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2009**, *106* (47), 20004-20009.
74. Tsodikov, O. V.; Green, K. D.; Garneau-Tsodikova, S., A Random Sequential Mechanism of Aminoglycoside Acetylation by Mycobacterium tuberculosis Eis Protein. *PLOS ONE* **2014**, *9* (4), e92370.
75. Houghton, J. L.; Biswas, T.; Chen, W.; Tsodikov, O. V.; Garneau-Tsodikova, S., Chemical and Structural Insights into the Regioversatility of the Aminoglycoside Acetyltransferase Eis. *ChemBioChem* **2013**, *14* (16), 2127-2135.
76. Ngo, H. X.; Green, K. D.; Gajadeera, C. S.; Willby, M. J.; Holbrook, S. Y. L.; Hou, C.; Garzan, A.; Mayhoub, A. S.; Posey, J. E.; Tsodikov, O. V.; Garneau-Tsodikova, S., Potent 1,2,4-Triazino[5,6b]indole-3-thioether Inhibitors of the Kanamycin Resistance Enzyme Eis from Mycobacterium tuberculosis. *ACS Infectious Diseases* **2018**, *4* (6), 1030-1040.
77. Willby, M. J.; Green, K. D.; Gajadeera, C. S.; Hou, C.; Tsodikov, O. V.; Posey, J. E.; Garneau-Tsodikova, S., Potent Inhibitors of Acetyltransferase Eis Overcome Kanamycin Resistance in Mycobacterium tuberculosis. *ACS Chemical Biology* **2016**, *11* (6), 1639-1646.
78. Garzan, A.; Willby, M. J.; Green, K. D.; Gajadeera, C. S.; Hou, C.; Tsodikov, O. V.; Posey, J. E.; Garneau-Tsodikova, S., Sulfonamide-Based Inhibitors of Aminoglycoside Acetyltransferase Eis Abolish Resistance to Kanamycin in Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Medicinal Chemistry* **2016**, *59* (23), 10619-10628.
79. Garzan, A.; Willby, M. J.; Green, K. D.; Tsodikov, O. V.; Posey, J. E.; Garneau-Tsodikova, S., Discovery and Optimization of Two Eis Inhibitor Families as Kanamycin Adjuvants against Drug-Resistant M. tuberculosis. *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2016**, *7* (12), 1219-1221.
80. Yang, W. R.; Gooding, J. J.; He, Z. C.; Li, Q.; Chen, G. N., Fast colorimetric detection of copper ions using L-cysteine functionalized gold nanoparticles. *Journal of Nanoscience & Nanotechnology* **2007**, *7* (2), 712-716.
81. Hassinen, J.; Liljestrom, V.; Kostianen, M. A.; Ras, R. H. A., Rapid Cationization of Gold Nanoparticles by Two-Step Phase Transfer. *Angewandte Chemie-International Edition* **2015**, *54* (27), 7990-7993.
82. Sharma, A.; Matharu, Z.; Sumana, G.; Solanki, P. R.; Kim, C. G.; Malhotra, B. D., Antibody immobilized cysteamine functionalized-gold nanoparticles for aflatoxin detection. *Thin Solid Films* **2010**, *519* (3), 1213-1218.
83. Feng, Z. V.; Gunsolus, I. L.; Qiu, T. A.; Hurley, K. R.; Nyberg, L. H.; Frew, H.; Johnson, K. P.; Vartanian, A. M.; Jacob, L. M.; Lohse, S. E.; Torelli, M. D.; Hamers, R. J.; Murphy, C. J.; Haynes, C. L., Impacts of gold nanoparticle charge and ligand type on surface binding and toxicity to Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Chemical Science* **2015**, *6* (9), 5186-5196.
84. Kwon, M. J.; Lee, J.; Wark, A. W.; Lee, H. J., Nanoparticle-Enhanced Surface Plasmon Resonance Detection of Proteins at Attomolar Concentrations: Comparing Different Nanoparticle Shapes and Sizes. *Analytical Chemistry* **2012**, *84* (3), 1702-1707.

85. Nikoobakht, B.; El-Sayed, M. A., Preparation and Growth Mechanism of Gold Nanorods (NRs) Using Seed-Mediated Growth Method. *Chemistry of Materials* **2003**, *15* (10), 1957-1962.
86. Parreen, S.; Aslam, M. S.; Hu, L.; Xu, G., *Electrogenerated Chemiluminescence*. Springer: Berlin, Heidelberg, 2013.
87. Zhang, J.; Gryczynski, Z.; Lakowicz, J. R., First observation of surface plasmon-coupled electrochemiluminescence. *Chemical Physics Letters* **2004**, *393* (4), 483-487.
88. Smith, D. S.; Kostov, Y.; Rao, G., SPCE-based sensors: Ultrafast oxygen sensing using surface plasmon-coupled emission from ruthenium probes. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2007**, *127* (2), 432-440.
89. Wang, D.; Guo, L.; Huang, R.; Qiu, B.; Lin, Z.; Chen, G., Surface Enhanced Electrochemiluminescence of Ru(bpy)₃²⁺. *Scientific Reports* **2015**, *5*, 7954.
90. Chen, X.; Gui, W.; Ma, Q., Ultrasensitive detection of EGFR gene based on surface plasmon resonance enhanced electrochemiluminescence of CuZnInS quantum dots. *Analytica Chimica Acta* **2018**, *1009*, 73-80.
91. Kurita, R., Development of Electrochemiluminescence and Surface Plasmon Resonance based Immunosensors with Surface Accumulable Molecules. *MRS Proceedings* **2012**, *1415*, mrsf11-1415-ii02-01.
92. Leland, J.; Powell, M., Electrogenerated chemiluminescence: an oxidative-reduction type ECL reaction sequence using tripropylamine. *Journal of the Electrochemical Society* **1990**, *137*, 3127-3131.
93. Borduas, G.; Dinél, M.-P.; Elder, E.; Fournelle, F.; Gauthier Cyr, J.-A.; Gravel Tatta, L.; Moustaine, Z.; Qbaich, A.; Sauvage, M.; Nkaye, A.; Bouilly, D.; Masson, J. F. *Team Results Document BiosensUM - SensUs 2018*; Université de Montréal: 2018.
94. Dinél, M.-P., Contrer ces bactéries qui résistent. *Revue Dire* **2018**, *27* (2), 11.
95. Diagnostics, C. *Conjugation Protocol of Carboxylated Particles by Carbodiimide Chemistry*; 2018.
96. Luka, G.; Ahmadi, A.; Najjaran, H.; Alocilja, E.; DeRosa, M.; Wolthers, K.; Malki, A.; Aziz, H.; Althani, A.; Hoorfar, M., Microfluidics Integrated Biosensors: A Leading Technology towards Lab-on-a-Chip and Sensing Applications. *Sensors (Basel, Switzerland)* **2015**, *15* (12), 30011-30031.
97. Sylvia, R. S.; Katrin, K.; Alexander, F.; Rupert, K.; Volker, R.; Stefan, K., Patterned Surface Activation of Cyclo-Olefin Polymers for Biochip Applications. *Periodica Polytechnica-Chemical Engineering* **2014**, *58* (1), 61-67.
98. Cecchi, A.; Hulikova, A.; Pastorek, J.; Pastorekova, S.; Scozzafava, A.; Winum, J. Y.; Montero, J. L.; Supuran, C. T., Carbonic anhydrase inhibitors. Design of fluorescent sulfonamides as probes of tumor-associated carbonic anhydrase IX that inhibit isozyme IX-mediated acidification of hypoxic tumors. *Journal of Medicinal Chemistry* **2005**, *48* (15), 4834-4841.
99. SensUs SensUs 2018 - BiosensUM - Results. <https://digital.sensus.org/>.

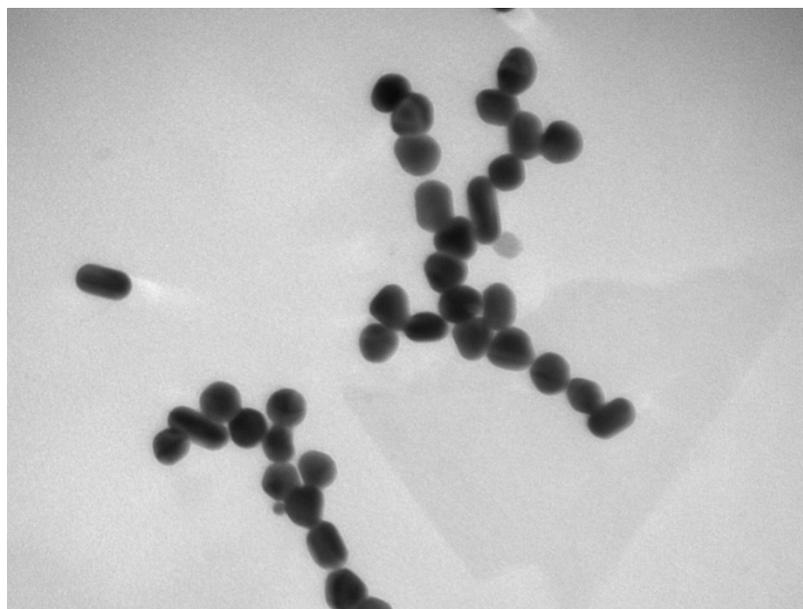
Annexe A – Images TEM des NPs quasi-sphériques



mp_001
Cal: 0.476681 nm/pix
14:58:02 8/18/2017

Camera: XR280, Exposure(ms): 1200.0 Gain: 1, Bin: 1
Gamma: 1.00, No Sharpening, Normal Contrast

100 nm
HV=80.0kV
Direct Mag: 110000x
Université de Montréal



mp_003
Cal: 0.349566 nm/pix
15:03:43 8/18/2017

Camera: XR280, Exposure(ms): 1200.0 Gain: 1, Bin: 1
Gamma: 1.00, No Sharpening, Normal Contrast

50 nm
HV=80.0kV
Direct Mag: 150000x
Université de Montréal

Figure 39. Nanoparticules quasi-sphériques

Annexe B – Document des résultats de BiosensUM 2018

Il s'agit du document officiel remis à la Compétition SensUs 2018 en date du 29 août 2018. Il a été co-écrit par tous les membres de l'équipe.



Team Results Document

BiosensUM

Team Members

Godefroy Borduas
Marie-Pier Diné
Elizabeth Elder
Frédéric Fournelle
Jean-Antoine Gauthier Cyr
Laurianne Gravel Tatta
Zoubaire Moustaine
Abdelhakim Qbaich
Madline Sauvage
Antoine Nkaye

Supervisor

Pr. Jean-François Masson

Coach

Pr. Delphine Bouilly

**Université de Montréal, Québec, Canada
August 2018**

Table of Contents

1. Summary	3
2. Biosensor System and Assay	4
2.1. <i>Competitive Bioassay</i>	
2.2. <i>Synthesis and characterization of vancomycin-FITC</i>	
2.3. <i>Microfluidic Chip</i>	
2.4. <i>Detection and Data Acquisition</i>	
3. Analytical Performance	6
4. Novelty and Creativity	7
4.1. <i>Already Available</i>	
4.2. <i>New Developments</i>	
5. Translational Potential	8
5.1. <i>Stakeholder Desirability</i>	
5.2. <i>Technical Feasibility</i>	
5.3. <i>Business Viability</i>	
6. Team and Support	10
6.1. <i>Contributions of the team members & People who have given us support</i>	
6.2. <i>Sponsors</i>	
7. Final Remarks	11
8. References	12
9. Annexe	13
9.1. <i>Synthesis and characterization of vancomycin-FITC</i>	
9.2. <i>BiosensUM Complete Business Plan prepared by Antoine Nkaye</i>	

1. Summary

BiosensUM has designed an integrated biosensor for monitoring vancomycin concentration in blood plasma. With this biosensor, we aim to improve the vancomycin treatment procedures in hospitals by reducing the risk of under-dosing patients, which can lead to bacterial resistance, or overdosing, which can worsen the medical condition of the patient. The main component of our biosensor consists of a single-use microfluidic chip for fast, and cost-effective analysis using green chemistry principles. Our system only requires a 20 μ L drop of plasma and delivers results in less than 5 minutes, compared to the 5 mL sample tube and a minimum of 2 hours required by the labour-intensive laboratory procedures currently performed in hospitals. We have created here a portable lab-on-a-chip, which allows for the direct injection of the sample, the mixing of the reagents, the bioassay and detection of the signal to occur in a continuous flow. The signal detected is automatically converted to a working concentration value by our software application and displayed on a user-friendly LCD screen or mobile device. Furthermore, without changing the hardware or software, we can customize the chips for the detection of a variety of different molecules providing endless possibilities. We believe that portable lab-on-a-chip biosensors are the future of blood testing in hospitals and everybody from hospital management to the patients will benefit from a user-friendly and minimalistic approach such as ours.

2. Biosensor System and Assay

2.1. Competitive Bioassay

We developed a miniature biosensor based on a competitive assay for the rapid detection and quantification of vancomycin in blood plasma in a clinically relevant concentration range between 5-100 mg/L in less than 5 minutes. The biosensor consists of a microfluidic chip that requires very small volumes of reagents which allows for effective, fast and economical reactions to occur¹. The unknown concentration of vancomycin in plasma will compete with our synthesized vancomycin isothiocyanate fluorescein (vancomycin-FITC) for the anti-vancomycin antibody bound on the surface of polystyrene microbeads². The continuous flow of buffer will wash the remaining unbound molecules of vancomycin and vancomycin-FITC and a photodiode will induce the vancomycin-FITC fluorescence at a wavelength of 480 nm. Fluorescence emission is detected at 525 nm and converted to the plasma vancomycin concentration (mg/L). Therefore, as the vancomycin competes with the vancomycin-FITC, fluorescence emission will decrease as the vancomycin level in plasma will increase and it will be possible to generate a calibration curve to determine the vancomycin concentration in human blood plasma.

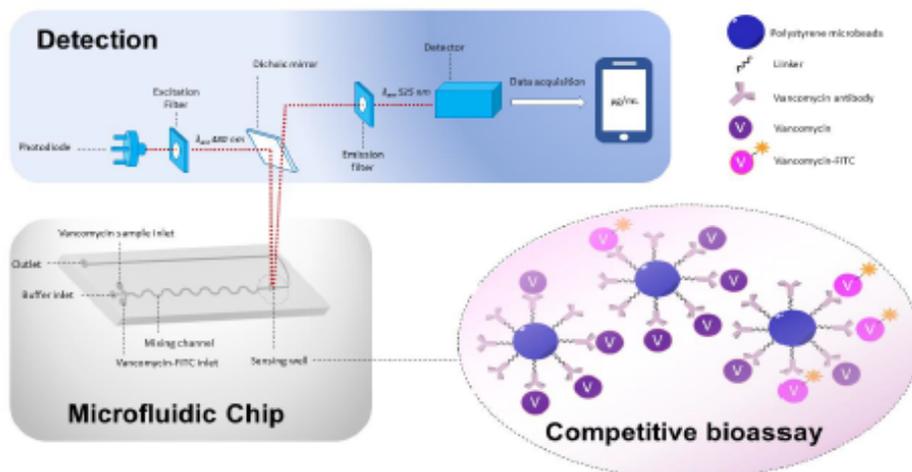


Figure 1: Development of a miniature biosensor for the detection of vancomycin in blood plasma based on a competitive assay.

2.2 Synthesis and characterization of vancomycin-FITC

To achieve this bioassay, we synthesized the vancomycin-FITC via the spontaneous reaction of the amine group of the vancomycin and the isothiocyanate of the isothiocyanate fluorescein in a basic solution to form an isothiourea group³. (Figure A1) The vancomycin tagged with the isothiocyanate fluorescein has been purified to 95% by liquid chromatography-mass spectrometry. (See Annexe 9.1) The mass spectrometry spectrum confirms the synthesis of the vancomycin-FITC. (Figure A2). The fluorescence spectrums of the synthesized vancomycin-FITC have been realized to find the optimal excitation (480 nm) and emission (525 nm) wavelengths in the running buffer. (Figure 2)

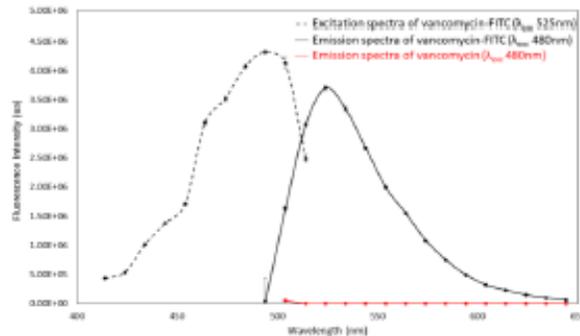


Figure 2: Fluorescence spectra of the vancomycin-FITC in the running buffer and emission spectra of vancomycin at 480 nm excitation

2.3 Microfluidic Chip

As mentioned above, our bioassay is performed in a single use microfluidic chip. The purpose of the microfluidic chip we designed is to use microbeads as a reactive surface for our fluorescence immunoassay, as they are easily functionalized⁴. The dimensions of the channels were designed to trap beads in the detection zone. In order to manufacture such a chip, a layer per layer process was designed by us and manufactured by *Aline Microfluidics Solutions*⁵. The chips were also covered by cyclo-olefin polymers and copolymers (COP/COC) to improve fluorescence^{6,7}. We designed the chips to have three injection channels converging into mixing tubing for the mixing of the vancomycin sample and the vancomycin-FITC with the washing buffer, which are injected in a continuous flow. The competitive bioassay will occur in the detection zone at the end of the mixing channel. Our biosensor hardware is equipped with a pressure pump to finely control the flow rate of reagents. This design requires a total volume of only 20 μL and takes a maximum of 5 minutes to complete.

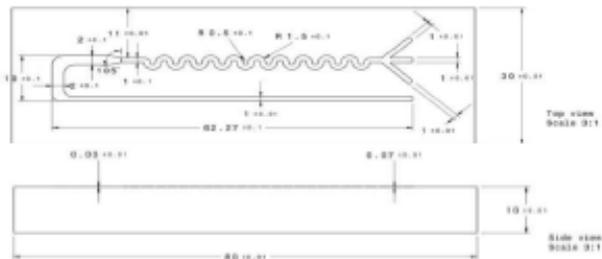
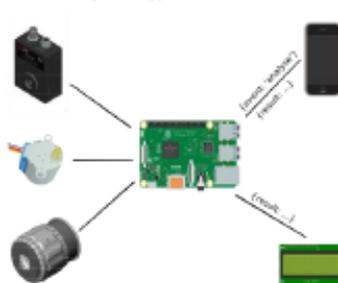


Figure 3: Final design of the microfluidic chip

2.4 Detection and Data Acquisition

The chip is inserted inside our instrument, which is equipped with a photodiode for the induction of vancomycin-FITC fluorescence. The photodiode and filter focus where the microbeads are trapped inside the chip to detect the fluorescence emission. The fluorescence emission is detected by the photodetector and measured with a digital oscilloscope. Subsequently, the result is stored on the Raspberry Pi for conversion to the concentration level

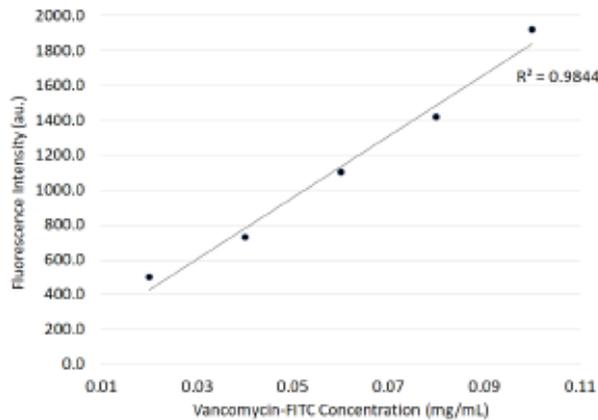


of plasma vancomycin, then displayed on the liquid-crystal display and the mobile application, both programmed by our team. Regarding the technological aspects, the application programming interface (API) on the server side uses the Flask microframework, controlling various Python scripts. The application uses the Dart programming language and the Flutter framework, mainly for its ease of use and compatibility across the iOS and Android operating systems. Starting an analysis is done simply by sending a JSON (JavaScript Object Notation) message through HTTP to the RPI server.

Figure 4: The detection and data acquisition software system (images under the creative commons copyright of Thorlabs®)

3. Analytical Performance

First, we tested our assay principle in a 96-wells fluorometer. We were able to detect the fluorescence of the synthesized vancomycin-FITC by this technique (Figure 2). We also performed a fluorescence calibration curve for the vancomycin-FITC linkage to our receptor, the anti-vancomycin monoclonal antibody, in the well and determined the optimal amount of



vancomycin-FITC that can compete with the vancomycin sample for the competitive assay (Figure 5). For the competitive assay, the tests in the 96-wells fluorometer were not conclusive. We realized that the instrument was reading the fluorescence in the solution and not at the surface of the plate where our vancomycin-FITC and vancomycin compete to bind the anti-vancomycin antibody. So, we were not able to dose the vancomycin in this condition.

Figure 5: Calibration curve of the fluorescence of vancomycin-FITC bound to anti-vancomycin monoclonal antibodies (Excitation wavelength : 480 nm, Emission wavelength : 525 nm)

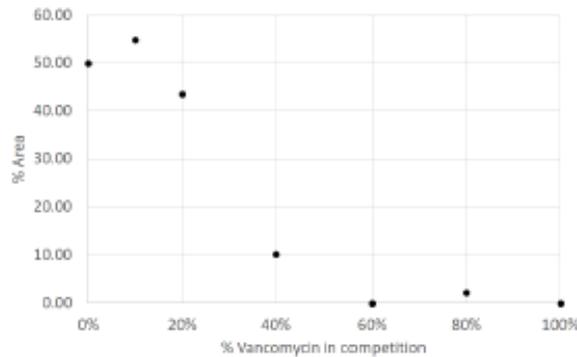


Figure 6: Competitive assay performed by fluorescence microscopy

Then, we moved to the fluorescence microscopy to confirm our competitive assay. With this technique, we were able to do an appropriate focus on our surface and optimize the precision of vancomycin detection. With these improvements, we achieved to realize a competitive assay (Figure 6). As we expected, the lower concentration of vancomycin gave a high fluorescent coverage of the surface and the higher quantity of vancomycin resulted to a really lower fluorescent coverage. So, with fluorescence microscopy, we confirmed the principal of our competitive assay.

Thereafter, we tried to implement the competitive assay on our device. We faced a lot of obstacles because the device was not optimized enough. The major part of the problem came from the fact that the diode was not enough powerful and gave an unstable signal. Because of this, the noise was very important. And, at the end, we were not able to get a fluorescence signal significantly different of the noise one for the vancomycin-FITC. And, at the end, we were not able to perform either a fluorescent calibration curve of the vancomycin-FITC or the competition assay. To solve this problem, we had some ideas such as adding a photomultiplier and using a more powerful and stable diode.

4. Novelty and Creativity

4.1. *Already Available*

The current procedures available for measuring the vancomycin concentration in patient samples^{9, 10, 11} are long, expensive and invasive. A registered nurse must draw a 5 mL blood sample and highly qualified professionals must perform the tests in hospital laboratories using large equipment such as a spectrophotometer and an ultracentrifuge that require daily maintenance and quality testing. This whole process can take up to 2 hours before the results are delivered to the doctor, not to mention very costly considering that a patient being treated with vancomycin needs to monitor their antibiotic levels multiple times a week^{9, 10, 11}. This can cause errors in dosage that can be detrimental to the patient's care.

4.2. *New Developments*

Our goal at BiosensUM was to develop a biosensor that could improve the monitoring of vancomycin treatments in hospitals and patient follow-up. We developed a minimally invasive point-of-care biosensor that only requires a 20 μ L drop of blood and can deliver results within 5 minutes on a LCD screen or via a mobile device. A nurse or hospital personnel can perform the whole procedure in the patient's room and send the results to the doctor via our proprietary software application that can easily be paired with the existing hospital system. The treatment of the patient can therefore be adjusted in a matter of minutes preventing the dangerous risks associated with under or over dosing the patient. Our novel microfluidic system is economical, compact and environmentally friendly. The device is portable and energy efficient and the microfluidic chips only need very small volumes of reagents. The chips themselves can be altered to detect a variety of different molecules giving way to endless possibilities without having to change the rest of the hardware or software. Thanks to our biosensor, we believe we can provide hospitals with a novel approach to blood testing.

5. Translational Potential

5.1. Stakeholder Desirability

The sensor that our team developed is set to provide an excellent answer to many stakeholders' needs. First off, the patient will benefit from the faster results delivered by our device, while experiencing a more pleasant less-invasive treatment. The point-of-care feature of this biosensor allows for immediate dosage adjustments to prevent under or overdosing the patient. We also envision developing a simpler device allowing the patients to monitor their treatment at home in the same principle as a glucometer, which will significantly shorten their hospital stay.

Another stakeholder that has a lot to gain from using the apparel is the hospital management. The adoption of our product will enable them to save on labour wages by lowering the amount of work required by the current labour-intensive procedures needed to provide doctors with results. This also helps improving the efficiency of the process, reducing the necessary time from a minimum of 2 hours to a maximum of 5 minutes. Such an improvement is possible since most of the work will now be performed bed-side in the patient's room with minimal equipment and hospital personnel as well as very small volumes of sample and reagents. We foresee that all users of this device will benefit from the user-friendliness handling of this tool. However, we are still working towards being in compliance with the call-for-tender procedures in order to obtain a contract to supply hospitals with our products. A more detailed analysis can be found in our complete business plan (see Annexe 9.2).

5.2. Technical Feasibility

The use of a single-board computer like the Raspberry Pi (RPI) enables a myriad of possibilities, since it is a cheap and small all-purpose computer. Coupled with the potential to program with the Python programming language, it is easy to prototype quickly on the machine. Countless peripherals and other devices can be attached to the RPI, either through USB, ethernet or general-purpose input/output. By using simple scripts, the small computer controls the light-emitting diode and the motorized pump, reads the value of the photodetector using an oscilloscope, and outputs the results using an LCD screen, in the matter of a few seconds. These same scripts can be easily iterated on, improved upon and customized for other uses. The protocol that we developed to control the computer and get the results with the LCD screen or through an application could also be used by vetted partners. Our company could also offer to implement the integration of the software.

Furthermore, we put a lot of emphasis on the miniaturization of our device. The size of the digital oscilloscope was selected to be as small as possible, around the same size as the Raspberry Pi. It would be possible to substitute the latter for its even smaller, albeit slower counterpart, the Raspberry Pi Zero¹². Additionally, the microfluidic chips used for testing measure only 3 cm by 8 cm. While greatly limiting blood volume withdrawn from patients, it also limits the environmental impact by reducing the quantity of reagents used in the process. It could also be possible to use eco-friendly material like degradable polymer during later stage of production.

Our future work will be aimed towards developing a custom printed circuit board as well as low-power embedded circuits that will help making it more portable, with a better battery life and at a slightly lesser cost. These improvements will be more suitable for usage in hospitals.

5.3. Business Viability

5.3.1 Cost projection

In order to produce decent and reliable products, efficient cost management techniques are needed. Furthermore, funds given by other parties should be separated within the different development objectives the company is aiming for. Those objectives can be stated as: according sufficient funds to research and development, maintaining enough cash flow to sustain a short/long – term growth and acquiring the assets needed for the commercialization phase (product, marketing, patent, etc.).

For the moment, there is nobody being paid for R&D since solely team members are doing it. However, later phases might require extra work and expertise to insure the worthiness of the tester. Therefore, part of the budget needs to be directed toward research (~12K/year) and development (~20K). We gathered the cost per unit for the tester (2898,14\$), the chips (33.53\$) and the microfluidic montage (3045\$). One hospital would require a tester, a microfluidic montage and around 180 chips per month adding up to an annual cost of ~77 167.80\$. This requires us to have around 600-800K funding to have the required cash flow throughout early years. Other costs to consider: the patent (~45K), certifications (~45K) and marketing (~10K/year).

5.3.2 Revenue streams

Investment in the healthcare sector is six times higher than it was back in 2010¹³. This implies that an appropriate business model could generate great profit margins over the years. After reviewing different types of revenue models, a hybrid between perpetual licensing and per test billing was chosen. To drag on profit, our strategy is based on obtaining long-term contracts while still providing resources every month. Our first objective would be to gather enough funding from Canadian institutions such as the Canadian Development Bank¹⁴ since those organisms can give substantial support for few costs compared to institutional capital. Then, we can start to lease the tester to as many customers as possible and sell them the chips for around five times our production cost. After that, the focus would be towards producing a variety of chips to test for different molecules, which would make us even more profit.

6. Team and Support

6.1. Contributions of the team members & People who have given us support

Name	Status	Principle contributions
Marie-Pier Dinel	Team Leader	Oversaw all aspects of the project
Madline Sauvage	Science VP.	Involved in the laboratory and performed analytical analyses
Jean-Antoine Gauthier Cyr	Technology VP.	Link between the science team and the engineering team
Zoubaire Moustaine	Engineering VP.	Microfluidic specialist
Antoine Nkaye	Marketing and Business VP.	Responsible for the entrepreneurial aspects of the project
Frédéric Fournelle	Science team member	Participated in the design of the biosensor, the development of the bioassay and the analytical tests
Élizabeth Elder	Science team member	Involved in the development of the bioassay and the scientific writing
Laurianne Gravel Tatta	Science team member	Conception of the bioassay and in the development of our analytical testing protocols
Abdelhakim Qbaich	Technology team member	Programming specialist
Godefroy Borduas	Technology team member	Participated in conceptualizing and coding the data acquisition system
Pr. Jean-François Masson	Supervisor	Helped us with the design of the bioassay and the technological aspects
Pr. Delphine Bouilly	Collaborator	Helped us with the bioassay and the detection

Finally, we would like to say a special thank you to Vanessa Kairouz, Karine Gilbert, Antoine Caron, Jean-François Mire and Alexandre Bouard without whom this project would not have been possible.

6.2. Sponsors



7. Final Remarks

The team at BiosensUM would like to thank SensUs for this amazing opportunity to participate in their international competition for the first time. It was a challenging learning experience that allowed us to grow as scientists and entrepreneurs as well as make lifelong friends along the way. We look forward to putting the finishing touches on our vancomycin biosensor and work towards acquiring a patent to pursue our project even further. We would also like to thank all our sponsors that provided us with the financial and technical support, the healthcare professionals that gave us some of their precious time to participate in our surveys and, last but not least, our two fantastic mentors Jean-François Masson and Delphine Bouilly for their guidance. We are excited for what is to come in 2019 for BiosensUM! Follow us on Instagram (@biosensum.udem) and Facebook (Biosensum - Université de Montréal SensUs Team) to see what we will be up to. See you next September for SensUs 2019!

8. References

1. Luka, George et al. "Microfluidics Integrated Biosensors: A Leading Technology towards Lab-on-a-Chip and Sensing Applications." Ed. Alexander Star and Frances S. Ligler. *Sensors (Basel, Switzerland)* 15.12 (2015): 30011–30031. PMC. Web. 29 Aug. 2018.
2. Vila, M., Oliveira, R., Gonçalves, M. (2007) "Analytical methods for vancomycin determination in biological fluids and in pharmaceuticals", *Quim. Nova*, Vol. 30, No. 2, 395-399.
3. ThermoFisher.com. (2018). Introduction to Amine Modification—Section 1.1 | Thermo Fisher Scientific - CA. [online] Available at: <https://www.thermoFisher.com/ca/en/home/references/molecular-probes-the-handbook/fluorophores-and-their-amine-reactive-derivatives/introduction-to-amine-modification.html#head3> [Accessed 29 Aug. 2018].
4. Siiman, O., Burshteyn, A., Insausti ME. "Covalently Bound Antibody on Polystyrene Latex Beads: Formation, Stability, and Use in Analyses of White Blood Cell Populations." *J Colloid Interface Sci.* 2001 Feb 1;234(1):44-58.
5. ALine Inc. (2018). Microfluidics Company: Science and Engineering | ALine. [online] Available at: <https://alineinc.com/> [Accessed 28 Aug. 2018].
6. Scheicher, S. R., Krammer, K., Fian, A., Kargl, R., Ribitsch, V. and Köstler, S. (2014) "Patterned Surface Activation of Cyclo-Olefin Polymers for Biochip Applications", *Periodica Polytechnica Chemical Engineering*, 58(1), pp. 61-67. doi: <https://doi.org/10.3311/PPCh.7203>.
7. Zeon.co.jp. (2018). Cyclo-olefin polymers (COP) - ZEONOR® - Products : ZEON CORPORATION. [online] Available at: http://www.zeon.co.jp/business_e/enterprise/speplast/speplast2.html [Accessed 28 Aug. 2018].
8. Thorlabs.com. (2018). Thorlabs, Inc. - Your Source for Fiber Optics, Laser Diodes, Optical Instrumentation and Polarization Measurement & Control. [online] Available at: <https://www.thorlabs.com> [Accessed 28 Aug. 2018].
9. Beaumontlaboratory.com. (2018). Beaumont Laboratory - Lab Test Details. [online] Available at: <https://www.beaumontlaboratory.com/test-lab-directory/lab-test-details/?testid=498> [Accessed 28 Aug. 2018].
10. Calgarylabservices.com. (2018). Vancomycin. [online] Available at: <http://www.calgarylabservices.com/lab-services-guide/lab-tests/AlphabeticalListing/V/Vancomycin.htm> [Accessed 28 Aug. 2018].
11. Geisingermedicallabs.com. (2018). Specimen collection and processing instructions for VANCOMYCIN TROUGH test. [online] Available at:

<https://www.geisingermedicallabs.com/catalog/details.cfm?tid=1433> [Accessed 28 Aug. 2018].

12. Raspberry Pi. (2018). Raspberry Pi Zero - Raspberry Pi. [online] Available at: <https://www.raspberrypi.org/products/raspberry-pi-zero/> [Accessed 28 Aug. 2018].
13. CB Insights Research. (2018). Digital Health Funding Sees Record Year In 2016. [online] Available at: <https://www.cbinsights.com/research/digital-health-startup-funding/> [Accessed 29 Aug. 2018].
14. BDC. (2018). Business Development Bank of Canada. [online] Available at: <https://www.bdc.ca/en/pages/home.aspx> [Accessed 28 Aug. 2018].

9. Annexe

9.1. Synthesis and characterization of vancomycin-FITC

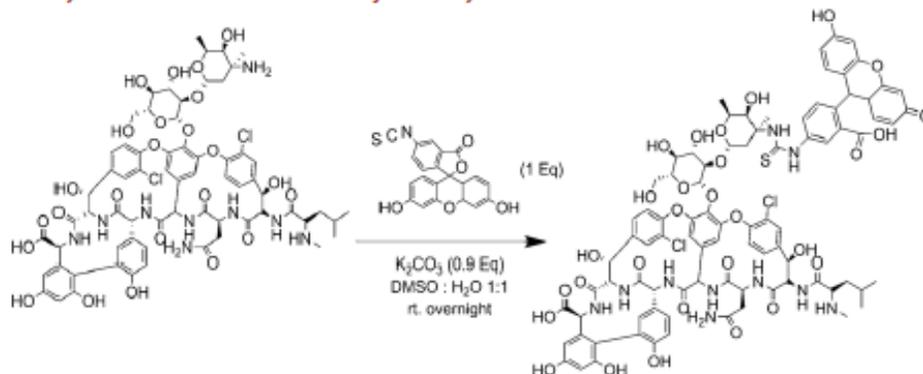


Figure A1: Synthesis of vancomycin isothiocyanate fluorescein

LC-MS prep method:

Column: XSelect@HSS PFP OBD 5 μm 19 mm x 100 mm

Elution: 24mL/min, 30:70 MeOH:H₂O+Formic Acid 0.1% to 70:30 MeOH:H₂O+Formic Acid 0.1% in 11 minutes. Collection of 920 m/z ($M+2H$)²⁺.

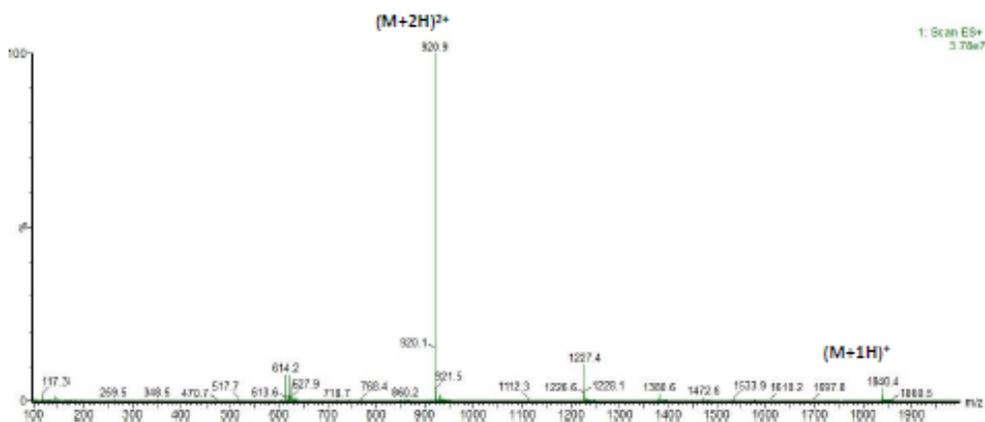


Figure A2: MS Spectra of Vancomycin-FITC

9.2. BiosensUM Complete Business Plan prepared by Antoine Nkaye

Section One: Packaging of a testing service.

A. Description of the BiosensUM business orientations.

The BiosensUM mission is to provide added value to the health sector by creating an entire platform easily usable for a multitude of tests. Our short-term goal is the elaboration of a vancomycin tester, but in the long run we'll make our device as versatile as possible to efficiently answer the future market's needs. Currently, our main objectives are:

- Acquiring the ability to detect vancomycin concentration in less than 5 minutes.
- Creating a client-based approach to produce a user-friendly machine and the complementary resources around its usage.
- Elaborate differentiation techniques to retain customers, such as custom packaging and leasing testers.

The guiding strategy relies on a growth tactic based on adding new products into the market. There is always a need for technological improvement in the health sector, which makes it a priority for business board members. We want to show them how much added value (savings, productivity, etc.) they can get by adhering to our services. Our success will come from selling a faster tester that can be used by newly trained nurses. Indeed, technicians' work would therefore not be needed as much as right now. When it comes to the business strategy, it's mostly a differentiation approach since our platform is unique and we'll be adopting custom client services. Although, efficient cost managing is still a priority to keep us ahead of the competition. We'll discuss more deeply the current market, our marketing plan and other important points in later sections of the plan.

B. The tester and the resources surrounding it.

The packaging of our products can vary depending on the client's need. Our main product is the tester itself, but profit comes mostly from selling supplies related to the machine on a periodical basis. Also, it is possible to add expertise on the various types of technical implementation over the production process to add even more value to the business. Finally, we want to have a helpful guide on how to easily use our product, personalize pens, stickers and other furniture that draws attention to our brand. Our product needs to be seen as innovative and fun to use. Therefore, we are working on a design that draws attention and possibly adding a touch screen. At the beginning, we would rather be focusing on delivering a product that satisfies all our production criteria (laws, speed, validity of the test, resistance to water and usage, etc.) to then focus on a final model that would penetrate the market efficiently. Another important aspect of our service is the complementary equipment we can add to the bill. We will use some basic discrimination methods to drag most of the customer profit. One example of that is the concept of different bundles offered for different prices. We can also add some special orders (products we don't have in inventory) to the menu, which makes us able to earn money by selling goods from another merchandiser. Since our sensor can be used bedside by a nurse instead of having the test be performed in a laboratory by technicians, it gives faster results, which saves time, energy and money. Indeed, our customers will be able to implement a new service process that makes the business more efficient and helps them satisfy their

patients' needs. In the long run, our clients will also have access to a wide variety of chips for different tests, which will increase the versatility of the tester.

C. Healthcare market analysis

Throughout the year, we have interviewed and surveyed dozens of stakeholders to deepen our understanding of the market. As a result, we now have a clear vision of the Canadian health sector's needs in terms of technological devices. The healthcare sector's need for technological devices is growing. Our approach must be adapted to two sectors (public and private) for which the strategy is quite different. Indeed, it is a priority for us to meet the requirements to obtain contracts in both fields.

Public sector: After interviewing biotech equipment decision makers, we obtained pertinent information about how to apply for contracts we want to obtain. In Canada, especially in Quebec, many requirements are necessary in order to obtain an agreement. Some of those include legal registration, full disclosure of financial statements and many more. Our objective is to obtain a no tender contract agreement, which lets us overextend the standard legal duration of a contract (3 years) to more. This is crucial for our supply-chain management strategy since it enables us to supply the client over the life of the patent.

Private sector: For the private sector, the more visibility we obtain, the better it is. This starts by an efficient marketing plan so that everyone knows about us.

D. Marketing Plan

Application and Effect of Loan or Investment: Collecting the necessary funds to finance the research and development costs is important, a well-executed management of that money is mandatory. With the diversity of knowledge our team has and the help of a few creditors, we can draw attention to our brand, retain customers and work towards great earnings over time. We are confident in our ability to put our tester into the client's hands.

Section Two: Financial Data.

Chips			
Item	# of units	Price per unit	Total cost
Microbead	1	0	0
EDC/NHS	1	0,1	0,1
Antibody	1	8	8
Vancomycin	1	0,33	0,33
Solvent	1	1	1
FITC	2	4	8
MS separator	1	16	16
Buffer	1	0,1	0,1
Total cost per chips			33,53

Microfluidic montage			
Item	# of units	Price per unit	Total cost
Tubing	1	2	2
Connectors	14	3	42
Valve	2	1500	3000
Syringe driver	1	0,2	0,2
Syringe	1	1	1
Total cost per chips			3045,2

Device			
Item	# of units	Price per unit	Total cost
LED	1	200	200
Collimator	1	270	270
Connecting joint	19	2	38
Lens tube	1	20	20
Dichroic mirror block	1	165	165
Converging lens	2	48	96
Filter	1	305	305
Dichroic mirror	1	255	255
Raspberry-Pi	1	45	45
Electric wire	20	0,057	1,14
Breadboard	1	10	10
Digital oscilloscope	1	250	250
Detector	1	1117	1117
LED screen	1	35	35
Pump pieces	2	45,5	91
Total cost per unit			2898,14

Annexe C – « Contrer ces bactéries qui résistent », Marie-Pier Dinel

DIRE / REGARD SUR L'ACTUALITÉ



Marie-Pier Dinel
marie-pier.dinel@umontreal.ca
Programme de maîtrise
en chimie

CONTRER CES BACTÉRIES QUI RÉSISTENT

Les infections causées par des bactéries résistantes aux antibiotiques sont de plus en plus communes et laborieuses à traiter. Dans ce contexte, en août 2017, le gouvernement du Canada a proposé un cadre d'action pancanadien afin de lutter contre la résistance aux antibiotiques.

Juste au Canada, 25 millions de prescriptions d'antibiotiques sont données par année, ce qui représente près d'une prescription par personne par an. De ce nombre, 50 % seraient inappropriées, voire inutiles. Or, la surconsommation et l'utilisation inadéquate de ces médicaments contribuent grandement à la croissance de la résistance bactérienne aux antibiotiques.

Le cadre d'action pancanadien *Lutter contre la résistance aux antimicrobiens et optimiser leur utilisation*, publié en août 2017 par le gouvernement du Canada, vise à contrer cette résistance en coordonnant des mesures de prévention des infections ainsi que la recherche et l'innovation. Parmi les éléments de ce rapport se retrouve l'arrêt de la vente libre des antibiotiques dans le domaine agricole dès décembre 2018¹. En ce moment, les animaux et les poissons d'élevage sont nourris préventivement avec des antibiotiques afin que leur croissance soit favorisée et les risques d'infection, réduits. Selon plusieurs études, les antibiotiques administrés aux animaux sont ingérés par les humains qui consomment la viande de ces bêtes. Avec cette modification au règlement, un vétérinaire devra diagnostiquer une infection chez l'animal malade avant de lui prescrire les antibiotiques nécessaires à sa guérison. La consommation préventive d'antibiotiques ne sera donc plus possible pour les élevages canadiens.

Parmi ce type de médicaments, les antibiotiques développés au 21^e siècle ne représentent que 20 % de ceux utilisés aujourd'hui. Sachant que les résistances des bactéries se développent de plus en plus rapidement, la recherche de nouveaux antibiotiques doit absolument être accentuée et favorisée. Pourtant, la tendance inverse est observée. En effet, depuis les années 2000, le nombre de pharmaceutiques travaillant sur le développement de nouveaux

médicaments antimicrobiens n'a cessé de chuter. Ces compagnies se tournent plutôt vers la recherche et le développement de médicaments pour les maladies chroniques tel le diabète, qui sont jusqu'à vingt fois plus rentables. Afin d'enrayer ce phénomène, la recherche et l'innovation représentent un élément important du cadre d'action pancanadien pour lutter contre la résistance antibactérienne.

Le gouvernement du Canada veut également favoriser le développement des méthodes de diagnostic au point de service. Pour ce faire, les Instituts de recherche en santé du Canada ont distribué à des équipes de recherche des subventions totalisant plus d'un million de dollars. L'utilisation d'outils rapides de suivi personnalisé des antibiotiques chez les patients dans le système de santé permettrait de cibler l'antibiotique nécessaire à la guérison du patient et d'en déterminer la quantité suffisante. Cette innovation mènerait à une utilisation adéquate des antibiotiques et éviterait la surconsommation.

Ainsi, le cadre d'action déposé par le gouvernement du Canada s'inscrit dans un élan mondial de sensibilisation à la résistance bactérienne. Il s'attaque à une problématique complexe qui nécessite une coordination entre les divers acteurs du milieu. Ce plan entraînera la mise en place d'actions concrètes afin de contrer la résistance aux antibiotiques. ●

¹ Agence de la santé publique du Canada. (2017). *Lutter contre la résistance aux antimicrobiens et optimiser leur utilisation : un cadre d'action pancanadien*. Reperé à <https://bit.ly/2v1QHZF>

Annexe D – Caractérisation de la vancomycine-FITC

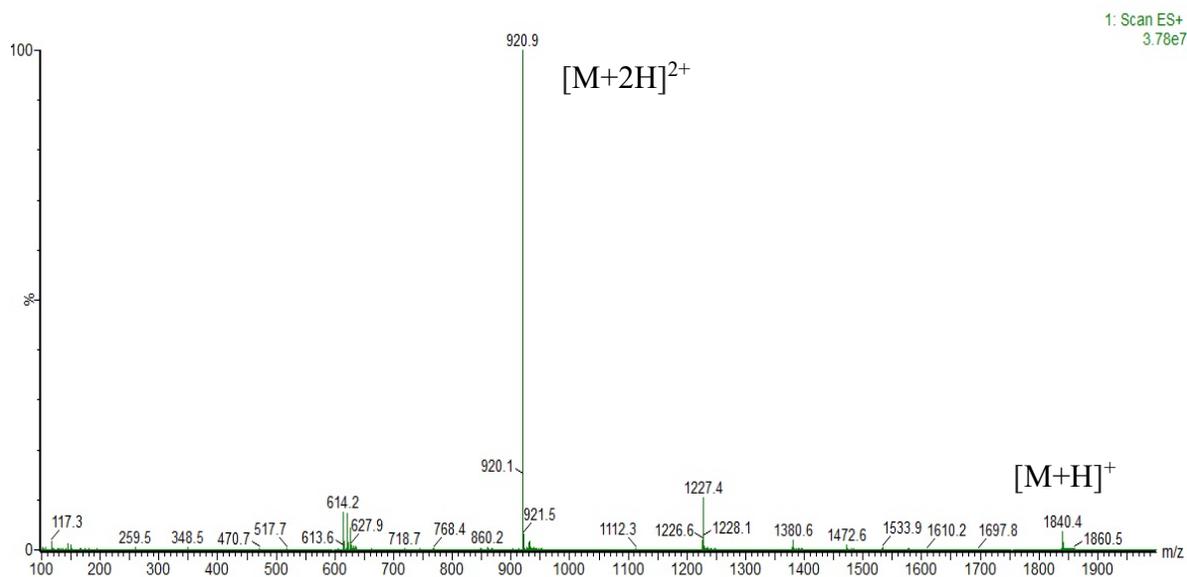


Figure 40. Spectre de masse de la vancomycine-FITC purifiée par chromatographie liquide en mode préparatif. $[M+H]^+ = 1840,4$ m/z, $[M+2H]^{2+} = 920,9$ m/z