

Université de Montréal

**Développement d'outils analytiques pour la détection de  
biomolécules directement dans des fluides sanguins**

par

Julien Breault-Turcot

Département de chimie

Faculté des arts et des sciences

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures et postdoctorales en vue de l'obtention du  
grade de *philosophiae doctor* (Ph.D.) en chimie

Septembre 2015

© Julien Breault-Turcot, 2015

## Résumé

Cette thèse porte sur le développement de biocapteurs basés sur la technique de résonance des plasmons de surface (SPR) pour effectuer des analyses directement dans un fluide sanguin n'ayant subi aucune purification ou dilution. L'ensemble des biocapteurs discutés exploiteront un instrument SPR portable développé dans le groupe du professeur Masson. Le premier volet de la thèse portera sur le processus d'interférence lié à l'adsorption non spécifique du sérum à la surface du capteur. L'analyse des biomolécules adsorbées sera effectuée en combinant la SPR à la spectrométrie de masse. Les informations obtenues seront exploitées pour la construction de biocapteurs adaptés à l'analyse en milieu sanguin.

Un premier biocapteur développé ciblera la protéine antigène prostatique spécifique (APS) contenue dans le sérum servant de biomarqueur pour dépister le cancer de la prostate. Pour détecter les faibles concentrations de cette protéine directement dans le sérum, un matériel plasmonique microstructuré sera utilisé pour amplifier les signaux obtenus et sera recouvert d'une monocouche peptidique minimisant l'adsorption non spécifique du sérum. L'instrument SPR aura été adapté pour permettre également la détection simultanée de fluorescence. Un test ELISA sera ainsi effectué en parallèle du test SPR. Chacune des techniques fournira un contrôle pour la deuxième, tout en permettant de détecter le biomarqueur au niveau requis pour dépister la maladie. La combinaison des deux méthodes permettra aussi d'élargir la gamme dynamique du test de dépistage.

Pour terminer, l'instrument SPR portable sera utilisé dans le cadre de détection de petites biomolécules ayant un potentiel thérapeutique directement dans un échantillon de sang. Des peptides ayant une activité anti-athérosclérotique pourront ainsi être détectés à même un échantillon de sang ni purifié ni dilué, et ce à des concentrations de l'ordre du micromolaire. Une modification de la microfluidique via l'introduction d'une membrane poreuse au cœur de celle-ci sera la clé permettant d'effectuer de telles analyses.

La présente thèse met de l'avant de nouvelles stratégies et des modifications instrumentales permettant d'analyser des protéines et des petites molécules directement dans un échantillon non purifié de sérum ou de sang. Les modifications apportées au système fluidique,

à l'instrument SPR et au niveau du biocapteur employé permettront d'effectuer des biodétections dans des matrices aussi complexes que les fluides sanguins. Les présents travaux mettent en lumière la capacité d'un instrument SPR/fluorescence portable à faire en 12 minutes la biodétection d'un marqueur du cancer de la prostate directement dans un échantillon de sérum. Finalement, on rapporte ici un des premiers articles où un biocapteur SPR est utilisé à même un échantillon de sang non-purifié pour faire des biodétections.

**Mots-clés** : Résonance des plasmons de surface, Biocapteur, Sérum, Sang, Spectrométrie de masse, Adsorption non spécifique, ELISA, Film d'or microstructuré, Monocouche autoassemblée, Cancer de la prostate, Barrière de diffusion, Microfluidique

## **Abstract**

This thesis discusses the development of surface plasmon resonance (SPR) biosensors to perform detection directly on unpurified and undiluted blood based fluids such as serum or blood. Every biosensor discussed in the following chapters rely on a home-built portable SPR device developed in Professor Masson's research laboratories. Non-specific adsorption, which greatly hinders biosensing in crude fluids, will be the first topic of the thesis. Serum adsorption was performed on the SPR sensor surface and then characterized by SPR and mass spectrometry. This study provided useful information for biosensing directly in blood-based fluids. It also provided a better fundamental understanding of the nonspecific adsorption process on surfaces.

The first biosensor was developed to detect prostate specific antigen (PSA), a protein normally contained in serum, which is a known biomarker for prostate cancer. In order to detect low concentrations of this protein directly in serum, a microstructured gold film was used to amplify the signal generated by the binding event on the biosensor. A peptide monolayer covered the metallic surface of the sensor to reduce non-specific protein adsorption. The SPR portable instrument was modified to simultaneously detect fluorescence in order to perform a SPR and ELISA test in a single instrumental platform. Each technique provided a control for the other for detection of the prostate cancer biomarker at concentration levels required for the screening of the disease. The SPR and ELISA combination also extended the dynamic range of the biosensing assay.

Finally, the portable SPR device was used to detect small biomolecules with potential therapeutic activity directly in a sample of blood. Peptides with an anti-atherosclerotic activity were thus detected in an unpurified and undiluted blood sample at micromolar concentration. The addition of a porous membrane to the microfluidic used for the biosensing assay facilitated the successful detection of these molecules in whole blood.

The present thesis describes novel strategies and instrumental modifications to unlock the possibility of performing biosensing directly on unpurified and undiluted blood-based fluids. Modifications of the fluidic system, the SPR instrument and biosensor used will allow detection in fluids with high complexity such as serum or blood. The work described herein reports a prostate cancer screening assay performed in 12 minutes directly in serum using a portable

SPR/fluorescence instrument. Finally, this thesis reports one of the first scientific papers where a SPR biosensor is used to perform analysis directly in blood.

**Keywords** : Surface plasmon resonance, Biosensor, Serum, Blood, Mass spectrometry, ELISA, Microstructured gold film, Self-Assembled Monolayer, Non-specific binding, Prostate cancer, Diffusion barrier, Microfluidic

# Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures.....	x
Liste des sigles.....	xv
Remerciements.....	xviii
Chapitre 1: Introduction.....	1
1.1 Préambule.....	1
1.1.1 Contexte.....	1
1.1.2 Approche et cibles proposées.....	3
1.1.3 Organisation de la thèse.....	4
1.2 La résonance des plasmons de surface:.....	5
1.2.1 Historique :.....	5
1.2.2 Théorie de la SPR :.....	6
1.2.3 Théorie du plasmon de surface localisé.....	10
1.3 Instrumentation SPR.....	12
1.3.1 Appareillage optique et configuration instrumentales SPR.....	12
1.3.2 Système fluidique.....	16
1.3.3 Capteur SPR.....	17
1.3.4 Matériel plasmonique nano ou microstructuré.....	18
1.4 Biodétection par SPR.....	21
1.4.1 Biocapteur SPR.....	21
1.4.2 Construction du biocapteur.....	23
1.4.3 Étalonnage et cinétique de biodétection par SPR.....	26
1.4.4 Analyse en milieu complexe et réduction de l'adsorption non spécifique de protéines.....	28

1.5	Technique ELISA .....	31
1.6	Spectrométrie de masse par Ionisation Désorption Laser Assisté par une Matrice combiné à un tube à temps de vol.....	33
1.6.1	Historique.....	33
1.6.2	Source et processus d'ionisation.....	34
1.6.3	Matrices organiques MALDI.....	35
1.6.4	Analyseur de masse.....	36
1.6.5	Séquençage et identification de protéines par MALDI-TOF/TOF .....	39
1.7	Directions et perspective de la thèse.....	41
Chapitre 2: Unravelling nonspecific adsorption of complex protein mixture on surfaces with SPR and MS .....		43
2.1	Abstract:.....	44
2.2	Introduction:.....	44
2.3	Experimental details: .....	47
2.3.1	Preparation of the SPR sensors .....	47
2.3.2	Serum adsorption and enzymatic digestion .....	47
2.3.3	Bovine serum albumin (BSA) digestion in solution .....	48
2.3.4	MS analysis .....	48
2.3.5	SPR measurements and instrumentation.....	49
2.4	Results and Discussion .....	49
2.4.1	Proteins adsorbed to surfaces.....	49
2.4.2	Protein digestion on surfaces .....	53
2.4.3	Orientation of BSA on surfaces .....	57
2.5	Conclusions.....	60
2.6	Acknowledgements.....	61
2.7	Supplementary information .....	61
2.7.1	Materials .....	61
2.7.2	Supplementary figures and tables:.....	62
Chapitre 3: Single chip SPR and fluorescent ELISA assay of prostate specific antigen.....		66
3.1	Abstract.....	67

3.2 Introduction.....	67
3.3 Experimental details.....	70
3.3.1 Microfluidic fabrication.....	71
3.3.2 SPR-fluorescence instrumentation.....	71
3.3.3 Biosensor assembly.....	73
3.3.4 PSA sensing with an SPR-ELISA assay.....	74
3.4 Results and discussion .....	74
3.4.1 SPR-fluorescence instrument.....	74
3.4.2 Microfluidics.....	76
3.4.3 Microhole arrays .....	77
3.4.4 Surface plasmon resonance detection of PSA .....	78
3.4.5 Surface plasmon resonance-ELISA assay .....	80
3.5 Conclusions.....	83
3.6 Acknowledgements.....	84
3.7 Supplementary information .....	84
3.7.1 Materials .....	84
3.7.2 Supplementary figures and tables:.....	85
Chapitre 4 : Microdialysis SPR: Diffusion gated sensing in blood .....	89
4.1 Abstract.....	90
4.2 Introduction.....	90
4.3 Experimental.....	93
4.3.1 Microdialysis SPR sensor .....	93
4.3.2 Diffusion measurements .....	94
4.3.3 Peptide biosensing .....	95
4.3.4 IgG biosensing.....	95
4.4 Results and discussion .....	96
4.4.1 Characteristics and optimization of the dialysis fluidic chamber .....	96
4.4.2 Diffusion of larger biomolecules .....	100
4.4.3 Biosensing with a dialysis chamber SPR instrument.....	102



4.4.4 Diffusion gated detection of small peptide ligands in crude biofluids with a CD36 biosensor .....	105
4.5 Conclusions.....	106
4.6 Acknowledgements.....	107
4.7 Supplementary information .....	108
4.7.1 Materials .....	108
4.7.2 Supplementary figures and tables .....	109
Chapitre 5 : Conclusions.....	110
5.1 Perspectives.....	113
Chapitre 6 : Bibliographie.....	115
Annexes.....	I
Annexe 1) Séquençage de protéine.....	II
Annexe 2) Optimisation du positionnement du module de fluorescence pour l'instrument SPR/fluorescence portable .....	IV
Annexe 3) Détection par SPR de la PSA directement dans un échantillon de sérum bovin n'ayant subi aucun traitement ou purification .....	IX
Annexe 4) Détection par SPR et fluorescence de la PSA en utilisant un anticorps secondaire marqué avec un fluorophore .....	XI

## Liste des tableaux

<b>Table 2.1</b> Peptides observed by MALDI MS on different SAM after tryptic digestion of adsorbed proteins initially contained in crude bovine serum and identification of the corresponding protein. ....	54
<b>Table 2.2</b> Changes in the MALDI MS peak areas of tryptic peptides for BSA digested in solution and on the SPR sensor.....	59
<b>Table 2.3</b> Mascot scores for peptides observed by MALDI MS on different SAM after trypsin digestion of adsorbed proteins initially contained in crude bovine serum.....	62
<b>Table 2.4.</b> Peptides observed by MALDI MS after trypsin digestion of proteins non-specifically adsorbed on different SAM.....	63
<b>Table 4.1.</b> Equilibration time for sucrose ( $RH/RP = 0.00235$ ) in the dialysis SPR chamber ( $D_{eff}/D_0 = 0.990$ ) of different thicknesses, with (theoretical) and without (experimental) stirring.....	98
<b>Table 4.2</b> Theoretical effective diffusion time for sucrose, PAA, hemoglobin, albumin and IgG through a porous membrane in a system with stirring. ....	100
<b>Table 4.3</b> SPR response for sucrose, PAA, Hemoglobin, BSA, IgG, human serum and human blood with or without the microdialysis chamber using a gold chip modified with 3-MPA-LHDLHD-OH.....	105

## Liste des figures

<b>Figure 1.1</b> A) Plasmon de surface à l'interface d'un film métallique (constante diélectrique $\epsilon_m$ ) et d'un milieu diélectrique (constante diélectrique $\epsilon_D$ ) se propageant selon l'axe z et B) Volume sondé (indiqué en rouge) par l'excitation du plasmon de surface depuis un prisme (constante diélectrique $\epsilon_p$ ) par un faisceau de lumière avec un angle d'incidence ( $\theta_{inc}$ ).....	7
<b>Figure 1.2</b> Schématisation du couplage de la lumière et du plasmon de surface par l'utilisation d'un prisme d'indice de réfraction plus élevé <sup>30</sup> .....	8
<b>Figure 1.3</b> Excitation du plasmon de surface localisé (LSPR) par l'entrée en résonance du nuage électronique de la nanoparticule avec un champ électrique.....	10
<b>Figure 1.4</b> Spectre de réflectance pour l'excitation d'un plasmon de surface via un instrument à interrogation angulaire ou spectral.....	12
<b>Figure 1.5</b> Instrument SPR basé sur l'interrogation des angles (A) et sur l'interrogation des longueurs d'onde (B) .....	14
<b>Figure 1.6</b> Instrument d'imagerie SPR basé sur l'interrogation des longueurs d'onde .....	15
<b>Figure 1.7</b> Matériaux plasmonique micro ou nanostructuré servant de capteur SPR (A – réseau de diffraction, B – nanofils, C – nano/microtrous, D – nanodisques) .....	19
<b>Figure 1.8</b> Sensorgramme des processus d'association et de dissociation d'un analyte avec un biocapteur SPR ayant un anticorps comme récepteur moléculaire.....	22
<b>Figure 1.9</b> Formation d'une monocouche auto-assemblée (SAM) sur un film d'or à partir de molécules bifonctionnelles contenant un groupement fonctionnel thiol .....	23
<b>Figure 1.10</b> Méthode d'immobilisation de récepteur moléculaire sur un capteur SPR : A) Physisorption sur le film d'or, B) Couplage chimique à une monocouche via groupement fonctionnel, C) Liaison à la protéine A, D) Complexation avec un ensemble biotine/streptavidine/biotine et E) Formation d'un complexe métallique de type His-tag.....	25
<b>Figure 1.11</b> Détection d'un analyte dans un milieu complexe par un test ELISA: A) Substrat solide où le récepteur moléculaire est immobilisé, B) Capture de l'analyte dans l'échantillon à analyser, C) Rinçage du matériel non lié au biocapteur, D) Formation d'un sandwich avec le deuxième anticorps modifié avec un enzyme et E) Conversion du substrat par l'enzyme en composé détectable (fluorescent ou coloré).....	32

<b>Figure 1.12</b> Schéma d'une source désorption/ionisation laser assisté par une matrice (MALDI) .....	34
<b>Figure 1.13</b> Analyseur de masse de type tube à temps de vol (TOF) en mode linéaire (A) et en mode réflectron (B).....	37
<b>Figure 2.1</b> Crude serum adsorption on self-assembled monolayer followed by MALDI-MS and SPR analysis for protein adsorption characterization .....	43
<b>Figure 2.2</b> MALDI mass spectra of proteins from whole bovine serum adsorbed on 16-MHA before (A) and after rinsing the surface with PBS (B).....	51
<b>Figure 2.3</b> MALDI mass spectra for BSA after trypsin digestion in solution (A) and after its adsorption on a monolayer of 16-MHA (B) with insets displaying the peptide at m/z 1568. Note: The peak at m/z 2211 was identified as an autolysis product of trypsin .....	58
<b>Figure 2.4</b> MALDI mass spectra of proteins from whole bovine serum adsorbed on 16-MHA after rinsing the surface with PBS. ....	64
<b>Figure 2.5</b> MALDI mass spectra of peptides after trypsin digestion of proteins adsorbed on various monolayers after exposure to crude bovine serum.....	65
<b>Figure 3.1.</b> (Left panel) Representation of the SPR-fluorescence-ELISA instrument. The sensor chip (not seen) was mounted at the interface between both units. (Right panel) Design of the fluorescence-ELISA unit for the SPR instrument. Standard components of an epifluorescence microscope were included in the unit (laser entry, lenses, optical tube, dichroic mirror, and a photodiode), in addition to the railing and actuator system for moving the fluorescence unit from channel to channel.....	72
<b>Figure 3.2.</b> (Left panel) Schematic representation of the fluidic cell. The SPR sensor is located below the fluidic cell and the fluorescence unit was located above the fluidic cell. (Right panel) The modifications to the SPR instrument required carving an optical window in the latch arm and adding the mounts for the fluorescence head.....	73
<b>Figure 3.3.</b> A) Concept of the combination of SPR and fluorescence ELISA detection in a single microfluidic for the dual detection of the recognition event and enzymatic conversion. B) Schematic of the SPR biodetection and C) for the fluorescence measurement.....	76
<b>Figure 3.4.</b> A) Photograph of microhole arrays produced by photolithography on a 4" wafer B) SEM image of the microhole arrays .....	78

**Figure 3.5** A) Different biosensing schemes for PSA: direct detection (I), secondary detection (II), anti-PSA labeled with HRP (III) B) SPR response for the detection of 10 nM PSA on microhole arrays for each biosensing scheme. .... 79

**Figure 3.6.** Calibration curve for PSA using the SPR assay. The detection was performed with the PSA complex with anti-PSA modified with HRP. Error bars represent one standard deviation for a triplicate measurement..... 80

**Figure 3.7.** Calibration of the fluorescence output for PSA detection using the SPR-fluorescent ELISA assay. 100  $\mu$ M of Ampliflu™ Red was incubated for 30 s and 600 s with HRP. The response from the sensing channel is shown in blue squares (30 s of reaction time) or black circles (600 s of reaction time) and the reference channel is shown in red squares (30 s of reaction time) or green circles (600 s of reaction time)..... 82

**Figure 3.8.** SPR instrument with a fluorescence unit. Left) A photograph of the actual unit in the presence of common laboratory items to highlight the small size of the device. The black fluorescence unit was composed of the filter cube (See the white “x”) and the avalanche photodiode at the top of the fluorescence unit. The linear actuator was mounted on the gray aluminum railing and the fluidic cell of the SPR system was underneath the fluorescence unit. Right) Ray tracing of the excitation laser in green and of the emitted light in yellow. Lenses focused the light on the SPR surface and on the avalanche photodiode. The filter cube was composed of a dichroic beam splitter and a long-pass fluorescence filter. .... 85

**Figure 3.9.** Screenshot of the fluorescence tab of the data acquisition software. .... 86

**Figure 3.10.** SPR sensorgrams for the immobilization of 500 nM anti-PSA (capture antibody) on a surface of 3-MPA-HHHDD-OH for a continuous gold film (red) and a microhole array (blue). The SPR response was stabilized in PBS for 2 minutes before incubating anti-PSA with the activated SPR sensor. .... 87

**Figure 3.11.** Real time measurements of fluorescence emission with the SPR-fluorescence instrument for Ampliflu™ Red peroxidase substrate at 10 (blue line), 20 (green line), 50 (red line) and 100  $\mu$ M (black line) on the SPR sensor. A concentration of 5 nM PSA was previously incubated with anti-PSA-HRP and the complex formed was captured with anti-PSA bound to the microhole array SPR sensor. The kinetic curve consists of a blank measurement in PBS from 0 to 60 seconds followed by the incubation with Ampliflu™ Red solution injected at 60 s. The

decrease in fluorescence at nearly 260 s for 100  $\mu$ M (black line) was due to self-quenching of the fluorophore..... 88

**Figure 4.1.** Left) Microfluidic system with a diffusion barrier: A) Gold coated prism, B) PDMS spacer (sensing chamber), C) Microporous membrane and D) PDMS fluidic reservoir (reservoir chamber). Right) Schematic of the dialysis chamber with blood in the reservoir chamber (not to scale). ..... 94

**Figure 4.2.** Diffusion of sucrose (MW =342 Da), poly(acrylic acid) (MW = 2 kDa), hemoglobin (MW = 64.0 kDa), BSA (MW = 66.4 kDa) and IgG (MW = 150 kDa) through the microporous membrane of 0.4  $\mu$ m pore size (concentration of 10mg/mL for sucrose and poly(acrylic acid) solution and 1 mg/mL for each protein solution)..... 101

**Figure 4.3.** Detection of a small peptide (DBG178) in PBS (blue), in human serum (red) and in human whole blood (green) by using a biosensor based on CD36 (Each single data point reported above comes from a triplicate) ..... 104

**Figure 4.4** Sensorgram for a 10 mg/mL sucrose solution without (top blue line) and with (bottom red line) a microporous membrane. The inset shows the delayed SPR response caused by the diffusion to the SPR sensor..... 109

**Figure 4.5** (Panel A) Calibration of the SPR instrument with dialysis microfluidic (microporous membrane of 0.4  $\mu$ m pore size and a spacer of 0.15 mm). The upper trace (blue) represents the signal acquired from an analytical channel with the addition of varying sucrose concentrations over time and the lower trace (red) represents the reference channel (no sensor). Panel B) Calibration with sucrose solution of the SPR instrument with (blue) or without (orange) a microporous membrane. *With microporous membrane:  $\Delta\lambda_{SPR} = 1764.1 \times RI - 2355.3, R^2 = 0.9983$  ; Without microporous membrane:  $\Delta\lambda_{SPR} = 2221.2 \times RI - 2963.6, R^2 = 0.9923$* ..... 110

**Figure 4.6** Injection of a 1 mg/mL IgG solution without (blue line) and with (orange line) a microporous membrane. The SPR response shows the efficacy of the microporous membrane in reducing background signal from proteins. .... 111

**Figure 4.7** Stabilization of the SPR response after injection of PBS (blue) and human blood spiked with DBG178 in presence of a microporous membrane. .... 112

**Figure A1.1** Paramètres utilisés pour réaliser l'identification des séquences peptidiques associées aux spectres MS/MS générés ..... II

<b>Figure A2.1.</b> Onglet du logiciel servant à effectuer l'acquisition de la fluorescence .....	IV
<b>Figure A2.2.</b> Logiciel AtmelStudio permettant de modifier les positions analysées par le module de fluorescence.....	V
<b>Figure A2.3.</b> Logiciel AtmelStudio avec les positions utilisées par le module de fluorescence .....	VI
<b>Figure A2.4.</b> Microcontrôleur en mode programmation (Gauche) et en mode acquisition (Droite).....	VII
<b>Figure A2.5.</b> Logiciel Atmel Flip utilisé pour enregistrer les nouvelles positions à analyser pour le module de fluorescence.....	VIII
<b>Figure A3.1.</b> Étalonnage d'un biocapteur SPR pour la détection de PSA directement dans le sérum bovin.....	X
<b>Figure A4.1.</b> Méthode de marquage des anti-PSA de l'ensemble commercial Zenon® Alexa Fluor 532 de ThermoFisher Scientific (image provenant du protocole de marquage d'une fiche technique explicative trouvé sur le site internet de la compagnie <a href="https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp25000.pdf">https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp25000.pdf</a> ).....	XII
<b>Figure A4.2.</b> Différent essai de biodétection de la PSA seule (AI), du complexe PSA-anti-PSA (AII), du complexe PSA-anti-PSA-HRP (AIII) et du complexe PSA-anti-PSA-Zenon® (AIV) avec les signaux SPR obtenus pour une concentration de 10 nM en PSA (B) .....	XIII

## Liste des sigles

16-MHA	Acide 16-mercaptohexadécanoïque
$\alpha$ -CHCA	Acide <i>alpha</i> -cyano-4-hydroxycinnamique
ACN	Acétonitrile
AFM	Microscopie à force atomique / <i>Atomic force microscopy</i>
BSA	Albumine de sérum bovin / <i>Bovine serum albumin</i>
CD36	Différenciation d'agrégat 36 / <i>Cluster differentiation 36</i>
DMF	<i>N,N</i> -Diméthylformamide
EDC	<i>N</i> -(3-Diméthylaminopropyl)- <i>N'</i> -éthylcarbodiimide
EOT	Transmission extraordinaire optique / <i>Extraordinary optical transmission</i>
IgG	Immunoglobuline G / <i>Immunoglobulin-G</i>
LSPR	Résonance des plasmons de surface localisés / <i>Localised surface plasmon resonance</i>
MALDI	Désorption/ionisation laser assistée par une matrice / <i>Matrix-assisted laser desorption/ionisation</i>
MS	Spectrométrie de masse / <i>Mass spectrometry</i>
MW	Masse moléculaire / <i>Molecular weight</i>
Nd/YAG	Grenat d'yttrium-aluminium dopé au néodyme / <i>Neodymium-doped yttrium aluminium garnet</i>
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimide
NTA	<i>N</i> $\alpha$ , <i>N</i> $\alpha$ -bis(carboxyméthyl)-L-lysine
PAA	Acide polyacrylique
PBS	Tampon phosphate salin / <i>Phosphate buffered saline</i>
PDMS	Polydiméthylsiloxane
PEG	Poly(éthylène glycol)
POC	Instrument diagnostique portable / <i>Point of care</i>
PSA	Antigène prostatique spécifique / <i>Prostate specific antigen</i>
RIU	Unité d'indice de réfraction / <i>Refractive index unit</i>
SAM	Monocouche auto-assemblée / <i>Self-assembled monolayer</i>



SPR	Résonance des plasmons de surface / <i>Surface plasmon resonance</i>
TM	Transverse magnétique
TOF	Tube à temps de vol / <i>Time of flight</i>
Da	Dalton
kDa	kilodalton

*“The only limit to our realization of tomorrow will be our doubts of today.”*

– Franklin D. Roosevelt

## Remerciements

Je commencerai mes remerciements en soulignant à quel point un doctorat occupe une grande part de votre quotidien pendant plusieurs années charnières de votre vie. L'université et les gens que vous y côtoyez pendant des années clés de votre vie vous façonneront et feront de vous la personne que vous êtes à la fin de votre cheminement universitaire. C'est en s'assoignant d'innombrables heures devant un ordinateur, après plusieurs années de travail, qu'on se rend inévitablement compte que tout cela n'aurait jamais pu être possible sans ceux qui vous ont entouré pendant ces dernières années.

Je tiens donc à remercier tout d'abord les gens présents au début de mes études graduées en chimie pour leur influence, conseils, présence et surtout leur aide. Un gros merci à Olivier Bolduc et Ludovic Saiveng Live, mes deux mentors qui m'ont pris sous leurs ailes et m'ont appris chacun à leur façon (très différente...) à travailler en recherche et à faire des études en chimie analytique. Un deuxième merci à Ludo pour m'avoir incité à rencontrer Jean-François Masson et convaincu de faire mes études graduées dans le groupe de recherche Masson. Merci aussi à Sandy Shuo Zhao pour toutes nos discussions autant en rapport avec la science qu'avec les nouvelles séries télévisées à regarder. Je veux aussi remercier Maxime Couture pour les discussions au sujet du pool de hockey, autour d'une bière en conférence et pour nos matchs de badminton. Je n'ai pas tenu le décompte des victoires et défaites, mais je pense qu'on peut régler ça dans un 2 de 3 au pire...

Comme mentionné précédemment, un doctorat occupe plusieurs années d'une vie au courant desquelles on rencontre beaucoup de gens que je tiens ici à remercier. Merci à Marie-Pierre Murray Méthot, Mathieu Ratel, Audrey Provencher-Girard, Rita Faid, Debby C. Ledo, Nathalia Bukar, Hugo-Pierre Poirier Richard, Alexandra Aubé, Daniel Pelechacz, Hélène Yockell-Lelièvre, Hu Zhu, Kristy McKeating, Simon Forest, Félix Lussier, Jérémie Labrecque Carbonneau, Geneviève Granger, Marc Vidal, Thibault Brulé et Simon Laporte pour votre présence pendant ces années et votre soutien au courant du mon doctorat. Le groupe de recherche a beaucoup grandi avec le temps, mais je n'ai oublié aucun de vous et je garde de précieux souvenirs de chaque personne.

Une petite pensée pour mes stagiaires, Mimosa Nguyen et Steeve (ou Corentin Geny pour les intimes), j'espère que vos études/projets personnels se déroulent comme vous le désirez puisque vous le méritez amplement tous les deux!

Évidemment, je dois également remercier mes parents pour leur soutien inconditionnel à tout moment (service 24h et 7 jours sur 7). Merci pour la bouffe de ma mère et pour l'écoute de mon père qui doit bien avoir hâte que j'arrête de parler de cancer de la prostate... Je suis chanceux, heureux, mais également extrêmement privilégié de les avoir toujours à mes côtés. Il n'y a aucun doute que mon cheminement n'aurait pas été possible sans leur support et je les en remercie du fond du cœur!

Un gros merci à celle qui partage ma vie depuis maintenant plus d'un an et demi. Merci Marie-Soleil pour ton amour, tes conseils et ta présence rassurante qui m'ont aidé dans mon cheminement du doctorat. Merci de m'endurer quand je suis bête, avec l'esprit occupé ou avant mon café le matin. Surtout, merci de m'aimer pour qui je suis réellement.

Je ne peux pas finir cette section sans remercier Jean-François Masson qui a été l'architecte de mes études graduées et qui a été également un mentor exceptionnel. J'ai eu la chance de le côtoyer pendant plusieurs années et je me considère comme privilégié d'avoir fait mon doctorat avec lui. C'est une personne très généreuse de son temps, toujours prête à donner un conseil et dont la porte est toujours ouverte, que l'on veuille parler de science, de voyage ou du pool de hockey! Ce qui est exceptionnel avec Jean-François, c'est qu'il est plus qu'un directeur de recherche. Il te met à l'aise, il tient en compte ton opinion et il te considère comme quelqu'un qui est plus qu'un simple étudiant. Grâce à lui, j'ai eu la chance d'effectuer un séjour de recherche pendant 4 mois en Allemagne et je lui en suis énormément reconnaissant pour cette merveilleuse expérience.

Finalement, je me dois de souligner la contribution des organismes subventionnaires tels que le CRSNG, le FQRNT ainsi que la FESP de l'Université de Montréal qui m'ont financé et appuyé tout au long de mes études au doctorat.

# Chapitre 1: Introduction

## 1.1 Préambule

### 1.1.1 Contexte

L'utilisation de biocapteurs est de plus en plus courante depuis plusieurs années en raison de leur grande sensibilité, leur simplicité, leur sélectivité et leur capacité à effectuer des analyses en temps réel. Des biocapteurs sont ainsi utilisés dans plusieurs domaines tels que l'agroalimentaire, la sécurité nationale, l'environnement et la médecine.<sup>1</sup> Ces dispositifs analytiques représentent une approche de choix pour de nombreuses applications comme la détection d'explosifs, de substances illicites, d'agents pathogènes, de médicaments, de biomarqueurs, etc.<sup>2-4</sup> Les deux grands succès commerciaux exploitant des biocapteurs sont sans contredit le glucomètre et le test de grossesse. Ces deux tests portant sur des applications de type biomédical permettent une détection rapide et simple tout en offrant un bas taux de faux positif. Ces deux exemples représentent aussi des systèmes de biodétection en vente libre, soulignant par le fait même leur capacité à rendre accessible de l'information médicale hors des centres d'analyses spécialisés. Il est envisageable que des dispositifs basés sur des technologies similaires puissent être développés et impliqués dans le dépistage de diverses conditions médicales ou de maladies. Ainsi, les biocapteurs pourraient être utilisés dans un cadre de dépistages préventifs effectué en clinique pour une portion de la population plus à risque pour une maladie donnée. Un dépistage précoce d'une maladie via l'utilisation de ces dispositifs de biodétection permettrait de cibler les personnes atteintes avant que le développement de la maladie ne soit trop important. Ceci permettrait en fin de compte de restreindre la durée des traitements utilisés ainsi que leur intensité, tout en augmentant le taux de guérison.

Le dépistage de maladie ayant recourt à l'utilisation d'un biocapteur sera généralement effectué en ciblant spécifiquement un ou plusieurs marqueurs dans un échantillon biologique tel que le sang, le sérum ou l'urine. Le prétraitement de l'échantillon dépend du milieu d'analyse et du marqueur ciblé et il est nécessaire afin d'obtenir une détection exempte d'interférence majeure<sup>5</sup>. En raison de la complexité des échantillons biologiques utilisés, plusieurs étapes de purification permettent d'isoler le ou les analytes ciblés. Le traitement de l'échantillon provenant d'un patient

demandera donc du temps, du personnel qualifié, différents instruments et plusieurs réactifs/consommables.

Dans le cadre de dépistage d'une maladie ou d'une condition médicale, le délai avant l'obtention des résultats d'analyses peut être crucial. En effet, le diagnostic précoce permettra de limiter les effets d'une maladie et de débiter le plus tôt possible le traitement adapté au stade de développement de celle-ci. Le dépistage est donc perçu comme étant la première étape menant au traitement et éventuellement à la guérison d'une maladie. Pour améliorer la facilité et la rapidité à laquelle le dépistage peut être effectué, il est nécessaire d'éliminer autant d'étapes et d'intermédiaires que possible dans ce processus d'analyse.

Un premier élément de solution à cette problématique consisterait à procéder au dépistage directement dans les fluides biologiques échantillonnés. Ceci ne demanderait pas ou peu de traitement de l'échantillon avant son analyse et permettrait d'accélérer le processus de diagnostic. Il serait intéressant dans un contexte de dépistage de cibler les fluides sanguins, en raison du grand nombre de biomarqueurs qu'ils contiennent. Le sang est en effet riche en informations concernant un individu et renseigne énormément sur son état de santé, ce qui justifie sa grande utilisation dans le cadre de détection de maladie. En raison de sa grande viscosité et des cellules qu'il contient, le sang est souvent converti en plasma ou en sérum par une étape de centrifugation, puis traité de différente façon afin d'isoler les molécules d'intérêt et de réduire les interférences provenant de la matrice.

Un deuxième aspect important du dépistage réside dans l'accessibilité à celui-ci. En effet, très souvent les patients devront, suite à une recommandation de leur médecin, prendre rendez-vous dans un centre de prélèvement où sera effectuée la prise de l'échantillon biologique nécessaire au dépistage. L'échantillon sera traité et analysé dans un deuxième centre par des instruments spécialisés, généralement massifs et coûteux, puis les résultats des tests seront finalement acheminés au médecin. Les délais entre les différents intermédiaires doivent être réduits ou doivent tout simplement disparaître pour assurer un diagnostic rapide de certaines conditions médicales. Pour contourner ces différents intermédiaires employés dans le processus d'analyse, un outil de dépistage pourrait être implanté directement dans le cabinet du médecin ou dans une ambulance. L'instrument de diagnostic portable (point of care - POC)<sup>6</sup> alors requis se devrait d'être simple d'utilisation, de faible coût d'opération, de faible taille, fournissant une analyse rapide et apte à

effectuer des mesures directement sur le terrain. L'instrument POC devrait également exploiter une technique permettant d'effectuer la biodétection d'un marqueur directement dans un échantillon complexe afin de réduire encore une fois le temps d'analyse et le coût lié à celle-ci<sup>7</sup>.

### **1.1.2 Approche et cibles proposées**

Une technique de plus en plus utilisée dans le domaine des biocapteurs et permettant une instrumentation de type POC est la résonance de plasmon de surface (surface plasmon resonance - SPR). Cette méthode sans marquage base sa détection sur le changement d'indice de réfraction à proximité d'un film métallique mince généralement d'or. Les biocapteurs SPR exploitent une source lumineuse en réflexion totale interne et le phénomène de champ évanescent, ce qui permet l'analyse d'échantillon turbide tel que le sang. De plus, la SPR a démontré sa capacité à faire l'analyse de multiples molécules et biomolécules à de très faibles concentrations (de l'ordre du pM au nM)<sup>8</sup>. Quelques systèmes SPR portables sont d'ailleurs disponibles sur le marché comme le Spreeta de Texas Instrument<sup>9</sup> ou le SPIRIT de Seattle Sensor System<sup>10</sup>, fournissant ainsi une plateforme de biodétection se basant sur une instrumentation de type POC.

L'interférence de la matrice, qui sera majeure pour une analyse directement dans un fluide sanguin, reste toutefois un problème à adresser dans le cas où un biocapteur SPR est utilisé pour analyser directement dans ce genre d'échantillon. Pour mieux caractériser et saisir les défis reliés à l'analyse directement dans les fluides sanguins, une étude du phénomène d'adsorption non spécifique ayant lieu à la surface d'un capteur SPR par ce genre de fluide a été effectuée. Deux méthodes analytiques, soit la SPR et la spectrométrie de masse (mass spectrometry – MS), ont été utilisées pour étudier les biomolécules adsorbées sur la surface d'un capteur. La SPR mesure quantitativement le matériel adsorbé selon la surface du capteur utilisée. L'identification des biomolécules adsorbées sur le capteur a été effectuée par MS. La possibilité d'effectuer des mesures SPR et MS sur un substrat unique, leur capacité à analyser directement une surface et les informations complémentaires pouvant être obtenues par ces deux méthodes expliquent leur choix.

Dans un deuxième temps, un biocapteur SPR a été réalisé pour cibler une protéine retrouvée dans le sérum, soit l'antigène prostatique spécifique (Prostate specific antigen – PSA). La PSA est couramment analysé dans le cadre du dépistage du cancer de la prostate. Ce type de cancer possède un des plus hauts taux de prévalence dans les pays occidentaux, en particulier auprès des hommes

de plus de 50 ans. Selon les statistiques actuelles, environ un homme sur huit sera affligé par cette maladie au cours de sa vie et un homme sur vingt-huit souffrant d'un cancer de la prostate en mourra. En 2014, la société canadienne du cancer estimait à près de 25 500 nouveaux cas et 4 000 décès au Canada en raison du cancer de la prostate. Ce type de cancer représentait en 2014 environ 24% des nouveaux cas de cancer et près de 10% des décès par cancer. Cependant, le nombre de décès attribuable au cancer de la prostate a commencé à diminuer lentement au Canada depuis les années 90 avec l'arrivée de dépistage à grande échelle chez les hommes à risque. En effet, les avancés au point de vue du dépistage, notamment avec l'arrivée de l'analyse du taux de PSA, a grandement aidé le domaine médical en lui fournissant un outil permettant un meilleur diagnostic<sup>11</sup>.

### 1.1.3 Organisation de la thèse

Dans la présente thèse, un système SPR portable développé dans les laboratoires du Professeur Masson à l'Université de Montréal<sup>12</sup> a été utilisé pour réaliser la détection de la PSA. Ce biomarqueur a été utilisé comme modèle biologique concret afin de valider les capacités de détection du système SPR portable. Dans le cadre de cette étude, un biocapteur basé sur un matériel plasmonique microstructuré et une chimie de surface minimisant l'interférence du sérum a été exploité pour faire la détection de la PSA aux concentrations requises pour le dépistage du cancer de la prostate (4 ng/mL ou 0,15 nM). Ce test a été également couplé avec un test de type ELISA, une méthode représentant le standard dans le domaine de la biodétection. La double détection de la PSA via la SPR et l'ELISA pourrait réduire le taux de faux positif du test de dépistage, d'où l'intérêt d'adapter l'instrument SPR pour détecter la fluorescence générée par le test ELISA.

Outre l'intérêt du dépistage, l'analyse en milieu biologique complexe pourrait avoir un grand impact en ce qui a trait aux études *in vitro* effectuées dans le cadre du développement de composés thérapeutiques. En effet, une plateforme de détection rapide apte à faire la détection d'un composé pharmaceutique directement dans un échantillon de sérum ou de sang pourrait indiquer le comportement d'une molécule lorsqu'elle circule dans le sang. En effet, il est important de bien saisir l'impact du milieu biologique sur le composé étudié pour comprendre les conséquences impliquées dans un modèle représentatif d'un cas réel<sup>13, 14</sup>. Souvent, les modèles *in vitro* employés représentent des systèmes simplifiés. Ces études négligent donc les interactions que le composé développé pourrait avoir avec le milieu biologique.



Un instrument basé sur la SPR serait intéressant pour effectuer la mesure d'interaction, directement dans un biofluide, d'un composé pharmaceutique avec son récepteur ciblé puisque la SPR est une technique sans marquage et n'implique pas de modification du composé pharmaceutique. L'ajout d'un marqueur pour faire l'analyse d'un composé pharmaceutique pourrait aussi affecter ses caractéristiques physiques et pourrait induire une variation de son affinité pour le récepteur. De plus, la SPR peut fonctionner dans les fluides biologiques, donc elle est adéquate pour ce type de mesure. L'utilisation d'une instrumentation de faible taille, comme celle proposée, pourrait aussi avoir l'avantage de réduire l'espace dédié à l'instrument. Bien que ce facteur ne soit pas nécessairement prioritaire, il reste que l'espace réservé pour l'instrumentation dans un laboratoire est souvent limité. L'appareil SPR portable développé a été donc finalement employé dans cette thèse pour faire la détection d'un composé thérapeutique ayant une activité anti-athérosclérotique à même un échantillon de sérum et de sang.

Donc, les travaux présentés dans cette thèse portent sur le développement de nouvelles approches analytiques pour effectuer des mesures SPR dans les biofluides. Pour faciliter la compréhension du lecteur, l'introduction présentera un résumé des notions essentielles sur les techniques SPR, MALDI-MS et ELISA dans les sections suivantes. Ce premier chapitre portera spécifiquement sur une description des principes théoriques des techniques, sur l'instrumentation impliquée et leur utilisation dans le cadre de la thèse.

## **1.2 La résonance des plasmons de surface:**

### **1.2.1 Historique :**

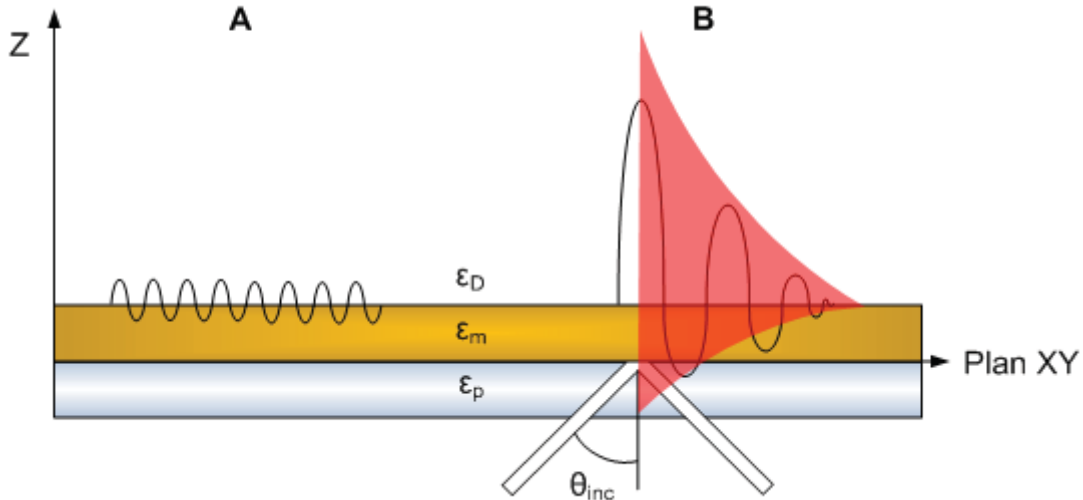
Les premières observations scientifiques modernes du phénomène physique de résonance des plasmons de surface datent de plus d'un siècle. Entre 1902 et 1912, Wood a observé certaines anomalies lorsque de la lumière blanche polarisée était réfléchi sur un réseau de diffraction<sup>15, 16</sup>. En effet, on pouvait observer des zones assombries pour la lumière résultante provenant du réseau de diffraction. Les premières analyses théoriques correspondant aux anomalies décrites par Wood furent réalisées en 1907 par Lord Rayleigh avec sa théorie des réseaux de diffraction<sup>17</sup>. Dans les années 1950, plusieurs travaux de recherche portant sur la perte d'énergie des électrons dans les

gaz et les films métalliques minces<sup>18, 19</sup> ont mené à la suggestion que cette perte d'énergie serait due à l'excitation des électrons de la bande de conduction. Pines et Bohm furent ainsi les premiers à décrire les anomalies comme étant une oscillation des électrons sur une surface et à établir les bases du phénomène de résonance de plasmon de surface<sup>20,21</sup>. L'excitation du plasmon de surface par réflexion totale atténuée en utilisant un prisme possédant un indice de réfraction plus élevé que l'air fut ensuite démontré dans les années 60 par Kretschman<sup>22, 23</sup> et Otto<sup>24</sup>. Nylander et Liedberg exploitèrent cette configuration SPR en réflexion totale atténuée pour réaliser parmi les premiers exemples de biodétection de cette méthode<sup>25</sup>. Au courant des années 80 et 90, les expériences de biodétections effectuées par SPR ont cru en popularité et sont aujourd'hui utilisées dans le domaine agroalimentaire, environnemental, biomédical et lié à la sécurité<sup>1, 8</sup>.

### **1.2.2 Théorie de la SPR :**

La SPR est souvent décrite comme étant l'interaction entre un champ électromagnétique comme la lumière et l'oscillation collective des électrons de la bande de conduction d'un métal noble<sup>26</sup>. Cette oscillation est aussi connue comme étant le plasmon de surface. Un film métallique peut supporter un plasmon de surface uniquement si la portion réelle de la constante diélectrique du métal ( $\epsilon_m$ ) est négative<sup>27</sup> ( $\epsilon_m = \epsilon' + i\epsilon''$  où  $\epsilon' < 0$ , ici  $\epsilon'$  représente la partie réelle alors que  $\epsilon''$  représente la partie imaginaire. La valeur absolue de la portion réelle de  $\epsilon_m$  doit également être plus grande que la constante diélectrique du milieu diélectrique ( $\epsilon_d$ ). L'or et l'argent sont deux métaux nobles généralement utilisés en SPR puisqu'ils supportent un plasmon de surface pouvant être excité par un faisceau lumineux du domaine spectral du visible et de l'infrarouge.

Un plasmon de surface va posséder une énergie propre représentée comme un champ électromagnétique. Celui-ci est perpendiculaire au film métallique qui est placé dans le plan XY et se propagera selon l'axe Z dans les deux directions de ce dernier (**Figure 1.1 A**). Une décroissance exponentielle de l'intensité du champ électrique du polariton de plasmon de surface sera observée au fur et à mesure que l'on s'éloigne de l'interface métal/diélectrique (**Figure 1.1 B**).



**Figure 1.1 A**) Plasmon de surface à l'interface d'un film métallique (constante diélectrique  $\epsilon_m$ ) et d'un milieu diélectrique (constante diélectrique  $\epsilon_D$ ) se propageant selon l'axe z et **B**) Volume sondé (indiqué en rouge) par l'excitation du plasmon de surface depuis un prisme (constante diélectrique  $\epsilon_p$ ) par un faisceau de lumière avec un angle d'incidence ( $\theta_{inc}$ )

Le vecteur d'onde du plasmon de surface<sup>28</sup>, décrit par l'équation 1, est polarisé transverse magnétique (TM), ce qui implique que son champ magnétique est parallèle au plan du film métallique (plan XY de la **Figure 1.1**).

$$k_{sp} = \frac{2\pi}{\lambda} \sqrt{\left( \frac{\epsilon_m(\lambda)\epsilon_s(\lambda)}{\epsilon_m(\lambda) + \epsilon_s(\lambda)} \right)} \quad (1)$$

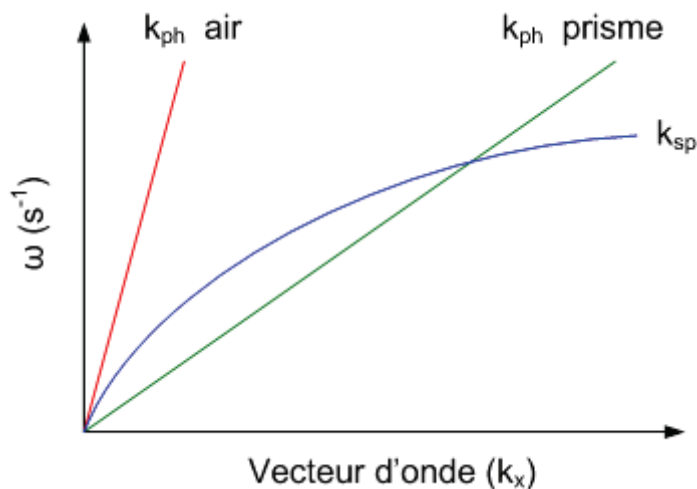
Où  $k_{sp}$  est le vecteur d'onde du plasmon de surface,  $\epsilon_m$  la constante diélectrique du métal,  $\epsilon_s$  est la constante électrique du milieu avoisinant le métal et  $\lambda$  la longueur d'onde de la lumière.

Un photon également polarisé TM et envoyé sur la surface métallique excitera le plasmon de surface s'il entre en résonance avec celui-ci. Pour obtenir cette résonance, le vecteur d'onde du photon ( $k_{ph}$ ) doit cependant être égal au vecteur d'onde du plasmon de surface ( $k_{sp}$ ). Cependant, le vecteur d'onde de la lumière dans l'air et dans l'eau (équation 2) sera toujours plus grand que le vecteur d'onde du plasmon de surface<sup>29</sup> (**Figure 1.2**).

$$k_{ph} = \frac{2\pi}{\lambda} \quad (2)$$

Où  $k_{ph}$  est le vecteur d'onde de la lumière et  $\lambda$  la longueur d'onde de la lumière.

Il faut donc moduler la valeur de  $k_{ph}$  ou de  $k_{sp}$  afin d'avoir une égalité entre les deux vecteurs d'onde ( $k_{ph} = k_{sp}$ ) pour que le photon entre en résonance avec le plasmon de surface. L'utilisation de lumière en réflexion totale interne dans un milieu possédant un indice de réfraction élevé (exemple : prisme de verre BK7) permet d'augmenter  $k_{ph}$  (**Figure 1.2**) alors que l'utilisation d'un réseau de diffraction permet de diminuer la valeur de  $k_{sp}$  (non présenté ici)<sup>28</sup>. Un photon sous condition de réflexion totale interne dans un prisme d'un indice de réfraction plus élevé (dites configuration de Kretschmann) aura un vecteur d'onde possédant une composante dans l'axe du film métallique décrit par l'équation 3.



**Figure 1.2** Schématisation du couplage de la lumière et du plasmon de surface par l'utilisation d'un prisme d'indice de réfraction plus élevé<sup>30</sup>

$$k_{ph} = \frac{2\pi}{\lambda} \eta_p \sin\theta_{inc} \quad (3)$$

Où  $\lambda$  est la longueur d'onde de la lumière,  $\eta_p$  est l'indice de réfraction du prisme et  $\theta_{inc}$  est l'angle d'incidence.

L'utilisation du prisme permettra d'augmenter le momentum du vecteur d'onde de la lumière et d'obtenir une égalité entre  $k_{sp}$  et  $k_{ph}$ . Il y aura alors absorption du photon par la surface puis retransmission de celui-ci dans le milieu adjacent au film métallique. Le milieu diélectrique sera sondé par le plasmon de surface excité sur une profondeur d'environ 100 à 200 nm par rapport au film métallique. Cette distance de pénétration du plasmon variera selon la nature et les caractéristiques du film métallique utilisé. La propagation du plasmon à la surface du film métallique qui est lié à la relaxation de celui-ci suite à son excitation se fera sur une distance de l'ordre de quelques dizaines à près d'une centaine de  $\mu\text{m}$ <sup>31, 32</sup>. L'excitation du plasmon de surface est particulièrement intéressante pour un mince film métallique avoisinant un milieu diélectrique (exemple : une solution aqueuse). En effet, les conditions de résonance du film métallique sont grandement affectées par le milieu diélectrique. Un lien peut être établi entre la constante diélectrique d'un milieu et son indice de réfraction ( $\epsilon_s \sim \eta_s^2$ ), menant ainsi à l'équation 4. Celle-ci démontre que l'indice de réfraction dictera les conditions d'excitation du plasmon de surface pour lesquelles  $k_{sp}$  et  $k_{ph}$  vont être en résonance.

$$k_{sp} = \frac{2\pi}{\lambda} \sqrt{\left(\frac{\epsilon_m \eta^2}{\epsilon_m + \eta^2}\right)} \quad (4)$$

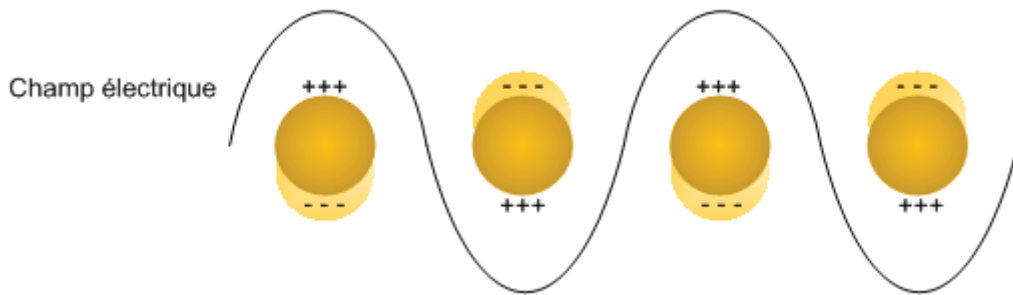
Où  $\eta_s$  est l'indice de réfraction de la solution (milieu diélectrique) en contact avec le film métallique (**Figure 1.1**)

Cette dépendance des conditions de résonance démontre donc le potentiel d'utiliser le phénomène SPR pour effectuer la mesure d'indice de réfraction à l'interface métal/diélectrique. De plus, comme la lumière en configuration Kretschmann sera confinée dans un prisme, celle-ci ne sera pas affectée par la turbidité de la solution à analyser. En effet, contrairement à des méthodes

comme la fluorescence ou l'absorption UV-Vis, le faisceau lumineux utilisé en SPR ne traversera pas l'échantillon à analyser. Ceci fait donc de la SPR une méthode de choix pour l'analyse en matrice complexe.

### 1.2.3 Théorie du plasmon de surface localisé

En limitant la surface disponible pour la propagation du plasmon de surface à un espace plus petit que la distance de propagation (sous le  $\mu\text{m}$ ) on observera un phénomène de plasmon de surface localisé ou LSPR<sup>33</sup>. Ce type de plasmon est généralement observé pour des nanoparticules faites de métaux nobles pouvant supporter un plasmon de surface comme l'or ou l'argent. Ces nanoparticules possèdent une grande densité d'électrons pouvant osciller en suivant certains modes et générant ainsi un dipôle électrique. Lorsqu'un champ électromagnétique passe au travers d'une solution de nanoparticules, il y aura pour certaines longueurs d'onde résonance entre le champ électrique de la lumière et le dipôle de la nanoparticule (**Figure 1.3**).



**Figure 1.3** Excitation du plasmon de surface localisé (LSPR) par l'entrée en résonance du nuage électronique de la nanoparticule avec un champ électrique

La lumière permettra ainsi d'exciter le plasmon de surface localisé dont l'absorption de lumière est définie par l'équation 5. L'excitation de la nanoparticule sera dans ce cas indépendante de l'orientation du photon, puisque la nanoparticule est plus petite que la longueur d'onde de la lumière<sup>34</sup>.

$$E(\lambda) = \left( \frac{24\pi^2 N a^3 (\epsilon_s)^{3/2}}{\lambda \ln(10)} \right) \left( \frac{\epsilon''_m}{(\epsilon'_m + \chi \epsilon_s)^2 + (\epsilon''_m)^2} \right) \quad (5)$$

Où  $E$  correspond à l'absorption à une longueur d'onde  $\lambda$  donnée,  $a$  est la taille des nanoparticules,  $N$  est le nombre de nanoparticules,  $\epsilon_s$  est la constante diélectrique de la solution adjacente,  $\epsilon'$  et  $\epsilon''$  sont respectivement les portions réelle et imaginaire de la constante diélectrique du métal et  $\chi$  est un facteur de forme de la nanoparticule

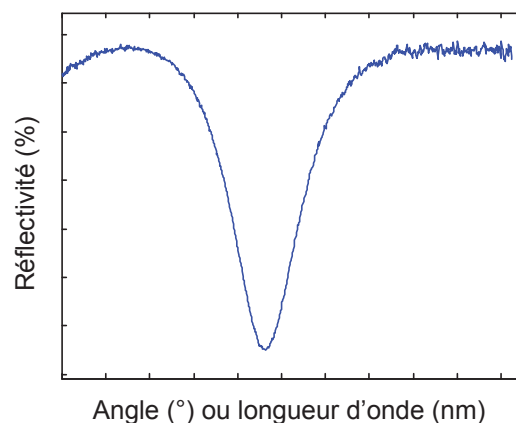
Ce type de plasmon de surface peut être excité directement, sans recourir à l'utilisation d'un prisme comme en SPR où celui-ci est nécessaire puisque la lumière requise pour l'excitation du plasmon est en réflexion totale interne. Lors de l'interaction de la lumière avec les nanoparticules, une portion de la lumière incidente sera absorbée alors qu'une portion sera dispersée. L'absorption et la dispersion seront grandement amplifiées en raison de l'excitation du LSPR. La taille et la forme (exemple : nanosphère, nanobâtonnet, nanoframboise et nanotriangle) des nanoparticules utilisées auront un impact sur la longueur d'onde à laquelle l'excitation du LSPR aura lieu. Celle-ci a généralement lieu dans le domaine du visible expliquant la coloration des solutions de nanoparticules. La taille de nanoparticules utilisées définit la distance disponible pour la relaxation du plasmon de surface et va donc avoir un impact majeur sur la longueur d'onde à laquelle l'absorption de lumière a lieu. Ainsi, en augmentant la taille des particules, on observera un changement progressif de la coloration de la solution de nanoparticules. Le grand confinement du champ électromagnétique et sa grande intensité induite par le LSPR fournissent par l'entremise des nanoparticules un type de sonde très sensible à la détection de petits changements de l'environnement diélectrique entourant la nanoparticule<sup>35</sup>.

## 1.3 Instrumentation SPR

Les instruments SPR sont généralement composés de trois portions essentielles : l'appareillage optique, le système de fluide et le capteur SPR. Ces aspects seront discutés dans les sous-sections suivantes.

### 1.3.1 Appareillage optique et configuration instrumentales SPR

L'appareillage optique servira à guider la lumière nécessaire à l'excitation du plasmon de surface puis également à collecter la lumière résultante. En observant les équations 3 et 4 de la section 1.3.2, on remarque que les conditions d'excitation où  $k_{sp}$  sera égal à  $k_{ph}$  dépendent de deux paramètres consistant en un couple fait d'une longueur d'onde ( $\lambda$ ) et d'un angle d'incidence ( $\theta_{inc}$ ). Des systèmes utilisant la configuration de Krestchmann<sup>8, 22</sup> ont ainsi été développés afin de faire l'analyse d'un de ces deux paramètres en gardant le deuxième fixe. Ces instruments permettent d'observer une bande d'absorption typique en SPR (**Figure 1.4**) de la source lumineuse utilisé lorsque l'ensemble des critères permettant l'excitation du phénomène SPR sont respectés. Il est possible de suivre l'évolution de l'indice de réfraction par SPR en analysant la position du minimum de cette bande rapportée en termes d'angle ou de longueur d'onde. Il est également possible de suivre les variations de réflectivité de la bande de façon à voir l'évolution du déplacement de la bande SPR en mode d'imagerie.



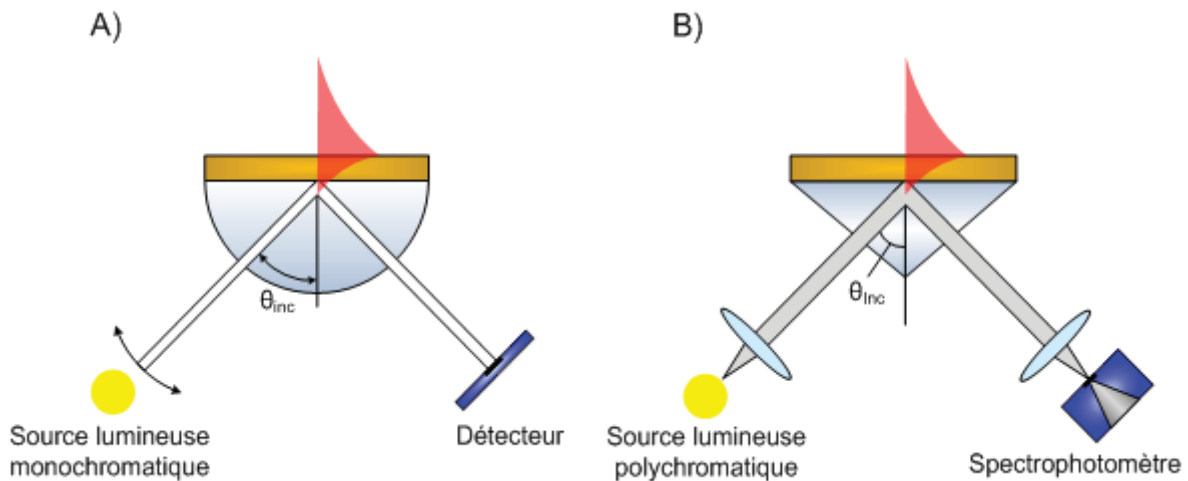
**Figure 1.4** Spectre de réflectance pour l'excitation d'un plasmon de surface via un instrument à interrogation angulaire ou spectral



Un point intéressant de la SPR provient du fait que la puissance de la source lumineuse utilisée n'est pas autant un facteur clé que pour plusieurs techniques spectroscopiques. La SPR nécessite évidemment une source permettant d'obtenir une bande d'absorption avec un ratio signal sur bruit acceptable, mais ne demandera pas une puissance lumineuse comparable à des méthodes spectroscopiques comme la fluorescence, l'absorption UV-visible, le Raman, etc. En effet, toutes ces méthodes sauf l'UV-Vis ont un signal qui est directement proportionnel à la puissance de la source utilisée et le choix de celle-ci sera donc crucial. La SPR base sa sensibilité sur le positionnement de sa bande d'absorption et non sur l'intensité de la lumière réfléchie ou réémise. La technique de la SPR s'affranchit donc cet aspect de puissance de la source et peut donc recourir à l'utilisation de source lumineuse moins puissante, réduisant potentiellement le coût et la taille de l'instrumentation.

Un premier type d'instrumentation SPR est le système à interrogation angulaire, qui génère l'excitation du plasmon de surface en conservant la longueur d'onde constante et en effectuant un balayage des angles d'incidence via un prisme hémisphérique ou hémicylindrique<sup>36</sup> (**Figure 1.5 A**). Ce système d'interrogation des angles nécessitera donc une source lumineuse monochromatique pour garantir l'utilisation d'une longueur d'onde invariable durant l'excitation du plasmon de surface selon différents angles. Il peut soit y avoir rotation du prisme pour faire l'acquisition de l'ensemble des angles ou bien focaliser de multiples angles en un seul et même point avant de tous les collecter à l'aide d'une barrette de diode. La deuxième option est plus intéressante puisqu'elle est plus rapide et permet de conserver une résolution temporelle sous l'ordre de la seconde. Ce type d'instrumentation est très populaire et est couramment utilisé dans plusieurs systèmes disponibles commercialement (Biacore, SPR Navi™, IBIS)<sup>37</sup>. Un système SPR à interrogation des angles permet une excellente résolution de la bande d'absorption SPR avoisinant  $10^{-7}$  RIU (*Refraction Index Unit*)<sup>8</sup>. Toutefois, la construction d'un tel instrument est complexe et requiert un alignement optique sans imperfection. Il peut être avantageux d'utiliser ce genre de configuration instrumentale, où l'on obtient la courbe de réflectivité en fonction de l'angle d'incidence, puisqu'il est possible de faire la modélisation de la courbe de la réflectivité attendue. En effet, le modèle de Fresnel à multiples couches pourra être utilisé dans ce cas pour décrire mathématiquement les différentes couches impliquées dans le capteur SPR (prisme, verre, chrome, or). Le modèle de Fresnel fournira donc la courbe théorique de la réflectivité en fonction de l'angle d'incidence. On

peut ainsi en utilisant la modélisation prédire la courbe attendue pour l'adsorption d'une substance ayant une densité et un indice de réfraction connu.

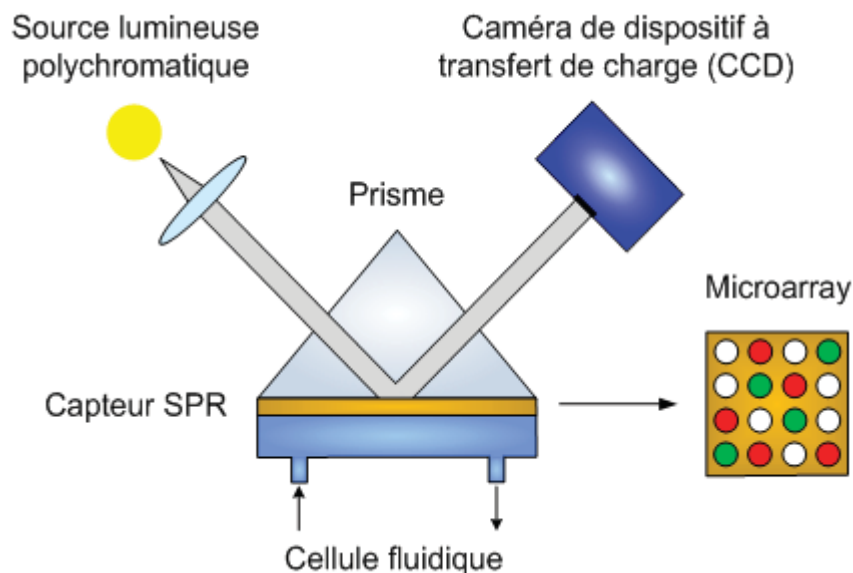


**Figure 1.5** Instrument SPR basé sur l'interrogation des angles (A) et sur l'interrogation des longueurs d'onde (B)

Il est également possible d'avoir une configuration instrumentale où un angle fixe d'excitation du plasmon de surface sera utilisé (**Figure 1.5 B**). Dans ce cas, on obtiendra un système d'interrogation des longueurs d'onde<sup>38</sup>. Ce système requiert l'utilisation d'un prisme généralement de forme triangulaire ainsi que d'une source polychromatique. La gamme d'illumination de la source sera captée par un spectrophotomètre afin de générer le spectre de la bande SPR en fonction des longueurs d'onde. La compagnie Thermo offre des systèmes basés sur cette configuration. Ce deuxième type d'instrument ne permettra toutefois pas une aussi bonne résolution du minimum de la bande SPR (environ  $10^{-5}$  ou  $10^{-6}$  RIU) qu'un instrument à interrogation des angles. En effet, il est difficile d'obtenir un seul angle d'incidence en collimant la lumière incidente envoyée sur le prisme. Il ne faut pas non plus négliger la dispersion spectrale des composantes de la lumière dans le prisme lors de l'utilisation d'une source polychromatique. Ces deux facteurs impliqueront donc plusieurs couples d'angles d'incidence/longueur d'onde pour réaliser l'excitation du plasmon de surface et un élargissement de la bande d'absorption sera ainsi observé. Cependant, un système d'interrogation des longueurs d'onde peut aisément être miniaturisé, permet des analyses avec une

bonne résolution temporelle et nécessite un alignement instrumental moins complexe que le système d'interrogation des angles.

Un dernier type d'instrumentation SPR est basé sur l'imagerie. Dans ce cas, la réflectivité de la bande SPR va être habituellement mesurée en utilisant un angle fixe et une source monochromatique. Des systèmes SPR d'imagerie mesurant la réflectivité en recourant à l'utilisation d'une source polychromatique et en sélectionnant une longueur d'onde précise sont également disponibles commercialement chez Graffinity Technology (**Figure 1.6**). Généralement, on balaye tout d'abord les différents angles d'incidence ou les longueurs d'onde afin d'observer la bande d'absorption SPR. Ensuite, on fixe la valeur de l'angle d'incidence ou la longueur d'onde pour faire les analyses afin de se trouver à une valeur de 50% en réflectivité de la bande SPR. Une caméra d'imagerie sera utilisée afin de faire la mesure sur l'ensemble de l'échantillon. Ce type d'instrumentation permet la mesure de «microarray», ouvrant la voie à l'analyse de nombreux échantillons simultanément. Cependant, dans le cas de mesures précises de cinétiques d'interactions biomoléculaires, seul le déplacement du minimum de la bande SPR sera fiable et devra être considéré. En effet, l'angle optimal fixé initialement ne sera pas le même sur l'ensemble des points du «microarray»<sup>39</sup>.



**Figure 1.6** Instrument d'imagerie SPR basé sur l'interrogation des longueurs d'onde

### 1.3.2 Système fluide

Un système fluide sera utilisé dans un instrument SPR afin d'acheminer diverses solutions à analyser jusqu'à la surface du capteur SPR. On en distingue principalement 3 types : la cellule fluide, la cuvette et la microfluidique. Il est possible de procéder à l'introduction de l'échantillon à analyser par injection à l'aide d'une seringue installée sur pompe mécanique ou bien en utilisant une pompe péristaltique. Plusieurs matériaux comme le téflon et des polymères malléables permettant une bonne étanchéité seront utilisés dans la construction des systèmes fluide.

Des systèmes fluidiques plus élaborés peuvent également être utilisés afin de remplir d'autres fonctions telles que l'analyse en parallèle de plusieurs composés, le traitement d'un échantillon à analyser, l'incubation de cellule, etc. En modifiant la configuration d'une microfluidique, il sera possible d'élaborer des cellules fluidiques adaptées à des besoins expérimentaux précis tout en étant compatible avec le capteur SPR. Un exemple de microfluidique bidimensionnelle permettant l'analyse en parallèle de multiples séquences de simple brin d'ADN a été rapporté par le groupe de Robert Corn<sup>40</sup>. La microfluidique rapporté dans ce cas était faite de PDMS et possédait de nombreux canaux pour effectuer au sein d'un même échantillon l'analyse de plusieurs séquences de simple brin d'ADN séparément, tout en utilisant de faibles volumes de l'ordre  $\sim 1 \mu\text{L}$  par canal. Un imageur SPR était utilisé dans ce cas pour permettre l'analyse de l'ensemble des canaux de la fluide simultanément.

Un deuxième modèle de microfluidique rapporté dans la littérature<sup>41</sup> permettait d'effectuer des biodétection dans le sérum dénaturé et de réduire l'interférence de la matrice. Une microfluidique de PDMS en forme de «T» était utilisé dans ce cas pour faire la détection d'un biomarqueur d'insuffisance cardiaque (peptide natriurétique de type B) dans le sérum. La branche supérieure du T de la fluide servait à l'introduction de l'échantillon et à sa préparation pour l'analyse subséquente. Cette dernière avait lieu dans le tronc du T où était situé le capteur SPR. En séparant le lieu d'introduction et de préparation de l'échantillon du capteur SPR, il était possible de minimiser les effets d'interférences provenant du sérum. Les auteurs rapportent ainsi la détection du peptide natriurétique de type B dans 10% de sérum humain dénaturé thermiquement à des niveaux adéquats pour diagnostiquer l'insuffisance cardiaque.

Un autre exemple de fluidique <sup>42</sup> pour permettre de réduire les interférences de la matrice consiste à introduire une fibre de verre creuse et poreuse au sein de la fluidique où est injecté la solution à analyser. La fibre poreuse laissait passer les molécules de faibles tailles et filtrait les macromolécules de haute masse molaire de la solution injectée. L'échantillon filtré était ensuite dirigé vers le capteur SPR pour effectuer l'analyse. Ce système <sup>42</sup> fut utilisé pour faire la détection du cortisol, une hormone liée au stress, en utilisant un système SPR portable (Spreeta™). L'essai développé permettait la détection de 1 ng/mL de cortisol à même un échantillon de salive.

La cellule fluidique pourrait finalement servir de microréacteur où aurait lieu l'incubation de cellules et où le capteur SPR effectuerait l'analyse de processus biologique en lien avec les cellules étudiées. La sécrétion d'anticorps par des cellules lymphocytes B fut étudiée par le groupe de Roupioz<sup>43</sup> en utilisant ce genre d'approche. L'utilisation d'un imageur SPR permettait ainsi de faire l'étude en temps réel de la sécrétion d'anti-HEL via un biocapteur SPR où l'antigène HEL était immobilisé. Des concentrations aussi basses que 50 ng/mL d'anticorps sécrété furent ainsi détectées par le système SPR utilisé<sup>43</sup>.

Les exemples mentionnés dans cette sous-section soulignent les rôles que peuvent jouer les cellules fluidiques dans le cadre de biodétections SPR. Il y a donc beaucoup d'intérêt à modifier les cellules fluidiques afin de permettre des analyses particulières ou pour simplifier l'analyse d'échantillon. En effet, la fluidique servira de «microlaboratoire» où auront lieu la purification, le traitement et la préparation de l'échantillon d'intérêt. Ceci simplifiera l'analyse tout en réduisant le volume d'échantillon nécessaire, le temps d'analyse ainsi que son coût.

### **1.3.3 Capteur SPR**

Un film d'or continu d'une épaisseur d'environ 50 nm est couramment utilisé en SPR<sup>29</sup> comme capteur dans les appareils de configuration Krestchemann. Un film d'argent pourrait également être utilisé comme capteur SPR. L'argent possède en fait des propriétés plasmoniques plus intéressantes que l'or, puisqu'elle génère une bande SPR plus fine ce qui améliore la résolution du capteur. Par contre, l'argent n'est pas inerte comme l'or et réagira avec l'oxygène de l'air pour former de l'Ag<sub>2</sub>O, qui n'est pas actif en SPR. Les capteurs SPR sont habituellement générés en effectuant initialement la déposition d'une couche d'adhésion (exemple 1 nm de chrome ou de titane) sur un substrat de verre propre avant d'effectuer la déposition de la couche d'or. Des

appareils de pulvérisation et d'évaporation des métaux permettent d'effectuer les dépôts de ces deux couches métalliques et d'ainsi générer le capteur SPR. La déposition de métaux peut être effectuée directement sur le prisme utilisé ou sur une lamelle de verre qui sera ensuite mise en contact optique avec un prisme en utilisant un fluide ou un gel d'adaptation d'indices de réfraction (*index matching fluid*).

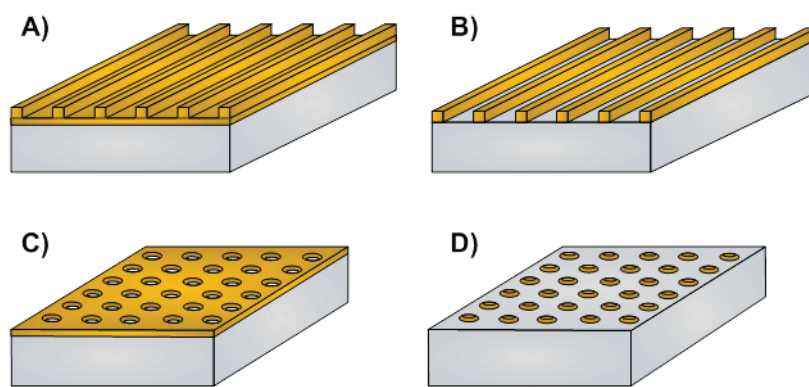
### 1.3.4 Matériel plasmonique nano ou microstructuré

Le développement de nouveaux matériaux pouvant servir de capteur optique tout en offrant une plus grande sensibilité et de plus faible limite de détection est un axe de recherche crucial pour la technique SPR. On peut comparer les performances de détection des capteurs SPR en comparant leur résolution respective à l'indice de réfraction (en RIU) et leur sensibilité à un changement d'indice de réfraction. La résolution sera généralement obtenue en calculant le bruit lié à une mesure (en % de réflectivité, en angle ou en longueur d'onde) divisée par la sensibilité du capteur en « unité de mesure »/RIU. La résolution en termes d'indice de réfraction sera donc dépendante du bruit généré par la bande SPR (en lien avec l'instrumentation) et des propriétés du matériel plasmonique utilisé (en lien avec le capteur).

Il a été démontré dans la littérature<sup>44</sup> que la technique SPR tend actuellement vers sa limite théorique de sensibilité en ce qui concerne l'instrumentation et l'appareillage optique utilisé. L'emploi de matériaux plasmoniques plus sensibles que les films d'or continu permettraient de repousser les limites actuelles de détection par SPR. L'utilisation de nouveaux algorithmes lors du traitement de données est une autre solution à exploiter pour réduire le bruit sur une mesure, améliorant par le fait même les limites de détection obtenues. Comme la sensibilité des matériaux plasmoniques dépend de leur composition et de leur morphologie, il est possible d'adapter ou de modifier leurs structures physiques afin de maximiser leur réponse à une variation de l'indice de réfraction.

Induire des modifications structurales à l'échelle nanométrique ou micrométrique sur le matériel plasmonique peut mener à l'excitation de modes de diffraction ou à la coexcitation du plasmon propagatif et du plasmon localisé<sup>45</sup>. Ces matériaux plasmoniques permettent d'augmenter la sensibilité ou de réduire la limite de détection en améliorant le ratio signal sur bruit. Certaines structures plasmoniques exploitent la forme de réseau de diffraction pour améliorer les

performances de détection en SPR. L'excitation du plasmon de surface d'un réseau de diffraction recouvert d'un mince film d'or (**Figure 1.7**) a démontré une plus grande sensibilité dans ces conditions de résonance<sup>27</sup>. La perturbation du plasmon propagatif par le réseau de diffraction explique cette augmentation de sensibilité pour ce type de structure. Une étude théorique de celle-ci prédit un facteur d'augmentation de sensibilité d'environ 6 ou 7 par rapport à un film mince d'or<sup>46</sup>. Dans ce cas, un système à interrogation des angles était utilisé et l'amplification avait lieu pour une gamme d'indices de réfraction dépendante des caractéristiques du réseau de diffraction. Il est possible pour ce type de structure d'observer des sites précis dans la structure du matériel plasmonique où l'amplification sera localement plus importante. Cet aspect a été rapporté dans la littérature<sup>47</sup> lors de l'immobilisation d'anticorps pour faire la détection d'anti-TNF- $\alpha$  sur des nano réseaux de diffraction. Positionner précisément le site de détection du biocapteur au point du substrat plasmonique où le champ électrique est le plus important permettrait de maximiser la sensibilité des nanostructures, mais reste un défi de taille à accomplir.



**Figure 1.7** Matériaux plasmonique micro ou nanostructuré servant de capteur SPR (A – réseau de diffraction, B – nanofils, C – nano/microtrous, D – nanodisques)

Un autre exemple de surface nanostructurée consiste en un arrangement de nanofils métalliques séparés par des espaces de l'ordre du micromètre (**Figure 1.7**). Ce type de structure peut être utilisé en réflexion total interne<sup>48</sup> ou en transmission<sup>49</sup>. Cet ensemble de nanofils supporte un plasmon de surface localisé pouvant être exploité dans le cadre de mesure impliquant un biocapteur<sup>49</sup>. Les bandes d'absorption SPR très fines dues aux ordres de diffraction vont permettre de réduire le niveau de bruit et offrir de bonnes limites de détection.

Un film d'or mince avec un arrangement hexagonal de trou ayant des diamètres entre 0.5 - 2  $\mu\text{m}$  et une périodicité d'environ 1 - 3 microns a également été étudié dans la littérature<sup>50</sup>. Un tel film de microtrous (**Figure 1.7**) possède des propriétés d'un réseau de diffraction puisqu'il peut être associé à un arrangement de bande d'or mince se répétant à tous les 60° de rotation par rapport au centre d'un trou. La sensibilité à l'indice de réfraction pour un film d'or avec microtrous sera augmentée d'un facteur 2 ou 3 par rapport à un film d'or continu. La biodétection de protéine comme l'IgG avec ce type de structure sera également amplifiée par un facteur d'environ 2 ou 3 par rapport à ce qui est observé sur un film d'or continu<sup>50</sup>. L'utilisation de ce type de matériel plasmonique est au cœur de cette thèse et a été exploitée dans le cadre de la détection d'un biomarqueur du cancer de la prostate (PSA) avec des détections de l'ordre du ng/mL, soit le niveau ciblé pour effectuer le test de dépistage de ce cancer<sup>51-53</sup>. La résolution observée pour les microtrous était similaire à celle obtenue pour un film d'or continu ( $1.5 \times 10^{-6}$  RIU) pour le même type d'instrument SPR de configuration Kretschmann basé sur un prisme dove à inversion d'image<sup>50</sup>.

Des films d'or nanostructurés ont également été utilisés en transmission extraordinaire optique (Extraordinary optical transmission - EOT) comme capteur LSPR<sup>54</sup> (**Figure 1.7**). En effet, des films d'or dans lesquels on retrouve des nanotrous ayant des diamètres entre 100 et 200 nm ont été rapportés pour l'étude physicochimique de formation et de changement de conformation de bicouches lipidiques<sup>55</sup>. Ces films d'or nanotroués ont aussi été utilisés en EOT pour l'étude de cinétique de liaison d'anticorps sur une bicouche lipidique<sup>56</sup> et pour la détection de protéine<sup>55</sup>. Ce type de nanostructure expose une portion de verre qui est plus ou moins importante à la solution selon la méthode de fabrication utilisée. Il est possible d'exploiter la présence du verre exposé librement à la solution pour promouvoir l'adhésion de liposomes ou des lipides à étudier<sup>56</sup>.

Un autre type de nanostructures pouvant être utilisées en EOT sont les nanodisques d'or ou d'argent. Certaines études rapportent leur utilisation pour la détection de l'antigène prostatique spécifique (PSA) qui est un biomarqueur utilisé pour le dépistage du cancer de la prostate<sup>57, 58</sup>. La biodétection de la PSA nécessitait toutefois un minimum de 2 heures pour ces deux études. Il est également important de mentionner que les analyses effectuées en EOT nécessitent le passage du faisceau lumineux à travers de la solution à analyser. Les biocapteurs développés sur ce principe seront grandement limités dans le cas d'échantillons plus complexes (exemple : sang ou sérum) qui absorberont la lumière et interféreront avec la biodétection. Cette interférence pourrait poser



problème pour analyser un marqueur tel que la PSA puisqu'il se retrouve justement dans le sang. L'utilisation d'un capteur en réflexion totale interne pourrait toutefois pallier aux interférences d'un milieu d'analyse aussi complexe.

## 1.4 Biodétection par SPR

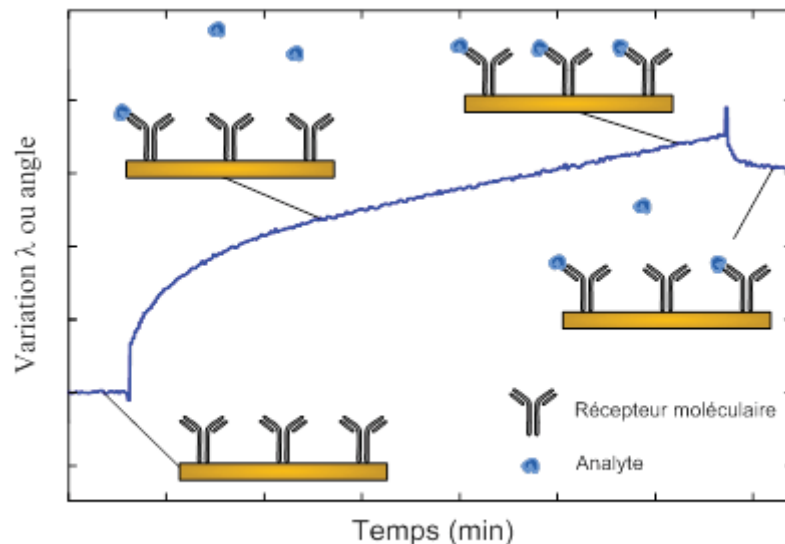
### 1.4.1 Biocapteur SPR

Les mesures SPR sont basées sur l'indice de réfraction ce qui en fait un détecteur quasi universel. Cependant, comme le film d'or en soi n'est pas sélectif, il sera impossible en utilisant cette configuration de distinguer une molécule dans un mélange complexe. On peut toutefois induire une certaine sélectivité au film d'or en modifiant chimiquement la surface du capteur. En effet, on peut greffer sur la surface d'or un récepteur moléculaire sélectif à un analyte pour ainsi obtenir un capteur SPR spécifique à une molécule ou une biomolécule en particulier. Lors de l'injection d'une solution contenant l'analyte d'intérêt, ce dernier sera capté en solution par le récepteur moléculaire placé à la surface même du capteur.

Selon la taille du récepteur moléculaire utilisé, cet événement de capture aura généralement lieu à moins d'environ 20 nm de l'interface métal/solution, une zone où le plasmon est très intense. Cette accumulation de l'analyte à la surface du capteur dans une zone de très grande sensibilité permettra de détecter de très faibles concentrations de la molécule ciblée par le capteur. De plus, l'association de l'analyte d'intérêt déplacera les molécules d'eau près de la surface métallique et comme l'indice de réfraction des biomolécules (exemple : protéine) est plus important que celui d'une solution aqueuse, on observera un grand changement en SPR. La taille de l'analyte capté aura également beaucoup d'importance, puisque plus il sera gros, plus il occupera un espace important dans le volume sondé par le SPR et plus il sera aisé de le détecter à de faible concentration.

Le changement d'indice de réfraction peut être analysé en temps réel par SPR en suivant le déplacement de la bande d'absorption via la mesure de la position du minimum de celle-ci. On générera ainsi un sensorgramme (**Figure 1.8**) décrivant l'association/dissociation progressive d'un

analyte dans le temps avec le récepteur ou sur le changement global d'indice de réfraction de la solution. Pour un biocapteur, le signal initial de celui-ci est habituellement mesuré dans le tampon ou toute autre solution de référence, puis comparé avec le signal obtenu après l'injection d'une solution renfermant ou non l'analyte ciblé. La variation de signal observé suite injection de la solution à analyser sera proportionnelle à la quantité d'analyte capté par le biocapteur. Cette mesure permettra ainsi de quantifier la concentration d'un analyte ciblé que renferme une solution à analyser. En utilisant différentes concentrations connues de l'analyte en solution et en injectant ces solutions sur un récepteur sélectionné, il sera possible de calculer les constantes d'association et de dissociation avec le récepteur formant le biocapteur.



**Figure 1.8** Sensorgramme des processus d'association et de dissociation d'un analyte avec un biocapteur SPR ayant un anticorps comme récepteur moléculaire

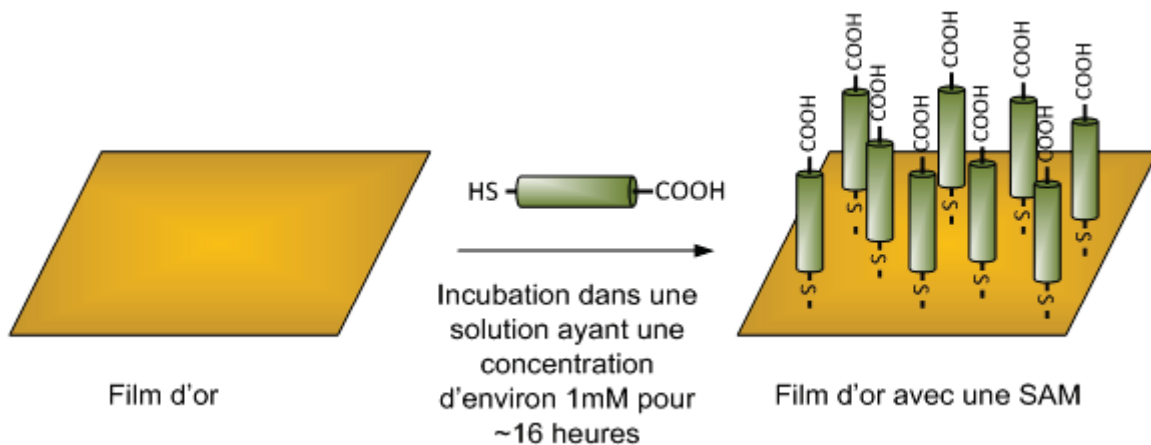
Plusieurs récepteurs moléculaires sont disponibles commercialement et seront employés pour former des biocapteurs SPR. Parmi ceux-ci, on peut mentionner des biomolécules tels que les anticorps<sup>59</sup>, les protéines<sup>60</sup>, les enzymes<sup>12</sup>, les simples brins d'ADN ou d'ARN<sup>61, 62</sup>. Il est aussi possible d'utiliser des petites molécules<sup>63, 64</sup> ou des peptides<sup>65, 66</sup> pour générer le biocapteur SPR désiré. Les options de récepteurs moléculaires sont nombreuses et il faudra prendre en compte la cible d'intérêt pour générer un couple récepteur/cible ayant une grande affinité l'un pour l'autre

afin de maximiser la sensibilité du biocapteur. La sélectivité du biocapteur pour l'analyte et non pour d'autres molécules apparentées sera également à prendre en compte et à évaluer selon le milieu d'analyse sélectionné.

## 1.4.2 Construction du biocapteur

L'immobilisation du récepteur moléculaire sur le film métallique afin d'y générer un biocapteur peut se faire de nombreuses façons. Il faut s'assurer que la méthode utilisée permettra de greffer un nombre adéquat de récepteurs à la surface du capteur, tout en conservant l'activité biologique du récepteur choisi. Il est important d'optimiser le nombre de récepteurs à la surface du biocapteur, puisque l'immobilisation d'un trop grand nombre pourrait mener à une diminution de la sensibilité du biocapteur, en raison d'encombrement stérique.

L'utilisation d'une monocouche auto-assemblée (SAM) est une première option qui permettra de fonctionnaliser la surface métallique avec la molécule désirée, pour ensuite greffer le récepteur moléculaire sur la monocouche générée. Les SAMs utilisées en SPR sont habituellement générées à partir de molécules bifonctionnelles et contenant au moins un groupement thiol (SH) (**Figure 1.9**). Ces SAMs faites de molécules organiques thiolés forment généralement des couches d'environ 1 à 3 nm d'épaisseurs sur le film métallique <sup>67</sup>.



**Figure 1.9** Formation d'une monocouche auto-assemblée (SAM) sur un film d'or à partir de molécules bifonctionnelles contenant un groupement fonctionnel thiol

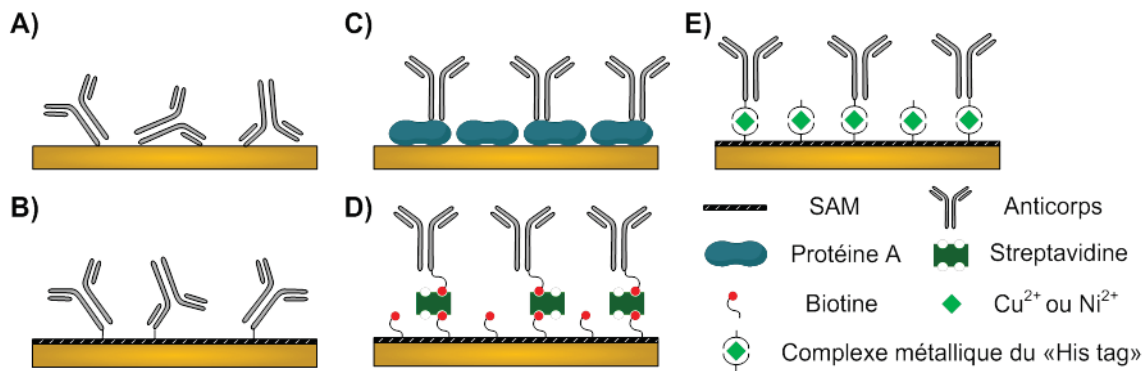
Le groupement thiol possède une forte affinité pour l'or et formera une liaison quasi covalente avec ce métal (~50 kJ/mol)<sup>68</sup>. Le lien formé entre le soufre et l'or est un lien ayant un caractère partiellement ionique et la force de ce dernier représente environ 50% de la force d'un lien carbone-carbone. Les alcanethiols et les disulfides ont ainsi été abondamment utilisés à ces fins<sup>69</sup> et la formation spontanée d'un lien entre le thiol et l'or a été rapporté dans la littérature lors des années 80<sup>70</sup>. Bien que cette réaction de chimisorption des thiols sur l'or ne soit pas encore de nos jours tout à fait bien comprise, on peut la décrire par l'équation générale suivante :



Les molécules thiolées liées au film métallique pourront aussi contenir un deuxième groupement fonctionnel (exemple : acide carboxylique) pouvant être exploité pour greffer le récepteur moléculaire de façon covalente à la surface de la monocouche.

Une deuxième option de chimie de surface pouvant être exploitée consiste à faire l'utilisation de polymères. Contrairement au SAM formant une couche bidimensionnelle sur le film d'or, une matrice polymérique générera une matrice tridimensionnelle pour l'immobilisation du récepteur. L'aspect 3D de cette couche de polymère permettra d'avoir un plus grand nombre de récepteurs immobilisés à proximité du capteur. Il a aussi été avancé que ce type de méthode d'immobilisation fournissait un environnement propice à une meilleure conservation de l'activité du récepteur<sup>71</sup>. Le carboxyméthyle dextran, un polymère fait d'unités dextrose, figure parmi les polymères les plus utilisés pour faire la construction d'un biocapteur SPR<sup>72</sup>. Cependant, ce type de chimie de surface n'immobilisera pas les récepteurs aussi près du film métallique que lors de l'utilisation de SAM, éloignant ainsi le site de liaison du biocapteur de la zone la plus sensible en SPR.

Pour réaliser l'immobilisation du récepteur moléculaire sur le type de chimie de surface sélectionnée, SAM ou polymère, plusieurs stratégies sont disponibles (**Figure 1.10**).



**Figure 1.10** Méthode d'immobilisation de récepteur moléculaire sur un capteur SPR : A) Physiorption sur le film d'or, B) Couplage chimique à une monocouche via groupement fonctionnel, C) Liaison à la protéine A, D) Complexation avec un ensemble biotine/streptavidine/biotine et E) Formation d'un complexe métallique de type His-tag

Il est possible d'effectuer la physisorption du récepteur directement à la surface du film d'or, mais le capteur résultant sera plutôt hétérogène, les récepteurs utilisés auront une orientation aléatoire par rapport à la surface et ils pourront se désorber de la surface. Tous ces facteurs affecteront la sensibilité et la reproductibilité du biocapteur généré. Des méthodes exploitant des réactifs de couplage chimique<sup>72</sup> pour former un lien covalent entre la surface et le récepteur moléculaire permettront une rétention du récepteur à la surface du capteur SPR. Ce type de couplage exploitera différents groupements fonctionnels se retrouvant sur la chimie de surface et sur le récepteur (amine, thiol, acide carboxylique, époxy)<sup>73</sup>. En raison de la grande complexité des récepteurs moléculaires au niveau chimique, il n'y aura pas une grande spécificité induite par ce genre de couplage, l'orientation résultante du récepteur à la surface sera aléatoire et le récepteur pourra potentiellement être dénaturé lors du couplage. Des méthodes plus douces d'immobilisation exploitant l'affinité biologique et formant des liens non covalents peuvent également être utilisées. Par exemple, on peut utiliser la protéine A qui se liera spécifiquement à l'extrémité F<sub>c</sub> d'un anticorps<sup>74</sup>. Il est également possible de faire l'utilisation d'un récepteur marqué avec une étiquette histidine (*His tag*)<sup>75</sup> formant un complexe métallique avec la surface ou exploiter l'affinité de la

biotine pour la streptavidine ( $K_d \sim 10^{-15}$ )<sup>76</sup> en ajoutant une biotine sur le récepteur et à la surface du capteur. Un couplage par affinité biologique permettra une meilleure orientation du récepteur à la surface du capteur et augmentera par le fait même la sensibilité de ce dernier. Cette méthode d'immobilisation est également réversible sous certaines conditions et il sera possible de retirer le récepteur moléculaire pour réutiliser le même capteur SPR. Ceci permettra une économie des capteurs utilisés et une plus grande reproductibilité des mesures effectuées.

### 1.4.3 Étalonnage et cinétique de biodétection par SPR

La bande d'absorption SPR sera associée à l'indice de réfraction de la solution analysée et sera reflétée par sa position en longueur d'onde ou en termes d'angle selon le type d'instrumentation utilisé. Il est possible d'étalonner l'instrument SPR en utilisant des solutions ayant différents indices de réfraction et d'évaluer le déplacement de la bande SPR en fonction de l'indice de réfraction. La sensibilité de l'instrument et du capteur SPR sera ainsi rapportée en  $\Delta\lambda/\Delta RIU$  ou en  $\Delta^\circ/\Delta RIU$ . Ce paramètre analytique permet de comparer entre eux les instruments SPR, mais également les matériaux plasmoniques utilisés (exemple : film d'or vs film d'argent).

Un biocapteur effectuant la détection d'une biomolécule exploitera également le changement d'indice de réfraction généré lors de la liaison de la cible au récepteur moléculaire. Dans ce cas par contre, d'autres facteurs entrant un jeu expliqueront l'aspect du sensorgramme typiquement observé (**Figure 1.8**) suivant un isotherme de Langmuir<sup>39, 77</sup>. Le signal observé dans ce cas n'est pas linéaire ou soudain, mais suit plutôt une augmentation rapide initialement avant de ralentir et de plafonner. Cette progression du signal et l'atteinte d'un maximum s'expliquent par le nombre limité de sites de capture de l'analyte sur le biocapteur. On doit aussi tenir compte dans ce cas de l'affinité entre l'analyte et le récepteur utilisé.

On peut définir les équations 6 et 7 qui tiennent compte de l'affinité entre un analyte (A) et le récepteur moléculaire (B)<sup>39</sup>.



$$\frac{1}{\Delta\lambda_{SPR}} = \frac{1}{\Delta\lambda_{MAX}KC} + \frac{1}{\Delta\lambda_{MAX}} \quad (7)$$

Où  $k_a$  et  $k_d$  sont respectivement les constantes d'association et de dissociation,  $K$  la constante d'équilibre du couple analyte/récepteur,  $\Delta\lambda_{SPR}$  représente le signal observé à un temps donné,  $\Delta\lambda_{MAX}$  représente le signal à saturation,  $C$  la concentration de l'analyte. Il est à noter que le signal était ici rapporté en variation de longueur d'onde ( $\Delta\lambda_{SPR}$ ), mais il aurait également pu être rapporté en termes d'angle.

À partir du signal obtenu, il est également possible de déterminer la concentration d'analyte en  $\text{ng/cm}^2$  qui sera capté à la surface du biocapteur<sup>78</sup>.

$$\Gamma = \rho \left( \frac{-l_d}{2} \right) \ln \left( 1 - \frac{\Delta\lambda_{SPR}}{m(\eta_{capt} - \eta_{sln})} \right) \quad (8)$$

Où  $\Gamma$  est la concentration de surface en  $\text{ng/cm}^2$ ,  $\rho$  est la densité de l'analyte,  $l_d$  la distance de pénétration de l'onde SPR,  $\Delta\lambda_{SPR}$  représente le signal observé,  $m$  la sensibilité de l'instrument utilisé,  $\eta_{capt}$  et  $\eta_{sln}$  sont respectivement les indices de réfraction de l'analyte capté et de la solution.

La distance de pénétration de l'onde SPR ( $l_d$ ) sera décrite par l'équation suivante :

$$l_d = \frac{\lambda}{2\pi(\varepsilon_1 \sin^2\theta - \varepsilon_2)^{1/2}}$$

Où  $l_d$  la distance de pénétration de l'onde SPR,  $\lambda$  et  $\theta$  correspondent au couple longueur d'onde et angle de la lumière incidente pour lequel on a le minimum de notre bande d'absorption,  $\varepsilon_1$  et  $\varepsilon_2$  sont les constantes diélectriques du prisme et du milieu adjacent à l'or

#### **1.4.4 Analyse en milieu complexe et réduction de l'adsorption non spécifique de protéines**

Plusieurs biocapteurs ont été développés dans le cadre d'applications biomédicales telles que le développement de composés pharmaceutiques, le dépistage ou le suivi du traitement de maladies. Selon le domaine et l'application, l'échantillon biologique devant être étudié variera (exemple : sérum, lysat cellulaire, coupe tissulaire). Les fluides sanguins constituent des milieux d'analyses de choix en ce qui a trait au dépistage de maladies puisqu'ils contiennent de nombreux marqueurs associés à plusieurs maladies comme le cancer de la prostate<sup>79</sup>, le carcinome hépatocellulaire<sup>80</sup>, l'infarctus du myocarde<sup>81</sup> et l'insuffisance cardiaque<sup>82</sup>.

Un défi de taille pour les biocapteurs réside dans leur utilisation directement dans un échantillon biologique en raison de la complexité et de la grande concentration de biomolécules qu'il renferme. Des fluides biologiques comme le sérum ou le sang renferment en effet une concentration totale de protéines d'environ 50 mg/mL<sup>83</sup> qui pourront potentiellement interférer avec le biocapteur et invalider l'analyse effectuée. Les protéines sont considérées comme étant une des principales sources du phénomène d'interférence d'adsorption non-spécifique<sup>5</sup> qui limite généralement les analyses SPR à des solutions plus simples comme des tampons ou des fluides biologiques fortement dilués. De plus, puisque la SPR est une technique sans marquage, elle ne permettra pas de différencier les événements de capture sélective du récepteur moléculaire et l'adsorption non spécifique à la surface du capteur. Il est donc crucial de minimiser le signal de fond généré par l'adsorption non spécifique de la matrice puisque cette interférence empêchera la détection de faibles concentrations d'analyte directement dans une matrice complexe. Ceci est d'autant plus important pour la biodétection de marqueurs de cancers qui sont contenus dans les fluides sanguins à de faibles concentrations de l'ordre du ng/mL ou du pg/mL<sup>84</sup>.

Pour réduire l'impact de l'adsorption non spécifique de cellules ou de protéines provenant de la matrice, il est possible de faire un prétraitement de l'échantillon sanguin avant de l'appliquer sur le biocapteur, notamment en utilisant des méthodes de précipitations des protéines ou des cartouches de purification/préparation<sup>85</sup>. Ce prétraitement nécessitera toutefois du temps, de l'argent, du personnel qualifié et divers instruments/consommables. Effectuer l'analyse directement dans un échantillon comme le sérum sans aucun traitement préalable de l'échantillon



pourrait pallier à ces désavantages. De plus, analyser directement un fluide biologique complexe augmenterait l'accessibilité de tests de dépistages pour diverses conditions médicales. En effet, l'échantillon pourrait être analysé tel quel sans passer entre les mains de plusieurs intermédiaires, améliorant la rapidité à laquelle on obtient le résultat du dépistage, mais également son accessibilité. Il pourrait ainsi être éventuellement envisagé d'évaluer diverses conditions médicales directement sur le terrain par l'intermédiaire d'ambulanciers ou dans le cabinet d'un médecin lors d'un examen de routine.

Analyser des cibles thérapeutiques directement dans un échantillon sanguin pourrait révéler leur comportement dans une matrice plus représentative d'un échantillon réel. On pourrait ainsi déterminer l'impact des composantes de la matrice sur le composé ciblé. En effet, des variations dans la pharmacocinétique de différents composés thérapeutiques ont été rapporté<sup>14</sup> lorsque celle-ci était en présence de certaines protéines ou un certain pourcentage de sérum<sup>13</sup>.

Pour parvenir à effectuer des analyses par SPR directement dans un échantillon comme le sérum, il faut donc réduire au minimum l'adsorption de la matrice biologique sur le biocapteur. L'utilisation d'une chimie de surface minimisant l'adsorption de biomolécules à la surface représente une alternative au prétraitement de l'échantillon. Outre son rôle de point d'ancrage pour le récepteur moléculaire, la chimie de surface pourrait également réduire l'adsorption indésirable de biomolécules contenue dans la solution à analyser. L'utilisation de polymère comme l'oligo(éthylène glycol) muni d'un thiol (PEG-SH) ou bien la polylysine a également été abondamment exploité afin de minimiser l'adsorption non spécifique du sérum à la surface du capteur<sup>86-89</sup>. Cependant, les SAM de PEG permettront tout de même l'adsorption d'une quantité non négligeable de matériel biologique, générant une certaine interférence et limitant la biodétection d'analyte à de très faibles concentrations.

Des surfaces basées sur des zwitterions ont également été utilisées pour permettre une réduction de l'adsorption de biomolécules provenant du sérum. Des monocouches à base de carboxybétaine méthacrylates<sup>90</sup> et d'acrylamides<sup>91</sup> ont notamment été rapportées dans la littérature pour leur capacité à réduire l'adsorption non spécifique. Ces surfaces zwitterioniques étaient également dotées de groupements fonctionnels acides carboxyliques, permettant d'effectuer l'immobilisation d'un récepteur moléculaire sur ce type de surface.

L'utilisation d'une monocouche auto-assemblée de peptides a aussi été rapportée comme un type de chimie de surface permettant de minimiser de façon importante l'adsorption non spécifique<sup>37, 92, 93</sup>. Un peptide fait d'un arrangement de deux blocs de répétition constitués des acides aminés leucine, histidine et acide aspartique a été rapporté pour ses capacités antiadhésives lors de son utilisation avec du sérum non dilué<sup>94</sup>. Cette SAM était liée au film d'or par l'ajout d'une molécule d'acide 3-mercaptopropionique (3-MPA) du côté N terminal de la séquence peptidique, alors que la portion C terminale possédait un groupement COOH pouvant être exploité pour la formation d'un biocapteur. Cette monocouche de 3-MPA-LHDLHD-OH a été utilisée dans le cadre de la biodétection du méthotrexate<sup>12</sup>, un agent anticancéreux, mais également pour la détection de composé thérapeutique possédant une activité anti-athérosclérotique<sup>95</sup>.

Le principal mécanisme menant à la réduction de l'adsorption non-spécifique de protéines sur une chimie surface donnée est lié à l'hydratation de la monocouche.<sup>5, 90, 96</sup> Les molécules d'eau à la surface de celle-ci formeront un film hydraté fortement retenu agissant comme une barrière physique et énergétique contrant l'adsorption de protéines. La quantité de molécules d'eau menant à l'hydratation de la surface représente un des facteurs majeurs expliquant la résistance de celle-ci à l'adsorption non-spécifique. Des surfaces de type PEG ont montrées un très haut niveau d'hydratation en raison de la structure en forme d'hélice qui semble être adoptée par les molécules formant la monocouche et qui refermerait une grande quantité de molécules d'eau<sup>97, 98</sup>. La force avec laquelle les molécules d'eau y seront adsorbées aura également une grande importance. Une meilleure rétention de l'eau au sein de la monocouche augmentera sa capacité à résister à l'adsorption de protéines. Les molécules d'eau seront retenues sur et dans les surfaces à base d'unité éthylène glycol par des liens hydrogènes. Des liaisons plus fortes permettront la rétention de molécules d'eau pour les surfaces zwitterioniques et seront plutôt de type ionique. Plusieurs études ont mis de l'avant que les surfaces les plus aptes à réduire l'adsorption de protéines avaient comme caractéristiques d'être hydrophiles, de pouvoir effectuer des ponts hydrogènes et d'avoir une charge globalement neutre<sup>99</sup>.

Un deuxième mécanisme expliquant la réduction de l'adsorption non-spécifique est en lien avec la flexibilité et la densité de la monocouche utilisée<sup>100</sup>. Ce facteur sera important pour des surfaces impliquant des molécules assez longues et conférant une certaine flexibilité à la monocouche. La densité de la monocouche aura dans ce cas une importance dans la réduction de

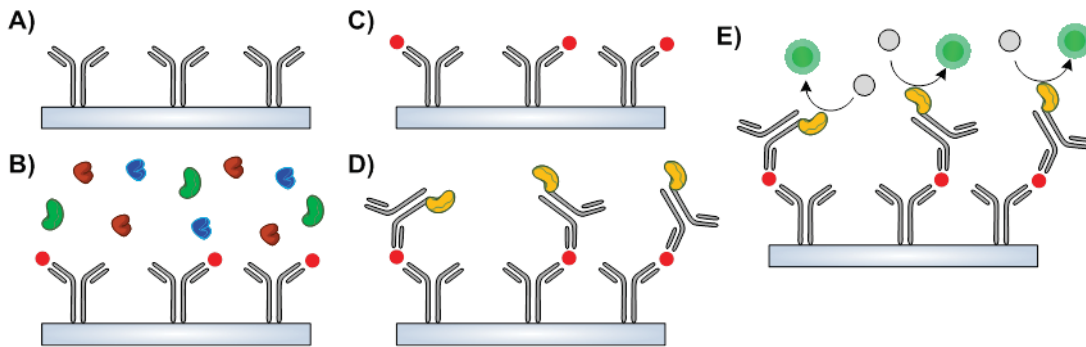
l'adsorption non-spécifique. Une faible densité de la SAM mènera à une faible quantité de molécules d'eau au sein de la monocouche et donc à une mauvaise hydratation de la surface. Celle-ci ne sera ainsi pas très efficace pour réduire l'adsorption de protéines. Une certaine gamme intermédiaire de densité fournira une hydratation de la surface adéquate de la surface tout en conservant une flexibilité au sein de la monocouche. La flexibilité permettra de réduire l'adsorption non-spécifique pour des raisons d'entropique et d'encombrement stérique<sup>100, 101</sup>. En effet, lors de l'adsorption de protéines, il y aura une déformation et une compression des chaînes de la monocouche, ce qui engendrera de l'encombrement stérique au sein de la surface. Ce phénomène sera défavorable au point de vue entropique puisqu'il y aura une perte de désordre dans la matière formant la monocouche. Finalement, une monocouche ayant une haute densité n'aura pas autant de flexibilité et l'effet de compression des molécules à la surface qui est entropiquement défavorisé ne sera pas aussi important. Donc, il n'y aura pas pour des monocouches à haute densité de contribution de la flexibilité à la réduction de l'adsorption non-spécifique.

## 1.5 Technique ELISA

La technique de dosage d'immunoabsorption par enzyme liée (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay – ELISA) est une technique très bien établie en biochimie permettant la détection de nombreux analytes comme le virus de l'hépatite, des anticorps en lien avec le virus du SIDA et des hormones liées à la grossesse. La méthode ELISA a littéralement révolutionné les tests diagnostiques effectués en médecine, en agriculture et dans divers d'autres domaines<sup>102</sup>. Cette méthode est solidement établie comme chef de file en biodétection et sert de référence aux autres méthodes recourant à l'utilisation de biocapteurs.

Cette technique nécessite un biocapteur immobilisé sur un substrat solide similaire à ce qui a été décrit précédemment dans la section 1.2.2. Dans le cadre d'un test ELISA toutefois, le substrat solide ne sera pas fait d'un film d'or mais plutôt de verre, de polymères ou de film de cellulose<sup>103</sup>. Le substrat sélectionné devra également être fonctionnalisé de façon à permettre d'y immobiliser le récepteur moléculaire approprié. Le test ELISA aura recours à un récepteur moléculaire, généralement un anticorps ultra spécifique, permettant de capter l'analyte d'intérêt dans un échantillon complexe. Cependant, contrairement au biocapteur SPR, l'évènement de

reconnaissance d'un analyte par le récepteur ne sera pas directement détecté lors de l'association de la cible sur le récepteur moléculaire. En effet, il sera nécessaire d'utiliser un deuxième anticorps sur lequel sera greffé une enzyme puis de former un «sandwich» à l'aide de ces deux anticorps et de l'analyte pour obtenir un signal mesurable<sup>104</sup>.



**Figure 1.11** Détection d'un analyte dans un milieu complexe par un test ELISA: A) Substrat solide où le récepteur moléculaire est immobilisé, B) Capture de l'analyte dans l'échantillon à analyser, C) Rinçage du matériel non lié au biocapteur, D) Formation d'un sandwich avec le deuxième anticorps modifié avec un enzyme et E) Conversion du substrat par l'enzyme en composé détectable (fluorescent ou coloré)

Le test ELISA peut donc être réalisé en cinq parties distinctes<sup>103</sup> (**Figure 1.11**). Dans un premier temps, on effectuera la capture de l'analyte dans la solution à analyser par un premier anticorps immobilisé sur un support solide. Une étape de rinçage du biocapteur sera effectuée pour retirer de celui-ci tout le matériel pouvant provenir de l'échantillon qui ne sera pas fortement retenu par le récepteur moléculaire. On procédera ensuite à l'ajout du deuxième anticorps auquel une enzyme sera greffée. Ce deuxième anticorps sera en excès et pourra aussi se lier à l'analyte mais en utilisant un site de reconnaissance différent de celui utilisé par l'anticorps de capture. Après un autre rinçage, seuls les sites où l'analyte est présent posséderont aussi l'anticorps modifié avec un enzyme et celle-ci sera exploitée pour quantifier l'analyte capté. L'enzyme, généralement une peroxydase ou une alcaline phosphatase, permettra en présence des réactifs appropriés de faire la conversion d'un substrat incolore ou non fluorescent en produit coloré ou fluorescent.

Des méthodes spectroscopiques permettront de faire la quantification du substrat coloré ou fluorescent produit après une période de temps donné et de la corrélérer avec la concentration de l'analyte capté. Comme l'enzyme peut catalyser plusieurs fois la conversion d'un substrat d'une forme à l'autre (exemple : non fluorescent à fluorescent), plusieurs molécules détectables seront produites pour un seul analyte capté, ce qui amplifiera le signal obtenu. Ce type d'essai colorimétrique et fluorimétrique a démontré la capacité de faire la détection d'analyte de l'ordre du pM ou du fM<sup>102</sup>. Un exemple de test ELISA commercialement disponible est le test de grossesse, qui est basé sur la détection directement dans l'urine de protéines provenant du placenta.

## **1.6 Spectrométrie de masse par Ionisation Désorption Laser Assisté par une Matrice combiné à un tube à temps de vol**

### **1.6.1 Historique**

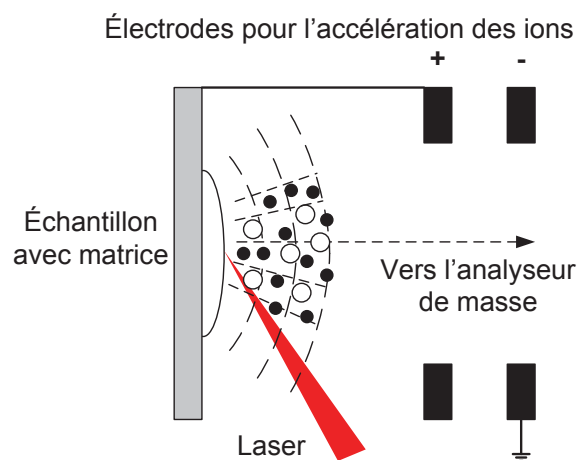
L'utilisation à la fin des années 60 de l'ionisation/désorption laser en spectrométrie de masse était principalement réservée à l'analyse de composés de faible masse ayant la capacité d'absorber facilement la longueur d'onde du laser utilisé<sup>105</sup>. L'analyse via la désorption laser de biomolécules possédant un poids moléculaire de l'ordre du kDa n'était pas aisément réalisable<sup>106, 107</sup>. Des techniques d'ionisations comme le bombardement d'atomes rapides (Fast Atom Bombardement - FAB) ou la désorption plasma au californium (Californium Plasma Desorption – <sup>252</sup>Cf-PD) étaient plutôt utilisées pour générer les spectres de masse de biomolécules<sup>108</sup>.

L'ajout et le mélange de composés absorbant la lumière avec l'échantillon avant l'analyse de ce dernier, a mis en place les fondements de la technique d'ionisation désorption laser assisté par une matrice (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation ou MALDI)<sup>109</sup>. La principale approche utilisée impliquait la cocrystallisation de l'analyte avec une matrice d'un composé organique<sup>110-113</sup>. L'ajout de cette matrice à l'échantillon d'intérêt et l'utilisation d'un analyseur de masse tel que le tube à temps de vol (Time-of-flight – TOF) a permis de réaliser des spectres de masse de protéines possédant des masses moléculaires allant jusqu'à 100 kDa. La grande polyvalence des matrices organiques ainsi que leur grande sensibilité ont fait des matrices

organiques la méthode de choix à utiliser en MALDI<sup>110, 111, 114</sup>. Cette technique d'ionisation représente actuellement une méthode de pointe dans des domaines comme la caractérisation des polymères<sup>115</sup> et la biochimie<sup>116</sup>.

### 1.6.2 Source et processus d'ionisation

Le MALDI est une source d'ionisation en spectrométrie de masse (MS) dite non continue ou «pulsée» exploitant l'absorption d'un laser par un échantillon solide à analyser. Plusieurs types de lasers possédant des longueurs d'onde couvrant de l'infrarouge à l'ultraviolet sont utilisés, notamment des lasers à l'azote (337 nm), à excimer (193, 248, 308 et 351 nm), Nd:YAG (355 et 266 nm), Er :Yag (2940 nm), etc. L'absorption de l'irradiation laser par l'échantillon solide provoquera son évaporation tout en causant son ionisation. Le «pulse» laser (environ 0.5 à 10 ns pour les lasers UV) sera focalisé sur une petite portion de l'échantillon représentant habituellement une zone possédant un diamètre d'environ 0.05-0.2 mm<sup>117</sup>. L'irradiance du laser représentera un paramètre clé en MALDI et pourra être contrôlée par un atténuateur afin d'optimiser l'intensité désirée pour générer la désorption/ionisation d'un analyte en particulier.



**Figure 1.12** Schéma d'une source désorption/ionisation laser assisté par une matrice (MALDI)

La formation d'ion par une source d'ionisation MALDI (**Figure 1.12**) reste un processus à l'étude afin de clarifier certains aspects mécanistiques impliqués. Plusieurs paramètres ayant un impact sur le pourcentage d'ions formés ont été étudiés, par exemple la fluence du laser<sup>118, 119</sup>, le

processus de désorption dans le temps<sup>120</sup>, la vitesse initiale des ions désorbés<sup>121-123</sup> et le processus de formation d'ions<sup>124, 125</sup>. Il existe plusieurs processus mécanistiques menant à la formation d'ions lors de l'utilisation d'une source de type MALDI<sup>125</sup>. L'utilisation d'une matrice possédant un pH acide pour faire l'analyse de peptides et de protéines a notamment indiqué la formation d'ion  $[M+H]^+$  en solution avant même la désorption laser. Il ne faut toutefois pas négliger les processus ayant lieu en phase gazeuse lors de l'expansion supersonique du mélange matrice/échantillon suite à l'impulsion laser puisqu'ils pourraient également générer des ions<sup>126, 127</sup>.

### 1.6.3 Matrices organiques MALDI

Les matrices utilisées en MALDI sont généralement des solides cristallins possédant une faible tension de vapeur afin de ne pas être sublimés aux basses pressions de la source d'ionisation. La matrice devra aussi être apte à absorber la longueur d'onde correspondant au laser utilisé<sup>128</sup>. Parmi les autres rôles de la matrice, on retrouve la capacité à rompre les forces intermoléculaires entre les ions/molécules de l'échantillon et à assister dans la formation d'ions par le don ou le gain de proton.

Pour des instruments dotés de laser UV, les matrices utilisées ont généralement des structures aromatiques jouant le rôle de chromophores permettant une forte absorption du laser. Celle-ci se traduira ensuite par une excitation électronique de la matrice qui se désorblera et générera les ions en phase gazeuse. Plusieurs molécules organiques aromatiques sont utilisées en MALDI telles que l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB), l'acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique (CHCA), l'acide sinapique (SA), l'acide 3-hydroxypicolinique (HPA), le dithranol, etc. Certaines d'entre-elles sont particulièrement «spécialisées» pour l'analyse de classes de molécules bien particulières comme les oligonucléotides (HPA<sup>129</sup>), les oligosaccharides (DHB<sup>130</sup>), les peptides (CHCA<sup>131</sup>), les protéines de grande masse moléculaire (SA<sup>132</sup>) les triacylglycerols (CHCA<sup>133</sup>) ou les polymères synthétiques (dithranol<sup>134</sup>).

La préparation des échantillons en MALDI-MS se fait habituellement par ajouts et évaporations successives de matrice à l'échantillon. Typiquement, des volumes de 0.5  $\mu$ L à 2  $\mu$ L d'une solution à 10 mg/mL ou saturée en matrice organique sont utilisés et appliqués sur l'échantillon à sec ou mélangé au préalable avec la solution à analyser. Un ratio molaire entre la matrice et l'analyte allant de 500 : 1 à 5000 : 1 est habituellement apte à fournir un spectre de masse

optimal<sup>135, 136, 137</sup>. On aura pour le spectre de masse dans ces conditions un bon ratio signal sur bruit et une faible fragmentation des ions. Le processus de cristallisation de la matrice est également à prendre en compte pour la préparation d'échantillon en MALDI afin d'assurer une bonne reproductibilité. On cherche l'obtention de cristaux fins distribués de façon homogène à la surface de l'échantillon. Pour y parvenir, on peut préparer la solution de matrice à l'aide de solvants volatils puis forcer l'évaporation de la matrice en chauffant légèrement, en utilisant un faible jet d'air ou bien en séchant sous vide<sup>138, 139</sup>.

#### 1.6.4 Analyseur de masse

Comme la source MALDI est une source pulsée, elle nécessitera un analyseur de masse qui est compatible avec cet aspect de la source d'ionisation. Le tube à temps de vol est couramment combiné avec une source MALDI puisque cet analyseur de masse nécessite également une source d'ionisation non continue. La configuration MALDI-TOF est en soi un mélange idéal en raison de leur mode d'analyse discontinu<sup>136, 140</sup>.

La construction d'un analyseur TOF a été publiée en 1946 par Stephen<sup>141</sup>. Cet analyseur de masse base la séparation d'ions sur leur temps de vol nécessaire pour atteindre un détecteur. En effet, des ions possédant différents ratios masse sur charge ( $m/z$ ) seront dispersés dans le temps à l'intérieur d'une zone sans champ. Le temps nécessaire à un ion pour atteindre le détecteur pourra être corrélé avec son ratio  $m/z$ . Les ions seront accélérés dans le TOF par une différence de potentiel appliquée dans la source d'ionisation. Ces ions auront tous le même point initial de départ dans le TOF et les ions accélérés possédant des ratios  $m/z$  plus petits atteindront le détecteur avant les ions ayant de grands  $m/z$ . Pour permettre la séparation des ions en fonction de leur  $m/z$ , le TOF demande cependant d'avoir des paquets d'ions qui sont générés au même moment. Le mode de séparation en TOF nécessite donc une source pulsée, expliquant la combinaison naturelle avec la source MALDI.

Les principaux avantages des instruments TOF sont la gamme en principe illimitée<sup>142, 143</sup> de  $m/z$  pouvant être analysée, la capacité de générer en quelques microsecondes un spectre de masse complet couvrant une large gamme de  $m/z$ , une excellente transmission d'ions, la simplicité de sa construction, la capacité de faire de mesures précises et de faire des analyses de spectrométrie de masse en tandem (MSMS). Le temps de vol entre la source et le détecteur d'un ion possédant un

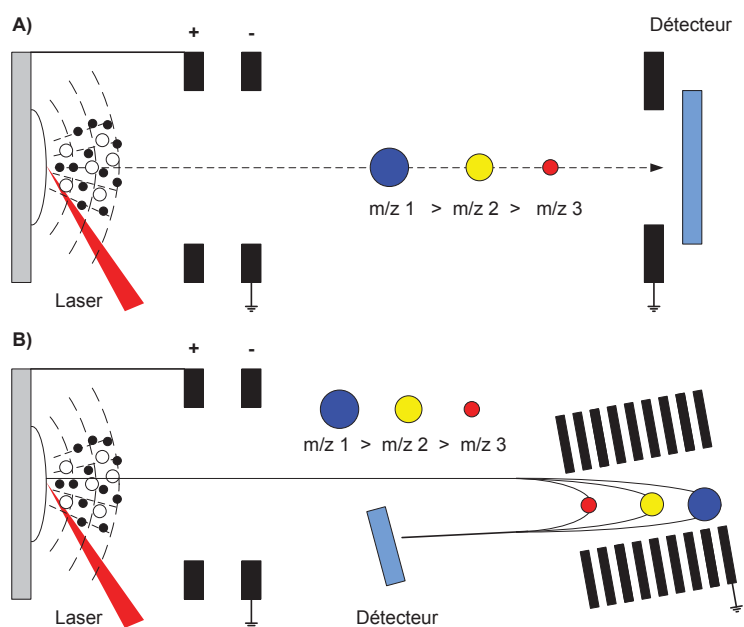


ratio  $m/z$  à l'intérieur d'un TOF d'une longueur connue peut être décrit par l'équation 10 où le temps passé dans la source d'ionisation est négligé.

$$t = \frac{s}{\sqrt{2eU}} \sqrt{\frac{m}{z}} \quad (10)$$

Où  $t$  est le temps de vol requis pour atteindre le détecteur,  $s$  est la distance à parcourir jusqu'au détecteur et  $U$  est le voltage d'accélération.

Un des principaux modes d'analyse utilisés avec un instrument MALDI-TOF est celui dit «linéaire»<sup>109</sup> (Figure 1.13 A).



**Figure 1.13** Analyseur de masse de type tube à temps de vol (TOF) en mode linéaire (A) et en mode réflectron (B)

L'analyte sera généré depuis le porte-échantillon suite à un pulse laser et transmis au TOF par un potentiel d'accélération appliqué entre l'échantillon et une contre électrode. Les ions générés par la désorption laser seront extraits et accéléré par le potentiel appliqué vers le TOF. Les ions

vont dériver dans un tube sans champ possédant une longueur d'environ 1 à 2 m avant d'atteindre le détecteur. Le pourcentage de transmission d'un TOF frôle le 90% puisque les pertes d'ions sont presque uniquement dues aux collisions avec des gaz résiduels ou à une mauvaise focalisation de la source d'ionisation. Le nombre de grilles de voltages traversés et le type de détecteur utilisé seront également à considérer pour évaluer le pourcentage de transmission du TOF. Les ions métastables subissant des décompositions et des bris moléculaires durant le temps de vol seront aussi détectés sans diminuer pour autant le signal obtenu. En effet, les fragments générés pendant le temps de vol conserveront leur énergie cinétique initiale et atteindront le détecteur au même temps de vol que les ions précurseurs intacts. Ainsi, les fragments ioniques et neutres génèrent une réponse au détecteur, faisant du TOF en mode linéaire un analyseur de masse idéal pour l'analyse de molécules fragiles ou de grand poids moléculaire.

Un autre mode d'analyse fréquemment utilisé en MALDI-TOF est celui impliquant un réflectron<sup>144</sup>, qui consiste en une série d'électrodes situées à l'extrémité du tube à temps de vol (**Figure 1.13 B**). L'application d'un potentiel sur ces électrodes générera un champ électrique répulsif directement après la zone sans champ. Le potentiel appliqué à cette série d'électrodes augmentera de façon croissante au fur et à mesure que l'on progresse à l'intérieur du réflectron. Les ions pénétreront donc dans le réflectron jusqu'à ce que leur énergie cinétique soit nulle et seront ensuite repoussés vers l'extérieur de celui-ci vers un détecteur situé au milieu du TOF (**Figure 1.13 B**). Cette série d'électrodes permettra ainsi de focaliser des ions d'un même  $m/z$ , mais possédant des énergies cinétiques différentes en leur faisant atteindre le détecteur avec un plus petit écart de temps de vol. En effet, pour un  $m/z$  donné, certains ions auront une plus grande énergie cinétique et iront plus loin dans le réflectron, alors que ceux possédant une plus petite énergie cinétique pénétreront moins loin dans celui-ci. Le réflectron permet ainsi de corriger les différences dans les temps de vol obtenu pour des ions d'un même  $m/z$ , d'améliorer la résolution du TOF ainsi que la précision sur la mesure de masse<sup>145 146</sup>. La capacité du réflectron à compenser les différences en énergie cinétique initiale en fait un mode d'opération de choix, en particulier pour obtenir une grande résolution permettant par exemple d'observer le patron isotopique d'une molécule.

### 1.6.5 Séquençage et identification de protéines par MALDI-TOF/TOF

Pour réaliser l'identification d'une protéine par spectrométrie de masse, on effectue le séquençage des acides aminés d'une fraction de la protéine appelée peptide. Pour générer ces peptides, il est possible de faire tout d'abord une étape menant au dépliement de la protéine en effectuant la réduction de ses ponts disulfures suivit de leur alkylation. L'utilisation de mercaptoéthanol ou de dithiothreitol permet de briser les ponts disulfures de la protéine lui conférant sa forme tridimensionnelle, rendant la séquence d'acides aminés isolés au cœur de la protéine plus accessible par la suite<sup>147</sup>.

La protéine pourra ensuite être clivée en ses peptides correspondant via l'utilisation d'une digestion enzymatique. Une enzyme sera exploitée pour effectuer le clivage à des sites précis de la séquence d'acides aminés de la protéine. Par exemple, la trypsine viendra couper la liaison peptidique du côté C terminal de chaque lysine (Lys) et arginine (Arg) qu'elle rencontrera dans la séquence d'acides aminés, sauf si une proline suit la lysine ou l'arginine<sup>148, 149</sup>. La chymotrypsine est une autre enzyme pouvant être utilisée pour la digestion enzymatique d'une protéine. Cette enzyme sera sélective à la phénylalanine, la tyrosine et le tryptophane, coupant la liaison peptidique du côté C terminal de ces trois acides aminés, sauf si une proline les suit dans la séquence<sup>150</sup>. Afin de permettre une digestion adéquate de la protéine, plusieurs paramètres tels que le temps de digestion et la quantité d'enzyme utilisée devront être optimisés.

Les peptides générés par digestion enzymatique pour une même protéine pourront alors être analysés par spectrométrie de masse. Une première analyse permettra d'observer l'ensemble des peptides générés et de faire leur cartographie, puis de cibler les peptides les plus abondants pour effectuer leur séquençage par spectrométrie de masse en tandem. Comme l'enzyme utilisée pour la digestion possède une certaine sélectivité, les peptides générés auront un certain patron caractéristique. Par exemple, les peptides provenant d'une digestion avec la trypsine se termineront tous par un acide aminé Lys ou Arg. Le ratio  $m/z$  d'un peptide sera utilisé dans un premier temps et représentera l'ion précurseur sélectionné par le premier analyseur de masse. Dans un appareil couplant la chromatographie liquide à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS), l'ion précurseur sélectionné est généralement ensuite transmis dans une chambre de collision où il sera fragmenté. Il est aussi possible d'avoir des configurations instrumentales sans chambre de collision, par exemple dans certains instruments MALDI-MS où un excès d'énergie interne sera fourni par le

laser et exploitée pour effectuer la fragmentation du précurseur sélectionné. Selon la méthode de collision employée (ex : CID, ETD, ECD ou par le laser en MALDI), différents fragments caractéristiques des peptides seront observés (fragments b et y principalement avec la CID)<sup>150</sup>. Les ions fragments générés seront observés dans le second analyseur de masse. Les principaux ions fragments résultent de la perte successive d'acides aminés dans la séquence peptidique. Le spectre de masse d'ions fragments générés pour l'ion précurseur sera alors enregistré.

Le patron de fragmentation d'un peptide généré par digestion enzymatique (ex. : trypsine) sera utilisé pour faire le séquençage des acides aminés qu'il renferme. La séquence identifiée pourra être rattachée à celle d'une protéine dans les bases de données et mener à son identification. Pour parvenir à cette identification, une comparaison des spectres de fragmentation expérimentale et théorique sera effectuée via une recherche en base de données (ex. : SwissProt database) par l'intermédiaire d'un moteur de recherche (ex : Mascot). Lors de la recherche en base de données, la liste des ions fragments d'un ion précurseur obtenu depuis le spectre d'ion fragment sera utilisée. Plusieurs paramètres tels que la taxonomie, la librairie de protéines, l'instrumentation, l'enzyme utilisée pour la digestion, l'erreur en m/z tolérée pour l'ion précurseur et les fragments seront à considérer dans le moteur de recherche. Ces facteurs auront un impact sur la recherche en base de données et sur le score obtenu pour le séquençage expérimental d'un peptide donné. Le score minimum menant à l'identification sera basé sur la probabilité que l'association entre les données expérimentales et celles de la base de données soit liée à un événement aléatoire. Le score sera rapporté comme étant  $-10 \log(P)$  où P est la probabilité d'un événement aléatoire. Les paramètres utilisés lors de la recherche pourront également avoir un impact sur le score minimum d'identification. Lorsqu'un score supérieur au score minimum sera obtenu pour un peptide séquencé expérimentalement, il sera possible d'associer la séquence du peptide à une protéine et de faire son identification. Faire l'identification de plusieurs peptides associés à une même protéine permet de consolider l'identification faite en base de données.

## 1.7 Directions et perspective de la thèse

Cette thèse traitera, au travers des différents chapitres qu'elle contient, de projets portant essentiellement sur l'analyse de molécules et de biomolécules directement dans un fluide sanguin non purifié à l'aide de biocapteurs SPR. Une meilleure compréhension des interférences provenant des fluides sanguins et différentes stratégies permettant d'effectuer des biodétections directement dans ces fluides sous leurs formes brutes seront ici développées.

Tout d'abord, une analyse des interférences générées par l'adsorption du sérum sanguin sur les surfaces des biocapteurs SPR sera effectuée pour mieux saisir les enjeux liés à l'analyse directement dans le sérum. Pour ce faire, une combinaison des techniques SPR et MALDI-TOF a été utilisée afin de générer un appareillage permettant d'élucider les phénomènes d'adsorption non spécifique du sérum. La SPR permettra de quantifier la quantité de biomatériau adsorbé alors que la MALDI-MS pourra identifier les biomolécules adsorbées sur le capteur SPR. Pour réaliser l'identification des protéines adsorbées par MALDI-MS, une digestion enzymatique impliquant la trypsine sera effectuée à même le capteur SPR. L'adsorption non spécifique du sérum sera évaluée par SPR et MALDI-MS sur plusieurs chimies de surface couramment utilisées pour former des monocouches sur des capteurs plasmonique. Les tendances et observations pour chacune des SAM étudiées sont rapportées et discutées dans le chapitre 2 de la thèse. Ce chapitre est tiré de l'article «*Unravelling nonspecific adsorption of complex protein mixture on surfaces with SPR and MS*» (*Analytical Chemistry*, publié en 2014) qui a été coécrit avec le directeur de recherche, professeur Jean-François Masson, en collaboration avec le professeur Pierre Chaurand.

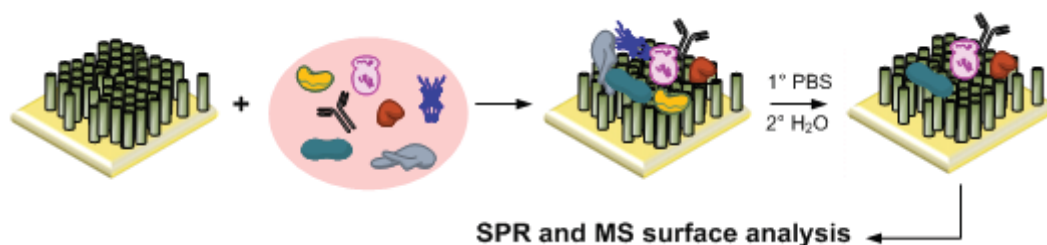
Dans le chapitre 3, le développement d'un instrument portable combinant les méthodes SPR et ELISA sera discuté. Cet instrument fut utilisé dans un cadre concret de dépistage qui ciblait un biomarqueur du cancer de la prostate (PSA) qui est habituellement contenu dans le sérum. La biodétection de PSA fut effectuée dans une gamme de concentrations requises pour diagnostiquer cette maladie. La combinaison SPR et ELISA a permis d'étendre le domaine de linéarité pour la détection de la PSA jusqu'à presque quatre ordres de grandeur alors que celui-ci est normalement d'environ deux ordres pour un biocapteur classique. Outre l'instrument développé, le troisième chapitre met également de l'avant l'utilisation d'un substrat plasmonique microstructuré constitué d'un arrangement hexagonal de microtrous. Ce film de microtrous a permis d'amplifier les signaux

obtenus pour la biodétection de la PSA. Ce matériel plasmonique combiné à une chimie de surface réduisant l'adsorption non spécifique a finalement permis la détection SPR de la PSA directement dans un échantillon de sérum n'ayant subi aucune dilution ou purification (Annexe 3). Le chapitre 3 rapporte l'article «*Single chip SPR and fluorescent ELISA assay of prostate specific antigen*» (*Lab on a chip*, publié en 2015) qui a été coécrit avec le professeur Jean-François Masson, Hugo Pierre Poirier Richard, Maxime Couture et Daniel Pelechacz.

Finalement, dans le chapitre 4, l'instrument SPR portable a été utilisé pour faire la détection de cibles pharmaceutiques directement dans un échantillon de sang. Pour permettre ce type de biodétection, l'ajout d'une membrane poreuse à la microfluidique utilisée a été nécessaire. L'introduction d'une barrière au sein même de la fluidique permettait d'exclure les cellules contenues dans le sang de la zone de détection SPR et de ralentir la diffusion des biomolécules de grande masse moléculaire. Ce double effet réduisait l'interférence de ce biofluide très complexe et permettait l'analyse de petites molécules diffusant rapidement. Il a ainsi été possible de détecter des peptides possédant une activité anti-athérosclérotique directement dans un échantillon de sang sans aucune dilution ou purification de ce dernier. Le chapitre 4 provient de l'article «*Microdialysis SPR: Diffusion gated sensing in blood*» (*Chemical Science*, publié en 2015) qui a été coécrit avec le professeur Jean-François Masson.

## Chapitre 2: Unravelling nonspecific adsorption of complex protein mixture on surfaces with SPR and MS

Julien Breault-Turcot, Pierre Chaurand and Jean-Francois Masson, *Analytical Chemistry* **2014**, *86*, 9612–9619



**Figure 2.1** Crude serum adsorption on self-assembled monolayer followed by MALDI-MS and SPR analysis for protein adsorption characterization

Je fus responsable de l'ensemble des manipulations réalisées en laboratoire et de l'ensemble du traitement de données pour l'article rapporté dans ce chapitre. Jean-Francois Masson, Pierre Chaurand et moi-même avons élaboré les protocoles expérimentaux ici présentés en plus de faire la rédaction de l'article. Pierre Chaurand et moi avons modifié le porte-échantillon du MALDI-TOF pour introduire les échantillons SPR.

## 2.1 Abstract:

Characterization of protein adsorption to surfaces has implications from biosensing to protective biocoatings. While research studies have principally focused on determining the magnitude of protein adsorption to surfaces, the proteins involved in the process remains only broadly identified and has not been investigated on several surfaces. To further elucidate the nonspecific adsorption process of serum to surfaces, surface plasmon resonance (SPR) and matrix assisted laser desorption ionisation mass spectrometry (MALDI-MS) were used in combination to obtain quantitative and qualitative information about the process of protein adsorption to surfaces. To validate the technique, crude serum was non-specifically adsorbed on four self-assembled monolayers (SAMs) on gold; 16-mercaptohexadecanoic acid (16-MHA), 11-mercaptoundecane(ethylene glycol)<sub>3</sub>-COOH (PEG), 3-MPA-LHDLHD-OH and 3-MPA-HHHDD-OH. Direct MS analysis of the non-specifically adsorbed proteins suggested the presence of a variety of protein (BSA, IgG and apolipoprotein A-1). Performing a trypsin digestion of the non-specifically adsorbed proteins confirmed the presence of BSA and Apolipoprotein A-1 and further revealed the complexity of the process by detecting the presence of complement C3, SHC-transforming protein 1 and kininogen 2. The level of nonspecific adsorption on different surfaces measured by SPR sensing directly correlated with the intensity of the serum protein and indirectly with the tryptic peptides measured by MS. Detailed analysis of the BSA peptides digested on 16-MHA and for BSA digested in solution was used to investigate the orientation of BSA on this surface. The combination of SPR and MS allows the quantitative and qualitative understanding of protein adsorption processes to surfaces.

## 2.2 Introduction:

Understanding the processes involved in nonspecific adsorption is essential for biosensing in crude biofluids. For example, screening for diseases or medical conditions is commonly done by the detection of a specific marker present in serum. Quantification of proteins biomarkers remains the premier source of information for the diagnostic of different medical conditions such as cardiomyopathy or cancer<sup>84, 151</sup>. The analysis of the biomarkers directly in crude biofluids would



be a great improvement in providing rapid, sensitive point-of-care biosensors. However, the complex mixture of background biomolecules in biofluids can lead to important adsorption to the surface of a biosensor, resulting in false positive or deviation of the analytical response. These interferences from the biological matrix have limited direct analysis with biosensors in such complex samples.

Different analytical techniques are used for detection of biomolecules in biological samples. Among them, surface plasmon resonance (SPR) biosensors<sup>8, 152, 153</sup> are a promising label-free tool relying on the interaction of the electric field of light undergoing total internal reflection with the electrons oscillating at the surface of a thin film of metal<sup>154</sup>. The plasmon resonance is sensitive to the refractive index at the vicinity of the metallic film and tracking the time-response of the plasmon resonance provides information about the bulk refractive index change and binding of molecules to the surface of the SPR sensor. The surface of the SPR sensor becomes selective to a specific analyte by functionalization of the sensor with a molecular receptor. Among the different classes of biomolecules that can be targeted by a biosensor, proteins are especially suited to SPR sensing due to the important refractive index change of proteins, resulting in high sensitivity of SPR sensors for proteins. In addition, proteins play a major biological role and thus are important biomedical targets. SPR sensing has thus been extensively used to detect many proteins with low ng/mL sensitivity<sup>8</sup>.

SPR sensors are particularly adapted to perform analysis in biofluids, as the light beam indirectly probes the surfaces of the SPR sensors and avoids the issues associated with absorption of biomolecules contained in biofluids and the turbidity of biofluids. However, nonspecific adsorption of proteins to the SPR sensor remains an issue for quantification of biomolecules directly in biofluids. In order to reduce the nonspecific adsorption, multiple strategies were developed to purify the sample by extraction/separation<sup>155</sup> or to reduce the contribution of interferences on the signal. Solving nonspecific adsorption also requires ultralow fouling surfaces to minimize the background signal coming from the sample. Different classes of surfaces have been proposed to decrease nonspecific adsorption of many blood-based biofluids. Polyethylene glycol (PEG) and its derivatives have been used with undiluted serum in order to reduce nonspecific adsorption<sup>88, 89</sup>. Surface chemistry based on zwitterionic molecules<sup>91</sup>, peptides<sup>92, 93</sup> and many others classes of molecule have also been used for that purpose and were discussed in a recent review<sup>5</sup>. Among the

zwitterionic surfaces proposed as ultralow fouling surfaces, polysulfobetaine methacrylic acid (pSBMA), polycarboxybetaine methacrylic (pCBMA) and polyoligoethyleneglycol methacrylic pOEGMA significantly reduced nonspecific adsorption<sup>37, 90</sup>. For the peptide based surfaces, 3-MPA-LHDLHD-OH showed the greatest reduction of non-specific adsorption of crude serum<sup>94</sup>. SAMs based on peptides have also been proposed to reduce nonspecific adsorption of other fluids such as cell lysate<sup>92</sup>. While these surfaces are effective in reducing nonspecific adsorption, the mechanism for the reduction is still debated.

Proteins were identified as the primary source of nonspecific adsorption in serum. It is generally accepted that the surface must be hydrophilic, have hydrogen bond acceptors and electrically neutral for the reduction of nonspecific adsorption of proteins<sup>99</sup>. Surface wetting is also suspected to play a role in minimizing nonspecific adsorption of proteins. However, proteins involved in nonspecific adsorption are poorly identified and the correlation of surface chemistry with the non-specifically adsorbed proteins remains poorly understood. It is suspected that albumin (66.4 kDa), immunoglobulin-G (IgG) (150 kDa) and fibrinogen (340 kDa) are mainly involved in the non-specific adsorption process of plasma<sup>156</sup>. Their high concentration in biofluids makes them likely to be involved in nonspecific adsorption. IgG and fibrinogens are present in plasma at concentrations in the  $\mu\text{g/mL}$  range while albumin can be found in the  $\text{mg/mL}$  range<sup>83</sup>. SPR sensing was employed to provide evidence that nonspecific adsorption follows a competitive process with successive adsorption/desorption events to surfaces. This sequential process known as the Vroman cascade is believed to occur rapidly for small protein of high abundance before being replaced by larger protein diffusing slowly but with stronger affinity for adsorption on the surface<sup>156</sup>. For example, albumin can be displaced from the surface by IgG, a larger protein that has more affinity for adsorption on the surface. Then, IgG can be displaced by fibrinogen using a similar process. While previously published studies characterized the adsorption process for pure solution of protein or mixture of proteins, nonspecific adsorption in plasma or serum involves a more complex mixture or protein and little is known about the synergic effect of a complex mixture on nonspecific adsorption. While SPR sensing is effective to quantify proteins, it remains a poor qualitative tool to identify molecules binding to the surface of the sensor. Thus, SPR sensing must be combined with a characterization tool capable of identifying proteins adsorbed to surfaces.

Mass spectrometry (MS) is a state of the art technique for protein analysis and identification<sup>157</sup>. Absorbed proteins can be identified after digestion on a surface using trypsin to generate sets of specific peptides<sup>158</sup>. The MS and MS/MS analysis of these peptides fragments is commonly used for sequencing and identifying proteins. Matrix assisted laser desorption ionisation MS (MALDI-MS) is well suited for surface analysis with ionization taking place on the surface<sup>159</sup>. The possibility of performing SPR and MALDI-MS directly on the SPR sensor, the sensitivity of SPR sensing and MALDI-MS for proteins, the complementarity of these surface techniques and the simplicity of adapting analysis of SPR sensors on MALDI-MS makes it advantageous to combine these techniques as previously demonstrated by Nedelkov *et al.*<sup>160-162</sup>. The combination of SPR with mass spectrometry is a promising approach that should enable a rapid identification of biomolecules adsorbed on a surface<sup>37</sup>.

## **2.3 Experimental details:**

### **2.3.1 Preparation of the SPR sensors**

The provenance of the materials is provided as electronic supporting information. Microscope slides of 25 x 75 x 1.0 mm or cover slips of 22 x 22 x 0.17 mm were cleaned in warm piranha solution (sulfuric acid + hydrogen peroxide – 3 : 1 at approx. 80°C) for at least 90 minutes. *Caution, piranha solution is highly corrosive!* The glass slides were then washed abundantly with deionised water to remove any traces of piranha solution. Cleaned and dried glass slides were covered with 0.5 nm chromium and 45 nm gold using sputtering (Cressington 308R sputter coater, Ted Pella Inc. Redding, CA) with an argon pressure of 0.02 mbar and a current set at 80 mA during deposition. The thickness of the metallic layer was calibrated by AFM. Monolayers of 16-MHA, PEG, 3-MPA-LHDLHD-OH and 3-MPA-HHHDD-OH were formed overnight on the SPR sensors in DMF solutions at a concentration of 1 mM. The samples were abundantly rinsed with ethanol to remove unbound molecules before drying the SPR sensor with a stream of nitrogen.

### **2.3.2 Serum adsorption and enzymatic digestion**

The different surfaces formed on 25 x 75 x 1.0 mm gold coated microscope glass slide were exposed to bovine serum for 10 minutes. The SPR sensors with the non-specifically adsorbed

serum were then immersed in PBS for 2 minutes and in distilled water for 2 minutes to wash off loosely bound proteins and excess salt. Enzymatic digestion of the proteins was performed directly on the surface at 37°C by deposition of a solution of 0.045 µg/µL of trypsin. The enzyme was solubilised and activated in a solution of 50 mM acetic acid/100 mM ammonium bicarbonate (1:10). The digestion setup consists of a heating plate on which a glass petri dish was filled with humidified cotton to maintain a constant temperature and humidity in the chamber during digestion. The samples were deposited directly on the humidified cotton. To monitor the temperature of the chamber during the digestion, a temperature probe was dipped in a droplet of water on a glass slide, also located in the chamber. To compensate for evaporation of the solution, small volumes of buffer solution (50 mM acetic acid and 100 mM ammonium bicarbonate with a 1:10 ratio) were added over the course of the digestion to maintain the enzyme in solution.

### **2.3.3 Bovine serum albumin (BSA) digestion in solution**

A 1 mg/mL solution of BSA was prepared in 100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> at pH 8 and 9 µg of trypsin were added for the enzymatic digestion. The mixture was heated at 37°C in an oil bath for 18 hours and the digested solution was placed at -80°C before analysis.

### **2.3.4 MS analysis**

Solutions of 10 mg/mL α-CHCA and SA were prepared in 1:1 ACN/H<sub>2</sub>O + 0.2% TFA. These matrices were spotted directly on the sample where proteins from bovine serum were adsorbed. The α-CHCA was used to study peptides generated by enzymatic digestion while SA was used to study undigested proteins. Depending on the analysis (protein or peptide), two successive volumes of 0.5 µL of the matrix were spotted on the sample, with enough time between the depositions for the matrix to dry (at room temperature). The total amount of matrix added on the surface was thus 10 µg. Analyses of proteins and tryptic peptides on surfaces were performed with a MALDI-TOF MS UltrafleXtreme mass spectrometer using an Nd:YAG/355nm laser and operated by Flex Control 3.0 software (Bruker Daltonics, Billerica, MA). Data acquisition of peptides was carried out in reflectron geometry under optimized delayed extraction conditions with a nominal source accelerating voltage of + 25 kV in the m/z range between 60 – 5,000. For proteins, data acquisition was done with the linear geometry with optimized sources potentials for the m/z range between 10,000 – 200,000. Profiling data were acquired by summing 10 x 500 laser shots on a single sample.

Calibration of the instrument for lower  $m/z$  range was done using a mix of known peptides (Bradikinin, Angiotensin II, ACTH (18-39), Insulin B chain) and a BSA solution was used to calibrate the instrument at higher  $m/z$  range. Flex Analysis software (Bruker Daltonics) was then used for mass spectrum analysis. For peptide characterization, MS/MS measurements were performed by using the LIFT/TOF/TOF mode. Protein identification was performed using MASCOT search engine and Swissprot database.

### **2.3.5 SPR measurements and instrumentation**

SPR measurements were performed on a custom miniature instrument based on a dove prism<sup>163</sup>. The sensors consisted of gold-coated microscope coverslips of 22 x 22 mm. Nonspecific adsorption of serum was measured on different monolayers. The SPR sensors were mounted using a RI-matching fluid to ensure optical contact with the prism and a custom flow cell was fitted on the system to inject the samples on the SPR sensor. The dark spectrum measurement was acquired with a total of 100 data points with the light source turned off. Then, 100 spectra with s-polarized light were recorded for the reference signal and finally the p-polarized spectra were recorded at different time intervals with a rate of one spectrum per second for the kinetic measurement. A portable spectrometer (Ocean Optic, Dunedin, FL) was used to collect data and MatLab was used to process data. Static flow conditions were used for all experiments. The kinetic curves consisted of a PBS baseline trace for a period of 5 minutes followed by bovine serum (2 mL) injected rapidly and nonspecific adsorption was monitored during 20 minutes for each monolayer.

## **2.4 Results and Discussion**

### **2.4.1 Proteins adsorbed to surfaces**

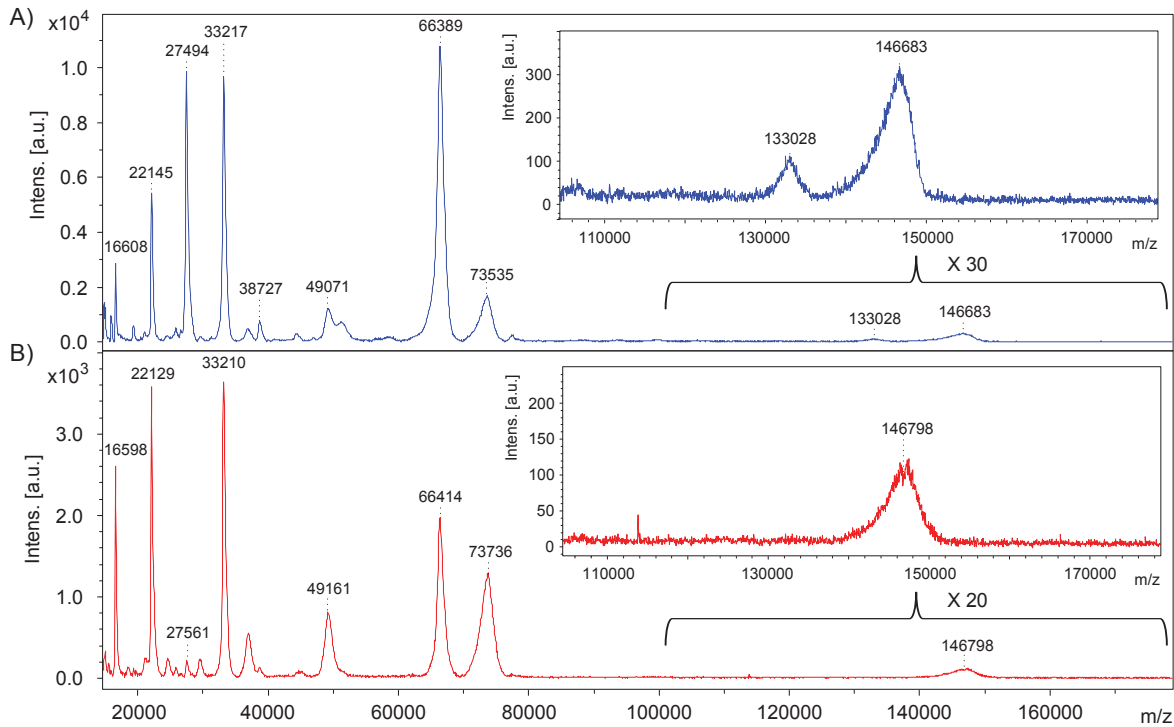
In recent years, the increasing interest for the direct analysis of biomolecules in complex biofluids and the issue of nonspecific adsorption of biofluids to surfaces has led to the development of surface chemistries providing low fouling. It is also important to understand biofouling of serum on SPR sensors, due to the prevalence of serum samples in bioanalysis. Proteins are expected to mainly participate in nonspecific adsorption due to the high concentration of proteins in biofluids.

SPR sensing was used here to provide quantitative information about the surface concentration of proteins non-specifically adsorbed from bovine serum on different monolayers. While being very sensitive and quantitative, SPR sensing remains a poor qualitative technique to identify molecules adsorbing to surfaces. Hence, the proteins involved in nonspecific adsorption remain poorly identified. In addition, it remains unknown whether the surface chemistry plays a role on the identity of non-specifically adsorbed proteins. To address this question, three types of SAM were investigated: an alkane thiol (16-MHA), an ethylene glycol derivative (SH-PEG) and two short thiolated peptides (3-MPA-HHHDD-OH and 3-MPA-LHDLHD-OH). These molecules each possess a thiol at the distal end to form a SAM and a carboxylic acid group (COOH) in the  $\alpha$  position that allows the binding of a biomolecular receptors using standard coupling chemistry in SPR sensing.

SPR sensors monitored quantitatively and in real time the adsorption of proteins from bovine serum on the modified gold surface. Nonspecific adsorption was calculated for the different SAM from the SPR data and the equation of Jung et al.<sup>78</sup>, using the experimental parameters previously reported<sup>164</sup>. The level of nonspecific binding was greater for 16-MHA, which had  $236 \pm 63$  ng/cm<sup>2</sup> of non-specifically adsorbed proteins. In comparison, PEG showed lesser nonspecific adsorption than 16-MHA with  $100 \pm 23$  ng/cm<sup>2</sup> as reported previously by our group in the literature using identical conditions<sup>91, 164</sup>. The two peptide monolayers further reduced nonspecific adsorption of serum. Nonspecific adsorption was respectively  $29 \pm 1$  ng/cm<sup>2</sup> and  $12 \pm 11$  ng/cm<sup>2</sup> for 3-MPA-HHHDD-OH and for 3-MPA-LHDLHD-OH<sup>94</sup>. Thus, nonspecific adsorption followed the trend of 16-MHA < PEG < 3-MPA-HHHDD-OH < 3-MPA-LHDLHD-OH, showing the potential of peptide based SAMs for biosensing directly in crude bovine serum.

The MS of undigested proteins provided valuable clues about the identity of proteins adsorbed on the surface (**Figure 2.2**). A monolayer of 16-MHA was exposed to bovine serum and proteins non-specifically adsorbed on the SAM were analyzed by MALDI-TOF. Peak ratios of different ions before and after washing with PBS suggest that a fraction of proteins are loosely bound on the SPR sensor modified with 16-MHA (**Figure 2.2**). PBS containing 0.05% of Tween 20 was also used to wash proteins bound on the SAM. Tween 20 is a detergent used to disrupt protein-protein interactions and to limit protein aggregation<sup>165, 166</sup> and is commonly used in SPR sensing. Using this detergent should disturb proteins aggregated on adsorbed material on the monolayer<sup>166</sup> leaving

mainly protein directly adsorbed on the surface. No noticeable changes in the MS spectra were observed upon the addition of Tween 20 to the wash buffer. This indicated that PBS was appropriate to remove loosely bound material from the surface, as the addition of tween 20 did not further removed proteins from the surface.



**Figure 2.2** MALDI mass spectra of proteins from whole bovine serum adsorbed on 16-MHA before (A) and after rinsing the surface with PBS (B).

According to the Vroman cascade<sup>156</sup>, adsorption of albumin, IgG and fibrinogen should be expected for blood or plasma. In our case, fibrinogen should not be observed since it is present in plasma and blood, but absent from serum. As the principal proteins in serum are known<sup>83</sup> and by using the Uniprot database, peaks at 66.4, 33.2, 22.1 and 16.6 kDa are likely due to BSA with various charge states (+1 to +4 respectively), while peaks at 146.7, 73.5, 49.1 and 36.7 kDa could indicate the presence of IgG charged +1, +2, +3 and +4 respectively. Another peak at 27.5 kDa could possibly be attributed to the singly charged apolipoprotein A-1 (confirmed by the sequencing of several tryptic peptides). It is not surprising to observe apolipoprotein A-1, as it was previously reported by Cedervall *et al.* to adsorb on acrylamide copolymer from plasma<sup>167</sup>. By comparing the



intensity of MS peaks for BSA (66.4 kDa) and apolipoprotein A-1 (27.5 kDa), we observed a more significant decrease after washing the SPR sensor for apolipoprotein A-1 (27.5 kDa) than for BSA (66.4 kDa) (**Figure 2.2**). This suggests that apolipoprotein (27.5 kDa) is more loosely bound to the surface than BSA (66.4 kDa). In addition to these proteins, a significant number of MS peaks were observed in the mass spectrum, indicating that other proteins were adsorbed on 16-MHA. A few peaks were observed at a lower mass range between 5 and 15 kDa (**Figure 2.4**). The main peak at 8.5kDa may be tentatively assigned to ubiquitin based on mass concordance in Uniprot database. Otherwise, the MS spectra were exempt of significant peaks and thus, the region at higher m/z was the focus of the following experiments.

Apolipoprotein A-1 was reported to adsorb favourably on the surface of nanoparticles of increasing hydrophobicity<sup>167</sup>. Thus, the ratio of the peak intensity of apolipoprotein A-1 (27.5 kDa) and BSA (66.4kDa) after the PBS wash can provide molecular information about the interaction of serum with different surface chemistries. The apolipoprotein A-1/BSA ratios were calculated at 0.11, 0.42 and 1.40 for PEG, 16-MHA and 3-MPA-HHHDD-OH respectively. The ratio of apolipoprotein A-1 to BSA follows quite well the trend of hydrophobicity of the surface. Indeed, contact angle values of 25°, 27° and 38° were obtained respectively for PEG, 16-MHA and 3-MPA-HHHDD-OH<sup>92, 93</sup>. These results indicate that apolipoprotein A-1 adsorb more favourably to gold surfaces of increasing hydrophobicity, similarly to the polymeric surface previously reported<sup>167</sup>. The nonspecific adsorption of serum does not follow the same trend, since 16-MHA has the larger nonspecific adsorption followed by PEG and 3-MPA-HHHDD-OH. Thus, while hydrophobicity is definitely a factor of protein adsorption, apolipoprotein A-1 does not constitute a predictor for the overall level of nonspecific adsorption and it does not explain the trend of nonspecific adsorption.

It must also be pointed out that 3-MPA-LHDLHD-OH, the most hydrophobic surface tested (static water contact angle of 53°) and also the surface with the lesser nonspecific adsorption, led to a relatively low ratio of apolipoprotein A-1 to BSA of 0.31, which is not following the trend of apolipoprotein A-1 adsorption in relation to surface hydrophobicity. A negative charge was expected at physiological pHs due to the presence of carboxylate groups. Thus, another factor than hydrophobicity and charge may explain why a smaller apolipoprotein A-1 to BSA ratio for 3-MPA-LHDLHD-OH was observed. The structural conformation adopted by the molecule forming the



monolayer may explain this result. Peptides can adopt a secondary structure such as an alpha helix or a beta sheet. Previous structure analysis by IR spectroscopy had shown that 3-MPA-HHHDD-OH will have an elongated structure similar to  $\beta$ -sheets<sup>93</sup> while 3-MPA-LHDLHD-OH will adopt an  $\alpha$ -helix conformation on the surface of the SPR sensor<sup>94</sup>. 3-MPA-LHDLHD-OH might provide a less favourable surface for apolipoprotein A-1 adsorption. Our previous study on 3-MPA-LHDLHD-OH revealed that the structure adopted by molecules forming the monolayer varies with the surface potential applied and changed significantly the nonspecific adsorption behaviour<sup>168</sup>. Thus, the hydrophobicity and the structure of the SAM are factors involved in the nature of the protein non-specifically adsorbed.

#### **2.4.2 Protein digestion on surfaces**

Enzymatic digestion was necessary to confirm the identification of the protein adsorbed on the SPR sensor from bovine serum. Trypsin generated a variety of peptides due to the presence of several lysine and arginine cleavage sites available in proteins. Tandem MS was used for the selection and fragmentation of peptides of a single m/z ratio, in order to elucidate the amino acid sequence of the corresponding protein after database interrogation. For each SAM investigated, monitoring the number and relative intensity of peptides generated was used to optimize the digestion conditions. The optimal proteolysis time was reduced for surfaces with lesser nonspecific adsorption with 45, 40, 20 and 10 min being optimal for 16-MHA, PEG, 3-MPA-HHHDD-OH and 3-MPA-LHDLHD-OH respectively. The proteolysis time in that case provided complementary information about the level of nonspecific adsorption and was in agreement with SPR sensing. In addition to proteolysis time, the optimal amounts of MALDI matrix deposited on the SPR sensors correlated with the amount of non-specifically adsorbed proteins. For example, the amount of CHCA used for analysis on 3-MPA-LHDLHD-OH was only of 5  $\mu$ g in order to optimize the intensity for the peptide generated by the proteolysis. This is due to the fact that a molar ratio of matrix/protein between 500:1 and 5000:1 is normally used in order to have the best signal to noise ratio<sup>135-137</sup>. Nevertheless, other parameters such as the crystallisation behavior on each SAM due to their respective hydrophobicity should be considered and could impact the optimal amount of CHCA that should be used.

**Table 2.1** Peptides observed by MALDI MS on different SAM after tryptic digestion of adsorbed proteins initially contained in crude bovine serum and identification of the corresponding protein.

$[M+H]^+$ (Da)	16-MHA	PEG	3-MPA- HHHDD-OH	3-MPA- LHDLHD-OH	Protein
1017.519	X	X	X	X	Apolipoprotein A-1
1163.630	X	X	X		Bovine serum albumin
1221.537	X	X	X		Complement C3
1301.728	X	X	X	X	SHC-transforming protein 1
1305.654	X	X	X	X	Bovine serum albumin
1345.631			X		Kininogen 2
1439.760	X	X			Bovine serum albumin
1479.744	X	X	X	X	Bovine serum albumin
1511.792	X	X	X	X	Bovine serum albumin
1567.700	X	X	X	X	Bovine serum albumin
1639.886	X	X	X		Bovine serum albumin
1791.053	X				Complement C3
2045.373	X				Bovine serum albumin

The number of peptides generated by proteolysis was also proportional to the nonspecific adsorption on a surface (**Table 2.1**). Peptides with lower intensities in MS were among the first to be no longer observed for surfaces exhibiting lower nonspecific adsorption. The absence of some peptide in the MS spectrum for low fouling surfaces should not be considered as evidence of the absence of the protein from the surface, but as a decrease of the intensity of these peptides below detection limit of the instrument. In these cases, the peptide might be generated by proteolysis of the protein on the surface, but remained undetected by MS. Thus, the absolute number of peaks generated by enzymatic digestion attributed to proteins (other than trypsin) was reduced from 25 peptides for 16-MHA and SH-PEG-COOH to 18 for 3-MPA-HHHDD-OH and 12 for 3-MPA-LHDLHD-OH. Again, values obtained by MS validate that nonspecific adsorption decreases in that order 16-MHA and SH-PEG > 3-MPA-HHHDD-OH > 3-MPA-LHDLHD-OH, which is in good agreement with SPR data.

The pattern of tryptic peptides is quite complex and varies for each surface (**Figure 2.5** and **Table 2.1**). While the major proteins remained the same, different proteins were observed on the surfaces and are thus also responsible for the nonspecific adsorption.

A Mascot database search identified several proteins from bovine serum as non-specifically adsorbed on the SPR sensor (**Table 2.3**) †. Peptides are mainly associated to four proteins: BSA, apolipoprotein A-1, complement C3 and SHC-transforming protein 1. These proteins represent the strongly bound fraction of proteins responsible for the nonspecific adsorption and (except SHC-transforming protein 1) are «classical plasma proteins», present at high level in serum <sup>83</sup> (mg/mL for BSA, µg/mL for apolipoprotein A-1 and complement C3). The impossibility of assigning all MS peaks generated from enzymatic digestion was due to low abundance signal for some peptides and their fragmentation spectrum generated afterward by MS/MS was thus inconclusive. Nevertheless, it was possible to associate some unsequenced peptides with the four major proteins identified based on the comparison of the m/z obtained experimentally by proteolysis with the theoretical m/z ratio obtained with *in silico* digestion (using the MS-digest tool of Protein prospector). To ensure a good confidence in the results obtained (**Table 2.4**), only peptide with a m/z difference between the theoretical and experimental value lower than 0.05 Da were considered. These results help to consolidate the identification of BSA, apolipoprotein A-1, complement C3 and SHC-transforming protein 1 on the SAMs investigated †.

Three of the four proteins identified on the SPR surface possessed a molecular weight that match proteins reported previously in the literature as “unknowns” for adsorption of plasma on polystyrene surface (apolipoprotein A-1: 28 kDa, complement C3: 180 kDa and SHC-transforming protein 1: 50 kDa) <sup>167</sup>. Nonspecific adsorption of plasma reported by Cedervall et al. <sup>167</sup> was carried with gel filtration chromatography, SDS-PAGE and MS to identify non-specifically adsorbed proteins. This lengthy sequence of preparation steps can be simplified using MALDI-MS directly on the SPR sensor to identify and quantify non-specifically adsorbed proteins. Our results for serum proteins non-specifically adsorbed proteins on the different SPR surfaces complement well literature that was inconclusive. Our SPR-MS approach could be advantageous to identify proteins adsorbed on different surfaces.

---

†Voir l'Annexe 1 pour plus d'information au sujet des paramètres utilisés pour faire l'identification des protéines

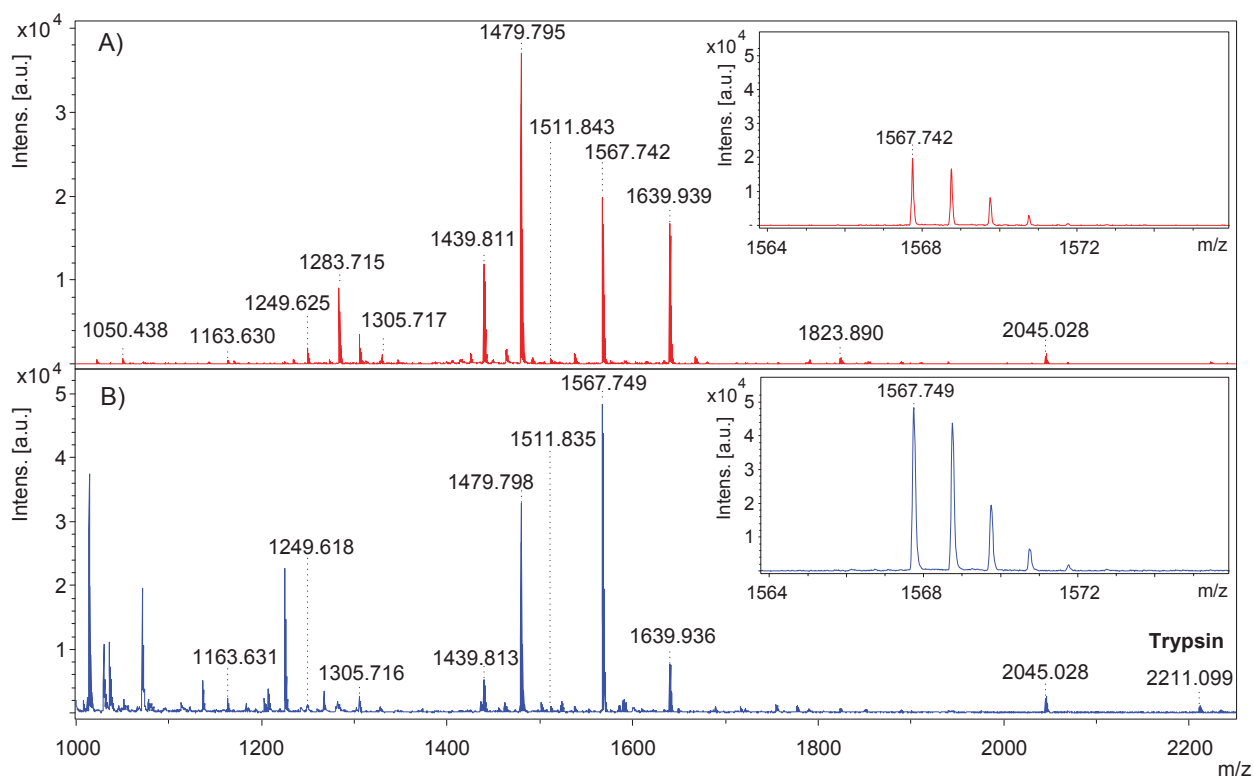
While the Vroman cascade has put a large emphasis on BSA and IgG as the major causes of nonspecific adsorption in serum, other proteins (apolipoprotein A-1, complement C3 and SHC-transforming protein 1) are also present on the various surfaces tested and thus play a role in nonspecific adsorption. In addition, it would have been expected to observe tryptic peptides belonging to IgG. However, no peptides associated with IgG were identified on any surface analyzed. Since IgG is found in serum at  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ <sup>83</sup> and that a peak at 146.7 kDa was observed for protein after the washing procedure (inset **Figure 2.2**), a few factors can explain the absence of peptide associated to IgG. The peak at 146.7 kDa (**Figure 2.2**) can possibly be attributed to IgG, but it must be considered that IgG is a class of biomolecule regrouping many different paratopes with roughly the same m/z ratio. Since the variable chains forming IgGs paratopes will be different from one species to another, different amino acid sequences will be expected and observed after enzymatic digestion. Thus, a small concentration of peptides specific to each IgG would be generated by enzymatic digestion, which would lead to intensities below the detection limit of the MS method. In addition, the quality of the MS/MS spectrum for weak signals may not be sufficient for sequencing and identification of the protein. Finally, the orientation of IgG may be the cause of the weak response to trypsin digestion. Trypsin must access the cleavage sites of IgG adsorbed at the surface and the orientation of IgG on the SPR sensor may be prohibitive for enzyme digestion.

The nature of adsorbed proteins varied on different surfaces. For example, no peptides identified on 3-MPA-LHDLHD-OH were related to complement C3 possibly due to a low abundance of this protein on the surface (**Table 2.1**). Non-specifically adsorbed proteins on the surfaces partly represent the major proteins found in serum. Complements C5 to C9, alpha-1-antitrypsin or transferrin were not detected, even if these proteins are present in serum at concentration level similar to apolipoprotein A-1 or complement C3<sup>83</sup>. The opposite situation where a SAM could have a particular affinity towards a protein might also be possible. For example, a peptide at 1345.631 Da was attributed to the protein kininogen 2 (**Table 2.1**) and was only identified on 3-MPA-HHHDD-OH. Another peptide (1542.646 Da) could potentially be linked to this protein based on its m/z and the *in silico* digestion performed and was only present on the 3-MPA-HHHDD-OH monolayer (**Table 2.4**). Kininogen 2 is a glycoprotein that can be found in serum at concentration in the  $\mu\text{g}/\text{mL}$ <sup>169, 170</sup>. This protein is known to play an important role in liberating bradykinin<sup>171</sup>, a vasoactive peptide, and to be a thiol protease inhibitor<sup>172</sup>. The fact that kininogen 2 inhibits this type of protease might explained why it has an affinity for the 3-MPA-HHHDD-OH

monolayer. Thiol proteases is a class of enzyme that possesses an active site made of a catalytic triad usually composed of three partners: a nucleophile, a base and an acid <sup>173, 174</sup>. For a thiol protease, the nucleophile will be a cysteine residue while the base and acid residue might vary. Among the different examples of triad found for proteases, the Ser-His-Asp and the Cys-His-Asp combination are common. Since the 3-MPA-HHHDD-OH is entirely made of amino acid that can be found in the catalytic triad, this monolayer might display affinity for the active site of a thiol protease. This pentapeptide could interact with the catalytic triad of the thiol protease. 3-MPA-LHDLHD-OH did not seem to promote the adsorption of kininogen 2. The presence of an hydrophobic amino acid with His and Asp, or the different configuration of the two peptide monolayers may explain the lower affinity of kininogen 2 to 3-MPA-LHDLHD-OH. Thus the combination of SPR and MS can further elucidate the proteins non-specifically adsorbing on surfaces and provide information about the nonspecific adsorption process.

### 2.4.3 Orientation of BSA on surfaces

Proteolysis will occur only at certain sites of the protein that are accessible to the enzyme. This selective cleavage is especially the case when proteolysis is carried out for proteins adsorbed on the SPR sensor, where steric hindrance is more important than in solution due to the presence of the surface. MS spectra obtained for digestion of BSA showed differences in intensity for digestion carried in solution and on the SPR sensor (**Figure 2.3**). For example, a 300% increase in peak area from digestion on a surface compared to digestion in solution was observed for the peptide at 1568 Da (inset **Figure 2.3**). According to the protein structure generated by Protein Homology/analogy Recognition Engine V 2.0 (PHYRE2), this peptide is located on the outer portion of the protein and should be readily accessible for digestion in solution. After adsorption of BSA on 16-MHA, the cleavage sites located on the side of BSA exposed to the solution could be more accessible for proteolysis rather than facing the surface. A small but not negligible change of conformation of BSA could also possibly explain the increased signal observed for the peptide after absorption of the protein on 16-MHA <sup>175</sup>.



**Figure 2.3** MALDI mass spectra for BSA after trypsin digestion in solution (A) and after its adsorption on a monolayer of 16-MHA (B) with insets displaying the peptide at m/z 1568. Note: The peak at m/z 2211 was identified as an autolysis product of trypsin

The ternary structure of BSA is divided into three different domains. The intensities of the tryptic peptides varied from the different domains, but also for single peptides within a domain (**Table 2.2**). The peptides generated in solution from domains 2 and 3 were highly represented. They account for respectively 61% and 32% of the total MS peak area for domain 2 and 3 compared to only 6% for domain 1. When the digestion was performed for BSA adsorbed on a surface, the fraction of the total MS peak area for each domain obtained was different with 8%, 79% and 12% respectively for domain 1, 2 and 3. The reduction of the relative intensity observed for domain 3 can possibly come from the adsorption of BSA with this domain predominantly facing the surface. The increase in intensity of domain 2 could be explained by the orientation of this domain towards the solution. Thus, the orientation of the protein adsorbed on a monolayer can be roughly estimated by comparing the relative intensity of the peptides produced enzymatically in solution and for a protein immobilized on a surface.

**Table 2.2** Changes in the MALDI MS peak areas of tryptic peptides for BSA digested in solution and on the SPR sensor

$[M+H]^+$ (Da)	Amino acid sequence	Domain	Variation (% Peak Area) <sup>a</sup>
* 1050.4925	564-573	3	
1163.6307	42-51	1	381
* 1249.6212	11-20	1	-20
* 1283.7106	337-347	2	
1305.7161	378-388	2	24
* 1347.7123	174-185	1	
1439.8118	336-347	2	-32
1479.7954	397-409	2 + 3	23
1511.8428	414-427	3	181
1567.7427	323-335	2	291
1639.9377	413-427	3	-33
* 1667.8131	445-458	3	
* 1824.206	484-499	3	
2045.0280	144-159	1	162

<sup>a</sup> The variation represents the change in peak area from digestion performed in solution and on the surface of the SPR sensor.

\* These MS peaks were not sequenced by MS/MS, but correspond to known BSA tryptic peptides based on the m/z ratio. This was confirmed after *in silico* digestion of the albumin sequence (using the MS-digest tool of Protein prospector).

The integration of SPR sensing and MS experiments on a single substrate have several potential applications. The field of nonspecific adsorption is currently maturing with the discovery of several surface chemistries competent to reduce nonspecific binding and perform bioanalysis directly in crude biofluids. Identifying the molecules still nonspecifically adsorbing to biosensors' surfaces will be important to further reduce nonspecific adsorption. It is hypothesized that mixed monolayers with different nonspecific adsorption profiles may further reduce overall nonspecific adsorption of biofluids. The quantitative nature of SPR sensing can be combined with the high quality data of MS to provide quantitative information to MS data. For example, imaging MS has

gained significant attention for providing high quality information about the localization of molecules in tissue sections<sup>176</sup>. However, quantitation has proven difficult and the combination of imaging SPR with imaging MS may solve this challenge. We are currently applying these techniques to selectively transfer the proteome contained with thin tissue sections to imaging SPR chips for quantitation and detecting the different molecules adsorbed to the surface (data not shown). Identifying the proper surface chemistries and understanding the nonspecific adsorption profiles in biofluids will be key in succeeding with the combination of imaging MS and imaging SPR for the qualitative and quantitative analysis of tissue sections.

## 2.5 Conclusions

Combining SPR and MALDI-MS provides a powerful tool to analyze nonspecific adsorption of proteins on surfaces. The combination of SPR and MS made possible the quantification of nonspecifically adsorbed proteins on a surface with SPR and the identification of these with MALDI-MS. This combination of analytical tools has permitted to further improve the understanding of serum nonspecific adsorption. The results reported here reveal the complexity of the nonspecific adsorption process of a variety of proteins (BSA, apolipoprotein A-1, complement C3, SHC-transforming protein 1 and kininogen 2). Also, nonspecific adsorption of serum involves a greater number of proteins than the Vroman cascade suggests. Different proteomes were identified for different SAMs, even revealing that certain monolayers might have some affinity for given proteins. Investigating the affinity of SAMs for proteins could be an interesting axis of research where the monolayer would be used to promote the adsorption of certain proteins while preserving low fouling. Lastly, MS was suited to study the orientation of proteins at the surface. By comparing the relative intensity of BSA peaks from a digestion in solution and on the surface of the SPR sensor, it was revealed that BSA preferentially adsorbs from domain 3, exposing domain 2 to the solution. Therefore, SPR and MS provide complementary information to further understand nonspecific adsorption processes.



## 2.6 Acknowledgements

The authors acknowledge financial support of the National Science and Engineering Research Council (NSERC) of Canada, the Canadian foundation for innovation (CFI), the Fonds québécois de recherche – Nature et technologies (FQR-NT) and the Centre for self-assembled chemical structures (CSACS).

## 2.7 Supplementary information

### 2.7.1 Materials

Ammonium bicarbonate was purchased from Bio Basic inc. (Markham, Ontario). Microscope slide of 22 x 22 mm and 25 x 75 x 1.0 mm, sulfuric acid, 30% hydrogen peroxide, dimethylformamide (DMF), acetonitrile (ACN) and trifluoroacetic acid (TFA) were purchased from Fisher Scientific (Pittsburgh, PA). 16-mercaptohexadecanoic acid (16-MHA),  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid ( $\alpha$ -CHCA), sinapinic acid (SA), bovine serum and acetic acid were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Trypsin Gold (Mass spectrometry grade) was purchased from Promega (Madison, WI). 11-mercaptoundecane(ethylene glycol)<sub>3</sub>-COOH (PEG) was purchased from Prochemia Surfaces (Sopot, Poland). Phosphate buffer saline (PBS) was purchased from Corning cellgro (Manassas, VA).

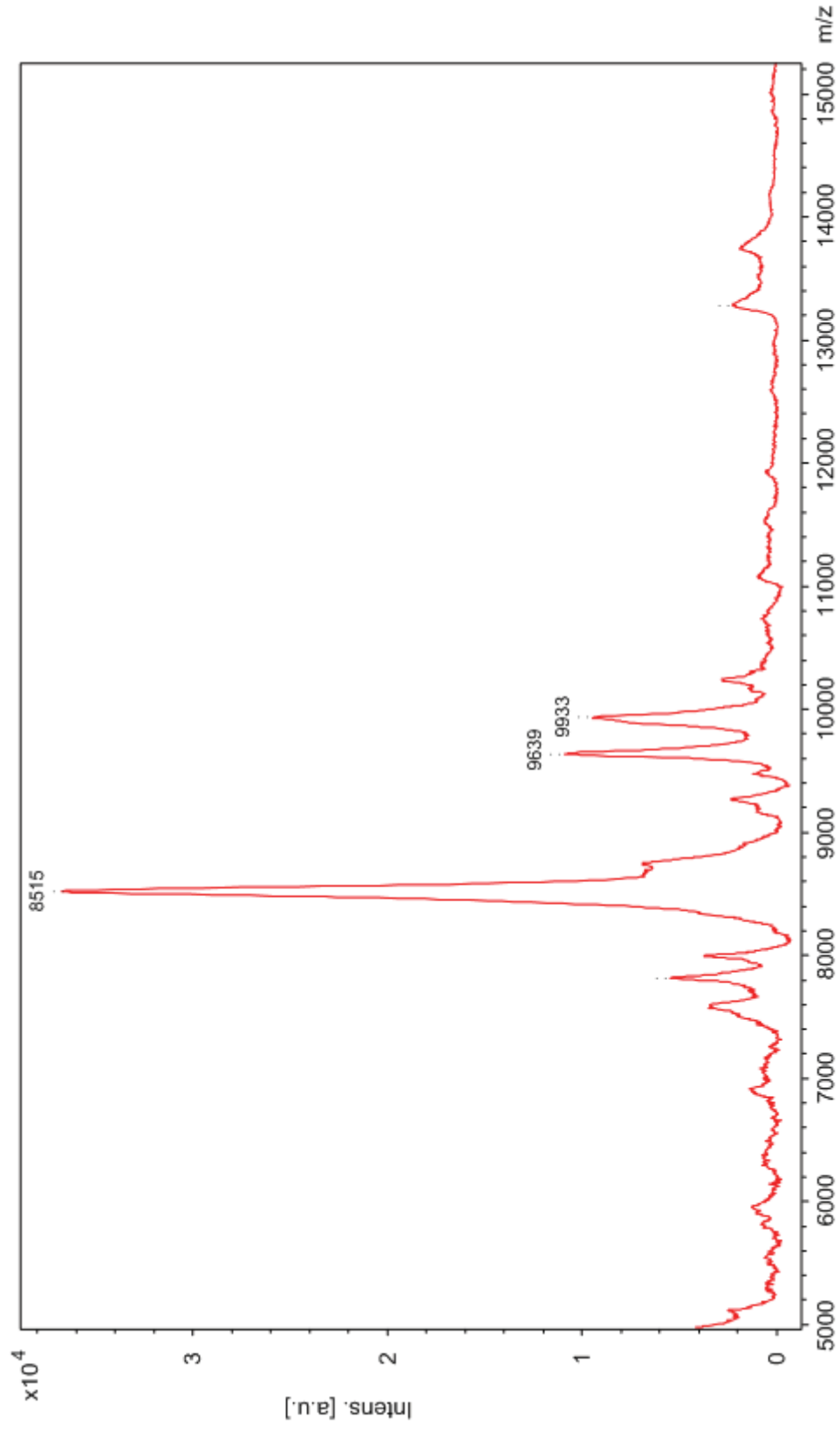
## 2.7.2 Supplementary figures and tables:

**Table 2.3** Mascot scores for peptides observed by MALDI MS on different SAM after trypsin digestion of adsorbed proteins initially contained in crude bovine serum

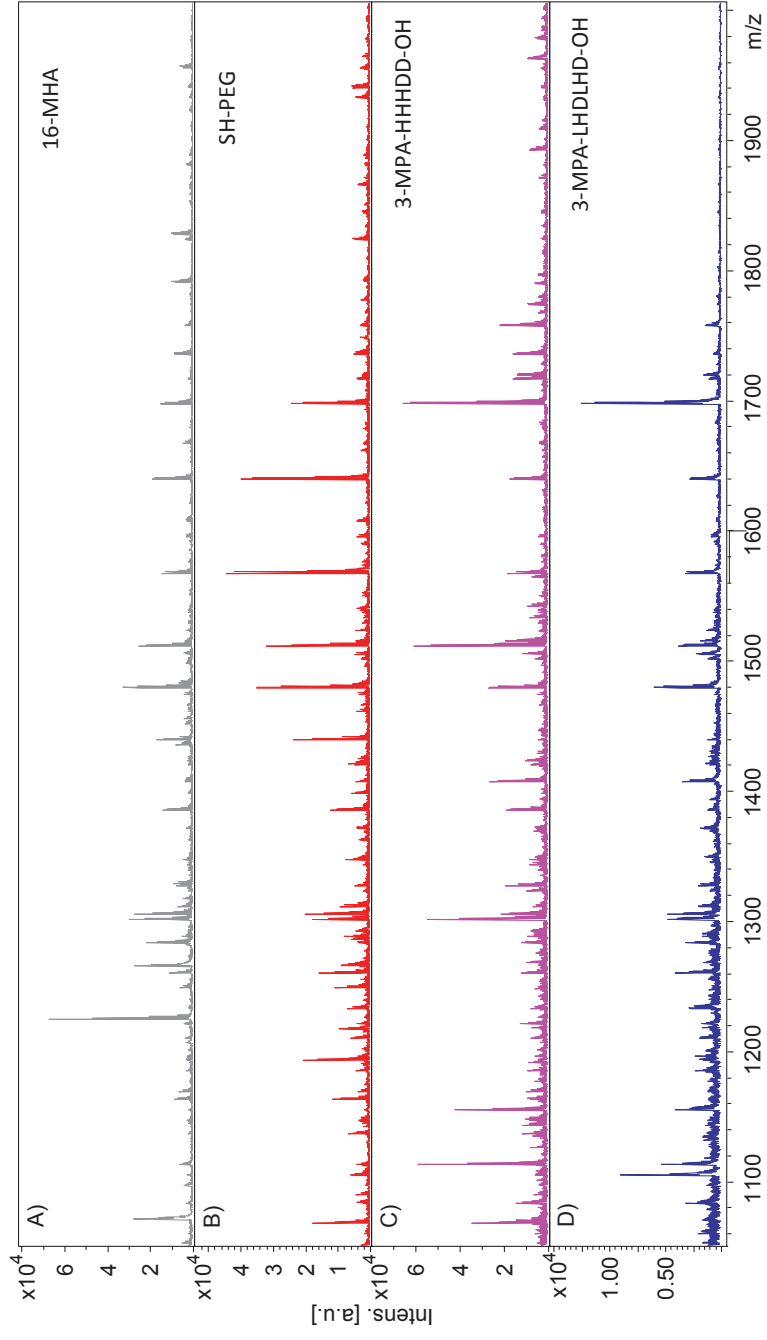
<b>[M+H]<sup>+</sup> (Da)</b>	<b>16-MHA</b>	<b>PEG</b>	<b>3-MPA- HHDD-OH</b>	<b>3-MPA- LHDLHD-OH</b>	<b>Protein</b>
1017.519	41	37	36	30	Apolipoprotein A-1
1163.630	27	42	28		Bovine serum albumin
1221.537	35	31	30		Complement C3
1301.728	29	35	33	40	SHC-transforming protein 1
1305.654	70	44	40	38	Bovine serum albumin
1345.631			24		Kininogen 2
1439.760	58	39			Bovine serum albumin
1479.744	72	36	38	48	Bovine serum albumin
1511.792	44	41	95	45	Bovine serum albumin
1567.700	93	37	44	51	Bovine serum albumin
1639.886	95	47	37		Bovine serum albumin
1791.053	32				Complement C3
2045.373	98				Bovine serum albumin

**Table 2.4.** Peptides observed by MALDI MS after trypsin digestion of proteins non-specifically adsorbed on different SAM.

$[M+H]^+$ (Da)	16-MHA	PEG	3-MPA-HHHDD-OH	3-MPA-LHDLHD-OH	Protein*
845.405				X	Complement C3
864.476			X		Complement C3
927.482	X	X	X	X	Serum albumin
974.450			X		Serum albumin
1026.570	X	X	X	X	Apolipoprotein A-1, SHC-transforming protein 1
1040.608		X			Apolipoprotein A-1
1083.536	X				Serum albumin, Complement C3
1193.582	X	X			Serum albumin
1249.587	X	X			Serum albumin
1260.566	X	X	X	X	Complement C3, Apolipoprotein A-1
1266.604		X			Apolipoprotein A-1
1283.661	X	X	X	X	Serum albumin
1288.591		X			Apolipoprotein A-1
1362.624		X			Serum albumin
1398.644	X	X			Apolipoprotein A-1
1505.731	X	X	X	X	Complement C3, Apolipoprotein A-1
1542.646			X		Kininogen 2
1823.846		X			Serum albumin
1844.828	X				Serum albumin, Complement C3
1865.961	X				Complement C3
1880.997	X				Complement C3
1932.892	X	X			Apolipoprotein A-1
2218.302		X			Apolipoprotein A-1



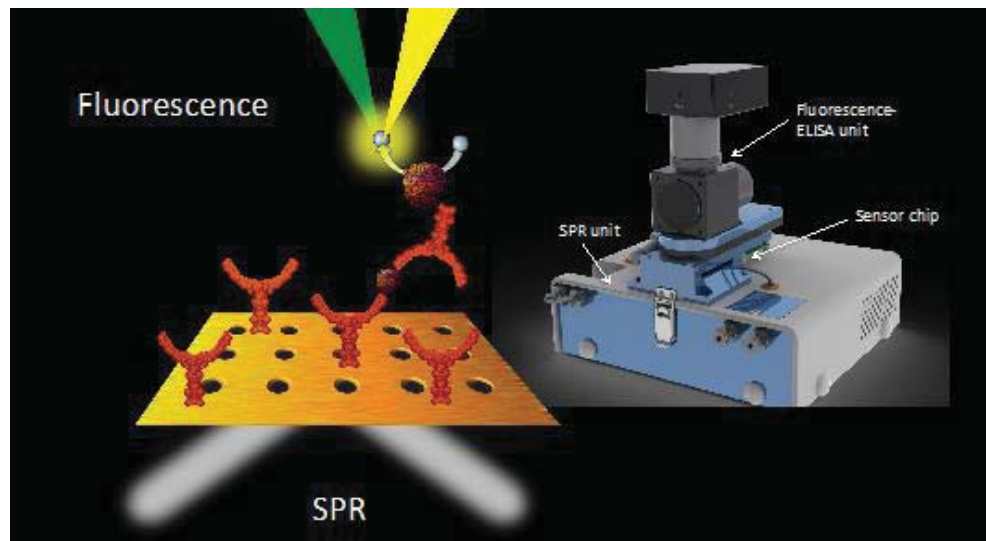
**Figure 2.4** MALDI mass spectra of proteins from whole bovine serum adsorbed on 16-MHA after rinsing the surface with PBS.



**Figure 2.5** MALDI mass spectra of peptides after trypsin digestion of proteins adsorbed on various monolayers after exposure to crude bovine serum.

# Chapitre 3: Single chip SPR and fluorescent ELISA assay of prostate specific antigen

Julien Breault-Turcot, Hugo-Pierre Poirier-Richard, Maxime Couture, Daniel Pelechacz and Jean-Francois Masson, *Lab on a chip*, 2015, 15, 4433-4440



Je fus responsable de l'ensemble des manipulations réalisées en laboratoire à l'exception de la fabrication par photolithographie des échantillons microstructurés. J'ai effectué l'ensemble du traitement de données pour l'article rapporté dans ce chapitre. Jean-Francois Masson et moi-même avons élaboré les protocoles expérimentaux ici présentés en plus de faire la rédaction de l'article. Hugo-Pierre Poirier-Richard et Maxime Couture ont développé la méthode production des échantillons d'or microstructuré en utilisant la photolithographie. Hugo-Pierre Poirier-Richard et Daniel Pelechacz ont développé le module de fluorescence et le système motorisé permettant son déplacement.

### **3.1 Abstract**

A multi-channel system combining fluidics and micropatterned plasmonic materials with wavelength interrogation surface plasmon resonance (SPR) and fluorescence detection was integrated from the combination of a small and motorized fluorescence microscope mounted on a portable 4-channel SPR instrument. The SPR and fluorescent measurements were performed based on the same detection area in a multi-channel fluidic, with a sensing scheme for prostate-specific antigen (PSA) consisting of a sandwich assay with a capture anti-PSA immobilized onto the SPR sensor and a detection anti-PSA modified with horseradish peroxidase (HRP). In this dual-detection instrument, fluorescence was measured from the solution side of the micropatterned gold film, while the interface between the glass prism and the gold film served to interrogate the SPR response. The SPR sensors were comprised of microhole arrays fabricated by photolithography to enhance the instrumental response for PSA detection by approximately a factor of 2 to 3 and they were coated with a self-assembled monolayer of a peptide (3-MPA-HHHDD-OH) to minimize nonspecific adsorption. PSA was successfully detected at clinical concentrations from 10 pM to 50 nM with this integrated system in a single assay lasting 12 minutes, almost centering on the desired range for PSA diagnostic tests ( $> 4$  ng/mL or  $> 150$  pM). The combination of two robust techniques in a single chip and instrument has led to a simple and effective assay that can be carried out on a small and portable instrument providing rapid biodetection of an important cancer biomarker with a dynamic range of nearly 4 orders of magnitude in the clinical range.

### **3.2 Introduction**

ELISA is a common method of surface-based detection for a variety of analytes and is currently the workhorse of clinical laboratories. In an ELISA test, the analyte is captured on a surface modified with a bioreceptor and detection occurs through the use of secondary antibodies modified with an enzyme that reacts with a colorimetric or fluorescent molecule. While ELISA assays are robust, they suffer from long incubation times and several steps that lengthen the detection process. Surface plasmon resonance (SPR) sensing is an optical technique

sensitive to biomolecules<sup>44</sup> and detection with SPR technologies can be achieved with specific receptors such as aptamers<sup>61, 62</sup>, antibodies<sup>59</sup> or antibody fragments<sup>177</sup>. The principles of SPR sensing are analogous to ELISA, where the bioreceptor is immobilized on the surface of the SPR sensor and the analyte captured. Unlike ELISA, SPR sensing is a label free technique providing real-time measurements of biomolecular interactions. Thus, SPR directly detects the binding event of an analyte on the sensor and does not require the conversion of the colorimetric or fluorescent reagent to quantify biomolecules. SPR sensing is also amenable to miniaturization of the instrumentation and rapid analysis. SPR sensing has been extensively used for characterization and quantification of a variety of proteins with limits of detection in the low nanomolar to picomolar range<sup>66, 178-180</sup>.

The advances in microfluidic technologies led to the engineering of smaller devices providing faster response for point-of-care applications. ELISA assays were thus developed on lab-on-a-chip platforms for a variety of applications in the medical field<sup>181-188</sup>. Portable systems build from more accessible instrumental components and detector like a smartphone were even adapted to an ELISA assay monitoring antibodies associated to different medical conditions<sup>189</sup>. In addition to the classical optical detection using fluorescence or UV-Vis, it is possible to integrate sensors in the microfluidic platform, such as electrochemical detection<sup>190</sup>, surface enhanced Raman scattering<sup>191</sup> or surface plasmon resonance<sup>192</sup>. The integration of multiple detection modalities can provide a built-in positive control for monitoring a disease marker if the techniques are not susceptible to the same interferences. For example, SPR sensing is especially susceptible to nonspecific binding of background molecules to the sensor while fluorescence-ELISA is generally insensitive to the binding of interferents to the sensor, as the response is revealed with the specific interaction of the secondary antibody with the analyte and the enzymatic response of the secondary antibody. ELISA requires low background fluorescence and is susceptible to optical interferences from absorbing species. In SPR sensing, the light beam indirectly interacts with the sample and is relatively insensitive to optical interferences. The combination of techniques such as SPR and fluorescence ELISA in a single platform could provide a confirmatory measurement.

In many medical applications, the level of biomarkers can vary by several orders of magnitude in clinical samples. However, the linear dynamic range of ELISA and affinity sensors



such as SPR is limited to around 2 orders of magnitude due to the thermodynamics of the Langmuir isotherm. Several strategies have been employed to extend the dynamic range of biosensors, including the modification of bioreceptors<sup>193-196</sup>, the combination of several bioreceptors with different affinities on a single biosensor<sup>197-199</sup>, enhancing the response obtained in the low concentration region of the Langmuir isotherm<sup>200</sup> and the use of a nanoplasmonic electrical field-enhanced sensor as the biosensing template<sup>201</sup>. The integration of multiple detection modalities in a single microfluidic platform can also provide the advantage of extended dynamic range if techniques have different but overlapping dynamic ranges, which is the case for SPR sensing and ELISA.

Several studies have compared the performance of SPR and ELISA<sup>202-209</sup>. SPR sensing was shown to be collinear with ELISA for the detection of anti-asparaginase<sup>202</sup>. In some cases, the sensitivity of SPR was similar to ELISA, such as for CD166/ALCAM<sup>208</sup> and for toxins<sup>203</sup>. In other cases, ELISA was more sensitive than SPR, which was demonstrated for albumin<sup>209</sup>, human hepatitis B virus (HBV)<sup>204</sup> and for ricin<sup>206</sup>. The amplification of an SPR response with secondary antibodies increased the sensitivity of the SPR sensor and thus, narrowed the gap in sensitivity between ELISA and SPR sensing in other applications<sup>204</sup>. All these previous reports were based on dedicated SPR and ELISA instruments, and they have to the best of our knowledge never been combined in a single platform. Regardless, these comparative studies revealed that SPR and ELISA have different but nearly overlapping dynamic ranges, which may be suited to increase the overall dynamic range of an assay if SPR and ELISA are combined in a single instrument.

The concept of SPR-ELISA is demonstrated here for the detection of prostate specific antigen (PSA), a common cancer biomarker. This model protein is one of several biomarkers indicative of the presence or the stage of certain diseases such as myocardial infarction<sup>81</sup>, congestive heart failure<sup>82</sup> or cancers<sup>79,210</sup>. PSA is secreted in the blood of patients with a healthy prostate at concentrations of around 0.01 to 0.1 nM for 50 years old men<sup>51</sup>. A concentration of PSA in blood above 0.15 nM (4 ng/mL) is considered high and is the common threshold to screen for prostate cancer. Prostate cancer is among the most prevalent cancers in western countries, especially in men over 50 years old. However, the number of deaths by prostate cancer has slowly started to decrease in Canada since the 90's with the advent of extensive screening

of men at risk and the screening of PSA levels in blood. Those two aspects have played a major role in the early diagnosis of prostate cancer and the increased survival rate. Screening of prostate cancer is generally performed by ELISA tests for PSA. These tests are still carried out in centralized laboratories and the turnaround time remains an important challenge in PSA screening. The detection of PSA in buffer solutions has been reported using SPR detection<sup>211</sup> and a sandwich assay<sup>212</sup> achieving detection limits of ng/mL for this biomarker. However, this analysis was performed on large and costly laboratory instruments. To address the challenges associated with ELISA in PSA testing, we report here on the use of a small and portable dual-detection system to perform PSA detection using both SPR and ELISA coupled with fluorescence detection.

### 3.3 Experimental details

The source of the materials and chemicals used is provided as supporting information. BK7 glass wafers of 4 inches in diameter and dove glass prism of 20 x 12 x 2.5 mm were all cleaned with warm piranha solution (sulphuric acid + hydrogen peroxide – 3 : 1 at approx. 80°C – *Caution! Piranha solution is highly corrosive*) for 20 and 90 minutes, respectively. All glass substrates were washed vigorously with deionised water to remove any traces of piranha solution and dried with a stream of nitrogen. Glass prisms were covered with a smooth and continuous gold film by directly sputtering 0.5 nm chromium and 45 nm gold (Cressington 308R sputter coater, Ted Pella Inc. Redding, CA). An argon pressure of 0.02 mbar and a current set at 80 mA were used during sputtering.

The microhole array substrates were fabricated with standard photolithography techniques. Cleaned BK7 glass 4" wafers were primed with HDMS for 90 seconds at 120°C (310TA oven, Yield Engineering Systems, Livermore, CA). Resins (LOR1A and OIR 674-11) were spin coated onto the primed-wafers according to the manufacturer's directives. The resins were exposed with a dose of 73.8 mW through a disk-patterned mask (Photomask portal, Richardson TX) using a MA6 mask aligner from SUSS MicroTec (Sunnyvale, CA). A post-exposure bake was then performed at 90°C for 90 seconds. The resins were then developed for

90 seconds in AZ726 MIF. Subsequently, 1 nm of chromium and 65 nm of gold were deposited on the wafers with ebeam lithography. Lift off of the photoresin mask was carried out in Remover PG in a sonic bath for 10 minutes. To fit on the dove prisms, the substrates were then cut into 11 X 17 mm chips with a 7100 Provectus dicing saw (Advanced Dicing Technology, Horsham, PA). Scanning electron microscopy (SEM, Jeol, Peabody, MA) and atomic force microscopy (AFM, Witec, Ulm, Germany) were used to validate the thickness of the metallic layer.

### 3.3.1 Microfluidic fabrication

The PDMS fluidics were prepared by mixing 184 silicone elastomere base and 184 silicone elastomere curing with a 10:1 ratio. This mixture was used to fill completely the mould specifically designed for the SPR instrument. The silicone mixture was kept still for a period of 10 minutes at room temperature so bubbles could be removed from the mixture. The bubble-free moulds filled with silicone were then heated at 80°C for an hour. They were cooled to room temperature before the removal of the PDMS fluidic. The custom PDMS microfluidic generated was used to deliver the samples in the SPR/fluorescence instrument.

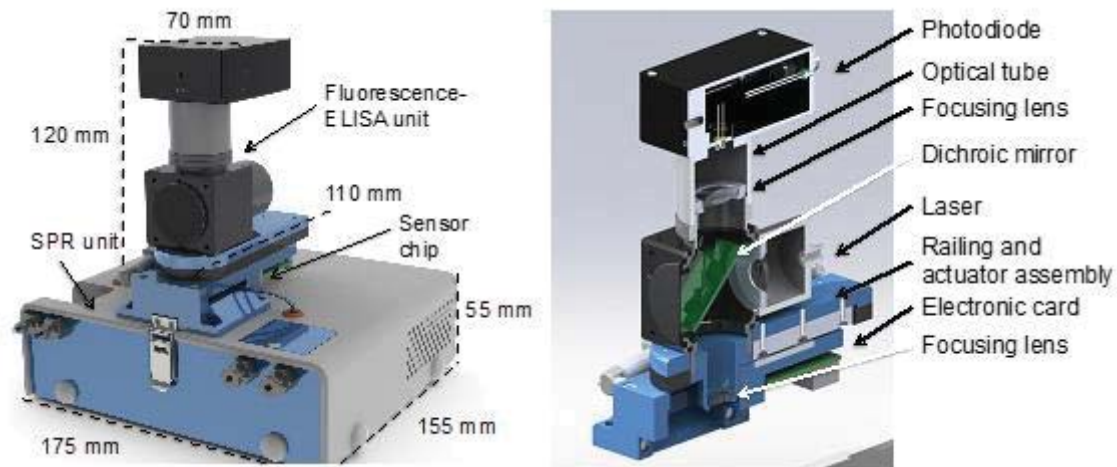
### 3.3.2 SPR-fluorescence instrumentation

The portable 4-channel SPR device used for biosensing has been previously described in the literature <sup>12</sup>. Herein, three channels were used as sensing channels, while the fourth channel served as a reference channel. Two types of SPR sensors were used in this study. The dove prisms were coated with a continuous gold film for a series of experiments. Microhole arrays were also mounted on a clean 20 x 12 x 3 mm glass dove prism with an RI-matching fluid. For both plasmonic materials, the custom made PDMS microfluidic was used to deliver the samples to the SPR sensor <sup>12</sup>. The fluidic was maintained in place with an aluminum arm latched to the main body of the instrument.

The fluorescence measurements were performed with a specifically designed fluorescence add-on fitted to the portable SPR device (**Figure 3.1**) †.

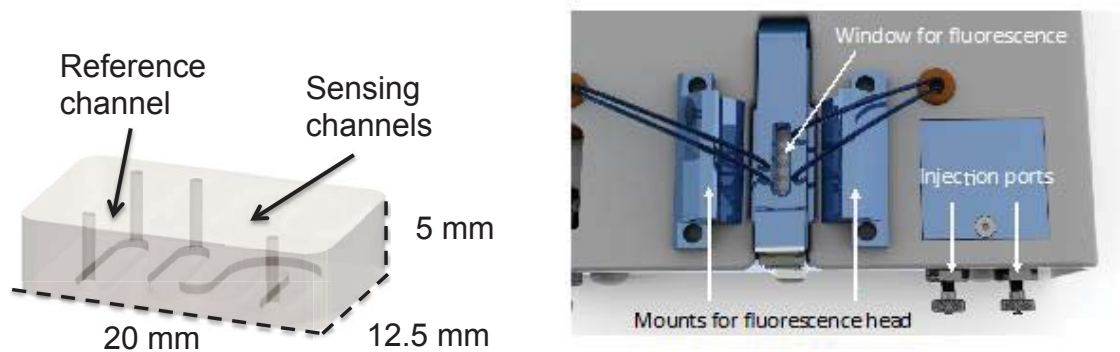
---

† Voir Annexe 2 pour les détails de l'optimisation du positionnement du module de fluorescence



**Figure 3.1.** (Left panel) Representation of the SPR-fluorescence-ELISA instrument. The sensor chip (not seen) was mounted at the interface between both units. (Right panel) Design of the fluorescence-ELISA unit for the SPR instrument. Standard components of an epifluorescence microscope were included in the unit (laser entry, lenses, optical tube, dichroic mirror, and a photodiode), in addition to the railing and actuator system for moving the fluorescence unit from channel to channel.

A window was carved in the aluminum arm maintaining the fluidics in place (**Figure 3.2**). The excitation source was a laser diode at 532 nm (OZ-2000 series, OZ Optics, Ltd., Ottawa, Canada). Fluorescence intensity was measured with an avalanche photodiode (APD130A, Thorlabs inc., Newton, NJ). Excitation and emission was filtered with a 532 nm dichroic beamsplitter and a 532 nm long-pass filter (Semrock, Inc., Rochester, NY). The fluorescence unit was 11 x 12 x 7 cm and latched to the top of the fluidic cell of the portable SPR device (**Figure 3.1**). The excitation and emission light were focused onto the surface of the SPR sensor and to the detector through a set of lenses. The fluorescence measurements were made through the PDMS of the fluidic cell. The fluorescence was read sequentially for each channel, which was then corrected with a reference measurement of fluorescence for a location outside of the fluidic channels. The signal was then additionally corrected with a background fluorescence measurement from PBS for all sensing channels. The fluorescence data reported were acquired from 3 scans of 10 data points/scan. The exposition time per data point was 0.1 s for Ampliflu™ Red.



**Figure 3.2.** (Left panel) Schematic representation of the fluidic cell. The SPR sensor is located below the fluidic cell and the fluorescence unit was located above the fluidic cell. (Right panel) The modifications to the SPR instrument required carving an optical window in the latch arm and adding the mounts for the fluorescence head.

### 3.3.3 Biosensor assembly

Monolayers of 3-mercaptopropionic acid-His-His-His-Asp-Asp-COOH (3-MPA-HHHDD-OH) were formed overnight on the gold surface of the SPR sensors with 1 mM solutions in dimethylformamide (DMF). The surface of the sensors were abundantly rinsed with ethanol to remove unbound molecules and dried with a stream of nitrogen. Specific biosensors for human PSA were constructed by using a protocol previously described elsewhere<sup>213</sup>. In brief, the monolayer was activated with ethyl-(dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) and N-hydroxysuccinimide (NHS) coupling chemistry. Antibody solutions were prepared in phosphate buffer saline (PBS) at 75  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and incubated with the activated monolayer for covalent binding to the SPR sensor. PBS was then injected to remove all unbound antibodies. The unreacted NHS esters on the sensor surface were deactivated with a solution of 1 M ethanolamine hydrochloride adjusted to pH 8.5. PBS was injected once again to remove any remaining ethanolamine. The SPR biosensor was completed at this step and ready for detection of the target of interest.

PSA solutions were prepared in PBS 1x buffer at concentrations ranging from 0.1 pM to 1  $\mu\text{M}$ . Biosensing of PSA was performed over 10 minutes in PBS with static flow incubation

conditions. PSA was pre-incubated with a secondary antibody prior to injection into the SPR system. Mixing PSA with the anti-PSA in a total volume smaller than 20  $\mu\text{L}$  for 10 minutes at room temperature formed a PSA/anti-PSA complex to increase sensitivity in SPR sensing. In the final step, dilution to a volume of 500 $\mu\text{L}$  was carried out using buffer.

### 3.3.4 PSA sensing with an SPR-ELISA assay

Anti-PSA modified with horseradish peroxidase (HRP) was used for the fluorescent-ELISA assay. The ELISA assay was performed on the SPR sensor and detected in the SPR instrument using the fluorescence unit. In this fluorescent-ELISA assay, Ampliflu™ Red peroxidase was incubated with an HRP-modified antibody to exhibit fluorescence with an excitation at a 532 nm. Anti-PSA labeled with HRP was pre-incubated with PSA for 10 minutes at room temperature using a molar ratio of 1:3 (PSA : anti-PSA). Thus, after the capture of PSA complex with anti-PSA labeled with HRP on the SPR sensor, the SPR sensor was incubated with 100  $\mu\text{M}$  Ampliflu™ Red solution prepared in PBS containing 20 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ . This assay led to fluorescence detection in the bulk solution due to the accumulation of the reaction product of HRP conversion of Ampliflu™ Red contained in the SPR fluidics. Fluorescence was measured at intervals of 30, 90, 150, 300 and 600 s. The background signal in PBS was subtracted from the fluorescence.

## 3.4 Results and discussion

### 3.4.1 SPR-fluorescence instrument

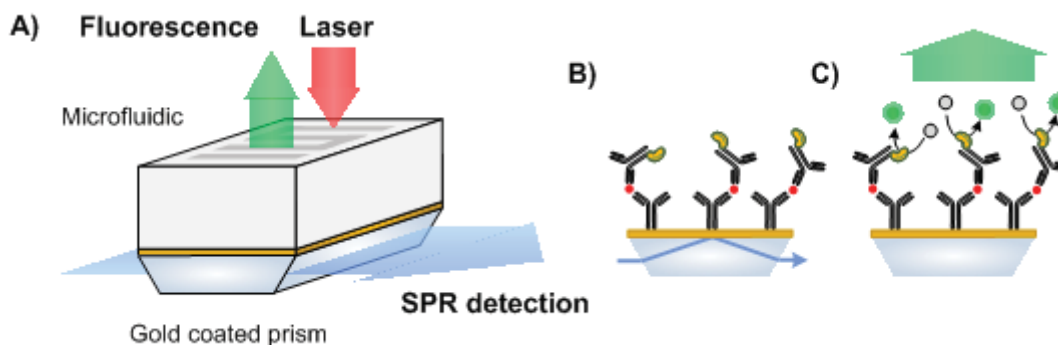
The design of the SPR-fluorescence system was based on a 4-channel SPR instrument, which has been previously reported for monitoring methotrexate<sup>12</sup> and for monitoring a small therapeutic peptide directly in whole blood with a microdialysis chamber<sup>214</sup>. It was here modified to include fluorescence detection (see **Figure 3.8**). The SPR instrument is powered by two USB cables from a laptop computer, has a small footprint and weight (1.8 kg), and has three sensing channels and a reference channel.

Several modifications to the SPR instrument were necessary to host the fluorescence unit. First, a window was carved into the aluminum arm that latches the fluidic cell in place (**Figure 3.2**). This window was aligned with the 4 channels of the SPR instrument to allow the upright fluorescence microscope to be mounted on the system. The fluorescence unit consisted of a laser entry port with a collimating lens directed to a long-pass dichroic beamsplitter matching the 532 nm laser excitation (**Figure 3.1** and **3.8**). The laser was focused on a sensing channel using a lens. The emitted light was transmitted through the beamsplitter and a long-pass 532 nm filter, and was focused on an avalanche photodiode using another lens. The fluorescence unit was designed to analyze a single channel, thus it was mounted on railings and motorized with a linear actuator to scan all 4 channels successively (**Figure 3.1**). The software was modified to include real-time fluorescence measurement in addition to the SPR sensorgrams (**Figure 3.9**). A wavelength of 532 nm was selected for the current experiments due to the prevalence of fluorescence markers excited with this laser. However, the SPR-fluorescence instrument is not limited to this wavelength and other lasers, dichroic beamsplitters and filters can be used on the system according to the requirements of the analysis.



### 3.4.2 Microfluidics

Since both SPR and fluorescence analysis were performed in a single microfluidic device (Figure 3.3), the microfluidic cell used in this system required compatibility with SPR and fluorescence-ELISA.



**Figure 3.3.** A) Concept of the combination of SPR and fluorescence ELISA detection in a single microfluidic for the dual detection of the recognition event and enzymatic conversion. B) Schematic of the SPR biodetection and C) for the fluorescence measurement

Beside providing a sealed environment for liquid handling, the microfluidic required a flat interface with the fluorescence unit to avoid background fluctuations from channel-to-channel, no defect or air bubbles and high transmission of fluorescent emission, which was fulfilled with molded PDMS. The fluidic cell was comprised of a sensing channel with an “S” shape to cover the three active sensors and a straight channel for the reference (Figure 3.2). The volume of the sensing channels of the microfluidic was also of importance. The channels of the fluidic cell must be about 1.5 mm wide to accommodate the SPR light beam. Smaller SPR light beams would lead to poorer signal-to-noise ratio of the SPR signal or longer integration times. The integration time per channel was set at 1 second with the 1 mm SPR beam, which was acceptable for providing detailed kinetic information in SPR. Longer integration times would lead to poorer time resolution of the measurements.

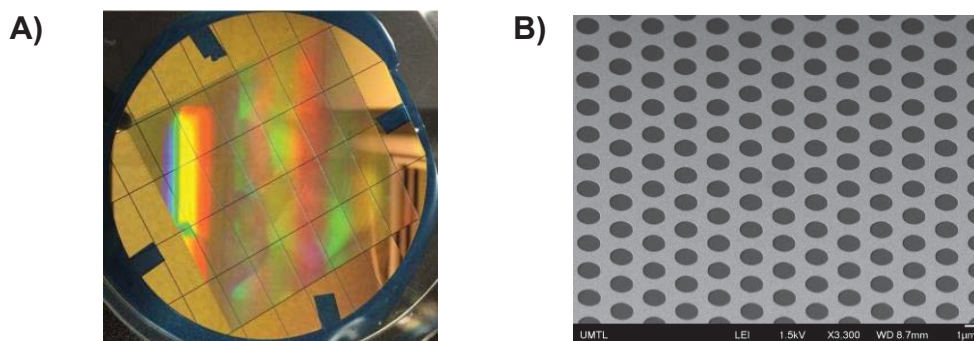
The fluorescence-ELISA was based on a peroxidase enzyme to generate a fluorescent product. Low microfluidic cell volumes would lead to low fluorescence due to limited the amount of available substrate that can be converted into its associated fluorophore. Large



volumes would dilute the fluorescence of the product as the number of antibodies was set by the area of the SPR sensor and lead to poorer sensitivity or longer detection times. Thus, the fluidic channels were 800  $\mu\text{m}$  deep for a total volume of 15  $\mu\text{L}$  per channel. This microfluidic cell provided low background fluorescence and adequate fluidic handling for the SPR and fluorescence-ELISA experiments.

### 3.4.3 Microhole arrays

Many nano or microstructured plasmonic materials with different physical features have shown high sensitivity to refractive index change<sup>45,215</sup>, which is an important feature improving detection limits in SPR sensing. Thus, highly sensitive microhole arrays with a periodicity of 3.2 microns and a hole diameter of 1.6 to 1.8 micron<sup>216</sup> were integrated to the SPR-fluorescence instrument. The original microhole array work was reported using a fabrication method that involved modified nanosphere lithography (NSL), and while this method of fabrication was suitable for the development of the microhole arrays, the technique has inhomogeneous coverage for microhole arrays on a large area of a few  $\text{cm}^2$ . This was inadequate for the current SPR instrument due to the precise positioning of the sensing channels and the larger area covered by all 4 sensing channels in comparison to our previous SPR design<sup>217</sup>. Thus, the fabrication method of microhole arrays needed to be improved. A photolithographic process on a 4" glass wafer was developed to obtain a plasmonic crystalline structure on an area of nearly 100  $\text{cm}^2$ . The wafer was diced into 24 homogeneous samples of 11 x 17 mm, which were then mounted on the dove prism SPR of 12 x 20 mm using RI-matching fluid. Photolithography led to a material with very few defects over a large surface (**Figure 3.4**).



**Figure 3.4.** A) Photograph of microhole arrays produced by photolithography on a 4'' wafer B) SEM image of the microhole arrays

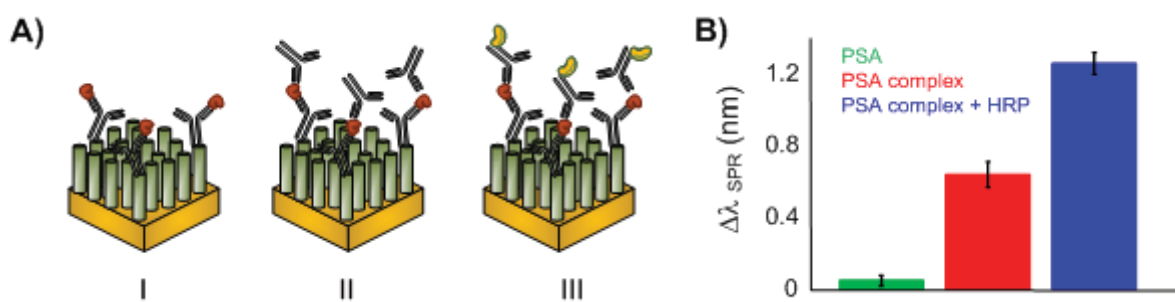
The plasmonic properties of the microhole arrays fabricated by photolithography were assessed with the measurement of a binding event occurring on the SPR sensor and compared with a smooth and continuous Au film SPR sensor. The SPR response obtained for the immobilization of 500 nM anti-PSA on the SPR sensor increased from  $2.22 \pm 0.09$  nm for the Au film to  $5.19 \pm 0.42$  nm for the microhole arrays (**Figure 3.10**). This SPR signal increase is around a factor of 2 to 3 with microhole arrays and is in agreement with a previous report using microhole arrays fabricated with nanosphere lithography<sup>218</sup>.

Another interesting property of microhole arrays concerns the time required for the SPR response to reach equilibrium. All experiments with the SPR instrument were performed with static flow injection and anti-PSA was incubated with the SPR sensor and the binding followed in real-time. The association process of anti-PSA to the SPR surface was therefore diffusion limited. Microhole arrays have a smaller area of gold and thus fewer possible binding sites per unit area of the sensor in comparison to a smooth and continuous gold film. However, the SPR response at equilibrium was not only larger for microhole arrays, but the equilibrium was reached in a shorter time (**Figure 3.10**). The time taken to reach 95% of the overall response was roughly 10 minutes for a continuous gold film and only 1.5 minutes for microhole arrays.

### 3.4.4 Surface plasmon resonance detection of PSA

The SPR instrument with the microhole arrays was validated with a biosensor for PSA, the current clinical biomarker for prostate cancer detection. PSA is a small protein (28 kDa) and

thus detected with lower sensitivity in SPR sensing compared to larger proteins. The change in refractive index induced by the PSA protein binding to the sensor at 10 nM was near the detection limit while still at a relatively large concentration for PSA screening (**Figure 3.5**). Since the maximum level of PSA in serum considered normal for men over 50 years old is 0.15 nM<sup>52, 53</sup>, different configurations of the PSA bioassay with microhole arrays and SPR sensing were tested to meet these requirements. PSA was thus incubated with a secondary antibody to form a complex of larger mass (178 kDa) prior to injection into the SPR system. The increase in mass of the complex led to a larger change in the dielectric constant near the metallic film and thus a significant SPR response was observed (**Figure 3.5**). Detection of the PSA complex was possible using the secondary antibody enhancement at concentrations as low as 0.1 nM in PBS, which is the critical level of PSA for prostate cancer diagnostics †.



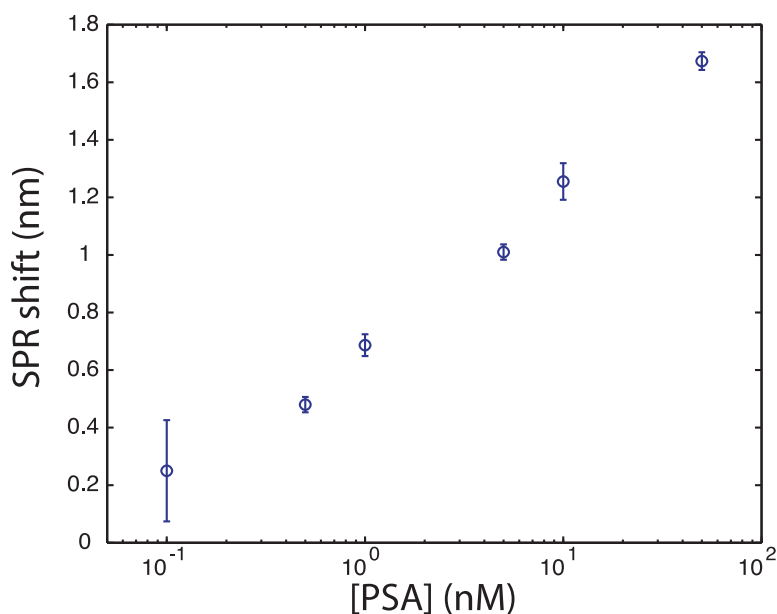
**Figure 3.5** A) Different biosensing schemes for PSA: direct detection (I), secondary detection (II), anti-PSA labeled with HRP (III) B) SPR response for the detection of 10 nM PSA on microhole arrays for each biosensing scheme.

In order to give a detectable fluorescence signal, the PSA complex was further modified. A fluorescence assay was adapted here for PSA detection by modifying the anti-PSA with a horseradish peroxidase (HRP) enzyme for the ELISA assay. The modifications performed on the PSA complex lead to a mass increase (222 kDa with HRP) and thus further amplified the SPR signal obtained for 10 nM PSA (**Figure 3.5**). A clear correlation was

---

† Voir Annexe 3 pour les biodétections de PSA effectués directement dans le sérum non-purifié

observed between the SPR signal and the mass of the PSA complex detected:  $0.05 \pm 0.03$  nm for free PSA (28 kDa),  $0.64 \pm 0.07$  nm with unlabeled anti-PSA (178 kDa) and  $1.26 \pm 0.06$  nm with anti-PSA-HRP (222 kDa). The SPR sensor for PSA was then calibrated with antibodies modified with HRP. The SPR biosensor was able to detect PSA concentrations as low as 0.1 nM using the modified antibody assay (**Figure 3.6**). A negative control was also performed by incubating 10 nM human IgG with anti-PSA. The signal obtained for the negative control ( $-0.22 \pm 0.13$  nm) was negligible in comparison to 0.1 nM PSA ( $0.21 \pm 0.03$  nm).



**Figure 3.6.** Calibration curve for PSA using the SPR assay. The detection was performed with the PSA complex with anti-PSA modified with HRP. Error bars represent one standard deviation for a triplicate measurement.

### 3.4.5 Surface plasmon resonance-ELISA assay

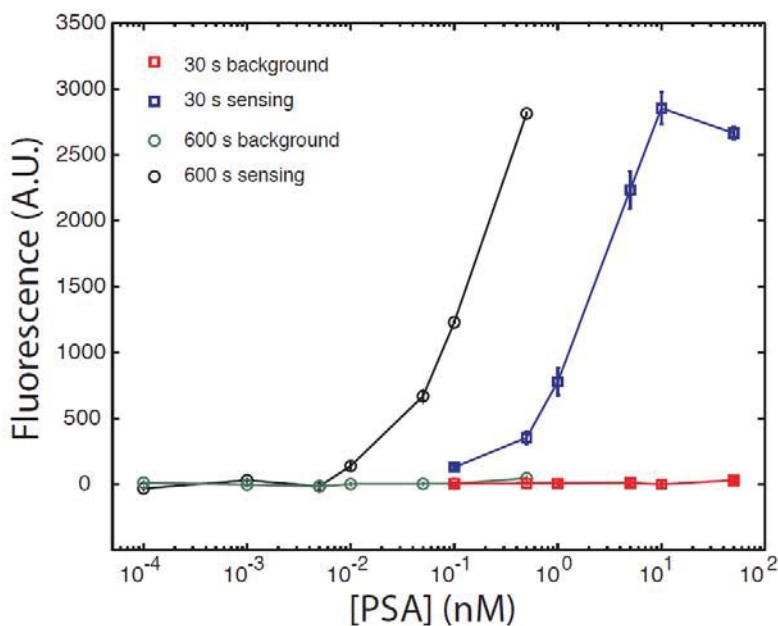
The ELISA assay was run directly on the SPR surface using microhole arrays and a thin Au film as previously outlined for PSA detection. This comparison of fluorescence detection on both surfaces was carried to verify whether the slightly smaller geometrical area of the microhole arrays (70% of the surface area of a thin Au film) had an impact on the fluorescence

response of the ELISA assay for PSA. At a PSA concentration of 10 nM, the fluorescence response was nearly identical for both plasmonic sensor at  $2743 \pm 20$  counts and  $2855 \pm 121$  counts for the continuous gold film and the microhole arrays respectively. Thus, microhole arrays were used for both the SPR and fluorescence ELISA assays.

The optimization of experimental conditions was performed with the capture of 5 nM PSA complex modified with HRP. A solution containing Ampliflu™ Red and hydrogen peroxide was then injected into the SPR fluidic cell and fluorescence was monitored in real-time through the PDMS fluidic using the fluorescence unit mounted on the SPR instrument. Different concentrations of Ampliflu™ Red were injected to optimize the response gained from the ELISA. Fluorescence rapidly increased in the SPR fluidic cell to reach a maximum within approximately 5 minutes (**Figure 3.11**). The ratio between Ampliflu™ Red and hydrogen peroxide (1:200) was always kept constant for this optimization. A slow decrease in signal was observed after an incubation of about 4 and 7.5 minutes for the most concentrated solutions of Ampliflu™ Red at 50 and 100  $\mu\text{M}$ , respectively. This can most likely be explained by self-quenching of fluorescence due to the accumulation of the fluorescent compound in the SPR fluidic cell. Decreasing the concentration of Ampliflu™ Red injected from 100 to 10  $\mu\text{M}$  improved the self-quenching issue, however this resulted in a smaller fluorescent signal in addition to a longer period of time required to reach the maximum observed signal. A 100  $\mu\text{M}$  Ampliflu™ Red solution was thus chosen to obtain a large fluorescence signal over a short period of time.

A short incubation time of 30 seconds was sufficient to detect 0.1 nM PSA in the fluorescence assay using anti-PSA modified with HRP, a detection limit comparable to the SPR assays (**Figure 3.7**). The calibration revealed that the dynamic range was from 0.1 to 5 nM and this was performed using triplicate measurements. No response was measured from the reference channel (Data points in green and red, **Figure 3.7**) where a blank sample, which did not contain the PSA with anti-PSA-HRP complex, was injected. The calibration curve fish-hooked at higher concentrations of PSA and the fluorescence response at 50 nM PSA was smaller than for 10 nM PSA. This decrease in fluorescence was again very likely due to self-quenching of the fluorescent compound. Nevertheless, an underestimation of the amount of PSA in solution could arise if fluorescence was performed alone and so SPR detection could in this

case provide a useful control to the fluorescence data, as SPR is still linear in this concentration range and does not fishhook at high concentrations.



**Figure 3.7.** Calibration of the fluorescence output for PSA detection using the SPR-fluorescent ELISA assay. 100  $\mu$ M of Ampliflu<sup>TM</sup> Red was incubated for 30 s and 600 s with HRP. The response from the sensing channel is shown in blue squares (30 s of reaction time) or black circles (600 s of reaction time) and the reference channel is shown in red squares (30 s of reaction time) or green circles (600 s of reaction time)

The sensitivity of the fluorescence-ELISA assay can be improved with longer incubation times. Thus, the assay was lengthened to 10 minutes instead of 30 seconds. An order of magnitude in sensitivity was gained and detection limits of 10 pM were possible (**Figure 3.7**). Concentrations below 10 pM PSA were not statistically different from the results obtained for the reference channel and the limit of detection was established at 10 pM for the ELISA-based fluorescence assay.

The comparison of SPR and the fluorescence-ELISA for PSA revealed that both assays were sensitive for an overlapping dynamic range for short ELISA incubation times. ELISA was more sensitive if longer incubation times were used. The combination of SPR and fluorescence

had significant advantages. Firstly, the dual detection of PSA with SPR and fluorescence provides an imbedded validation, which increases the confidence of the results for concentrations where SPR and fluorescence are both linear (0.1 to 5 nM). This concentration range coincides with the clinically relevant range for patients suspected of developing prostate cancer (PSA levels above 150 pM). The second advantage concerns the extended dynamic range accessible using the SPR-ELISA assay. Using a single sample, set of reagents and set of experimental parameters, SPR coupled to a fluorescence-ELISA can quantify PSA concentrations ranging from 10 pM to nearly 50 nM. This dynamic range of the combined assay reached nearly 4 orders of magnitude far exceeding the dynamic range of a typical ELISA, which is in the region of 2 orders of magnitude †.

### 3.5 Conclusions

The combination of SPR and fluorescence was achieved using a small and portable instrument proficient in the detection of PSA. Analysis of this prostate cancer biomarker by both SPR and fluorescence was achieved in a single microfluidic at concentration level relevant for diagnostic. SPR sensing provided real time analysis of biomolecule binding events whereas the use of microhole arrays as the plasmonic substrate allowed for the sensitive detection of PSA from 0.1 nM up to 50 nM within 2 minutes using a secondary antibody. The microhole arrays provided a 2-fold increase in SPR response. By introducing an HRP-modified secondary antibody into the assay, fluorescent detection was achieved using the modified SPR-fluorescence setup. This assay was more sensitive than SPR and had a dynamic range starting at 10 pM, which could be extended to 5 nM depending on the analysis time. The dynamic range of both techniques overlapped from 100 pM to 5 nM and so concentrations within this range will have an imbedded control. The dual SPR-fluorescence assay described herein was effective in the detection of PSA contained in a single sample at concentrations relevant for clinical diagnostics (10 pM to 50 nM) with an analysis time of 12 minutes. Thus, the extended range of

---

†Voir Annexe 4 pour l'essai biologique développé à l'aide du réactif Zenon® menant à un complexe de PSA-anti-PSA fluorescent

PSA concentrations accessible to dual SPR-fluorescence detection covers that of healthy patients and the elevated concentrations of patients with prostate cancer. This setup could be extremely useful for the rapid staging of this disease, detecting PSA concentrations down to 0.1 nM.

### **3.6 Acknowledgements**

The authors would like to thank Jean-François Myre of the Université de Montréal for his contributions to the design and fabrication of the SPR-fluorescence-ELISA instrument. The author also acknowledge financial support of the National Science and Engineering Research Council (NSERC) of Canada, the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), the Canadian foundation for innovation (CFI), the Fonds québécois de recherche – Nature et technologies (FQR-NT) and the Centre for Self-Assembled Chemical Structures (CSACS).

### **3.7 Supplementary information**

#### **3.7.1 Materials**

Glass (BK7) wafer of 4” in diameter were purchased from University Wafer. The dove prism were manufactured by Vy Optics (China). Resin LOR1A and remover PG were purchased from MicroChem Corp. (Westborough, MA). Resin OIR 674-11 was purchased from *Fujifilm* Electronic Materials Inc. (North Kingstown, RI). AZ726 MIF developer was purchased from MicroChemicals (Ulm, Germany). Microscope cover slips of 22 x 22 mm, dimethylformamide (DMF), sulfuric acid and 30 % hydrogen peroxide were purchased from Fisher Scientific (Pittsburgh, PA). 16-mercaptohexadecanoic acid (16-MHA), N-hydroxysuccinimide (NHS), ethyl-(dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC), ethanolamine hydrochloride and Ampliflu™ Red were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Phosphate buffer saline (PBS) was purchased from Corning cellgro (Manassas, VA). AffiniPure



goat anti-human IgG (H+L) and human gamma globulin were purchased from *Jackson Immuno Research Labs* (West Grove, PA). Human prostate specific antigen (PSA), unlabeled PSA antibodies (catalog # 10-P20A and 10-P21A) and PSA antibody modified with HRP were purchased from *Fitzgerald Industries International* (Acton, MA). Ethanol was purchased from *Commercial alcohols* (Brampton, ON).

### 3.7.2 Supplementary figures and tables:



**Figure 3.8.** SPR instrument with a fluorescence unit. Left) A photograph of the actual unit in the presence of common laboratory items to highlight the small size of the device. The black fluorescence unit was composed of the filter cube (See the white “x”) and the avalanche photodiode at the top of the fluorescence unit. The linear actuator was mounted on the gray aluminum railing and the fluidic cell of the SPR system was underneath the fluorescence unit. Right) Ray tracing of the excitation laser in green and of the emitted light in yellow. Lenses focused the light on the SPR surface and on the avalanche photodiode. The filter cube was composed of a dichroic beam splitter and a long-pass fluorescence filter.

SPR tabs

Fluorescence tab

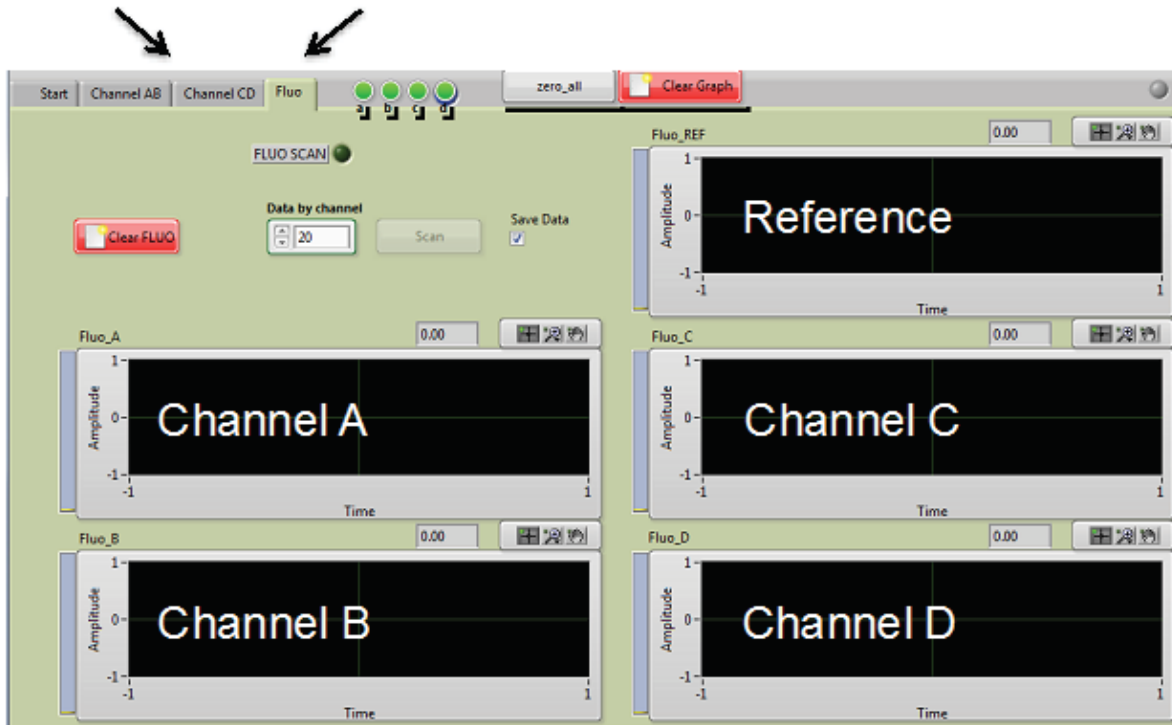
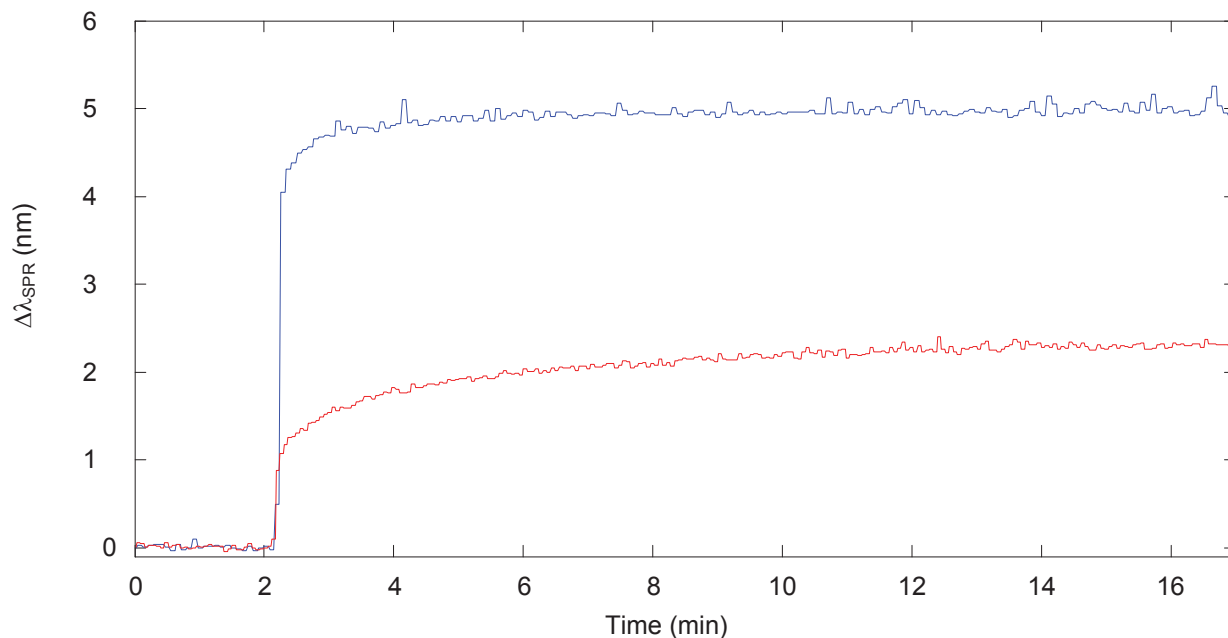
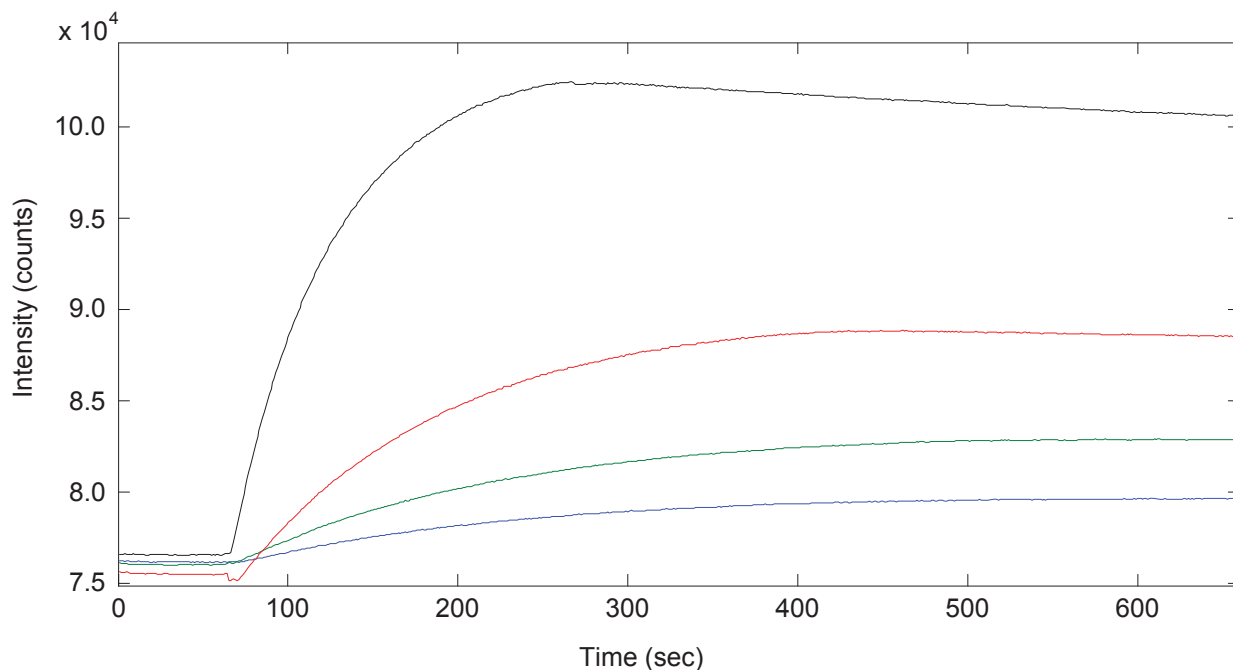


Figure 3.9. Screenshot of the fluorescence tab of the data acquisition software.



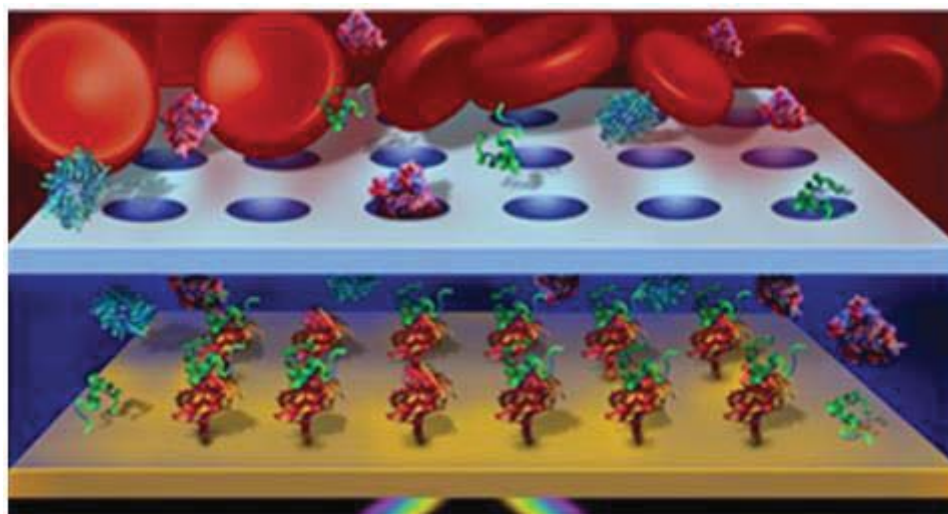
**Figure 3.10.** SPR sensorgrams for the immobilization of 500 nM anti-PSA (capture antibody) on a surface of 3-MPA-HHHDD-OH for a continuous gold film (red) and a microhole array (blue). The SPR response was stabilized in PBS for 2 minutes before incubating anti-PSA with the activated SPR sensor.



**Figure 3.11.** Real time measurements of fluorescence emission with the SPR-fluorescence instrument for Ampliflu™ Red peroxidase substrate at 10 (blue line), 20 (green line), 50 (red line) and 100  $\mu\text{M}$  (black line) on the SPR sensor. A concentration of 5 nM PSA was previously incubated with anti-PSA-HRP and the complex formed was captured with anti-PSA bound to the microhole array SPR sensor. The kinetic curve consists of a blank measurement in PBS from 0 to 60 seconds followed by the incubation with Ampliflu™ Red solution injected at 60 s. The decrease in fluorescence at nearly 260 s for 100  $\mu\text{M}$  (black line) was due to self-quenching of the fluorophore.

## Chapitre 4 : Microdialysis SPR: Diffusion gated sensing in blood

Julien Breault-Turcot and Jean-Francois Masson, *Chemical Science*, 2015, 6, 4247-4254



Je fus responsable de l'ensemble des manipulations réalisées en laboratoire et de l'ensemble du traitement de données pour l'article rapporté dans ce chapitre. Jean-Francois Masson et moi-même avons élaboré les protocoles expérimentaux ici présentés en plus de rédiger l'article. La protéine CD-36, utilisée comme récepteur moléculaire pour le biocapteur, a été fournie par Huy Ong. Les peptides DBG178 et CP-2B(i), servant de cibles pour les tests développés, ont été fournis par William D. Lubell.

## 4.1 Abstract

Chemical measurements are rarely performed in crude blood due to the poor performance of sensors and devices exposed to biofluids. In particular, biosensors have been severely limited for detection in whole blood due to surface fouling from proteins, the interaction of cells with the sensor surface and potential optical interference when considering optical methods of analysis. To solve this problem, a dialysis chamber was introduced to a surface plasmon resonance (SPR) biosensor to create a diffusion gate for large molecules. This dialysis chamber relies on the faster migration of small molecules through a microporous membrane towards a sensor, located at a specified distance from the membrane. Size filtering and diffusion through a microporous membrane restricted the access of blood cells and larger biomolecules to a sensing chamber, while smaller, faster diffusing biomolecules migrated preferentially to the sensor with limited interference from blood and serum. The affinity of a small peptide (DBG178) with anti-atherosclerotic activity and targeting type B scavenger receptor CD36 was successfully monitored at micromolar concentrations in human serum and blood without any pre-treatment of the sample. This concept could be generally applied to a variety of targets for biomolecular interaction monitoring and quantification directly in whole blood, and could find potential applications in biochemical assays, pharmacokinetic drug studies, disease treatment monitoring, implantable plasmonic sensors, and point-of-care diagnostics.

## 4.2 Introduction

Blood remains one of the most important biofluids for gathering information about the health of an individual. The concentrations of proteins, blood cells, metabolites and therapeutic molecules circulating in blood can provide important information about the health of patients, the status of many biological processes and functions, and the progress of therapy. A common example involves the analysis of blood to determine the level of certain biomarkers for use in disease screening<sup>151, 219</sup>. Blood is also a vehicle for disease treatment, and it is important to be able to detect the concentration of circulating

therapeutic drugs, as well as monitoring the fate of these drugs<sup>13</sup>. However, most contemporary techniques fail to analyze molecules directly in whole blood and thus require time consuming and labour intensive sample preparation to avoid interference from the cells and proteins contained in blood. This factor has severely limited the development of several technologies in biomedical sciences such as point-of-care tests and pharmacokinetic studies which utilise biosensors.

The ability to carry out an analysis in blood has many advantages, including the reduced sample preparation needed, which is applicable to point-of-care diagnostics. Additionally, it would provide a more realistic environment for biomolecular interaction assays that would account for the potential molecular reactions (degradation, complexation or metabolism) that occur in a native biological environment. For example, the high concentration of proteins in blood will impact the pharmacokinetics of certain drugs, affecting their efficiency,<sup>13, 14, 220</sup> and this has been reported for insulin, among other therapeutic drugs<sup>221</sup>. Testing in blood would therefore provide a more realistic model to understand biochemical events or interactions occurring within a living organism. Among several other applications, a sensor that could measure biomolecular affinities in whole blood could also provide useful *in vitro* data on the fate of therapeutic targets.

A number of strategies have been proposed to eliminate interference from blood cells and proteins on sensors. The isolation of blood cells from serum (if clotting occurs) or plasma (without clotting) leads to a solution free of large particles. Cells are traditionally separated from blood with sedimentation or diffusion-based techniques. Centrifugation is commonly used and exploits the faster sedimentation rate of cells, however it can be time consuming and costly<sup>222</sup>. Fluidic based systems have also been proposed to analyse blood samples<sup>223</sup> and they have been employed in several applications such as clinical diagnosis, environmental analysis, and ligand screening<sup>224, 225</sup>. Fluidic devices can isolate, capture or filter blood cells based on size dependent particle separation<sup>226, 227</sup>. In addition to interference from cells, biosensors have also been hampered by the nonspecific adsorption of proteins in serum or plasma<sup>5</sup>. Nonspecific

adsorption of proteins can be limited by using depletion columns<sup>85</sup>, protein precipitation<sup>228</sup> or coating the sensor with an ultralow fouling surface<sup>37</sup> composed of polyethylene glycol (PEG)<sup>88</sup>, zwitterionic molecules<sup>229</sup> or peptide monolayers<sup>94</sup>. The combination of fluidic devices sufficient in removing cells with the appropriate surface chemistry could thus enable whole blood sensing.

Additionally, current sensing techniques generally rely on direct contact of the sample with the surface of the sensor. Hence, all molecules interact with the surface at essentially the same time, effectively reducing the ability of the sensor to discriminate between molecules. However, diffusion can be drastically different between small molecules, proteins and cells and this can be exploited by creating a diffusion gate, which can be used to specify the distance the molecules must travel from the sample to the sensor. Fluid contact must be maintained between the sensor and the sample, however, this can be done with a transfer fluid suitable for the biosensor. Meeting these conditions, faster moving molecules would preferentially reach the sensor surface, leaving slower moving molecules in the bulk solution. Implantable electrochemical glucose and gas sensors often rely on the concept of diffusion membranes<sup>230, 231</sup>. This concept could prove highly efficient for the analysis of small molecules, such as metabolites, contaminants, or therapeutic drugs in blood, in the presence of proteins and cells, using a wide variety of surface-based optical sensors.

Fluidic devices relying on dialysis could efficiently integrate sample preparation in biosensing systems. In particular, surface plasmon resonance (SPR) sensing has gained broad acceptance in biomolecular interaction analysis<sup>30</sup>. SPR sensing currently suffer from high background signals from biofluids and therefore, have been limited to the analysis of relatively pure solutions<sup>30</sup>. In dialysis, the concentration gradient between blood (high concentration) and the dialysate (low concentration) forces molecules through a semi-permeable membrane. Dialysis is more efficient for fast diffusing molecules, and thus performs well for small molecules. Strategically placing a microporous membrane at the interface between two fluid chambers in a SPR instrument, one of which is allocated to the blood sample and the other to the sensor would enable



sample pre-treatment *in situ*. The microporous membrane would serve to filter cells and create a diffusion gate to the SPR sensor. Thereby, a concentration gradient would rapidly transfer small molecules from blood to a chamber containing a SPR sensor specific for a target of interest, while retarding slower diffusing molecules. The interference from slow moving, abundant and large proteins in blood could be avoided as they would reach the sensor surface later, and the time delay would be a function of diffusion coefficient, molecular size and distance travelled.

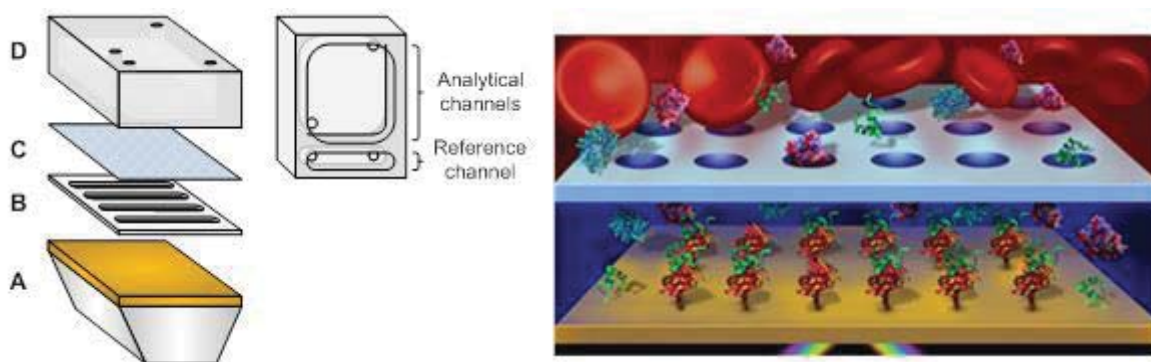
The concept of diffusion membranes has not been successfully implemented to SPR sensors for bioanalysis in blood. In the rare literature examples citing the use of diffusion membranes in SPR, the membrane was either directly deposited on the surface of the SPR sensor for methanol-raffinose analysis<sup>232</sup> or positioned off-line for sample preparation for the analysis of cortisol in saliva<sup>233</sup>. Here we report on such a dialysis-based sensor for use in combination with SPR. As a proof-of-principle experiment, the detection of a small peptide which exhibits anti-atherosclerotic activity is performed directly in whole blood using a CD36 based biosensor, the affinity of which has previously been reported<sup>94</sup>.

## 4.3 Experimental

### 4.3.1 Microdialysis SPR sensor

Materials are provided in the ESI. Custom made PDMS fluidics and spacers (**Figure 4.1**) were prepared by mixing 184 silicone elastomer base and 184 silicone elastomer curing agent in a 10:1 ratio. Spacers of different thicknesses were fabricated between 150  $\mu\text{m}$  and 1.0 mm. Curing of the PDMS components was carried out at 80°C for 1 hour and cooled to room temperature before de-moulding. Dove shaped glass prisms of 12 x 20 x 3 mm were cleaned with piranha solution (sulphuric acid + hydrogen peroxide –3 : 1 at 80°C) for 90 minutes. *Caution, piranha solution is highly corrosive!* The prisms were then vigorously washed with deionised water to remove any traces of acid. Sputtering of 0.5 nm Cr and 45 nm Au was performed (Cressington 308R sputter

coater, Ted Pella Inc. Redding, CA) on the long face of the prisms to create the SPR surface. The small, portable 4-channel SPR device used for analysis has previously been reported<sup>12</sup>. The fluidic was modified according to **Figure 4.1**. Three channels were used as the sensing channels while the single channel served as a reference for instrumental fluctuation. The dialysis fluidic chamber was created by placing the spacer directly on the SPR prism, completely filling the chamber of the spacer with PBS buffer to avoid the presence of air bubbles. Then, the microporous membrane was placed on top of the spacer before latching the fluidic cell in place. The SPR instrument was calibrated with or without the microporous membrane using successive injections of 1 mL of sucrose solutions with different refractive indices ranging from 1.33772 to 1.35589.



**Figure 4.1.** Left) Microfluidic system with a diffusion barrier: A) Gold coated prism, B) PDMS spacer (sensing chamber), C) Microporous membrane and D) PDMS fluidic reservoir (reservoir chamber). Right) Schematic of the dialysis chamber with blood in the reservoir chamber (not to scale).

### 4.3.2 Diffusion measurements

The impact of molecular weight on diffusion was assessed with the dialysis chamber and a SPR sensor modified with a 3-MPA-LHDLHD-OH monolayer to minimize nonspecific adsorption. Diffusion of sucrose, a small molecule, was compared with larger molecules such as poly(acrylic acid) (MW = 2,000 Da), bovine serum albumin (BSA) (MW = 66.4 kDa), hemoglobin (MW = 64.0 kDa), and IgG (MW = 150

kDa). Sucrose and polymer solutions were prepared at 10 mg/mL, while protein solutions were prepared at 1 mg/mL. The solutions were also injected without the microporous membrane in the fluidic. Analysis times of 10 and 90 min were used, respectively, without and with the microporous membrane.

### 4.3.3 Peptide biosensing

The CD36 biosensor was constructed as previously described<sup>94</sup>. In brief, 3-MPA-LHDLHD-OH was self-assembled on the SPR sensor in an overnight procedure, then reacted with *Nα,Nα*-bis(carboxymethyl)-L-lysine (NTA) using EDC/NHS coupling chemistry and subsequently chelated to Cu<sup>2+</sup> to create the sensor competent for binding hexahistidine-tagged CD36. All these surface chemistry modification were performed offline the SPR instrument. The functionalized SPR sensors are stable for at least 6 months and can form a complex with any protein containing a his-tag. The SPR sensors were functionalized with CD36 using the fluidic cell presented in **Figure 4.1** with parameter previously described by Zhao *et al*<sup>12</sup>. Following the functionalization steps, the dialysis chamber was mounted on the SPR sensor. CD36 was expressed as previously reported<sup>94</sup> and immobilized to the SPR surface by chelation with the monolayer. Small peptides (DBG178 and CP-2B(i)) were detected with the CD36 SPR sensor at concentrations in the micromolar range in PBS to evaluate the performance of the dialysis chamber. DBG178 was used as a positive control and CP-2B(i) as a negative control. All peptides were injected for 1.5 hours in the reservoir chamber to ensure equilibrium measurements in the sensing chamber. The experiments were repeated in human serum and whole human blood for DBG178 in the same concentration range.

### 4.3.4 IgG biosensing

A human gamma immunoglobulin (IgG) biosensor was constructed on a 16-mercaptohexadecanoic acid (16-MHA) monolayer as previously described<sup>213</sup>. The sensor was created by activating the 16-MHA monolayer with EDC/NHS and reacted with anti-IgG. The remaining NHS esters on the SPR sensor were deactivated with ethanolamine. IgG was detected at the nanomolar level in PBS with the anti-IgG biosensor and the dialysis chamber. Binding equilibrium was reached after 8 hours.

## 4.4 Results and discussion

### 4.4.1 Characteristics and optimization of the dialysis fluidic chamber

The microfluidic possesses three main components: a spacer, a microporous membrane and a reservoir fluidic chamber (**Figure 4.1**). The microporous membrane created a partition and a diffusion barrier separating the reservoir chamber containing the biofluid from the sensing chamber. The reservoir was significantly larger than the sensing chamber to ensure minimal dilution of the samples between the reservoir and the sensing chamber. Due to their localization within the SPR instrument and their small size, the reservoir and the sensing chambers could not be stirred and mixing relied exclusively upon molecular diffusion inside the pores and in the chambers.

To validate the performance of the SPR instrument with the microdialysis chamber, changes in refractive index were measured with the injection of sucrose solutions into the reservoir chamber while monitoring the SPR response from the sensing chamber. SPR responses were successfully monitored in accordance with the changes in the refractive index of the reservoir using the 1 mm PDMS spacer. In classical experiments, the change in SPR response is almost instantaneous with the change in bulk refractive index. In the current experiments, with the microporous membrane, diffusion must take place through the pores and then from the pores to the sensor surface (1 mm distance). Thus, the initial change in the SPR response was monitored for nearly 2 minutes following the injection of the sucrose solution (**Figure 4.4**), before the SPR response was then a function of the flux of sucrose molecules arriving at the surface until equilibrium was reached.

The SPR response can thus be decomposed into two independent factors: the diffusion time of molecules through the pores and the passive mixing through diffusion in the sensing chamber. Diffusion of molecules through microporous membranes has been extensively studied and reported in the literature<sup>234, 235</sup>.

The Renkin equation predicts the effective diffusion coefficient through a membrane and can be expressed as <sup>236</sup>:

$$D_{\text{eff}}/D_0 = (1 - R_H/R_P)^2 (1 - 2.1R_H/R_P + 2.1R_H/R_P^3 - 0.95R_H/R_P^5) \quad (1)$$

where  $R_H$  is the hydrodynamic radius,  $R_P$  is pore radius,  $D_{\text{eff}}$  is the effective diffusion coefficient and  $D_0$  is the diffusion coefficient in bulk solution. A ratio of  $R_H/R_P$  close to 0 indicates that the molecule is significantly smaller than the pore size, leading to a relatively unhindered diffusion through the pore. This theory also predicts that large molecules, relative to the pore diameter, will have a significantly slower diffusion through the pore.

Sucrose has a significantly smaller hydrodynamic radius (approximately 0.47 nm) than the 200 nm membrane pore radius ( $R_H/R_P$  smaller than 0.025). The Renkin equation predicts that  $D_{\text{eff}}$  for sucrose will correspond to approximately 99% of the diffusion coefficient in bulk solution <sup>235</sup>. While the diffusion coefficient remains essentially constant, the presence of the microporous membrane in the fluidic cell will restrict the equilibration of the concentration on both sides of the chamber. The time required for solutions between the reservoir and the sensing chamber to reach equilibrium can be characterized with the effective time of diffusion through a membrane ( $t_{\text{eff}}$ ) in a system under continuous stirring <sup>235</sup>:

$$c = c_{\text{eq}} (1 - e^{-t/t_{\text{eff}}}) \quad (2)$$

where  $c$  is the concentration in the sensing chamber,  $c_{\text{eq}}$  is the equilibrium concentration,  $t$  is the time and  $t_{\text{eff}}$  is the effective diffusion time.

The effective diffusion coefficient is also related to  $t_{\text{eff}}$  by considering a few characteristics of the microporous membrane:

$$D_{\text{eff}} = A/t_{\text{eff}} \quad (3)$$

where  $A = L/[N_p\pi R_p^2(1/V_1 + 1/V_2)]$ ,  $L$  is the membrane thickness,  $N_p$  is the number of pores, and  $V_1$  and  $V_2$  are the volume of the reservoir and of the sensing chamber, respectively.

By using equation 1 and 3 it was possible to determine the theoretical  $t_{\text{eff}}$  values (**Table 4.1**) for different spacer thicknesses. The calculations were performed with the same specifications as the fluidic cell in the SPR system with the exception that stirring was assumed. Since this was not possible in the current dialysis fluidic the time required to reach equilibrium will be longer than estimated due to passive mixing through diffusion.

**Table 4.1.** Equilibration time for sucrose ( $RH/RP = 0.00235$ ) in the dialysis SPR chamber ( $D_{\text{eff}}/D_0 = 0.990$ ) of different thicknesses, with (theoretical) and without (experimental) stirring.

<b>D (mm)</b>	<b><math>t_{\text{eff}}</math> stirred (theoretical) (s)</b>	<b>Normalized <math>\Delta\lambda_{\text{SPR}}</math></b>	<b><math>t_{\text{eff}}</math> unstirred (experimental) (s)</b>
<b>0.15</b>	18	$74 \pm 7 \%$	5529
<b>0.30</b>	35	$67 \pm 5 \%$	9892
<b>0.60</b>	64	$42 \pm 2 \%$	26590
<b>1.00</b>	96	$39 \pm 2 \%$	55687

The experimental SPR response was correlated to the concentration of sucrose in the sensing chamber, and so by tracking the change in SPR wavelength, the diffusion process in the dialysis chamber was monitored in real-time. Fitting the experimental data with equation 2 led to the estimation of the experimental effective diffusion times. While the theoretical diffusion time was 96 s for chambers under stirring (using a spacer of 1

mm), the experimental effective time was calculated at 15.5 hours. This large difference was a consequence of the passive mixing in the dialysis chamber.

Diffusion times are generally proportional to the square of the distance, thus the spacer thickness was incrementally reduced to 150  $\mu\text{m}$  in order to obtain shorter diffusion times. Reducing the thickness of the spacer also had the advantage of reducing the volume of the sensing chamber, decreasing the dilution factor of the sample. The volume of the reservoir chamber was set at 135  $\mu\text{L}$ , while the total volumes for the sensing chambers were 6.9, 14, 28 and 46  $\mu\text{L}$  for the spacers of 150, 300, 600 and 1000  $\mu\text{m}$ , respectively. As expected, the effective diffusion times decreased with the spacer thickness (**Table 4.1**). The theoretical effective times for sucrose ranged from 18 to 96 s (directly proportional to the spacer thicknesses of 150 to 1000  $\mu\text{m}$ ), while the experimental effective times ranged from 1.5 to 15.5 h. Thus, the absence of mixing resulted in a 300-fold increase in equilibration time of the sensing chamber for the 150  $\mu\text{m}$  spacer, a direct consequence of the diffusion time sucrose required to pass through the membrane and reach the sensing surface. While the influence of the spacer thickness was linear for the theoretical  $t_{\text{eff}}$ , the experimental values followed a second power exponential due to the influence of the passive mixing with diffusion following the Stokes-Einstein equation ( $[x]^2 = 4Dt/\pi$  where  $x$  = distance,  $D$  = diffusion coefficient,  $t$  = time).

The sensing performance of SPR was established with sucrose solutions of different concentrations and the dialysis chamber composed of the microporous membrane and the 150  $\mu\text{m}$  spacer (**Figure 4.5**). The sensitivity decreased when using the fully functional dialysis chamber (1764 nm/RIU) in comparison to analysis in the absence of the microporous membrane (2221 nm/RIU). The equilibrium SPR signal obtained for a sucrose solution of 1.34569 RIU with each spacer thickness was calculated and normalized with the SPR signal obtained without the microporous membrane (**Table 4.1**). The normalized SPR signal decreased from 74% to 39% as the spacer thickness increased from 0.15 to 1 mm. A smaller volume of the sensing chamber decreased the dilution factor of the solution explaining the larger relative signal obtained with thinner

spacers. In addition, a smaller volume of the sensing chamber ( $V_2$ ) led to a smaller value of the A term and  $t_{\text{eff}}$  decreased proportionally to the spacer thickness (Equation 3). The shorter  $t_{\text{eff}}$  were advantageous due to lesser dilution and a greater SPR response with the 150  $\mu\text{m}$  thick spacer, therefore this spacer was used for further analysis.

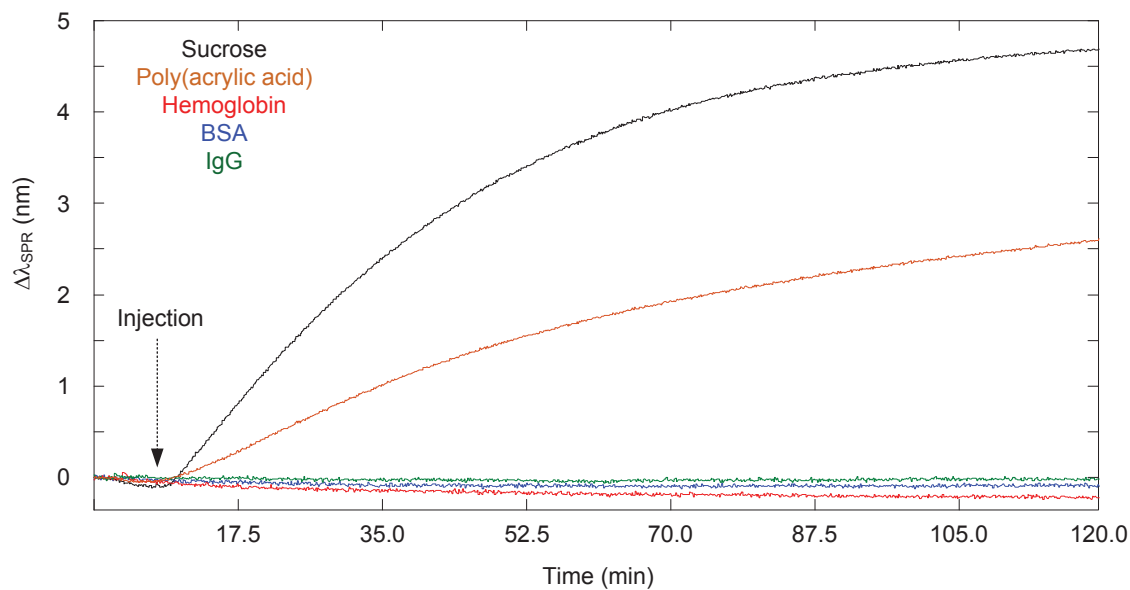
#### 4.4.2 Diffusion of larger biomolecules

The equilibration time of the sensing chamber depended on the diffusion properties and the size of the molecules (**Table 4.2**). Thus, the impact of diffusion coefficient and molecular size on the effective diffusion time in the dialysis chamber was verified with different biomolecules, including sucrose (342 Da;  $R_h = 0.47$  nm), poly(acrylic acid) (2000 Da;  $R_h = 0.96$  nm), hemoglobin (64.0 kDa;  $R_h = 3.1$  nm), BSA (66.4 kDa;  $R_h = 3.5$  nm) and IgG (~150 kDa;  $R_h = 5.4$  nm). Larger, high molecular weight biomolecules such as proteins have a slower diffusion coefficient than small molecules such as sucrose. Larger biomolecules increased the  $R_H/R_P$  ratio leading to greater steric hindrance in the pores and slower effective diffusion coefficients through the pores (Equation 1). The passive mixing through diffusion in the sensing chamber was also slower for larger biomolecules. In consequence, the equilibration time increased for large biomolecules in comparison to small molecules (**Figure 4.2**).

**Table 4.2** Theoretical effective diffusion time for sucrose, PAA, hemoglobin, albumin and IgG through a porous membrane in a system with stirring.

Spacer (mm)	$t_{\text{eff}}$ (s)				
	Sucrose	PAA	Hemoglobin	BSA	IgG
<b>0.15</b>	18	48	130	167	272
<b>0.30</b>	35	92	248	319	519
<b>0.60</b>	64	169	453	584	949
<b>1.00</b>	96	253	678	874	1420





**Figure 4.2.** Diffusion of sucrose (MW = 342 Da), poly(acrylic acid) (MW = 2 kDa), hemoglobin (MW = 64.0 kDa), BSA (MW = 66.4 kDa) and IgG (MW = 150 kDa) through the microporous membrane of 0.4  $\mu\text{m}$  pore size (concentration of 10mg/mL for sucrose and poly(acrylic acid) solution and 1 mg/mL for each protein solution)

The diffusion experiments with large biomolecules clearly demonstrated that the analysis of proteins did not result in an SPR response when using the microporous membrane over the course of the experiment (**Figure 4.2**). Sucrose reached equilibrium, while the poly(acrylic acid) solution resulted in an SPR response that was still increasing after 2 h. The magnitude of the SPR response thus followed the rate of diffusion of molecules ( $D_{\text{proteins}} < D_{\text{short chain polymer}} < D_{\text{small molecules}}$ ). Importantly, the initial rise in the SPR response after injection was delayed by a few minutes due to the diffusion time required by the molecules to travel through the membrane and towards the SPR sensor. In absence of the microporous membrane, every solution led to a significant SPR response at the moment of injection (**Figure 4.6** for IgG). A suppression factor was thus calculated to show the decrease in background protein concentration at the sensor's surface. The suppression percentage for BSA and IgG was greater than 99%, such that

proteins would not interfere throughout the duration of a binding experiment for small molecules within the dialysis chamber.

Although the analysis time is longer than a typical SPR experiment, the dialysis chamber provided a better discrimination between molecules with different size. The effective diffusion times for the molecules investigated were calculated for a theoretical system under stirring and with different spacers thicknesses (**Table 4.2**). Again,  $t_{\text{eff}}$  was shown to increase linearly with increasing spacer thicknesses and ranged from 18 s for sucrose to 272 s for IgG with a 150  $\mu\text{m}$  thick spacer. Considering that SPR experiments typically run for 10 to 20 minutes (600 to 1200 seconds), every molecule, including proteins, would reach equilibrium in that period of time if mixing was performed. The influence of the passive diffusion was clear from these calculations and demonstrated that this method of diffusion is required for the dialysis chamber to work effectively as a diffusion gate. The thickness of the spacer controlled the time and thus, the molecular weight or diffusion constant range of molecules reaching the SPR sensor over the course of an experiment. The 150  $\mu\text{m}$  spacer thus facilitated the design of a biosensing assay for small analytes ( $\sim 1$  kDa) contained in a highly concentrated protein solution such as blood-based fluid<sup>83, 237</sup>.

#### **4.4.3 Biosensing with a dialysis chamber SPR instrument**

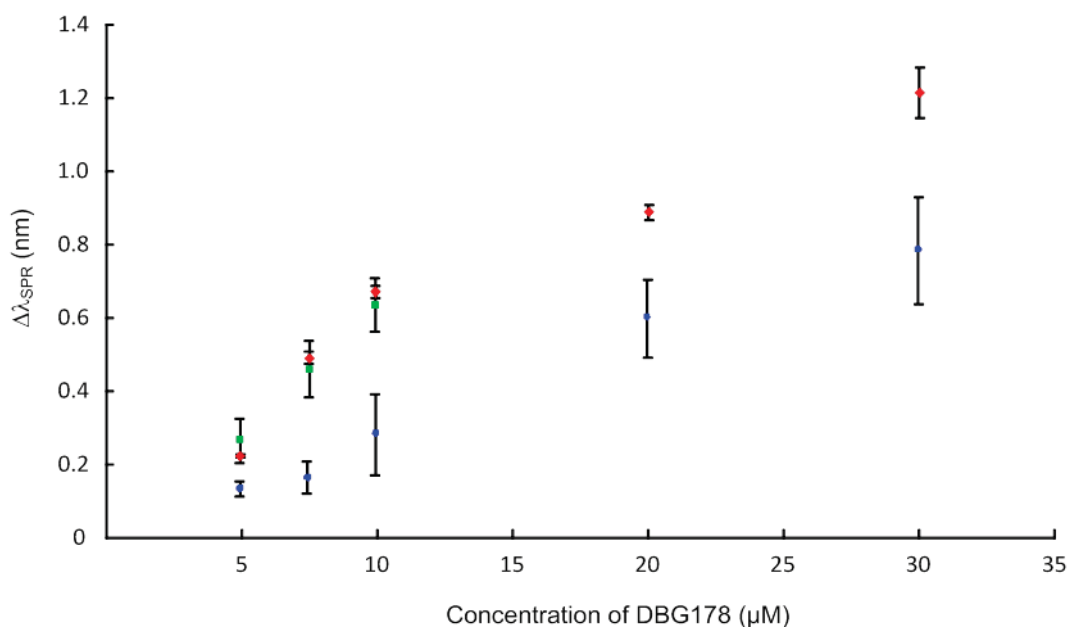
Biosensing with the dialysis chamber was demonstrated with a model system of hexapeptide ligands binding to the cluster of differentiation 36 (CD36). The construction of the biosensor involved the immobilization of a His-tagged type B scavenger receptor CD36, as previously reported in the literature<sup>94</sup>. The receptor CD36 is an 88 kDa integral membrane protein that is highly glycosylated and found in platelets, macrophages and microvascular endothelium<sup>238</sup>. It has been shown that this protein interacts with a variety of different biomolecules, for example collagen and thrombospondin,<sup>238</sup> and is involved in the modulation of angiogenesis and in the scavenging of oxidized low-density lipoproteins<sup>239</sup>. The receptor CD36 is also a receptor involved in atherosclerosis, which can be inhibited by peptides with anti-atherosclerotic activity<sup>239</sup>. There is a significant interest in the development of therapeutic ligands with anti-atherosclerotic activities

since atherosclerosis plays a role in heart diseases, common in industrial countries <sup>240</sup>. In addition, this model system was perfectly suited for the demonstration of the performance of the dialysis chamber SPR instrument.

This CD36 based biosensor was competent for the detection of therapeutic hexapeptides such as His-D-Trp-Ala-AzaTyr-D-Phe-Lys-NH<sub>2</sub> (named DBG178 with a  $K_D = 5 \mu\text{M}$  in saline solution). This peptide belongs to the growth hormone-releasing peptide (GHRP) family <sup>239, 241</sup>, which interacts with CD36. DBG178 possess a molecular weight (MW 850.97 g mol<sup>-1</sup>) intermediate to sucrose and PAA, and this peptide should therefore have a similar mechanism of diffusion, reaching the SPR sensor within a comparable time. The CD36 based biosensor was validated within the dialysis chamber by injecting either 10  $\mu\text{M}$  of DBG178 or CP-2B(i) (His-D-Trp-AzaLeu-Trp-D-Phe-Ala-NH<sub>2</sub>; MW = 858.98 Da), where DBG178 served as the positive control ( $K_D = 5 \mu\text{M}$ ) and CP-2B(i) ( $K_D = 31 \mu\text{M}$ ) served as a negative control. A signal change of  $0.28 \pm 0.11 \text{ nm}$  and  $-0.073 \pm 0.030 \text{ nm}$  was obtained for DBG178 and CP-2B(i), respectively. A chip-to-chip variation of 9% was calculated with this system by comparing the SPR signal for the immobilization of CD36 on the surface prior to the addition of the porous membrane. The successful detection of DBG178 in buffer through the porous membrane thus confirmed the suitability of the dialysis chamber for monitoring biomolecular interactions.

The CD36 biosensor within the dialysis chamber was calibrated with injection of varying concentrations of DBG178 between 5 and 30  $\mu\text{M}$  (**Figure 4.3**) using analysis period of 90 minutes per concentration. The dilution of the sample in the process of dialysis leads to slightly smaller responses for DBG178 than could be obtained using classical SPR and as a result concentrations below 5  $\mu\text{M}$  could not be detected, and a  $K_D$  in saline solution could not be estimated with the dialysis chamber. Improvement in the fluidic design by using fabrication method leading to thinner spacer could also reduce the dilution factor observed between the reservoir and the sensing chamber, providing increased signal for biosensing. The concentrations reported in **Figure 4.3** do not account for the dilution factor reported above. Nonetheless, the detection of several

concentrations of DBG178 was achieved within 90 minutes for each concentration with the dialysis chamber and SPR analysis.



**Figure 4.3.** Detection of a small peptide (DBG178) in PBS (blue), in human serum (red) and in human whole blood (green) by using a biosensor based on CD36 (Each single data point reported above comes from a triplicate)

Protein sensing is of high importance for the diagnosis of several diseases. As a proof-of-concept experiment, IgG detection at nanomolar concentrations was performed with the dialysis chamber. It should be stated that the analysis was carried out over approx. 8 hours since the IgG diffused slowly as a result of its molecular weight (150 kDa), an advantage when detecting small molecules via the dialysis chamber. Protein detection was successfully achieved with the 150 μm spacer, however, the detection time is currently prohibitive for a useful assay. Analysis time could be improved by reducing the thickness of the spacer and therefore one can envision the adaptation of this dialysis chamber for a variety of surface-based sensors to combat the challenges associated with sensing in biofluids.

#### 4.4.4 Diffusion gated detection of small peptide ligands in crude biofluids with a CD36 biosensor

Similarly to BSA and IgG, the suppression of the background signal from blood and serum was approximately 99% with the microporous membrane (**Table 4.3**). Thus, the protein concentrations (a major contributor to the background SPR signal from serum and blood) was about 1% of the reservoir concentration at the SPR sensor surface after more than 6 hours of dialysis. The dialysis chamber provided an extended period of time during which biodetection of small molecules can be performed in a biofluid with limited interference from the matrix.

**Table 4.3** SPR response for sucrose, PAA, Hemoglobin, BSA, IgG, human serum and human blood with or without the microdialysis chamber using a gold chip modified with 3-MPA-LHDLHD-OH

<b>Biomolecule/fluid</b>	<b><math>\Delta\lambda_{SPR}</math> with dialysis chamber (nm)</b>	<b><math>\Delta\lambda_{SPR}</math> without dialysis chamber (nm)</b>	<b>SPR response reduction (%)</b>
<b>Sucrose</b>	18.3 ± 1.6	24.7 ± 0.6	26 %
<b>PAA</b>	1.8 ± 0.9	3.9 ± 0.1	54 %
<b>BSA</b>	< LOD	3.7 ± 0.4	> 99%
<b>IgG</b>	< LOD	10.7 ± 0.4	> 99%
<b>Serum</b>	0.26 ± 0.05	23.3 ± 1.9	99%
<b>Blood</b>	0.44 ± 0.06	38.5 ± 0.2	99%

To confirm the competence of the dialysis chamber for biosensing in a complex biological fluid, human serum was spiked with DBG178 and analyzed with the SPR instrument. No treatment nor dilution of the serum was done before its injection. Despite higher viscosity of blood based fluid compare to buffer, analysis time of 90 minutes were still sufficient to obtain a signal that reach equilibrium (see **Figure 4.7**). The analysis of

DBG178 in human serum was successfully performed in the same concentration range as reported for PBS (**Figure 4.3**), and the calibration curve obtained showed an increased in signal compared to PBS. Albeit at a 1% of its original concentration in blood, the presence of serum proteins in the sensing chamber might explain the slight increase in sensitivity compared to PBS measurements. The presence of 1% of protein concentration is insufficient to induce significant nonspecific adsorption on the SPR sensor (**Table 4.3**). Data were background subtracted to remove the small contribution of nonspecific adsorption. The  $K_D$  was measured at 17  $\mu\text{M}$  in human serum, lower than the value reported in PBS. However, this could be expected as DBG178 is diluted slightly in the sensing chamber from the original concentration in serum and that the free fraction of DBG178 may not be 100%.

Finally, whole human blood was spiked with DBG178 and injected into the SPR instrument with the dialysis chamber at concentrations of 5, 7.5 and 10  $\mu\text{M}$  DBG178. To minimize the impact of bulk refractive index change and nonspecific adsorption of blood component over the sensor, unspiked blood/serum was injected as well in the reference channel and was use as a blank. All the signal reported in **Figure 4.3** are data from the sensing channels that were corrected according to the signal obtained in the reference channel after injection of blood/serum without DBG178 added. The SPR response obtained directly in whole blood was in great agreement with human serum (**Figure 4.3**). The SPR responses for 7.5  $\mu\text{M}$  DBG178 in serum and blood were statistically identical at  $0.49 \pm 0.02$  nm and  $0.46 \pm 0.08$  nm respectively. To the best of our knowledge, this is the first report of a plasmonic biosensor working in whole human blood.

## 4.5 Conclusions

The microporous membrane of the dialysis chamber created a size exclusion filter and a diffusion gate for blood. The membrane had pore size of 0.4  $\mu\text{m}$  diameter, smaller than the average diameter of a red blood cell ( $\sim 8 \mu\text{m}$ )<sup>242</sup>, white cell ( $\sim 6$  to  $10 \mu\text{m}$ )<sup>243</sup> and platelets ( $\sim 3.9 \mu\text{m}$ )<sup>244</sup>. These three major components of blood were not transferred

from the reservoir chamber to the sensing chamber and will not interfere with analysis, as would be the case when using a conventional SPR fluidic chamber. The molecules in blood including the proteins, metabolites and small molecules were able to cross the membrane since they all have a smaller hydrodynamic radius than the pores, which at 400 nm diameter were perfectly suited to filter cells and platelets, without impeding the diffusion of small molecules and biomolecules. The microporous membrane also served as a diffusion gate since molecules crossing the membrane will reach the sensor according to their size and diffusion coefficient. In the experiments reported, molecules or small biomolecule such as sucrose, DBG178 and PAA diffused at a faster rate in comparison to large biomolecules like albumin or IgG. Due to high concentration of protein in serum or blood <sup>83</sup>, a large shift could still be observed if enough diffusion time is allowed (~7-8 hours after serum or blood injection). The biosensing of smaller molecules can therefore be performed before larger biomolecules that interfere with the SPR response can reach the sensor, and over the course of the reported experiments, the dialysis chamber was able to suppress the bulk refractive index change from blood-based components. The potential sensing capabilities of this SPR diffusion gated biosensor could provide a rapid, label-free platform for direct ligand screening in untreated blood samples from patients.

Improvement in the fluidic design such as the fabrication of thinner spacer could also reduce even more the dilution factor observed between the reservoir and the sensing chamber, providing increased signal for biosensing.

## **4.6 Acknowledgements**

The authors thank William D. Lubell and Huy Ong of the Université de Montréal for providing the peptides and CD36, and Joachim Wegener of the University of Regensburg for fruitful discussions. The author also acknowledge financial support of the National Science and Engineering Research Council (NSERC) of Canada, the

Canadian foundation for innovation (CFI), the Fonds québécois de recherche – Nature et technologies (FQR-NT) and the Centre for self-assembled chemical structures (CSACS).

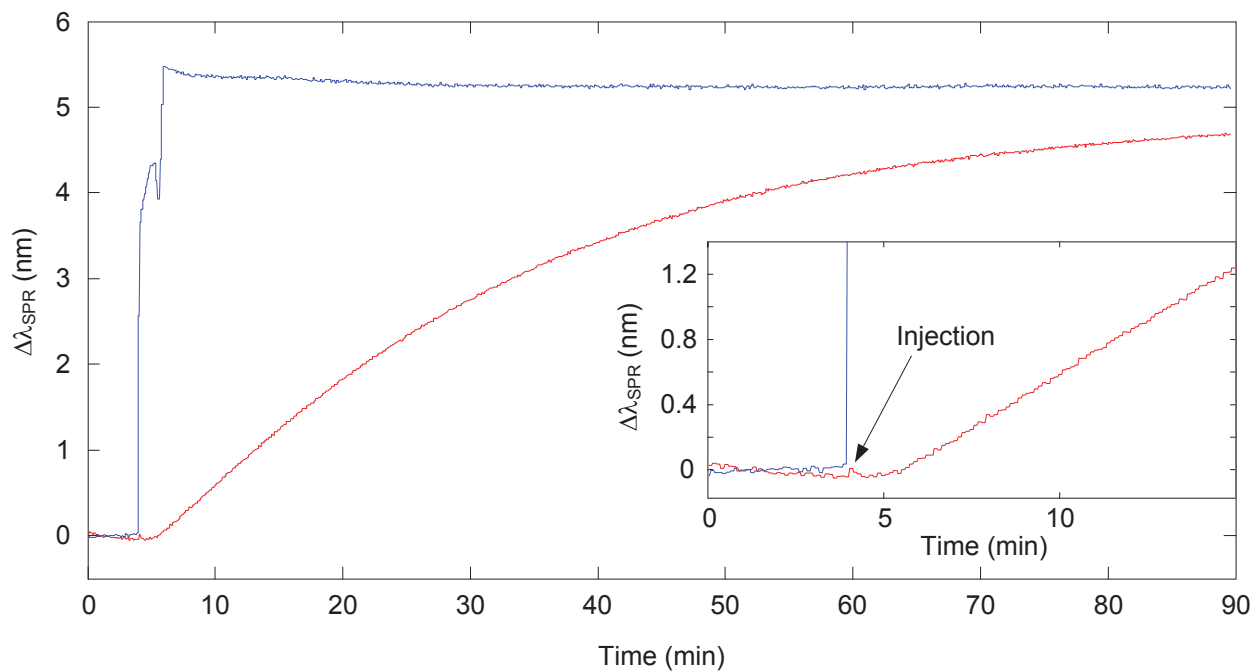
## 4.7 Supplementary information

### 4.7.1 Materials

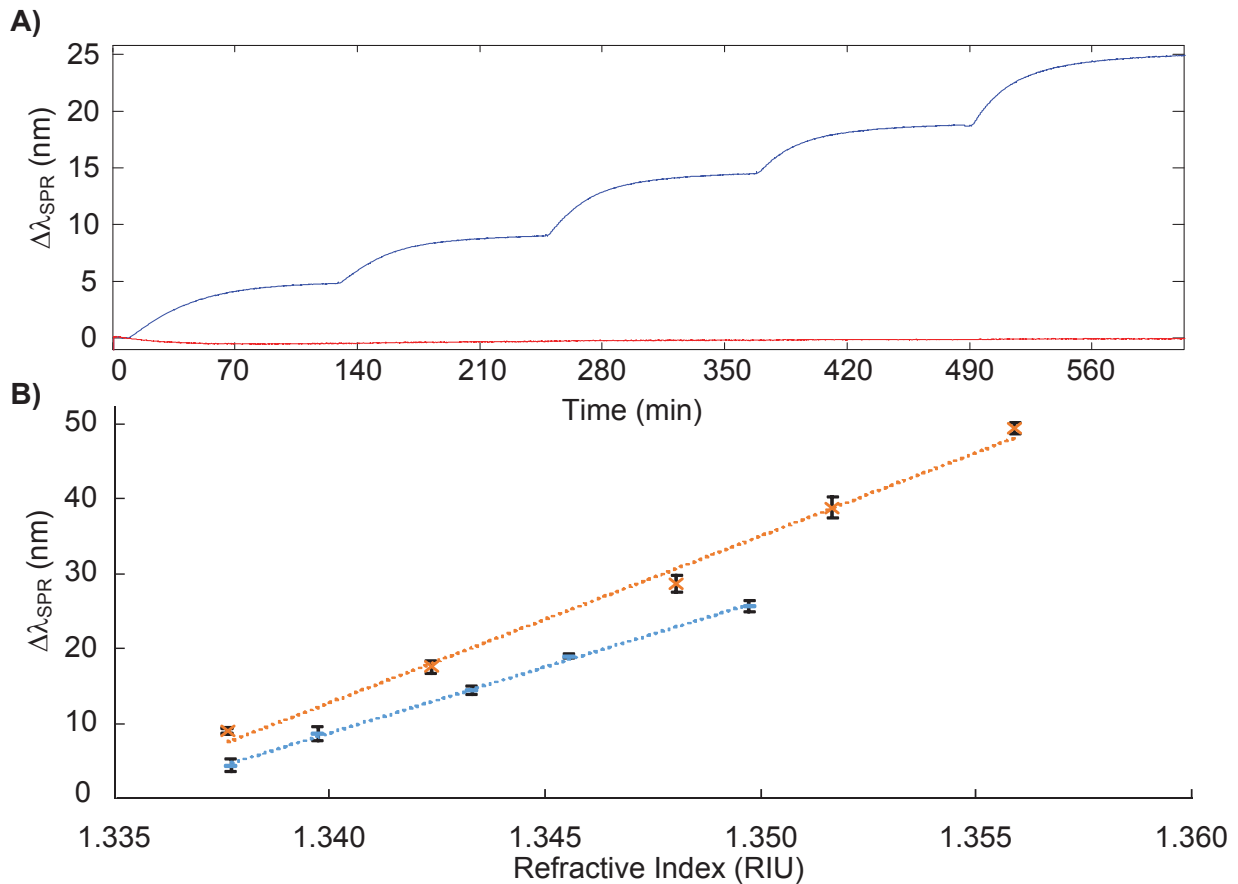
Dimethylformamide (DMF), sucrose, sulfuric acid and 30 % hydrogen peroxide were purchased from Fisher Scientific (Pittsburgh, PA). 16-mercaptohexadecanoic acid (16-MHA), N-hydroxysuccinimide (NHS), ethanolamine hydrochloride, N $\alpha$ ,N $\alpha$ -bis(carboxymethyl)-L-lysine (NTA), poly(acrylic acid) MW 2000 (PAA), human serum, bovine serum albumin (BSA) and human hemoglobin were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Phosphate buffer saline (PBS) was purchased from Corning cellgro (Manassas, VA). AffiniPure Goat Anti-Human IgG (H+L) and Human Gamma Globulin were purchased from *Jackson Immunoresearch* Labs. (West Grove, PA). 184 silicone elastomer base and 184 silicone elastomer curing were purchased from Dow Corning (Midland, MI). Copper (II) sulfate pentahydrate and Isopore® Membrane Filter (made of polycarbonate and hydrophilic) with 0.4  $\mu$ m pore size and 10-20% porosity were purchased from EMD Inc. (Mississauga, ON). Ethanol was purchased from Commercial alcohols (Brampton, ON). Single donor human whole blood with Na Heparin added as an anticoagulant was purchased from Innovative Research (Novi, MI).



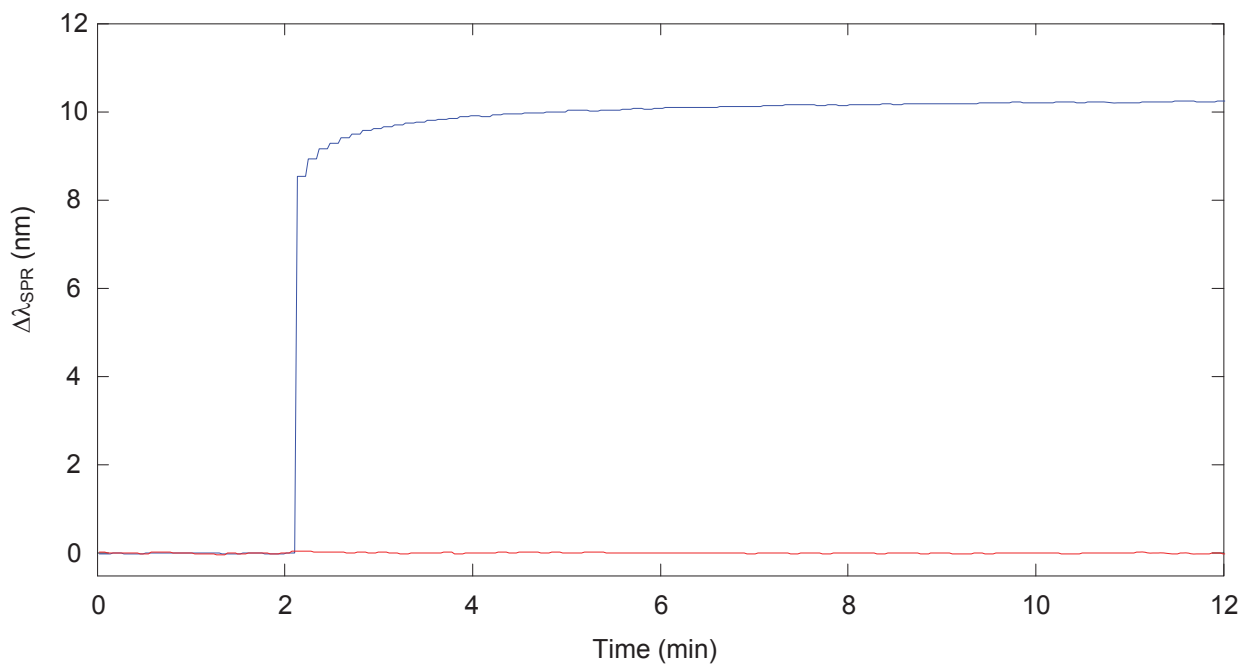
## 4.7.2 Supplementary figures and tables



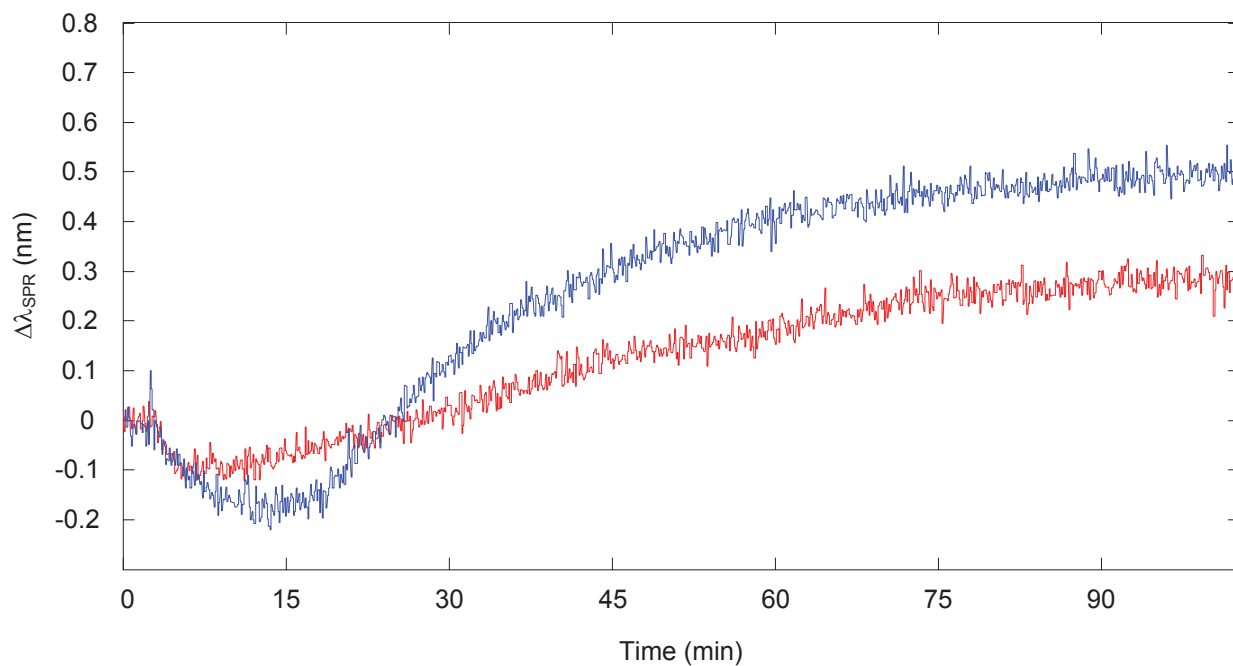
**Figure 4.4** Sensorgram for a 10 mg/mL sucrose solution without (top blue line) and with (bottom red line) a microporous membrane. The inset shows the delayed SPR response caused by the diffusion to the SPR sensor.



**Figure 4.5** (Panel A) Calibration of the SPR instrument with dialysis microfluidic (microporous membrane of 0.4  $\mu\text{m}$  pore size and a spacer of 0.15 mm). The upper trace (blue) represents the signal acquired from an analytical channel with the addition of varying sucrose concentrations over time and the lower trace (red) represents the reference channel (no sensor). Panel B) Calibration with sucrose solution of the SPR instrument with (blue) or without (orange) a microporous membrane. *With microporous membrane:*  $\Delta\lambda_{SPR} = 1764.1 \times RI - 2355.3$ ,  $R^2 = 0.9983$ ; *Without microporous membrane:*  $\Delta\lambda_{SPR} = 2221.2 \times RI - 2963.6$ ,  $R^2 = 0.9923$



**Figure 4.6** Injection of a 1 mg/mL IgG solution without (blue line) and with (orange line) a microporous membrane. The SPR response shows the efficacy of the microporous membrane in reducing background signal from proteins.



**Figure 4.7** Stabilization of the SPR response after injection of PBS (blue) and human blood spiked with DBG178 in presence of a microporous membrane.

## Chapitre 5 : Conclusions

Cette thèse met en lumière les défis et stratégies employées pour effectuer des analyses directement dans des milieux biologiques complexes comme les fluides sanguins. Celle-ci met l'emphase sur l'utilisation de biocapteurs adaptés à un instrument SPR portable pour faire des biodétections directement dans des échantillons de sérum ou de sang n'ayant subi aucune purification ou dilution. Afin de réaliser de telles mesures, une meilleure compréhension du milieu d'analyse était tout d'abord nécessaire et la SPR fut pour cette raison combinée avec la méthode de MALDI-MS. Par la suite, l'instrument SPR miniature a été adapté et modifié pour permettre des bioanalyses directement en matrice complexe. Une combinaison de la SPR avec un test ELISA a généré un instrument de type POC permettant une double détection en parallèle d'un biomarqueur au sein d'un même échantillon. Au long de ces chapitres, il a été démontré que l'utilisation d'une chimie de surface appropriée ainsi que des modifications apportées à la cellule fluidique permettaient une réduire les interférences de la matrice biologique pour effectuer des biodétections à même un échantillon de sérum ou de sang. Certaines stratégies ont ainsi pu être mises de l'avant pour permettre l'utilisation de biocapteur directement dans un fluide sanguin en utilisant un instrument SPR portable.

Dans un premier temps, la combinaison des techniques SPR et MALDI-MS a fourni un outil analytique permettant l'analyse et la caractérisation d'adsorption non spécifique de protéines sur différentes surfaces. Combiner ces deux techniques permettait de quantifier par SPR la quantité totale de protéines adsorbées sur une surface, pour ensuite les identifier par MALDI-MS. L'utilisation d'une telle plateforme analytique a permis de mieux comprendre le phénomène d'adsorption non spécifique du sérum ayant lieu sur des capteurs SPR. En effet, le sérum, en raison de sa complexité et de l'importante interférence générée par l'adsorption non spécifique de biomolécules qu'il contient, est rarement utilisé comme milieu d'analyse. Les résultats exposés dans le chapitre 2 démontrent justement la grande complexité du phénomène d'adsorption non spécifique. Il a été observé que l'identité et la quantité des protéines adsorbées varieront d'une surface à l'autre. De plus, contrairement à ce qui est suggéré par la cascade de Vroman, il a été mis de l'avant que plusieurs autres protéines contenues dans le sérum semblent jouer un rôle important dans le processus d'adsorption non spécifique (Apolipoprotéine A-1,

Complément C3, Protéine 1 de changement SHC, kininogène 2). Certaines surfaces semblent même posséder une pseudo affinité pour certaine protéine, révélant le potentiel d'une surface pour «préconcentrer» une protéine en particulier contenue dans un échantillon complexe. Finalement, la portion MALDI-MS de cette combinaison instrumentale a été utilisée pour étudier l'orientation adoptée par une protéine lors de son adsorption sur une surface. Cette dernière étude a révélé que sur une SAM de 16-MHA, l'albumine s'adsorbe préférentiellement sur une de ses faces, exposant le reste de la protéine à la solution. La combinaison du SPR et du MALDI-MS fournit donc une instrumentation de choix pour quantifier et identifier des protéines adsorbées sur une surface et mieux comprendre l'adsorption non spécifique d'un échantillon complexe. Les informations tirées de ce genre d'étude pourraient ensuite être utilisées pour le développement de nouvelles surfaces modulant l'adsorption de protéines à la surface.

Dans un deuxième volet, l'instrument SPR portable a été exploité pour effectuer la détection d'un biomarqueur du cancer de la prostate, soit la protéine PSA. L'instrument SPR utilisé dans ce cas était combiné avec un module de détection de fluorescence permettant de réaliser en parallèle une analyse par SPR et via un test ELISA. Outre l'innovation au point de vue instrumentale, le biocapteur employé dans cette étude s'appuyait sur l'utilisation d'un nouveau matériel plasmonique microstructuré fait d'un arrangement hexagonal de microtrous dans le film d'or. Ce dernier permettait d'augmenter le signal SPR obtenu d'un facteur entre 2 et 3 par rapport à un film d'or non structuré. Le biocapteur bâti sur ce film microstructuré et utilisé avec l'instrument SPR portable a permis de détecter la PSA combiné à un anticorps secondaire jusqu'à 0,1 nM en moins de 2 minutes. De plus, ce biocapteur exploitait une SAM basée sur un peptide réduisant l'adsorption non spécifique du sérum. Ainsi, la combinaison du film microtroué et de la SAM peptidique a permis d'analyser le complexe PSA/anticorps secondaire directement dans le sérum à des concentrations aussi basses que 0,1 nM. L'utilisation pour le capteur d'une chimie de surface réduisant l'adsorption du sérum à de très bas niveaux était ici cruciale pour réaliser une telle analyse. En modifiant l'anticorps secondaire lié à la PSA avec une enzyme de type peroxydase, il a aussi été possible de faire la détection de la capture de la PSA par fluorescence via un test de type ELISA à même le biocapteur SPR développé. La conversion enzymatique d'un composé en sa forme fluorescente a permis de détecter jusqu'à 0,01 nM de PSA après 10 minutes d'exposition. Cependant, seulement 30 secondes de réaction

étaient nécessaires pour la détection de 0,1 nM en PSA, une concentration sous le seuil considéré comme critique pour ce biomarqueur (0,15 nM) lors du dépistage du cancer de la prostate. La combinaison des techniques SPR et ELISA offrait un contrôle pour chacune des méthodes employées dans une gamme de concentration allant de 0,1 nM à 5 nM. Cette gamme de concentration est justement utilisée pour évaluer le stade de développement d'un cancer de la prostate. Le contrôle respectif que permet l'utilisation des deux techniques en parallèle pourrait aider à diminuer le taux de faux positif lié à la détection de la PSA. De plus, l'utilisation en parallèle de la SPR et de l'ELISA permettait d'étendre la gamme dynamique de détection de la PSA sur presque 4 ordres de grandeur, alors qu'elle serait plutôt d'environ 2 ordres pour un biocapteur classique. Les 4 ordres s'étendaient dans ce cas sur une gamme de concentration couvrant autant les niveaux observés chez des patients sains que ceux atteints du cancer de la prostate. L'instrument SPR et ELISA portable utilisant un biocapteur bâti sur un substrat microstructuré a donc permis la détection d'un biomarqueur du cancer de la prostate aux concentrations nécessaires pour le diagnostic de la maladie en moins de 12 minutes. Cette plateforme de détection permet donc une double mesure rapide effectuée sur un appareil de type POC pour le biomarqueur du cancer de la prostate et ouvre potentiellement la voie au dépistage de cette maladie directement dans le sérum.

Finalement, des modifications apportées à la microfluidique utilisée dans l'appareil SPR ont permis de détecter de petites biomolécules directement dans le sérum et le sang. La modification consistait à introduire une membrane poreuse dans la microfluidique divisant celle-ci en deux parties : la chambre réservoir et la chambre de détection. La membrane utilisée possédait des pores de 0.4  $\mu\text{m}$  en diamètre et toutes particules excédant cette taille n'étaient pas transmises au travers de celle-ci. De plus, la membrane imposait une séparation selon la vitesse de diffusion des espèces la traversant, jouant un rôle de barrière de microdialyse. Ainsi, lors de l'injection de sang, les cellules sanguines telles que les globules rouges, blancs ou bien les plaquettes ne traversaient pas la membrane en raison de leur taille et étaient exclues de la chambre de détection SPR. Les cellules sanguines n'interféraient donc pas avec l'analyse comme cela aurait été le cas pour une microfluidique classique. Les biomolécules contenues dans le sang possédant des diamètres inférieurs aux pores de la membrane pouvaient toutefois diffuser au travers de celle-ci vers la chambre de détection. La membrane servait alors de

barrière de diffusion. Les molécules la traversant subissaient une séparation temporelle avant d'arriver au capteur SPR qui dépendait de leur coefficient de diffusion et de leur taille. Les grosses biomolécules comme les protéines nécessitaient de plus de temps pour atteindre le capteur que les petites molécules. Les protéines pouvaient toutefois générer un signal si un temps d'analyse assez long (environ 7 à 8 heures) était utilisé. Ainsi, il y a une fenêtre de temps pendant laquelle les petites biomolécules atteindront le capteur SPR avant que les grosses biomolécules ne le fassent. Ceci s'avère très intéressant pour l'analyse de petites molécules contenues dans un mélange complexe renfermant énormément de grosses biomolécules, par exemple le sérum ou le sang. En effet, les protéines, qui génèrent beaucoup d'interférence en SPR et qui sont très concentrées dans le sérum ou le sang, diffuseront plus lentement que de petites molécules. Celles-ci bénéficieront d'une période de temps pendant laquelle l'analyse effectuée dans les fluides sanguins sera exempte d'interférence des protéines. La biodétection d'une petite molécule directement dans le sérum et le sang a ainsi été effectuée en utilisant le modèle de la CD36 et d'un ligand (DBG178) possédant une affinité pour ce récepteur. On dispose donc grâce à l'addition de la membrane poreuse dans la microfluidique d'une fenêtre de temps pendant laquelle on peut effectuer des biodétections à même un échantillon de sérum ou de sang. Le temps pendant lequel l'analyse sera exempte d'interférence des protéines contenue dans les fluides sanguins dépendra de la distance entre la membrane et le capteur SPR. Ce type de biocapteur SPR basé sur une barrière de diffusion permet ainsi la détection rapide, sans aucun marquage des cibles thérapeutiques directement dans un échantillon non traité de sang.

## 5.1 Perspectives

Les différentes combinaisons de méthodes analytiques présentées dans cette thèse pourraient potentiellement être utilisées pour d'autres études ou sous d'autres formats. Par exemple, la combinaison SPR/MS pourrait être utilisée sous un format d'imagerie dans lequel l'information obtenue par chacune des méthodes serait reliée à un positionnement précis. Encore une fois la SPR fournirait une mesure quantitative alors que la MS permettrait l'identification des espèces analysées, mais cette fois l'information serait rapportée pour des coordonnées sur



une surface en deux dimensions. Il serait alors envisageable d'analyser un échantillon solide comme des coupes tissulaires. Exploiter la possible sélectivité de certaines surfaces pour extraire des biomolécules sélectivement pourrait également être intéressant dans le cadre d'une application en imagerie afin d'améliorer la résolution des images obtenues par SPR et MS.

Le projet basé sur l'instrumentation SPR/fluorescence est maintenant mûr pour être entièrement adapté à l'analyse à même un échantillon de sérum. Quelques simplifications et amélioration instrumentale permettraient dans un avenir proche des analyses d'échantillons cliniques de sérum de patients pour établir les capacités du système SPR/fluorescence en tant que système de type POC. La combinaison SPR/fluorescence pourrait aussi être exploitée pour tirer davantage d'informations sur des processus biologiques. Par exemple, il serait possible d'exploiter cet instrument pour venir déterminer le site de liaison d'un nouveau ligand sur un récepteur donné en les marquant au préalable avec un ou des marqueurs fluorescents. On pourrait aussi tenter de corréler par SPR et fluorescence les changements de conformation ou de repliement d'une protéine dans différentes conditions.

Finalement, la membrane ajoutée au sein de la microfluidique pourrait être exploitée pour servir de support à un biofilm représentant une barrière «biologique». On pourrait par exemple tenter de reproduire la barrière hématoencéphalique et faire la mesure de la diffusion au travers de cette barrière pour plusieurs molécules. Ainsi, ce système pourrait mesurer la capacité de cibles thérapeutiques à franchir la barrière hématoencéphalique. Comme la SPR est une technique sans marquage, aucune modification des ligands ne serait nécessaire, ce qui ne modifiera pas la capacité de diffusion des composés et permettra d'avoir une idée plus juste de leur capacité à traverser une telle barrière.

## Chapitre 6 : Bibliographie

1. Shankaran, D. R.; Gobi, K. V. A.; Miura, N., Recent advancements in surface plasmon resonance immunosensors for detection of small molecules of biomedical, food and environmental interest. *Sens. Actuator B-Chem.* **2007**, *121*, 158-177.
2. Fan, X. D.; White, I. M.; Shopova, S. I.; Zhu, H. Y.; Suter, J. D.; Sun, Y. Z., Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: A review. *Anal. Chim. Acta* **2008**, *620*, 8-26.
3. Cooper, M. A., Optical biosensors in drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1*, 515-528.
4. Lippa, P. B.; Sokoll, L. J.; Chan, D. W., Immunosensors - principles and applications to clinical chemistry. *Clin. Chim. Acta* **2001**, *314*, 1-26.
5. Blaszykowski, C.; Sheikh, S.; Thompson, M., Surface chemistry to minimize fouling from blood-based fluids. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 5599-5612.
6. Gubala, V.; Harris, L. F.; Ricco, A. J.; Tan, M. X.; Williams, D. E., Point of Care Diagnostics: Status and Future. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 487-515.
7. Chin, C. D.; Linder, V.; Sia, S. K., Lab-on-a-chip devices for global health: Past studies and future opportunities. *Lab Chip* **2007**, *7*, 41-57.
8. Homola, J., Surface plasmon resonance sensors for detection of chemical and biological species. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 462-493.
9. Naimushin, A. N.; Soelberg, S. D.; Bartholomew, D. U.; Elkind, J. L.; Furlong, C. E., A portable surface plasmon resonance (SPR) sensor system with temperature regulation. *Sens. Actuator B-Chem.* **2003**, *96*, 253-260.
10. Chinowsky, T. M.; Soelberg, S. D.; Baker, P.; Swanson, N. R.; Kauffman, P.; Mactutis, A.; Grow, M. S.; Atmar, R.; Yee, S. S.; Furlong, C. E., Portable 24-analyte surface plasmon resonance instruments for rapid, versatile biodetection (vol 22, pg 9, 2007). *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *23*, 149-149.
11. Hayes, J. H.; Barry, M. J., Screening for Prostate Cancer With the Prostate-Specific Antigen Test A Review of Current Evidence. *JAMA-J. Am. Med. Assoc.* **2014**, *311*, 1143-1149.
12. 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. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *64*, 664-670.
13. Kragghansen, U., Molecular aspects of ligand-binding to serum-albumin. *Pharmacol. Rev.* **1981**, *33*, 17-53.
14. Vallner, J. J., Binding of drugs by albumin and plasma-protein. *J. Pharm. Sci.* **1977**, *66*, 447-465.
15. Wood, R. W., XLII. On a remarkable case of uneven distribution of light in a diffraction grating spectrum. *Philosophical Magazine Series 6* **1902**, *4*, 396-402.
16. Wood, R. W., XXVII. Diffraction gratings with controlled groove form and abnormal distribution of intensity. *Philosophical Magazine Series 6* **1912**, *23*, 310-317.
17. Rayleigh, L., *On the Dynamical Theory of Gratings*. 1907; Vol. 79, p 399-416.
18. Ritchie, R. H., Plasma Losses by Fast Electrons in Thin Films. *Physical Review* **1957**, *106*, 874-881.
19. Powell, C. J.; Swan, J. B., Effect of Oxidation on the Characteristic Loss Spectra of Aluminum and Magnesium. *Physical Review* **1960**, *118*, 640-643.

20. Bohm, D.; Pines, D., A Collective Description of Electron Interactions. I. Magnetic Interactions. *Physical Review* **1951**, *82*, 625-634.
21. Pines, D.; Bohm, D., A Collective Description of Electron Interactions: II. Collective  $\{\nu\}$  Individual Particle Aspects of the Interactions. *Physical Review* **1952**, *85*, 338-353.
22. 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*, 2135-&.
23. Kretschm.E, Determination of optical constants of metals by excitation of surface plasmons. *Zeitschrift Fur Physik* **1971**, *241*, 313-&.
24. Otto, A., Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by method of frustrated total reflection. *Zeitschrift Fur Physik* **1968**, *216*, 398-&.
25. Liedberg, B.; Nylander, C.; Lundstrom, I., Surface plasmon resonance for gas-detection and biosensing. *Sensors and Actuators* **1983**, *4*, 299-304.
26. Willets, K. A.; Van Duyne, R. P., Localized surface plasmon resonance spectroscopy and sensing. In *Annual Review of Physical Chemistry*, Annual Reviews: Palo Alto, 2007; Vol. 58, pp 267-297.
27. Zayats, A. V.; Smolyaninov, II; Maradudin, A. A., Nano-optics of surface plasmon polaritons. *Phys. Rep.-Rev. Sec. Phys. Lett.* **2005**, *408*, 131-314.
28. Raether, H., *Surface Plasmons on Smooth and Rough Surfaces and on Gratings*. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, 1988; Vol. 111.
29. Homola, J., Present and future of surface plasmon resonance biosensors. *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, *377*, 528-539.
30. Couture, M.; Zhao, S. S.; Masson, J.-F., Modern surface plasmon resonance for bioanalytics and biophysics. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2013**, *15*, 11190-11216.
31. Maier, S. A.; Atwater, H. A., Plasmonics: Localization and guiding of electromagnetic energy in metal/dielectric structures. *J. Appl. Phys.* **2005**, *98*, 10.
32. Barnes, W. L., Surface plasmon-polariton length scales: a route to sub-wavelength optics. *J. Opt. A-Pure Appl. Opt.* **2006**, *8*, S87-S93.
33. Liz-Marzan, L. M., Tailoring surface plasmons through the morphology and assembly of metal nanoparticles. *Langmuir* **2006**, *22*, 32-41.
34. Kreibig, U.; Vollmer, M., *Optical Properties of Metal Clusters*. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, 1995.
35. Sepulveda, B.; Angelome, P. C.; Lechuga, L. M.; Liz-Marzan, L. M., LSPR-based nanobiosensors. *Nano Today* **2009**, *4*, 244-251.
36. Matsubara, K.; Kawata, S.; Minami, S., A compact surface-plasmon resonance sensor for measurement of water in process. *Appl. Spectrosc.* **1988**, *42*, 1375-1379.
37. Couture, M.; Zhao, S. S.; Masson, J. F., Modern surface plasmon resonance for bioanalytics and biophysics. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 11190-11216.
38. Zhang, L. M.; Uttamchandani, D., Optical chemical sensing employing surface-plasmon resonance. *Electron. Lett.* **1988**, *24*, 1469-1470.
39. Schasfoort, R. B. M.; Tudos, A. J., *Handbook of Surface Plasmon Resonance*. The Royal Society of Chemistry: Cambridge, 2008.
40. Lee, H. J.; Goodrich, T. T.; Corn, R. M., SPR imaging measurements of 1-D and 2-D DNA microarrays created from microfluidic channels on gold thin films. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 5525-5531.

41. Kurita, R.; Yokota, Y.; Sato, Y.; Mizutani, F.; Niwa, O., On-chip enzyme immunoassay of a cardiac marker using a microfluidic device combined with a portable surface plasmon resonance system. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 5525-5531.
42. Stevens, R. C.; Soelberg, S. D.; Near, S.; Furlong, C. E., Detection of cortisol in saliva with a flow-filtered, portable surface plasmon resonance biosensor system. *Anal Chem* **2008**, *80*, 6747-6751.
43. Milgram, S.; Cortes, S.; Villiers, M. B.; Marche, P.; Buhot, A.; Livache, T.; Roupioz, Y., On chip real time monitoring of B-cells hybridoma secretion of immunoglobulin. *Biosens. Bioelectron.* **2011**, *26*, 2728-2732.
44. Piliarik, M.; Homola, J., Surface plasmon resonance (SPR) sensors: approaching their limits? *Opt. Express* **2009**, *17*, 16505-16517.
45. Shalabney, A.; Abdulhalim, I., Sensitivity-enhancement methods for surface plasmon sensors. *Laser Photon. Rev.* **2011**, *5*, 571-606.
46. Alleyne, C. J.; Kirk, A. G.; McPhedran, R. C.; Nicorovici, N. A. P.; Maystre, D., Enhanced SPR sensitivity using periodic metallic structures. *Opt. Express* **2007**, *15*, 8163-8169.
47. Hoa, X. D.; Kirk, A. G.; Tabrizian, M., Enhanced SPR response from patterned immobilization of surface bioreceptors on nano-gratings. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *24*, 3043-3048.
48. Halpern, A. R.; Chen, Y. L.; Corn, R. M.; Kim, D., Surface Plasmon Resonance Phase Imaging Measurements of Patterned Mono layers and DNA Adsorption onto Microarrays. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 2801-2806.
49. Han, Y.; Corn, R. M., Characterization and Application of Surface Plasmon-Enhanced Optical Diffraction from Electrodeposited Gold Nanowire Arrays. *J. Phys. Chem. Lett.* **2011**, *2*, 1601-1606.
50. Live, L. S.; Bolduc, O. R.; Masson, J. F., Propagating Surface Plasmon Resonance on Microhole Arrays. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 3780-3787.
51. Kuriyama, M.; Wang, M. C.; Papsidero, L. D.; Killian, C. S.; Shimano, T.; Valenzuela, L.; Nishiura, T.; Murphy, G. P.; Chu, T. M., Quantitation of prostate specific antigen in serum by a sensitive enzyme immunoassay. *Cancer Research* **1980**, *40*, 4658-4662.
52. Makarov, D. V.; Trock, B. J.; Humphreys, E. B.; Mangold, L. A.; Walsh, P. C.; Epstein, J. I.; Partin, A. W., Updated nomogram to predict pathologic stage of prostate cancer given prostate-specific antigen level, clinical stage, and biopsy gleason score (Partin tables) based on cases from 2000 to 2005. *Urology* **2007**, *69*, 1095-1101.
53. Labrie, F.; Candas, B.; Dupont, A.; Cusan, L.; Gomez, J. L.; Suburu, R. E.; Diamond, P.; Levesque, J.; Belanger, A., Screening decreases prostate cancer death: First analysis of the 1988 Quebec prospective randomized controlled trial. *Prostate* **1999**, *38*, 83-91.
54. Estevez, M. C.; Otte, M. A.; Sepulveda, B.; Lechuga, L. M., Trends and challenges of refractometric nanoplasmonic biosensors: A review. *Anal. Chim. Acta* **2014**, *806*, 55-73.
55. Jonsson, M. P.; Jonsson, P.; Dahlin, A. B.; Hook, F., Supported lipid bilayer formation and lipid-membrane-mediated biorecognition reactions studied with a new nanoplasmonic sensor template. *Nano Lett.* **2007**, *7*, 3462-3468.
56. Wittenberg, N. J.; Im, H.; Xu, X. H.; Wootla, B.; Watzlawik, J.; Warrington, A. E.; Rodriguez, M.; Oh, S. H., High-Affinity Binding of Remyelinating Natural Autoantibodies to Myelin-Mimicking Lipid Bilayers Revealed by Nanohole Surface Plasmon Resonance. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 6031-6039.

57. Chen, S.; Svedendahl, M.; Kall, M.; Gunnarsson, L.; Dmitriev, A., Ultrahigh sensitivity made simple: nanoplasmonic label-free biosensing with an extremely low limit-of-detection for bacterial and cancer diagnostics. *Nanotechnology* **2009**, *20*, 9.
58. Lee, S. W.; Lee, K. S.; Ahn, J.; Lee, J. J.; Kim, M. G.; Shin, Y. B., Highly Sensitive Biosensing Using Arrays of Plasmonic Au Nanodisks Realized by Nanoimprint Lithography. *ACS Nano* **2011**, *5*, 897-904.
59. Fagerstam, L. G.; Frostell, A.; Karlsson, R.; Kullman, M.; Larsson, A.; Malmqvist, M.; Butt, H., Detection of antigen-antibody interactions by surface plasmon resonance. Application to epitope mapping. *Journal of molecular recognition : JMR* **1990**, *3*, 208-214.
60. Leveque, C.; Ferracci, G.; Maulet, Y.; Grand-Masson, C.; Seagar, M.; El Far, O., A chip-based assay for botulinum neurotoxin A activity in pharmaceutical preparations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *99*, 4355-4360.
61. Tombelli, S.; Minunni, A.; Mascini, A., Analytical applications of aptamers. *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *20*, 2424-2434.
62. Win, M. N.; Klein, J. S.; Smolke, C. D., Codeine-binding RNA aptamers and rapid determination of their binding constants using a direct coupling surface plasmon resonance assay. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 5670-5682.
63. Campbell, K.; Barnes, P.; Haughey, S. A.; Higgins, C.; Kawatsu, K.; Vasconcelos, V.; Elliott, C. T., Development and single laboratory validation of an optical biosensor assay for tetrodotoxin detection as a tool to combat emerging risks in European seafood. *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, *405*, 7753-7763.
64. Kawazumi, H.; Gobi, K. V.; Ogino, K.; Maeda, H.; Miura, N., Compact surface plasmon resonance (SPR) immunosensor using multichannel for simultaneous detection of small molecule compounds. *Sens. Actuator B-Chem.* **2005**, *108*, 791-796.
65. Rojo, N.; Ercilla, G.; Haro, I., GB virus C (GBV-C) hepatitis G virus (HGV): Towards the design of synthetic peptides-based biosensors for immunodiagnosis of GBV-C/HGV infection. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2003**, *4*, 291-298.
66. Wittekindt, C.; Fleckenstein, B.; Wiesmuller, K. H.; Eing, B. R.; Kuhn, J. E., Detection of human serum antibodies against type-specifically reactive peptides from the N-terminus of glycoprotein B of herpes simplex virus type 1 and type 2 by surface plasmon resonance. *J. Virol. Methods* **2000**, *87*, 133-144.
67. Love, J. C.; Estroff, L. A.; Kriebel, J. K.; Nuzzo, R. G.; Whitesides, G. M., Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1103-1170.
68. Forster, R. J.; Keyes, T. E.; Vos, J. G., *Interfacial Supramolecular Assemblies*. Wiley: 2003.
69. Knoll, W.; Liley, M.; Piscevic, D.; Spinke, J.; Tarlov, M. J., Supramolecular architectures for the functionalization of solid surfaces. *Advances in biophysics* **1997**, *34*, 231-251.
70. Nuzzo, R. G.; Allara, D. L., Adsorption of bifunctional organic disulfides on gold surfaces. *Journal of the American Chemical Society* **1983**, *105*, 4481-4483.
71. Zhang, S. G., Hydrogels - Wet or let die. *Nat. Mater.* **2004**, *3*, 7-8.
72. Lofas, S.; Johnsson, B.; Edstrom, A.; Hansson, A.; Lindquist, G.; Hillgren, R. M. M.; Stigh, L., Methods for site controlled coupling to carboxymethyl dextran surfaces in surface-plasmon resonance sensors. *Biosens. Bioelectron.* **1995**, *10*, 813-822.



73. Rusmini, F.; Zhong, Z. Y.; Feijen, J., Protein immobilization strategies for protein biochips. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 1775-1789.
74. Lu, B.; Smyth, M. R.; Okennedy, R., Oriented immobilization of antibodies and its applications in immunoassays and immunosensors. *Analyst* **1996**, *121*, R29-R32.
75. Zhen, G. L.; Falconnet, D.; Kuennemann, E.; Voros, J.; Spencer, N. D.; Textor, M.; Zurcher, S., Nitrilotriacetic acid functionalized graft copolymers: A polymeric interface for selective and reversible binding of histidine-tagged proteins. *Adv. Funct. Mater.* **2006**, *16*, 243-251.
76. Wilchek, M.; Bayer, E. A., The avidin biotin complex in bioanalytical applications. *Anal. Biochem.* **1988**, *171*, 1-32.
77. Langmuir, I., The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum. *Journal of the American Chemical Society* **1918**, *40*, 1361-1403.
78. 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*, 5636-5648.
79. Gann, P. H.; Hennekens, C. H.; Stampfer, M. J., A prospective evaluation of plasma prostate-specific antigen for detection of prostatic-cancer. *JAMA-J. Am. Med. Assoc.* **1995**, *273*, 289-294.
80. Nguyen, M. H.; Keeffe, E. B., Screening for hepatocellular carcinoma. *J. Clin. Gastroenterol.* **2002**, *35*, S86-S91.
81. Eggers, K. M.; Oldgren, J.; Nordenskjold, A.; Lindahl, B., Diagnostic value of serial measurement of cardiac markers in patients with chest pain: Limited value of adding myoglobin to troponin I for exclusion of myocardial infarction. *Am. Heart J.* **2004**, *148*, 574-581.
82. Dao, Q.; Krishnaswamy, P.; Kazanegra, R.; Harrison, A.; Amirnovin, R.; Lenert, L.; Clopton, P.; Alberto, J.; Hlavin, P.; Maisel, A. S., Utility of B-type natriuretic peptide in the diagnosis of congestive heart failure in an urgent-care setting. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2001**, *37*, 379-385.
83. Anderson, N. L.; Anderson, N. G., The human plasma proteome - History, character, and diagnostic prospects. *Mol. Cell. Proteomics* **2002**, *1*, 845-867.
84. Polanski, M.; Leigh Anderson, N., A List of Candidate Cancer Biomarkers for Targeted Proteomics. *Biomark. Insights* **2006**, *1*, 1-48.
85. Bjorhall, K.; Miliotis, T.; Davidsson, P., Comparison of different depletion strategies for improved resolution in proteomic analysis of human serum samples. *Proteomics* **2005**, *5*, 307-317.
86. Jung, L. S.; Nelson, K. E.; Stayton, P. S.; Campbell, C. T., Binding and dissociation kinetics of wild-type and mutant streptavidins on mixed biotin-containing alkylthiolate monolayers. *Langmuir* **2000**, *16*, 9421-9432.
87. Nelson, K. E.; Gamble, L.; Jung, L. S.; Boeckl, M. S.; Naeemi, E.; Golledge, S. L.; Sasaki, T.; Castner, D. G.; Campbell, C. T.; Stayton, P. S., Surface characterization of mixed self-assembled monolayers designed for streptavidin immobilization. *Langmuir* **2001**, *17*, 2807-2816.
88. Huang, N. P.; Voros, J.; De Paul, S. M.; Textor, M.; Spencer, N. D., Biotin-derivatized poly(L-lysine)-g-poly(ethylene glycol): A novel polymeric interface for bioaffinity sensing. *Langmuir* **2002**, *18*, 220-230.
89. Blattler, T. M.; Pasche, S.; Textor, M.; Griesser, H. J., High salt stability and protein resistance of poly(L-lysine)-g-poly(ethylene glycol) copolymers covalently immobilized via

aldehyde plasma polymer interlayers on inorganic and polymeric substrates. *Langmuir* **2006**, *22*, 5760-5769.

90. Zhang, Z.; Zhang, M.; Chen, S. F.; Horbetta, T. A.; Ratner, B. D.; Jiang, S. Y., Blood compatibility of surfaces with superlow protein adsorption. *Biomaterials* **2008**, *29*, 4285-4291.

91. Vaisocherova, H.; Yang, W.; Zhang, Z.; Cao, Z.; Cheng, G.; Pilarik, M.; Homola, J.; Jiang, S., Ultralow fouling and functionalizable surface chemistry based on a zwitterionic polymer enabling sensitive and specific protein detection in undiluted blood plasma. *Anal Chem* **2008**, *80*, 7894-7901.

92. Aube, 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*, 10141-10148.

93. Bolduc, O. R.; Pelletier, J. N.; Masson, J. F., SPR Biosensing in Crude Serum Using Ultralow Fouling Binary Patterned Peptide SAM. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 3699-3706.

94. Bolduc, O. R.; Lambert-Lanteigne, P.; Colin, D. Y.; Zhao, S. S.; Proulx, C.; Boeglin, D.; Lubell, W. D.; Pelletier, J. N.; Fethiere, J.; Ong, H.; Masson, J. F., Modified peptide monolayer binding His-tagged biomolecules for small ligand screening with SPR biosensors. *Analyst* **2011**, *136*, 3142-3148.

95. Breault-Turcot, J. M., J. F, Microdialysis SPR: diffusion-gated sensing in blood. *Chemical Science* **2015**, *6*, 4247-4254.

96. Zheng, J.; Li, L.; Tsao, H.-K.; Sheng, Y.-J.; Chen, S.; Jiang, S., Strong Repulsive Forces between Protein and Oligo (Ethylene Glycol) Self-Assembled Monolayers: A Molecular Simulation Study. *Biophys. J.* **2005**, *89*, 158-166.

97. Herrwerth, S.; Eck, W.; Reinhardt, S.; Grunze, M., Factors that Determine the Protein Resistance of Oligoether Self-Assembled Monolayers – Internal Hydrophilicity, Terminal Hydrophilicity, and Lateral Packing Density. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 9359-9366.

98. Wang, R. L. C.; Kreuzer, H. J.; Grunze, M., Molecular Conformation and Solvation of Oligo(ethylene glycol)-Terminated Self-Assembled Monolayers and Their Resistance to Protein Adsorption. *The Journal of Physical Chemistry B* **1997**, *101*, 9767-9773.

99. Ostuni, E.; Chapman, R. G.; Holmlin, R. E.; Takayama, S.; Whitesides, G. M., A survey of structure-property relationships of surfaces that resist the adsorption of protein. *Langmuir* **2001**, *17*, 5605-5620.

100. Chen, S.; Li, L.; Zhao, C.; Zheng, J., Surface hydration: Principles and applications toward low-fouling/nonfouling biomaterials. *Polymer* **2010**, *51*, 5283-5293.

101. Li, L.; Chen, S.; Zheng, J.; Ratner, B. D.; Jiang, S., Protein Adsorption on Oligo(ethylene glycol)-Terminated Alkanethiolate Self-Assembled Monolayers: The Molecular Basis for Nonfouling Behavior. *The Journal of Physical Chemistry B* **2005**, *109*, 2934-2941.

102. Anderson, G. L.; McNellis, L. A., Enzyme-linked antibodies: A laboratory introduction to the ELISA. *J. Chem. Educ.* **1998**, *75*, 1275-1277.

103. Voller, A.; Bartlett, A.; Bidwell, D. E., Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. *J. Clin. Pathol.* **1978**, *31*, 507-520.

104. Morozova, V. S.; Levashova, A. I.; Eremin, S. A., Determination of pesticides by enzyme immunoassay. *J. Anal. Chem.* **2005**, *60*, 202-217.

105. Vastola, F. J.; Mumma, R. O.; Pirone, A. J., Analysis of organic salts by laser ionization. *Org. Mass Spectrom.* **1970**, *3*, 101-&.

106. Wilkins, C. L.; Weil, D. A.; Yang, C. L. C.; Ijames, C. F., High mass analysis by laser desorption Fourier-Transform mass-spectrometry. *Anal. Chem.* **1985**, *57*, 520-524.
107. Coates, M. L.; Wilkins, C. L., Laser desorption Fourier-Transform mass-spectra of malto-oligosaccharides. *Biomedical Mass Spectrometry* **1985**, *12*, 424-428.
108. Macfarlane, R. D., Mass spectrometry of biomolecules: From PDMS to MALDI. *Braz. J. Phys.* **1999**, *29*, 415-421.
109. Gross, J., *Mass Spectrometry*. Heidelberg, 2004.
110. Karas, M.; Bachmann, D.; Hillenkamp, F., Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules. *Anal. Chem.* **1985**, *57*, 2935-2939.
111. Karas, M.; Bachmann, D.; Bahr, U.; Hillenkamp, F., Matrix-assisted ultraviolet-laser desorption of nonvolatile compounds. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.* **1987**, *78*, 53-68.
112. Karas, M.; Hillenkamp, F., Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10000 Daltons. *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 2299-2301.
113. Karas, M.; Bahr, U.; Ingendoh, A.; Hillenkamp, F., Laser desorption ionization mass-spectrometry of proteins of mass 100 000 to 250 000 Dalton. *Angew. Chem.-Int. Edit. Engl.* **1989**, *28*, 760-761.
114. Karas, M.; Ingendoh, A.; Bahr, U.; Hillenkamp, F., Ultraviolet-laser desorption ionization mass-spectrometry of femtomolar amounts of large proteins. *Biomedical and Environmental Mass Spectrometry* **1989**, *18*, 841-843.
115. Murgasova, R.; Hercules, D. M., MALDI of synthetic polymers - an update. *Int. J. Mass Spectrom.* **2003**, *226*, 151-162.
116. Cotter, R. J., *Time-of-Flight Mass Spectrometry: Instrumentation and Applications in Biological Research* American Chemical Society: Washington, 1997.
117. Dreisewerd, K.; Schurenberg, M.; Karas, M.; Hillenkamp, F., Influence of the laser intensity and spot size on the desorption of molecules and ions in matrix-assisted laser-desorption ionization with a uniform beam profile. *Int. J. Mass Spectrom.* **1995**, *141*, 127-148.
118. Zenobi, R.; Knochenmuss, R., Ion formation in MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* **1998**, *17*, 337-366.
119. Menzel, C.; Dreisewerd, K.; Berkenkamp, S.; Hillenkamp, F., Mechanisms of energy deposition in infrared matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.* **2001**, *207*, 73-96.
120. Menzel, C.; Dreisewerd, K.; Berkenkamp, S.; Hillenkamp, F., The role of the laser pulse duration in infrared matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2002**, *13*, 975-984.
121. Berkenkamp, S.; Menzel, C.; Hillenkamp, F.; Dreisewerd, K., Measurements of mean initial velocities of analyte and matrix ions in infrared matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2002**, *13*, 209-220.
122. Juhasz, P.; Vestal, M. L.; Martin, S. A., On the initial velocity of ions generated by matrix-assisted laser desorption ionization and its effect on the calibration of delayed extraction time-of-flight mass spectra. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1997**, *8*, 209-217.
123. Karas, M.; Bahr, U.; Fournier, I.; Gluckmann, M.; Pfenninger, A., The initial-ion velocity as a marker for different desorption-ionization mechanisms in MALDI. *Int. J. Mass Spectrom.* **2003**, *226*, 239-248.
124. Horneffer, V.; Dreisewerd, K.; Ludemann, H. C.; Hillenkamp, F.; Lage, M.; Strupat, K., Is the incorporation of analytes into matrix crystals a prerequisite for matrix-assisted laser



- desorption/ionization mass spectrometry? A study of five positional isomers of dihydroxybenzoic acid. *Int. J. Mass Spectrom.* **1999**, *185*, 859-870.
125. Gluckmann, M.; Pfenninger, A.; Kruger, R.; Thierolf, M.; Karas, M.; Horneffer, V.; Hillenkamp, F.; Strupat, K., Mechanisms in MALDI analysis: surface interaction or incorporation of analytes? *Int. J. Mass Spectrom.* **2001**, *210*, 121-132.
126. Wang, B. H.; Dreisewerd, K.; Bahr, U.; Karas, M.; Hillenkamp, F., Gas-phase cationization and protonation of neutrals generated by matrix-assisted laser desorption. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1993**, *4*, 393-398.
127. Liao, P. C.; Allison, J., Ionization processes in matrix-assisted laser-desorption ionization mass-spectrometry - Matrix-dependent formation of M+H (+) VS M+Na (+) ions of small peptides and some mechanistic comments. *J. Mass Spectrom.* **1995**, *30*, 408-423.
128. Juhasz, P.; Costello, C. E.; Biemann, K., Matrix-assisted laser desorption ionization mass-spectrometry with 2-(4-hydroxyphenylazo)benzoic acid matrix. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1993**, *4*, 399-409.
129. Taranenko, N. I.; Potter, N. T.; Allman, S. L.; Golovlev, V. V.; Chen, C. H., Gender identification by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 3974-3976.
130. Karas, M.; Ehring, H.; Nordhoff, E.; Stahl, B.; Strupat, K.; Hillenkamp, F.; Grehl, M.; Krebs, B., Matrix-assisted laser-desorption ionization mass-spectrometry with additives to 2,5-dihydroxybenzoic acid. *Org. Mass Spectrom.* **1993**, *28*, 1476-1481.
131. Li, L. J.; Garden, R. W.; Romanova, E. V.; Sweedler, J. V., In situ sequencing of peptides from biological tissues and single cells using MALDI-PSD/CID analysis. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 5451-5458.
132. Beavis, R. C.; Chait, B. T., Cinnamic acid derivatives as matrices for ultraviolet laser desorption mass spectrometry of proteins. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM* **1989**, *3*, 432-435.
133. Ayorinde, F. O.; Elhilo, E.; Hlongwane, C., Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of canola, castor and olive oils. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1999**, *13*, 737-739.
134. Kassis, C. M.; DeSimone, J. M.; Linton, E. W.; Lange, G. W.; Friedman, R. M., An investigation into the importance of polymer-matrix miscibility using surfactant modified matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1997**, *11*, 1462-1466.
135. Karas, M.; Bahr, U.; Giessmann, U., Matrix-assisted laser desorption ionization mass-spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* **1991**, *10*, 335-357.
136. Hillenkamp, F.; Karas, M.; Beavis, R. C.; Chait, B. T., Matrix-assisted laser desorption ionization mass-spectrometry of biopolymers. *Anal. Chem.* **1991**, *63*, A1193-A1202.
137. Strupat, K.; Karas, M.; Hillenkamp, F., 2,5-Dihydroxybenzoic acid - A new matrix for laser desorption ionization mass-spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.* **1991**, *111*, 89-102.
138. Vorm, O.; Mann, M., Improved mass accuracy in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass-spectrometry of peptides. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1994**, *5*, 955-958.
139. Vorm, O.; Roepstorff, P.; Mann, M., Improved resolution and very high-sensitivity in MALDI TOF of matrix surfaces made by fast evaporation. *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 3281-3287.

140. Cotter, R. J., Laser mass-spectrometry - An overview of techniques, instruments and applications. *Anal. Chim. Acta* **1987**, *195*, 45-59.
141. Stephens, W. E., A pulsed mass spectrometer with time dispersion. *Physical Review* **1946**, *69*, 691-691.
142. Fuerstenau, S. D.; Benner, W. H., Molecular weight determination of megadalton DNA electrospray ions using charge detection time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1995**, *9*, 1528-1538.
143. Fuerstenau, S. D.; Benner, W. H.; Thomas, J. J.; Brugidou, C.; Bothner, B.; Siuzdak, G., Mass spectrometry of an intact virus. *Angew. Chem.-Int. Edit.* **2001**, *40*, 542-544.
144. Mamyryn, B. A., Laser-assisted reflectron time-of-flight mass-spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.* **1994**, *131*, 1-19.
145. Guilhaus, M., Principles and instrumentation in time-of-flight mass-spectrometry - physical and instrumental concepts. *J. Mass Spectrom.* **1995**, *30*, 1519-1532.
146. Cotter, R. J., Time-of-flight mass spectrometry for the structural analysis of biological molecules. *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 1027A-1039A.
147. Gundry, R. L.; White, M. Y.; Murray, C. I.; Kane, L. A.; Fu, Q.; Stanley, B. A.; Van Eyk, J. E., Preparation of Proteins and Peptides for Mass Spectrometry Analysis in a Bottom-Up Proteomics Workflow. In *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc.: 2001.
148. Naylor, S.; Findeis, A. F.; Gibson, B. W.; Williams, D. H., An approach towards the complete FAB analysis of enzymic digests of peptides and proteins. *Journal of the American Chemical Society* **1986**, *108*, 6359-6363.
149. Yates, J. R., Mass spectrometry and the age of the proteome. *J. Mass Spectrom.* **1998**, *33*, 1-19.
150. Mann, M.; Hendrickson, R. C.; Pandey, A., Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annu. Rev. Biochem.* **2001**, *70*, 437-473.
151. Kohn, E. C.; Azad, N.; Annunziata, C.; Dharmoon, A. S.; Whiteley, G., Proteomics as a tool for biomarker discovery. *Dis. Markers* **2007**, *23*, 411-417.
152. Piliarik, M.; Homola, J., Surface plasmon resonance (SPR) sensors: approaching their limits? *Opt. Express* **2009**, *17*, 16505-16517.
153. Ray, S.; Mehta, G.; Srivastava, S., Label-free detection techniques for protein microarrays: Prospects, merits and challenges. *Proteomics* **2010**, *10*, 731-748.
154. Homola, J.; Yee, S. S.; Gauglitz, G., Surface plasmon resonance sensors: review. *Sens. Actuator B-Chem.* **1999**, *54*, 3-15.
155. Mitzner, S. R.; Stange, J.; Klammt, S.; Risler, T.; Erley, C. M.; Bader, B. D.; Berger, E. D.; Lauchart, W.; Peszynski, P.; Freytag, J.; Hickstein, H.; Loock, J.; Lohr, J. M.; Liebe, S.; Emmrich, J.; Korten, G.; Schmidt, R., Improvement of hepatorenal syndrome with extracorporeal albumin dialysis MARS: Results of a prospective, randomized, controlled clinical trial. *Liver Transplant.* **2000**, *6*, 277-286.
156. Green, R. J.; Davies, M. C.; Roberts, C. J.; Tendler, S. J. B., Competitive protein adsorption as observed by surface plasmon resonance. *Biomaterials* **1999**, *20*, 385-391.
157. Pan, S.; Aebersold, R.; Chen, R.; Rush, J.; Goodlett, D. R.; McIntosh, M. W.; Zhang, J.; Brentnall, T. A., Mass Spectrometry Based Targeted Protein Quantification: Methods and Applications. *J. Proteome Res.* **2009**, *8*, 787-797.
158. Switzar, L.; Giera, M.; Niessen, W. M. A., Protein Digestion: An Overview of the Available Techniques and Recent Developments. *J. Proteome Res.* **2013**, *12*, 1067-1077.

159. van Hove, E. R. A.; Smith, D. F.; Heeren, R. M. A., A concise review of mass spectrometry imaging. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 3946-3954.
160. Nedelkov, D.; Nelson, R. W., Analysis of native proteins from biological fluids by biomolecular interaction analysis mass spectrometry (BIA/MS): exploring the limit of detection, identification of non-specific binding and detection of multi-protein complexes. *Biosens. Bioelectron.* **2001**, *16*, 1071-1078.
161. Nedelkov, D.; Nelson, R. W., Design and use of multi-affinity surfaces in biomolecular interaction analysis-mass spectrometry (BIA/MS): a step toward the design of SPR/MS arrays. *Journal of Molecular Recognition* **2003**, *16*, 15-19.
162. Nedelkov, D.; Nelson, R. W.; Kiernan, U. A.; Niederkofler, E. E.; Tubbs, K. A., Detection of bound and free IGF-1 and IGF-2 in human plasma via biomolecular interaction analysis mass spectrometry. *FEBS Lett.* **2003**, *536*, 130-134.
163. Bolduc, O. R.; Live, L. S.; Masson, J. F., High-resolution surface plasmon resonance sensors based on a dove prism. *Talanta* **2009**, *77*, 1680-1687.
164. Bolduc, O. R.; Clouthier, C. M.; Pelletier, J. N.; Masson, J. F., Peptide Self-Assembled Monolayers for Label-Free and Unamplified Surface Plasmon Resonance Biosensing in Crude Cell Lysate. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 6779-6788.
165. Oh, B. K.; Kim, Y. K.; Park, K. W.; Lee, W. H.; Choi, J. W., Surface plasmon resonance immunosensor for the detection of Salmonella typhimurium. *Biosens. Bioelectron.* **2004**, *19*, 1497-1504.
166. Lee, W.; Oh, B. K.; Bae, Y. M.; Paek, S. H.; Lee, W. H.; Choi, J. W., Fabrication of self-assembled protein A monolayer and its application as an immunosensor. *Biosens. Bioelectron.* **2003**, *19*, 185-192.
167. Cedervall, T.; Lynch, I.; Lindman, S.; Berggard, T.; Thulin, E.; Nilsson, H.; Dawson, K. A.; Linse, S., Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 2050-2055.
168. Bolduc, O. R.; Correia-Ledo, D.; Masson, J.-F., Electroformation of Peptide Self-Assembled Monolayers on Gold. *Langmuir* **2012**, *28*, 22-26.
169. Mulleresterl, W.; Fritz, H.; Machleidt, W.; Ritonja, A.; Brzin, J.; Kotnik, M.; Turk, V.; Kellermann, J.; Lottspeich, F., Human-plasma kininogens are identical with alpha-cysteine proteinase-inhibitors - evidence from immunological, enzymological and sequence data. *FEBS Lett.* **1985**, *182*, 310-314.
170. Brocklehurst, W. E.; Zeitlin, I. J., Determination of plasma kinin and kininogen levels in man. *The Journal of Physiology* **1967**, *191*, 417-426.
171. Higashiyama, S.; Ohkubo, I.; Ishiguro, H.; Kunitatsu, M.; Sawaki, K.; Sasaki, M., Human high-molecular-weight kininogen as a thiol proteinase-inhibitor - Presence of the entire inhibition capacity in the native form of heavy-chain. *Biochemistry* **1986**, *25*, 1669-1675.
172. Sueyoshi, T.; Enyoji, K.; Shimada, T.; Kato, H.; Iwanaga, S.; Bando, Y.; Kominami, E.; Katunuma, N., A new function of kininogens as thiol-proteinase inhibitors - Inhibition of papain and cathepsin-B, cathepsin-H and cathepsin-L by bovine, rat, and human-plasma kininogens. *FEBS Lett.* **1985**, *182*, 193-195.
173. Dodson, G.; Wlodawer, A., Catalytic triads and their relatives. *Trends Biochem.Sci.* **1998**, *23*, 347-352.

174. Buller, A. R.; Townsend, C. A., Intrinsic evolutionary constraints on protease structure, enzyme acylation, and the identity of the catalytic triad. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, *110*, E653-E661.
175. Larsericsdotter, H.; Oscarsson, S.; Buijs, J., Structure, stability, and orientation of BSA adsorbed to silica. *J. Colloid Interface Sci.* **2005**, *289*, 26-35.
176. Chaurand, P., Imaging mass spectrometry of thin tissue sections: A decade of collective efforts. *Journal of Proteomics* **2012**, *75*, 4883-4892.
177. Dunne, L.; Daly, S.; Baxter, A.; Haughey, S.; O'Kennedy, R., Surface plasmon resonance-based immunoassay for the detection of aflatoxin B-1 using single-chain antibody fragments. *Spectr. Lett.* **2005**, *38*, 229-245.
178. Dupont, D.; Muller-Renaud, S., Quantification of proteins in dairy products using an optical biosensor. *J. AOAC Int.* **2006**, *89*, 843-848.
179. Indyk, H. E.; Filonzi, E. L.; Gapper, L. W., Determination of minor proteins of bovine milk and colostrum by optical biosensor analysis. *J. AOAC Int.* **2006**, *89*, 898-902.
180. Li, Y.; Lee, H. J.; Corn, R. M., Detection of protein biomarkers using RNA aptamer microarrays and enzymatically amplified surface plasmon resonance imaging. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 1082-1088.
181. Eteshola, E.; Leckband, D., Development and characterization of an ELISA assay in PDMS microfluidic channels. *Sensors and Actuators B-Chemical* **2001**, *72*, 129-133.
182. Christodoulides, N.; Mohanty, S.; Miller, C. S.; Langub, M. C.; Floriano, P. N.; Dharshan, P.; Ali, M. F.; Bernard, B.; Romanovicz, D.; Anslyn, E.; Fox, P. C.; McDevitt, J. T., Application of microchip assay system for the measurement of C-reactive protein in human saliva. *Lab on a Chip* **2005**, *5*, 261-269.
183. Dupuy, A. M.; Lehmann, S.; Cristol, J. P., Protein biochip systems for the clinical laboratory. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* **2005**, *43*, 1291-1302.
184. Goluch, E. D.; Nam, J.-M.; Georganopoulou, D. G.; Chiesl, T. N.; Shaikh, K. A.; Ryu, K. S.; Barron, A. E.; Mirkin, C. A.; Liu, C., A bio-barcode assay for on-chip attomolar-sensitivity protein detection. *Lab on a Chip* **2006**, *6*, 1293-1299.
185. Henares, T. G.; Mizutani, F.; Hisamoto, H., Current development in microfluidic immunosensing chip. *Analytica Chimica Acta* **2008**, *611*, 17-30.
186. Lee, B. S.; Lee, J.-N.; Park, J.-M.; Lee, J.-G.; Kim, S.; Cho, Y.-K.; Ko, C., A fully automated immunoassay from whole blood on a disc. *Lab on a Chip* **2009**, *9*, 1548-1555.
187. Ng, A. H. C.; Uddayasankar, U.; Wheeler, A. R., Immunoassays in microfluidic systems. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2010**, *397*, 991-1007.
188. Chin, C. D.; Laksanasopin, T.; Cheung, Y. K.; Steinmiller, D.; Linder, V.; Parsa, H.; Wang, J.; Moore, H.; Rouse, R.; Umvilighozo, G.; Karita, E.; Mwambarangwe, L.; Braunstein, S. L.; van de Wijgert, J.; Sahabo, R.; Justman, J. E.; El-Sadr, W.; Sia, S. K., Microfluidics-based diagnostics of infectious diseases in the developing world. *Nature Medicine* **2011**, *17*, 1015-U1138.
189. Berg, B.; Cortazar, B.; Tseng, D.; Ozkan, H.; Feng, S.; Wei, Q.; Chan, R. Y.-L.; Burbano, J.; Farooqui, Q.; Lewinski, M.; Di Carlo, D.; Garner, O. B.; Ozcan, A., Cellphone-Based Hand-Held Microplate Reader for Point-of-Care Testing of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. *ACS Nano* **2015**, *9*, 7857-7866.
190. Rossier, J. S.; Girault, H. H., Enzyme linked immunosorbent assay on a microchip with electrochemical detection. *Lab on a Chip* **2001**, *1*, 153-157.



191. Chon, H.; Lim, C.; Ha, S.-M.; Ahn, Y.; Lee, E. K.; Chang, S.-I.; Seong, G. H.; Choo, J., On-Chip Immunoassay Using Surface-Enhanced Raman Scattering of Hollow Gold Nanospheres. *Analytical Chemistry* **2010**, *82*, 5290-5295.
192. Luo, Y.; Yu, F.; Zare, R. N., Microfluidic device for immunoassays based on surface plasmon resonance imaging. *Lab on a Chip* **2008**, *8*, 694-700.
193. de Melo, J. V.; Soldatkin, A. P.; Martelet, C.; Jaffrezic-Renault, N.; Cosnier, S., Use of competitive inhibition for driving sensitivity and dynamic range of urea ENFETs. *Biosensors and Bioelectronics* **2003**, *18*, 345-351.
194. Soldatkin, A. P.; Montoriol, J.; Sant, W.; Martelet, C.; Jaffrezic-Renault, N., A novel urea sensitive biosensor with extended dynamic range based on recombinant urease and ISFETs. *Biosensors and Bioelectronics* **2003**, *19*, 131-135.
195. Yamazaki, T.; Kojima, K.; Sode, K., Extended-Range Glucose Sensor Employing Engineered Glucose Dehydrogenases. *Analytical Chemistry* **2000**, *72*, 4689-4693.
196. Kolossov, V. L.; Spring, B. Q.; Clegg, R. M.; Henry, J. J.; Sokolowski, A.; Kenis, P. J. A.; Gaskins, H. R., Development of a high-dynamic range, GFP-based FRET probe sensitive to oxidative microenvironments. *Experimental Biology and Medicine* **2011**, *236*, 681-691.
197. Kang, D.; Vallée-Bélisle, A.; Porchetta, A.; Plaxco, K. W.; Ricci, F., Re-engineering Electrochemical Biosensors To Narrow or Extend Their Useful Dynamic Range. *Angewandte Chemie International Edition* **2012**, *51*, 6717-6721.
198. Vallée-Bélisle, A.; Ricci, F.; Plaxco, K. W., Engineering Biosensors with Extended, Narrowed, or Arbitrarily Edited Dynamic Range. *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134*, 2876-2879.
199. Andersson, O.; Nikkinen, H.; Kanmert, D.; Enander, K., A multiple-ligand approach to extending the dynamic range of analyte quantification in protein microarrays. *Biosensors and Bioelectronics* **2009**, *24*, 2458-2464.
200. Tawa, K.; Yokota, Y.; Kintaka, K.; Nishii, J.; Nakaoki, T., An application of a plasmonic chip with enhanced fluorescence to a simple biosensor with extended dynamic range. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2011**, *157*, 703-709.
201. Inci, F.; Filippini, C.; Baday, M.; Ozen, M. O.; Calamak, S.; Durmus, N. G.; Wang, S.; Hanhauser, E.; Hobbs, K. S.; Juillard, F.; Kuang, P. P.; Vetter, M. L.; Carocci, M.; Yamamoto, H. S.; Takagi, Y.; Yildiz, U. H.; Akin, D.; Wesemann, D. R.; Singhal, A.; Yang, P. L.; Nibert, M. L.; Fichorova, R. N.; Lau, D. T.-Y.; Henrich, T. J.; Kaye, K. M.; Schachter, S. C.; Kuritzkes, D. R.; Steinmetz, L. M.; Gambhir, S. S.; Davis, R. W.; Demirci, U., Multitarget, quantitative nanoplasmonic electrical field-enhanced resonating device (NE2RD) for diagnostics. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2015**, *112*, E4354-E4363.
202. Avramis, V. J.; Avramis, E. V.; Hunter, W.; Long, M. C., Immunogenicity of Native or Pegylated E. coli and Erwinia Asparaginases Assessed by ELISA and Surface Plasmon Resonance (SPR-Biacore) Assays of IgG Antibodies (Ab) in Sera from Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL). *Anticancer Research* **2009**, *29*, 299-302.
203. Campbell, K.; Huet, A.-C.; Charlier, C.; Higgins, C.; Delahaut, P.; Elliott, C. T., Comparison of ELISA and SPR biosensor technology for the detection of paralytic shellfish poisoning toxins. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2009**, *877*, 4079-4089.
204. Chung, J. W.; Kim, S. D.; Bernhardt, R.; Pyun, J. C., Application of SPR biosensor for medical diagnostics of human hepatitis B virus (hHBV). *Sensors and Actuators B-Chemical* **2005**, *111*, 416-422.

205. Lung, F. D. T.; Chen, H. Y.; Lin, H. T., Monitoring bone loss using ELISA and surface plasmon resonance (SPR) technology. *Protein and Peptide Letters* **2003**, *10*, 313-319.
206. Mahajan, S. S.; Iyer, S. S., ELISA and SPR Studies of Ricin Binding to beta-Galactoside Analogs. *Journal of Carbohydrate Chemistry* **2012**, *31*, 447-465.
207. Nechansky, A., HAHA - nothing to laugh about. Measuring the immunogenicity (human anti-human antibody response) induced by humanized monoclonal antibodies applying ELISA and SPR technology. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2010**, *51*, 252-254.
208. Vaisocherova, H.; Faca, V. M.; Taylor, A. D.; Hanash, S.; Jiang, S., Comparative study of SPR and ELISA methods based on analysis of CD166/ALCAM levels in cancer and control human sera. *Biosensors & Bioelectronics* **2009**, *24*, 2143-2148.
209. Vashist, S. K.; Saraswat, M.; Holthoefter, H., Comparative study of the developed chemiluminescent, ELISA and SPR immunoassay formats for the highly sensitive detection of human albumin. *2nd International Conference on Bio-Sensing Technology* **2012**, *6*, 184-193.
210. Yamamoto, M.; Baba, H.; Kakeji, Y.; Endo, K.; Ikeda, Y.; Toh, Y.; Kohnoe, S.; Okamura, T.; Maehara, Y., Prognostic significance of tumor markers in peritoneal lavage in advanced gastric cancer. *Oncology* **2004**, *67*, 19-26.
211. Besselink, G. A. J.; Kooyman, R. P. H.; van Os, P.; Engbers, G. H. M.; Schasfoort, R. B. M., Signal amplification on planar and gel-type sensor surfaces in surface plasmon resonance-based detection of prostate-specific antigen. *Anal. Biochem.* **2004**, *333*, 165-173.
212. Huang, L.; Reekmans, G.; Saerens, D.; Friedt, J. M.; Frederix, F.; Francis, L.; Muyldermans, S.; Campitelli, A.; Van Hoof, C., Prostate-specific antigen immunosensing based on mixed self-assembled monolayers, camel antibodies and colloidal gold enhanced sandwich assays. *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *21*, 483-490.
213. Ratel, M.; Provencher-Girard, A.; Zhao, S. S.; Breault-Turcot, J.; Labrecque-Carbonneau, J.; Branca, M.; Pelletier, J. N.; Schmitzer, A. R.; Masson, J. F., Imidazolium-Based Ionic Liquid Surfaces for Biosensing. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 5770-5777.
214. Breault-Turcot, J.; Masson, J.-F., Microdialysis SPR: diffusion-gated sensing in blood. *Chemical Science* **2015**, *6*, 4247-4254.
215. Breault-Turcot, J.; Masson, J. F., Nanostructured substrates for portable and miniature SPR biosensors. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *403*, 1477-1484.
216. Live, L. S.; Dhawan, A.; Gibson, K. F.; Poirier-Richard, H. P.; Graham, D.; Canva, M.; Vo-Dinh, T.; Masson, J. F., Angle-dependent resonance of localized and propagating surface plasmons in microhole arrays for enhanced biosensing. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *404*, 2859-2868.
217. Bolduc, O. R.; Live, L. S.; Masson, J.-F., High-resolution surface plasmon resonance sensors based on a dove prism. *Talanta* **2009**, *77*, 1680-1687.
218. Live, L. S.; Dhawan, A.; Gibson, K. F.; Poirier-Richard, H.-P.; Graham, D.; Canva, M.; Vo-Dinh, T.; Masson, J.-F., Angle-dependent resonance of localized and propagating surface plasmons in microhole arrays for enhanced biosensing. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2012**, *404*, 2859-2868.
219. Polanski, M.; Anderson, N. L., A list of candidate cancer biomarkers for targeted proteomics. *Biomarker insights* **2007**, *1*, 1-48.
220. Fasano, M.; Curry, S.; Terreno, E.; Galliano, M.; Fanali, G.; Narciso, P.; Notari, S.; Ascenzi, P., The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin. *IUBMB Life* **2005**, *57*, 787-796.

221. Chuang, V. T. G.; Kragh-Hansen, U.; Otagiri, M., Pharmaceutical strategies utilizing recombinant human serum albumin. *Pharm. Res.* **2002**, *19*, 569-577.
222. Hogman, C. F., Preparation and preservation of red cells. *Vox Sang.* **1998**, *74*, 177-187.
223. Toner, M.; Irimia, D., Blood-on-a-chip. In *Annual Review of Biomedical Engineering*, Annual Reviews: Palo Alto, 2005; Vol. 7, pp 77-103.
224. Fan, X. D.; White, I. M., Optofluidic microsystems for chemical and biological analysis. *Nat. Photonics* **2011**, *5*, 591-597.
225. Gardeniers, J. G. E.; van den Berg, A., Lab-on-a-chip systems for biomedical and environmental monitoring. *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, *378*, 1700-1703.
226. Chen, J. D.; Chen, D.; Yuan, T.; Chen, X.; Xie, Y.; Fu, H. L.; Cui, D. X.; Fan, X. D.; Oo, M. K. K., Blood plasma separation microfluidic chip with gradual filtration. *Microelectron. Eng.* **2014**, *128*, 36-41.
227. Aran, K.; Fok, A.; Sasso, L. A.; Kamdar, N.; Guan, Y. L.; Sun, Q.; Undar, A.; Zahn, J. D., Microfiltration platform for continuous blood plasma protein extraction from whole blood during cardiac surgery. *Lab Chip* **2011**, *11*, 2858-2868.
228. Zellner, M.; Winkler, W.; Hayden, H.; Diestinger, M.; Eliassen, M.; Gesslbauer, B.; Miller, I.; Chang, M.; Kungl, A.; Roth, E.; Oehler, R., Quantitative validation of different protein precipitation methods in proteome analysis of blood platelets. *Electrophoresis* **2005**, *26*, 2481-2489.
229. Vaisocherova, H.; Yang, W.; Zhang, Z.; Cao, Z. Q.; Cheng, G.; Pilarik, M.; Homola, J.; Jiang, S. Y., Ultralow fouling and functionalizable surface chemistry based on a zwitterionic polymer enabling sensitive and specific protein detection in undiluted blood plasma. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 7894-7901.
230. Abel, P. U.; von Woedtke, T., Biosensors for in vivo glucose measurement: can we cross the experimental stage. *Biosensors & Bioelectronics* **2002**, *17*, 1059-1070.
231. Knake, R.; Jacquinet, P.; Hodgson, A. W. E.; Hauser, P. C., Amperometric sensing in the gas-phase. *Analytica Chimica Acta* **2005**, *549*, 1-9.
232. Montecillo, M. E.; Yoshidome, T.; Yamagata, T.; Yamasaki, T.; Mitsushio, M.; Sarno, B. J.; Higo, M., Concentration Determination of Individual Components in Methanol-Raffinose Mixtures Using Diffusion through Agar Membrane Attached to a Surface Plasmon Resonance Sensor. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2010**, *83*, 1531-1533.
233. Stevens, R. C.; Soelberg, S. D.; Near, S.; Furlong, C. E., Detection of cortisol in saliva with a flow-filtered, portable surface plasmon resonance biosensor system. *Analytical Chemistry* **2008**, *80*, 6747-6751.
234. Kathawalla, I. A.; Anderson, J. L., Pore-size effects on diffusion of polystyrene in dilute-solution. *Ind. Eng. Chem. Res.* **1988**, *27*, 866-871.
235. Guillot, G.; Leger, L.; Rondelez, F., Diffusion of large flexible polymer-chains through model porous membranes. *Macromolecules* **1985**, *18*, 2531-2537.
236. Renkin, E. M., Filtration, diffusion, and molecular sieving through porous cellulose membranes *J. Gen. Physiol.* **1954**, *38*, 225-243.
237. Jacobs, J. M.; Adkins, J. N.; Qian, W. J.; Liu, T.; Shen, Y. F.; Camp, D. G.; Smith, R. D., Utilizing human blood plasma for proteomic biomarker discovery. *J. Proteome Res.* **2005**, *4*, 1073-1085.
238. Greenwalt, D. E.; Lipsky, R. H.; Ockenhouse, C. F.; Ikeda, H.; Tandon, N. N.; Jamieson, G. A., Membrane glycoprotein-CD36 - A review of its roles in adherence, signal transduction, and transfusion medicine. *Blood* **1992**, *80*, 1105-1115.

239. Demers, A.; McNicoll, N.; Febbraio, M.; Servant, M.; Marleau, S.; Silverstein, R.; Ong, H., Identification of the growth hormone-releasing peptide binding site in CD36: a photoaffinity cross-linking study. *Biochem. J.* **2004**, *382*, 417-424.
240. Bhupathiraju, S. N.; Tucker, K. L., Coronary heart disease prevention: Nutrients, foods, and dietary patterns. *Clin. Chim. Acta* **2011**, *412*, 1493-1514.
241. Bodart, V.; Febbraio, M.; Demers, A.; McNicoll, N.; Pohankova, P.; Perreault, A.; Sejlitz, T.; Escher, E.; Silverstein, R. L.; Lamontagne, D.; Ong, H., CD36 mediates the cardiovascular action of growth hormone-releasing peptides in the heart. *Circ.Res.* **2002**, *90*, 844-849.
242. Aarts, P.; Bolhuis, P. A.; Sakariassen, K. S.; Heethaar, R. M.; Sixma, J. J., Red-blood-cell size is important for adherence of blood-platelets to artery subendothelium. *Blood* **1983**, *62*, 214-217.
243. Schmidtschonbein, G. W.; Shih, Y. Y.; Chien, S., Morphometry of human-leukocytes. *Blood* **1980**, *56*, 866-875.
244. Noris, P.; Biino, G.; Pecci, A.; Civaschi, E.; Savoia, A.; Seri, M.; Melazzini, F.; Loffredo, G.; Russo, G.; Bozzi, V.; Notarangelo, L. D.; Gresele, P.; Heller, P. G.; Pujol-Moix, N.; Kunishima, S.; Cattaneo, M.; Bussel, J.; De Candia, E.; Cagioni, C.; Ramenghi, U.; Barozzi, S.; Fabris, F.; Balduini, C. L., Platelet diameters in inherited thrombocytopenias: analysis of 376 patients with all known disorders. *Blood* **2014**, *124*, E4-E10.
245. Loeb, S.; Catalona, W. J., Prostate-specific antigen in clinical practice. *Cancer Lett.* **2007**, *249*, 30-39.
246. Lilja, H.; Christensson, A.; Dahlen, U.; Matikainen, M. T.; Nilsson, O.; Pettersson, K.; Lovgren, T., Prostate-specific antigen in serum occurs predominantly in complex with alpha-1-antichymotrypsin. *Clin. Chem.* **1991**, *37*, 1618-1625.
247. Stenman, U. H.; Leinonen, J.; Alfthan, H.; Rannikko, S.; Tuhkanen, K.; Alfthan, O., A complex between prostate-specific antigen and alpha-1-antichymotrypsin is the major form of prostate-specific antigen in serum of patient with prostatic-cancer - Assay of the complex improves clinical sensitivity for cancer. *Cancer Research* **1991**, *51*, 222-226.



# **Annexes**

## Annexe 1) Séquençage de protéine

L'identification de protéines digérées par la trypsin (tel que décrit dans le chapitre 2) fut effectuée en utilisant les spectres MS/MS obtenus pour les peptides générés par la digestion. Le logiciel BioTools fut utilisé avec le moteur de recherche Mascot pour faire l'identification de la séquence d'acides aminés pouvant correspondre à une protéine donnée.

The screenshot shows the 'MS/MS Ions Search' window with the following parameters:

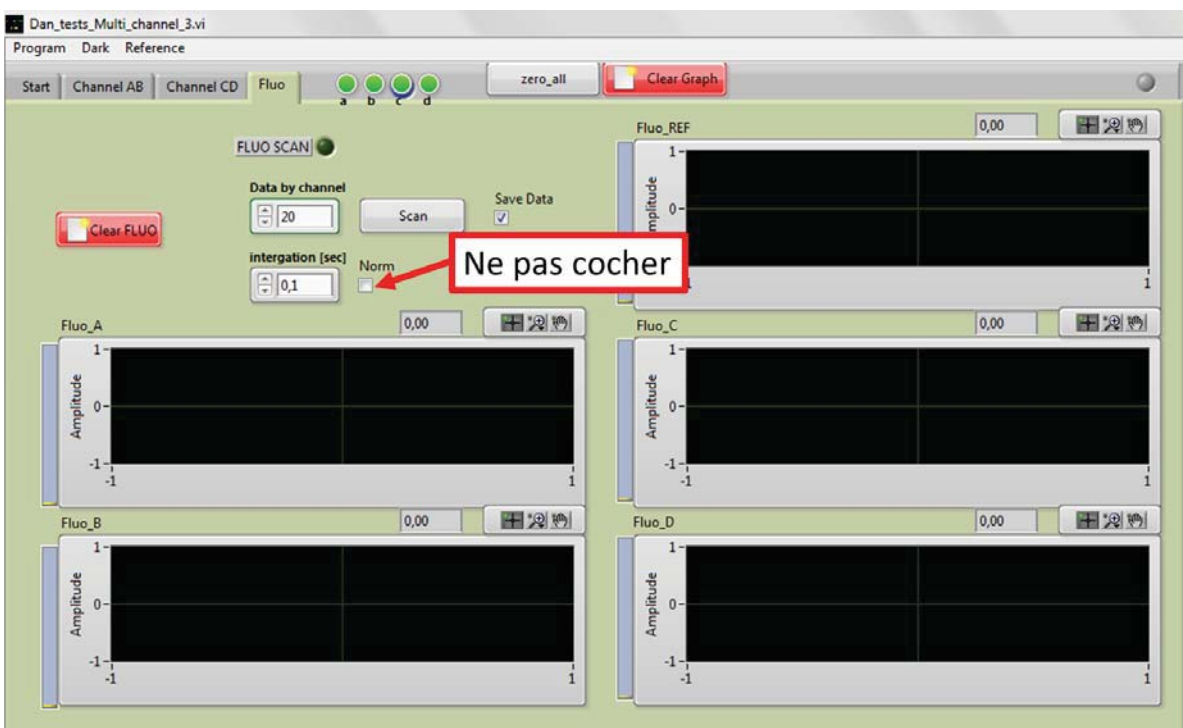
- URL: <http://www.matrixscience.com/cgi/nph-mascot.exe?1>
- User Name: chaurand
- Email: mslab@umontreal.ca
- Search Title: 3014.6
- Taxonomy: Mus musculus (house mouse)
- Database: SwissProt (selected)
- Enzyme: Trypsin
- Partials <=: 1
- Quantitation: None
- Global Modifications: TMT6plex (K) (selected)
- Variable Modifications: Acetyl (K) (selected)
- Protein MW >=: [ ] kDa
- Mass Tol. MS: 0.3 Da
- MS/MS Tol: 0.6 Da
- Charge state: 1+
- 3014.600000
- Search type: Monoisotopic
- Query Data: 86.196349 1485.724524, 112.177026 1458.536803, 129.229198 1960.794281, 175.229310 2554.359403, 211.233866 1594.096944
- Instrument: MALDI-TOF-TOF
- Results: Overview (checked), Report top 20 hits
- Fragmentation: CID (selected)

**Figure A1.1** Paramètres utilisés pour réaliser l'identification des séquences peptidiques associées aux spectres MS/MS générés

Différents paramètres tels que la taxonomie, l'enzyme utilisé pour la digestion, la base de donnée utilisée pour la recherche, l'erreur tolérée sur l'ion parent, l'erreur tolérée sur les ions fragments et l'instrument MS utilisé sont à considérer pour effectuer la recherche en base de données de la séquence peptidique. Les paramètres indiqués dans la **Figure A1.1** étaient généralement utilisés comme point de départ pour faire le séquençage (la taxinomie variait selon l'échantillon analysé). Par la suite, il est possible de raffiner la recherche en diminuant l'erreur tolérée sur l'ion parent et sur les ions fragments pour obtenir les protéines ayant le plus de similitudes avec le spectre MS/MS utilisé.

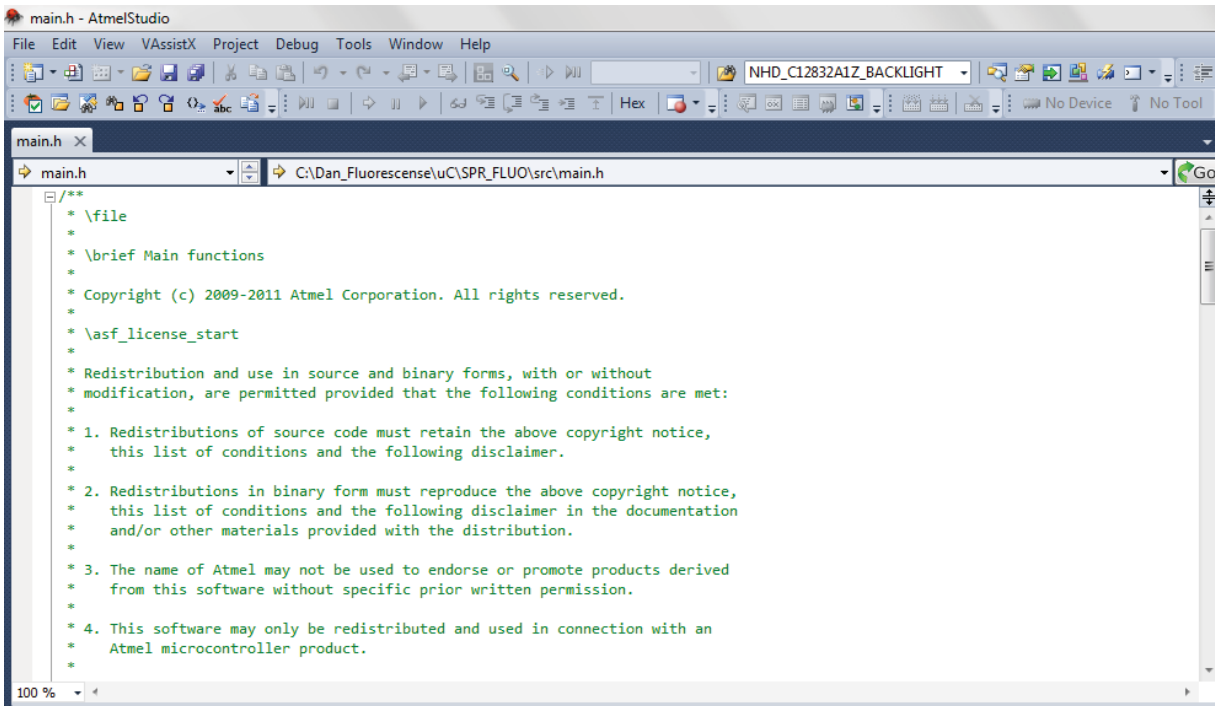
## Annexe 2) Optimisation du positionnement du module de fluorescence pour l'instrument SPR/fluorescence portable

Pour optimiser l'intensité de la fluorescence captée par le détecteur, il est possible de changer les positions où le module de fluorescence effectue les prises de données. Pour étalonner le module de fluorescence, on acquiert la fluorescence pour une solution d'une molécule fluorescente (ex : 50  $\mu\text{M}$  de rhodamine 6G) dans le système SPR/fluorescence. Dans la fenêtre «Fluo» (**Figure A2.1**) du logiciel utilisé pour l'instrument, on sélectionne le nombre de mesures effectué par point (*Data by channel*) et la fréquence d'acquisition (*Interogation*). On s'assure de ne pas cocher «Norm» et de cocher ou non «Save data» selon le cas désiré. Les valeurs d'intensités de fluorescence obtenues alors servent de point de départ pour optimiser le positionnement de la tête pour chacun des points de mesures (A, B, C et D).



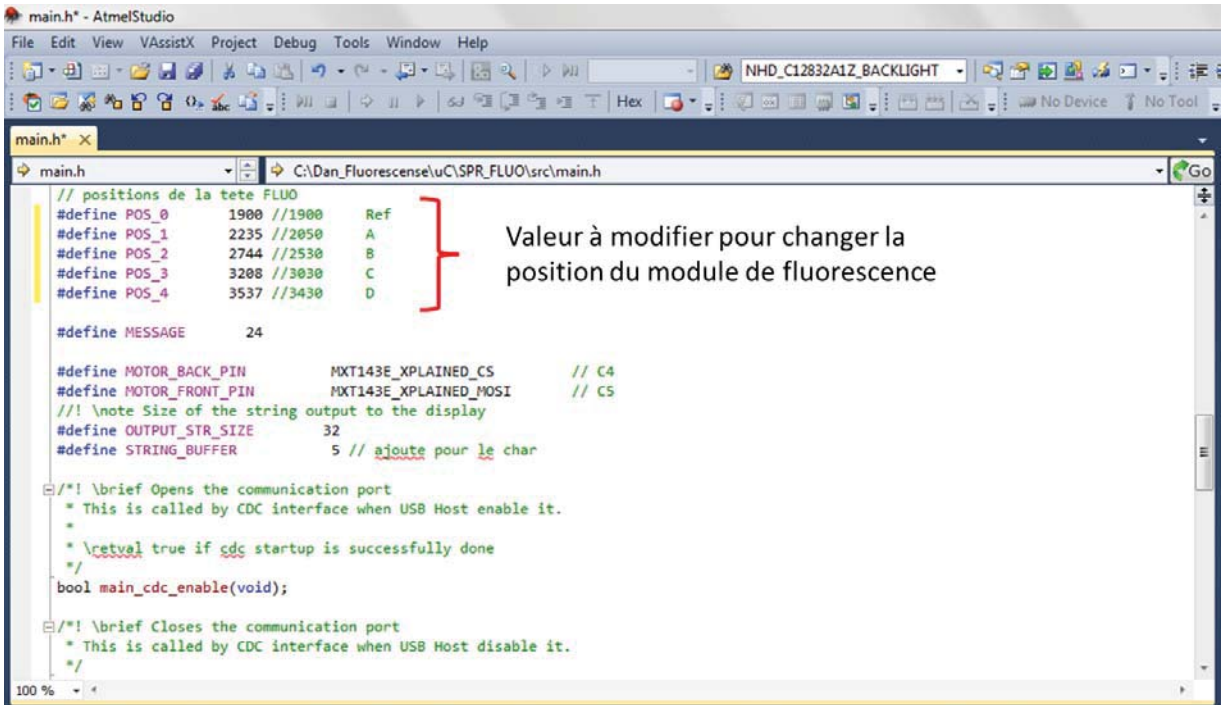
**Figure A2.1.** Onglet du logiciel servant à effectuer l'acquisition de la fluorescence

On peut ensuite faire varier les positions de la tête de fluorescence pour optimiser l'intensité qui est captée au détecteur. Pour modifier ses positions, on doit utiliser le logiciel AtmelStudio (**Figure A2.2**).



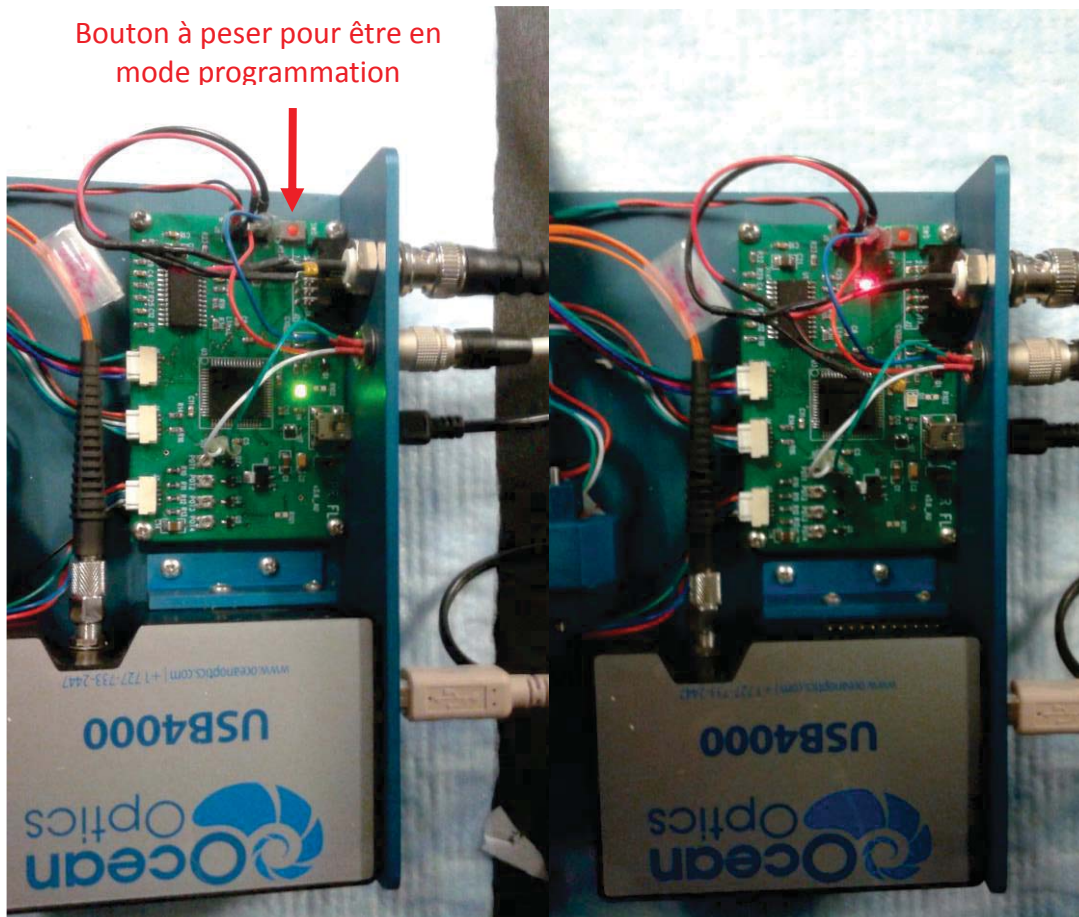
**Figure A2.2.** Logiciel AtmelStudio permettant de modifier les positions analysées par le module de fluorescence

Le nom du fichier à ouvrir est C:\Dan\_Fluorescence\uC\SPR\_FLUO\src\main.h et se trouve sur l'ordinateur contrôlant le module de fluorescence. Ce fichier contient les coordonnées utilisées par la tête de fluorescence pour faire la prise de mesure.



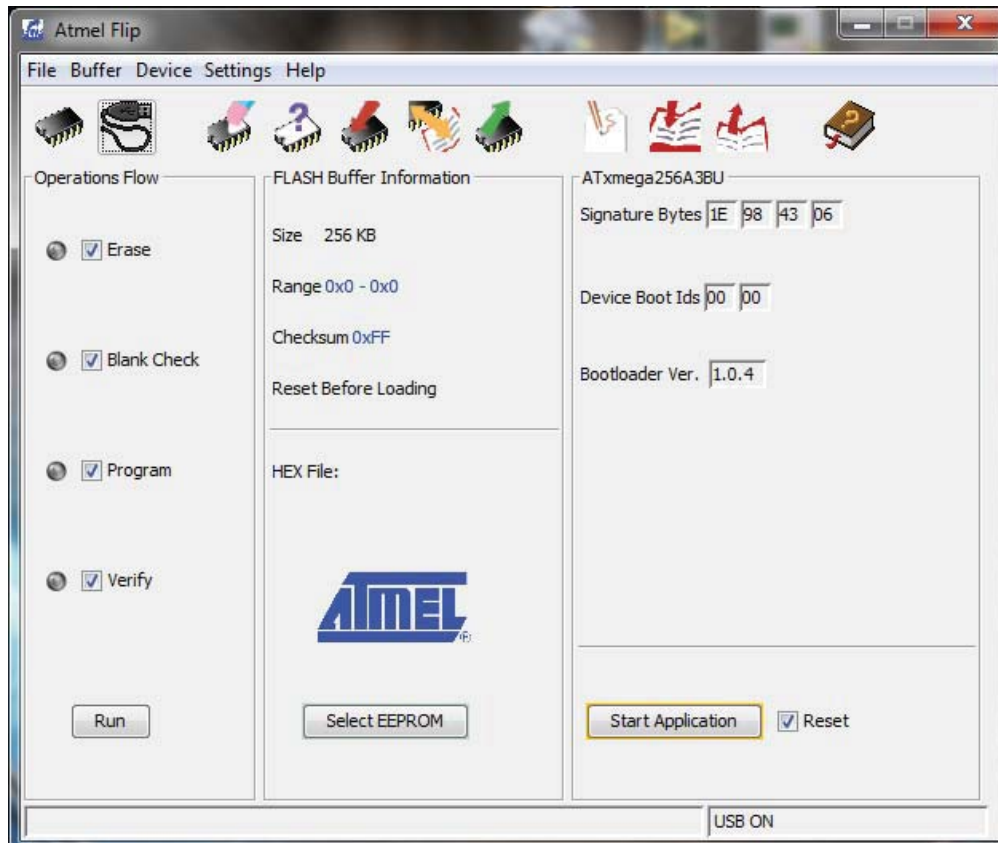
**Figure A2.3.** Logiciel AtmelStudio avec les positions utilisées par le module de fluorescence

En variant les positions de la tête de fluorescence (**Figure A2.3**), en notant les nouvelles intensités de fluorescence obtenue et en les comparant avec les intensités initiales, il sera possible d'évaluer les positions optimales où un maximum de fluorescence sera capté par le détecteur. Pour appliquer les modifications de balayage au module de fluorescence, il faut enregistrer les modifications sur AtmelStudio. Pour reprogrammer le microcontrôleur avec ces nouvelles positions, il faut d'abord passer en mode programmation. Pour y accéder, il faut manuellement presser le bouton rouge à gauche de la carte et introduire le câble de connexion USB déjà connecté à l'ordinateur (**Figure A2.4**). Une fois en mode programmation, une lumière verte apparaîtra sur la carte du montage SPR.



**Figure A2.4.** Microcontrôleur en mode programmation (Gauche) et en mode acquisition (Droite)

Ensuite le programme doit être chargé sur le microcontrôleur en utilisant le logiciel Atmel Flip (**Figure A2.5**). Dans le logiciel, on connecte le système en cliquant sur le dessin de câble USB (en haut à gauche). Ensuite on ouvre le fichier .hex dans C:\Dan\_Fluorescence\uC\SPR\_FLUO\Debug\MICRO\_Version\_FLUO.hex et on clique sur «Run» en bas à gauche de l'écran.



**Figure A2.5.** Logiciel Atmel Flip utilisé pour enregistrer les nouvelles positions à analyser pour le module de fluorescence

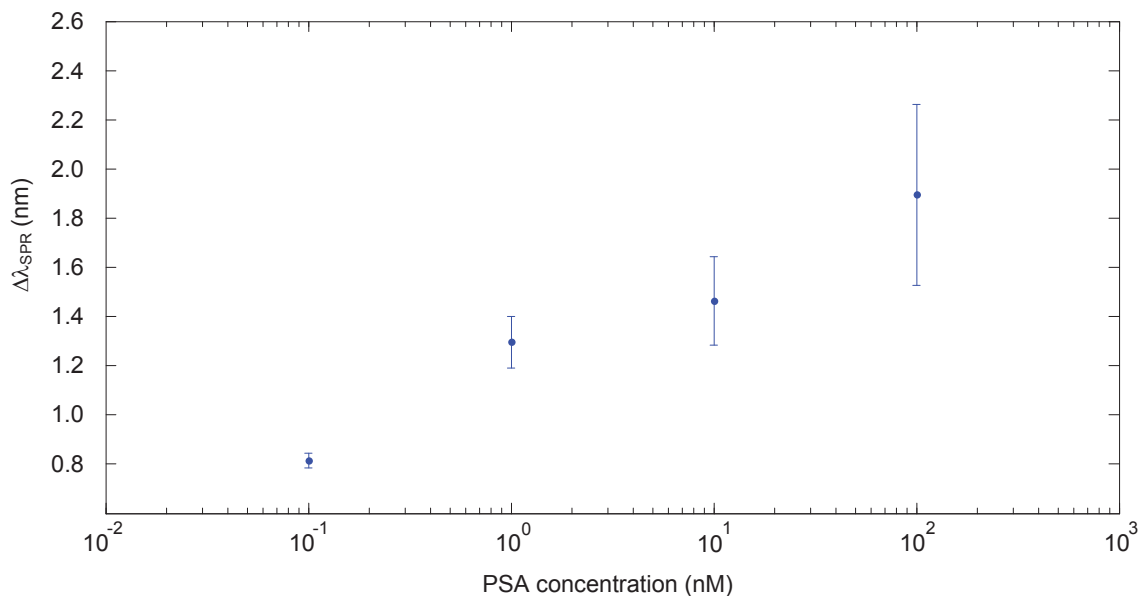
On déconnecte ensuite le câble USB de l'ordinateur, en le reconnectant à l'ordinateur et en ouvrant à nouveau le logiciel d'acquisition on aura une lumière rouge qui s'allumera sur la carte de l'instrument (**Figure A2.4**). On peut alors procéder à la prise de mesure pour les nouvelles positions sélectionnées pour le module de fluorescence et procéder à l'optimisation de l'acquisition de la fluorescence selon sa position.



## **Annexe 3) Détection par SPR de la PSA directement dans un échantillon de sérum bovin n'ayant subi aucun traitement ou purification**

Effectuer des analyses directement dans un fluide biologique complexe (exemple : le sérum) à l'aide de biocapteurs SPR nécessite une chimie de surface minimisant l'adsorption non spécifique de la matrice à de très bas niveaux<sup>5, 30</sup>. Une monocouche constituée d'acide 3-mercaptopropionique-His-His-His-Asp-Asp-COOH (3-MPA-HHHDD-OH) représente un type de chimie de surface limitant l'adsorption non spécifique du sérum<sup>93</sup>. Cette SAM basée sur un peptide fut employée sur un film d'or microtroué pour y prévenir l'adsorption de protéines contenues dans le sérum. La combinaison du matériel plasmonique et de la chimie de surface exploitée fournissait une plateforme de biodétection apte à détecter de faible concentration de PSA humaine directement dans un échantillon de sérum non purifié.

Le même type de manipulation effectué dans le chapitre 3 fut ici utilisé en remplaçant le tampon salin par du sérum. La réponse SPR générée par l'injection de sérum, où aucune PSA n'avait été ajouté, fut mesurée comme référence et soustrait au signal SPR obtenu pour du sérum dopé avec une certaine concentration de PSA. Encore une fois, la PSA formant un complexe avec un anticorps secondaire était utilisé et employé dans le sérum pour permettre des détections à de faibles concentrations de PSA sous la valeur seuil utilisé pour le dépistage du cancer de la prostate (0.15 nM). Il fut ainsi possible de détecter une concentration en PSA de 0.1 nM directement dans un échantillon de sérum (**Figure A3.1**). Du sérum bovin disponible commercialement était dans ce cas utilisé, au lieu de sérum humain, pour minimiser l'impact sur le signal obtenu de la PSA qui serait contenu de façon endogène dans le sérum humain.



**Figure A3.1.** Étalonnage d'un biocapteur SPR pour la détection de PSA directement dans le sérum bovin

Une certaine augmentation du signal SPR est observée lors de la mesure de la PSA dans le sérum par rapport à celle effectuée dans le tampon. En effet, les signaux SPR obtenus pour la détection d'un complexe de PSA et d'anti-PSA à 10 nM dans le tampon et le sérum étaient respectivement de  $(0.64 \pm 0.07)$  nm et  $(1.46 \pm 0.18)$  nm (**Figure 3.1** et **Figure A3.1**). Le sérum est en effet un fluide biologique hautement concentré en protéines<sup>83</sup> et les interactions entre les protéines à d'aussi grande concentration sont communément observées. La liaison de protéines contenues dans le sérum au complexe de PSA pourrait avoir comme effet d'augmenter le poids moléculaire du complexe détecté par le biocapteur. Il en résulterait d'une augmentation du signal SPR observé pour des mesures effectuées dans sérum. En effet, la PSA est reconnue comme étant une protéine ayant une fraction libre et liée à d'autres protéines<sup>245-247</sup>, ceci pourrait fournir une explication à l'augmentation de signal observé en SPR dans de telles conditions.

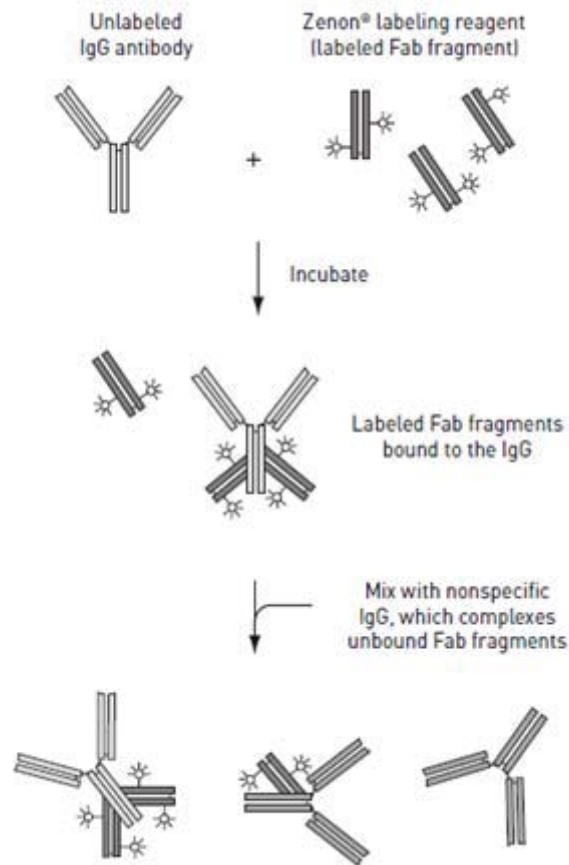
## **Annexe 4) Détection par SPR et fluorescence de la PSA en utilisant un anticorps secondaire marqué avec un fluorophore**

Une alternative au test ELISA décrit dans le chapitre 3 fut d'ajouter directement sur l'anticorps secondaire (anti-PSA) le fluorophore approprié. Cette approche permet une détection de la fluorescence plus directe que le test ELISA proposé puisqu'elle n'implique pas de réaction secondaire de conversion pour générer un produit fluorescent.

Un ensemble de marquage commercial (Zenon® Mouse IgG de ThermoFisher Scientific, voir **Figure A4.1**) fut utilisé pour faire l'ajout d'un fluorophore, soit le Alexa Fluor® 532, sur l'anti-PSA. Un ratio molaire de 3:1 du réactif de marquage Zenon® et de l'anti-PSA fut utilisé pour permettre un marquage de l'ensemble des anticorps en solution. En tenant compte des recommandations du fournisseur du Zenon®, la procédure de marquage fut effectuée à température pièce pour une période de 10 minutes en mélangeant une solution de 1 µg de l'anticorps dans un volume de moins de 15 µL avec 5 µL de la solution du réactif de marquage Zenon®. Un volume de 5 µL d'un agent bloquant (IgG de souris) fournis dans l'ensemble de marquage était ensuite ajouté à température pièce à la solution d'anti-PSA marqué avec le Zenon®. Pour réaliser l'étalonnage de ce système, l'anti-PSA modifié avec le Zenon® pouvait ensuite être incubé à température pièce avec la protéine PSA en suivant le même protocole qui est décrit pour un anti-PSA modifié avec un HRP dans le chapitre 3.

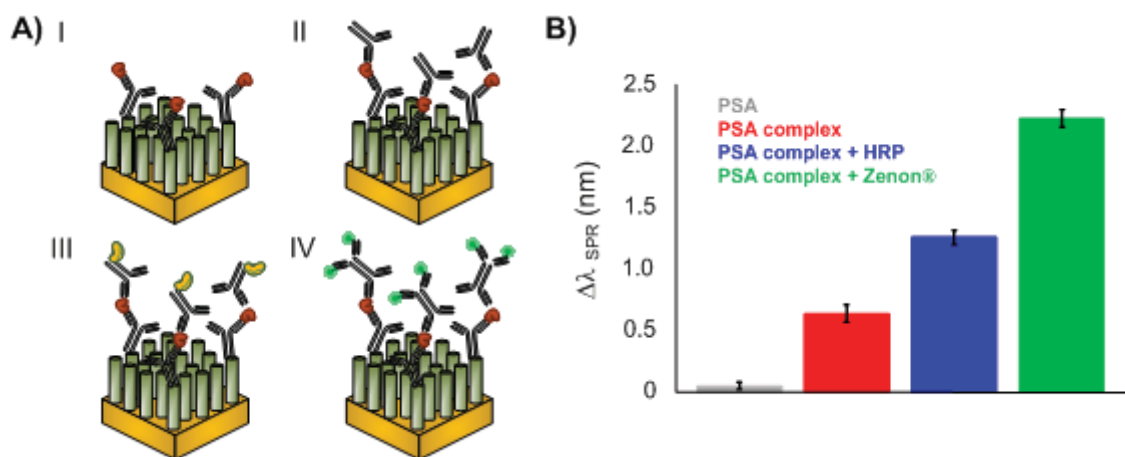
La méthode de marquage génère dans ce cas un anti-PSA pouvant être détecté directement par SPR et fluorescence sans aucune autre réaction secondaire comme pour le système impliquant l'anti-PSA marqué d'un HRP décrit dans le chapitre 3. En présence de PSA en solution, il y aura une liaison de l'anti-PSA marqué par le Zenon® à la surface du capteur SPR et la quantité de PSA pourra ainsi être évaluée par SPR et fluorescence. La détection de la fluorescence dans ce cas se fera directement à la surface du capteur SPR et non en solution. Pour mesurer la fluorescence, on mesure la réponse en fluorescence dans le tampon avant l'ajout du

complexe de PSA/anti-PSA marqué avec le Zenon®. Après l'ajout du complexe de PSA pour une période de 10 minutes et le rinçage du biocapteur avec du tampon, on reprend une mesure de fluorescence, puis on y soustrait la valeur obtenue dans le tampon initialement. La différence de fluorescence proviendra des complexes de PSA anti-PSA marqué avec le Zenon® qui ont été captés à la surface du biocapteur SPR. Le protocole utilisé est donc très similaire à celui rapporté dans le chapitre 3, à l'exception qu'un temps d'exposition par point de 0,1 s et 1 s étaient ici utilisés.



**Figure A4.1.** Méthode de marquage des anti-PSA de l'ensemble commercial Zenon® Alexa Fluor 532 de ThermoFisher Scientific (image provenant du protocole de marquage d'une fiche technique explicative trouvé sur le site internet de la compagnie <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp25000.pdf>)

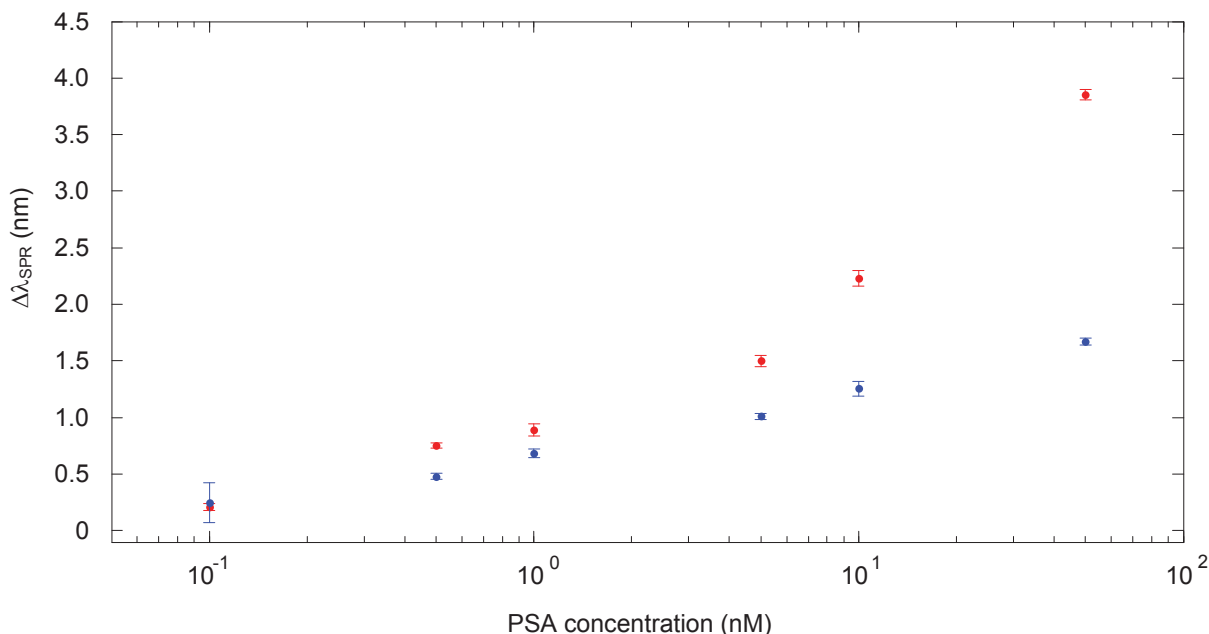
Les modifications apportées au complexe de PSA menaient à une augmentation de la masse molaire de celui-ci, permettant par le fait même d'amplifier le signal SPR obtenu. Le complexe formé par un anti-PSA marqué par le Zenon® et la PSA possède en effet suite aux modifications un poids moléculaire de 278 kDa. Ce complexe aura une masse moléculaire plus importante que celle rapportée pour le complexe entre l'anti-PSA modifié avec un HRP et la PSA qui était de 222 kDa. En raison d'un plus grand poids moléculaire, les modifications impliquant le Zenon® devraient avoir un impact plus important sur l'amplification du signal en SPR que ce qui fut observé pour les anticorps modifiés avec le HRP. La détection de 10 nM de PSA générait en SPR un signal de  $(0.05 \pm 0.03)$  nm pour la protéine PSA sous sa forme libre, de  $(1.26 \pm 0.06)$  nm pour le complexe PSA-anti-PSA-HRP et de  $(2.23 \pm 0.07)$  nm pour le complexe impliquant l'anti-PSA-Zenon® (Voir **Figure A4.2**). On peut ainsi voir la corrélation existant entre la masse du complexe de PSA détecté et le signal SPR enregistré (masse molaire complexe de PSA étudiés : PSA < Anti-PSA < Anti-PSA modifié avec l'enzyme HRP < Anti-PSA modifié avec le Zenon®).



**Figure A4.2.** Différent essai de biodétection de la PSA seule (AI), du complexe PSA-anti-PSA (AII), du complexe PSA-anti-PSA-HRP (AIII) et du complexe PSA-anti-PSA-Zenon® (AIV) avec les signaux SPR obtenus pour une concentration de 10 nM en PSA (B)

En préparant les complexes de PSA avec l'anti-PSA-Zenon® à diverses concentrations, il a été possible d'évaluer la sensibilité de cet essai biologique par SPR et par fluorescence. En

comparant les résultats SPR obtenus pour l'essai avec l'anti-PSA-HRP et l'anti-PSA-Zenon®, il fut observé que le deuxième complexe permet d'avoir une meilleure sensibilité (**Figure A4.3**). Dans les deux cas, il sera également possible de détecter une concentration de 0.1 nM en PSA. L'addition de 2 fragments F<sub>ab</sub> lors de l'utilisation du réactif Zenon® ne semble pas poser de problème d'encombrement stérique dans l'essai biologique développé et la liaison du complexe à la surface du capteur se faire adéquatement.



**Figure A4.3.** Courbe d'étalonnage de la PSA par SPR. La détection fut effectuée en utilisant les complexes où les anti-PSA étaient modifiés avec l'enzyme HRP (bleu) ou avec le Zenon® (rouge). Le poids moléculaire du réactif Zenon® explique la plus grande sensibilité cet essai biologique observe en SPR par rapport à l'essai impliquant l'anti-PSA modifié avec le HRP. Les barres d'erreurs représentent un écart type pour une mesure prise en triplicata.

La biodétection d'un complexe anti-PSA-Zenon® a également été effectuée avec des biocapteurs se trouvant sur un film d'or continu et un film microtroué afin de comparer leur sensibilité respective. La détection de 10 nM du complexe de PSA où l'anticorps est modifié avec le Zenon® a généré un signal de  $(1.26 \pm 0.05)$  nm pour le film d'or continu et de  $(2.23 \pm 0.07)$  nm pour le film de microtrous. Le signal SPR augmente donc d'environ un facteur deux

quand la biodétection est effectuée avec un film microstructuré, ce qui est en accord avec les tendances observées précédemment<sup>215, 216</sup>.

Malgré les résultats encourageants obtenus en SPR pour le système impliquant l'anticorps marqué avec le Zenon®, il ne fut toutefois pas possible d'abaisser la limite de détection au-delà de 0.1 nM. Le potentiel de mesurer la fluorescence de l'essai impliquant le Zenon® fut ensuite analysé en utilisant l'instrument de SPR/fluorescence. La principale différence de ce test par rapport à l'essai impliquant le HRP et l'Ampliflu™Red du chapitre 3 est que la fluorescence proviendra dans ce cas uniquement d'un mince film de molécules fluorescentes à la surface du capteur et non du volume total de la fluide. Il fut tout de même possible de mesurer un signal de  $(325 \pm 7)$  counts pour 10 nM de PSA formant un complexe avec un anticorps modifié par le Zenon®. Aucun signal ne fut toutefois obtenu pour des concentrations plus faibles en PSA. Des améliorations au niveau du détecteur et du module de fluorescence utilisé pourraient grandement améliorer la sensibilité de l'instrument tout en diminuant la quantité de PSA pouvant être détecté en fluorescence via cette approche.