

Université de Montréal

**Développement de chimie de surface pour la réduction de
l'adsorption non-spécifique de lysat cellulaire et application
clinique de biocapteurs SPR**

par Alexandra Aubé

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 *philosophiæ doctor* (PhD) en chimie

Décembre 2016

© Alexandra Aubé, 2016

RÉSUMÉ DE LA THÈSE

Le travail présenté dans cette thèse porte sur le développement de chimie de surface et de biocapteurs pouvant être utilisés dans le milieu hospitalier afin d'améliorer les méthodes de dépistages et de suivi de traitement de diverses maladies et cancers. Les méthodes actuelles de dépistage du cancer reposent principalement sur l'analyse histologique des cellules par des experts dans le domaine. Cela complique la transmission de l'information au patient et retarde le moment où un traitement approprié peut être entamé. Grâce à de nouvelles techniques d'analyses simples et peu coûteuses comme la spectroscopie de résonance des plasmons de surface (SPR), il est possible de développer des tests qui pourront être effectués par le personnel de l'hôpital, en peu de temps et à peu de frais. Afin de pouvoir utiliser la SPR en milieu clinique, une chimie de surface appropriée doit être développée afin d'empêcher les matrices biologiques de masquer le signal des analytes d'intérêt. En effet, qu'il s'agisse de lysat cellulaire, de sérum ou de tout autre fluide biologique, le contenu protéique et lipidique peut s'adsorber de façon non-spécifique aux surfaces d'analyse, compromettant ainsi les résultats obtenus.

Afin de pallier ce problème, le développement de chimie de surface a été effectué. Des monocouches de peptides et de liquides ioniques ont été utilisées afin de réduire l'adsorption non-spécifique de lysat cellulaire non-dilué sur des capteurs SPR. Parmi les peptides, le plus efficace s'est avéré être le 3-MPA-(His)₂(Leu)₂(Phe)₂-OH, un peptide chargé positivement formé de 6 acides aminés plutôt hydrophobes. Grâce à cette surface, l'adsorption non-spécifique de lysat cellulaire a pu être réduite jusqu'à 159 ± 27 ng/cm², par rapport à 929 ± 186 ng/cm² sur une surface d'or non protégée. Une étude en spectrométrie de masse a permis de mieux comprendre le phénomène d'adsorption non-spécifique de lysat cellulaire et de confirmer que ce sont principalement des lipides qui s'adsorbent non-spécifiquement au capteur SPR lorsque celui-ci est exposé à du lysat cellulaire.

Malgré la nette amélioration par rapport à un capteur non protégé, le phénomène d'adsorption non-spécifique était encore significativement présent avec les

monocouches de peptides. L'adsorption non-spécifique de lysat cellulaire a ensuite été drastiquement réduite grâce aux liquides ioniques hydrophobes et chargés. Le liquide ionique le plus performant a montré une adsorption non-spécifique d'à peine 2 ± 2 ng/cm². Par la suite, un biocapteur permettant la détection de HER2, un biomarqueur de cancer du sein présent dans environ 30% des cas de cancers du sein agressifs, a été développé. Cela a permis de démontrer que le liquide ionique pouvait être utilisé pour la construction d'un biocapteur, ouvrant ainsi la porte à un large domaine d'analyses en lysat cellulaire.

Finalement, les défis de l'analyse SPR avec des échantillons cliniques ont été explorés par le développement d'un biocapteur pour l'anti-asparaginase, permettant de faire le suivi de traitement de patients atteints de leucémie. L'asparaginase est administrée aux patients leucémiques, en combinaison avec plusieurs autres composés chimiothérapeutiques, afin de combattre ce cancer. Toutefois, plusieurs patients ont une réaction allergique à cette protéine de source bactérienne, mais ne démontrent pas de symptômes physiques. Le biocapteur développé visait donc à détecter les réactions immunitaires des patients afin de modifier leur traitement lorsque cela s'avère nécessaire. Un biocapteur pour la détection de l'anti-asparaginase dans le sérum non-dilué de patients leucémiques a donc été développé. Des échantillons cliniques ont été étudiés et les résultats obtenus pour le nouveau biocapteur SPR ont montré une bonne concordance avec les résultats obtenus en ELISA.

Mots clés : Spectroscopie de résonance des plasmons de surface (SPR), chimie de surface, peptide, liquide ionique, leucémie, asparaginase, cancer, HER2, biomarqueur, biocapteur

ABSTRACT

This thesis describes the development of clinical biosensors. These biosensors were developed with the aim of improving diagnostic and treatment monitoring methods. Actual monitoring methods often rely on histological analysis performed by experts. This complicates the transmission of the information to the patient and delays the onset of an appropriate treatment. It is envisioned to develop simple experiments at low cost, which will allow untrained personnel to perform the testing on-site with biosensing technologies such as surface plasmon resonance (SPR). In order to perform SPR in clinical analysis, appropriate surface chemistry must be developed to prevent nonspecific adsorption. Nonspecific adsorption is the fouling of surfaces with biomolecules contained in the sample matrix such as proteins or lipids of biofluids. This leads to false positive signals preventing the correct measurement of the analyte concentration.

Peptide and ionic liquid monolayers have been studied in this thesis to prevent nonspecific adsorption of undiluted cell lysate. The most efficient peptide was the 3-MPA-(His)₂(Leu)₂(Phe)₂-OH peptide, a 6 amino acids hydrophobic and positively charged peptide. The nonspecific adsorption of cell lysate was reduced to 159 ± 27 ng/cm², compared to 929 ± 186 ng/cm² on a bare gold surface. Also, mass spectrometry was performed to better understand the cell lysate nonspecific adsorption phenomenon. This study showed lipids were mostly adsorbed on the sensor when exposed to cell lysate.

Despite a significant reduction of nonspecific adsorption with peptides, it remained unoptimal and should be improved. The newly developed hydrophobic and charged ionic liquids nearly eliminated the nonspecific adsorption of undiluted cell lysate, with only 2 ± 2 ng/cm² of nonspecific material adsorbed on the surface. Then, a biosensor of an aggressive breast cancer biomarker, HER2, was developed. This proved that the ionic liquids could be used in the development of clinical biosensors.

Finally, the challenges of the analysis of clinical samples with SPR sensing were explored with the development of an anti-asparaginase biosensor for leukemic

patients. Asparaginase is a chemotherapeutic drug administered to patients in combination with various other drugs to treat leukemia. However, many patients suffer from silent allergic reactions due to the bacterial source of this drug. Therefore, a biosensor was developed to detect the antibodies in undiluted serum produced against the drug, which could ultimately serve to modify the patient's treatment when necessary. Clinical samples from leukemia patients were studied and the results were in good agreement with ELISA experiments.

Key words: Surface plasmon resonance (SPR), surface chemistry, peptide, ionic liquid, leukemia, asparaginase, cancer, HER2, biomarker, biosensor

TABLE DES MATIÈRES

Résumé de la thèse	iii
Abstract	v
Liste des tableaux	xi
Liste des figures.....	xii
Liste des abréviations	xv
Remerciements	xix
1 Chapitre I : Introduction	1
1.1 Contexte.....	1
1.2 Le cancer dans la médecine actuelle.....	3
1.2.1 Dépistage du cancer.....	4
1.2.2 Cancer du sein	5
1.2.3 Leucémie	7
1.3 Techniques d'Analyse bioanalytique.....	10
1.3.1 ELISA.....	10
1.3.2 Les biocapteurs.....	13
1.3.3 La spectroscopie de résonance des plasmons de surface	13
1.3.4 Comparaison de la SPR et de l'ELISA	19
1.3.5 Analyse SPR en matrice complexe : le défi de l'adsorption non-spécifique.....	21
1.4 Chimie de surface	23
1.4.1 Les monocouches auto-assemblées	23
1.4.2 Réduction de l'adsorption non-spécifique grâce au développement de chimie de surface.....	26
1.4.3 Peptides	34

1.4.4	Liquides ioniques	39
1.5	Objectifs de la thèse	44
2	Chapitre II Nonspecific Adsorption of Crude Cell Lysate On SPR Sensors..	47
2.1	Abstract	48
2.2	Introduction	48
2.3	Experimental Section	51
2.3.1	Peptide-modified SPR chips	51
2.3.2	Cell Lysate	51
2.3.3	SPR Measurements	52
2.3.4	MALDI-TOF/TOF MS of nonspecifically bound molecules	53
2.4	Results and Discussion.....	53
2.4.1	Nonspecific adsorption of homopeptides.....	53
2.4.2	Nonspecific adsorption on diblock and triblockpeptides.....	58
2.4.3	MS analysis of adsorbed molecules from cell lysate	62
2.5	Conclusions	66
2.6	Acknowledgements	66
3	Chapitre III Ultra-low fouling alkylimidazolium modified surfaces for the detection of HER2 in breast cancer cell lysate	69
3.1	Abstract	70
3.2	Introduction	70
3.3	Materials and Methods.....	73
3.3.1	Ionic liquid synthesis	73
3.3.2	Peptide synthesis.....	73
3.3.3	Fabrication of the SPR sensor chips	73
3.3.4	Functionalization of the SPR sensor chips.....	73
3.3.5	Cell lysate.....	74

3.3.6	SPR experiments.....	75
3.4	Results and Discussion	76
3.4.1	Antifouling SAM development.....	76
3.4.2	Nonspecific adsorption experiments	78
3.4.3	Biosensing experiments.....	84
3.5	Conclusion.....	89
3.6	Acknowledgements.....	89
3.7	Supporting information.....	90
3.7.1	General information	90
3.7.2	Ionic liquid synthesis.....	91
3.7.3	SPR measurements.....	97
4	Chapitre IV Response monitoring of acute lymphoblastic leukemia (ALL) patients undergoing L-asparaginase therapy: Successes and challenges associated with clinical sample analysis in plasmonic sensing	101
4.1	Abstract.....	102
4.2	Introduction.....	103
4.3	Materials and methods.....	105
4.3.1	Peptide synthesis	105
4.3.2	Sensor chip fabrication for metal chelation of His-tagged EcAII	106
4.3.3	L-Asparaginase preparation	107
4.3.4	SPR experiments	107
4.3.5	Patients undergoing ALL treatment	109
4.3.6	SPR analysis of clinical samples	109
4.3.7	Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).....	109
4.4	Results and Discussion	110
4.4.1	Design of the biosensor	110

4.4.2	Quantification of anti-asparaginase antibodies buffer	113
4.4.3	Quantification of anti-asparaginase antibodies in undiluted human serum	114
4.4.4	Quantification of anti-asparaginase antibodies in clinical serum samples	116
4.5	Conclusion.....	121
4.6	Acknowledgements	122
4.7	Supporting Information	122
4.7.1	Reagents and biological compounds.....	122
5	Conclusions et perspectives	125
6	Bibliographie.....	133
7	Annexe	i

LISTE DES TABLEAUX

Table 2.1. Influence of the hydrophobicity of the amino acid on nonspecific adsorption from cell lysate on pentapeptide SAMs.....	55
Table 2.2. Nonspecific adsorption from diluted cell lysate on peptide SAMs of different lengths.....	56
Table 2.3. Nonspecific adsorption from diluted cell lysate on diblock pentapeptide SAMs.....	58
Table 2.4. Nonspecific adsorption from concentrated cell lysate on triblock hexapeptide SAMs	60
Table 2.5. Comparison of nonspecific adsorption from concentrated cell lysate on various surfaces	61
Table 2.6. MALDI-TOF/TOF analysis of nonspecifically adsorbed protein on 3-MPA-(Leu) ₅ -OH SAM.....	63
Table 2.7. MALDI-TOF/TOF analysis of nonspecifically adsorbed lipids on various SAMs.....	65
Table 3.1 Nonspecific adsorption of SK-BR-3 cell lysate on different self-assembled monolayers	99

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Schématisation de l'essai sandwich dans une analyse ELISA	11
Figure 1.2 Principe de la spectroscopie de résonance des plasmons de surface	14
Figure 1.3 Configuration optique des instruments SPR.....	16
Figure 1.4 Déplacement de la bande SPR suite à l'augmentation de l'indice de réfraction à la surface (A) et suivi en temps réel de la position du minimum de la bande SPR (B).....	17
Figure 1.5 Comparaison du temps d'analyse pour les méthodes d'ELISA et de SPR	20
Figure 1.6 Illustration du phénomène d'adsorption non-spécifique de lysat cellulaire sur un capteur sans monocouche auto-assemblée (A) et avec une monocouche auto-assemblée visant à réduire l'adsorption non-spécifique (B).....	22
Figure 1.7 Illustration de l'étude du phénomène de mouillabilité des surfaces par la mesure de l'angle de contact.....	25
Figure 1.8 Principe de l'instrumentation d'un appareil de spectrométrie de masse MALDI-TOF.....	32
Figure 1.9 Structure chimique d'un peptide formé de 6 acides aminés et ayant un groupement thiol au N-terminal.....	35
Figure 1.10 Schématisation des structures des monocouches auto-assemblées peptidiques utilisées pour la réduction de l'adsorption non-spécifique de lysat cellulaire.....	36
Figure 1.11 Synthèse peptidique sur support solide	38
Figure 1.12 Noyaux et contre-ions communs des liquides ioniques	40
Figure 1.13 Schématisation des structures des monocouches auto-assemblées de liquides ioniques utilisées pour la réduction de l'adsorption non-spécifique de lysat cellulaire.....	42

Figure 2.1 General structure of 3-MPA-amino acid –OH type peptides.....	54
Figure 2.2 Overview of reduction of nonspecific adsorption from cell lysate with peptide SAMs; 3-MPA-(Ser) ₅ -OH (dark blue), Au (red), 3-MPA-(Leu) ₃ (Phe) ₂ -OH (green), HS-PEG (light blue) and 3-MPA-(His) ₂ (Leu) ₂ (Phe) ₂ -OH (pink).....	61
Figure 2.3 Mass spectrum of adsorbed lipids on 3-MPA-(Ser) ₅ -OH SAM with CHCA matrix (A). MS/MS spectrum of the lipid at m/z 761.9 (B).....	64
Figure 3.1 Structures of the ionic liquids designed to reduce nonspecific adsorption of cell lysate.....	76
Figure 3.2 Synthesis of 1-(2-carboxyethyl)-3-(12-mercaptododecyl)-1H-imidazolium bromide (n=1, [(HS) ¹² C ₁₂ (COOH) ² C ₂ im] ⁺) and 1-(5-carboxypentyl)-3-(12-mercaptododecyl)-1H-imidazolium bromide (n=4, [(HS) ¹² C ₁₂ (COOH) ⁵ C ₅ im] ⁺).....	77
Figure 3.3 Contact angle of the different monolayers used to reduce nonspecific binding of cell lysate	79
Figure 3.4 Dynamic nonspecific adsorption of SK-BR-3 crude cell lysate on ionic liquid monolayers. (A) Effect of the chain length and (B) effect of the nature of the counterion.....	80
Figure 3.5 Nonspecific adsorption of SK-BR-3 cell lysate measured by SPR reported in surface coverage (Γ) on different self-assembled monolayers (see legend) and example of SPR sensorgrams of relevant SAMs (inset).	81
Figure 3.6 Mixed monolayers to reduce nonspecific adsorption of cell lysate. Red x are contact angle, blue spheres are residual nonspecific adsorption and green triangles are dynamic nonspecific adsorption.....	84
Figure 3.7 Difference in nonspecific adsorption on [(HS) ¹² C ₁₂ (COOH) ⁵ C ₅ im] ⁺ Br ⁻ of native IL-SAM and modified with RP04 antibody	86
Figure 3.8 Schematic representation of the HER2 detection with SPR sensing	87
Figure 3.9 HER2 secondary detection in undiluted cell lysate by a sandwich assay on [(HS) ¹² C ₁₂ (COOH) ⁵ C ₅ im] ⁺ Br ⁻ SAM.	88
Figure 3.10 Synthesis of 1-(2-carboxyethyl)-3-(12-mercaptododecyl)-1H-imidazol-3-ium bromide (n=1) and 1-(5-carboxypentyl)-3-(12-mercaptododecyl)-1H-	

imidazol-3-ium bromide (n=4) (The same figure is found in the paper (Figure 2). It was repeated here for clarity.)..... 91

Figure 3.11 Different calculation techniques for the measurement of the nonspecific binding shift on a SPR sensorgram..... 97

Figure 3.12 SPR sensorgram of HER2 detection in undiluted cell lysate by a sandwich assay on $[(HS)^{12}C_{12}(COOH)^5C_{5im}]^+ Br^- SAM$. Complete sensorgram (A) and zoom on the secondary detection with a Savitzki-Golay smoothing ($x \pm 2$) (B). 98

Figure 4.1 Anti-asparaginase biosensor (A) and scheme of the different L-asparaginase receptor constructions (B). Direct detection and secondary detection schemes for anti-L-asparaginase detection (C)..... 111

Figure 4.2 SPR calibration curves for the detection of rabbit anti-asparaginase in spiked PBS (A) and human serum (B)..... 113

Figure 4.3 SPR calibration curves for the detection of rabbit anti-asparaginase with N26-EcAII receptor spiked undiluted human serum. 115

Figure 4.4 Comparison of the SPR and ELISA results of the detection of anti-asparaginase in clinical samples with direct and secondary detection (A) and SPR signal for the secondary detection of human anti-asparaginase antibodies in blank (B). 117

Figure 4.5 Comparison of the SPR and ELISA results..... 119

Figure 4.6 Non-specific binding control on different sensors compared to the anti-asparaginase SPR signal. 123

Figure 4.7 Washing and regeneration of the SPR sensor chip to confirm that the N(tag)26 (A), N(tag)21 (B) and C(tag)8 (C) receptor is bound by the His-tag on the surface. 123

LISTE DES ABRÉVIATIONS

RNA : Ribonucleic acid (acide ribonucléique – ARN)

% CV : Coefficient of variation (coefficient de variation – %CV)

DNA : Deoxyribonucleic acid (acide désoxyribonucléique – ADN)

ELISA : Enzyme linked immunosorbent assay (méthode immuno-enzymatique – ELISA)

HRP : Horseradish peroxidase (peroxidase de raifort – HRP)

HER2 : Human epidermal growth factor (récepteur pour les facteurs de croissance épidermiques humains – HER2)

ALL : Acute lymphoblastic leukemia (leucémie lymphoblastique aigüe – LLA)

MALDI-TOF : Matrix-assisted laser desorption ionisation time of flight (désorption-ionisation laser assistée par matrice temps de vol – MALDI-TOF)

MS : Mass spectrometry (spectrométrie de masse – MS)

PBS : Phosphate buffered saline (tampon phosphate salin – PBS)

PEG : Polyethylene glycol (polyéthylène glycol – PEG)

RIU : Refractive index unit (unité d'indice de réfraction – RIU)

NMR : Nuclear magnetic resonance (résonance magnétique nucléaire – RMN)

SAM : Self-assembled monolayer (monocouche auto-assemblée – SAM)

SPR : Surface plasmon resonance (résonance des plasmons de surface – SPR)

TMB : Tetramethylbenzidine (tétraméthylbenzidine – TMB)

À papi

REMERCIEMENTS

Je souhaite profiter de cet espace plus personnel pour remercier sincèrement toutes les personnes m'ayant encouragée et soutenue durant mes cinq années de doctorat. Les défis rencontrés sur mon parcours étaient loin d'être ceux auxquels je m'étais attendue et c'est grâce à la présence d'un entourage extraordinaire que j'ai pu conserver autant d'enthousiasme et de plaisir tout au long de mes études.

Tout d'abord, j'aimerais remercier mon père, Alain, mais surtout papa. Papa, c'est grâce à toi que j'ai eu le courage de débiter mon doctorat, directement après mon bac, même si j'avais peur de cette montagne devant moi. Tu m'as dit, avec ton habituel air moqueur « Tu as peur que ça soit beaucoup de travail ? Ce n'est pas une raison ! Vas-y, tu es capable » et j'ai su qu'effectivement, j'y arriverais. Merci papa.

Ensuite, je souhaiterais remercier ma mère, Marguerite, maman pour moi. Maman, c'est grâce à ta persévérance à me forcer à jouer dehors même quand je me plaignais que j'avais trop de devoirs en étant jeune que j'ai appris, bien malgré moi, à ne jamais négliger ma santé, peu importe la quantité de travail devant moi. Chaque fois que je me suis donné le droit de prendre une pause, pour ma santé physique (et souvent mentale), c'était grâce à toi. Merci maman.

J'aimerais maintenant remercier mon amoureux, Mat, qui me supporte tous les jours lors des périodes de stress, quand je suis fatiguée mais pas tant que ça finalement, joyeuse, ah non finalement, oh, d'accord oui, peut-être, quand je ne veux pas être seule mais que je ne suis « pas parlable », fâchée mais contente, que même mes émotions ont leurs propres émotions et que plus rien n'est endurable. Je t'aime.

Mon groupe, mon cher groupe, eh que je vous aime et une chance que je vous ai ! Oli, Mathieu, Ludo, Félix, Gen, Jer, Simon et Simon, Kristy, Natalia, Marie et Ben les petits nouveaux, Thierry et surtout mes gars du bureau Julien, Hugo et Max, merci d'avoir rendu mon expérience extraordinaire avec autant de niaiseries que d'intelligence, vous êtes tous incroyablement précieux pour moi. Merci d'avoir mangé tous les gâteaux que je ne voulais pas garder chez moi parce que je les aurais

mangés toute seule, merci d'avoir goûté 10 différentes sortes de gâteaux au chocolat pour me supporter dans mon optimisation complètement excessive de recette, merci d'avoir apporté de la joie dans mon quotidien. Continuez de sourire et d'avoir autant de plaisir, même si, vous aussi, vous êtes (ou étiez) aux cycles supérieurs et que vous n'avez pas toujours nécessairement le moral au plus haut.

Merci à mes merveilleux amis, Jeff et Sarah de ne pas avoir besoin d'une raison pour que je débarque dans votre bureau, ou vous dans le mien, et qu'on se fasse un souper à l'improviste quand on n'est plus capable de la recherche. Merci de me comprendre et de toujours être là. Merci aussi à Momo de toujours me trouver si bonne et d'avoir autant confiance en moi. Tu as réussi à me convaincre que j'étais encore capable quand j'en avais besoin.

Merci à tous mes supers autres collègues d'Université que je ne veux pas oublier et à qui j'ai eu la chance de dire bonjour dans les corridors. Certains d'entre vous ont même été assez gentils et patients pour m'aider lorsque je faisais de l'organique et que j'avais désespérément besoin d'aide. Merci pour votre patience et votre sourire.

Merci à ma famille, cousins, cousines, oncles, tantes et grands-parents, de tellement m'encourager et d'être aussi fiers de moi. Votre amour me donne du courage, vous me faites tellement de bien. Et merci à mes extraordinaires petits frères que j'aime plus que tout au monde de me ramener sur terre au besoin, de me brasser juste assez et de me faire sentir comme chez moi, peu importe où je suis. Merci Fax, Lulu et coco.

Je voudrais aussi dire un énorme merci à mon comité de thèse qui m'a encouragée à grandir, à prendre confiance et à croire en moi. Merci de m'avoir encouragée à rédiger ma thèse à ma façon, en respectant mes idées et mon style. J'ai adoré mon expérience et je suis fière du chemin que j'ai parcouru. Merci aussi à Professeure Joelle Pelletier qui m'a énormément aidée tout au long de mon doctorat. Merci de ta patience et de ton support.

Et finalement, je voudrais remercier Jean-François, mon directeur de recherche. Jean-François, je n'arrive pas à trouver les mots qui pourraient décrire pleinement l'immensité de ma gratitude et de ma reconnaissance envers toi. Pour moi, tu as été un directeur de recherche inespérément, indescriptiblement parfait. Par ton accessibilité, tes encouragements, ta compréhension et ton désir de vouloir le meilleur pour tes étudiants, tu m'as donné envie de me dépasser, de donner le maximum de moi-même, même si j'étais parfois découragée. Je te remercie de toujours avoir été accessible, ta porte était ouverte chaque fois que j'avais des questions, sur la recherche et sur l'écriture, et ce, malgré ton emploi du temps incroyablement chargé. Merci d'avoir lu et re-lu et (re)_n-lu mes articles, review et thèse, de les avoir travaillés avec moi, d'avoir pris le temps de m'apprendre à m'améliorer. Merci de ne pas prendre le chemin facile de tout faire à notre place même si ça serait plus rapide pour toi, d'avoir la bonté et la persévérance de nous montrer. Merci d'avoir l'immense générosité de partager tes connaissances et de tout faire pour que tes étudiants se développent pleinement, en tant que chercheurs, mais aussi en tant que personnes. J'ai eu la chance de m'épanouir dans d'autres sphères de ma vie et de débiter un emploi qui me passionne profondément parce que tu m'as permis de passer du temps ailleurs qu'au labo, sans pression ni reproche. Tu n'as pas idée à quel point ce cadeau est précieux. Tu as accueilli la jeune fille que j'étais en sortant du bac, intimidée par la recherche et les cycles supérieurs, et tu m'as guidée dans mon parcours pour devenir une jeune chercheuse et adulte.

Milles merci Jean-François. Ton intelligence et ta gentillesse sont remarquables et tu les partages sans compter. Je me considère énormément choyée d'avoir eu l'honneur de faire partie de ton groupe de recherche.

CHAPITRE I : INTRODUCTION

1.1 CONTEXTE

Dans le domaine de la chimie bioanalytique, les techniques d'analyses se multiplient et les performances des nouveaux instruments surpassent sans cesse les standards établis par les instruments antérieurs. L'effervescence du domaine donne lieu à une multitude de travaux de recherche démontrant des performances analytiques inégalées, d'une part par la sensibilité des techniques, d'autre part par la polyvalence de leurs domaines d'applications. Au moment de la rédaction de cette thèse, plusieurs techniques bioanalytiques avaient été développées par différents chercheurs pour permettre la quantification de biomarqueurs d'intérêts, comme les biomarqueurs de cancer. Par contre, encore peu de ces techniques permettaient la détection directement en matrice complexe, une étape nécessaire pour analyser les échantillons cliniques rapidement et à proximité du patient. Une telle détection permettrait de réduire le temps de préparation des échantillons, donnant ainsi la possibilité au médecin de transmettre les résultats au patient beaucoup plus rapidement. Dans certains cas, le suivi très serré d'un traitement peut bénéficier d'une analyse rapide, lorsqu'il est nécessaire d'ajuster le taux de médicament dans le sang par exemple.

La rareté des études effectuées en matrice complexe avec des échantillons cliniques est due à la complexité du développement de telles analyses. Plusieurs techniques analytiques reposent sur l'analyse à une interface : surface d'analyse-solution, par exemple. Lorsqu'un échantillon clinique est analysé avec une telle technique, les molécules biologiques de l'échantillon peuvent interférer avec la surface d'analyse. Ce faisant, le signal mesuré par l'appareil provient principalement d'une multitude de molécules interférentes plutôt que de l'analyte d'intérêt. Cela peut nuire fortement à l'analyse. De plus, la variabilité d'un échantillon à l'autre et les problèmes d'interférences causés par les autres molécules présentes dans la matrice rendent laborieux le développement de ces analyses. Dans le cadre de cette thèse, de

nombreux efforts ont été déployés afin de développer une chimie de surface permettant l'analyse en matrice complexe. Cette chimie de surface vise à réduire l'interaction entre les molécules non-désirées de la matrice complexe et la surface d'analyse, dans le but de permettre une analyse fiable, directement dans un échantillon clinique.

Les surfaces développées pourront être utilisées dans le futur par d'autres chercheurs souhaitant développer des expériences de biodétection et les appliquer en milieu clinique, soutenant ainsi l'avancement de la recherche au sein du système de santé. Par exemple, si un petit appareil capable de donner le résultat d'un dépistage de maladie ou d'un taux de médicament dans le sang était installé directement dans le bureau du médecin, un patient pourrait avoir son résultat instantanément, durant son rendez-vous avec le professionnel de la santé. Pour les tests de routine, cela pourrait désengorger les laboratoires d'analyses et permettre au patient de ne se déplacer qu'une seule fois. Toutefois, la réalité est encore loin de cet objectif; c'est pourquoi les chercheurs continuent de travailler au développement de ces nouvelles techniques et au transfert des technologies entre le laboratoire et le milieu médical.

Suite au développement de chimie de surface, des expériences de biodétection ont été effectuées dans le but de démontrer l'efficacité réelle de la technique d'analyse utilisée dans le cadre de cette thèse lorsqu'elle est employée dans un milieu représentatif du milieu clinique. En effet, la réalité du milieu clinique est loin de celle du laboratoire de recherche. Lors du développement d'une expérience de biodétection, pour le dépistage d'un cancer par exemple, les expériences effectuées dans un laboratoire de recherche sont réalisées avec du matériel commercial. Les échantillons sont donc tous très semblables les uns aux autres et il est plus aisé de développer une méthode analytique. Toutefois, lorsque la technologie doit être implantée au milieu clinique, il faut adapter les expériences à une nouvelle réalité. Les échantillons cliniques sont de composition et de concentration très variables; il est donc nécessaire de s'assurer que la méthode développée en laboratoire est suffisamment robuste pour permettre l'analyse d'échantillons réels. Dans le cadre de cette thèse, le développement en laboratoire d'un essai de biodétection pour le

dépistage d'une réaction allergique chez des patients atteints de leucémie suite à l'administration d'un médicament particulier a d'abord été effectué. Ensuite, des échantillons cliniques de patients de l'hôpital Sainte-Justine ont été analysés avec la technique nouvellement développée.

Aussi, grâce aux expériences avec des échantillons cliniques, la compréhension des difficultés liées à l'analyse de tels échantillons avec les techniques optiques émergentes comme la spectroscopie de résonance des plasmons de surface offre une contribution significative au milieu scientifique. Ces connaissances permettront à d'éventuels chercheurs de développer des expériences de plus en plus efficaces, jusqu'à ce que l'analyse en matrice complexe avec des échantillons cliniques devienne chose commune.

Ainsi, les travaux décrits dans cette thèse s'insèrent dans un contexte de développement d'une nouvelle technologie permettant l'analyse rapide et à faible coût de molécules d'intérêt dans des fluides biologiques. Que ce soit pour le dépistage d'un cancer ou le suivi d'un traitement, la chimie de surface développée et le principe utilisé pour le développement d'un nouveau biocapteur clinique contribuent à l'avancement de la recherche bioanalytique actuelle.

1.2 LE CANCER DANS LA MEDECINE ACTUELLE

Le cancer est connu depuis des millénaires. Selon la Société de recherche sur le cancer, des écrits datant d'environ 3000 ans avant J.-C. ont été retrouvés décrivant la méthode de retrait de tumeurs cancéreuses¹. Toutefois, c'est plutôt depuis la fin de la seconde guerre mondiale que l'intérêt des scientifiques s'est manifesté pour le cancer, puisque le nombre de publications scientifiques ne cesse d'augmenter depuis². D'ailleurs, depuis 2008, plus de 100 000 nouveaux articles scientifiques à propos du cancer sont répertoriés chaque année dans la base de recherche PubMed.gov et ce nombre atteindra bientôt 200 000 si la tendance se maintient². Cet engouement phénoménal des scientifiques pour le cancer est représentatif de l'importance de cette maladie dans notre société. En effet, le cancer est, à ce jour, la plus grande cause de

décès au Canada³ et la seconde plus grande cause de décès aux États-Unis⁴, et ce, malgré l'augmentation des mesures de dépistage et l'amélioration marquée de l'efficacité des traitements grâce à la recherche. Le cancer occupe donc une place importante dans la médecine actuelle et dans la recherche, et ce, certainement pour encore plusieurs décennies.

Dans le cadre de cette thèse, deux cancers en particulier seront explorés, soient le cancer du sein (section 1.2.2) et la leucémie (1.2.3). D'une part, de nouvelles chimies de surfaces ont été développées pour permettre le dépistage du cancer du sein par l'analyse de lysat cellulaire (chapitres II et III). D'autre part, un biocapteur a été développé et utilisé avec des échantillons cliniques de sérum pour permettre la détection d'une réaction allergique lors du traitement des patients leucémiques (chapitre IV).

1.2.1 Dépistage du cancer

Grâce aux avancées récentes en recherche, il est possible de faire l'analyse sanguine du patient pour voir si certains biomarqueurs y sont présents, comme le HER2, tel qu'il sera discuté à la section suivante. Un biomarqueur est une molécule biologique permettant de différencier un patient en santé d'un patient malade. Il peut s'agir de divers types de molécules, comme des protéines, des acides nucléiques, des peptides ou autre, et sont généralement trouvés dans les fluides biologiques (salive, urine, sang) ou les tissus (tumeurs)⁵⁻⁶. La prise de sang est peu invasive et est souvent préconisée pour dépister le cancer, mais elle peut parfois mener à des résultats erronés, entre autres dans le cas où le biomarqueur serait en trop faible concentration ou lorsque le taux normal de biomarqueur varie d'un patient à l'autre. C'est le cas, par exemple, de l'antigène prostate spécifique (PSA), utilisé lors du dépistage du cancer de la prostate. Puisque le taux normal de PSA varie d'un homme à l'autre, il est ardu de déterminer avec certitude si un taux de PSA dans le sang d'un patient est indicateur d'un cancer ou s'il est simplement plus différent pour ce patient³.

De façon générale, une biopsie de la tumeur sera effectuée et elle sera analysée par un pathologiste qui étudiera les cellules par microscopie³, permettant de déterminer si les cellules prélevées se différencient des cellules normales, signifiant ainsi la présence d'un cancer. Cette technique, quoi que très fiable, car elle repose sur des spécialistes, est laborieuse. De plus, plusieurs jours peuvent s'écouler entre le prélèvement de la biopsie et l'annonce des résultats au patient, occasionnant une longue période de stress pour celui-ci. Par conséquent, le besoin de développer de nouvelles technologies permettant la quantification de biomarqueurs dans les biopsies afin de pallier à ces inconvénients est indéniable.

Afin d'alléger les procédures et de permettre au personnel de laboratoires de biochimie clinique d'effectuer les analyses, l'utilisation de lysat cellulaire peut s'avérer très utile. Le lysat cellulaire consiste en la lyse des cellules provenant d'une biopsie par une méthode mécanique, chimique ou dans un bain à ultra-sons. Pour faciliter la lyse, les cellules sont baignées dans une solution de lyse contenant des détergents afin de briser les parois cellulaires et d'exposer les protéines. Puisque le lysat est simple à préparer et que l'analyse peut être effectuée en peu de temps, il serait possible pour un patient d'obtenir les résultats de son analyse peu de temps après le prélèvement de sa biopsie. Ainsi, l'analyse de lysat cellulaire pourra éventuellement être utilisée pour le dépistage du cancer du sein, mais aussi de nombreux autres cancers, comme la leucémie, puisqu'une biopsie de moelle osseuse ou d'un ganglion peut être utilisée pour dépister ce cancer.

1.2.2 Cancer du sein

1.2.2.1 Contexte

Le cancer du sein est le cancer le plus répandu chez la femme³ et l'importance de la recherche pour le développement de nouveaux traitements n'est plus à démontrer. Les progrès immenses en termes de traitements font que, à ce jour, 87% des femmes atteintes d'un cancer du sein survivront plus de 5 ans. L'augmentation de la fréquence du dépistage a aussi joué un rôle clé dans la diminution du taux de

mortalité, car plus tôt un cancer est détecté, plus grandes sont les chances de rémission³.

1.2.2.2 Dépistage

Lorsqu'un médecin observe la présence d'une tumeur chez son patient, diverses options s'offrent à lui pour déterminer si la tumeur est cancéreuse. Le dépistage actuel du cancer du sein se fait en plusieurs étapes. En premier lieu, une mammographie permettra au médecin de détecter la présence d'une tumeur. Si un cancer est suspecté, une biopsie de la tumeur sera prélevée et un pathologiste pourra déterminer s'il s'agit d'une tumeur cancéreuse. Diverses techniques de diagnostic sont aussi offertes, comme la scintimammographie, la galactographie, les analyses biochimiques sanguines, l'analyse des récepteurs hormonaux et l'analyse de l'expression de HER2³. Le médecin déterminera la technique la plus appropriée pour émettre son diagnostic et poursuivre le traitement le plus approprié avec sa patiente. D'ailleurs, l'analyse de l'expression de HER2 a créé un engouement en recherche durant les dernières années, puisque la surexpression de la protéine membranaire apparaît dans 20 à 30% des cancers du sein agressifs et qu'un niveau élevé de HER2 dans le sang indique un risque de cancer accru⁷⁻⁹. Bien qu'une surexpression de la protéine HER2 ne soit pas visible dans tous les types de cancers du sein, celle-ci est présente dans suffisamment de cas pour rendre pertinente la détection de cette protéine. La méthode actuellement utilisée par les médecins pour l'analyse de l'expression de HER2 est une étude histochimique. Une biopsie de la tumeur est effectuée et la quantité de HER2 dans les cellules est déterminée par immunohistochimie (IHC) ou par hybridation in situ en fluorescence (FISH)^{1, 3, 10}. L'analyse sanguine du HER2 peut quant à elle être utilisée pour déterminer si un traitement est efficace contre le cancer d'une patiente, si celle-ci est victime d'un cancer produisant une grande quantité de HER2, mais n'est pas utilisée pour le diagnostic de cancer au Canada. Malgré cela, l'intérêt pour ce type de dépistage a mené à une impressionnante quantité de publications scientifiques à ce sujet.

1.2.3 Leucémie

1.2.3.1 *Qu'est-ce que la leucémie?*

La leucémie, qui est diagnostiquée chez plus de 6000 personnes par année seulement au Canada³, naît dans les cellules souches de la moelle osseuse. Ces cellules, qui normalement devraient se développer en cellules matures et occuper diverses fonctions dans le système sanguin, deviennent plutôt ce que l'on appelle des blastes, soient des cellules sanguines immatures. Ces cellules sont développées dans un très grand nombre et ne peuvent pas occuper les fonctions normales des cellules sanguines. Petit à petit, les blastes viennent à occuper un si grand volume dans le sang que celui-ci cesse de fonctionner normalement, car il n'y a plus suffisamment de cellules saines pour accomplir les diverses tâches du système sanguin³.

Il existe quatre principaux types de leucémie, selon le type de cellules souches originaires du cancer (myéloïdes ou lymphoïdes) et la rapidité à laquelle se propage le cancer. Dans le cadre de cette thèse, il sera question de la leucémie lymphoblastique aiguë (LLA, ou ALL en anglais), soit un type de leucémie prenant naissance dans les cellules souches lymphoïdes et se développant très rapidement. La LLA affecte principalement les enfants, ce qui n'est pas nécessairement le cas de tous les types de leucémie¹¹⁻¹². Grâce aux avancées de la médecine, la LLA a un taux de rémission supérieur à 80% depuis près de 40 ans, pour les patients en bas âge^{3, 12}. Ce haut taux de succès est dû à l'amélioration du mélange de médicaments chimiothérapeutiques donné aux patients. Par exemple, la L-asparaginase, une enzyme de source bactérienne, est maintenant couramment utilisée dans les mélanges de médicaments chimiothérapeutiques pour le traitement de la LLA grâce à sa grande efficacité. Toutefois, malgré le haut taux de succès dans le traitement de ce type de leucémie, la recherche continue de battre son plein pour tenter de trouver un moyen efficace de traiter les autres patients ne répondant pas efficacement aux traitements.

1.2.3.2 Traitement de la leucémie avec la L-asparaginase

La recherche est encore très active pour le développement de nouveaux protocoles de traitements pour les patients leucémiques, bien que celle-ci repose sur plus de 60 ans de recherches. C'est en 1953, par J.M. Kidd¹³, que les propriétés thérapeutiques du sérum de cochon d'Inde ont été observées sur la réduction de lymphomes et c'est en 1961 que J.D. Broome¹⁴⁻¹⁵ a pu déterminer que c'était grâce à son contenu en L-asparaginase. En effet, la L-asparaginase était trouvée dans le sérum des cochons d'Inde, mais pas dans le sérum d'autres animaux. Lorsque le sérum de cochon d'Inde était administré à des souris affligées d'un lymphome, celui-ci régressait. Toutefois, le sérum n'était efficace que sur certains lymphomes. Parallèlement, L.J. Old¹⁶ a pu démontrer pour la première fois les effets anti-leucémiques de la L-asparaginase en guérissant des souris atteinte de ce cancer. Par la suite, grâce à l'isolation de l'enzyme à partir de bactéries *Escherichia coli* par L.T. Mashburn¹⁷, H.F. Oettgen¹⁸ et J.M. Hill¹⁹, les premiers essais cliniques ont été conduits dès 1967 et ont permis la rémission de patients leucémiques suite à l'administration de la L-asparaginase. Depuis cette période, les protocoles de recherche se sont améliorés drastiquement, mais la L-asparaginase est toujours utilisée dans la majorité des protocoles, en combinaison avec plusieurs autres agents thérapeutiques, grâce à son efficacité démontrée^{1, 3, 20-24}.

Les principales sources de L-asparaginase utilisée aujourd'hui pour le traitement de la leucémie sont les bactéries *Escherichia coli* et *Erwinia chrysanthemi*, car l'effet thérapeutique de l'enzyme produite par ces deux bactéries est reconnu²⁵. Toutefois, l'utilisation de la L-asparaginase dans le traitement de la leucémie comporte un inconvénient majeur : le nombre de réactions allergiques est très élevé à cause de la provenance bactérienne de l'enzyme²⁶⁻²⁷. En effet, le taux de réactions allergiques peut s'élever jusqu'à plus de deux tiers des patients selon certaines études²⁶⁻²⁹ et varie en fonction du type de préparation de l'enzyme, de la méthode d'injection, de la quantité par dose et du nombre de doses administrées. En effet, avec l'avancement de la recherche, de nouvelles options thérapeutiques ont été développées afin de réduire le nombre de réactions allergiques des patients, en

utilisant de la L-asparaginase provenant de *l'Erwinia chrysanthemi*, ou en utilisant une L-asparaginase protégée par des groupements polyéthylène glycol, appelée la forme «pegylée». Malheureusement, peu importe la forme qui est utilisée, certains patients auront une réaction immunitaire contre le médicament. Il est donc important pour les médecins d'effectuer un suivi du traitement afin de mesurer les signes démontrant une réaction immunitaire, comme l'apparition d'anticorps contre la L-asparaginase, les anti-asparaginase, ou la diminution de l'activité de l'enzyme.

1.2.3.3 Suivi du traitement par ELISA et mesure d'activité

Dans la région du grand Montréal, les enfants atteints de LLA sont soignés à l'hôpital Sainte-Justine et suivent les protocoles de recherche 05-011 et 11-001 mis au point par le Dana Farber Cancer Institute (DFCI) ²⁴ en ce qui concerne l'administration de leur traitement en chimiothérapie. Ces protocoles de recherche visent à améliorer le traitement contre la LLA et à minimiser sa toxicité, en adaptant le traitement administré au patient si celui-ci développe une réaction immunitaire. La méthode utilisée actuellement pour effectuer ce suivi est l'analyse ELISA de la quantité d'anticorps anti-asparaginase dans le sang des patients, ainsi que la mesure de l'activité de la L-asparaginase. Un haut taux d'anticorps, ou une diminution de l'activité de la L-asparaginase, indiqueront que le patient a une réaction immunitaire contre le médicament et que son efficacité peut être réduite.

En milieu hospitalier, les analyses sanguines plus complexes, comme celles nécessitant des techniques d'analyse telles que l'ELISA, sont fréquemment envoyées à des laboratoires externes qui envoient par la suite les résultats aux hôpitaux. Par exemple, pour les patients leucémiques traités à l'hôpital Sainte-Justine, les échantillons sont prélevés à l'hôpital, puis ils sont envoyés au Dana Farber Cancer Institute, à Boston, où une analyse est effectuée. Bien que ce système soit fonctionnel, une analyse simple et rapide, qui pourrait avoir lieu sur place, permettrait de réduire significativement le temps d'analyse, ce qui serait un avantage majeur pour le patient et rendrait la procédure globale moins fastidieuse. Par exemple, pour les patients leucémiques, le suivi de traitement est primordial car ils peuvent avoir une réaction

allergique au traitement et celle-ci doit être détectée le plus rapidement possible puisqu'elle nuit au traitement. Si les analyses étaient effectuées sur place, le traitement pourrait être ajusté en quelques heures seulement, donc le patient aurait moins de chance que ses symptômes s'aggravent ou que son traitement soit moins efficace. La rapidité d'analyse serait aussi grandement utile dans le cas où la concentration d'un médicament dans le sang d'un patient doit être contrôlée précisément. Si les échantillons sanguins du patient pouvaient être analysés en quelques minutes seulement, le suivi du taux de médicament serait plus efficace et la médication pourrait être ajustée beaucoup plus rapidement, favorisant ainsi la réussite du traitement.

Bien que la rapidité d'analyse soit importante dans plusieurs cas en milieu hospitalier, il est aussi primordial que les résultats apportés soient fiables. L'ELISA étant une technique robuste et utilisée depuis plusieurs années, elle est la technique de référence dans le développement de nouvelles techniques d'analyse bioanalytique.

1.3 TECHNIQUES D'ANALYSE BIOANALYTIQUE

1.3.1 ELISA

1.3.1.1 Théorie

L'ELISA (dosage d'immunoabsorption par enzyme liée, de l'anglais *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) est une technique mise au point au début des années 70³⁰⁻³¹ et est utilisée aujourd'hui comme la technique de référence en analyse bioanalytique. Malgré l'émergence d'une multitude de nouvelles techniques analytiques, l'ELISA demeure fortement utilisée dans les laboratoires cliniques, grâce à sa fiabilité et sa robustesse. De plus, les appareils commerciaux sont conçus pour permettre l'analyse de plusieurs échantillons simultanément, généralement par groupes de 96 ou 384, ce qui rend l'analyse très efficace. Il existe différents types d'essais ELISA, soient l'essai sandwich, l'essai compétitif, l'essai direct et l'essai

indirect. Selon les nécessités de l'analyse, le type d'essai ELISA le plus approprié sera choisi. Puisque l'essai sandwich (Figure 1.1) est l'essai le plus fréquemment utilisé et qu'il a été utilisé dans le cadre de cette thèse, uniquement celui-ci sera présenté.

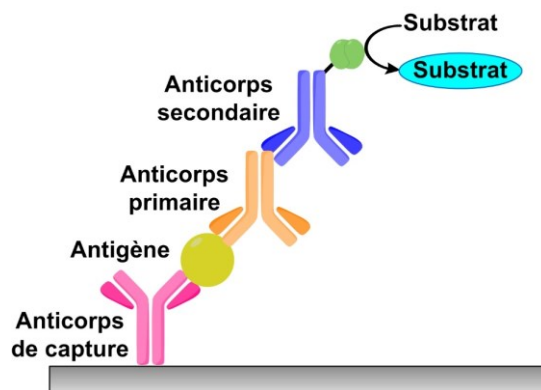


Figure 1.1 Schématisation de l'essai sandwich dans une analyse ELISA

Dans un essai sandwich, un anticorps de capture est placé sur une surface polymérique, de sorte à pouvoir capturer un antigène qui lui est spécifique. Par la suite, un anticorps secondaire se lie à l'antigène, puis un troisième anticorps reconnaît la chaîne lourde de l'anticorps secondaire. Ce troisième anticorps est conjugué à une enzyme, fréquemment la *horseradish peroxidase* (HRP), qui permet de transformer un substrat en une molécule produisant un signal coloré. Le tétraméthylbenzidine (TMB)³²⁻³³ est un exemple de substrat pouvant être utilisé. Sous l'effet de la HRP, comme les autres substrats chromogènes, le TMB devient coloré, ce qui permet la lecture du signal par un spectrophotomètre. L'intensité de la couleur permet de connaître la quantité d'antigène présente à la surface d'analyse et, par le fait même, dans la solution à analyser.

1.3.1.2 Avantages et inconvénients

Dans les laboratoires d'analyse, l'ELISA est utilisée sur une base quotidienne puisqu'il s'agit d'une technique fiable et robuste. De plus, l'avantage majeur que comporte cette technique est la possibilité d'analyser plusieurs échantillons à la fois.

La pratique courante est d'utiliser une plaque multi-puits, possédant généralement 96 ou 384 puits, permettant ainsi l'analyse de dizaines d'échantillons en une seule expérience. Ceci permet d'économiser énormément de temps lorsque des dizaines ou centaines d'échantillons doivent être analysés.

Le principal désavantage de l'ELISA est qu'une seule analyse peut prendre une journée entière, car les temps d'incubation varient de quelques heures à toute une nuit³³, sans inclure le temps de préparation des solutions ni le temps de lecture de la plaque. Lorsque les analyses ne sont pas urgentes et que plusieurs dizaines d'analyses simultanées sont nécessaires, le temps d'analyse a peu d'importance. En effet, le temps d'analyse par échantillon est minime puisque des dizaines d'échantillons sont analysés simultanément. Dans ce type de situation, l'analyse ELISA est appropriée car elle est efficace. Toutefois, dans les cas où seulement un petit nombre d'échantillons doit être analysé, ou dans un cas où les analyses sont urgentes, le temps d'analyse peut s'avérer problématique. Par exemple, si la médication d'un patient doit être contrôlée avec précision et qu'elle nécessite des ajustements plusieurs fois par jour, l'utilisation de l'ELISA n'est pas recommandable puisque le temps d'analyse empêche d'obtenir les résultats dans les délais imposés par la situation médicale du patient. L'autre principal désavantage inhérent à l'ELISA est que plusieurs anticorps et réactifs différents doivent être utilisés au cours d'une analyse et ces produits peuvent être très coûteux³⁴. Certaines techniques alternatives utilisant moins de matériel biologique permettent d'effectuer des analyses à moindre coût.

En bref, l'ELISA est une technique robuste qui continuera d'être utilisée dans les laboratoires d'analyse bioanalytique grâce à sa fiabilité. Par contre, elle comprend quelques inconvénients, principalement la longue période de temps requise pour faire les expériences, motivant ainsi les chercheurs à développer des techniques alternatives pouvant pallier ces désavantages. La spectroscopie de résonance des plasmons de surface est une technique de bioanalyse pouvant servir d'alternative à l'ELISA. Cette technique, comme plusieurs autres techniques alternatives, est basée sur l'utilisation de biocapteurs, surtout lorsque les analyses sont effectuées en milieu clinique.

1.3.2 Les biocapteurs

Un biocapteur est défini comme étant un outil analytique exploitant une réaction biochimique spécifique reposant sur une ou plusieurs composantes biologiques et permettant de traduire le signal biologique en phénomène détectable, comme un signal électrique, thermique ou optique³⁵. Ces composantes biologiques peuvent avoir différentes formes, comme une protéine, un anticorps, une enzyme, une cellule, un assemblage d'acides nucléiques (ADN et ARN), un peptide, un tissu, une organelle, etc. Par exemple, une enzyme attachée à une électrode pourrait permettre la reconnaissance spécifique d'un analyte par la transformation de l'analyte en une molécule qui peut être oxydée et, ainsi, générer un signal électrique. Le principe de fonctionnement décrit ici correspond au principe d'un biocapteur depuis longtemps commercialisé, soit le glucomètre. Plusieurs autres principes de fonctionnement sont possibles pour les biocapteurs, dont celui exploité dans le cadre de cette thèse, soit le changement d'un signal optique suite à la reconnaissance spécifique d'un analyte par une enzyme liée à la surface d'un capteur de spectroscopie de résonance des plasmons de surface.

1.3.3 La spectroscopie de résonance des plasmons de surface

1.3.3.1 Principe de la résonance des plasmons de surface

Le concept de résonance des plasmons de surface a été introduit à la fin des années 60³⁶⁻³⁸, mais il a été beaucoup plus exploité dans les quelques dernières décennies³⁶. La spectroscopie de résonance des plasmons de surface (SPR, de *Surface Plasmon Resonance*, en anglais), est une technique optique basée sur la mesure d'indice de réfraction près de la surface de mesure³⁹. Dans un instrument SPR, un faisceau lumineux est dirigé à travers un prisme dans lequel il entre en réflexion totale interne. C'est grâce à la réflexion totale interne que le champ électrique de la lumière peut pénétrer la surface et interagir avec les électrons. Ce phénomène est appelé résonance des plasmons de surface.

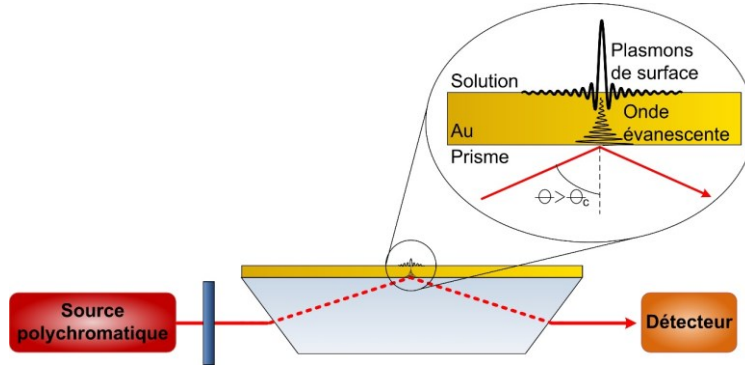


Figure 1.2 Principe de la spectroscopie de résonance des plasmons de surface

Le phénomène de résonance des plasmons de surface repose sur l'interaction entre un faisceau lumineux et les électrons libres à la surface d'une fine couche d'un métal et à l'interface d'un diélectrique⁴⁰⁻⁴². L'oscillation des électrons à la surface du métal peut être apparentée à une onde et est appelée «plasmons de surface» (Figure 1.2). La résonance des plasmons de surface apparaît lorsque l'énergie de la lumière incidente est transférée aux électrons, mais cela n'est possible qu'à condition que le vecteur d'onde des photons incidents soit égal au vecteur d'onde des électrons oscillants⁴³. Pour cette raison, le faisceau incident doit être dirigé sous la surface à travers un prisme d'indice de réfraction élevé et être en réflexion totale interne, de sorte que son vecteur d'onde puisse être augmenté et qu'il corresponde à celui des plasmons de surface. Sans cette condition, les vecteurs d'ondes ne pourraient pas être égaux. Les vecteurs d'ondes sont décrits par les équations suivantes :

$$k_{sp} = k_0 \left(\frac{\epsilon_m \epsilon_s}{\epsilon_m + \epsilon_s} \right)^{1/2} \quad [1]$$

$$k_x = k_0 \eta_D \sin \theta_{inc} \quad [2]$$

où k_{sp} est le vecteur d'onde des plasmons de surface, k_x celui de la lumière incidente en réflexion totale interne dans l'axe x et polarisée TM , k_0 celui de la lumière ($2\pi/\lambda$ où λ est la longueur d'onde), ϵ est la constante diélectrique, l'indice m représente le métal, l'indice s représente la solution, η_D est l'indice de réfraction du prisme et θ_{inc} est l'angle d'incidence de la lumière.

Seule la composante électrique de la lumière peut exciter les plasmons de surface. Pour cette raison, le faisceau incident doit être polarisé «transverse magnétique» (TM ou p), consistant en une polarisation dirigeant le champ électrique perpendiculairement à la surface et le champ magnétique parallèlement à la surface. Dans cette polarisation, le champ évanescent de la lumière entre en contact avec les électrons de surface et le photon ayant le même vecteur d'onde que les plasmons est absorbé.

Le choix du métal fait aussi partie intégrante du phénomène SPR, puisque seulement quelques métaux possèdent les propriétés nécessaires à la résonance plasmonique. La partie réelle de la constante diélectrique du métal doit être négative pour que le métal puisse supporter les plasmons de surface. C'est le cas de l'or, de l'argent, du platine, de l'indium, du cuivre et de l'aluminium, entre autres⁴³. Plusieurs de ces métaux sont très coûteux, comme le platine et l'indium, ou offrent moins de sensibilité à l'indice de réfraction, tels que le cuivre ou l'aluminium. L'or est très souvent le meilleur choix, car il ne s'oxyde pas, contrairement à l'argent, et offre des performances acceptables au niveau de la sensibilité⁴³. De plus, la chimie des thiols permet d'attacher solidement et facilement toutes sortes de molécules d'intérêt à la surface d'or, facilitant ainsi la fonctionnalisation de la surface et permettant le développement de biocapteurs⁴³.

1.3.3.2 Instrumentation

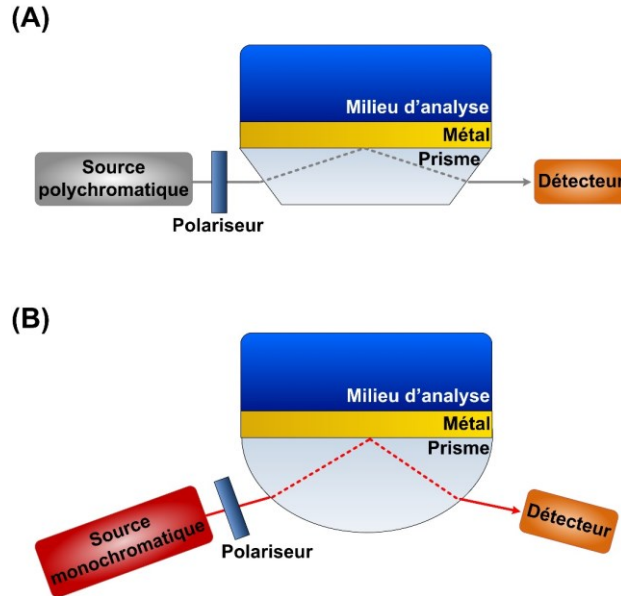


Figure 1.3 Configuration optique des instruments SPR

En SPR, il est possible de mesurer le changement de longueur d'onde d'une lumière polychromatique lorsque l'angle est fixe (Figure 1.3A) ou de mesurer le changement d'angle lorsque la longueur d'onde est fixe (Figure 1.3B). La configuration à angle fixe permet la miniaturisation du système, car toute l'optique peut être placée à 180° et ne nécessite pas de modification de l'angle de la lumière incidente. Un faisceau lumineux provenant d'une source polychromatique est dirigé à travers un prisme, puis est dévié vers la surface d'analyse à un angle permettant la réflexion totale interne. Le faisceau est ensuite réfléchi, puis dirigé vers un détecteur. Un polariseur est placé avant ou après le prisme afin de permettre la lecture du signal SPR en polarisation p, tel qu'expliqué à la section précédente.

Dans le cas d'un instrument à longueur d'onde fixe, l'appareillage est légèrement différent (Figure 1.3B). Dans ce type de montage, que l'on dit en configuration Kretschmann, un laser est dirigé à travers un prisme sphérique ou cylindrique. À l'instar de l'instrument à angle fixe, un polariseur est utilisé. Ensuite, le faisceau lumineux est réfléchi sous la surface métallique et est redirigé vers un

détecteur. L'angle de mesure est déterminé selon le maximum d'intensité du signal. Ainsi, à tout moment, le signal mesuré est aussi sensible que possible. Le détecteur est généralement un tube photomultiplicateur se déplaçant afin de capter un maximum de lumière réfléchi. Ce type de détecteur permet une sensibilité accrue, mais un temps d'analyse plus long.

Bien qu'un instrument à longueur d'onde fixe soit généralement plus sensible qu'un instrument à angle fixe, l'avantage procuré par la miniaturisation de l'appareil a prévalu dans le cadre de cette thèse. Ainsi, un montage à angle fixe tel que celui représenté à la Figure 1.3A a été utilisé. La mesure du signal SPR a donc été effectuée en mesurant le changement de longueur d'onde.

1.3.3.3 Mesure du signal SPR

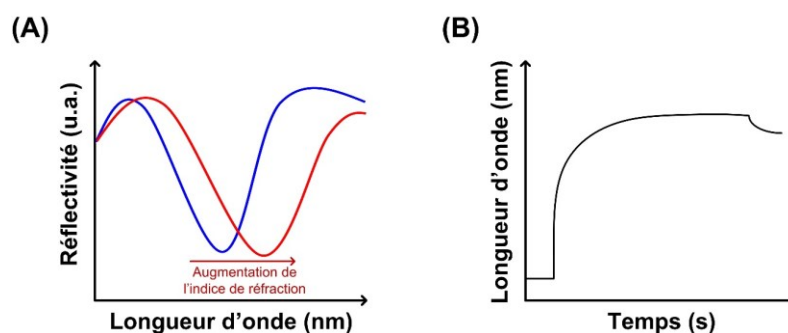


Figure 1.4 Déplacement de la bande SPR suite à l'augmentation de l'indice de réfraction à la surface (A) et suivi en temps réel de la position du minimum de la bande SPR (B)

Lorsque le vecteur d'onde d'un photon correspond au vecteur d'onde des plasmons de surface, l'absorption de ce photon par la surface métallique est traduite par un minimum dans le spectre de réflectance mesuré par l'appareil SPR (Figure 1.4A). L'oscillation des plasmons de surface étant très sensible à l'indice de réfraction près de la surface, un changement d'indice de réfraction, causé par la liaison d'une molécule par exemple, modifiera le vecteur d'onde des plasmons de surface, ce qui aura pour effet de modifier la longueur d'onde du photon absorbé (Figure 1.4A). Ce déplacement peut être tracé en fonction du temps (Figure 1.4B), ce qui permet le suivi

en temps réel des phénomènes mesurés, une interaction anticorps-antigène par exemple. La sensibilité à l'indice de réfraction peut s'étendre sur une distance d'environ 200 nm à partir de la surface métallique. Cette distance représente la diminution du champ électromagnétique associé à l'excitation des plasmons de surface. Le champ électromagnétique est à son maximum tout près de la surface, puis diminue de façon exponentielle en s'éloignant de celle-ci. Lorsque du matériel s'adsorbe sur la surface d'analyse à l'intérieur de la zone de sensibilité du capteur, il peut être quantifié avec une grande sensibilité.

1.3.3.4 Quantification de matériel adsorbé

Selon l'amplitude du déplacement de la bande SPR, la quantité de matériel adsorbé à la surface pourra être déterminée. Afin d'établir une courbe d'étalonnage en SPR, le déplacement de la bande SPR est mesuré suite à l'injection de plusieurs solutions de concentration d'analyte connu dans l'appareil. Généralement, une sensibilité de l'ordre du nM ou du pM est obtenue en SPR, ce qui rend cette technique tout à fait appropriée pour la détection de biomarqueurs.

La cinétique d'adsorption d'analyte à la surface s'apparente à un isotherme de Langmuir, c'est-à-dire que l'adsorption se fait très rapidement au début, lorsque beaucoup récepteurs moléculaires sont disponibles, puis ralenti pour atteindre un plateau, où l'équilibre entre adsorption et désorption est atteint. C'est le déplacement entre la ligne de base au début de la mesure et le plateau de chaque concentration d'analyte qui est calculé pour former la courbe d'étalonnage. Lorsqu'une gamme de concentrations suffisamment petite est utilisée, une courbe d'étalonnage linéaire peut être tracée en considérant que la relation entre le signal et la concentration est pseudo-linéaire. Dans le cadre de cette thèse, la majorité des courbes d'étalonnage ont été tracées avec cette méthode. La relation entre le signal SPR et la concentration était décrite par l'équation à la page suivante.

$$\lambda_{SPR} = \frac{[analyte]K_A\lambda_{max}}{[analyte]K_A + 1} \quad [3]$$

où λ_{SPR} est le déplacement de la longueur d'onde dû à la capture d'un analyte, $[analyte]$ est la concentration d'analyte, K_A est la constante d'association entre l'analyte et le récepteur et λ_{max} est la longueur d'onde où l'équilibre est atteint pour une concentration d'analyte donnée.

Toutefois, lorsqu'une grande gamme de concentrations est utilisée, le signal SPR n'est pas linéairement proportionnel à la concentration d'analyte, car la relation entre le signal et la concentration suit également l'isotherme de Langmuir.

Tel que vu dans cette section, la SPR est une technique permettant l'analyse rapide et sensible de divers analytes en solution. Dépendamment des besoins de l'analyse, elle pourrait servir d'alternative à l'ELISA. Il est toutefois nécessaire de comparer les avantages et inconvénients apportés par chacune des techniques afin de choisir celle qui est la plus appropriée pour le type d'analyse requis.

1.3.4 Comparaison de la SPR et de l'ELISA

Le bénéfice de l'utilisation de la SPR en milieu clinique préférentiellement à une autre technique comme l'ELISA réside en trois avantages majeurs, soient la rapidité de l'analyse, le faible coût et la possibilité de procéder à des analyses en matrice complexe.

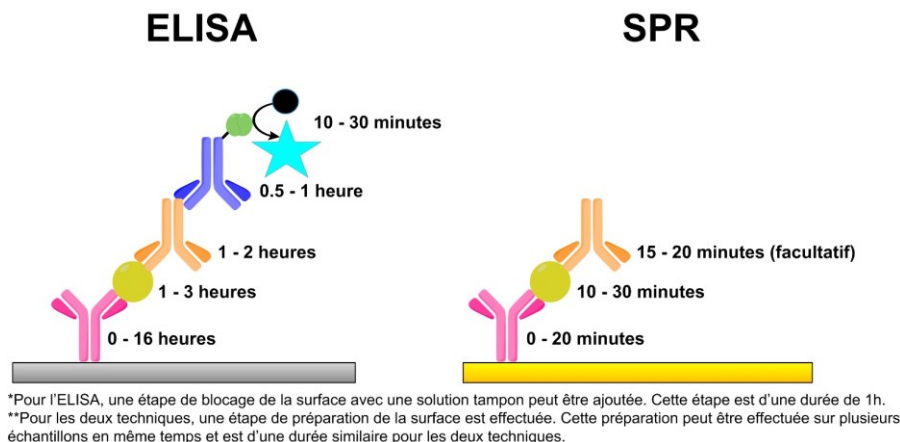


Figure 1.5 Comparaison du temps d'analyse pour les méthodes d'ELISA et de SPR

La Figure 1.5 montre les différentes étapes d'un essai ELISA de type sandwich et d'un essai SPR avec une détection secondaire. Comme la figure le démontre, les étapes d'analyse en ELISA sont beaucoup plus longues et plus nombreuses que celles d'une méthode SPR. De plus, entre chacune des étapes d'incubation illustrées ci-dessus, des étapes de lavage pouvant prendre quelques dizaines de minutes sont nécessaires pour l'ELISA. Au contraire, les étapes de lavage en SPR ne prennent, en général, que 2 à 5 minutes. En général, une analyse ELISA prend de nombreuses heures, tandis qu'une analyse SPR prend moins d'une heure.

L'utilisation de marqueurs fluorescents ou chromogènes, ainsi que les multiples étapes de détection en ELISA, contribuent à augmenter les coûts et le temps d'analyse. Avec la technique SPR, lorsqu'une détection directe est possible, seule une molécule de capture est nécessaire à la surface d'analyse, contrairement à trois en ELISA, et aucun marquage n'est nécessaire. Toutefois, la différence de coût entre les deux types d'analyses n'est pas proportionnelle au nombre de molécules de captures utilisées. En effet, bien qu'un essai SPR n'utilise qu'une petite variété de molécules biologiques, soit un ou deux anticorps seulement, l'ELISA nécessite généralement de plus petits volumes par échantillon, donc le coût d'un anticorps par échantillon est réduit. C'est plutôt le nombre d'anticorps différents qui augmente le coût d'une analyse. En résumé, selon les quantités de molécules biologiques utilisées pour

chacun des types d'analyse, le coût sera variable, mais, généralement, les coûts d'une analyse par SPR sont moindres.

Finalement, un des grands avantages de la SPR est que les mesures peuvent être effectuées en milieu (ou matrice) complexe, car le faisceau lumineux n'a pas à traverser l'échantillon. Le fait d'éviter la dilution de l'échantillon permet d'avoir une concentration d'analyte la plus élevée possible tout en réduisant à un minimum le nombre de manipulations à effectuer, donc le temps total de l'analyse. Par contre, lors de l'analyse en matrice complexe, il est important de prendre en compte le phénomène de l'adsorption non-spécifique.

1.3.5 Analyse SPR en matrice complexe : le défi de l'adsorption non-spécifique

1.3.5.1 Description du phénomène de l'adsorption non-spécifique

Puisque la SPR est basée sur la simple mesure de l'indice de réfraction, elle est susceptible de mesurer un signal non-spécifique. Un signal non-spécifique est dû à l'adsorption de molécules diverses à la surface du capteur SPR. Ce phénomène n'intervient généralement pas lorsque les analyses sont effectuées dans un tampon salin, mais pour l'analyse dans un fluide sanguin, ou dans tous les autres fluides biologiques, l'adsorption non-spécifique peut être problématique. Le développement de méthodes SPR en matrices complexes est donc nécessaire à l'application de cette technique en milieu clinique.

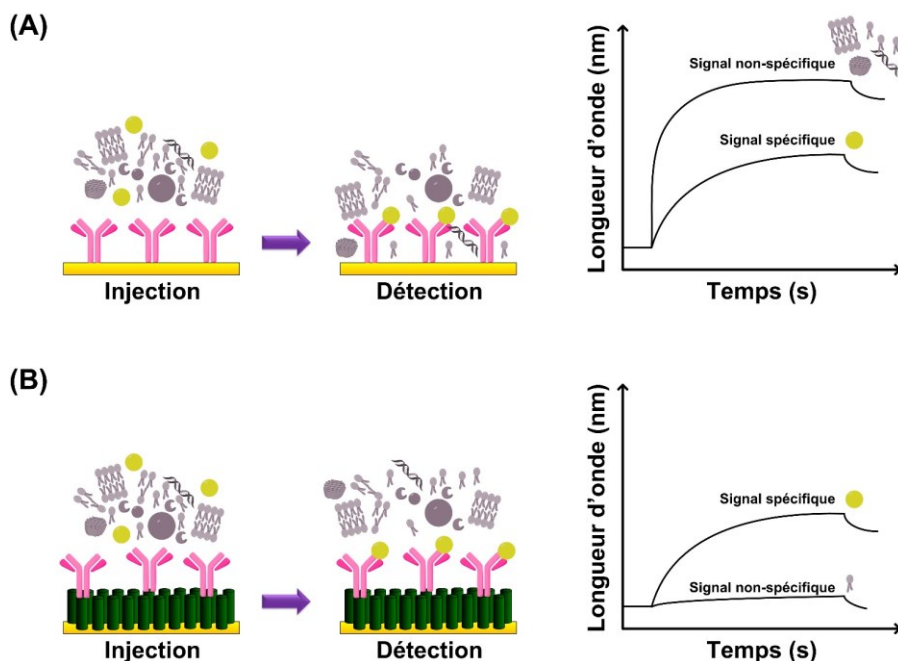


Figure 1.6 Illustration du phénomène d'adsorption non-spécifique de lysat cellulaire sur un capteur sans monocouche auto-assemblée (A) et avec une monocouche auto-assemblée visant à réduire l'adsorption non-spécifique (B)

En milieu clinique, les analyses sont effectuées dans l'urine, la salive, le sang, le sérum, le plasma, en lysat cellulaire, etc. Tous ces échantillons biologiques sont composés de différents types de molécules, comme des protéines, des cellules, des lipides, des sucres, etc. Ces molécules sont susceptibles de s'adsorber non-spécifiquement à la surface d'un capteur SPR. Cela crée un signal qui est indissociable de celui de l'analyte d'intérêt (Figure 1.6A), car c'est le changement d'indice de réfraction global qui est mesuré et que cette propriété n'est pas spécifique à chaque analyte.

Afin d'empêcher ce phénomène et permettre uniquement à l'analyte d'intérêt de se lier à la surface, divers types de chimie de surface ont été développés pour minimiser les interactions des molécules de la matrice biologique sur les surfaces SPR (Figure 1.6B). Cela permet donc de mesurer le signal dû à l'analyte d'intérêt, sans amplifier le signal ni augmenter la concentration de l'analyte.

1.4 CHIMIE DE SURFACE

1.4.1 Les monocouches auto-assemblées

1.4.1.1 Utilisation des monocouches auto-assemblées

Les monocouches auto-assemblées (SAM – *Self-Assembled Monolayers*), sont des couches de molécules se formant à la surface de divers matériaux dans un arrangement structuré. Ces couches ont l'épaisseur d'une seule molécule : elles ne forment pas de bicouches ou de multiples couches. Le processus se fait généralement de façon spontanée. Elles peuvent avoir plusieurs utilités dans le développement de méthodes bioanalytiques en SPR. Tout d'abord, ces monocouches servent d'ancrage aux biomolécules agissant comme récepteurs spécifiques à la surface d'un capteur SPR. Les biomolécules, comme les anticorps, sont très sensibles à leur environnement et peuvent facilement perdre leur activité. Un anticorps qui serait adsorbé directement sur une surface d'or ou sur une monocouche inappropriée pour former un biocapteur risquerait de voir son activité significativement réduite, diminuant ainsi l'efficacité du capteur⁴⁴. Les monocouches doivent également protéger contre l'adsorption non-spécifique des molécules de la matrice biologiques. Ces deux propriétés seront essentielles dans la conception des biocapteurs SPR présentés dans cette thèse. Une des interactions les plus connues pour les monocouches auto-assemblées est l'interaction thiol-or.

1.4.1.2 Principe de formation et organisation des molécules sur une surface d'or

Les composés sulfo-organiques peuvent former des monocouches sur plusieurs métaux de transition, comme le mercure, le fer, l'argent et le cuivre, mais c'est la formation de monocouches auto-assemblées sur l'or qui a été le plus étudié dans la littérature⁴⁵. La formation de monocouches auto-assemblées d'alcanethiols sur une surface d'or a lieu en deux étapes cinétiques distinctes⁴⁵.

La première, très rapide, est dépendante de la concentration de thiol en solution et du nombre de sites de liaison disponibles à la surface. Les molécules s'adsorbent très rapidement et de façon assez désorganisée, car la quantité de molécules présentes en solution est assez grande pour que le phénomène ne dépende pas de la diffusion (typiquement 1 mM). Ensuite, l'adsorption se fait de plus en plus lentement à mesure que les sites d'interactions disponibles diminuent. L'adsorption des molécules à la surface suit le modèle cinétique de Langmuir⁴⁶. Environ 80-90% des molécules s'adsorbent à la surface durant cette étape.

La seconde étape est beaucoup plus lente et dure plusieurs heures. Durant cette période, les molécules à la surface s'organisent de façon beaucoup plus structurée, dans une forme s'apparentant à un cristal. Les interactions de Van der Waals entre les chaînes diminuent l'énergie du système et favorisent l'organisation structurée des molécules. Plus le nombre d'interactions de Van der Waals est grand, plus la structure cristalline de la monocouche sera compacte⁴⁷. Par exemple, les longues chaînes alkyles des alcanethiols forment une monocouche très structurée grâce aux multiples interactions de Van der Waals. Par contre, lorsqu'il s'agit de molécules avec des structures moléculaires moins régulières, la cristallinité de la monocouche diminue. Des agrégats et une structure irrégulière représentent mieux la réalité des monocouches auto-assemblées de molécules différentes des alcanethiols⁴⁷. Malgré cela, les monocouches auto-assemblées formées de molécules irrégulières ont une couverture de surface suffisamment grande pour que les propriétés de surface soient dépendantes de la nature des molécules.

1.4.1.3 Caractérisation des propriétés des monocouches par angle de contact

Les propriétés hydrophobes ou hydrophiles d'une monocouche auto-assemblée peuvent être décrites par la mouillabilité de la surface, déterminée grâce à l'angle de contact que formera une goutte d'eau avec la surface. L'angle de contact est mesuré entre l'interface liquide-solide et l'interface liquide-vapeur et est décrit par l'équation de Young⁴⁸. Cette équation représente la relation entre les différentes

tensions de surface appliquées sur une goutte déposée sur une surface dans un milieu gazeux, comme l'air (Figure 1.7).

$$\gamma_{lv} \cos \theta_Y = \gamma_{sv} - \gamma_{sl} \quad [4]$$

où γ_{lv} , γ_{sv} et γ_{sl} représentent respectivement les tensions de surface liquide-vapeur, solide vapeur et solide liquide. θ_Y représente l'angle de contact de Young.

La forme sphérique d'une goutte est due à la tension de surface, soit la force qui retient les molécules d'eau ensemble afin de diminuer l'aire de surface comparativement au volume et ainsi diminuer l'énergie libre de surface. Idéalement, seule cette force devrait être utilisée pour caractériser les interactions entre une goutte d'eau et une surface. Par contre, les gouttes sont aussi affectées par la gravité. Ainsi, l'angle de contact mesuré dans un système donné dépend de la tension de surface et des forces extérieures comme la gravité.

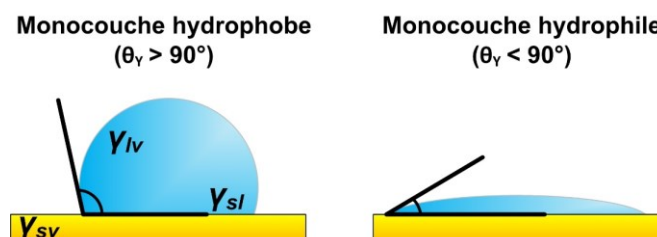


Figure 1.7 Illustration de l'étude du phénomène de mouillabilité des surfaces par la mesure de l'angle de contact

De façon générale, une goutte d'eau qui formera un petit angle avec la surface, donc qui s'étendra sur celle-ci, indiquera une surface hydrophile. Au contraire, une goutte d'eau formant un grand angle avec la surface, donc qui semble repoussée par celle-ci pour minimiser les interactions, indiquera une surface hydrophobe (Figure 1.7). Dans le cadre de cette thèse, la mesure d'angle de contact pour diverses monocouches auto-assemblées a été effectuée en déposant une goutte de 30 μ L d'eau

ou de PBS sur une plaque d'or recouverte de la monocouche à étudier. Ensuite, une photo de la goutte était prise et les angles de contact pour les côtés droit et gauche de la goutte étaient mesurés grâce au logiciel ImageJ. L'expérience a été effectuée quatre fois pour chacune des monocouches. Cela a permis de comprendre quels sont les effets de leurs propriétés physico-chimiques sur leur capacité à réduire l'adsorption non-spécifiques. Tel qu'il sera discuté dans les chapitres II et III, les propriétés physico-chimiques efficaces pour la réduction de l'adsorption non-spécifique d'une matrice complexe varient en fonction de la matrice. Dans les travaux d'Olivier Bolduc⁴⁹, il a été rapporté que les monocouches les plus efficaces étaient hydrophiles. Ces résultats sont contraires à ceux observés dans le cadre de cette thèse où les études d'adsorption non-spécifique ont été effectuées dans le lysat cellulaire. Cela démontre bien l'importance de la caractérisation des surfaces lorsque des molécules sont développées pour réduire l'adsorption non-spécifique d'une nouvelle matrice.

1.4.2 Réduction de l'adsorption non-spécifique grâce au développement de chimie de surface

Tel que mentionné précédemment, la réduction ou, idéalement, l'élimination complète de l'adsorption non-spécifique de molécules biologiques sur une surface est nécessaire à l'analyse en matrice complexe. Si le phénomène d'adsorption non-spécifique est trop important, le signal de l'analyte sera masqué par le signal non-spécifique et il sera impossible d'effectuer la quantification à faible concentration, ce qui est normalement requis lors d'analyses biologiques. Plusieurs chercheurs ont développé divers types de chimie de surface permettant la réduction significative du signal résultant de l'adsorption non-spécifique de matrices biologiques. Il est important de noter que la chimie de surface utilisée dépend de la matrice d'analyse choisie. En effet, les propriétés de surface recherchées pour la réduction de l'adsorption non-spécifique de sérum sont complètement différentes, même contraires, aux propriétés recherchées pour le lysat cellulaire. Ces différences ont mené à la distinction des axes de développement de chimie de surface pour le sérum et le lysat cellulaire.

1.4.2.1 *Résumé de la littérature*

1.4.2.1.1 Sérum

La recherche de molécules permettant de réduire l'adsorption non spécifique du sérum a débuté dans les années 90, mais c'est depuis les années 2000 que cet axe de recherche est en essor⁵⁰. Diverses classes de molécules ont été développées pour réduire l'adsorption non-spécifique de sérum sur des surfaces d'or, mais parmi les plus exploitées à travers les années se trouvent les oligo- et polyéthylène glycols. Plusieurs groupes de recherche ont développé des films de polyéthylène glycols ayant des structures de toutes sortes (linéaires, brosse, dendritiques, etc.) ce qui a permis de réduire significativement l'adsorption non-spécifique de protéines sériques, avec une valeur de couverture de surface sur un capteur d'or inférieure à 1 ng/cm^2 ⁵¹⁻⁵⁵. Cette valeur est la plus petite qu'il soit possible d'atteindre car, à moins de 1 ng/cm^2 , le signal mesuré ne dépasse pas le bruit. À titre comparatif, une valeur de couverture de surface de $808 \pm 51 \text{ ng/cm}^2$ a été rapportée par Olivier Bolduc pour sa surface la moins efficace dans sa première étude sur l'adsorption non-spécifique de sérum bovin sur des capteurs SPR⁵⁶.

Parmi les groupes de recherches ayant développé des surfaces très efficaces, Hong Chen et ses collègues ont synthétisé un polymère de poly(N-acryloylaminoéthoxyéthanol) permettant de réduire significativement l'adsorption de protéines de sérum et de plasma humain⁵⁵. En augmentant l'épaisseur du film de polymère jusqu'à environ 28 nm, ils ont réduit l'adsorption non-spécifique de diverses protéines à $0,3 \text{ ng/cm}^2$ après un rinçage au tampon salin. Dans le même ordre d'idées, Hongwei Ma et ses collègues ont utilisé un poly(oligo(éthylène glycol) méthacrylate de méthyle) (poly(OEGMA)) pour réduire l'adsorption de protéines de sérum bovin foetal non dilué⁵³. Ils ont fait varier la densité du polymère à la surface afin d'optimiser son efficacité à réduire l'adsorption non-spécifique et ont réussi à obtenir moins de 1 ng/cm^2 d'adsorption non-spécifique après un rinçage avec un tampon salin.

Les polymères à base de carboxybétaine^{51, 57-66} et les brosses hydroxyalkyles^{52, 67-73} ont aussi été grandement exploités et ont démontré des performances

équivalentes pour la réduction d'adsorption non-spécifique de sérum non dilué sur des capteurs d'or. Entre autres, Hana Vaisocherová et ses collègues ont étudiés différents polymères, soient un pHEMA et un pCBAA, pour leur capacité à réduire l'adsorption non-spécifique de plasma sanguin humain et de plusieurs autres matrices, comme des jus de légumes et du lait⁶⁵. Ils ont non seulement étudié l'adsorption non-spécifique de ces matrices sur les polymères directement, mais aussi lorsque les polymères sont fonctionnalisés. Cela a permis d'observer la différence d'efficacité d'une monocouche pour réduire l'adsorption non-spécifique lorsque celle-ci est attachée à un anticorps qui affecte les propriétés de surface. Le polymère pCBAA s'est avéré très efficace pour toutes les matrices analysées, avec moins de 5 ng/cm² d'adsorption non-spécifique pour toutes les matrices lorsque le polymère n'était pas fonctionnalisé. Lorsque les polymères ont été fonctionnalisés avec divers anticorps, le pCBAA a conservé une bonne efficacité, avec une adsorption non-spécifique de 14 ng/cm².

D'autres exemples de chimie de surface développés pour réduire l'adsorption non-spécifique de sérum sont les peptides courts. Ils ont été utilisés en 2011 dans le groupe de Jean-François Masson⁷⁴ et en 2015 dans le groupe de Karl S. Booksh⁷⁵. Un polymère composé de sous-unités d'apparence peptidique a aussi été développé par Shaohui Lin en 2011 et s'est avéré très efficace⁷⁶. En effet, le polymère poly(N-éthyl-β-alanine), ou PEtA, a eu une adsorption non-spécifique après rinçage au tampon salin de 108 pg/mm² (ou 10,8 ng/cm²) et 98 pg/mm² (ou 9,8 ng/cm²) pour le plasma humain non dilué et le sérum humain non dilué respectivement.

D'autres classes de molécules ont aussi été développées, mais ne seront pas discutées ici. Ces informations sont regroupées dans la revue de littérature effectuée en 2015 par Christophe Blaszykowski⁵⁰.

1.4.2.1.2 Lysat cellulaire

Contrairement au sérum, la recherche portant spécifiquement sur le développement de surfaces réduisant l'adsorption non-spécifique de lysat cellulaire est très limitée. En 2015, le groupe de Hana Vaisocherová a utilisé une surface de polycarboxybétaine afin de réduire l'adsorption non-spécifique de lysat cellulaire

pour permettre la détection de micro-ARN par SPR⁷⁷ et en 2016, Christopher J. Benjamin et ses collègues ont développé un polymère à base de polyéthylène glycol permettant de réduire l'adsorption non-spécifique de lysat cellulaire sur des grilles de microscopie à transmission électronique (TEM)⁷⁸.

Quelques exemples d'utilisation de polymères anti-adsorption non-spécifique peuvent être trouvés dans la littérature⁷⁸⁻⁸⁶, mais, à notre connaissance, nous sommes le seul groupe de recherche à travailler sur le développement de chimie de surface destiné à réduire précisément l'adsorption non-spécifique de lysat cellulaire sur des surfaces d'or. Par exemple, Deependra Tyagi et ses collègues ont utilisé des surfaces fonctionnalisées avec de courtes chaînes de poly(éthylène glycol) et des polymères de type pOEGMA et pHEMA pour réduire l'adsorption non-spécifique de lysat cellulaire⁸⁶. Ils ont étudié l'effet des surfaces utilisées sur les anticorps de détection liés à la surface et sur l'adsorption non-spécifique, mais ils n'ont pas développé de nouvelles surfaces. Il en est de même pour Parayil Kumaran Ajikumar et ses collègues qui ont caractérisé un polymère dendritique PAMAM et étudié son effet sur la réduction de l'adsorption non-spécifique de lysat cellulaire⁷⁹. Ils n'ont pas développé un nouveau type de polymère, mais ils ont fait une étude détaillée de ses capacités. Ils ont entre autres mesuré la capacité du polymère à retenir un anticorps lié à sa surface.

Dans le cadre de cette thèse, les peptides et les liquides ioniques ont été développés pour réduire l'adsorption non-spécifique de lysat cellulaire. Afin de comparer les diverses monocouches auto-assemblées, le matériel adsorbé a été quantifié.

1.4.2.2 Méthode de mesure et formules utilisées

Afin de connaître l'efficacité d'une monocouche auto-assemblée contre l'adsorption non-spécifique de lysat cellulaire, celle-ci doit être exposée au fluide et le matériel adsorbé doit être quantifié. Dans le cadre de cette thèse, toutes les mesures de biodétection ont été effectuées par SPR. C'est donc aussi avec cette technique analytique que le matériel non-spécifique adsorbé sur les monocouches étudiées a été

mesuré. En SPR, la variation d'indice de réfraction mesuré près de la surface est directement liée à la quantité de matériel adsorbé sur celle-ci. Cette information est traduite par l'instrument en variation de longueur d'onde du point minimal de la bande SPR, appelée déplacement SPR. Le déplacement SPR peut ensuite être transposé dans l'équation suivante afin de connaître la quantité de matériel adsorbé sur la surface en ng/cm^2 :

$$\Gamma = \rho \left(\frac{-l_d}{2} \right) \ln \left(1 - \frac{\Delta\lambda_{SPR}}{m(\eta_{adsorbé} - \eta_{solution})} \right) \quad [5]$$

où Γ est la quantité de matériel adsorbé en ng/cm^2 , ρ est la densité de la monocouche auto-assemblée, l_d est la distance de pénétration du plasmon de surface, m est la sensibilité du système SPR, $\eta_{adsorbé}$ est l'indice de réfraction de la monocouche auto-assemblée et $\eta_{solution}$ est l'indice de réfraction de la solution complète.

En utilisant cette équation, la quantité de lysat s'adsorbant non-spécifiquement sur différentes monocouche a pu être déterminée. L'objectif étant de réduire le plus possible l'adsorption non-spécifique, les monocouches considérées les plus efficaces sont celles ayant une valeur de couverture de surface aussi près de zéro que possible.

1.4.2.3 Caractérisation du matériel adsorbé par spectrométrie de masse

Afin de comprendre le phénomène d'adsorption non-spécifique de matrices complexes sur des monocouches auto-assemblées, une étude par spectrométrie de masse peut être effectuée. Julien Breault-Turcot a effectué une étude visant à comprendre quelles protéines sériques s'adsorbaient sur différentes monocouches couramment utilisées en SPR⁸⁷. En comparant une monocouche d'alcane-thiol (16-MHA), un polyéthylène glycol et deux peptides efficaces pour réduire l'adsorption non-spécifique de sérum, il a pu observer la différence d'affinité entre diverses protéines et les surfaces. Il a d'abord observé, tel qu'attendu, que plus la monocouche était efficace pour réduire l'adsorption non-spécifique, moins il y avait de protéines à

la surface. Il a ensuite fait l'observation que certaines monocouches pouvaient avoir des affinités spécifiques avec certaines protéines. En effet, la protéine kininogen 2 n'était présente que sur une seule surface, soit la surface de 3-MPA-HHHDD-OH. Cette surface était pourtant plus efficace pour réduire l'adsorption non-spécifique. Ces observations ont permis de mieux comprendre le phénomène d'adsorption non-spécifique de sérum.

Dans le cadre de cette thèse, l'utilisation d'un appareil de MALDI-TOF-MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation – Time of Flight – Mass Spectrometry, ou Désorption-Ionisation Laser Assistée par Matrice – Temps de vol – Spectrométrie de Masse) a permis d'étudier le phénomène d'adsorption non-spécifique de lysat cellulaire. Cette technique offrait l'avantage de pouvoir obtenir des conditions d'adsorption de lysat cellulaire les plus représentatives possible du milieu d'analyse. En effet, une monocouche auto-assemblée pouvait être formée sur une plaque d'or, puis immergée dans le lysat cellulaire. Après le retrait du lysat, la plaque pouvait être directement recouverte de matrice et analysée immédiatement par spectrométrie de masse MALDI-TOF-MS. Cette technique ne nécessitait pas le rinçage ou le retrait physique du matériel adsorbé à la surface des plaques d'or, ce qui a grandement facilité l'analyse.

1.4.2.4 Théorie du MALDI-TOF

Le principe de la désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI) repose sur la co-cristallisation d'une matrice organique et de l'analyte d'intérêt sur une surface d'analyse⁸⁸. L'analyte est mis en solution avec la matrice, puis une goutte est déposée sur une plaque qui sera transférée dans l'appareil pour l'analyse. Il est aussi possible de déposer la matrice directement sur un échantillon tel qu'il a été décrit à la section précédente.

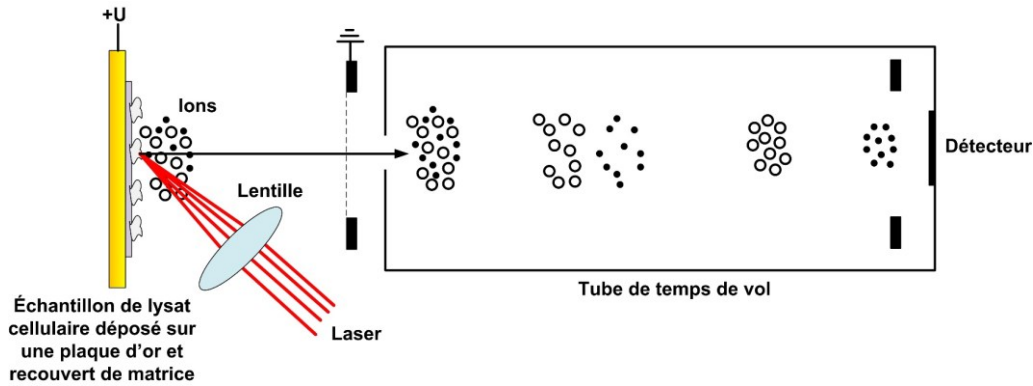


Figure 1.8 Principe de l'instrumentation d'un appareil de spectrométrie de masse MALDI-TOF

En spectrométrie de masse MALDI-TOF, l'ionisation de l'échantillon est produite suite à une courte impulsion du laser (3-10 ns). La matrice organique utilisée permet l'absorption du rayonnement laser et favorise ainsi l'évaporation et l'ionisation du composé à analyser. Un ensemble d'ions est créé et dirigé vers l'analyseur de masse grâce à une différence de potentiel appliquée entre le début et la fin de la chambre d'ionisation. Ce potentiel appliqué forme un faisceau d'ions qui traversera le tube de temps de vol, suivant un parcours linéaire exempt de champ électrique (Figure 1.8). Puisque la formation d'ions se fait grâce à une impulsion laser très courte, le point de départ de ceux-ci est sensiblement le même, peu importe la taille des ions. De plus, ils débutent tous avec sensiblement la même énergie cinétique globale. Ce faisant, la séparation de masse dans le tube de temps de vol se fait uniquement grâce à deux facteurs : la masse des ions et leur charge. L'équation suivante représente la relation entre la vitesse des ions et leur masse, démontrant la relation inverse de la masse de l'ion et sa vitesse dans le tube de temps de vol :

$$v = \sqrt{\frac{2ezU}{m}} \quad [6]$$

où v est la vitesse de l'ion, e est la charge d'un électron ($1,602 \times 10^{-19}$ C), z est la charge de l'ion, U est le voltage appliqué et m est la masse de l'ion.

Pour des ions de même charge, la séparation dans le tube de temps de vol sera basée uniquement sur la masse. Les ions de petite masse atteindront le détecteur en premier et *vice versa*. Selon le temps qu'ont pris les ions pour traverser le tube de temps de vol, l'analyseur de masse générera un spectre de masse où un signal est donné pour chaque ratio masse sur charge.

Malgré que l'énergie cinétique initiale des ions soit presque la même, il existe une légère différence pouvant nuire à la résolution du spectre de masse dans certains cas. Afin de corriger cette déviation, un réflectron peut être utilisé. Un réflectron est composé d'une série d'électrodes situées à la fin de la partie sans champ du tube de temps de vol. Plus les électrodes sont près du détecteur, plus elles ont un grand potentiel électrique. Les ions de même ratio masse/charge mais d'énergies cinétiques initiales différentes qui pénètrent dans le réflectron poursuivent leur trajectoire jusqu'à ce que leur énergie cinétique soit nulle, puis sont redirigés vers un détecteur. Plus un ion a une grande énergie cinétique en entrant dans le réflectron, plus il pénétrera loin, donc plus il passera de temps dans le réflectron. De cette façon, tous les ions de même ratio masse/charge atteindront le second détecteur exactement au même moment, améliorant ainsi grandement la résolution du spectre final.

La spectrométrie de masse MALDI-TOF est grandement utilisée pour faire l'analyse de molécules de haut poids moléculaire de manière intactes. Il est donc possible de faire l'analyse de protéines de poids moléculaire de plus de 100 kDa. De plus, la diversité de matrices organiques disponibles permet d'adapter le choix de matrice à l'analyte, menant à l'ionisation la plus efficace possible.

Cette technique permet l'analyse de protéines entières, mais elle permet aussi, suite à une digestion tryptique, l'analyse de peptides et leur séquençage. En effet, lorsqu'un spectre de masse de peptides est généré, il est possible de faire une seconde analyse, appelée spectrométrie de masse en tandem, pour connaître la séquence d'acides aminés dans chaque peptide. Il est alors possible d'identifier une protéine avec plus de précision. Cette caractéristique a été exploitée lors de l'analyse de lysat cellulaire afin de connaître l'identité des protéines adsorbées aux surfaces développées.

La spectrométrie de masse MALDI-TOF permet aussi l'analyse de lipides, rendant cette technique parfaitement appropriée pour l'analyse de lysat cellulaire adsorbé sur des monocouches auto-assemblées. En effet, puisque la membrane cellulaire est composée de lipides, ceux-ci sont très présents dans le lysat cellulaire. Grâce à des études menées au cours de cette thèse, nous avons déterminé qu'ils étaient les principaux responsables de l'adsorption non-spécifique de lysat cellulaire, contrairement à l'adsorption non-spécifique mesurée en sérum où ce sont plutôt des protéines qui s'adsorbent aux surfaces. Ce faisant, l'analyse de lipides par spectrométrie de masse MALDI-TOF fût nécessaire à la compréhension du phénomène d'adsorption non-spécifique de lysat cellulaire sur les monocouches auto-assemblées de peptides développées dans le cadre de cette thèse.

1.4.3 Peptides

Les peptides sont utilisés dans notre groupe de recherche pour réduire l'adsorption non-spécifique depuis 2008. Ils ont tout d'abord été utilisés dans le sérum par Olivier Bolduc⁴⁹, qui a démontré qu'en modifiant la séquence d'acides aminés il était possible de modifier les propriétés physico-chimiques des peptides et, ainsi, modifier leur capacité à réduire l'adsorption non-spécifique. Le même principe a ensuite été appliqué pour le lysat cellulaire dans le cadre de cette thèse.

1.4.3.1 Structure des peptides utilisés

Un peptide est une courte chaîne d'acides aminés, les unités structurelles des protéines. Les peptides peuvent être produits en digérant une protéine, grâce à certaines enzymes spécifiques comme la trypsine, mais ils peuvent aussi être synthétisés, en ajoutant un acide aminé à la fois sur la séquence, pour bâtir une chaîne de la longueur désirée. C'est cette seconde méthode qui a été utilisée dans le cadre de cette thèse, car elle permet d'avoir un plein contrôle sur la structure chimique des peptides développés, donc sur leurs propriétés physico-chimiques. De plus, cette méthode de synthèse permet d'ajouter un groupement thiol au N-terminal de la chaîne peptidique afin de former une monocouche auto-assemblée sur les capteurs SPR.

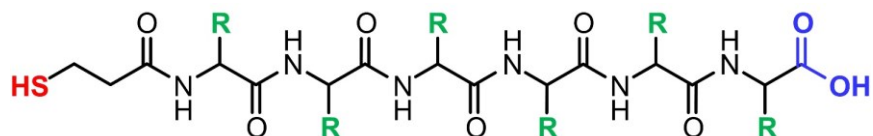


Figure 1.9 Structure chimique d'un peptide formé de 6 acides aminés et ayant un groupement thiol au N-terminal

Les acides aminés ont un groupement amine, un groupement carboxyle et une chaîne latérale. Lorsque des acides aminés sont assemblés pour former un peptide, le groupement amine de l'un est lié au groupement carboxyle de l'autre, formant ainsi une chaîne d'acides aminés (Figure 1.9). Les groupements latéraux sont exposés à l'environnement et c'est grâce à eux qu'il est possible de contrôler les propriétés physico-chimiques d'une surface. Par exemple, en utilisant des acides aminés ayant une chaîne latérale très hydrophobe, comme la leucine, le peptide résultant est plutôt hydrophobe. À l'inverse, lorsque des acides aminés ayant des groupements plus hydrophiles sont utilisés, comme l'acide aspartique, le peptide résultant est plutôt hydrophile. C'est donc en variant la nature de la chaîne latérale que les propriétés physico-chimiques d'un peptide seront contrôlées.

1.4.3.2 Types de peptides utilisés

En utilisant des acides aminés avec des propriétés différentes pour former les peptides utilisés pour réduire l'adsorption non-spécifique, il est possible de déterminer quelles propriétés sont plus efficaces pour empêcher le lysat cellulaire de s'adsorber à la surface des capteurs. De plus, il est possible de faire varier la longueur des peptides afin d'observer l'efficacité de la longueur sur la réduction de l'adsorption non-spécifique. Finalement, il est aussi possible de faire diverses combinaisons d'acides aminés ayant des propriétés similaires ou complémentaires. Cela mène à des monocouches encore plus efficaces que des peptides constitués d'un seul acide aminé répété plusieurs fois (les détails de l'étude sont donnés au chapitre II).

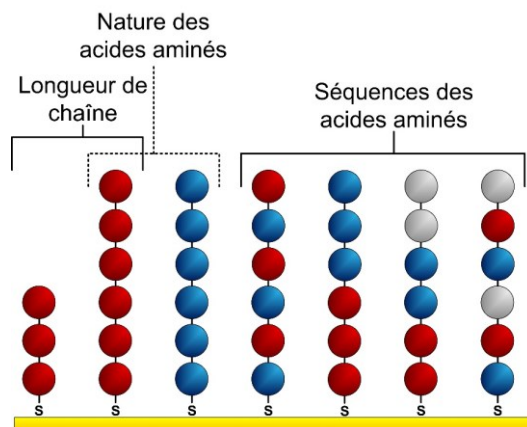


Figure 1.10 Schématisation des structures des monocouches auto-assemblées peptidiques utilisées pour la réduction de l'adsorption non-spécifique de lysat cellulaire

La Figure 1.10 représente les types de peptides à chaîne courte ayant été synthétisés dans le cadre de cette thèse. L'alternance de billes de couleurs représente les différents types de modifications de la structure des peptides qui peuvent être effectuées dans le but de modifier leurs propriétés physico-chimiques.

Tout d'abord, il est possible de modifier le nombre d'acides aminés utilisés pour former un peptide, afin d'évaluer quel est l'effet de la longueur de chaîne sur l'adsorption non-spécifique (Figure 1.10, billes rouges de gauche).

Ensuite, il est possible de modifier la nature des acides aminés choisis, en observant l'effet de la polarité et de la charge par exemple. Dans la Figure 1.10, les peptides ayant une seule couleur de bille représentent des homopeptides, soient des peptides formés d'un seul acide aminé, répété un certain nombre de fois. En étudiant l'efficacité des homopeptides sur la réduction de l'adsorption non-spécifique, il est possible de déduire quelles sont les propriétés physico-chimiques les plus efficaces.

Finalement, les peptides schématisés par une alternance de billes de couleurs différentes à la Figure 1.10 représentent les multiples possibilités de modification de la structure lorsque des hétéropeptides sont synthétisés. En effet, il est possible de combiner les propriétés physico-chimiques de plusieurs acides aminés en les combinant et en alternant leur séquence, afin de créer de nouveaux peptides. Puisque

les peptides sont attachés à une surface, il a été observé que l'ordre des acides aminés dans la séquence pouvait influencer grandement les propriétés de surface (voir chapitre II), car selon l'ordre des acides aminés, ce ne seront pas les mêmes groupements fonctionnels qui seront exposés à solution d'analyse. Ce sujet sera discuté plus en détails dans le chapitre II.

1.4.3.3 Avantages de l'utilisation des peptides

En faisant la conception de molécules permettant de réduire l'adsorption non-spécifique de lysat cellulaire, il ne faut pas perdre de vue que l'objectif, une fois la molécule la plus efficace trouvée, est de former des biocapteurs permettant la détection de matériel biologique. Les molécules doivent donc avoir trois caractéristiques importantes : former une monocouche auto-assemblée sur une surface d'or, permettre l'ancrage d'un récepteur moléculaire et favoriser l'activité du récepteur biologique.

Le premier avantage apporté par les peptides dans le développement de biocapteurs est que, lors de la synthèse peptidique, il est aisé d'attacher un groupement thiol en bout de chaîne. Ce faisant, les peptides synthétisés peuvent s'auto-assembler sur une surface d'or. Le second avantage des peptides est qu'ils ont tous un groupement amine et un groupement carboxyle. Lorsque le peptide est synthétisé, ce sont ces groupements qui se lie entre eux pour former la chaîne peptidique, mais il reste toujours un groupement amine terminal et un groupement carboxyle terminal. Dans le cadre de cette thèse, les peptides ont été volontairement synthétisés en fonction que l'acide carboxylique du dernier acide aminé soit exempt de tout groupement fonctionnel supplémentaire (voir Figure 1.9). Grâce à cette propriété, peu importe la séquence d'acide aminés choisie, il a toujours été possible d'assurer l'ancrage d'un récepteur moléculaire à la surface du capteur SPR par un couplage avec un carbodiimide. Finalement, un autre avantage de l'utilisation des peptides est qu'ils offrent aux protéines un environnement hydraté et semblable à leur structures. Ce faisant, ils maximisent les chances que le fonctionnement des molécules biologiques liées à la surface soit optimal⁸⁹.

1.4.3.4 Méthode de synthèse

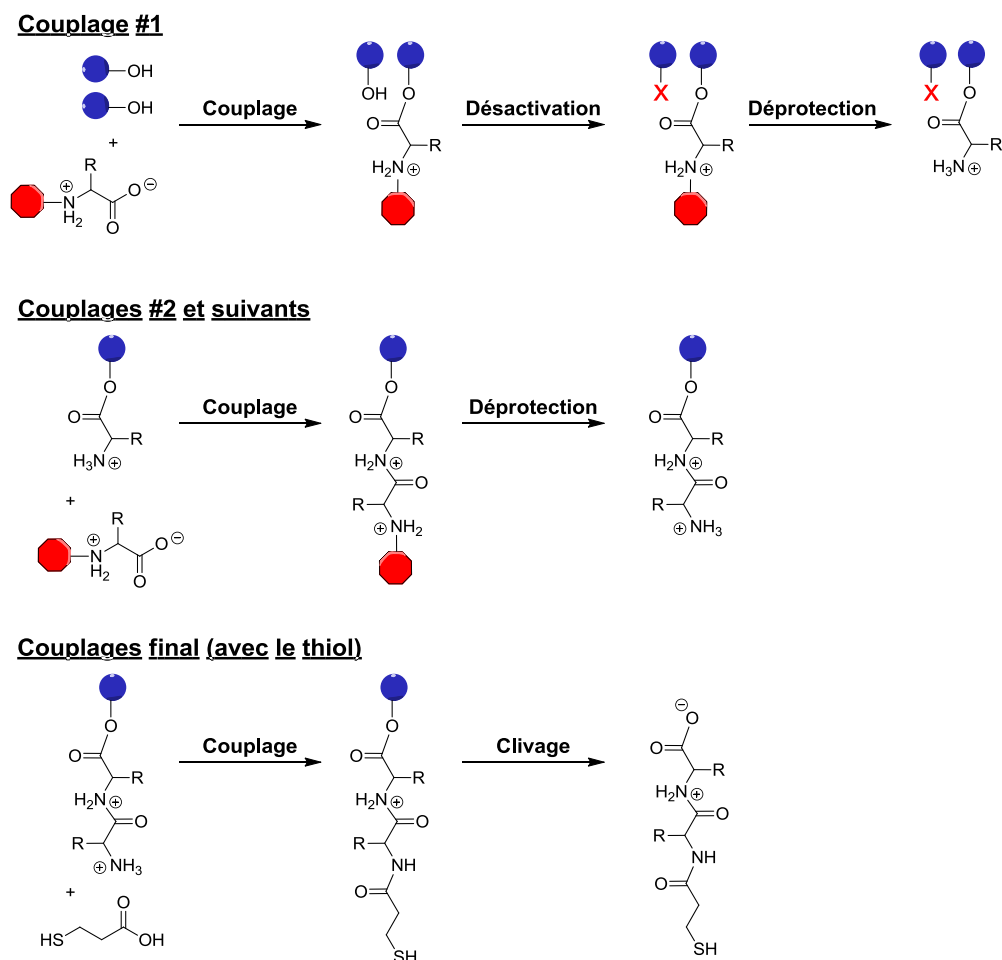


Figure 1.11 Synthèse peptidique sur support solide

Autant en milieu industriel qu'en recherche, la synthèse peptidique sur support solide est une méthode grandement utilisée pour sa simplicité. Elle permet d'ajouter un à un les acides aminés, donc de contrôler parfaitement la séquence peptidique. Les acides aminés choisis pour la synthèse sur support solide portent des groupements protecteurs sur les groupes fonctionnels qui ne doivent pas réagir durant leur couplage à la résine. Dans le cadre de cette thèse, le groupement amine était protégé (en rouge sur la Figure 1.11). Lors de la synthèse (Figure 1.11), le premier acide aminé est greffé sur la résine servant de support solide par la formation d'un lien peptidique (en bleu

sur la Figure 1.11). Il est ensuite déprotégé, la résine est désactivée, puis le deuxième acide aminé est greffé. Le cycle de déprotection-réaction est poursuivi jusqu'à ce que le peptide ait atteint la longueur désirée. Un excès d'acide aminé est utilisé afin de maximiser le nombre de réactions avec la résine et tenter d'avoir un peptide le plus pur possible. Malgré cela, il est possible que certains sites de réactions ne puissent réagir durant le premier couplage. Pour cette raison, une étape de désactivation est faite après le premier couplage, bloquant ainsi les sites qui n'ont pas réagi. Cela limite les risques d'avoir des peptides avec des acides aminés en moins dans la séquence.

1.4.3.5 Conclusion sur l'utilisation des peptides pour la réduction de l'adsorption non-spécifique de lysat cellulaire

Grâce aux propriétés décrites dans cette section, les peptides ont été utilisés dans le cadre de cette thèse en première hypothèse pour réduire l'adsorption non-spécifique de lysat cellulaire. La facilité de modulation des propriétés physico-chimiques grâce aux modifications dans la séquence peptidique a permis d'étudier plusieurs dizaines de peptides différents, afin de bien comprendre quels types de propriétés étaient efficaces.

Toutefois, au cours de l'étude sur l'efficacité des peptides à réduire l'adsorption non-spécifique, un plateau a été atteint, de sorte que les peptides développés semblaient avoir atteint la limite de leur efficacité. L'adsorption non-spécifique de lysat cellulaire n'ayant pas été complètement éliminée, le type de molécule utilisée pour la réduction de l'adsorption non-spécifique a été modifié. Les liquides ioniques présentés à la section suivante ont donc été choisis, car ils ont eux aussi des propriétés facilement modulables et sont reconnus pour conserver l'activité des anticorps⁴⁴.

1.4.4 Liquides ioniques

Les liquides ioniques, découverts en 1914 par Paul Walden suite à ses observations des propriétés physiques du nitrate d'éthylammonium⁹⁰, sont

aujourd'hui utilisés dans une diversité impressionnante de domaines académiques et industriels. Par exemple, les liquides ioniques peuvent agir en tant qu'électrolytes pour des batteries au lithium⁹¹⁻⁹², servir comme électrolytes de façon générale⁹³, être utilisés comme additifs pour les peintures⁹¹, être ajoutés aux agents nettoyants⁹¹, agir en tant que solvant vert⁹⁴ et servir comme solvant pour la catalyse et la synthèse organique^{91, 95-97}. La grande diversité de leurs structures chimiques permet d'adapter les liquides ioniques aux besoins spécifiques.

1.4.4.1 Qu'est-ce qu'un liquide ionique ?

La définition de liquide ionique est très générale, ce qui explique son large éventail de structures chimiques, donc ses multiples domaines d'application. Un liquide ionique est un sel organique ayant un point de fusion inférieur à 100°C, donc un liquide constitué uniquement d'ions^{91, 97-99}. En général, les liquides ioniques ont un noyau cationique et un contre-ion anionique, mais l'inverse est aussi possible. Les propriétés physico-chimiques uniques des liquides ioniques leur confèrent de multiples avantages pour la synthèse organique, puisqu'ils peuvent solubiliser une multitude de composés, être utilisés pour la synthèse en milieu très polaire mais non aqueux et être utilisés dans des systèmes sous vide, car ils ne sont pas volatils⁹⁷.

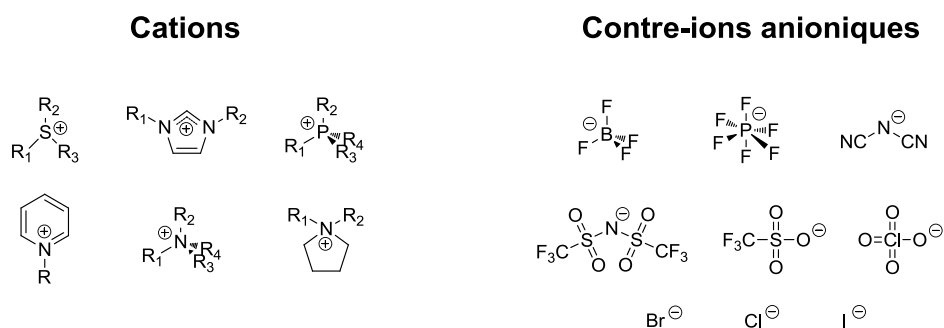


Figure 1.12 Noyaux et contre-ions communs des liquides ioniques

La structure générale des liquides ioniques cationiques comporte un noyau positif et une ou plusieurs chaînes alkyles^{97, 99}, ainsi qu'un contre-ion négatif (Figure

1.12). Les noyaux cationiques sont souvent des dérivés d'azote, de phosphore ou de soufre. Des exemples de contre-ions fréquemment retrouvés sont les halogénures (Br^- , Cl^- , I^-), le perchlorate [ClO_4^-], (le bis(trifluorométhylsulfonyl)imide ([NTf_2^-]), le triflate de trifluorométhanesulfonate ([OTf^-]), le tétrafluoroborate ([BF_4^-]), le dicyanamide ([$\text{N}(\text{CN})_2^-$]) et l'hexafluorophosphate ([PF_6^-])^{97, 99}. Il existe donc une grande variété possible de liquides ioniques, avec des propriétés physico-chimiques différentes selon les chaînes choisies pour le noyau cationique et selon la nature du contre-ion, permettant ainsi de préparer un liquide ionique spécifique à ses besoins.

1.4.4.2 *Types de liquides ioniques utilisés*

Dans le cadre de cette thèse, des liquides ioniques ayant un cation imidazolium ont été utilisés. Tout comme les peptides, les liquides ioniques devaient réduire l'adsorption non-spécifique de lysat cellulaire efficacement, tout en permettant d'attacher un récepteur moléculaire afin de permettre la construction d'un biocapteur et l'analyse de molécules d'intérêt. De plus, puisque les études sur l'adsorption non-spécifique de lysat cellulaire ont été conduites sur les peptides avant les liquides ioniques, il était possible de prévoir que des liquides ioniques hydrophobes auraient une meilleure efficacité pour réduire l'adsorption non-spécifique. Ainsi, des liquides ioniques comportant un groupement thiol, une longue chaîne alkyle et un acide carboxylique ont été synthétisés. Le thiol a pour fonction de permettre la formation d'une monocouche auto-assemblée de liquide ionique à la surface d'or d'un capteur SPR et l'acide carboxylique permet la liaison entre le liquide ionique et un récepteur moléculaire comme un anticorps.

L'effet du contre-ion sur l'efficacité des liquides ioniques à réduire l'adsorption non-spécifique a aussi été étudiée. En effet, les contre-ions ont différentes propriétés physico-chimiques et peuvent avoir une influence sur les propriétés de surface. Les contre-ions étudiés étaient Br^- , BF_4^- , PF_6^- , ClO_4^- et NTf_2^- . Cette gamme de contre-ions a permis d'étudier l'effet de la taille et l'effet de l'hydrophobie des contre-ions sur l'efficacité des liquides ioniques à réduire l'adsorption non-spécifique de lysat cellulaire.

La nomenclature des liquides ioniques varie d'un article à l'autre. Dans la revue de littérature effectuée par Jason P. Hallet et Tom Welton, la nomenclature suivante a été établie dans le but d'uniformiser et de clarifier le nom de divers liquides ioniques :

[«(Groupement fonctionnel)^xC_n» «(Groupement fonctionnel)^yC_m» «noyau cationique»]

où (Groupement fonctionnel)^x et (Groupement fonctionnel)^y indiquent la présence d'un groupement fonctionnel sur les carbones x et y de chaînes de carbone de longueur n et m et où C_n et C_m indiquent le nombre de carbone de chaque chaîne alkyle.

Cette nomenclature a aussi été utilisée dans le cadre de cette thèse. Deux liquides ioniques ont été synthétisés avant l'échange de contre ions (Figure 1.13, gauche), soient le [(HS)¹²C₁₂(COOH)²C₂im]⁺ et le [(HS)¹²C₁₂(COOH)⁵C₅im]⁺. Ces liquides ioniques ont une chaîne alkyle de 12 carbones sur laquelle un groupement thiol est attaché, ainsi qu'une chaîne alkyle de 2 ou 5 carbones où un acide carboxylique est attaché. Les deux liquides ioniques ont un noyau imidazolium, d'où l'abréviation «im».

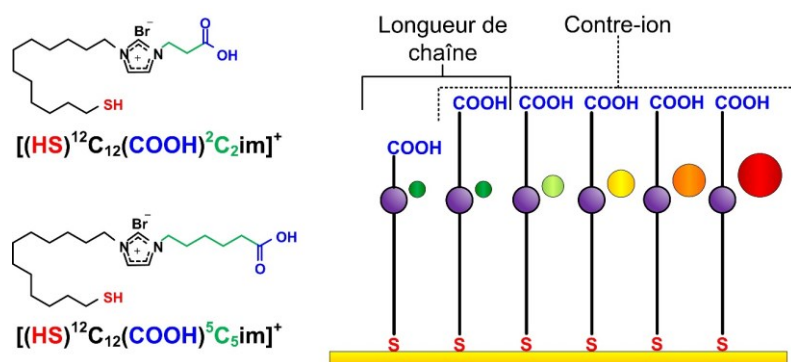


Figure 1.13 Schématisation des structures des monocouches auto-assemblées de liquides ioniques utilisées pour la réduction de l'adsorption non-spécifique de lysat cellulaire

Tel que mentionné précédemment, la modification de la structure des liquides ioniques ainsi que la modification de la nature du contre-ion influencent les propriétés des liquides ioniques. La section de droite de la Figure 1.13 illustre les différentes modifications effectuées au cours de cette thèse. Tout d'abord, la longueur de chaîne du groupement acide carboxylique a été modifiée : soit deux ou 5 carbones séparaient le noyau imidazole du groupement acide carboxylique. Ensuite, pour les deux liquides ioniques, la métathèse de contre-ion a été effectuée afin d'étudier l'effet du contre-ion sur les propriétés de surface. Un total de 10 liquides ioniques a donc été étudié.

1.4.4.3 Avantages de l'utilisation des liquides ioniques

Le principal avantage recherché par l'utilisation de liquides ioniques pour la réduction de l'adsorption non-spécifique de lysat cellulaire sur des capteurs SPR plutôt qu'un autre type de molécules est qu'il a été démontré par le passé qu'ils conservaient l'activité des anticorps à la surface des capteurs⁴⁴. Grâce à cette propriété, ainsi qu'à la flexibilité dans la synthèse permettant d'ajouter les groupements fonctionnels nécessaires à la construction d'un biocapteur, les liquides ioniques sont une classe de molécules très prometteuse dans le domaine de la fabrication de biocapteurs. De plus, les liquides ioniques ont l'avantage d'avoir des propriétés physico-chimiques modulables grâce à la métathèse de contre-ions. Lorsqu'un liquide ionique ayant un contre-ion donné est mis en solution avec un contre-ion ayant une plus grande affinité avec le noyau cationique, l'échange de contre-ion se fera automatiquement. Cette propriété des liquides ioniques s'avère aussi vraie lorsque les liquides ioniques sont fixés à une surface d'or. Ainsi, l'effet sur la réduction de l'adsorption non-spécifique des différentes propriétés physico-chimiques des contre-ions a pu être étudié, sans avoir besoin d'effectuer la synthèse individuelle de chacun des couples cation imidazolium – contre-ion.

1.4.4.4 Conclusion sur l'utilisation des liquides ioniques pour la réduction de l'adsorption non-spécifique de lysat cellulaire

Grâce aux liquides ioniques étudiés dans le cadre de cette thèse, l'adsorption non-spécifique de lysat cellulaire a pu être presque éliminée. De plus, à l'aide de cette nouvelle chimie de surface, un biocapteur de HER2 a pu être élaboré et la détection de HER2 a été effectuée dans du lysat cellulaire. Cette nouvelle chimie de surface, simple à synthétiser et très stable en surface, ouvre la voie pour le développement de multiples biocapteurs pouvant être utilisés en lysat cellulaire, pour le dépistage de cancer par exemple.

1.5 OBJECTIFS DE LA THESE

Le premier objectif de cette thèse était le développement de chimie de surface permettant la réduction de l'adsorption non-spécifique de lysat cellulaire sur des capteurs SPR dans le but de permettre la détection d'analytes d'intérêt dans du lysat cellulaire concentré grâce à une méthode comme la SPR ou à d'autres méthodes analytiques ne permettant pas la distinction entre l'adsorption non spécifique et le signal de l'analyte. Afin d'atteindre cet objectif, des peptides ayant des propriétés physico-chimiques variées ont été développés et étudiés au chapitre 2. Le phénomène d'adsorption non-spécifique a aussi été étudié par spectrométrie de masse afin d'améliorer notre compréhension d'un phénomène très peu étudié jusqu'à aujourd'hui dans la littérature. Grâce à cette étude, une seconde série de molécules permettant la réduction d'adsorption non-spécifique de lysat cellulaire a pu être développée. En se basant sur les connaissances acquises lors de l'étude peptidique, des liquides ioniques ont pu être synthétisés avec des propriétés physico-chimiques optimisées. Ces liquides ioniques ont permis l'élimination complète de l'adsorption non-spécifique de lysat cellulaire.

Le second objectif de cette thèse visait à développer des biocapteurs SPR permettant la détection d'analytes d'intérêt directement dans des échantillons de sérum et de lysats cellulaires. Cela a tout d'abord été effectué dans le chapitre 3, où

les liquides ioniques précédemment développés ont pu être utilisés pour fabriquer un biocapteur permettant la détection d'un biomarqueur de cancer, la protéine HER2, directement dans le lysat cellulaire. Ensuite, dans le chapitre 4, un second biocapteur a été fabriqué afin de permettre la détection d'anti-asparaginase dans le sang de patients leucémiques. Cette étude a permis de quantifier le taux de réactions allergiques de patients traités avec la L-asparaginase. L'analyse d'échantillons cliniques dans le cadre de ce projet a permis de démontrer l'efficacité des capteurs SPR en milieu clinique et de comprendre quels étaient les défis pour les chercheurs en ce qui a trait à l'analyse de tels échantillons.

CHAPITRE II

NONSPECIFIC ADSORPTION OF CRUDE CELL LYSATE ON SPR SENSORS

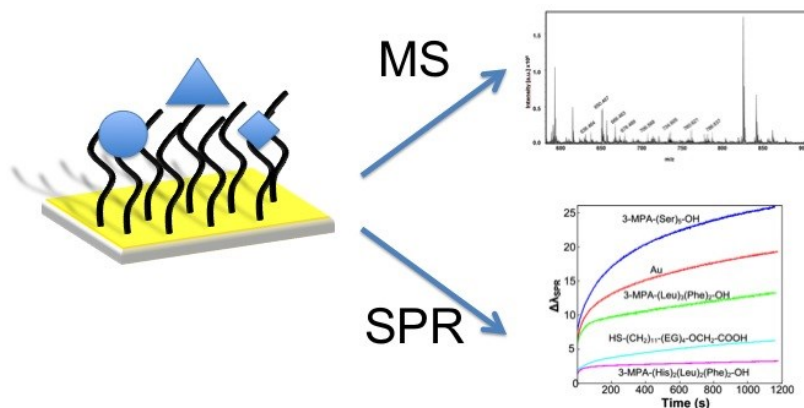
Alexandra Aubé¹, Julien-Breault-Turcot¹, Pierre Chaurand¹, Joelle N. Pelletier^{1,2,3}
and Jean-François Masson^{1,4*}

¹Département de Chimie, Université de Montréal, C.P.6128 Succ. Centre-ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7

²PROTEO, the Québec Network for Research on Protein Structure, Function and Engineering, QC, Canada

³Département de Biochimie, Université de Montréal, C.P. 6128 Succ. Centre-ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7

⁴Centre for self-assembled chemical structures (CSACS)



Les travaux de recherche décrits dans ce chapitre¹ ont été conçus en collaboration avec Professeur Pierre Chaurand, Professeure Joelle N. Pelletier et Professeur Jean-François Masson. J'ai réalisé toutes les expériences au laboratoire, excepté les expériences en spectrométrie de masse qui ont été réalisées avec l'aide de Julien Breault-Turcot. La rédaction du manuscrit a été effectuée en collaboration avec Professeur Pierre Chaurand, Professeure Joelle N. Pelletier et Professeur Jean-François Masson, ainsi qu'avec Julien Breault-Turcot.

¹ 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 (32), 10141-10148.

2.1 ABSTRACT

Nonspecific adsorption of the molecular components of biofluids is ubiquitous in the area of biosensing technologies, severely limiting the use of biosensors in real-world applications. The surface chemistries developed to prevent nonspecific adsorption of crude serum are not necessarily suited for sensing in other biosamples. In particular, the diagnostic potential of differential expression of proteins in tissues makes cell lysate attractive for disease diagnostics using solid biopsies. However, crude cell lysate poses a significant challenge for surface chemistries due to a large concentration of highly adherent lipids. Contrary to the nonspecific adsorption in crude serum being suppressed by hydrophilic surfaces, the surface plasmon resonance (SPR) analysis of serine, aspartic acid, histidine, leucine and phenylalanine-based peptide monolayers revealed that hydrophobic and positively charged peptides decreased nonspecific adsorption when using lysate from HEK 293FT cells. A PEG monolayer resulted in 2-fold greater fouling than the best peptide (3-MPA-(His)₂(Leu)₂(Phe)₂-OH) under the same conditions. MALDI-TOF/TOF MS analysis of the adsorbate from cell lysate confirmed that lipids are the main source of nonspecific adsorption. Importantly, the MS study revealed that both the number of lipids identified and their intensity decreased with decreasing nonspecific adsorption. A peptide monolayer thus provides an efficient means to suppress nonspecific adsorption from this human cell lysate.

2.2 INTRODUCTION

The healthcare industry constantly searches for methodologies to improve diagnostic techniques, in terms of analysis time, sensitivity and selectivity. Despite the numerous technological and medical advances, cancer remains one of the biggest scourges of humanity. The need is thus well justified to develop early and reliable cancer diagnostic technologies to improve the chance of remission of cancer patients¹⁰⁰. ELISA assays and various biosensing technologies are the staple methodologies for identifying and quantifying cancer biomarkers. These

technologies rely mainly on solubilized proteins found in serum due to the non-invasive nature of sample collection. Nonetheless, not all proteins are of diagnostic interest.

Many biosensors have been developed utilizing a large variety of selective bioreceptors, such as enzymes, antibodies or DNA¹⁰¹. Different techniques such as mass spectrometry¹⁰²⁻¹⁰³ or fluorescence spectroscopy employed for protein arrays¹⁰⁴ provide analytical detection of the results on the sensor. Surface plasmon resonance (SPR) is an analytical tool of particular interest because it allows real-time monitoring of multiple biomarkers with sensitivity and rapidity. SPR sensing has been significantly developed in recent years to quantify biomarkers in complex matrixes, such as serum¹⁰⁵⁻¹⁰⁷, plasma¹⁰⁸ or saliva¹⁰⁹. SPR biosensors have been shown to be suited to detection of several cancer biomarkers in solubilized samples, such as oropharyngeal squamous cell carcinoma¹⁰⁹, prostate cancer¹⁰⁵, colorectal, gastric and pancreatic cancer¹⁰⁶, intestinal cancer¹⁰⁷, liver cancer¹⁰⁸ and ovarian cancer¹¹⁰, among others. However, several types of cancer do not exhibit a significant protein or metabolomic response in biofluids such as blood, serum, urine or saliva. In those cases, biopsies are taken from the suspected tumor site to verify the presence of cancerous cells. The staple diagnostic method, immunostaining and microscopic readout, is lengthy, requires highly skilled pathologists and suffers from subjective interpretation. This procedure is thus prone to human error, which may delay the assessment of the presence of cancer and retard the onset of treatment. To circumvent this problem, direct lysis of biopsy tissue for biomarker analysis with a SPR biosensor could provide analytical grade results in less than an hour.

Cell lysate is a lipid-rich complex biological matrix, which is expected to significantly foul the sensor surface. Although lipid adsorption promoted by different surface chemistries has been used to immobilize active membrane proteins on sensors¹¹¹ and as a membrane cloaking technique to analyse proteins in serum³⁶, SPR sensing requires low fouling surface chemistries. A recent review details the significant efforts deployed to circumvent the nonspecific adsorption problem in biosensing¹¹². The most promising surface chemistries include a polycarboxybetaine

acrylamide surface¹¹³ and polyMeOEGMA¹¹⁴ surfaces. Recently, a peptidoid polymer¹¹⁵ and a peptide¹¹⁶ self-assembled monolayer (SAM) were proposed to reduce nonspecific adsorption of serum. All these surfaces have been developed to prevent nonspecific adsorption of proteins from serum, but, to our knowledge, no attempt at developing low-fouling surface chemistry for cell lysate has been reported. As a result of the lipid-rich nature of cell lysate in opposition to the protein-rich composition of serum, it is expected that the surfaces developed to prevent nonspecific adsorption from serum will not be effective when used with cell lysate. We have previously applied a surface developed for serum analysis toward analysis using crude bacterial cell lysate, with moderate success¹¹⁷. Although the enzyme β -lactamase was successfully detected in the test cell lysate, significant fouling was observed on the sensor exposed to a control cell lysate. The need thus exists to develop a surface chemistry suited to reduce the nonspecific adsorption from cell lysate.

Establishing the physical parameters governing nonspecific interactions from cell lysate is primordial to design low fouling surface chemistries. Understanding nonspecific adsorption implies obtaining chemical information on the complex processes involved at surfaces. SPR sensing provides quantitative information on the total “mass” adsorbed to the chip. To provide information on the chemical identity of molecular adsorbates, a combination of SPR and mass spectrometry (MS) must be used¹¹⁸. To date, SPR-MS has been mainly applied to identify protein-antibody interaction¹¹⁹. While this technique has tremendous potential, it has never been employed for identification of nonspecifically bound molecules. We show in this paper a first example that makes use of matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) time of flight (TOF) MS for identification of lipids and proteins nonspecifically bound to the SPR surface.

2.3 EXPERIMENTAL SECTION

2.3.1 Peptide-modified SPR chips

A solid-phase procedure was extensively described in the literature to synthesize the 3-MPA-peptides-OH^{116-117, 120} and was adapted as detailed below. After the first coupling, the resin was protected by reacting 10 equiv of N-ethyl-diisopropylamine (Alfa Aesar) and 10 equiv of acetic anhydride (Sigma Aldrich) for 1 hour. Also, only 6 equiv of N-ethyl-diisopropylamine instead of 9 were used for each amino acid coupling. Finally, the resin was rinsed only 3 times with DMF between each step, except when the resin had to be stored dry overnight, in which case the DMF-Methanol-DCM rinsing described in the literature were performed. The exact mass of each peptide was verified using MS (ESI-TOF-MS, Agilent), with a direct injection of a 1:1 w/v solution of the peptide in ethanol. Because of the electrospray ionization process, singly and multiply-charged ions attributed to the expected peptides were observed.

Micro cover glass slides (22x22 mm, VWR) were cleaned for 90 minutes with a hot piranha solution (*Caution! Piranha is highly corrosive*). The slides were then coated with a 1 nm Cr adhesion layer, followed by a 50 nm thick Au layer to create the SPR sensor. The sensors were reacted overnight in a 1 mM DMF solution of the peptide to form the monolayer. The sensors were then rinsed with ethanol to wash away the unbound peptides. Detailed studies of the formation and conformation of the peptide monolayers concluded that depositing thiolated peptides at open-circuit potential forms a densely packed and single monolayer on the surface of Au sensors^{117, 121}. A full monolayer is necessary to suppress nonspecific adsorption.

2.3.2 Cell Lysate

HEK 293FT cells were cultured at 37°C with a 5% CO₂ atmosphere in a DMEM (-) cell growth medium (Life Technologies) in which 10% v/v fetal bovine serum (Life Technologies) and 1% v/v of a 100x penicillin/streptomycin solution

(Life Technologies) were added to obtain DMEM (+) culture media. Cells were passaged² and propagated to obtain pools of 10^9 cells. The pooled cells were lysed with 50 mL of RIPA buffer composed of HEPES (50 mM), NaCl (250 mM), EDTA (5 mM), Triton-X100 (1% v/v) and a protease inhibitor cocktail tablet (Complete ULTRA tablets, glass vials from Roche Applied Science). The mixture was passed through a BD-25G1½ needle to complete the lysis. Quantification of lipids in the cell lysate was performed as described below. A common Bligh and Dyer extraction was used to extract lipids¹²². Specifically, to 1 mL of cell lysate was added 3.75 mL of a 1:2 chloroform:methanol extraction solvent. After vortexing, 1.25 mL of chloroform was added, followed by the same volume of water after vortexing. The mixture was vortexed again, then allowed to separate in two phases. The chloroform phase was recovered with a Pasteur pipette, washed with 2.25 mL of water and transferred in a pre-weighed vial. After evaporating the chloroform, the vial was weighed again to quantify the lipids.

2.3.3 SPR Measurements

The SPR chip was mounted on a custom-made SPR instrument based on a dove prism¹²³ and allowed to stabilize for 15 minutes. Optical contact was ensured with RI-matching oil, deposited between the SPR chip and the prism (requires stabilization). Then, 100 spectra of s-polarized light were recorded as a reference. Each spectrum was acquired at 1 Hz from 10 accumulations at 100 ms integration time. P-polarized light served for the real-time measurements. The peptide-modified SPR chips were exposed to PBS for 5 min, to cell lysate for 20 min and the baseline was monitored again in PBS for 5 min. Data were processed with Matlab software. Each peptide SAM was subjected to this experiment at least four times to study reproducibility of the results.

² Passaged: the cells were taken from one petri dish and separated in multiple petri dishes in order to let them replicate and increase the total number of cells.

2.3.4 MALDI-TOF/TOF MS of nonspecifically bound molecules

MALDI-TOF/TOF analyses were performed to monitor peptides and lipids on the adsorbed layer of cell lysate on peptide SAMs using α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA, peptides and lipids in positive mode) and 2',6'-dihydroxyacetophenone (DHA, lipids in negative mode) matrixes. Matrix solutions were prepared at 10 mg/mL in 1:1 acetonitrile H₂O + 0.1% trifluoroacetic acid. It is noteworthy to point out that the slides used for MS experiments were 25 x 75 x 1.0 mm microscope slides to fit the slide adaptor of the MS instrument. The slides were Au-coated and functionalized as described above. Functionalized slides were incubated for 10 min in cell lysate, then rinsed for 2 min in PBS and 2 min in distilled water. A 30 min trypsin digestion was run at 37°C on three different spots (3 μ L) per slide on a heating plate controlled by a temperature sensor. The substrate was mounted on hydrated cotton wool on the heating plate to distribute heat uniformly. A reference gold coated slide with a drop of water was used as a reference for the temperature sensor. Matrix deposition was done by successive evaporation of 0.5 μ L of matrix solution on the digested spots to analyze proteins, and beside the digested spots for lipid analysis. MS analysis of the adsorbed material was performed with a MALDI-TOF/TOF mass spectrometer (UltrafleXtreme, Bruker Daltonics, Billerica MA) as previously described by Ratel *et al.*¹²⁴. Protein and lipid identification were made with MASCOTTM search engine and LIPID MAPS database (<http://www.lipidmaps.org>) respectively.

2.4 RESULTS AND DISCUSSION

2.4.1 Nonspecific adsorption of homopeptides

It has been long established that nonspecific adsorption of proteins in serum is reduced by hydrophilic surfaces¹²⁵, such as hydrophilic peptide SAMs^{117, 120, 126}. It is however essential to reassess the impact of the surface property in the face of the distinctive molecular composition of cell lysate¹²⁷. Here, we focus on lysate from

cultured human cells in the interest of improving diagnostic capacity using lysate from biopsies.

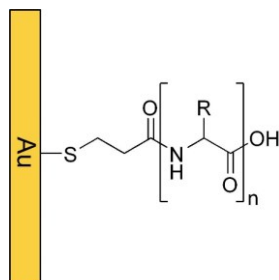


Figure 2.1 General structure of 3-MPA-amino acid –OH type peptides

To monitor the effect of peptide composition on nonspecific adsorption, 3-MPA-(AA)₅-OH SAMs of peptides with differing polarities were synthesized (Figure 2.1). Hydrophobic and hydrophilic amino acids (serine, aspartic acid, histidine, leucine and phenylalanine) were tested to cover the effects of charge, polarity and aromaticity. Nonspecific surface coverage after the exposure of the SAMs to HEK 293FT cell lysate was measured from the SPR response (in wavelength shift ($\Delta\lambda_{SPR}$) converted to surface coverage (Γ) by the equation derived from the one proposed by Jung *et al*¹²⁸:

$$\Gamma = \rho \frac{-l_d}{2} \ln\left(1 - \frac{\Delta\lambda_{SPR}}{m(\eta_{ads} - \eta_{sol})}\right) \quad [7]$$

where the density of the monolayer (ρ) is 1.05g/cm^3 ¹²⁹, the penetration depth of the surface plasmons¹²⁶ (l_d) is approximately 230 nm and the refractive index of the adsorbed material (η_{ads}) is approximately 1.5 RIU¹³⁰.

The sensitivity of the biosensor was previously established as 1765 ± 100 nm/RIU¹²⁶. Finally, the refractive index of the cell lysate (η_{sol}) was measured with a high-resolution refractometer at 1.33932 ± 0.00002 RIU. We estimate the surface coverage of a full lipid bilayer to be $0.5 \mu\text{g/cm}^2$ of adsorbed materials using an

average value of 750 g/mol for lipids and 0.5 nm²/lipid molecule in the lipid bilayer¹²⁶. The fraction of a lipid bilayer resulting from nonspecific adsorption can be estimated from these values.

Table 2.1. Influence of the hydrophobicity of the amino acid on nonspecific adsorption from cell lysate on pentapeptide SAMs

Peptide	Γ / ng·cm ²	% _{bilayeradsorbed}	Contact Angle PBS / ° (Ref ¹¹⁷)
3-MPA-(Ser) ₅ -OH	458 ± 97	92	21 ± 2
3-MPA-(Asp) ₅ -OH	454 ± 162	91	14 ± 2
3-MPA-(His) ₅ -OH	274 ± 58	55	26 ± 1
3-MPA-(Phe) ₅ -OH	235 ± 77	47	74 ± 2
3-MPA-(Leu) ₅ -OH	194 ± 77	39	75 ± 1

The comparison of peptides constituted with different classes of amino acids reveals that the peptides built with hydrophobic amino acids are more efficient in preventing cell lysate adsorption on the sensor surface than are hydrophilic peptides (Table 2.1). Serine and aspartic acid-based peptides, shown to be low fouling with respect to serum, showed significant fouling with cell lysate with nearly 450 ng/cm² adsorbed to the surface. Assuming that adsorption was essentially due to lipids (confirmed by MS analysis, see below), this corresponds to a lipid bilayer surface coverage over nearly 90% of the surface of the SPR chip. Interestingly, the positive polyhistidine peptide was relatively efficient at reducing nonspecific adsorption of cell lysate (274 ng/cm²). Leucine and phenylalanine-based peptides were significantly more effective with respect to cell lysate adsorption (nearly 200 ng/cm² or 40% of a bilayer), although these peptide monolayers performed poorly with serum. Contact angles were previously measured in PBS for this set of peptides¹¹⁷. The most hydrophilic peptides, as measured by contact angle, were the most susceptible to be fouled with cell lysate. This heavily contrasts with the previous conclusions for serum, stating that hydrophilic surfaces better resist nonspecific adsorption from

serum^{125, 127}. It is interesting to observe that different physico-chemical properties reduce nonspecific adsorption from cell lysate.

Table 2.2. Nonspecific adsorption from diluted cell lysate on peptide SAMs of different lengths

Peptide	$\Gamma / \text{ng}\cdot\text{cm}^2$	%bilayeradsorbed	Contact Angle PBS / ° (Ref ¹¹⁷)
3-MPA-(Ser) ₁ -OH	256 ± 47	51	38 ± 4
3-MPA-(Ser) ₂ -OH	265 ± 101	53	37 ± 1
3-MPA-(Ser) ₃ -OH	597 ± 152	119	25 ± 2
3-MPA-(Ser) ₄ -OH	361 ± 211	72	22 ± 1
3-MPA-(Ser) ₅ -OH	458 ± 97	92	21 ± 2
3-MPA-(His) ₁ -OH	296 ± 184	59	32 ± 2
3-MPA-(His) ₂ -OH	241 ± 86	48	29 ± 3
3-MPA-(His) ₃ -OH	269 ± 76	54	27 ± 2
3-MPA-(His) ₄ -OH	241 ± 63	48	27 ± 1
3-MPA-(His) ₅ -OH	274 ± 58	55	26 ± 1
3-MPA-(Leu) ₁ -OH	183 ± 54	37	63 ± 1
3-MPA-(Leu) ₂ -OH	147 ± 44	29	70 ± 2
3-MPA-(Leu) ₃ -OH	223 ± 108	45	71 ± 1
3-MPA-(Leu) ₄ -OH	230 ± 148	46	74 ± 1
3-MPA-(Leu) ₅ -OH	194 ± 77	39	75 ± 1

The chain length of the peptide monolayers significantly influenced the extent of nonspecific adsorption from serum¹¹⁷. Three amino acids were selected to evaluate the effect of the chain length on nonspecific adsorption of cell lysate. A neutral and polar (serine), a hydrophobic (leucine) and positively charged (histidine) amino acid were used to build 3-MPA-(AA)_n-OH peptides where n = 1-5. The chain length had little influence on the nonspecific adsorption process (Table 2.2). Thus, the trend observed for the hydrophobicity of the pentapeptides remained unchanged when the

chain length was varied, with hydrophobic peptides being generally more effective at preventing fouling from cell lysate than hydrophilic ones. Contact angles were previously measured for these sets of peptides and increasing hydrophobicity followed the series serine < histidine < leucine (Table 2.2 and Ref¹⁷), inversely proportional to the nonspecific adsorption observed with cell lysate. The chain length significantly influences the properties of peptide self-assembled monolayer¹¹⁷. The surface coverage of the monolayer (thus the conformation), the nonspecific adsorption of serum and the contact angle all depend on the chain length of short chain peptides (n=1 to 5). We note that the serine series shows the largest changes in contact angle. The shortest chains of the serine series are the most hydrophobic peptides and also, the serine peptides with the lowest nonspecific adsorption. The changes in hydrophobicity were significantly smaller for the other series, and thus, the changes in nonspecific adsorption were also marginal. Thus, hydrophobicity is a major physical chemistry parameter influencing nonspecific adsorption, but in the case of cell lysate, more hydrophobic surfaces are preventing nonspecific adsorption. This conclusion contrasts with the general trend of hydrophilic surfaces being better at preventing nonspecific adsorption of serum or protein based biofluids.

It is expected that more optimization of surface chemistry properties is required to further reduce nonspecific adsorption from cell lysate. The main component of serum is protein, while lipids are the major constituents of cell lysate. Lipids in cell lysate are essentially a concentrated solution of fragments of bilayers, the surface of which is quite hydrophilic as a result of the charged polar headgroups of the lipids. Based on the observations of Kyo and al.⁸² that negative charges increase nonspecific adsorption of cell lysate, we could easily hypothesize that histidine-based peptides would perform better than other hydrophilic or hydrophobic peptides as they bear basic groups, which could electrostatically repel the lipid bilayers and reduce nonspecific adsorption. However, we conclude that the hydrophobic character of leucine-based peptide contributes significantly in reducing nonspecific adsorption lipid bilayer fragments contained in HEK 293FT cell lysate. Thus, both positively

charged and hydrophobic side chains are efficient at suppressing nonspecific adsorption of cell lysate.

2.4.2 Nonspecific adsorption on diblock and triblockpeptides

Diblock peptides were previously shown to reduce nonspecific adsorption in presence of crude serum¹²⁰. Thus, diblock peptides 3-MPA-A_nB_m-OH were synthesized for A and B being either leucine or phenylalanine; n and m were varied from 1 to 4 and n + m was equal to 5 for every peptide.

Table 2.3. Nonspecific adsorption from diluted cell lysate on diblock pentapeptide SAMs

Peptide	Γ / ng·cm ²	% _{bilayeradsorbed}	Contact Angle Water / °
3-MPA-(Phe) ₁ (Leu) ₄ -OH	210 ± 84	42	57 ± 2
3-MPA-(Phe) ₂ (Leu) ₃ -OH	201 ± 35	40	41 ± 3
3-MPA-(Phe) ₃ (Leu) ₂ -OH	225 ± 57	45	61 ± 2
3-MPA-(Phe) ₄ (Leu) ₁ -OH	220 ± 79	44	59 ± 1
3-MPA-(Phe) ₅ -OH	235 ± 77	47	67 ± 3
3-MPA-(Leu) ₁ (Phe) ₄ -OH	148 ± 54	30	64 ± 2
3-MPA-(Leu) ₂ (Phe) ₃ -OH	165 ± 87	33	66 ± 1
3-MPA-(Leu) ₃ (Phe) ₂ -OH	112 ± 28	22	73 ± 2
3-MPA-(Leu) ₄ (Phe) ₁ -OH	173 ± 52	35	60 ± 1
3-MPA-(Leu) ₅ -OH	194 ± 77	39	75 ± 1

The resulting peptides terminated with phenylalanine were found to have a better capacity to reduce nonspecific adsorption from cell lysate down to nearly 150 ng/cm² or 30 % of a bilayer (Table 2.3). The leucine-terminated peptides showed constant nonspecific adsorption of nearly 215 ng/cm² corresponding to 43% of a bilayer. Nonspecific adsorption was decreased to 112 ng/cm² with 3-MPA-(Leu)₃(Phe)₂-OH. This analysis clearly demonstrates that the peptide sequence has a

critical impact on nonspecific adsorption. Water contact angles were measured for the series of peptides with leucine and phenylalanine on the *C*-terminus. Generally, a *C*-terminal phenylalanine increased the water contact angle and exhibited lower nonspecific adsorption than the more hydrophilic peptides with a *C*-terminal leucine. The solvent-exposed *C*-terminal position plays a major role in reducing nonspecific adsorption. Thus, the simple inversion of two blocks in the sequence modified the surface and nonspecific adsorption properties of the SAM. 3-MPA-(Leu)₃(Phe)₂-OH exemplifies this concept, offering the most hydrophobic surface and resulting in the lowest nonspecific adsorption among the diblock peptides, while its inverted counterpart 3-MPA-(Phe)₂(Leu)₃-OH shows a nearly two-fold lower contact angle and results in nearly two-fold higher nonspecific adsorption.

Various triblock peptides having the overall structure 3-MPA-AABBCC-OH, 3-MPA-(ABC)₂-OH or 3-MPA-(AB)₃-OH were synthesized to further improve on the conclusions drawn from homopeptides (Table 2.2) and diblock peptides (Table 2.3), where A, B, and C are either leucine, phenylalanine or histidine. The nonspecific adsorption on triblock peptides was measured with a more highly concentrated cell lysate, providing a more stringent test for the triblock peptides and the reference materials (PEG and Au). Since many factors influence nonspecific adsorption, data can be directly compared only if they are obtained from similar quality of cell lysate. To allow comparison between sets of experiments, the nonspecific adsorption experiments were repeated for some key peptides from Tables 1-3 using the more concentrated cell lysate (Table 2.4).

Table 2.4. Nonspecific adsorption from concentrated cell lysate on triblock hexapeptide SAMs

Peptide	Γ / $\text{ng}\cdot\text{cm}^2$	%bilayeradsorbed
3-MPA-(His) ₂ (Phe) ₂ (Leu) ₂ -OH	774 ± 57	155
3-MPA-(Leu) ₂ (His) ₂ (Phe) ₂ -OH	763 ± 102	153
3-MPA-((His)(Leu)(Phe)) ₂ -OH	744 ± 92	149
3-MPA-((Phe)(His)(Leu)) ₂ -OH	739 ± 95	148
3-MPA-((Leu)(Phe)) ₃ -OH	592 ± 126	118
3-MPA-((Leu)(Phe)(His)) ₂ -OH	554 ± 22	111
3-MPA-(Phe) ₂ (Leu) ₂ (His) ₂ -OH	187 ± 10	37
3-MPA-(His) ₂ (Leu) ₂ (Phe) ₂ -OH	159 ± 27	32

Nonspecific adsorption to 3-MPA-(Ser)₅-OH and to 3-MPA-(Leu)₃(Phe)₂-OH increased by approximately a factor of 3-6 with the more concentrated cell lysate. Further, to ensure that those differences in surface coverage were attributed to the concentration of cell lysate, a Bligh and Dyer lipid extraction was performed on 1 mL of cell lysate. The mass of lipids obtained after drying indicated that the second cell lysate was three times more concentrated than the former (6 mg/mL compared to 2 mg/mL), which correlates with the nonspecific adsorption results.

As previously demonstrated for serum¹¹⁶, triblock peptides significantly reduced nonspecific adsorption from cell lysate. In particular, 3-MPA-(His)₂(Leu)₂(Phe)₂-OH reduced the nonspecific adsorption from the concentrated cell lysate to a surface coverage of 159 ng/cm² corresponding to 31% of a lipid bilayer. In comparison, the best diblock peptide 3-MPA-(Leu)₃(Phe)₂-OH peptide fared significantly worse, with 698 ng/cm² or 136% of a lipid bilayer from the concentrated cell lysate. The triblock peptide is thus more efficient in terms of reducing nonspecific adsorption. The optimal peptide provides six times lower nonspecific adsorption from cell lysate than unprotected bare gold. The peptides with a C-terminal phenylalanine or histidine performed better than those with a C-terminal leucine. This strongly

suggests that a combination of positively charged surfaces and hydrophobicity is required to minimize nonspecific interactions. In addition, the position of the blocks within each peptide clearly have an important impact on performance, as shown by comparison of 3-MPA-((Leu)(Phe)(His))₂-OH (554 ng/cm²) and 3-MPA-(Phe)₂(Leu)₂(His)₂-OH (187 ng/cm²).

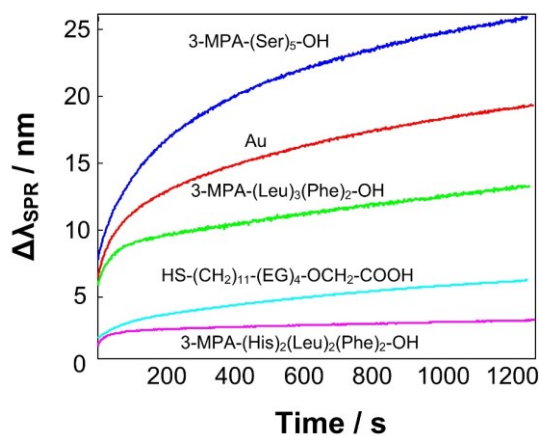


Figure 2.2 Overview of reduction of nonspecific adsorption from cell lysate with peptide SAMs; 3-MPA-(Ser)₅-OH (dark blue), Au (red), 3-MPA-(Leu)₃(Phe)₂-OH (green), HS-PEG (light blue) and 3-MPA-(His)₂(Leu)₂(Phe)₂-OH (pink).

Table 2.5. Comparison of nonspecific adsorption from concentrated cell lysate on various surfaces³

Peptide	Γ / ng·cm ²	%bilayeradsorbed	Contact Angle Water / °
3-MPA-(Ser) ₅ -OH	1156 ± 141	231	45 ± 3
Au	929 ± 186	186	87 ± 2
3-MPA-[(Leu)(His)(Asp)] ₂ -OH	789 ± 107	158	53 ± 1
3-MPA-(Leu) ₃ (Phe) ₂ -OH	413 ± 47	83	71 ± 3
PEG	294 ± 25	59	25 ± 3
3-MPA-(His) ₂ (Leu) ₂ (Phe) ₂ -OH	159 ± 27	32	77 ± 4

³ This table compares the nonspecific adsorption of crude cell lysate of SAMs developed in different conditions. The SAMs were all retested in the same cell lysate in tetraplicate in order to compare them accurately. Therefore, the conclusions drawn from these results, i.e. that the 3-MPA-HHLLFF-OH SAM is significantly more efficient than the previously developed 3-MPA-LLLFF-OH, are strong.

To confirm the incompatibility of surfaces designed for use in serum with respect to use with cell lysate, nonspecific adsorption measurements were conducted using either a thiolated-PEG (HS-(CH₂)₁₁-(EG)₄-OCH₂-COOH) SAM, which is commonly used to prevent serum adsorption on biosensors, or a 3-MPA-[(Leu)(His)(Asp)]₂-OH SAM (Figure 2.2), as it has been found to be the most efficient peptide for reducing nonspecific adsorption from serum¹¹². Neither of these SAMs offered as great a reduction in nonspecific adsorption as the hydrophobic peptide developed here. PEG and 3-MPA-[(Leu)(His)(Asp)]₂-OH were respectively twice and 5-fold worse than 3-MPA-(His)₂(Leu)₂(Phe)₂-OH (Table 2.5). Again, the trend of more hydrophobic surfaces was confirmed with contact angle measurements for peptide monolayers. While the hydrophobicity and charge definitely play a major role in driving nonspecific adsorption processes on the SPR sensors, they are not exclusive. Bare gold is very hydrophobic, but fouls significantly, while PEG is quite hydrophilic and negatively charged at the pH of the buffer and performs moderately well. Hydrophobic and/or positively charged peptides definitely improve nonspecific adsorption of cell lysate, and thus constitute a general rule of thumb for minimizing nonspecific adsorption. Our conclusions are in agreement to the observations of Kyo *et al.*⁸² that negatively charged monolayers tend to favourably adsorb cell lysate. They observed that a full monolayer of PEG-COOH was adsorbing a significant amount of cell lysate and suppressed nonspecific adsorption by diluting PEG-COOH in a mixed monolayer. We confirmed that PEG-COOH does adsorb cell lysate and that peptide monolayers can further decrease nonspecific adsorption. Further comparison is difficult as the sources and type of cell lysate differs between studies.

2.4.3 MS analysis of adsorbed molecules from cell lysate

While the nonspecific adsorption study points to lipid adsorption, cell lysate is a complex matrix containing a diversity of proteins and small molecules in addition to lipids. MS analysis provides molecular fingerprinting of the materials non-specifically adsorbed on various surface chemistries. Protein adsorption to surfaces is well documented for serum-based analysis^{112, 131}. Since nonspecific adsorption from

cell lysate has never been analysed by MS, the interaction between the peptide SAMs and cell lysate must be investigated. Nonspecifically adsorbed proteins were analysed on SAM after trypsin digestion of the proteins. MS analyses of the resulting tryptic peptides were performed by MALDI MS and MS/MS and identification of the corresponding proteins was performed by database interrogation with the MASCOT search engine. Identification of the proteins adsorbed to the different SAM peptide surfaces is presented in Table 2.6.

Table 2.6. MALDI-TOF/TOF analysis of nonspecifically adsorbed protein on 3-MPA-(Leu)₅-OH SAM

m/z	Ion	Protein
801.363	[M+H] ⁺	Collagen alpha-1(XX) chain
1134.551	[M+H] ⁺	40s ribosomal protein S19
1247.579	[M+H] ⁺	40s ribosomal protein S18
1338.808	[M+H] ⁺	Mitogen-activated protein (kinase) ₅
1408.664	[M+H] ⁺	40s ribosomal protein S29
1703.794	[M+H] ⁺	40s ribosomal protein S19

This analysis has also been made on 3-MPA-(Ser)₅-OH, 3-MPA-(Phe)₅-OH, 3-MPA-(Leu)₃(Phe)₂-OH, 3-MPA-(Phe)₁(Leu)₄-OH, 3-MPA-(His)₂(Leu)₂(Phe)₂-OH and 3-MPA-(Phe)₂(Leu)₂(His)₂-OH SAMs, but no protein could be identified because there was simply no peak that could be linked to a protein on the MS spectrum.

Results from the protein analysis are of particular interest for two reasons. The proteins identified such as collagen alpha-1(XX) chain, 40S ribosomal proteins (S18, S19, and S29) and mitogen-activated protein (kinase) 5 are known to be present in HEK 293FT cell lysate. Surprisingly, these proteins were detected on only one (3-MPA-(Leu)₅-OH) of the seven peptide SAMs. None of the other surfaces tested (3-MPA-(Ser)₅-OH, 3-MPA-(Phe)₅-OH, 3-MPA-(Leu)₃(Phe)₂-OH, 3-MPA-(Phe)₁(Leu)₄-OH, 3-MPA-(His)₂(Leu)₂(Phe)₂-OH and 3-MPA-(Phe)₂(Leu)₂(His)₂-OH) held any identifiable tryptic peptide. The MS analysis thus confirms that protein adsorption from cell lysate is not an important source of fouling.

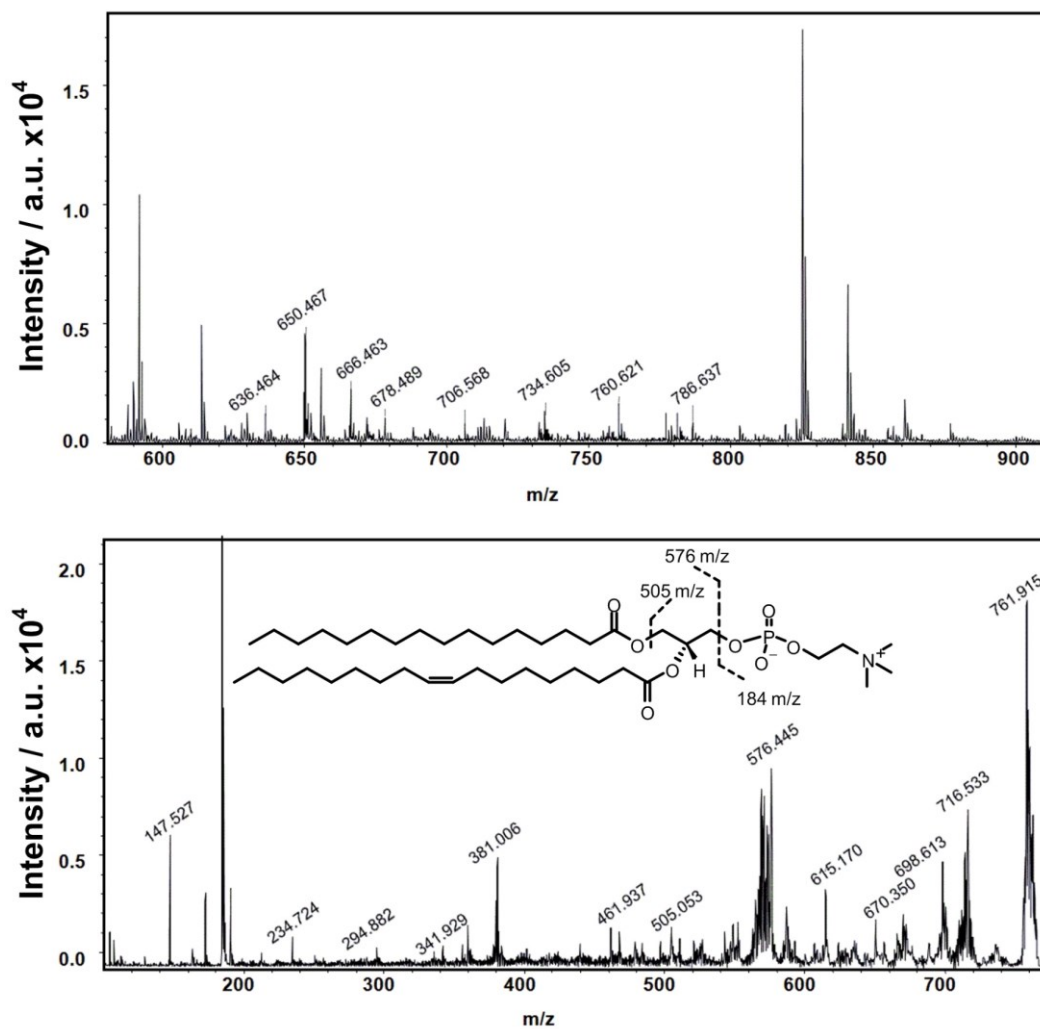


Figure 2.3 Mass spectrum of adsorbed lipids on 3-MPA-(Ser)₅-OH SAM with CHCA matrix (A). MS/MS spectrum of the lipid at *m/z* 761.9 (B)

Since lipids are the major component of cell lysate, a thorough MS analysis for lipids was performed by MALDI MS with both positive and negative polarities. A first MS analysis was performed to obtain the general lipid spectrum for each SAM. Then, every peak which mass-to-charge value could be attributed to a lipid was analysed by MS/MS for identification (Figure 2.3). Hence, with the molecular ion and the MS/MS spectra, some lipids could be identified.

Table 2.7. MALDI-TOF/TOF analysis of nonspecifically adsorbed lipids on various SAMs

m/z	SAM		MSMS peaks	3-MPA-	3-MPA-	3-MPA-	3-MPA-
	Ion	Lipid		(Ser) ₅ -OH	(Phe) ₅ -OH	(Leu) ₃ (Phe) ₂ -OH	(Phe) ₂ (Leu) ₂ (His) ₂ -OH
636.5	[M+H] ⁺	PC(O-16:0/10:0)	184, 395	x			
650.5	[M+H] ⁺	PC(12:0/14:0)	184, 422, 439	x	x	x	
666.5	[M+H] ⁺	SM(d18:0/12:0)	184, 467	x			
676.5	[M+H] ⁺	PC(28:1)*	184		x		
678.5	[M+H] ⁺	PC(28:0)*	184	x			
694.9	[M+Na] ⁺	PC(28:3)*	184			x	
706.6	[M+H] ⁺	PC(30:0)*	184	x			
732.6	[M+H] ⁺	PC (32:1)*	184	x			
734.6	[M+H] ⁺	PC(14:0/18:0)	184, 524	x			
760.6	[M+H] ⁺	PC(16:0/18:1)	184, 505, 576	x			
786.6	[M+H] ⁺	PC(18:0/18:2)	184, 503	x			
831.2	[M+K] ⁺	PA(22:5/22:6)	468				x
857.3	[M+K] ⁺	PI(O-16:0/18:3)	278				x
849.6	[M-H] ⁻	PG(20:5/22:1)	301, 337, 529	x			
901.4	[M-H] ⁻	PI(20:5/20:5)	301, 600		x		
941.6	[M-H] ⁻	PI(22:4/20:0)	311, 315		x		
1013.8	[M-H] ⁻	PIP(20:3/22:5)	305, 313, 329, 338	x			

This analysis was repeated on 3-MPA-(Leu)₅-OH, 3-MPA-(Leu)₂(Phe)₃-OH, 3-MPA-(Phe)₁(Leu)₄-OH, 3-MPA-(His)₂(Leu)₂(Phe)₂-OH SAMs, but no lipid could be identified, either because no lipid given by LIPID MAPS could be attributed to the cellular lysate used or because there was simply no peak that could be linked to a lipid on the MS spectrum.

Table 2.7 reports the most likely lipids observed considering the mass spectral accuracy and the assignment power of the software. The most efficient peptides

SAMs for preventing nonspecific adsorption of cell lysate results in a smaller variety of lipid signals found on the surface, which is in strong agreement with the SPR measurements. For example, 3-MPA-(Ser)₅-OH exhibited the greatest number of lipids identified, while 3-MPA-(Phe)₂(Leu)₂(His)₂-OH had the fewest (Table 2.7). We observed that most of the lipids identified were in the phosphatidyl choline family, which are quite hydrophilic and have a positively charged headgroup. We note that several of the surfaces analysed (3-MPA-(Leu)₅-OH, 3-MPA-(Leu)₂(Phe)₃-OH, 3-MPA-(Phe)₁(Leu)₄-OH and 3-MPA-(His)₂(Leu)₂(Phe)₂-OH) did not give rise to mass signals that could be attributed to lipids (Table 2.7). These results confirm the capacity of hydrophobic and/or positively-charged peptide SAMs to minimize lipid adsorption.

2.5 CONCLUSIONS

This article reports the development of a novel surface chemistry that will improve SPR analysis in crude cell lysate. Even though similar experiment has previously been reported for other complex matrixes such as serum, the results obtained in serum were shown here to being incompatible with the use of cell lysate. PEG and our best-performing peptide for serum analyses, 3-MPA-[(Leu)(His)(Asp)]₂-OH, were significantly worse than 3-MPA-(His)₂(Leu)₂(Phe)₂-OH at preventing surface fouling. Peptide monolayers with hydrophobic and basic groups showed greater potential to reduce significantly nonspecific adsorption of cell lysate. In addition, the nature of the material adsorbed on the SAMs was confirmed by MALDI TOF/TOF MS, which revealed that few proteins adsorbed on the surface while lipids constituted the major source of nonspecific adsorption.

2.6 ACKNOWLEDGEMENTS

Financial support was provided by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), the Center for Self-Assembled Chemical Structures (CSACS), the Fond québécois de la recherche sur la nature et les

technologies (FQRNT), the Canadian Foundation for Innovation (CFI), the Mérieux Research Grants, Université de Montréal, and Univalor. We thank Stéphane Roy for the HEK 293FT cell line and use of cell culture facilities, and Damien Colin for producing cell lysate. The authors also acknowledge the help of Aurélien Thomas (Dept of Chemistry, Université de Montréal) for his help with searches in LIPID MAPS.

CHAPITRE III

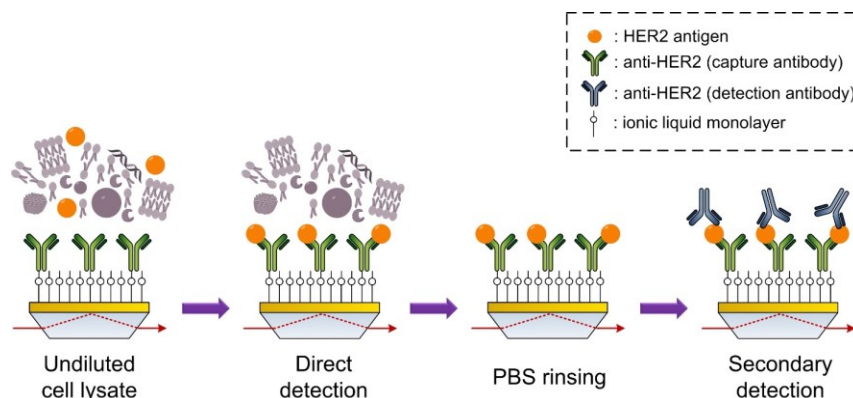
ULTRA-LOW FOULING ALKYLIMIDAZOLIUM MODIFIED SURFACES FOR THE DETECTION OF HER2 IN BREAST CANCER CELL LYSATE

Alexandra Aubé^a, Shirley Campbell^b, Andreea R. Schmitzer^a, Audrey Claing^b and Jean-François Masson^{a,c*}

^a Département de chimie, Université de Montréal, C.P. 6128 Succ. Centre-ville, Montreal, Quebec, H3C 3J7, Canada

^b Département de pharmacologie et physiologie, Université de Montréal, C.P. 6128 Succ. Centre-ville, Montreal, Quebec, H3C 3J7, Canada

^c Centre for self-assembled chemical structures (CSACS)



Les travaux de recherche décrits dans ce chapitre⁴ ont été conçus en collaboration avec Professeure Andreea Schmitzer, Professeure Audrey Claing et Professeur Jean-François Masson. De plus, l'élaboration des synthèses organiques a été effectuée avec l'aide de Thierry Havard et Jeffrey Santandrea. J'ai réalisé toutes les expériences au laboratoire, excepté la culture cellulaire qui a été entièrement effectuée par Shirley Campbell. La rédaction du manuscrit a été effectuée en collaboration avec Professeure Andreea Schmitzer, Professeure Audrey Claing et Professeur Jean-François Masson, ainsi qu'avec Shirley Campbell.

⁴ Article soumis à *Analyst* en janvier 2017.

3.1 ABSTRACT

We synthesized novel ultra-low fouling ionic liquids and demonstrated their use with surface plasmon resonance (SPR) sensing for the analysis of HER2 in breast cancer cell lysate. Whilst biomarkers are commonly detected in serum, this remains challenging for cancer diagnostics due to their low concentrations in circulation and in some case, plagued with poor correlation between serum and tissue concentration. Therefore, tissue analysis in the form of cell lysate constitute an interesting biosample for cancer diagnosis and typing, which is largely unexploited for chemical biosensing of cancer biomarkers. However, high fouling of surfaces in contact with cell lysate and the absence of effective surface chemistries to prevent fouling is currently limiting biomarker analysis in cell lysate. To address this challenge, we report the synthesis of 1-(carboxyalkyl)-3-(12-mercaptododecyl)-*1H*-imidazolium ionic liquids with different anions (Br^- , BF_4^- , PF_6^- , ClO_4^- , and NTf_2^-) and ethyl and pentyl chains to form monolayers and analyse specific proteins from cell lysates. The most efficient ionic liquid monolayer, 1-(carboxyethyl)-3-(12-mercaptododecyl)-*1H*-imidazolium bromide, was able to eliminate nonspecific adsorption (surface coverage of $2 \pm 2 \text{ ng/cm}^2$) of a concentrated cell lysate (protein concentration of $\sim 3.5 \text{ mg/mL}$), which was significantly better than the carboxy-PEG (surface coverage of $14 \pm 7 \text{ ng/cm}^2$), a benchmark monolayer commonly used to reduce nonspecific adsorption. These ionic liquid monolayers were modified with anti-HER2 and the detection of HER2 breast cancer biomarker was carried in crude breast cancer cell lysates, as shown with HER2-negative MCF-7 cells spiked with HER2 and in HER2 positive SK-BR-3 cells.

3.2 INTRODUCTION

Cancer is the leading cause of death in Canada ³, the second leading cause of death in the United States ¹³² and it is one of the most common causes of death worldwide ⁴. Significant efforts are thus being deployed to better understand cancer

progression and to develop tools to better diagnose and treat patients². Among these, early diagnosis of cancer improves the remission chances of patients and survival¹³³. Current tools to diagnose cancer rely on medical imaging techniques, monitoring the level of circulating biomarkers in biofluids and in immunohistochemistry of biopsied tissues. In breast cancer, the HER2 biomarker overexpression occurs in 20-30% of aggressive breast cancer cases⁷ and a high level of circulating HER2 indicates a higher risk of cancer⁸⁻⁹. Hence, this biomarker has been previously quantified in the blood stream using different approaches^{7, 134-142} to facilitate cancer diagnostic.

While elevated circulating concentration of HER2 is indicative of cancer in a fraction of the HER2-positive breast cancers, there is growing concern about the correlation of circulating HER2 concentration to tissue concentration for early stage breast cancers¹⁴³ and prognosis for treatment¹⁴⁴. In addition, monitoring serum concentration is usually performed in complement to a biopsy. Hence, the malignancy of a tumor is defined by the phenotypical features of the cells by a qualified professional, such as a pathologist or an immunologist^{1, 3, 10}. This type of analysis, even though very efficient, takes time and highly qualified personal.

The analysis of cancer cell lysate from biopsies might represent an appropriate biofluid to provide a reliable biomarker analysis for the diagnosis of breast cancer or other types of cancers. A RIPA buffer is often used to lyse the cells and solubilize all the proteins. This gives access to useful biomarkers in potentially very high concentrations, that otherwise might not be accessible in serum as proteins may remain confined inside the cells or shedded only at low concentrations in serum. Performing quantitative biomarker analysis of biopsied tissues with biosensors is thus very attractive for detecting cancer biomarkers in tissue samples.

Several biosensing techniques have been developed to help clinicians detect a plethora of cancer biomarkers¹⁴⁵⁻¹⁶², including surface plasmon resonance (SPR) and other plasmonic techniques³⁹. Advantages of SPR sensing include label-free sensing, sensitivity and portability, making it suitable for point-of-care analysis¹⁶³. However, the precise and quantitative measurement of biomarkers in crude biological matrices, such as blood, serum, plasma, cell lysate, urine and saliva remains a contemporary

challenge in plasmonic sensing. This is currently limited by the high fouling of biofluids on surfaces, causing a high nonspecific response of SPR and plasmonic sensors. Recent advances in low fouling surface chemistry with the advent of poly(carboxybetaines)^{51, 57-66, 77}, PEG¹¹² and peptide monolayers^{74-76, 164} decreased nonspecific adsorption to a level sufficiently low to facilitate detection of biomolecules in blood based biofluids with SPR sensing. Therefore, SPR sensing has been recently applied to detect a series of biomolecules in sera of patients for clinical analysis^{62-63, 120, 165-183}.

It is generally accepted that hydrophilic surfaces that are well hydrated (such as PEG) are necessary for the prevention of nonspecific adsorption of serum and blood based biofluids^{50, 112}. However, cell lysate chemical composition differs significantly from serum. In addition to the biomarkers, DNA, RNA and proteins, cell lysate has high concentrations of lipids. We have recently observed that ultra-low fouling surface chemistries developed for serum analysis performed poorly in preventing nonspecific adsorption of lipid-rich cell lysate¹⁶⁴, and that hydrophobic and positively charged surfaces were more effective at reducing nonspecific adsorption of cell lysate due to the dominance of the adsorption of lipids in cell lysate. Reports of antifouling surface chemistry for cell lysate remains scarce^{50, 77, 86}, but successful examples include the use of a poly(carboxybetaine acrylamide) layer to reduce the nonspecific adsorption of cell lysate in a RNA detection experiment⁷⁷. While these first reports are exciting, there is still a need to develop simple and efficient surface chemistry that will suppress nonspecific adsorption of cell lysate and allow the immobilization of biological receptors for the detection of analytes.

Ionic liquids have been studied in the past decades^{97, 99} due to their broad range of application^{91-96, 184-192} and their relatively simple synthesis. The physico-chemical properties of ionic liquid monolayers, such as the contact angle on Au surfaces¹⁹³, were shown to depend on the nature of the counterion. Ionic liquid monolayers were also previously found to retain the activity of antibodies when bound on the surface of SPR sensors⁴⁴. They can also be easily designed with an hydrophobic alkyl chain and positive charge with imidazolium cation, which should

favour suppression of cell lysate nonspecific adsorption based on previous observations^{50, 164}.

Therefore, the synthesis of two hydrophobic ionic liquids with different counterions is reported in this paper (Figure 1), as well as the study of the influence of the counter ion and of the alkylchain length on nonspecific adsorption of cell lysate on SPR sensors. Here, their ability to reduce nonspecific adsorption of cell lysate was tested by using SK-BR-3 cells, a breast cancer cell line endogenously overexpressing the invasive breast cancer biomarker HER2¹⁹⁴. MCF-7 cells were used as a reference, since they contain very low levels of this protein¹⁹⁵. Finally, we assessed the detection of this cancer biomarker in undiluted cell lysate.

3.3 MATERIALS AND METHODS

3.3.1 Ionic liquid synthesis

The ionic liquid synthesis is reported in details in the Supporting Information section, according to the reaction scheme of Figure 3.2.

3.3.2 Peptide synthesis

The peptide synthesis was performed as previously reported¹⁸³.

3.3.3 Fabrication of the SPR sensor chips

The SPR chips were prepared as detailed elsewhere¹⁸³ and in Supporting Information.

3.3.4 Functionalization of the SPR sensor chips

The gold-coated prisms were immersed overnight in a N,N-dimethylformamide (DMF) solution of the desired thiolated molecule to form a self-

assembled monolayer (SAM), at a concentration of 1 mg/mL for the peptide SAMs, 1 mM for 16-MHA and dodecanethiol and 5 mM for the ionic liquids SAMs. The ionic liquids were synthesized with the bromide (Br^-) counter ion. An exchange of counterion has been performed to compare their efficiency to reduce nonspecific adsorption. Sodium tetrafluoroborate (NaBF_4), sodium perchlorate (NaClO_4), sodium hexafluorophosphate (NaPF_6), sodium bromide (NaBr) and Bis(trifluoromethane)sulfonimide lithium salt (LiNTf_2) were used to prepare the counterions solutions.

In order to exchange the counter ion, the SPR chip modified with the ionic liquid monolayers was immersed overnight in a 10 mM aqueous solution of desired counterion, then stored in the counterion solution prior to use.

An NHS group had to be attached on the ionic liquid prior to the formation of the SAM for the biosensing experiments. Therefore, a solution of 28 mM $[(\text{HS})^{12}\text{C}_{12}(\text{COOH})^5\text{C}_{5\text{sim}}]^+ \text{Br}^-$, 30 mM N-hydroxysuccinimide (NHS) and 30 mM N,N'-diisopropylcarbodiimide (DIC) was prepared in 1:2 dioxane/DMF and stirred for 24 hours. Then, the solution was diluted to final concentration of 2.8 mM $[(\text{HS})^{12}\text{C}_{12}(\text{COOH})^5\text{C}_{5\text{sim}}]^+ \text{Br}^-$. NHS in DMF and the prisms were immersed overnight for the formation of the SAM.

3.3.5 Cell lysate

MCF-7 cells were obtained from Sylvie Mader (University of Montreal, Canada) and SK-BR-3 cells were from ATCC (ATCC HTB-30). Cells maintained in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (Wisent, St-Bruno, Canada) at 37°C in 5% CO_2 were washed once with PBS and counted. Cells were centrifuged at 300g for 5 min, pellets were snap frozen and stored at -80°C until lysis. For the cell lysis, RIPA buffer was prepared with 1.19 g of HEPES, 1.46 g of NaCl, 186 mg of EDTA dissolved in 100 mL of water. The pH was adjusted to 7.3 and 1000 μL of Triton-X and 2 protease inhibitor cocktail tablets were added. Cells pellets were kept on ice and RIPA buffer was added. Cells were sonicated during 20 seconds, 4 times,

at 30% intensity. Cells were lysed with this procedure, but not the nucleus. Lysates were centrifuged 15 minutes at 4°C at 10 000 g. The supernatant was aliquoted. The final protein concentration was determined by a Bradford assay at 6.96 mg/mL for the SK-BR-3 cells and 6.40 mg/mL for the MCF-7 cells.

3.3.6 SPR experiments.

The SPR experiments were performed with a P4SPR instrument (Affinité instruments) as described previously¹⁶³. The functionalized prisms were mounted in the system with a microfluidic cell that allowed triplicate measurements and a reference measurement. The solutions were injected in the SPR instrument manually.

3.3.6.1 *Nonspecific adsorption measurements.*

The SPR kinetic measurements were performed for every nonspecific adsorption experiment using the following sequence: 2 minutes of PBS, 20 minutes of SK-BR-3 cell lysate diluted 1:1 in PBS containing anti-protease cocktail at a final protein concentration of 3.48 mg/mL and 2 minutes of PBS. The SPR shifts were calculated with the dynamic nonspecific adsorption (see Supporting Information, Figure 3.11).

3.3.6.2 *HER2 analysis.*

Three SPR experiments were performed for the HER2 analysis. They were all performed on the $[(\text{HS})^{12}\text{C}_{12}(\text{COOH})^5\text{C}_{5\text{sim}}]^+$ Br.NHS chips with the following protocol: 1 min H₂O, 1 min PBS pH 4.5, 20 min capture antibody (20 µg/mL) in PBS pH 7.4, 2 min 30 s PBS pH 7.4, 20 min cell lysate, 2 min PBS pH 7.4 (3 times 1 mL was injected, to rinse thoroughly), 15 min detection antibody (20 µg/mL) in PBS pH 7.4, and 1 min PBS pH 7.4. Capture antibody was HER2 / ErbB2 / CD340 polyclonal rabbit antibody from Sino Biological (catalog number: 10004-RP03) and detection antibody was HER2 / ErbB2 / CD340 polyclonal rabbit antibody, antigen purified, from Sino Biological (catalog number: 10004-RP04). Both antibodies recognize the human HER2 / ErbB2 protein (antigen) from Sino Biological (catalog number:

10004-H08H). For the control experiments, undiluted crude MCF-7 cell lysate was injected on the surface (protein concentration of 6.40 mg/mL determined by a Bradford assay). Crude MCF-7 cell lysate was then spiked with HER2 antigen (Sino Biological, catalog number: 10004-H08H) at a concentration of 25 $\mu\text{g/mL}$ and this solution was injected on the SPR surface. Finally, crude SK-BR-3 cell lysate was analyzed with the HER2 SPR sensor. The different methods for the measurement of the SPR chip are illustrated in Figure 3.11, in Supporting Information.

3.4 RESULTS AND DISCUSSION

3.4.1 Antifouling SAM development

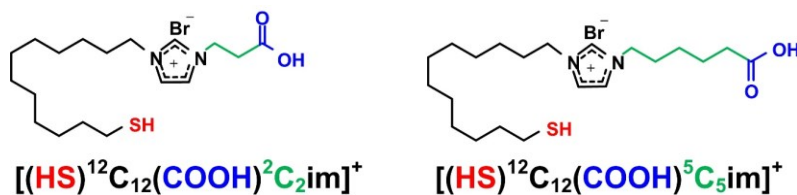


Figure 3.1 Structures of the ionic liquids designed to reduce nonspecific adsorption of cell lysate.

The ionic liquid monolayers were designed to combine different moieties necessary for the construction of an efficient biosensor in cell lysate. Firstly, a thiol was mandatory to form a self-assembled monolayer on the gold SPR chip. The second moiety was a carboxylic acid, at the distal end of the ionic liquid, to allow the covalent binding of an antibody on the surface through EDC/NHS coupling with the lysines on the antibody's heavy-chain. Finally, it was observed previously that the most efficient self-assembled monolayers to reduce nonspecific adsorption of cell lysate were hydrophobic and positively charged¹⁶⁴. Hence, long alkyl chains were added to the imidazolium cation structure. The design resulted in the synthesis of two ionic liquids, both bearing mercaptododecyl chains and an ethyl- or pentyl- carboxylic acid on the distal end (Figure 3.1).

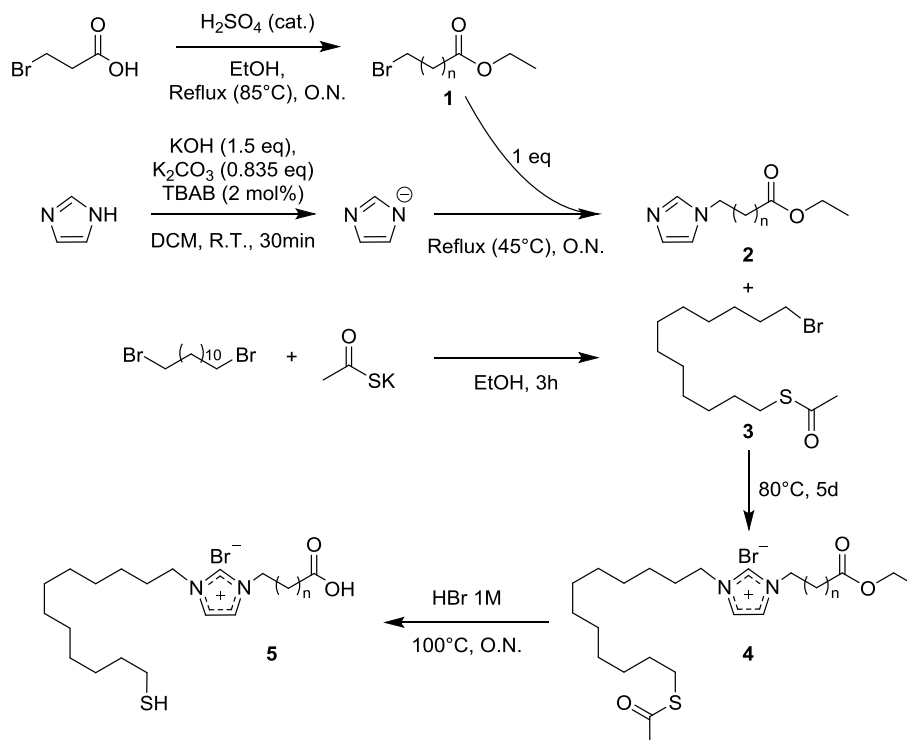


Figure 3.2 Synthesis of 1-(2-carboxyethyl)-3-(12-mercaptododecyl)-1H-imidazolium bromide ($n=1$, $[(\text{HS})^{12}\text{C}_{12}(\text{COOH})^2\text{C}_2\text{im}]^+$) and 1-(5-carboxypentyl)-3-(12-mercaptododecyl)-1H-imidazolium bromide ($n=4$, $[(\text{HS})^{12}\text{C}_{12}(\text{COOH})^5\text{C}_5\text{im}]^+$)

A bromoalkyl acid was used as starting material for the synthesis of the ionic liquids (Figure 3.2). The yield of the esterification reaction was as high as 67% before purification for the ethyl chain. Yields were better for the pentyl chain at 80-85%. Different concentrations of acids and temperature were tested, without significantly affecting the results. The deprotonation of imidazole was first tried with sodium hydride deprotonation under nitrogen atmosphere, but the yields were significantly higher with a mixture of bases (KOH , K_2CO_3 , TBAB), with yields between 75-85% for purified products. Finally, the addition of the protected alkyl chain to 1-(carboxyalkyl)imidazole and the thiol deprotection reactions⁴⁴ led to high yields of 83% for $[(\text{HS})^{12}\text{C}_{12}(\text{COOH})^2\text{C}_2\text{im}]^+$ and 91% for $[(\text{HS})^{12}\text{C}_{12}(\text{COOH})^5\text{C}_5\text{im}]^+$.

The ionic liquids were synthesized with the bromide counterion, but then a series of anion exchange reactions were performed to lead to ionic liquids with

different properties. The exchange of the counterion for ionic liquids requires respecting the affinity order. The counterions have different affinities with the imidazolium salt and are easily exchanged when a counterion with a greater affinity, more hydrophobic, is exposed to the ionic liquid. Bromide has the lowest affinity for imidazolium of the counterions used in this experiment. The order of affinity goes as follow: $\text{Br}^- < \text{BF}_4^- < \text{PF}_6^- < \text{ClO}_4^- < \text{NTf}_2^-$ ^{193, 196-197}. The counterion exchange was performed after the formation of the ionic liquid SAM on the SPR chip.

3.4.2 Nonspecific adsorption experiments

A total of 18 surfaces, including 17 monolayers (10 ionic liquids, 3 PEGs, 16-MHA, dodecanethiol and 2 peptide monolayers) and bare Au were compared for their efficiency to reduce nonspecific adsorption of cell lysate. The results are reported in surface coverage (ng/cm^2), representing the amount of nonspecifically adsorbed SK-BR-3 cell lysate on the surface. SK-BR-3 cells were chosen since they are HER2-positive breast cancer cells and can be easily used for the detection of HER2 biomarker. Nonetheless, we expect the general conclusions will be valid for cell lysate from different cell lines despite slight difference in specific compositions of cell lysate.

3.4.2.1 Ionic liquids

Different molecular parameters can be compared in order to understand the efficiency of ionic liquids performances in reducing nonspecific adsorption. In this study, we focused on the effect of alkyl chain length and effect of counterion. Contact angles of the different monolayers were measured in water in order to characterize the surface properties (Figure 3.3).

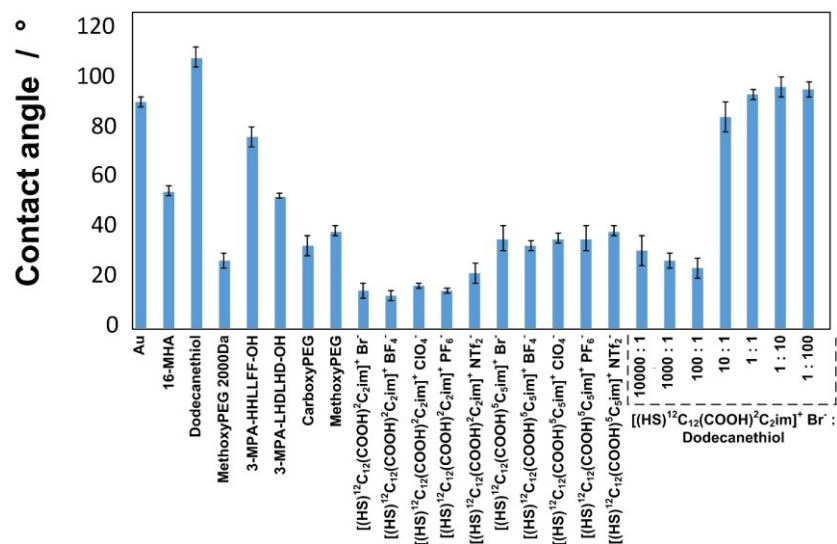


Figure 3.3 Contact angle of the different monolayers used to reduce nonspecific binding of cell lysate

All the ionic liquids, independently from the counterion, showed relatively low contact angles, between 13° and 22° for [(HS)¹²C₁₂(COOH)²C₂im]⁺ and between 33° and 39° for [(HS)¹²C₁₂(COOH)⁵C₅im]⁺. The difference in contact angle showed that the length of the alkyl chain contributes to the hydrophobicity of the surface. This observation is of great interest since the efficiency in reducing nonspecific adsorption of cell lysate is presumed not only due to the hydrophobicity of the surface, but also to its charge. Therefore, even if a surface has a low contact angle due to its charge, they were expected to be effective in reducing nonspecific adsorption of cell lysate when it has hydrophobic moieties as alkyl chains.

Nonspecific adsorption results were compared using the surface coverage of cell lysate on the SPR chip modified with each surfaces. The values of surface coverage resulted from the measurement of the *dynamic nonspecific adsorption* corresponding to the change in SPR signal while the cell lysate is exposed to the SPR chip, as described in Supporting Information. This SPR shift was used to calculate a surface coverage value in ng/cm².

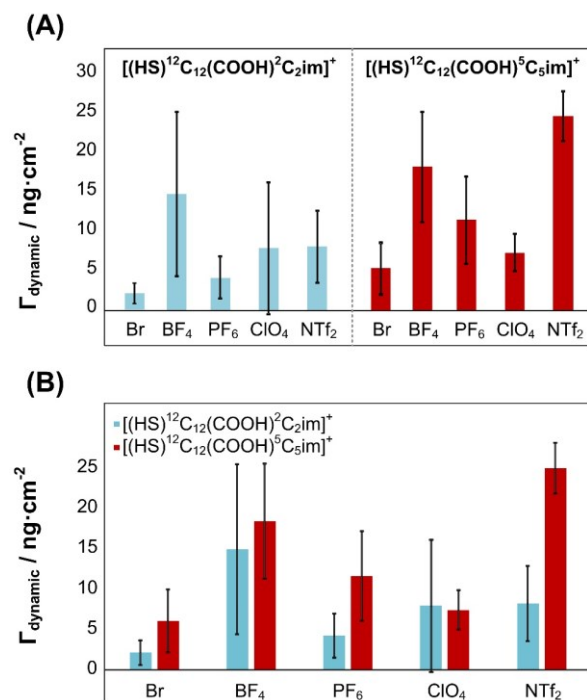


Figure 3.4 Dynamic nonspecific adsorption of SK-BR-3 crude cell lysate on ionic liquid monolayers. (A) Effect of the chain length and (B) effect of the nature of the counterion.

We first compared the influence of the alkyl chain length. The surface coverage range for $[(\text{HS})^{12}\text{C}_{12}(\text{COOH})^2\text{C}_2\text{im}]^+$ was 2 ± 2 to $15 \pm 11 \text{ ng/cm}^2$, which overlaps with the range for $[(\text{HS})^{12}\text{C}_{12}(\text{COOH})^5\text{C}_5\text{im}]^+$ is 6 ± 4 to $25 \pm 3 \text{ ng/cm}^2$. According to these results, there was no significant difference in nonspecific adsorption attributable to the chain length of the alkyl-carboxylic acid moiety (Figure 3.4A). The effect of counterion was also studied and we did not observe a correlation between the counterions hydrophobicity and nonspecific adsorption (Figure 3.4B). For both ionic liquids, the counterion with the best efficiency to reduce nonspecific binding of cell lysate was the bromide, which is normally the most hydrophilic. For $[(\text{HS})^{12}\text{C}_{12}(\text{COOH})^2\text{C}_2\text{im}]^+$, the worst counterion was the BF_4^- and the NTf_2^- counterion was the worst for the $[(\text{HS})^{12}\text{C}_{12}(\text{COOH})^5\text{C}_5\text{im}]^+$. Even if there is a slight difference in the efficiency of the different ionic liquid monolayers, the overall performances were very similar. Therefore, there is no significant effect of counterion exchange on the efficiency of the ionic liquid monolayers to reduce nonspecific

adsorption of cell lysate. This is in accordance with the observation that all the ionic liquid monolayers had similar contact angle.

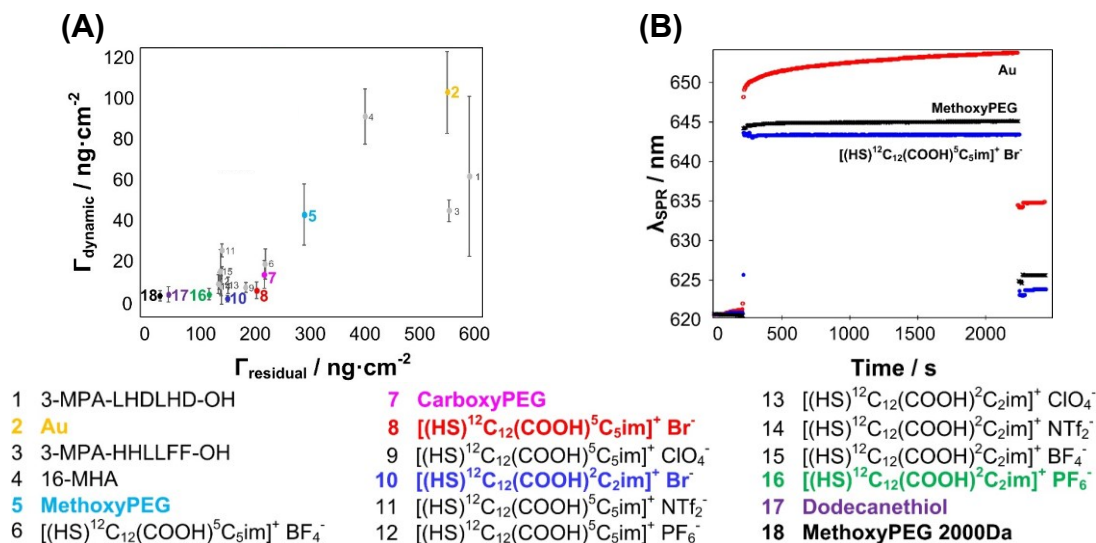


Figure 3.5 Nonspecific adsorption of SK-BR-3 cell lysate measured by SPR reported in surface coverage (Γ) on different self-assembled monolayers (see legend) (A) and example of SPR sensorgrams of relevant SAMs (B).

Since all ionic liquids had very similar performances in reducing the dynamic nonspecific adsorption of cell lysate, we classified their efficiencies using two parameters: the dynamic nonspecific adsorption and the residual nonspecific adsorption. The residual nonspecific adsorption is the material that was still adsorbed on the surface after a washing step with PBS pH 7.4 (Figure 3.5). The surface coverage values of all the studied monolayers are also provided in **Erreur ! Source du renvoi introuvable**. Table 3.1 in Supporting Information. Considering only the dynamic adsorption parameter, the most efficient SAM to reduce nonspecific adsorption during the exposition of the surface to cell lysate was the ionic liquid $[(\text{HS})^{12}\text{C}_{12}(\text{COOH})^2\text{C}_2\text{im}]^+$ with the bromide counterion ($[(\text{HS})^{12}\text{C}_{12}(\text{COOH})^2\text{C}_2\text{im}]^+ \text{Br}^-$). However, this SAM was not very efficient in the reducing of the residual adsorption. The most efficient ionic liquid SAM to reduce nonspecific adsorption in both dynamic shift and residual shift was the $[(\text{HS})^{12}\text{C}_{12}(\text{COOH})^2\text{C}_2\text{im}]^+ \text{PF}_6^-$ SAM, with a dynamic nonspecific adsorption of $4 \pm 3 \text{ ng/cm}^2$ and a residual nonspecific

adsorption of 107 ± 26 ng/cm². Note that even if this ionic liquid was the most efficient, all the ionic liquids had similar performances (see the cluster in Figure 3.5). The difference in dynamic and residual nonspecific adsorption is likely due to part of the nonspecific adsorption occurring faster than the acquisition of data (seconds). As observed in Figure 3.5, every ionic liquid monolayer reduced significantly nonspecific adsorption occurring during the exposure of the surface to cell lysate.

3.4.2.2 *Common low fouling monolayers*

A carboxy-PEG (HS-(CH₂CH₂O)-CH₂CH₂-COOH) and two methoxy-PEGs (HS-(CH₂CH₂O)-CH₂CH₂-COOCH₃) of different molecular weights were also studied, in order to have a comparison point between the newly developed ionic liquids and common low fouling surfaces. The short PEGs were fouling more than the most efficient ionic liquids with dynamic nonspecific adsorption of 14 ± 5 ng/cm² for the carboxy-PEG and 42 ± 15 ng/cm² for the short methoxy-PEG. The 2000 Da methoxy-PEG was very effective at reducing nonspecific adsorption, as well as dodecanethiol, with respective dynamic surface coverages of 4 ± 3 ng/cm² and 4 ± 4 ng/cm². Dodecanethiol is the most hydrophobic SAM tested (contact angle of $109 \pm 5^\circ$) and usually not considered as a low-fouling surface, confirming the previously reported observations that hydrophobic surfaces were effective to suppress nonspecific adsorption of cell lysate. These surfaces would be excellent to passivate materials. However, dodecanethiol and 2000 Da methoxy-PEG cannot be considered for biosensing, since they lack reactive functional groups necessary to be functionalized with molecular receptors.

The efficiency to reduce nonspecific adsorption of 16-MHA, a commonly used monolayer in SPR, was also studied. This monolayer had the worst performances of the SAM tested with a dynamic surface coverage of 89 ± 13 ng/cm², which is only slightly better than bare gold (100 ± 19 ng/cm²). Therefore, even if this monolayer has the appropriate functional group to perform a biosensing assay, it cannot be used in cell lysate.

Finally, two peptide monolayers with good nonspecific adsorption properties were studied. The 3-mercaptopropionic acid-(Leu-His-Asp)₂-OH (3-MPA-LHDLHD-OH) monolayer, which is very efficient to reduce nonspecific adsorption of serum⁷⁴, was also one of the worst monolayers studied here with a dynamic surface coverage of 60 ± 38 ng/cm². This result was expected since it was observed previously that the efficient anti-fouling monolayers in serum are not efficient in cell lysate¹⁶⁴. The second peptide monolayer that was compared to ionic liquids developed in this study was the 3-MPA-(His)₂(Leu)₂(Phe)₂-OH (3-MPA-HHLLFF-OH), a more hydrophobic peptide developed previously in our group. Even if this peptide was the most efficient of all previously developed peptides¹⁶⁴, it remained one of the worst surfaces studied in this paper, in comparison to all newly developed ionic liquids, with a dynamic surface coverage of 44 ± 5 ng/cm². This underlines the impressive performances of ionic liquids in the reducing of nonspecific adsorption of cell lysate.

3.4.2.3 *Mixed monolayers*

We then considered the combination of different monolayers to better understand the properties of the ionic liquids and also in an attempt to further improve the efficiency of different monolayers (Figure 3.5). Ionic liquids almost eliminated the dynamic nonspecific adsorption of cell lysate, but there was still some residual nonspecific adsorption after PBS rinsing. Therefore, different combinations of [(HS)¹²C₁₂(COOH)²C₂im]⁺ Br⁻ and dodecanethiol were tried with the aim of improving the overall antifouling properties.

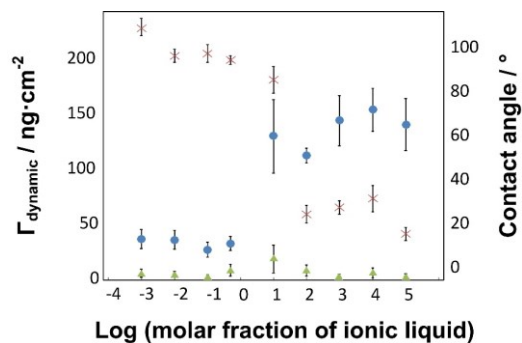


Figure 3.6 Mixed monolayers to reduce nonspecific adsorption of cell lysate. Red x are contact angle, blue spheres are residual nonspecific adsorption and green triangles are dynamic nonspecific adsorption.

For the dynamic surface coverage, there is no significant difference between the different monolayers, but two regimes can be observed in the residual surface coverage (Figure 3.6). When the molar fraction of ionic liquid in the functionalization solution is low (0.5 or less), the surface properties corresponded mainly to the properties of a dodecanethiol SAM, with a residual surface coverage of $32 \pm 8 \text{ ng/cm}^2$ in average and a high contact angle (between 94° and 109°). When the molar fraction of ionic liquid in the functionalization solution was high (0.99 or higher), the surface properties corresponded to the properties of the ionic liquid SAM, with a residual surface coverage of $137 \pm 18 \text{ ng/cm}^2$ in average and a low contact angle (between 15° and 31°). The surface properties changed significantly at a molar fraction of ionic liquid of 0.9 (1 dodecanethiol : 10 ionic liquid). At this concentration, the dodecanethiol's efficiency in reducing the residual nonspecific adsorption was lost (residual surface coverage of $129 \pm 33 \text{ ng/cm}^2$), but the contact angle was high ($85 \pm 6 \text{ ng/cm}^2$).

3.4.3 Biosensing experiments

Biosensors were then constructed to detect biomolecules of interest in cell lysate. During our initial biosensing experiment, we encountered an unpredicted issue regarding the availability of the carboxylic group of the ionic liquid; it was impossible to bind an antibody to the two most efficient ionic liquid monolayers

$[(\text{HS})^{12}\text{C}_{12}(\text{COOH})^2\text{C}_2\text{im}]^+ \text{Br}^-$ and $[(\text{HS})^{12}\text{C}_{12}(\text{COOH})^2\text{C}_2\text{im}]^+ \text{PF}_6^-$ despite numerous attempts with EDC/NHS binding, pre-functionalization of the ionic liquid with the NHS group, changing the solution's pH, etc. We hypothesize that the interaction between the negative carboxyl group and the positive imidazolium core was too strong to allow the reaction of the carboxyl group. This interaction is likely due to the short distance between the carboxylic group and the imidazolium core. Therefore, we were constrained to change the ionic liquid. We chose to use the $[(\text{HS})^{12}\text{C}_{12}(\text{COOH})^5\text{C}_5\text{im}]^+ \text{Br}^-$ ionic liquid, for its efficiency to reduce nonspecific adsorption of cell lysate and the simplicity of the preparation of the SAM, since no counterion exchange was necessary. Again, we were not able to use EDC/NHS chemistry directly on the surface to bind an antibody, but preactivation of the carboxylic acid with the NHS group prior to the formation of the SAM facilitated binding of the antibody. We hypothesized that the longer alkyl chain between the imidazolium core and the carboxylic group diminished the interaction between the oppositely charged moieties.

The ionic liquid monolayer was applied to a clinically relevant biodetection scheme. HER2 biomarkers are indicative of a malignant tumor in approximately one-third of the breast cancer cases, making this biomarker a relevant target in development of new biosensing technologies. The first HER2 detection experiment was a direct assay. A cell lysate sample was spiked with HER2 and an anti-HER2 antibody was attached to the $[(\text{HS})^{12}\text{C}_{12}(\text{COOH})^5\text{C}_5\text{im}]^+ \text{Br}^-$ surface. Unfortunately, there was no significant difference in the dynamic shift between the spiked sample and the blank sample. This experiment led to the observation that, when an antibody is attached on the surface, the antifouling properties of the SAM were reduced (Figure 3.7).

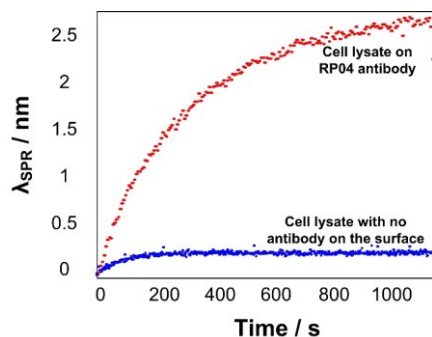


Figure 3.7 Difference in nonspecific adsorption on $[(\text{HS})_{12}\text{C}_{12}(\text{COOH})_5\text{C}_5\text{sim}]^+ \text{Br}^-$ of native IL-SAM and modified with RP04 antibody

This observation is of great interest in the anti-fouling SAM research field, because SAMs are often developed without any verification that the anti-fouling properties will remain unchanged when an antibody is attached to the surface. Vaisocherová et al. reported the same observation in a recent article⁶⁵. They attached three different antibodies on two polymer brushes, pCBAA and pHEMA, and obtained a plasma fouling of $19 \pm 4 \text{ ng/cm}^2$ and $135 \pm 19 \text{ ng/cm}^2$ respectively, compared to very low fouling when no antibody was attached. In comparison, we obtained a blank crude cell lysate fouling of $61 \pm 8 \text{ ng/cm}^2$ when the anti-HER2 was attached on the surface, compared to $6 \pm 4 \text{ ng/cm}^2$ when there was no antibody (Figure 3.7). Therefore, a direct assay in undiluted matrix could potentially be used when the target is expected to be found in a high concentration, but when the concentration of analyte is low, a different detection strategy had to be developed in order to increase the signal of the analyte.

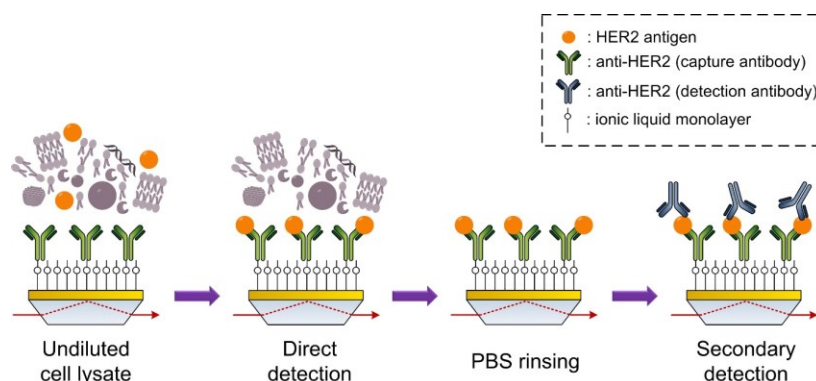


Figure 3.8 Schematic representation of the HER2 detection with SPR sensing

In the case of HER2, since the concentration is relatively low, the analyte signal was lost in the background signal, even if a very efficient antifouling surface was used. To overcome this issue, we chose to use a simple secondary detection (Figure 3.8) for the detection of HER2 in crude cell lysate. Surfaces with low nonspecific adsorption remain useful despite the use of secondary detection. HER2 detection was then performed in breast cancer cell lysate. MCF-7 cell lysate was spiked with a concentration of 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of a recombinant HER2 (MW = 70 kDa) and SK-BR-3 cell lysate naturally containing HER2 were analyzed with the SPR sensor. In both cases, a polyclonal capture antibody was bound on the surface through the lysines on the heavy chain by a nucleophilic attack on the carboxyl group of the ionic liquid activated with NHS. Also in both cases, a secondary detection with a different polyclonal antibody (detection antibody) was performed, after a PBS rinsing step (Figure 3.8).

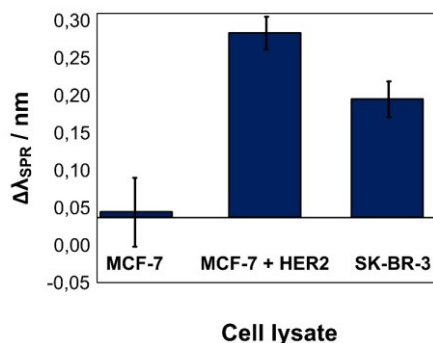


Figure 3.9 HER2 secondary detection in undiluted cell lysate by a sandwich assay on $[(\text{HS})^{12}\text{C}_{12}(\text{COOH})^5\text{C}_{5\text{sim}}]^+ \text{Br}^- \text{SAM}$.

SPR responses obtained for the secondary detection of HER2 in both HER2-containing cell lysates were significantly higher than the signal from the control experiment (Figure 3.9 and Figure 3.12 in Supporting Information). MCF-7 cell lysate should not contain a significant amount of HER2 and thus, the SPR signal was almost zero ($0.01 \pm 0.05 \text{ nm}$). In contrary, the spiked MCF-7 cell lysate and the SK-BR-3 cell lysate showed significant SPR signals, $0.26 \pm 0.02 \text{ ng/cm}^2$ and $0.17 \pm 0.03 \text{ ng/cm}^2$ respectively. This confirms that HER2 can be detected specifically in crude cell lysate with the $[(\text{HS})^{12}\text{C}_{12}(\text{COOH})^5\text{C}_{5\text{sim}}]^+ \text{Br}^- \text{SAM}$.

The observations that were made with these experiments and the biosensing results underline the significant difference between surface development and the real application in biological samples. When applying a supposedly robust chemistry to a real-world situation, the number of unexpected issues that were encountered was significant. In this paper, we showed the importance of verifying the anti-fouling properties of a newly developed surface when a molecular receptor is attached on the surface. We were able to develop a very efficient ionic liquid that can practically eliminate nonspecific adsorption of crude cell lysate and that can be used to perform a real-world biosensing experiment. This novel ionic liquid can be used in a great variety of biosensing experiments, with SPR but with any sensing technology that requires reduction of nonspecific adsorption of cell lysate. A plethora of cancer could be diagnosed using biosensors built on this ionic liquid and the accessibility of a

cancer diagnosis would be exponentially increased, since the diagnosis would not be only reserved to a small minority of experts.

3.5 CONCLUSION

In brief, a new ionic liquid self-assembled monolayer was designed to significantly reduce nonspecific adsorption of crude cell lysate in SPR sensing. The most efficient ionic liquid, $[(\text{HS})^{12}\text{C}_{12}(\text{COOH})^2\text{C}_{2\text{im}}]^+ \text{Br}^-$ had a surface coverage as low as $2 \pm 2 \text{ ng/cm}^2$, 7 times lower than the carboxy-PEG tested ($14 \pm 7 \text{ ng/cm}^2$). Although $[(\text{HS})^{12}\text{C}_{12}(\text{COOH})^2\text{C}_{2\text{im}}]^+ \text{Br}^-$ was the most efficient ionic liquid, most of the newly designed ionic liquid monolayers were very efficient to reduce nonspecific adsorption of crude cell lysate. We expect that this very efficient monolayer can be used in a multitude of other techniques requiring the elimination of nonspecific adsorption, since the formation of the ionic liquid SAM relies only on the commonly used thiol-gold chemistry. These monolayers were then applied for biosensing experiments in cell lysate. Using the $[(\text{HS})^{12}\text{C}_{12}(\text{COOH})^5\text{C}_{5\text{im}}]^+ \text{Br}^-$ ionic liquid, we were able to detect HER2 from crude breast cancer cell lysate. The results show that our ionic liquid can be used to perform efficient HER2 biomarker detection in cell lysate. This surface chemistry could be used for a multitude of other biosensing experiments and for protecting surfaces to cell lysate adsorption.

3.6 ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Sylvie Mader (Université de Montréal) for providing MCF-7 cells and Thierry Havard and Jeffrey Santandrea for discussions about the synthesis of the ionic liquids. The authors thank financial support from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), the Natural Science and Engineering Research Council (NSERC) of Canada, and of the Canada Foundation for Innovation (CFI).

3.7 SUPPORTING INFORMATION

3.7.1 General information

3.7.1.1 List of abbreviations

EtOH: Ethanol 100%

DMF: N,N-Dimethylformamide

EtOAc: Ethyl acetate

DCM: Dichloromethane

TBAB: Tetrabutylammonium bromide

MeOH: Methanol

LiNTf₂: Bis(trifluoromethane)sulfonimide lithium salt

3.7.1.2 Materials

HBr, TBAB, K₂CO₃, KOH, CDCl₃, 3-bromopropionic acid, 6-bromohexanoic acid, NaBr, NaBH₄, NaClO₄, NaPF₆ and LiNTf₂ were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Potassium thioacetate, 1,2-dibromododecane, imidazole, were purchased from Alfa Aesar. Sulfuric acid, DCM, DMF, EtOAc, were purchased from Fisher Scientific. Dimethyl-d₆ sulfoxide was purchased from C/D/N isotopes (Pointe-Claire, QC). The silica used to purify the compounds by chromatography was purchased from Silicycle Chemical division (40-63 nm; 230-240 mesh). The thin-layer chromatography (TLC) was performed on glass-backed silica gel. Visualization of TLC plates was performed by KMnO₄ stain. All mixed solvent eluents are reported as volume/volume solutions. NMR spectra were acquired with a Bruker AV-400 instrument, except for the ¹³C spectra that were acquired with a Bruker AV-300 instrument. Multiplicity in the reported spectra analysis is indicated as follow: s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quartet), quin (quintet), m (multiplet) and br

(broad). Exact MS spectra were acquired with a Synapt G2-Si instrument from Waters.

3.7.1.3 Fabrication of SPR chips

Dove glass prisms were washed in piranha solution (3:1 sulfuric acid : hydrogen peroxide 30%) during 1 hour at room temperature. They were then thoroughly rinsed with deionized water and rinsed once with ethanol afterwards. Prior to gold deposition, the glass prisms were air dried and placed into a sputtering instrument (Cressington 308R sputter coater, Ted Pella Inc. Redding, CA) where approximately 0.7 nm (35 seconds) of chromium and 50 nm (1 minute and 40 seconds) of gold were deposited on the surface to form a continuous film.

3.7.2 Ionic liquid synthesis

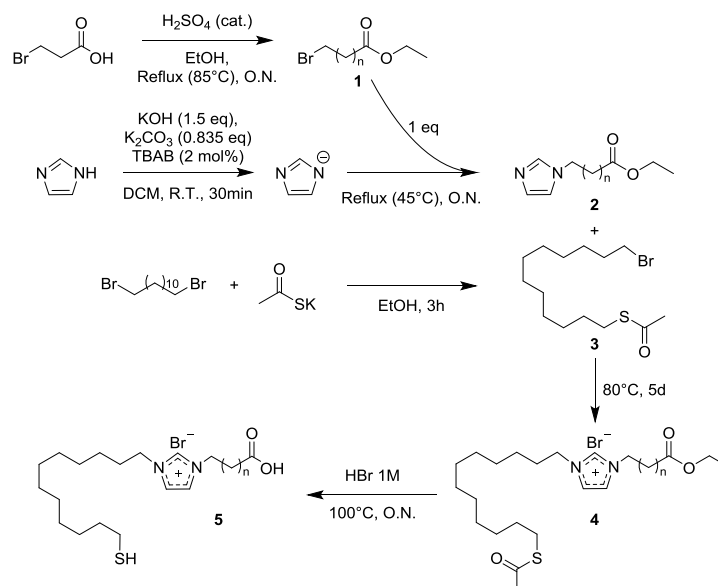
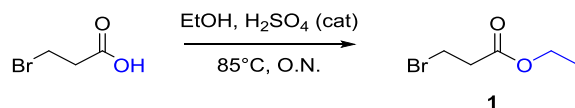
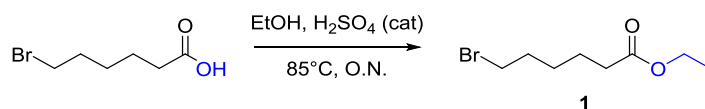


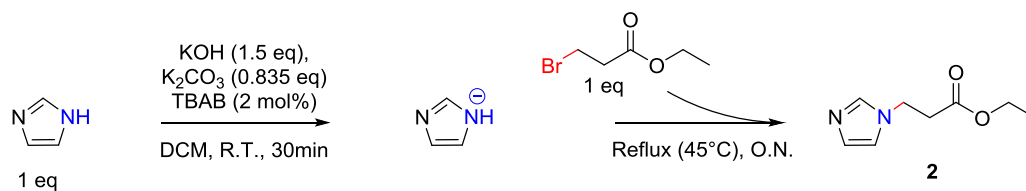
Figure 3.10 Synthesis of 1-(2-carboxyethyl)-3-(12-mercaptododecyl)-1H-imidazol-3-ium bromide ($n=1$) and 1-(5-carboxypentyl)-3-(12-mercaptododecyl)-1H-imidazol-3-ium bromide ($n=4$) (The same figure is found in the paper (Figure 2). It was repeated here for clarity.)



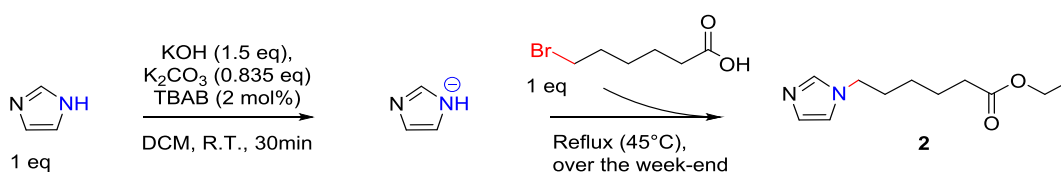
Ethyl-3-bromopropionate (1, n=1). 3-bromopropionic acid (7.6 g, 50 mmol) was added to 150 mL of EtOH in a round-bottom flask. The mixture was agitated until the acid is well dissolved and 50 drops of H₂SO₄ was added. The light orange mixture was agitated at reflux (85°C) overnight. The EtOH was evaporated to yield a dark orange solution and 120 mL of water and 30 mL of NaHCO₃ saturated solution was added. The mixture was agitated for a few seconds and transferred in a separatory funnel to be extracted 6 times with 80 mL of DCM. The organic phase was dried on MgSO₄ and filter on cotton. Solvent was evaporated and the product was purified by gel column chromatography (100% hexanes to 2% ether/hexanes). A yellowish liquid compound was obtained with a 44% yield. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 4.224 (q, 2H, J=7.2), 3.615 (t, 2H, J=6.8), 2.941 (t, 2H, J=6.8), 1.313 (t, 3H, J=7.2).



Ethyl-3-bromohexanoate (1, n=4). 3-bromohexanoic acid (12.7 g, 65 mmol) was added to 200 mL of EtOH in a round-bottom flask. The light orange mixture was agitated until the acid is well dissolved and 30 drops of H₂SO₄ was added. The mixture was agitated at reflux (85°C) overnight. The EtOH was evaporated to yield a dark orange solution and 40 mL of water and 10 mL of NaHCO₃ saturated solution was added. The mixture was agitated for a few seconds and transferred in a separatory funnel to be extracted 6 times with 50 mL of DCM. The organic phase was dried over MgSO₄ and filter on cotton. Solvent was evaporated and the product was purified by gel column chromatography (5% ether/hexanes). A yellowish liquid compound was obtained with a 85% yield. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 4.163 (q, 2H, J=7.2), 3.441 (t, 2H, J=6.8), 2.347 (t, 2H, J=7.2), 1.913 (m, 2H), 1.690 (quin, 2H, J=7.6), 1.511 (m, 2H), 1.290 (t, 3H, J=7.2).

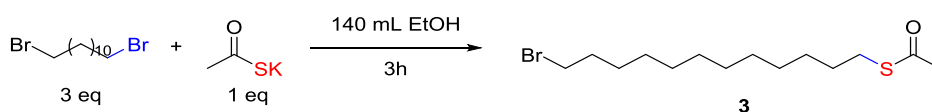


Ethyl 3-(1H-imidazol-1-yl)propanoate (2, n=1). Imidazole (3.0 g, 44 mmol) was added to a round-bottom flask and dissolved in 25 mL of DCM by sonication. KOH (3.7 g, 66 mmol), K₂CO₃ (5.1 g, 36.74 mmol) and TBAB (0.283 g, 2 mol%) were added to the mixture with another 8 mL of DCM. The mixture was agitated 30 minutes at reflux (45°C). Compound 1 (n=1) was added dropwise to the mixture while stirring and the mixture was agitated overnight. The mixture was filtered on Buckner and the flask and residue were rinsed 3 times with DCM. The mixture was then filtered on cotton and transferred in a separatory funnel. It was washed 6 times with 50 mL H₂O (until the water pH=7). The aqueous phase was then transferred in a separatory funnel to recover all the DCM. The organic phase was dried over MgSO₄ and the solvent was evaporated. A translucent oil was obtained, with a yield of 85%. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm: 7.613 (s, 1H), 7.171 (s, 1H), 6.872 (s, 1H), 4.210 (t, 2H, J=6.4), 4.069 (q, 2H, J=7.2), 2.830 (t, 2H, J=6.4), 1.168 (t, 3H, J=7.2).

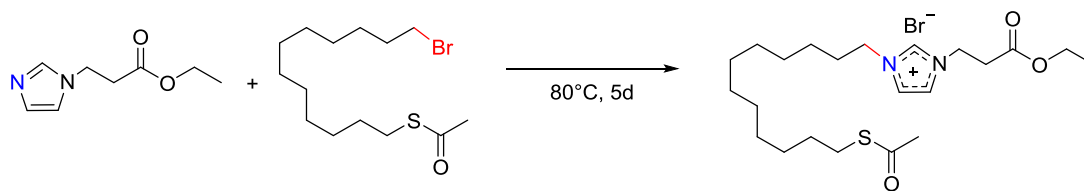


Ethyl 6-(1H-imidazol-1-yl)hexanoate (2, n=4). Imidazole (3.4 g, 50 mmol) was added to a round-bottom flask and dissolved in 25 mL of DCM by sonication. KOH (4.2 g, 75 mmol), K₂CO₃ (5.8 g, 41.75 mmol) and TBAB (0.322 g, 2 mol%) were added to the mixture with another 5 mL of DCM. The mixture was agitated 30 minutes at reflux (45°C). Compound 1 (n=4) was added dropwise to the mixture while stirring and the mixture was agitated over-the-week-end (overnight is probably enough). The mixture was filtered on Buckner and the flask and residue were rinsed

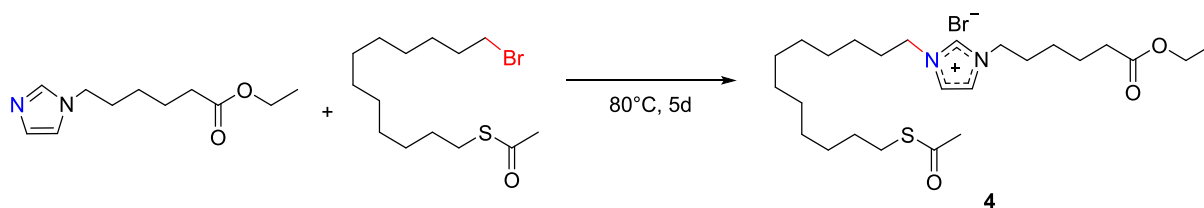
5 times with DCM. The organic phase was washed 4 times with 30 mL of brine solution and dried over MgSO₄. The solvent was evaporated yielding in a dark orange liquid which was purified by gel column chromatography (2% MeOH/DCM) to obtain a yellow oil (with traces of TBAB that were not separated). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm: 7.607 (s, 1H), 7.161 (s, 1H), 6.878 (s, 1H), 4.047 (q, 2H, J=7.2), 3.945 (t, 2H, J=7.2), 2.279 (t, 2H, J=7.6), 1.707 (quin, 2H, J=7.2), 1.543 (quin, 2H, J=7.6), 1.214 (m, 2H), 1.178 (t, 3H, J=7.2).



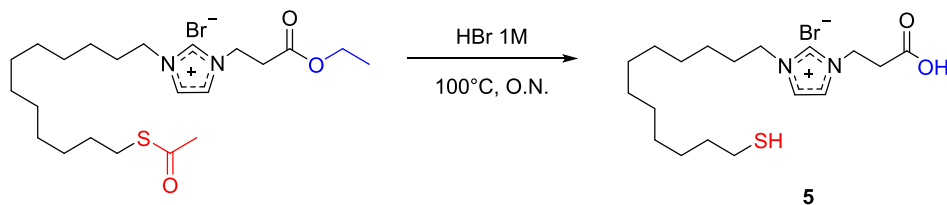
S-(12-bromododecyl) ethanethioate (3). 1,2-dibromododecane (66.0 g, 201 mmol) was added in a round bottom flask and heated to 85°C until the compound is liquefied. Potassium thioacetate (7.7 g, 67 mmol) was dissolved in a minimum of EtOH (140 mL) by sonication (10 minutes). The potassium thioacetate solution (not the solid residue) was added dropwise to the liquefied 1,2-dibromododecane (the addition took 3 hours). After the addition, the reaction was followed by TLC and was finished. The hot mixture was filtered on cotton and rinsed with a small volume of EtOAc. The solvent was evaporated and the compound was allowed to cool-down at room temperature, leading to a solid white compound. A dry-pack was prepared in order to purify the product by gel column chromatography (100% hexanes until the first product (1,2-dibromododecane) is out of the column, then 2% EtOAc/hexanes). The 1,2-dibromododecane was recovered for further use. After evaporating the solvent from the second product (desired product) (small volumes in large flasks since the product is a surfactant and bumps in the rotary evaporator), the white product has been re-purified by gel column chromatography (100% hexanes to 3% EtOAc/hexanes). A white solid was obtained with a 55% yield. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm: 3.536 (t, 2H, J=6.0), 2.832 (t, 2H, J=6.0), 2.327 (s, 3H) 1.797 (quin, 2H, J=6.8), 1.503 (quin, 2H, J=7.2), 1.383 (br m, 2H), 1.259 (br m, 14H).



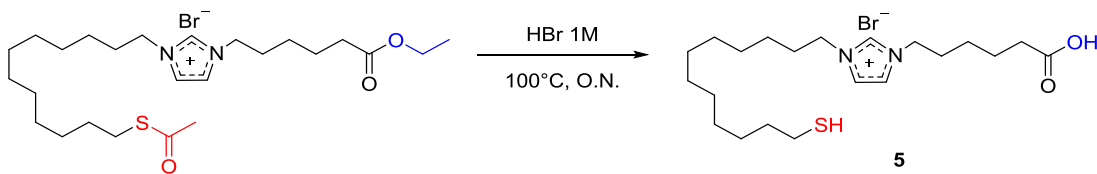
3-(12-(acetylthio)dodecyl)-1-(3-ethoxy-3-oxopropyl)-1H-imidazol-3-ium bromide (4, n=1). Compounds 2 (n=1) and 3 were added in a round-bottom flask, heated to 80°C and agitated 5 days. 60 mL of hexanes were added in the flask and agitated 2 minutes wash the compound. The hexanes is discarded (the desired compound is very viscous and stays in the flask) and the washing procedure is repeated once. The residual hexanes is evaporated, yielding in a light orange opaque viscous oil with a quantitative yield. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm: 9.206 (s, 1H), 7.799 (s, 2H), 4.408 (t, 2H, J=6.8), 4.169 (t, 2H, J=6.8), 4.083 (q, 2H, J=6.8), 3.007 (t, 2H, J=6.8), 2.830 (t, 2H, J=6.8), 2.330 (s, 3H), 1.780 (m, 2H), 1.499 (m, 2H), 1.245 (br m, 16H), 1.179 (t, 3H, J=7.2).



3-(12-(acetylthio)dodecyl)-1-(6-ethoxy-6-oxohexyl)-1H-imidazol-3-ium bromide (4, n=4). Compounds 2 (n=4) and 3 were added in a round-bottom flask, heated to 80°C and agitated 5 days. 60 mL of hexanes was added in the flask and agitated 2 minutes wash the compound. The hexanes is discarded (the desired compound is very viscous and stays in the flask) and the washing procedure is repeated once. The residual hexanes is evaporated, yielding in a dark orange translucent viscous oil with a quantitative yield. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm: 9.197 (s, 1H), 7.811 (s, 2H), 4.163 (m, 4H), 4.055 (q, 2H, J=6.8), 2.827 (t, 2H, J=8.0), 2.329 (s, 3H), 2.303 (t, 2H, J=7.6), 1.795 (m, 4H), 1.560 (m, 2H), 1.499 (m, 2H), 1.246 (br m, 18H), 1.182 (t, 3H, J=7.2).



1-(2-carboxyethyl)-3-(12-mercaptododecyl)-1H-imidazol-3-ium bromide (5, n=1). Compound 4 (n=1) was kept in the same flask (from last reaction) and 80 mL of HBr 1M was added. The mixture was agitated at reflux (100°C) overnight. The liquid was transferred to a separatory funnel and the aqueous phase was extracted with 3 times 100 mL DCM. The organic phase was dried over MgSO₄ and the solvent was evaporated, yielding in a light orange solid with 83% yield. Melting point: 88°C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm: 9.242 (s, 1H), 7.808 (s, 2H), 4.370 (t, 2H, J=6.8), 4.170 (t, 2H, J=7.2), 2.926 (t, 2H, J=7.2), 2.469 (q, 2H, J=7.6), 2.239 (t, 2H, J=6.8), 1.780 (br quin, 2H, J=7.6), 1.527 (quin, 2H, J=7.2), 1.252 (m, 14H). ¹³C NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ ppm: 172.13, 136.89, 122.98, 122.75, 49.26, 45.23, 34.14, 33.82, 29.79, 29.40 (3C), 29.25, 28.95, 28.80, 28.19, 25.89, 24.21. Experimental exact mass (m/z): 341.22750 Calculated exact mass (m/z): 341.22630



1-(5-carboxypentyl)-3-(12-mercaptododecyl)-1H-imidazol-3-ium bromide (5, n=4). Compound 4 (n=4) was kept in the same flask (from last reaction) and 80 mL of HBr 1M was added. The mixture was agitated at reflux (100°C) overnight. The liquid was transferred to a separatory funnel and the aqueous phase was extracted with 3 times 100 mL DCM. The organic phase was dried over MgSO₄ and the solvent was evaporated, yielding in a white powder with 91% yield. Melting point: 104°C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm: 12.025 (s, 1H), 9.214 (s, 1H), 7.814 (s, 2H), 4.168-4.052 (m, 4H), 2.471 (q, 2H, J=7.2), 2.224 (m, 2H), 1.803 (m,

4H), 1.532 (m, 4H), 1.251 (m, 18H). ^{13}C NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 174.74, 136.41, 122.91 (2C), 49.31, 49.10, 33.81, 33.79, 29.71, 29.47, 29.40 (2C), 29.35, 29.26, 28.95, 28.78, 25.93, 25.43, 24.20, 24.17. Experimental exact mass (m/z): 383.27360 Calculated exact mass (m/z): 383.27320

3.7.3 SPR measurements

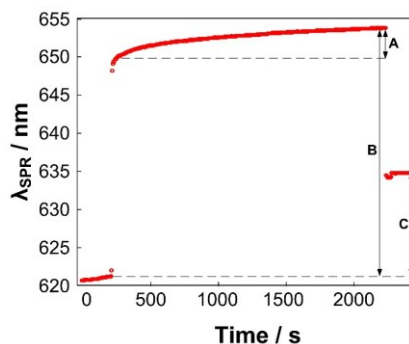


Figure 3.11 Different calculation techniques for the measurement of the nonspecific binding shift on a SPR sensorgram

The nonspecific adsorption shifts that are reported in the article correspond to the shift A. This shift represents the measurement of real-time adsorption of nonspecific material on the surface. We called it *dynamic shift*. To an average of the last 30 seconds of the cell lysate exposition, the mean of the 375th second to the 400th second was subtracted. Seconds 375 to 400 were selected to be able to compare as precisely as possible every sensorgram (with the shift A). The SAMs were also classified for their ability to reduce nonspecific binding after washing the surface with buffer (shift C). Shift C represents the residual nonspecifically adsorbed material on the surface. The shifts B was also measured, but the results were not use to compare one SAM to another. Shift B represents the bulk refractive index change, due to the difference in the refractive index between PBS and concentrated cell lysate, plus the nonspecific adsorption of material during the surface exposition to cell lysate.

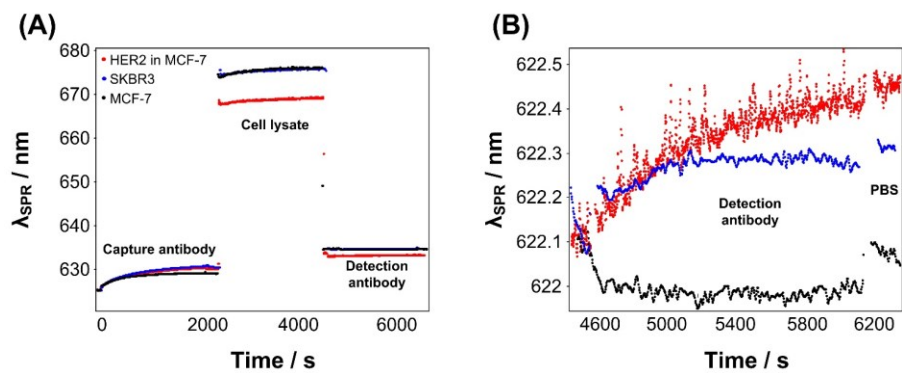


Figure 3.12 SPR sensorgram of HER2 detection in undiluted cell lysate by a sandwich assay on $[(\text{HS})^{12}\text{C}_{12}(\text{COOH})^5\text{C}_5\text{im}]^+ \text{Br}^- \text{SAM}$. Complete sensorgram (A) and zoom on the secondary detection with a Savitzki-Golay smoothing ($x \pm 2$) (B).

Table 3.1 Nonspecific adsorption of SK-BR-3 cell lysate on different self-assembled monolayers

Self-assembled monolayer	Γ_{dynamic} ng/cm ²			Γ_{residual} ng/cm ²		
[(HS) ¹² C ₁₂ (COOH) ² C ₂ im] ⁺ Br ⁻	2	±	2	139	±	24
Methoxy PEG 2000Da	4	±	3	20	±	14
Dodecanethiol	4	±	4	35	±	9
[(HS) ¹² C ₁₂ (COOH) ² C ₂ im] ⁺ PF ₆ ⁻	4	±	3	107	±	26
[(HS) ¹² C ₁₂ (COOH) ⁵ C ₅ im] ⁺ Br ⁻	6	±	4	191	±	45
[(HS) ¹² C ₁₂ (COOH) ⁵ C ₅ im] ⁺ ClO ₄ ⁻	7	±	2	171	±	32
[(HS) ¹² C ₁₂ (COOH) ² C ₂ im] ⁺ ClO ₄ ⁻	8	±	9	129	±	13
[(HS) ¹² C ₁₂ (COOH) ² C ₂ im] ⁺ NTf ₂ ⁻	8	±	5	128	±	9
[(HS) ¹² C ₁₂ (COOH) ⁵ C ₅ im] ⁺ PF ₆ ⁻	12	±	6	130	±	14
Carboxy PEG	14	±	7	204	±	31
[(HS) ¹² C ₁₂ (COOH) ² C ₂ im] ⁺ BF ₄ ⁻	15	±	11	127	±	30
[(HS) ¹² C ₁₂ (COOH) ⁵ C ₅ im] ⁺ BF ₄ ⁻	19	±	7	206	±	34
[(HS) ¹² C ₁₂ (COOH) ⁵ C ₅ im] ⁺ NTf ₂ ⁻	25	±	3	130	±	9
Methoxy PEG (short)	42	±	15	274	±	112
3-MPA-HHLLFF-OH	44	±	5	529	±	55
3-MPA-LHDLHD-OH	60	±	38	565	±	159
16-MHA	89	±	13	382	±	8
Au	100	±	19	526	±	76

CHAPITRE IV

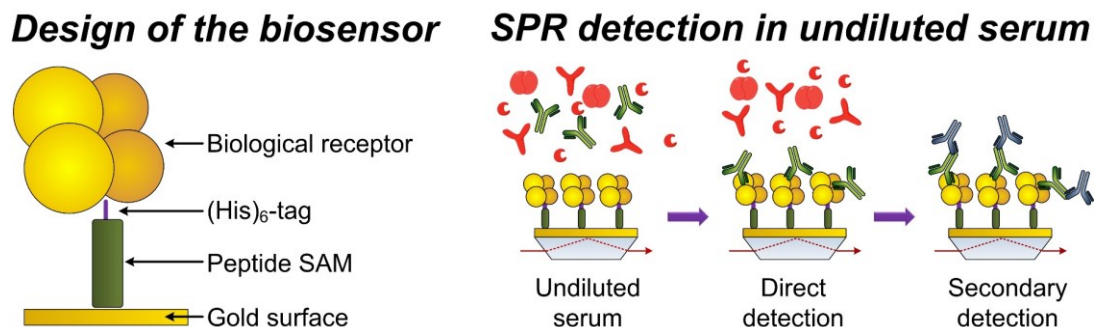
RESPONSE MONITORING OF ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA (ALL) PATIENTS UNDERGOING L-ASPARAGINASE THERAPY: SUCCESSES AND CHALLENGES ASSOCIATED WITH CLINICAL SAMPLE ANALYSIS IN PLASMONIC SENSING

Alexandra Aubé^a, David M. Charbonneau^{a,b}, Joelle N. Pelletier^{a,b} and Jean-François Masson^{a,c*}

^a Département de Chimie and Département de Biochimie, Université de Montréal, C.P. 6128 Succ. Centre-ville, Montreal, Quebec, H3C 3J7, Canada

^b PROTEO

^c Centre for self-assembled chemical structures (CSACS)



Les travaux de recherche décrits dans ce chapitre⁵ ont été conçus en collaboration avec David Charbonneau, Professeure Joelle N. Pelletier et Professeur Jean-François Masson. J'ai réalisé toutes les expériences au laboratoire, excepté l'expression de l'asparaginase et les mesures en ELISA qui ont été entièrement effectuées par David Charbonneau. La rédaction du manuscrit a été effectuée en collaboration avec Professeure Joelle N. Pelletier et Professeur Jean-François Masson, ainsi qu'avec David Charbonneau.

⁵ Aubé, A.; Charbonneau, D. M.; Pelletier, J. N.; Masson, J.-F., Response Monitoring of Acute Lymphoblastic Leukemia Patients Undergoing L-Asparaginase Therapy: Successes and Challenges Associated with Clinical Sample Analysis in Plasmonic Sensing. *ACS Sensors* **2016**, *1* (11), 1358-1365.

4.1 ABSTRACT

Monitoring the response of patients undergoing chemotherapeutic treatments is of great importance to predict remission success, avoid adverse effects and thus, maximise the patients' quality of life. In the case of leukemia patients treated with *E. coli* L-asparaginase, monitoring the immune response by the detection of specific antibodies to L-asparaginase in the serum of patients can prevent extended immune response to the drug. Here, we developed a surface plasmon resonance (SPR) biosensor to rapidly detect anti-asparaginase antibodies directly in patients' sera, without requiring sample pre-treatment or dilution. A direct assay with SPR sensing to detect anti-asparaginase antibodies exhibited a limit of detection of 500 pM and a high sensitivity range between 100 nM and 1 μ M in pooled and undiluted human serum from a commercial source. While the SPR assay showed excellent reproducibility (12% CV) in pooled serum, challenges were encountered upon analyzing clinical samples due to high sample-to-sample variability in color and turbidity and, in all likelihood, in composition. As a result, direct detection in clinical samples was unreliable due to factors that may generally affect assays based on plasmonic detection. Addition of a secondary detection step overcame sample variability due to bulk differences in patients' sera. By those means, the SPR biosensor was successfully applied to the analysis of clinical samples from leukemia patients undergoing asparaginase treatments and the results agreed well with the standard ELISA assay. Monitoring antibodies against drugs is common such that this type of sensing scheme could serve to monitor a plethora of immune responses in sera of patients undergoing treatment.

Keywords: Surface plasmon resonance (SPR), ELISA, anti-asparaginase, L-asparaginase, leukemia, human serum, biosensing, clinical sample

4.2 INTRODUCTION

Leukemia is a family of blood cancers. Approximately 66,000 new cases are diagnosed each year in the United States and Canada¹⁹⁸⁻¹⁹⁹ and almost 27,000 patients die of leukemia annually. Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is an aggressive form of leukemia that most commonly affects children. It develops in bone marrow where the immature white blood cells (lymphocytes) become cancerous. The resulting lymphoblasts proliferate and spread in the blood flow and to organs, while preventing the proper function of other blood cells^{4, 132-133}. Current therapies combine a multitude of chemotherapeutic drugs^{20-23, 200} and have greatly improved the outcome of patients afflicted by ALL. Among the drugs used to combat ALL, L-asparaginase is commonly used due to its efficacy^{26, 201-203}. L-Asparaginase is a front line biological therapeutic agent purified from *Escherichia coli* bacteria or other microbes such as *Erwinia chrysanthemi*. As a result of their foreign origin, they provoke a relatively high rate of immune response from the patients, ranging from silent hypersensitivity to anaphylactic shock²⁶⁻²⁷, a source of concern for the efficient treatment of ALL. Antibodies can appear in the blood several days before the occurrence of the anaphylactic shock. Therefore, if patients' blood samples were tested onsite and regularly for anti-asparaginase antibodies, silent hypersensitivity could be monitored in a timely manner, preventing potential future anaphylactic shock and significantly improving the patients' quality of life.

The current method to quantify anti-asparaginase antibodies in leukemia patients treated with L-asparaginase is the well-known enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)^{29, 204}. This methodology is robust and readily amenable to analysing large numbers of samples simultaneously, but it requires trained personnel, is costly when a small number of samples need to be analysed, and for the detection of anti-asparaginase, is not broadly accessible in clinical laboratories. Several other issues limit the applicability of ELISA in monitoring anti-asparaginase antibodies, including the accessibility of the test (*i.e.* most samples in Montreal are tested in Boston despite Montreal being a major healthcare hub), the time required to perform the analysis and the need for rapid action in changing the

course of treatment in occurrences of immune response. In the case of Sainte-Justine Hospital, one of the largest children's hospitals in North America, an average of only twelve patients undergo L-asparaginase chemotherapy at any given time. As a result, the advantage procured by ELISA in processing large numbers of samples is lost, while additional flexibility and timeliness in testing small numbers of samples would be beneficial. An alternative to ELISA that requires less sample preparation, is simple, low cost and suitable for immediate analysis of a few samples is of interest for clinical biochemistry laboratories in these situations. Such a method will allow closer monitoring of the patient's health, allowing decisions to be made in a timely manner and thus provide the best treatment course possible.

It has been previously proposed to detect anti-asparaginase using surface plasmon resonance (SPR) sensing ²⁰⁵. In that report, the sensor required sample pre-treatment, sample dilution and a large serum volume (3 mL), which could prove limiting in the case of clinical studies where the available sample volumes are often limited to a few hundreds of microliters or less. In addition, that study was performed on a Biacore T100 laboratory-based SPR system that is not suited for point-of-care clinical monitoring.

Despite the drawbacks identified in that study, SPR sensing and other plasmonic techniques remain ideally positioned for development as point-of-care sensors to analyse clinical samples ¹⁶⁵. SPR sensing is a refractometric ⁴² technique that can serve in complex matrices when an appropriate surface chemistry protects the sensor against fouling ^{50, 56, 116, 120, 178, 206}. In SPR sensing, a light beam in total internal reflection interacts with the surface plasmon of a noble metal thin film. Its wavelength or angle of resonance depends on the refractive index of a thin layer of fluid in contact with the film. Since the light beam does not go through the solution, analysis in opaque and complex fluids is possible, in contrast with many spectroscopic techniques where such solutions need to be diluted. The refractive index change observed in SPR sensing allows real-time monitoring of phenomena such as specific binding events between an antibody (*i.e.* anti-asparaginase) and its specific antigen immobilized on the sensor's surface (*i.e.* L-asparaginase). In

addition, SPR sensors can be portable ²⁰⁷⁻²⁰⁹ and thus, potentially used at the point-of-care. Therefore, SPR sensing is perfectly adapted for the analysis of undiluted sera samples but, to the best of our knowledge, there are few reports of SPR analysis in undiluted serum ^{63, 120, 166-181, 210}, and fewer reports of the analysis of undiluted clinical sera samples ¹⁸².

Here, we demonstrate the quantification of anti-asparaginase antibodies in undiluted human serum with a portable SPR biosensor. Sensor design considered the small volumes of clinical samples that are generally accessible and the capacity to analyse crude serum as well as simplicity of handling and robustness of the analysis. The SPR sensor was applied to monitor anti-asparaginase antibodies in clinical samples provided by a local hospital participating in the development of a new therapeutic protocol using L-asparaginase. The sample-to-sample variability was found to be a barrier to direct monitoring. A secondary detection step of the antibody ensured the reliability of the results obtained with clinical samples and good agreement with ELISA.

4.3 MATERIALS AND METHODS

4.3.1 Peptide synthesis

The synthesis of 3-mercaptopropionic acid-Leu-His-Asp-Leu-His-Asp-COOH (3-MPA-LHDLHD-OH) was adapted from previously described protocols ^{56, 211} as follows. Hydroxymethyl polystyrene resin (100-200 mesh, 1% divinylbenzene (DVB)) was placed into a solid phase synthesis tube and hydrated with dichloromethane (DCM) for 45 minutes. Then, DCM was replaced with a solution of 3 equivalents of aspartic acid (Fmoc-Asp(OtBu)-OH), 3 equivalents of N,N'-diisopropylcarbodiimide (DIC) and a catalytic quantity (12 mg) of 4-dimethylaminopyridine (DMAP) in N,N-dimethylformamide (DMF) and the tube was agitated for 3 hours. The resin was then washed three times with DMF and the recapping solution was added (10 equivalents of N,N-ethyldiisopropylamine (DIEA)

and 10 equivalents of acetic anhydride) and agitated for 1 hour. For the coupling of the next amino acids (histidine, leucine, aspartic acid, histidine and leucine), the four next steps were repeated : washing the resin 3 times with DMF, deprotection with a mix of 80% DMF and 20% piperidine for 30 minutes, washing 3 times with DMF and, finally, reaction with a solution of 3 equivalents of amino acid, 3 equivalents of N,N,N',N'-tetramethyl-O-(1H-benzotriazol-1-yl)uronium hexafluorophosphate (HBTU) and 6 equivalents of DIEA in DMF for 1 hour (or overnight for the last coupling step of a working day). Each coupling step was followed by a Kaiser test to ensure that the coupling was successful. After the amino acids couplings, 3-mercaptopropionic acid (3-MPA) was coupled with a solution of 2 equivalents of 3-MPA, 4 equivalents of DIEA and 2 equivalents of HBTU in DMF for 3 hours. The resin was then washed 3 times with DMF, 3 times with MeOH and 3 times with DCM to prepare it for the cleaving step. The peptide was then cleaved from the resin with a solution of 95% trifluoroacetic acid (TFA), 2.5% triethylsilane (TES) and 2.5% H₂O for 45 minutes and the acid was evaporated.

4.3.2 Sensor chip fabrication for metal chelation of His-tagged EcAII

Dove glass prisms were washed in piranha solution (3:1 sulfuric acid and hydrogen peroxide 30%) for one hour at room temperature. They were then rinsed at least 10 times with deionized water, until a pH paper indicated neutral. They were stored in ethanol until usage. To fabricate the sensor, the glass prisms were air dried and placed into a sputtering instrument (Cressington 308R sputter coater, Tel Pella Inc. Redding, CA) where approximately 0.7 nm (35 seconds) of chromium and 50 nm (1 minute and 40 seconds) of gold were deposited on the surface, with an argon pressure of 0.02 mbar and at a current of 80 mA, to form a continuous Au film. The gold-coated prisms were functionalized overnight (16 hours) in a 1 mg/mL solution of 3-MPA-Leu-His-Asp-Leu-His-Asp-COOH peptide in DMF to form a self-assembled monolayer. The prisms were rinsed with ethanol and dried with nitrogen. They were immersed sequentially in aqueous solutions (Milli-Q water) of 100 mM

N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) and 50 mM N-hydroxysuccinimide (NHS) for 15 min, 30 mM N α ,N α -bis(carboxymethyl)-L-lysine hydrate for 2 h, 1 M ethanolamine hydrochloride pH 8.5 for 15 min and 100 mM cobalt(II) sulfate heptahydrate for 2 h. The cobalt is chelated *via* the exposed carboxyl groups with open coordination for His-tag binding. The SPR sensors were rinsed with deionized water between each step. The functionalized prisms were kept in plastic petri dish under air atmosphere and covered with aluminum foil and were stable for more than 6 months. The sensors were very reproducible from batch to batch and offered the same SPR performances (%CV = 7%). The binding of the protein receptor was performed on-line⁶ for every experiment.

4.3.3 L-Asparaginase preparation

The native *E. coli* L-asparaginase II (EcAII) used in this study was the commercial therapeutic drug (Kidrolase[®], EUSA Pharma). The design and production of the *N*- and *C*-terminally His-tagged versions of recombinant EcAII developed for immobilization and SPR sensing were described in Charbonneau *et al.*²¹² (submitted for publication). Three His-tagged versions of EcAII were used: N21- and N26-EcAII which harbour 20 and 25 additional amino acids at the *N*-terminus, respectively, and C8-EcAII which exhibit eight additional amino acids at the *C*-terminus.

4.3.4 SPR experiments

The SPR instrument (Affinité Instruments) was described in a previous report²⁰⁷. The SPR sensors functionalized with the modified peptide were mounted in the SPR system with the microfluidic cell. The microfluidic design allowed for a triplicate measurement of the sample simultaneously with a measurement of a control. The first step of each experiment to quantify anti-asparaginase antibody (except for

⁶ The term "on-line" is the opposite of "off-line". Here, on-line means that the protein was attached to the surface in the same kinetic measurement that the rest of the experiment.

Kidrolase[®], see details in the next paragraph of this section) was to inject 1 mL of phosphate buffered saline (PBS) for 2 min to acquire a stable baseline, inject 0.4 mL of a solution of 0.1 mg/mL of His-tagged recombinant L-asparaginase for 20 min to allow the binding of the receptor to the SPR chip and rinse with 1 mL of PBS for 2 min. For experiments in human serum, 0.4 mL of blank human serum were injected for 10 min to passivate the surface and 0.4 mL of human serum spiked with anti-asparaginase were injected for 20 min to detect anti-asparaginase. The SPR shift was calculated with MATLAB[®] software as the difference between the equilibrated SPR shift of the binding step and the SPR shift measured during the first seconds of the same step to quantify the antibody concentration.

Kidrolase[®] receptor. When the Kidrolase[®] was used as a bioreceptor, the gold-coated prisms were incubated overnight with the 3-MPA-LHDLHD-OH solution as described earlier. After the rinsing and drying steps, the functionalized prism was mounted in the SPR instrument. The first steps of the analysis were to inject 1 mL of PBS for 2 min to acquire a stable baseline, 1 mL of a freshly mixed EDC/NHS solution (400 mM and 200 mM, respectively) for 5 min to activate the sensor, 1 mL of PBS pH 4.5 for 2 min and 1 mL of a 0.1 mg/mL Kidrolase solution in PBS buffer for 20 min, followed by the measurements as described above.

Calibration curves. The calibration curves for the comparison of the different receptors were prepared by sequentially injecting standard solutions, from the lowest to the highest concentration rabbit polyclonal anti-L-asparaginase antibody on a single sensor. The experiments were performed in triplicate on identically prepared SPR chips. For the final calibration curve in undiluted human serum using the N26-EcAII receptor, each standard was analysed separately in triplicate on identically prepared prisms. During all the experiments with human serum, the serum was never diluted nor pre-treated. For these experiments, the anti-asparaginase was resuspended in undiluted serum instead of PBS to avoid any dilution. The fluidic cell was washed with 0.1% Tween 20 in PBS between each experiment to remove any biological material remaining in the fluidics of the system.

4.3.5 Patients undergoing ALL treatment

Patients undergoing chemotherapy treatments for acute lymphoblastic leukemia (ALL) were treated at Sainte-Justine Hospital in Montreal according to the Dana-Farber Cancer Institute (DFCI) protocol' 05-001 or 11-001. They received L-asparaginase II or an alternative form of the drug. Serum samples were collected from patients at regular intervals during the treatment to observe the appearance of, or any variation in concentration of, anti-asparaginase antibodies upon repeated administrations of the drug. The analysis of 8 de-identified clinical samples is reported in this paper.

4.3.6 SPR analysis of clinical samples

The clinical samples were analysed exactly as were the spiked serum samples for the calibration curve, with the addition of a secondary detection step. The N26-EcAII receptor was used for the analysis of all clinical samples. After the 20 min incubation of the clinical sample, a vigorous washing step with 5 mL of PBS for 5 min was performed, followed by a 15 min incubation of 0.4 mL of a 78 nM solution of goat anti-human IgG (γ -chain specific)-HRP (Sigma-Aldrich cat no. A6029) in PBS and finally a 2 min rinse with PBS. The SPR shift between the last seconds of the secondary detection step and the first seconds of the same step was calculated with MATLAB® software to quantify the concentration of the antibody.

4.3.7 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Indirect ELISA measurements were performed as follows. Microplates (Nunc-Immuno plate, Thomas Scientific, cat no. 62409-50) were coated overnight at 4°C with 0.1 mL (10 μ g/mL) of native EcAII (Kidrolase®, EUSA Pharma) diluted in 0.05 M carbonate/bicarbonate pH 9.5. The ELISA assays were performed as in a previous report²⁰⁴, which was adapted from the following protocol²⁹. All further steps were at room temperature. After removing residual liquid from the wells, any unreacted sites were blocked by incubation with 0.3 mL PBS containing 0.05%

Tween-20 and 0.1% BSA for 90 min and washed 3 times with PBS/Tween-20. The negative control reference sera (samples from healthy children who had never received L-asparaginase) and serum samples from patients treated with native or PEGylated EcAII were diluted (1:400) in PBS (0.1 mL), added to the wells and incubated for 1 h. Each sample was analyzed in triplicate. The wells were washed 3 times with PBS/Tween-20 and then goat anti-human IgG (γ -chain specific)-HRP was added to wells (0.1 mL) at a dilution 1:10,000 (in PBS) and incubated for 1 h. After removing residual liquid, the wells were washed 4 times with PBS. A volume of 0.1 mL of freshly-made 0.4 mg/mL *o*-phenylenediamine dihydrochloride (OPD) in 0.1 M citrate buffer pH 6 containing 0.01% hydrogen peroxide was added and incubated for 30 min in the dark, after which the reaction was stopped by the addition of 0.1 mL of 1 M phosphoric acid. Formation of the orange-colored end-product (2, 3-diaminophenazine) was monitored by measuring the absorbance at 490 nm (specific absorption) following subtraction of the absorbance at 650 nm (non-specific). A sample was considered positive if $OD_{490} - OD_{650}$ was greater than 2.58 standard deviations above the mean value of the negative control.

4.4 RESULTS AND DISCUSSION

4.4.1 Design of the biosensor

The approach we used for the development of this SPR biosensor is similar to ELISA in that L-asparaginase served as the biological receptor. In contrast to ELISA, where L-asparaginase is non-specifically adsorbed on a surface and is thus non-oriented, orientation of the immobilized receptor was taken into consideration for the SPR sensor (see below). An additional advantage procured by SPR relative to ELISA is real-time monitoring. Non-specific binding is a key issue in SPR and can be reduced by use of appropriate surface chemistry, such as polymers or peptides^{50, 206}. Hence, the development of this biosensor initially focused on ensuring minimal nonspecific binding of human serum.

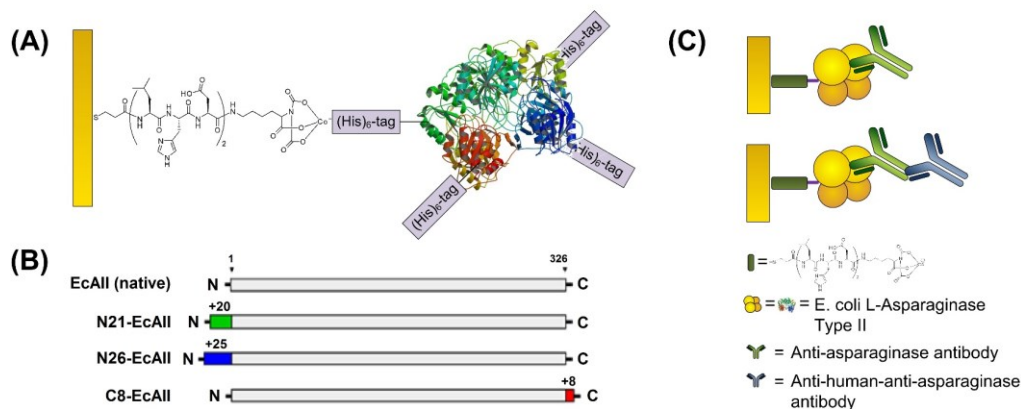


Figure 4.1 Anti-asparaginase biosensor (A) and scheme of the different L-asparaginase receptor constructions (B). Direct detection and secondary detection schemes for anti-L-asparaginase detection (C).

A self-assembled monolayer of a short peptide developed by our group was used since it has repeatedly proven its efficacy in reducing non-specific binding of serum^{87, 116, 207, 213}. The peptide is thiolated to allow the formation of a self-assembled monolayer on the gold sensor (Figure 4.1). Control experiments were performed to verify the sensor's efficiency in reducing nonspecific binding (Figure 4.6 in Supporting Information). To ensure that the measured shift was due to the binding of anti-L-asparaginase for the sequential calibration curves, sequential injections of blank serum were made. In Figure 4.6, we see a clear distinction between the SPR signal due to the anti-L-asparaginase and the one resulting from nonspecific binding, insuring that the SPR shift in the calibration curves is attributable to an antibody detection. We note that the nonspecific binding is very low for the first few injections, but it increases afterwards. This is a normal phenomenon attributable to the reduced performances of the anti-fouling properties of the SAM when some nonspecific material is adsorbed on the surface. For the point by point calibration curve, only one injection of serum was made, so the nonspecific binding was negligible, due to the anti-fouling SAM on the surface. For every experiment, an injection of blank serum was done in the reference channel to insure the anti-fouling properties of every chip.

The biological receptor was subjected to optimization. In ELISA assays, L-asparaginase is randomly adsorbed on the surface of the ELISA plate based on hydrophilic and hydrophobic interactions. As a result, a subset of receptors should be oriented in a manner that allows binding to the analyte (here, the anti-asparaginase antibodies), which may not lead to optimal sensitivity. Hence, three different constructions of His-tagged recombinant L-asparaginase were developed to orient the receptor by metal chelation on the surface and optimize sensitivity. These receptors were described in Charbonneau *et al.*²¹² The commercial Kidrolase® was also evaluated as a receptor. Since its binding to a surface cannot be oriented, it was covalently attached to the SPR surface in a non-oriented manner through EDC/NHS chemistry and served as a standard to compare SPR results with ELISA.

Binding of the His-tagged receptors to the cobalt-functionalized SPR surface was characterized to verify that oriented immobilization occurred by chelation of the His-tag rather than being randomly orientated like the covalently bound Kidrolase® receptor. Upon washing the biosensor with 5 M imidazole, the chelated His-tagged L-asparaginase variants were specifically released, while lower concentrations of imidazole were insufficient to displace the receptor from the surface (Figure 4.7 in Supporting Information). The biosensors were successfully regenerated by addition of His-tagged bioreceptor, confirming the specific binding of the receptors by chelation of the His-tag.

4.4.2 Quantification of anti-asparaginase antibodies buffer

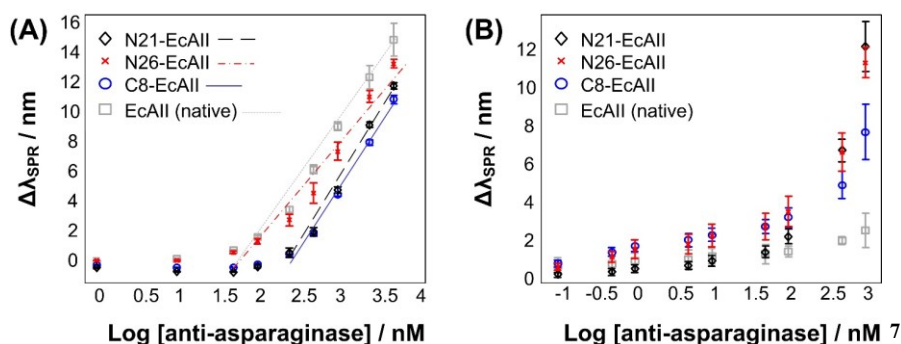


Figure 4.2 SPR calibration curves for the detection of rabbit anti-asparaginase in spiked PBS (A) and human serum (B).

Error bars represent the standard deviation from $n=3$ (A) and $n=9$ (B). N21-EcAII : $\Delta\lambda_{SPR} = 9.00 \log(C) - 21.78$, $R^2=0.99$, N26-EcAII : $\Delta\lambda_{SPR} = 6.63 \log(C) - 12.11$, $R^2=0.96$, C8-EcAII : $\Delta\lambda_{SPR} = 8.19 \log(C) - 19.83$, $R^2=0.99$, EcAII (native) : $\Delta\lambda_{SPR} = 7.38 \log(C) - 13.09$, $R^2=0.98$. Log(C) corresponds to the base 10 log of the concentration in nanomolar.

The four different versions of the L-asparaginase biological receptor were evaluated with respect to SPR sensing to determine the most sensitive immobilization strategy for the detection of the associated antibodies. The SPR sensing calibration curves for each biosensor were performed with commercial rabbit polyclonal anti-L-asparaginase antibody spiked in PBS (Figure 4.2A). Each SPR sensor was calibrated upon injection of increasing concentrations of antibody. The linearity and dynamic range for the four receptors were comparable. In the case of Kidrolase® and N26-EcAII, the limit of detection was 10 nM and the calibration curve was linear between 50 nM and at least 5 μ M (higher concentrations were not measured due to the available concentration of the antibody), with a standard deviation under 10% for Kidrolase and 15% for N26-EcAII. For C8-EcAII and N21-EcAII, the limit of detection was 250 nM and the calibration curves were linear between 250 nM and at least 5 μ M, with a standard deviation under 10% for C8-EcAII and 15% for N21-

⁷ Log [anti-asparaginase] / nM : Here, the units (nM) refer to the concentration of the anti-asparaginase before the logarithm was calculated.

EcAII. These results clearly showed the ability of the SPR sensor to quantify precisely low nanomolar concentrations of anti-asparaginase in saline solutions.

4.4.3 Quantification of anti-asparaginase antibodies in undiluted human serum

Calibration was performed in commercial undiluted human serum spiked with commercial rabbit polyclonal anti-L-asparaginase antibody (Figure 4.2B). The high-sensitivity detection range was displaced towards higher concentrations of antibody in serum relative to measurements made in PBS. Nonetheless, the response remained sufficiently high even at low concentrations, allowing the quantification in low nanomolar range and high nanomolar range. In this case, all three His-tagged version of recombinant EcAII receptors provided a detection range of low sensitivity between 0.5 and 100 nM of anti-asparaginase antibodies in undiluted human serum, while the high sensitivity range was between 100 nM and at least 1 μ M. In contrast, Kidrolase provided a sensitivity significantly lower than the different His-tagged versions of recombinant L-asparaginase (see Figure 4.2B). It was determined that the N26-EcAII receptor gave significantly more reproducible results than other receptors, with an average coefficient of variation (CV) of 4% in the high sensitivity range, compared to 12% for N21-EcAII, 21% for C8-EcAII, and 21% for Kidrolase. Accordingly, the N26-EcAII was selected for the detection and quantification of anti-asparaginase antibodies in human serum.

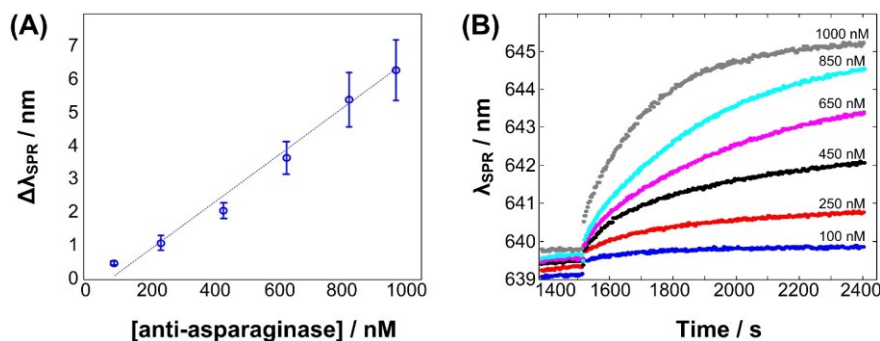


Figure 4.3 SPR calibration curves for the detection of rabbit anti-asparaginase with N26-EcAII receptor spiked undiluted human serum.

Every data point was measured on different SPR chips. Error bars represent the standard deviation on $n=9$. The corrected calibration curve shows the SPR signal from which was subtracted the nonspecific signal measured in the reference channel for every data point individually. (B) SPR sensorgrams for the detection of rabbit anti-asparaginase in spiked undiluted human serum with N26-EcAII receptor. Measured SPR signal: $\Delta\lambda_{\text{SPR}} = 0.0067 \log(C) - 0.1957$, $R^2=0.9887$, Corrected SPR signal: $\Delta\lambda_{\text{SPR}} = 0.0067 \log(C) - 0.5738$, $R^2=0.9857$. $\log(C)$ corresponds to the base 10 log of the concentration in nanomolar.

The first calibration of the sensor was performed with serial injection of increasing concentrations of anti-asparaginase on a single sensor chip to minimize the use of costly reagents (Figure 4.2B). However, this does not represent the standard practice for clinical measurements. Therefore, the SPR sensor was also calibrated point-by-point to represent the standard procedure for clinical samples analysis where a single sample will be analyzed per SPR chip (Figure 4.3). Each data point in this calibration curve represents triplicate measurements made on each of three different SPR sensors, performed on different days using freshly-made solutions. For every data point, a measurement of the nonspecific signal was performed in the reference channel of the instrument. This signal was subtracted in the corrected curve in Figure 4.3. The standard deviation for these experiments was under 15% for each antibody concentration tested, which is exceptional for SPR sensing analyses made in undiluted and untreated complex fluid. The sensitivity of this biosensor was 6.7 pm/nM. This optimized SPR biosensor was applied to the analysis of clinical serum samples.

4.4.4 Quantification of anti-asparaginase antibodies in clinical serum samples

The analysis of clinical samples is a common challenge in all sensing technologies. In this case, we set goals to perform the analysis in a short period of time, at low cost and with no sample pre-treatment except for the extraction of serum from whole blood. The clinical laboratory provided volumes of usually less than 500 μL , which provided enough material for a single measurement in the current experimental conditions. There was a great diversity between the clinical serum samples (different colors or opacity). These parameters can affect the SPR measurements due to the sensitivity of this technique to the solution refractive index and thus, can unexpectedly cause significant variations in the sensor response. We point out that the negative SPR shifts were attributable to the lower refractive index of some clinical samples compared to commercial serum used to passivate the sensors. The RI mismatch of different sera samples are an issue with plasmonic techniques and were at the origin of the negative SPR shifts.

We attempted direct detection of the anti-L-asparaginase with clinical samples as it requires the use of fewer reagents and less time than most detection methods. The SPR results obtained for clinical sera with the direct assay were compared with ELISA to verify the reliability of our technique with the gold standard used in hospital. The ELISA method was performed according to the “Boston protocol” of the Dana-Farber Cancer Institute, one of the few clinical biochemistry laboratories routinely testing for anti-L-asparaginase in ALL patients undergoing L-asparaginase therapy. To establish a comparison point, a threshold for the SPR measurements was determined by using the highest signal obtained for the blank samples (see the red line in Figure 4.4).

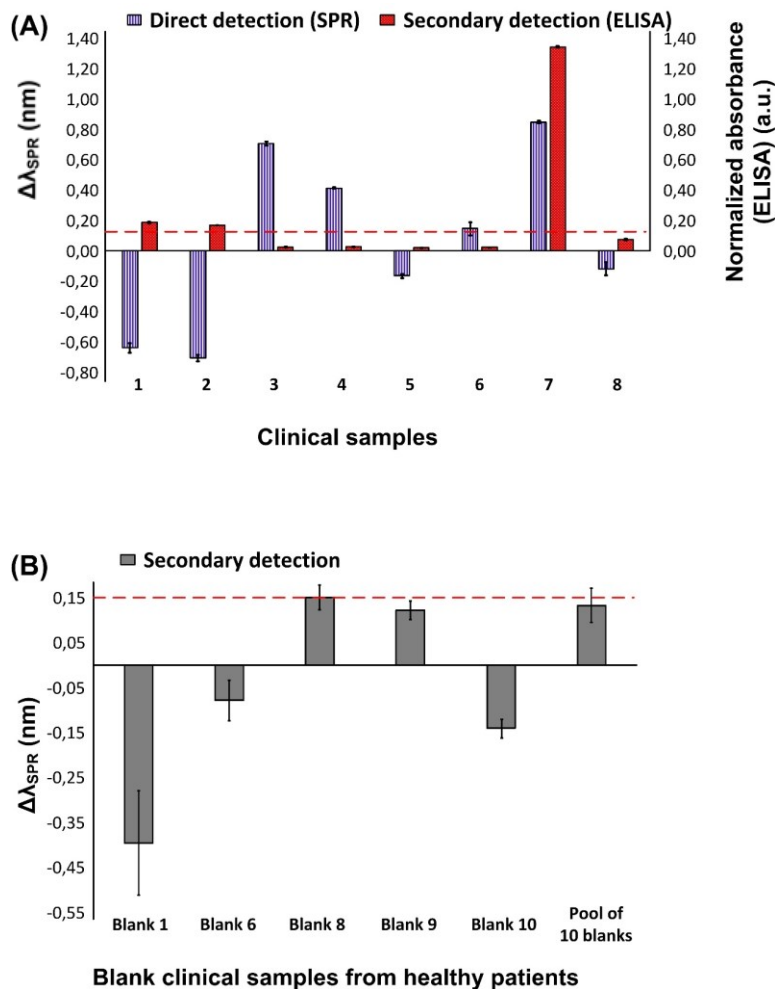


Figure 4.4 Comparison of the SPR and ELISA results of the detection of anti-asparaginase in clinical samples with direct and secondary detection (A) and SPR signal for the secondary detection of human anti-asparaginase antibodies in blank (B).

The SPR results for (A) were obtained for the direct measurement of human anti-asparaginase antibodies in undiluted clinical serum samples with N26-EcAII receptor, while the ELISA results were acquired for serum samples diluted 1:400 and using Kidrolase to capture human anti-asparaginase antibodies. samples. The threshold (red dashed line) is defined by the signal of the blank sample #8 (highest response) and is applied to the SPR results.

When the SPR signal from a clinical sample was above the threshold, it was considered as positive. We note that, in this study, a ‘positive’ sample means that it was considered as containing a significant amount of anti-asparaginase antibodies compared to the defined blank value (represented by the threshold), with no regards

to the clinical positivity determined by the Boston protocol. When a sample was positive according to both SPR and ELISA, we considered that the SPR result was reliable. A result was also considered reliable if it was negative⁸ according to both SPR and ELISA. The key factor here is that both methods had to give the same result when the signal was compared to the established threshold. We note that the threshold for determining a positive response served only to compare both methods, since it was based on the signal of the blank samples.

The sensor was calibrated with a single source of commercial, polyclonal anti-L-asparaginase that may not represent the diversity of antibodies expressed by individual patients. The immune response is different between patients. A broad range of antibody affinities may be expected in clinical samples, rendering the report of antibody concentration irrelevant. Therefore, the SPR output will be discussed in terms of SPR shift corresponding to the magnitude of change of the SPR response in the detection of anti-L-asparaginase. ELISA was performed with the same clinical samples as the SPR analysis (Figure 4.4A). Due to the extensive sample variation (opacity, color, etc.), the SPR results obtained with the direct assay showed significant divergence with ELISA and were thus deemed unreliable. In fact, only three samples out of eight correlated between ELISA and SPR. The variation of the bulk properties of clinical serum samples was confirmed with the results obtained for the blanks, which also showed significant variance in the SPR assay (Figure 4.4B). We note the inaccessibility to paired samples, where each test sample would be matched to a serum sample lacking the analyte. Such samples might allow direct detection.

⁸ Here, the word "negative" refers to negative in sense, such as a "negative result". It does not refer to negative in sign, such as "-x".

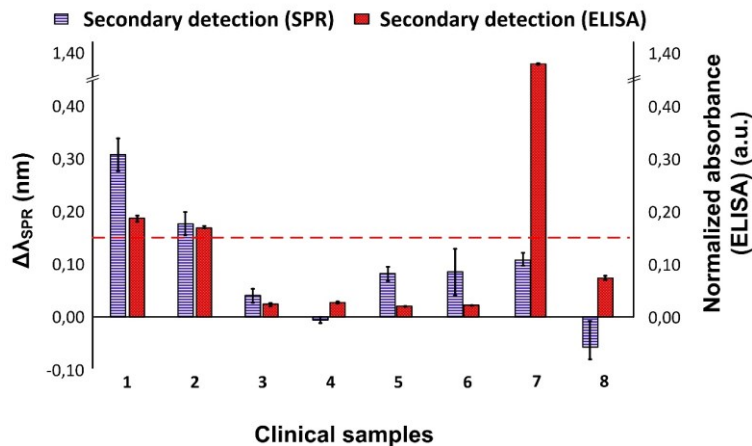


Figure 4.5 Comparison of the SPR and ELISA results.

The SPR results were obtained for the secondary detection of human anti-asparaginase antibodies in undiluted clinical serum samples. The ELISA results were acquired for serum samples diluted 1:400 and using Kidrolase to capture human anti-asparaginase antibodies. The threshold (red dashed line) is defined by the signal of the blank sample #8 (highest response) and is applied to the SPR results.

In reaction to these observations, the method was modified to eliminate the variability in the SPR signal resulting from bulk differences between clinical samples. We evaluated a secondary detection step to overcome the issue of variability without affecting assay sensitivity or sample preparation. The secondary antibody used was the same as for the ELISA assay (see Methods). Thereby, seven samples out of eight showed good agreement between SPR and ELISA (Figure 4.5). The mismatched sample (sample #7) might be due to the different orientation of L-asparaginase between the SPR sensor (oriented immobilization by terminal His-tags) and the ELISA plate (randomly oriented by surface adsorption). It is plausible that the antibodies expressed by this patient bind to a region of L-asparaginase unavailable in the direct or secondary detection for the SPR assay.

This observation raises the issue of current practices of optimizing sensors in pooled human serum for direct assays. We observed significant variation of the SPR response for the blanks and for the clinical samples using the direct assay, while the secondary assay was significantly better correlated with ELISA. This issue is

ubiquitous to all plasmonic platforms that are designed for monitoring analytes in clinical samples, a field that is increasingly popular. The variability of the samples resides in biological variance between patients and in differences in sample preparation or processing. Dilution of the samples might reduce the effect of sample-to-sample variability and provide an interesting solution to some of these issues. However, the observed response of the SPR sensor was only about 10-times greater than signal-to-noise and thus, dilution was not possible in this case. It has also been proposed to use the clinical sample depleted of the analyte as a reference for compensating the variance of the clinical sample ²¹⁴. In this process, a constant concentration of a reagent binding the analyte is supplemented to the serum samples to deplete the analyte concentration. While of great value for some assays, the use of this type of signal compensation was not optimal for our current assay design as the samples would have to be supplemented with a fixed value of L-asparaginase. The clinical samples contained an unknown concentration of L-asparaginase and thus, it would have been difficult to adjust to a uniform concentration. Biological variance is unavoidable in clinical samples ⁶⁷ and thus, secondary detection will most likely to be necessary for obtaining reliable clinical data for a series of plasmonic sensors.

The results obtained with this L-asparaginase biosensor are promising for clinical and point-of-care sensing of clinical samples using plasmonic technologies. Despite this success, there are still areas of improvement for plasmonic sensing of clinical samples. We observed that the selection of the biological receptor is of utmost importance. Multiple receptors, in different orientations, could be added on the surface to increase the probability of antibody recognition. In our case, Kidrolase was randomly oriented on the SPR chip using EDC-NHS chemistry, but the sensitivity of a SPR sensor modified with Kidrolase was significantly lower in crude serum than the other receptors tested. This limitation might be specific to Kidrolase such that a random orientation should still be considered in the future for other targets. Consequently, to develop a robust clinical sensor based on plasmonics and validate it for clinical use, it is clear that biological variation of the samples must be addressed in a robust manner, such as the secondary detection step we applied here, and a greater

pool of clinical samples (exceeding the scope of this study) will have to be analysed to confirm the trends observed in this study.

We also raise the issue of the optimization of a sensor for monitoring antibodies in clinical samples since patients may express unique antibodies leading to a plethora of different analytes with slight variations in affinity to detect. We lack a good standard for optimization due to the impossibility to purchase commercial antibodies representing the breadth of clinical samples. Hence, we optimize the sensor with a standard that represents a subset of analytes to be detected, and measuring concentration is challenging due to the different affinities of antibodies of individual patients. Reporting concentration is therefore impossible and we relied here on the absolute SPR signal to provide a measure of the presence of antibodies in clinical samples.

4.5 CONCLUSION

A SPR biosensor was successfully developed for monitoring anti-L-asparaginase in undiluted human serum of actual clinical samples. The biosensor combined peptide surface chemistry to reduce nonspecific binding in undiluted serum and a modified L-asparaginase receptor. A calibration curve allowed the quantification of antibodies in spiked undiluted human serum samples, with a limit of detection of 0.5 nM and a sensitivity of 6.7 pm/nM in the high sensitivity dynamic range (100 nM to 1 μ M) using the N26-EcAII His-tagged receptor. The biosensor was used to perform the analysis of anti-asparaginase antibodies produced as an immune reaction to therapeutic *E. coli* L-asparaginase in patients undergoing leukemia treatments. The challenges associated with biological variance of the serum samples of individual patients were minimized using a secondary detection step. Serum samples from these patients were analysed with the SPR biosensor and the results correlated well with ELISA. We report here one of the first studies with clinical data acquired using plasmonic sensors and correlated to ELISA, providing strong evidence that plasmonic sensors can be applied to clinical chemistry.

4.6 ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank financial support from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), the National Science and Engineering Research Council (NSERC) of Canada, and of the Canada Foundation for Innovation (CFI).

4.7 SUPPORTING INFORMATION

4.7.1 Reagents and biological compounds

The glass dove prisms were manufactured by Vy Optics (China). Sulfuric acid, hydrogen peroxide 30%, methylene chloride (DCM), methanol (MeOH) and N,N-dimethylformamide (DMF) were purchased from Fisher Scientific (Pittsburgh, PA). 3-mercaptopropionic acid (3-MPA), N,N'-diisopropylcarbodiimide (DIC), piperidine, acetic anhydride, trifluoroacetic acid (TFA), triethylsilane (TES), N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC), N-hydroxysuccinimide (NHS), Na,Na-bis(carboxymethyl)-L-lysine hydrate, ethanolamine hydrochloride, cobalt(II) sulfate heptahydrate and human serum (male AB plasma) were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO). N,N-ethyldiisopropylamine (DIEA) was purchased from Alfa Aesar (Ward Hill, MA). Leucine (Fmoc-Leu-OH), histidine (Fmoc-His(Trt)-OH), aspartic acid (Fmoc-Asp(OtBu)-OH) and hydroxymethyl polystyrene (100-200 mesh, 1% DVB) were purchased from EMD Millipore (Etobicoke, ON, Canada). 4-Dimethylaminopyridine (DMAP) was purchased from Acros Organics (Geel, Belgium). N,N,N',N'-tetramethyl-O-(1H-benzotriazol-1-yl)uronium hexafluorophosphate (HBTU) was purchased from ChemPep Inc. (Wellington, FL). Phosphate buffer saline (PBS) was purchased from Corning cellgro (Manassas, VA). Anti-rabbit polyclonal anti-L-asparaginase antibody was purchased lyophilized from Antibodies-Online (Atlanta, GA) (product number ABIN459219), resuspended in PBS and stored at -20°C. For the experiments in undiluted serum, the antibody was resuspended in undiluted serum when received lyophilized from the manufacturer and also stored at -20°C.

Kidrolase® was provided by Sainte-Justine Hospital (Montreal) who purchased it from EUSA Pharma (France).

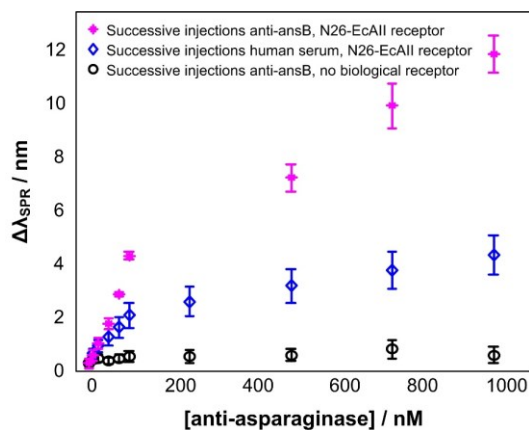


Figure 4.6 Non-specific binding control on different sensors compared to the anti-asparaginase SPR signal.

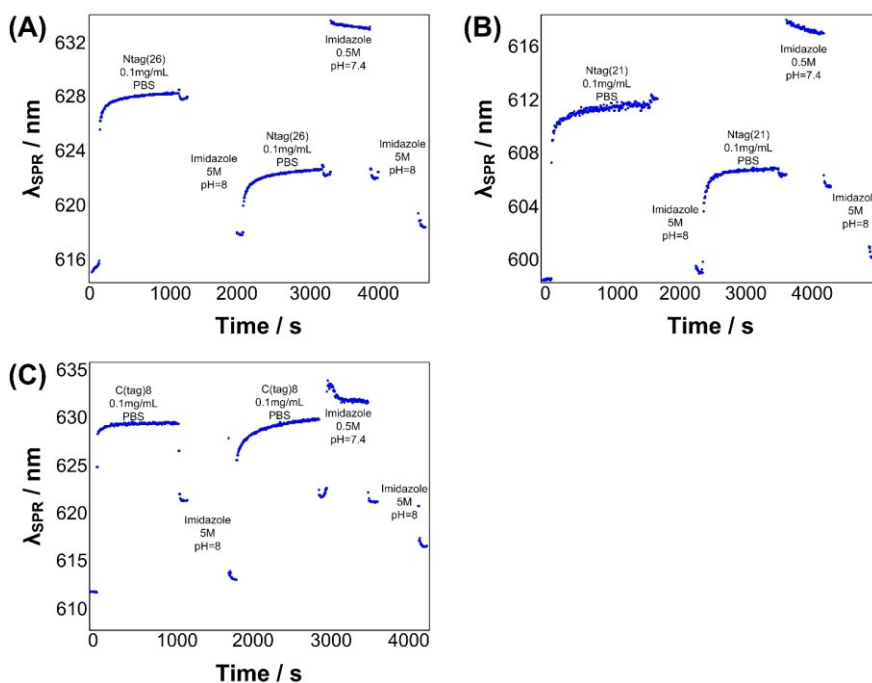


Figure 4.7 Washing and regeneration of the SPR sensor chip to confirm that the N(tag)26 (A), N(tag)21 (B) and C(tag)8 (C) receptor is bound by the His-tag on the surface.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les biocapteurs sont des outils analytiques puissants, pouvant être utilisés pour une multitude d'applications. Comme le démontre l'exemple bien connu du glucomètre, les biocapteurs peuvent être exploités dans le milieu médical. Toutefois, le besoin de développer des biocapteurs adaptés au milieu clinique actuel est encore bien présent. Malgré l'émergence de plusieurs nouvelles techniques analytiques performantes, le développement de biocapteurs est fréquemment effectué dans des matrices qui ne sont pas transposables au milieu clinique, où des échantillons de nature et de composition différentes font partie du quotidien. Les travaux rapportés dans cette thèse visaient à permettre le développement de méthodes analytiques adaptées au milieu clinique en fournissant la chimie de surface nécessaire à cette application. Aussi, afin de démontrer l'efficacité des surfaces développées, un biocapteur a été construit et utilisé pour la détection d'un biomarqueur de cancer du sein. Finalement, un biocapteur clinique a été développé afin de détecter une réaction allergique chez des patients atteints de leucémie.

Les premiers travaux effectués dans le cadre de cette thèse visaient à empêcher l'adsorption non-spécifique de lysat cellulaire sur des capteurs SPR. La SPR est une technique analytique pouvant être utilisée en matrices complexes telles que les fluides biologiques, mais le développement d'une chimie de surface appropriée est nécessaire pour l'utilisation de cette technique en milieu clinique. Par exemple, afin de poser un diagnostic de cancer, il est possible de prélever une biopsie de la tumeur, de procéder à la lyse des cellules et d'en analyser le contenu protéique et lipidique. Pour utiliser la SPR, il est nécessaire de réduire l'adsorption non-spécifique des molécules biologiques autres que le biomarqueur d'intérêt afin que son signal ne soit pas masqué par les interférences dues aux autres molécules en solution. Dans la littérature, très peu d'exemples de chimie de surface permettant la réduction de l'adsorption non-spécifique de lysat cellulaire sont donnés. De façon générale, certains polymères ont été utilisés, mais ils n'ont pas été développés spécifiquement pour le lysat cellulaire. Ainsi, la première partie de cette thèse qui consistait à développer de courts peptides

pouvant s'auto-assembler sur des surfaces d'or dans le but de réduire l'adsorption non-spécifique de lysat cellulaire apportait un tout volet nouveau à ce domaine.

Afin de cibler quelles propriétés physico-chimiques étaient les plus efficaces pour réduire l'adsorption non-spécifique de cette matrice biologique peu étudiée jusqu'ici, des homopeptides de différentes longueurs et polarité ont été synthétisés. En observant l'effet de l'hydrophobie des surfaces sur l'efficacité à réduire l'adsorption non-spécifique, il a été conclu que les surfaces hydrophobes étaient les plus appropriées pour leur utilisation dans le lysat cellulaire. Une fois cette observation faite, plusieurs combinaisons d'acides aminés ont été effectuées et comparées pour leur efficacité. Le peptide le plus efficace pour réduire l'adsorption non-spécifique de lysat cellulaire a été le 3-MPA-(His)₂(Leu)₂(Phe)₂-OH. Grâce à ce peptide, l'adsorption non-spécifique de lysat cellulaire a été réduite à $159 \pm 27 \text{ ng/cm}^2$, comparativement à $929 \pm 186 \text{ ng/cm}^2$ sur une surface d'or non protégée et $294 \pm 25 \text{ ng/cm}^2$ sur une monocouche commerciale reconnue pour son efficacité, le PEG. Suite à l'étude sur les capacités à réduire l'adsorption non-spécifique de lysat cellulaire, certaines monocouches ont été étudiées par spectrométrie de masse afin de comprendre quelle était la nature des molécules s'adsorbant non-spécifiquement. Cette étude a permis de d'observer que les principaux responsables de l'adsorption non-spécifique de lysat cellulaire sont les lipides. Cela a aussi permis de comprendre que les surfaces positivement chargées, telles que le peptide le plus efficace développé dans le cadre de cette thèse, avaient un bon potentiel pour repousser les agrégats de membrane cellulaire positivement chargés par répulsion électrostatique.

Bien que les peptides aient apporté une nette amélioration de performance par rapport au PEG commercial, l'adsorption non-spécifique de lysat cellulaire n'a pas été éliminée complètement. Cela a donc mené au second volet du projet, soit le développement de liquides ioniques. Grâce aux connaissances nouvellement acquises par l'étude en spectrométrie de masse, il a été possible de prévoir que des liquides ioniques hydrophobes seraient efficaces pour réduire l'adsorption non-spécifique de lysat cellulaire. Deux liquides ioniques ont été synthétisés, le

$[(HS)^{12}C_{12}(COOH)^2C_2im]^+ Br^-$ et le $[(HS)^{12}C_{12}(COOH)^5C_5im]^+ Br^-$. Ces deux liquides ioniques peuvent s'auto-assembler à la surface de capteurs SPR à l'aide d'un thiol. Ils permettent aussi l'ancrage d'un récepteur moléculaire grâce à leur groupement acide carboxylique. De plus, grâce à la métathèse de contre-anion pouvant s'effectuer facilement à la surface des capteurs SPR, quatre autres contre-ions (BF_4^- , PF_6^- , ClO_4^- et Nf_2^-) ont pu être étudiés pour leur effet sur les performances des liquides ioniques, sans besoin de recommencer la synthèse des liquides ioniques. De façon générale, les liquides ioniques étaient très efficaces pour réduire l'adsorption non-spécifique de lysat cellulaire, avec des couvertures de surface allant de 2 à 25 ng/cm^2 . Cette avancée est significative dans le domaine de la réduction de l'adsorption non-spécifique de lysat cellulaire et les liquides ioniques développés pourront être utilisés par d'autres chercheurs visant à développer de nouveaux biocapteurs dans cette matrice biologique complexe.

Puisque, dans le cadre de cette thèse, le développement de liquides ioniques visait à permettre le développement de biocapteurs en milieu clinique, le liquide ionique choisi comme étant le plus efficace devait permettre l'ancrage d'un récepteur moléculaire tel qu'un anticorps. Le liquide ionique retenu a donc été le $[(HS)^{12}C_{12}(COOH)^5C_5im]^+ Br^-$, avec une valeur de couverture de surface de $6 \pm 4 ng/cm^2$, soit une adsorption non-spécifique presque nulle. Il a été observé qu'une chaîne de carbone trop courte entre l'acide carboxylique terminal du liquide ionique et le noyau imidazolium empêchait un anticorps de se lier à la surface car les interactions électrostatiques entre les deux fonctions de charges opposées sont trop fortes.

Par la suite, le liquide ionique a été utilisé dans le développement d'un biocapteur de HER2, un biomarqueur présent dans 20 à 30% des cancers du sein. Le biomarqueur a pu être détecté directement dans du lysat cellulaire non dilué grâce à une détection par un anticorps secondaire. Deux lysats cellulaires différents ont été utilisés : un lysat naturellement exempt de HER2 servant de référence et de contrôle lorsqu'il était dopé avec le biomarqueur et un lysat contenant naturellement du HER2.

Le biomarqueur a pu être détecté grâce au nouveau biocapteur développé dans les deux lysats où du HER2 était présent, démontrant ainsi le potentiel de ce liquide ionique pour le développement de biocapteurs clinique.

Le second volet de cette thèse visait à développer un réel biocapteur clinique, afin de démontrer le potentiel de la SPR pour de telles analyses. En effet, peu d'exemples d'applications cliniques de biocapteurs sont rapportés dans la littérature. Il est fréquent que le développement soit effectué dans un laboratoire, mais qu'aucun échantillon clinique ne soit analysé. Ainsi, dans le cadre de cette thèse, un biocapteur permettant de détecter l'anti-asparaginase a été développé et l'analyse d'échantillons cliniques non dilués a été effectuée. L'anti-asparaginase est un anticorps produit par certains patients atteints de leucémie lorsqu'ils reçoivent un médicament appelé L-asparaginase. Ce médicament de source bactérienne occasionne fréquemment des réactions immunitaires, parfois asymptomatiques. L'apparition des anticorps dans le sang des patients indique que le traitement doit être modifié car une réaction allergique peut être dangereuse pour le patient et nuire au traitement.

Le biocapteur a été construit en utilisant un peptide efficace contre l'adsorption non-spécifique de sérum développé par Olivier Bolduc⁴⁹. Le récepteur biologique utilisé était la L-asparaginase elle-même, sur laquelle des groupements histidines avaient été attachés pour permettre sa fixation à la surface du capteur SPR par l'interaction avec un complexe de cobalt. Une optimisation du récepteur moléculaire a d'abord eu lieu, menant à l'observation que le récepteur avec la plus longue chaîne histidine positionnée sur le groupement N-terminal offrait la meilleure limite de détection en sérum. Le biocapteur optimisé a permis la détection des anticorps anti-asparaginase dans des échantillons cliniques de sérum non dilué de patients leucémiques. La méthode a été validée par la comparaison des résultats obtenus en SPR avec les résultats obtenus par ELISA. Sur un total de 8 échantillons cliniques analysés, 7 concordaient avec les résultats obtenus en ELISA.

La transposition de la méthode d'analyse développée en laboratoire avec une matrice commerciale à l'analyse d'échantillons cliniques réels a permis de mieux comprendre les défis associés au développement d'une telle méthode. Les variations entre les échantillons cliniques rendent l'analyse SPR directe peu réaliste car l'indice de réfraction du sérum de chaque patient est différent. Il a donc été conclu que, pour le développement d'une méthode analytique en fluide biologique non dilués, la détection secondaire était nécessaire. Ces conclusions seront utiles aux autres chercheurs souhaitant apporter leur méthode au milieu clinique car peu d'études du même type ont été rapportées dans la littérature jusqu'à ce jour.

Les perspectives sont nombreuses pour la suite des projets amorcés dans le cadre de cette thèse. La chimie de surface développée peut maintenant être utilisée par d'autres chercheurs dans le développement de biocapteurs en lysat cellulaire. Par exemple, afin de diagnostiquer le cancer du poumon ou le cancer colorectal, une biopsie pourrait être effectuée et les cellules lysées puis analysées par SPR. Dans le développement de tels biocapteurs, l'utilisation du liquide ionique serait nécessaire afin d'empêcher l'adsorption non-spécifique de lysat cellulaire.

Dans un sens plus large, les liquides ioniques développés ne sont pas limités qu'à la construction de biocapteurs. Ils peuvent aussi être utilisés en tant que matériel antiadhésif dans tous les appareils où sont utilisées des cellules. Par exemple, dans les bioréacteurs utilisés pour la production à grande échelle de protéines thérapeutiques et de vaccins, les liquides ioniques pourraient empêcher les cellules d'adhérer aux parois afin de s'assurer que toutes les cellules sont en solution et soient cultivées dans les mêmes conditions. Cela faciliterait aussi le nettoyage des réacteurs. Les liquides ioniques étant très stables et plutôt simples à produire, leur potentiel d'application industriel est bien réel.

Les perspectives apportées par le projet de développement d'un biocapteur pour l'anti-asparaginase sont plus à court terme. Puisque l'étude n'a été effectuée que sur un petit nombre d'échantillons cliniques, un nombre d'échantillons plus grand devra être analysé afin de valider l'étude. Par la suite, un appareil SPR tel que celui utilisé dans notre groupe de recherche pourra être implanté à l'hôpital Sainte-Justine afin de faire le suivi serré de la présence d'anticorps dans le sang des patients leucémiques soignés avec la L-asparaginase. Un tel appareil pourrait permettre au personnel de l'hôpital d'effectuer les analyses eux-mêmes et, ainsi, d'avoir les résultats beaucoup plus rapidement. Néanmoins, les notions acquises durant ces travaux, tels que les difficultés associées au transfert de méthode entre le laboratoire universitaire et le milieu clinique, ainsi que le moyen de contourner ces difficultés, pourront être utiles aux chercheurs souhaitant développer n'importe quel biocapteur clinique.

En bref, les travaux présentés dans cette thèse s'insèrent dans un contexte de développement de nouvelles méthodologies analytiques, principalement pour le développement de biocapteurs cliniques. Les avantages de l'utilisation de la SPR ont été démontrés tout au long de cette thèse. La combinaison de cet outil analytique avec la chimie de surface nouvellement développée permettra aux futurs chercheurs d'avoir les outils nécessaires au développement de nouveaux biocapteurs, robustes et fiables, pouvant être utilisées dans des matrices biologiques complexes.

BIBLIOGRAPHIE

1. Cancer-Research-Society http://www.crs-src.ca/page.aspx?pid=637&_ga=1.200275371.409427945.1473778651.
2. PubMed.org <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=cancer>.
3. Canadian-Cancer-Society <http://www.cancer.ca/>.
4. American-Cancer-Society Cancer Statistics. <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/statistics>.
5. Henry, N. L.; Hayes, D. F., Cancer biomarkers. *Molecular Oncology* **2012**, 6 (2), 140-146.
6. Hayes, D. F., Biomarker validation and testing. *Molecular Oncology* **2015**, 9 (5), 960-966.
7. Qureshi, A.; Gurbuz, Y.; Niazi, J. H., Label-free capacitance based aptasensor platform for the detection of HER2/ErbB2 cancer biomarker in serum. *Sensors and Actuators B-Chemical* **2015**, 220, 1145-1151.
8. Diaconu, I.; Cristea, C.; Hârceagă, V.; Marrazza, G.; Berindan-Neagoe, I.; Săndulescu, R., Electrochemical immunosensors in breast and ovarian cancer. *Clinica Chimica Acta* **2013**, 425, 128-138.
9. Ludovini, V.; Gori, S.; Colozza, M.; Pistola, L.; Rulli, E.; Floriani, I.; Pacifico, E.; Tofanetti, F. R.; Sidoni, A.; Basurto, C.; Rulli, A.; Crino, L., Evaluation of serum HER2 extracellular domain in early breast cancer patients: correlation with clinicopathological parameters and survival. *Annals of Oncology* **2008**, 19 (5), 883-890.
10. National-Cancer-Institute <https://www.cancer.gov>.
11. Pui, C. H.; Robison, L. L.; Look, A. T., Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* **2008**, 371 (9617), 1030-1043.
12. Inaba, H.; Greaves, M.; Mullighan, C. G., Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* **2013**, 381 (9881), 1943-1955.
13. Kidd, J. G., Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by means of normal guinea pig serum. *Journal of Experimental Medicine* **1953**, 98 (6), 565-&.
14. Broome, J. D., Evidence that L-asparaginase activity of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects. *Nature* **1961**, 191 (479), 1114-&.
15. Broome, J. D., Evidence that L-asparaginase activity of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects. I. Properties of L-asparaginase of guinea pig serum in relation to those of antilymphoma substance. *Journal of Experimental Medicine* **1963**, 118 (1), 99-&.
16. Old, L. J.; Boyse, E. A.; Campbell, H. A.; Daria, G. M., Leukaemia-inhibiting properties and L-asparaginase activity of sera from certain south american rodents. *Nature* **1963**, 198 (488), 801-&.
17. Mashburn, L. T.; Wriston, J. C., Tumor inhibitory effect of L-asparaginase from Escherichia coli. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1964**, 105 (2), 450-&.
18. Oettgen, H. F.; Old, L. J.; Boyse, E. A.; Campbell, H. A.; Philips, F. S.; Clarkson, B. D.; Tallal, L.; Leeper, R. D.; Schwartz, M. K.; Kim, J. H., Inhibition of leukemias in man by L-asparaginase. *Cancer Research* **1967**, 27 (12P1), 2619-&.
19. Hill, J. M.; Roberts, J.; Loeb, E.; Khan, A.; Maclellan, A.; Hill, R. W., L-asparaginase therapy for leukemia and other malignant neoplasms - remission in human leukemia. *Journal of the American Medical Association* **1967**, 202 (9), 882-+.

20. Dekking, S. A. S.; van der Graaf, R.; de vries, M. C.; Bierings, M. B.; van Delden, J. J. M.; Kodish, E.; Lantos, J. D., Is a New Protocol for Acute Lymphoblastic Leukemia Research or Standard Therapy? *Pediatrics* **2015**, *136* (3), 566-570.
21. Hough, R.; Rowntree, C.; Goulden, N.; Mitchell, C.; Moorman, A.; Wade, R.; Vora, A., Efficacy and toxicity of a paediatric protocol in teenagers and young adults with Philadelphia chromosome negative acute lymphoblastic leukaemia: results from UKALL 2003. *British Journal of Haematology* **2016**, *172* (3), 439-451.
22. Sunami, S.; Sekimizu, M.; Takimoto, T.; Mori, T.; Mitsui, T.; Fukano, R.; Saito, A. M.; Watanabe, T.; Ohshima, K.; Fujimoto, J.; Nakazawa, A.; Kobayashi, R.; Horibe, K.; Tsurusawa, M.; Japanese Pediat, L.-L., Prognostic Impact of Intensified Maintenance Therapy on Children With Advanced Lymphoblastic Lymphoma: A Report From the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group ALB-NHL03 Study. *Pediatric Blood & Cancer* **2016**, *63* (3), 451-457.
23. Matloub, Y.; Stork, L.; Asselin, B.; Hunger, S. P.; Borowitz, M.; Jones, T.; Bostrom, B.; Gastier-Foster, J. M.; Heerema, N. A.; Carroll, A.; Winick, N.; Carroll, W. L.; Camitta, B.; Devidas, M.; Gaynon, P. S., Outcome of Children with Standard-Risk T-Lineage Acute Lymphoblastic Leukemia-Comparison among Different Treatment Strategies. *Pediatric Blood & Cancer* **2016**, *63* (2), 255-261.
24. Place, A. E.; Stevenson, K. E.; Vrooman, L. M.; Harris, M. H.; Hunt, S. K.; O'Brien, J. E.; Supko, J. G.; Asselin, B. L.; Athale, U. H.; Clavell, L. A.; Cole, P. D.; Kelly, K. M.; Laverdiere, C.; Leclerc, J. M.; Michon, B.; Schorin, M. A.; Welch, J. J. G.; Lipshultz, S. E.; Kutok, J. L.; Blonquist, T. M.; Neuberg, D. S.; Sallan, S. E.; Silverman, L. B., Intravenous pegylated asparaginase versus intramuscular native Escherichia coli L-asparaginase in newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukaemia (DFCI 05-001): a randomised, open-label phase 3 trial. *Lancet Oncology* **2015**, *16* (16), 1677-1690.
25. Yadav, S.; Verma, S. K.; Singh, J.; Kumar, A., Industrial Production and Clinical Application of L-Asparaginase: A Chemotherapeutic Agent. *International Journal of Medical, Health, Biomedical, Bioengineering and Pharmaceutical Engineering* **2014** *8*(1), 54-60.
26. Asselin, B. L., L-Asparaginase for Treatment of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: What Have We Learned? (Commentary on Schrey et al., page 378). *Pediatric Blood & Cancer* **2011**, *57* (3), 357-358.
27. Avramis, V. I.; Tiwari, P. N., Asparaginase (native ASNase or pegylated ASNase) in the treatment of acute lymphoblastic leukemia. *International Journal of Nanomedicine* **2006**, *1* (3), 241-254.
28. Strullu, M.; Corradini, N.; Audrain, M.; Orsonneau, J. L.; Bouige, D.; Thomare, P.; Vermot-Desroches, C.; Mansuy, A.; Legrand, A.; Roze, J. C.; Mohty, M.; Mechinaud, F., Silent hypersensitivity to Escherichia coli asparaginase in children with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia & Lymphoma* **2010**, *51* (8), 1464-1472.
29. Wang, B.; Hak, L. J.; Relling, M. V.; Pui, C. H.; Woo, M. H.; Storm, M. C., ELISA to evaluate plasma anti-asparaginase IgG concentrations in patients with acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Immunological Methods* **2000**, *239* (1-2), 75-83.
30. Voller, A.; Bartlett, A.; Bidwell, D. E., Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. *Journal of Clinical Pathology* **1978**, *31* (6), 507-520.
31. Engvall, E.; Perlmann, P., Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin-G. *Immunochemistry* **1971**, *8* (9), 871-&.
32. Gauchez, A. S.; Ravanel, N.; Villemain, D.; Brand, F. X.; Pasquier, D.; Payan, R.; Mousseau, M., Evaluation of a Manual ELISA Kit for Determination of HER2/neu in Serum of Breast Cancer Patients. *Anticancer Research* **2008**, *28* (5B), 3067-3073.

33. Meenakshi, A.; Kumar, R. S.; Kumar, N. S., ELISA for quantitation of serum C-erbB-2 oncoprotein in breast cancer patients. *Journal of Immunoassay & Immunochemistry* **2002**, *23* (3), 293-305.
34. Gauglitz, G., Direct optical detection in bioanalysis: an update. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2010**, *398* (6), 2363-2372.
35. Turner, A. P. F. Biosensors and Bioelectronics. <http://www.journals.elsevier.com/biosensors-and-bioelectronics>.
36. Phillips, K. S.; Cheng, Q., Recent advances in surface plasmon resonance based techniques for bioanalysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2007**, *387* (5), 1831-1840.
37. Zeindleberhart, E.; Jungblut, P.; Otto, A.; Rabes, H. M., Characterization and analysis of tumor-associated protein variants from chemically induced rat hepatomas. In *Proceedings of the German Society for Pathology, 78th Meeting: Molecular Pathology*, Kloppel, G., Ed. 1994; Vol. 78, pp 380-380.
38. Kretschmann, E.; Raether, H., Plasma resonance emission in solids. *Zeitschrift Fur Naturforschung Part a-Astrofysik Physik Und Physikalische Chemie* **1968**, *A 23* (4), 615-+.
39. Gauglitz, G., Point-of-Care Platforms. In *Annual Review of Analytical Chemistry, Vol 7*, Cooks, R. G.; Pemberton, J. E., Eds. 2014; Vol. 7, pp 297-315.
40. Homola, J., Present and future of surface plasmon resonance biosensors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2003**, *377* (3), 528-539.
41. Homola, J.; Yee, S. S.; Gauglitz, G., Surface plasmon resonance sensors: review. *Sensors and Actuators B-Chemical* **1999**, *54* (1-2), 3-15.
42. Sharsfoort, R. B. M.; Tudos, A. J., *Handbook of Surface Plasmon Resonance*. Royal Society of Chemistry: 2008.
43. Abdulhalim, I.; Zourob, M.; Lakhtakia, A., Surface plasmon resonance for biosensing: A mini-review. *Electromagnetics* **2008**, *28* (3).
44. 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. *Analytical Chemistry* **2013**, *85* (12), 5770-5777.
45. Ulman, A., Formation and structure of self-assembled monolayers. *Chemical Reviews* **1996**, *96* (4), 1533-1554.
46. Poirier, G. E., Characterization of organosulfur molecular monolayers on Au(111) using scanning tunneling microscopy. *Chemical Reviews* **1997**, *97* (4), 1117-1127.
47. Pensa, E.; Cortes, E.; Corthey, G.; Carro, P.; Vericat, C.; Fonticelli, M. H.; Benitez, G.; Rubert, A. A.; Salvarezza, R. C., The Chemistry of the Sulfur-Gold Interface: In Search of a Unified Model. *Accounts of Chemical Research* **2012**, *45* (8), 1183-1192.
48. Yuan, Y.; Lee, T. R., Contact Angle and Wetting Properties. In *Surface Science Techniques*, Bracco, G.; Holst, B., Eds. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2013; pp 3-34.
49. Bolduc, O. R. Monocouches peptidiques auto-assemblées et applications dans le domaine des biocapteurs de résonance de plasmon de surfaces. Université de Montréal, Montréal, 2011.
50. Blaszykowski, C.; Sheikh, S.; Thompson, M., A survey of state-of-the-art surface chemistries to minimize fouling from human and animal biofluids. *Biomaterials Science* **2015**, *3* (10), 1335-1370.
51. Ladd, J.; Zhang, Z.; Chen, S.; Hower, J. C.; Jiang, S., Zwitterionic Polymers Exhibiting High Resistance to Nonspecific Protein Adsorption from Human Serum and Plasma. *Biomacromolecules* **2008**, *9* (5), 1357-1361.
52. Rodriguez-Emmenegger, C.; Decker, A.; Surman, F.; Preuss, C. M.; Sedlakova, Z.; Zydziak, N.; Barner-Kowollik, C.; Schwartz, T.; Barner, L., Suppressing Pseudomonas

aeruginosa adhesion via non-fouling polymer brushes. *Rsc Advances* **2014**, *4* (110), 64781-64790.

53. Ma, H.; Hyun, J.; Stiller, P.; Chilkoti, A., "Non-Fouling" Oligo(ethylene glycol)-Functionalized Polymer Brushes Synthesized by Surface-Initiated Atom Transfer Radical Polymerization. *Advanced Materials* **2004**, *16* (4), 338-341.

54. Gautrot, J. E.; Trappmann, B.; Ocegüera-Yanez, F.; Connelly, J.; He, X.; Watt, F. M.; Huck, W. T. S., Exploiting the superior protein resistance of polymer brushes to control single cell adhesion and polarisation at the micron scale. *Biomaterials* **2010**, *31* (18), 5030-5041.

55. Chen, H.; Zhang, M.; Yang, J.; Zhao, C.; Hu, R.; Chen, Q.; Chang, Y.; Zheng, J., Synthesis and Characterization of Antifouling Poly(N-acryloylaminoethoxyethanol) with Ultralow Protein Adsorption and Cell Attachment. *Langmuir* **2014**, *30* (34), 10398-10409.

56. 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. *Analytical Chemistry* **2009**, *81* (16), 6779-6788.

57. Zhang, Z.; Zhang, M.; Chen, S.; Horbett, T. A.; Ratner, B. D.; Jiang, S., Blood compatibility of surfaces with superlow protein adsorption. *Biomaterials* **2008**, *29* (32), 4285-4291.

58. Rodríguez-Emmenegger, C.; Kylián, O.; Houska, M.; Brynda, E.; Artemenko, A.; Kousal, J.; Alles, A. B.; Biederman, H., Substrate-Independent Approach for the Generation of Functional Protein Resistant Surfaces. *Biomacromolecules* **2011**, *12* (4), 1058-1066.

59. Kostina, N. Y.; Rodríguez-Emmenegger, C.; Houska, M.; Brynda, E.; Michálek, J., Non-fouling Hydrogels of 2-Hydroxyethyl Methacrylate and Zwitterionic Carboxybetaine (Meth)acrylamides. *Biomacromolecules* **2012**, *13* (12), 4164-4170.

60. Rodríguez Emmenegger, C.; Brynda, E.; Riedel, T.; Sedlakova, Z.; Houska, M.; Alles, A. B., Interaction of Blood Plasma with Antifouling Surfaces. *Langmuir* **2009**, *25* (11), 6328-6333.

61. Cheng, G.; Li, G.; Xue, H.; Chen, S.; Bryers, J. D.; Jiang, S., Zwitterionic carboxybetaine polymer surfaces and their resistance to long-term biofilm formation. *Biomaterials* **2009**, *30* (28), 5234-5240.

62. Vaisocherová, H.; Yang, W.; Zhang, Z.; Cao, Z.; Cheng, G.; Piliarik, 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. *Analytical Chemistry* **2008**, *80* (20), 7894-7901.

63. Brault, N. D.; White, A. D.; Taylor, A. D.; Yu, Q.; Jiang, S., Directly Functionalizable Surface Platform for Protein Arrays in Undiluted Human Blood Plasma. *Anal. Chem.* **2013**, *85* (3), 1447-1453.

64. Yang, W.; Xue, H.; Li, W.; Zhang, J.; Jiang, S., Pursuing "Zero" Protein Adsorption of Poly(carboxybetaine) from Undiluted Blood Serum and Plasma. *Langmuir* **2009**, *25* (19), 11911-11916.

65. Vaisocherová, H.; Ševců, V.; Adam, P.; Špačková, B.; Hegnerová, K.; de los Santos Pereira, A.; Rodríguez-Emmenegger, C.; Riedel, T.; Houska, M.; Brynda, E.; Homola, J., Functionalized ultra-low fouling carboxy- and hydroxy-functional surface platforms: functionalization capacity, biorecognition capability and resistance to fouling from undiluted biological media. *Biosensors and Bioelectronics* **2014**, *51*, 150-157.

66. Cao, B.; Li, L.; Tang, Q.; Cheng, G., The impact of structure on elasticity, switchability, stability and functionality of an all-in-one carboxybetaine elastomer. *Biomaterials* **2013**, *34* (31), 7592-7600.

67. Pereira, A. d. I. S.; Rodriguez-Emmenegger, C.; Surman, F.; Riedel, T.; Alles, A. B.; Brynda, E., Use of pooled blood plasmas in the assessment of fouling resistance. *RSC Advances* **2014**, *4* (5), 2318-2321.
68. Zhao, C.; Li, L.; Wang, Q.; Yu, Q.; Zheng, J., Effect of Film Thickness on the Antifouling Performance of Poly(hydroxy-functional methacrylates) Grafted Surfaces. *Langmuir* **2011**, *27* (8), 4906-4913.
69. Zhao, C.; Li, L.; Zheng, J., Achieving Highly Effective Nonfouling Performance for Surface-Grafted Poly(HPMA) via Atom-Transfer Radical Polymerization. *Langmuir* **2010**, *26* (22), 17375-17382.
70. Zhao, C.; Zheng, J., Synthesis and Characterization of Poly(N-hydroxyethylacrylamide) for Long-Term Antifouling Ability. *Biomacromolecules* **2011**, *12* (11), 4071-4079.
71. Zhao, C.; Chen, Q.; Patel, K.; Li, L.; Li, X.; Wang, Q.; Zhang, G.; Zheng, J., Synthesis and characterization of pH-sensitive poly(N-2-hydroxyethyl acrylamide)-acrylic acid (poly(HEAA/AA)) nanogels with antifouling protection for controlled release. *Soft Matter* **2012**, *8* (30), 7848-7857.
72. Yang, J.; Zhang, M.; Chen, H.; Chang, Y.; Chen, Z.; Zheng, J., Probing the Structural Dependence of Carbon Space Lengths of Poly(N-hydroxyalkyl acrylamide)-Based Brushes on Antifouling Performance. *Biomacromolecules* **2014**, *15* (8), 2982-2991.
73. Liu, Q.; Singh, A.; Lalani, R.; Liu, L., Ultralow Fouling Polyacrylamide on Gold Surfaces via Surface-Initiated Atom Transfer Radical Polymerization. *Biomacromolecules* **2012**, *13* (4), 1086-1092.
74. 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* (15), 3142-3148.
75. Zou, Q. J.; Kegel, L. L.; Booksh, K. S., Electrografted Diazonium Salt Layers for Antifouling on the Surface of Surface Plasmon Resonance Biosensors. *Analytical Chemistry* **2015**, *87* (4), 2488-2494.
76. Lin, S. H.; Zhang, B.; Skoumal, M. J.; Ramunno, B.; Li, X. P.; Wesdemiotis, C.; Liu, L. Y.; Jia, L., Antifouling Poly(beta-peptoid)s. *Biomacromolecules* **2011**, *12* (7), 2573-2582.
77. Vaisocherova, H.; Sipova, H.; Visova, I.; Bockova, M.; Springer, T.; Ermini, M. L.; Song, X.; Krejcik, Z.; Chrastinova, L.; Pastva, O.; Pimkova, K.; Merkerova, M. D.; Dyr, J. E.; Homola, J., Rapid and sensitive detection of multiple microRNAs in cell lysate by low-fouling surface plasmon resonance biosensor. *Biosensors & Bioelectronics* **2015**, *70*, 226-231.
78. Benjamin, C. J.; Wright, K. J.; Hyun, S. H.; Krynski, K.; Yu, G. M.; Bajaj, R.; Guo, F.; Stauffacher, C. V.; Jiang, W.; Thompson, D. H., Nonfouling NTA-PEG-Based TEM Grid Coatings for Selective Capture of Histidine-Tagged Protein Targets from Cell Lysates. *Langmuir* **2016**, *32* (2), 551-559.
79. Ajikumar, P. K.; Kiat, J.; Tang, Y. C.; Lee, J. Y.; Stephanopoulos, G.; Too, H. P., Carboxyl-terminated dendrimer-coated bioactive interface for protein microarray: High-sensitivity detection of antigen in complex biological samples. *Langmuir* **2007**, *23* (10), 5670-5677.
80. Ajikumar, P. K.; Ng, J. K.; Lee, J. Y.; Stephanopoulos, G.; Too, H. P.; Lim, W. P., *Nanostructured dendrimer modified glass surfaces for protein microarray*. 2007; Vol. 6, p 161-165.
81. Brueggemeier, S. B.; Wu, D.; Kron, S. J.; Palecek, S. P., Protein-acrylamide copolymer hydrogels for array-based detection of tyrosine kinase activity from cell lysates. *Biomacromolecules* **2005**, *6* (5), 2765-2775.

82. Kyo, M.; Usui-Aoki, K.; Koga, H., Label-free detection of proteins in crude cell lysate with antibody arrays by a surface plasmon resonance imaging technique. *Analytical Chemistry* **2005**, *77* (22), 7115-7121.
83. Luk, Y. Y.; Tingey, M. L.; Hall, D. J.; Israel, B. A.; Murphy, C. J.; Bertics, P. J.; Abbott, N. L., Using liquid crystals to amplify protein-receptor interactions: Design of surfaces with nanometer-scale topography that present histidine-tagged protein receptors. *Langmuir* **2003**, *19* (5), 1671-1680.
84. Nagasaki, Y.; Kobayashi, H.; Katsuyama, Y.; Jomura, T.; Sakura, T., Enhanced immunoresponse of antibody/mixed-PEG co-immobilized surface construction of high-performance immunomagnetic ELISA system. *Journal of Colloid and Interface Science* **2007**, *309* (2), 524-530.
85. Ng, J. K.; Ajikumar, P. K.; Tang, Y. C.; Lee, J. Y.; Stephanopoulos, G.; Too, H. P., Spatially addressable protein array: ssDNA-directed assembly for antibody microarray. *Electrophoresis* **2007**, *28* (24), 4638-4644.
86. Tyagi, D.; Perez, J. B.; Nand, A.; Cheng, Z. Q.; Wang, P. Z.; Na, J.; Zhu, J. S., Detection of embryonic stem cell lysate biomarkers by surface plasmon resonance with reduced nonspecific adsorption. *Analytical Biochemistry* **2015**, *471*, 29-37.
87. Breault-Turcot, J.; Chaurand, P.; Masson, J.-F., Unravelling Nonspecific Adsorption of Complex Protein Mixture on Surfaces with SPR and MS. *Analytical Chemistry* **2014**, *86* (19), 9612-9619.
88. Gross, J. H., *Mass Spectrometry*. Springer: Germany, 2011.
89. Bolduc, O. R.; Masson, J. F., Monolayers of 3-Mercaptopropyl-amino Acid to Reduce the Nonspecific Adsorption of Serum Proteins on the Surface of Biosensors. *Langmuir* **2008**, *24* (20), 12085-12091.
90. Walden, P., Molecular weights and electrical conductivity of several fused salts. *Bulletin de l'Académie impériale des sciences de Saint-Petersburg* **1914**, *8*, 405-422.
91. Plechkova, N. V.; Seddon, K. R., Applications of ionic liquids in the chemical industry. *Chemical Society Reviews* **2008**, *37* (1), 123-150.
92. Lewandowski, A.; Swiderska-Mocek, A., Ionic liquids as electrolytes for Li-ion batteries-An overview of electrochemical studies. *Journal of Power Sources* **2009**, *194* (2), 601-609.
93. Galinski, M.; Lewandowski, A.; Stepniak, I., Ionic liquids as electrolytes. *Electrochimica Acta* **2006**, *51* (26), 5567-5580.
94. Earle, M. J.; Seddon, K. R., Ionic liquids. Green solvents for the future. *Pure and Applied Chemistry* **2000**, *72* (7), 1391-1398.
95. Dupont, J.; de Souza, R. F.; Suarez, P. A. Z., Ionic liquid (molten salt) phase organometallic catalysis. *Chemical Reviews* **2002**, *102* (10), 3667-3691.
96. Sheldon, R., Catalytic reactions in ionic liquids. *Chemical Communications* **2001**, (23), 2399-2407.
97. Welton, T., Room-temperature ionic liquids. Solvents for synthesis and catalysis. *Chemical Reviews* **1999**, *99* (8), 2071-2083.
98. Wasserscheid, P.; Keim, W., Ionic liquids - New "solutions" for transition metal catalysis. *Angewandte Chemie-International Edition* **2000**, *39* (21), 3772-3789.
99. Hallett, J. P.; Welton, T., Room-Temperature Ionic Liquids: Solvents for Synthesis and Catalysis. 2. *Chemical Reviews* **2011**, *111* (5), 3508-3576.
100. Reddy, P. J.; Sadhu, S.; Ray, S.; Srivastava, S., Cancer Biomarker Detection by Surface Plasmon Resonance Biosensors. *Clinics in Laboratory Medicine* **2012**, *32* (1), 47-72.
101. 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. *Sensors and Actuators B-Chemical* **2007**, *121* (1), 158-177.

102. Wei, B.-R.; Hoover, S. B.; Ross, M. M.; Zhou, W.; Meani, F.; Edwards, J. B.; Spelhalski, E. I.; Risinger, J. I.; Alvord, W. G.; Quinones, O. A.; Belluco, C.; Martella, L.; Campagnutta, E.; Ravaggi, A.; Dai, R.-M.; Goldsmith, P. K.; Woolard, K. D.; Pecorelli, S.; Liotta, L. A.; Petricoin, E. F., III; Simpson, R. M., Serum S100A6 Concentration Predicts Peritoneal Tumor Burden in Mice with Epithelial Ovarian Cancer and Is Associated with Advanced Stage in Patients. *Plos One* **2009**, *4* (10), e7670.
103. Sun, Y.; Zang, Z.; Xu, X.; Zhang, Z.; Zhong, L.; Zan, W.; Zhao, Y.; Sun, L., Differential Proteomics Identification of HSP90 as Potential Serum Biomarker in Hepatocellular Carcinoma by Two-dimensional Electrophoresis and Mass Spectrometry. *International Journal of Molecular Sciences* **2010**, *11* (4), 1423-1433.
104. Ramirez, A. B.; Loch, C. M.; Zhang, Y. Z.; Liu, Y.; Wang, X. H.; Wayner, E. A.; Sargent, J. E.; Sibani, S.; Hainsworth, E.; Mendoza, E. A.; Eugene, R.; LaBaer, J.; Urban, N. D.; McIntosh, M. W.; Lampe, P. D., Use of a Single-Chain Antibody Library for Ovarian Cancer Biomarker Discovery. *Mol. Cell. Proteomics* **2010**, *9* (7), 1449-1460.
105. Choi, S.; Chae, J., Methods of reducing non-specific adsorption in microfluidic biosensors. *Journal of Micromechanics and Microengineering* **2010**, *20* (7), 075015.
106. Su, F.; Xu, C.; Taya, M.; Murayama, K.; Shinohara, Y.; Nishimura, S.-I., Detection of carcinoembryonic antigens using a surface plasmon resonance biosensor. *Sensors* **2008**, *8* (7), 4282-4295.
107. Ladd, J.; Lu, H.; Taylor, A. D.; Goodell, V.; Disis, M. L.; Jiang, S., Direct detection of carcinoembryonic antigen autoantibodies in clinical human serum samples using a surface plasmon resonance sensor. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* **2009**, *70* (1), 1-6.
108. Teramura, Y.; Iwata, H., Label-free immunosensing for alpha-fetoprotein in human plasma using surface plasmon resonance. *Analytical Biochemistry* **2007**, *365* (2), 201-207.
109. Yang, C. Y.; Brooks, E.; Li, Y.; Denny, P.; Ho, C. M.; Qi, F. X.; Shi, W. Y.; Wolinsky, L.; Wu, B.; Wong, D. T. W.; Montemagno, C. D., Detection of picomolar levels of interleukin-8 in human saliva by SPR. *Lab on a Chip* **2005**, *5* (10), 1017-1023.
110. Liu, C.; Lei, T.; Ino, K.; Matsue, T.; Tao, N.; Li, C.-Z., Real-time monitoring biomarker expression of carcinoma cells by surface plasmon resonance biosensors. *Chemical Communications* **2012**, *48* (84), 10389-10391.
111. Besenicar, M.; Macek, P.; Lakey, J. H.; Anderluh, G., Surface plasmon resonance in protein-membrane interactions. *Chemistry and Physics of Lipids* **2006**, *141* (1-2), 169-178.
112. Blaszykowski, C.; Sheikh, S.; Thompson, M., Surface chemistry to minimize fouling from blood-based fluids. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (17), 5599-5612.
113. Brault, N. D.; Sundaram, H. S.; Li, Y.; Huang, C.-J.; Yu, Q.; Jiang, S., Dry Film Refractive Index as an Important Parameter for Ultra-Low Fouling Surface Coatings. *Biomacromolecules* **2012**, *13* (3), 589-593.
114. Rodriguez-Emmenegger, C.; Kylian, O.; Houska, M.; Brynda, E.; Artemenko, A.; Kousal, J.; Bologna Alles, A.; Biederman, H., Substrate-Independent Approach for the Generation of Functional Protein Resistant Surfaces. *Biomacromolecules* **2011**, *12* (4), 1058-1066.
115. Lin, S.; Zhang, B.; Skoumal, M. J.; Ramunno, B.; Li, X.; Wesdemiotis, C.; Liu, L.; Jia, L., Antifouling Poly(beta-peptoid)s. *Biomacromolecules* **2011**, *12* (7), 2573-2582.
116. 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* (15), 3142-3148.
117. 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. *Analytical Chemistry* **2009**, *81* (16), 6779-6788.

118. Nelson, R. W.; Krone, J. R.; Jansson, O., Surface plasmon resonance biomolecular interaction analysis mass spectrometry .1. Chip-based analysis. *Analytical Chemistry* **1997**, *69* (21), 4363-4368.
119. Nedelkov, D., Development of surface plasmon resonance mass spectrometry array platform. *Analytical Chemistry* **2007**, *79* (15), 5987-5990.
120. Bolduc, O. R.; Pelletier, J. N.; Masson, J.-F., SPR Biosensing in Crude Serum Using Ultralow Fouling Binary Patterned Peptide SAM. *Analytical Chemistry* **2010**, *82* (9), 3699-3706.
121. Bolduc, O. R.; Correia-Ledo, D.; Masson, J.-F., Electroformation of Peptide Self-Assembled Monolayers on Gold. *Langmuir* **2012**, *28* (1), 22-26.
122. Bligh, E. B.; Dyer, W. J., A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* **1959**, *37* (8), 911-917.
123. Bolduc, O. R.; Live, L. S.; Masson, J.-F., High-resolution surface plasmon resonance sensors based on a dove prism. *Talanta* **2009**, *77* (5), 1680-1687.
124. Ratel, M.; Branca, M.; Breault-Turcot, J.; Zhao, S. S.; Chaurand, P.; Schmitzer, A. R.; Masson, J.-F., Properties of ionic liquids on Au surfaces: non-conventional anion exchange reactions with carbonate. *Chemical Communications* **2011**, *47* (38), 10644-10646.
125. 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* (18), 5605-5620.
126. Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P., *Molecular Biology of the Cell*. 5th Edition ed.; Taylor & Francis: 2007.
127. Ostuni, E.; Chapman, R. G.; Liang, M. N.; Meluleni, G.; Pier, G.; Ingber, D. E.; Whitesides, G. M., Self-assembled monolayers that resist the adsorption of proteins and the adhesion of bacterial and mammalian cells. *Langmuir* **2001**, *17* (20), 6336-6343.
128. Jung, L. S.; Campbell, C. T.; Chinowsky, T. M.; Mar, M. N.; Yee, S. S., Quantitative interpretation of the response of surface plasmon resonance sensors to adsorbed films. *Langmuir* **1998**, *14* (19), 5636-5648.
129. Mashaghi, A.; Swann, M.; Popplewell, J.; Textor, M.; Reimhult, E., Optical anisotropy of supported lipid structures probed by waveguide spectroscopy and its application to study of supported lipid bilayer formation kinetics (vol 80, pg 3666, 2008). *Analytical Chemistry* **2008**, *80* (13), 3666-3676.
130. Giess, F.; Friedrich, M. G.; Heberle, J.; Naumann, R. L.; Knoll, W., The protein-tethered lipid bilayer: A novel mimic of the biological membrane. *Biophysical Journal* **2004**, *87* (5), 3213-3220.
131. Green, R. J.; Frazier, R. A.; Shakesheff, K. M.; Davies, M. C.; Roberts, C. J.; Tendler, S. J. B., Surface plasmon resonance analysis of dynamic biological interactions with biomaterials. *Biomaterials* **2000**, *21* (18), 1823-1835.
132. Center-for-Disease-Control-and-Prevention <http://www.cdc.gov/nchs/fastats/leading-causes-of-death.htm>.
133. Cancer-Research-UK Why is early diagnosis important? <http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/cancer-symptoms/why-is-early-diagnosis-important>.
134. Arkan, E.; Saber, R.; Karimi, Z.; Shamsipur, M., A novel antibody-antigen based impedimetric immunosensor for low level detection of HER2 in serum samples of breast cancer patients via modification of a gold nanoparticles decorated multiwall carbon nanotube-ionic liquid electrode. *Analytica Chimica Acta* **2015**, *874*, 66-74.
135. Capobianco, J. A.; Shih, W. Y.; Adams, G. P.; Shih, W. H., Label-free Her2 detection and dissociation constant assessment in diluted human serum using a longitudinal extension

- mode of a piezoelectric microcantilever sensor. *Sensors and Actuators B-Chemical* **2011**, *160* (1), 349-356.
136. Capobianco, J. A.; Shih, W. Y.; Yuan, Q. A.; Adams, G. P.; Shih, W. H., Label-free, all-electrical, in situ human epidermal growth receptor 2 detection. *Review of Scientific Instruments* **2008**, *79* (7).
137. Gohring, J. T.; Dale, P. S.; Fan, X. D., Detection of HER2 breast cancer biomarker using the opto-fluidic ring resonator biosensor. *Sensors and Actuators B-Chemical* **2010**, *146* (1), 226-230.
138. Kim, K. W.; Song, J. F.; Kee, J. S.; Liu, Q.; Lo, G. Q.; Park, M. K., Label-free biosensor based on an electrical tracing-assisted silicon microring resonator with a low-cost broadband source. *Biosensors & Bioelectronics* **2013**, *46*, 15-21.
139. Loo, L.; Capobianco, J. A.; Wu, W.; Gao, X. T.; Shih, W. Y.; Shih, W. H.; Pourrezaei, K.; Robinson, M. K.; Adams, G. P., Highly Sensitive Detection of HER2 Extracellular Domain in the Serum of Breast Cancer Patients by Piezoelectric Microcantilevers. *Analytical Chemistry* **2011**, *83* (9), 3392-3397.
140. Ravalli, A.; da Rocha, C. G.; Yamanaka, H.; Marrazza, G., A label-free electrochemical affisensor for cancer marker detection: The case of HER2. *Bioelectrochemistry* **2015**, *106*, 268-275.
141. Vaidyanathan, R.; Rauf, S.; Shiddiky, M. J. A.; Trau, M., Tuneable surface shear forces to physically displace nonspecific molecules in protein biomarker detection. *Biosensors & Bioelectronics* **2014**, *61*, 184-191.
142. Zhu, Y.; Chandra, P.; Shim, Y. B., Ultrasensitive and Selective Electrochemical Diagnosis of Breast Cancer Based on a Hydrazine-Au Nanoparticle-Aptamer Bioconjugate. *Analytical Chemistry* **2013**, *85* (2), 1058-1064.
143. Tchou, J.; Lam, L.; Li, Y. R.; Edwards, C.; Ky, B.; Zhang, H., Monitoring serum HER2 levels in breast cancer patients. *SpringerPlus* **2015**, *4*, 237.
144. Leyland-Jones, B.; Smith, B. R., Serum HER2 testing in patients with HER2-positive breast cancer: the death knell tolls. *The Lancet Oncology* **2011**, *12* (3), 286-295.
145. Chikkaveeraiah, B. V.; Mani, V.; Patel, V.; Gutkind, J. S.; Rusling, J. F., Microfluidic electrochemical immunoarray for ultrasensitive detection of two cancer biomarker proteins in serum. *Biosensors & Bioelectronics* **2011**, *26* (11), 4477-4483.
146. Du, D.; Zou, Z.; Shin, Y.; Wang, J.; Wu, H.; Engelhard, M. H.; Liu, J.; Aksay, I. A.; Lin, Y., Sensitive Immunosensor for Cancer Biomarker Based on Dual Signal Amplification Strategy of Graphene Sheets and Multienzyme Functionalized Carbon Nanospheres. *Analytical Chemistry* **2010**, *82* (7), 2989-2995.
147. Jokerst, J. V.; Raamanathan, A.; Christodoulides, N.; Floriano, P. N.; Pollard, A. A.; Simmons, G. W.; Wong, J.; Gage, C.; Furmaga, W. B.; Redding, S. W.; McDevitt, J. T., Nano-bio-chips for high performance multiplexed protein detection: Determinations of cancer biomarkers in serum and saliva using quantum dot bioconjugate labels. *Biosensors & Bioelectronics* **2009**, *24* (12), 3622-3629.
148. Li, Z.; Wang, Y.; Wang, J.; Tang, Z.; Pounds, J. G.; Lin, Y., Rapid and Sensitive Detection of Protein Biomarker Using a Portable Fluorescence Biosensor Based on Quantum Dots and a Lateral Flow Test Strip. *Analytical Chemistry* **2010**, *82* (16), 7008-7014.
149. Malhotra, R.; Patel, V.; Vaque, J. P.; Gutkind, J. S.; Rusling, J. F., Ultrasensitive Electrochemical Immunosensor for Oral Cancer Biomarker IL-6 Using Carbon Nanotube Forest Electrodes and Multilabel Amplification. *Analytical Chemistry* **2010**, *82* (8), 3118-3123.
150. Mani, V.; Chikkaveeraiah, B. V.; Patel, V.; Gutkind, J. S.; Rusling, J. F., Ultrasensitive Immunosensor for Cancer Biomarker Proteins Using Gold Nanoparticle Film Electrodes and Multienzyme-Particle Amplification. *Acs Nano* **2009**, *3* (3), 585-594.

151. Myung, S.; Solanki, A.; Kim, C.; Park, J.; Kim, K. S.; Lee, K.-B., Graphene-Encapsulated Nanoparticle-Based Biosensor for the Selective Detection of Cancer Biomarkers. *Advanced Materials* **2011**, *23* (19), 2221-2225.
152. Perfezou, M.; Turner, A.; Merkcoci, A., Cancer detection using nanoparticle-based sensors. *Chemical Society Reviews* **2012**, *41* (7), 2606-2622.
153. Stern, E.; Vacic, A.; Rajan, N. K.; Criscione, J. M.; Park, J.; Ilic, B. R.; Mooney, D. J.; Reed, M. A.; Fahmy, T. M., Label-free biomarker detection from whole blood. *Nature Nanotechnology* **2010**, *5* (2), 138-142.
154. Stoeva, S. I.; Lee, J. S.; Smith, J. E.; Rosen, S. T.; Mirkin, C. A., Multiplexed detection of protein cancer markers with biobarcode nanoparticle probes. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128* (26), 8378-8379.
155. Tothill, I. E., Biosensors for cancer markers diagnosis. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **2009**, *20* (1), 55-62.
156. Wang, J., Electrochemical biosensors: Towards point-of-care cancer diagnostics. *Biosensors & Bioelectronics* **2006**, *21* (10), 1887-1892.
157. Wee, K. W.; Kang, G. Y.; Park, J.; Kang, J. Y.; Yoon, D. S.; Park, J. H.; Kim, T. S., Novel electrical detection of label-free disease marker proteins using piezoresistive self-sensing micro-cantilevers. *Biosensors & Bioelectronics* **2005**, *20* (10), 1932-1938.
158. Wilson, M. S.; Nie, W., Multiplex measurement of seven tumor markers using an electrochemical protein chip. *Analytical Chemistry* **2006**, *78* (18), 6476-6483.
159. Xu, S.; Liu, Y.; Wang, T.; Li, J., Positive Potential Operation of a Cathodic Electrogenerated Chemiluminescence Immunosensor Based on Luminol and Graphene for Cancer Biomarker Detection. *Analytical Chemistry* **2011**, *83* (10), 3817-3823.
160. Zheng, G. F.; Patolsky, F.; Cui, Y.; Wang, W. U.; Lieber, C. M., Multiplexed electrical detection of cancer markers with nanowire sensor arrays. *Nature Biotechnology* **2005**, *23* (10), 1294-1301.
161. Frank, R.; Hargreaves, R., Clinical biomarkers in drug discovery and development. *Nature Reviews Drug Discovery* **2003**, *2* (7), 566-580.
162. Ludwig, J. A.; Weinstein, J. N., Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection. *Nature Reviews Cancer* **2005**, *5* (11), 845-856.
163. 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.
164. 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* (32), 10141-10148.
165. Carmen Estevez, M.; Otte, M. A.; Sepulveda, B.; Lechuga, L. M., Trends and challenges of refractometric nanoplasmonic biosensors: A review. *Analytica Chimica Acta* **2014**, *806*, 55-73.
166. Haimovich, J.; Czerwinski, D.; Wong, C. P.; Levy, R., Determination of anti-idiotypic antibodies by surface plasmon resonance. *Journal of Immunological Methods* **1998**, *214* (1-2), 113-119.
167. Thaler, M.; Metzger, J.; Schreiegg, A.; Denk, B.; Gleixner, A.; Hauptmann, H.; Lippa, P. B., Immunoassay for sex hormone-binding globulin in undiluted serum is influenced by high-molecular-mass aggregates. *Clinical Chemistry* **2005**, *51* (2), 401-407.
168. Wang, R.; Lajevardi-Khosh, A.; Choi, S.; Chae, J., Regenerative Surface Plasmon Resonance (SPR) biosensor: Real-time measurement of fibrinogen in undiluted human serum using the competitive adsorption of proteins. *Biosensors & Bioelectronics* **2011**, *28* (1), 304-307.

169. Brault, N. D.; Gao, C.; Xue, H.; Piliarik, M.; Homola, J.; Jiang, S.; Yu, Q., Ultra-low fouling and functionalizable zwitterionic coatings grafted onto SiO₂ via a biomimetic adhesive group for sensing and detection in complex media. *Biosensors & Bioelectronics* **2010**, *25* (10), 2276-2282.
170. Cappi, G.; Spiga, F. M.; Moncada, Y.; Ferretti, A.; Beyeler, M.; Bianchessi, M.; Decosterd, L.; Buclin, T.; Guiducci, C., Label-Free Detection of Tobramycin in Serum by Transmission-Localized Surface Plasmon Resonance. *Analytical Chemistry* **2015**, *87* (10), 5278-5285.
171. Jang, H. R.; Wark, A. W.; Baek, S. H.; Chung, B. H.; Lee, H. J., Ultrasensitive and Ultrawide Range Detection of a Cardiac Biomarker on a Surface Plasmon Resonance Platform. *Analytical Chemistry* **2014**, *86* (1), 814-819.
172. Arvinte, T.; Palais, C.; Green-Trexler, E.; Gregory, S.; Mach, H.; Narasimhan, C.; Shameem, M., Aggregation of biopharmaceuticals in human plasma and human serum Implications for drug research and development. *Mabs* **2013**, *5* (3), 491-500.
173. Garay, F.; Kisiel, G.; Fang, A.; Lindner, E., Surface plasmon resonance aided electrochemical immunosensor for CK-MB determination in undiluted serum samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2010**, *397* (5), 1873-1881.
174. Vaisocherova, H.; Zhang, Z.; Yang, W.; Cao, Z.; Cheng, G.; Taylor, A. D.; Piliarik, M.; Homola, J.; Jiang, S., Functionalizable surface platform with reduced nonspecific protein adsorption from full blood plasma-Material selection and protein immobilization optimization. *Biosensors & Bioelectronics* **2009**, *24* (7), 1924-1930.
175. Carlsson, J.; Gullstrand, C.; Westermark, G. T.; Ludvigsson, J.; Enander, K.; Liedberg, B., An indirect competitive immunoassay for insulin autoantibodies based on surface plasmon resonance. *Biosensors & Bioelectronics* **2008**, *24* (4), 876-881.
176. Phillips, K. S.; Han, J. H.; Cheng, Q., Development of a "membrane cloaking" method for amperometric enzyme immunoassay and surface plasmon resonance analysis of proteins in serum samples. *Analytical Chemistry* **2007**, *79* (3), 899-907.
177. Dutra, R. F.; Mendes, R. K.; da Silva, V. L.; Kubota, L. T., Surface plasmon resonance immunosensor for human cardiac troponin T based on self-assembled monolayer. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2007**, *43* (5), 1744-1750.
178. Bolduc, O. R.; Masson, J.-F., Monolayers of 3-Mercaptopropyl-amino Acid to Reduce the Nonspecific Adsorption of Serum Proteins on the Surface of Biosensors. *Langmuir* **2008**, *24* (20), 12085-12091.
179. Masson, J.-F.; Battaglia, T. M.; Khairallah, P.; Beaudoin, S.; Booksh, K. S., Quantitative measurement of cardiac markers in undiluted serum. *Analytical Chemistry* **2007**, *79* (2), 612-619.
180. Lee, C.-Y.; Gamble, L. J.; Grainger, D. W.; Castner, D. G., Mixed DNA/oligo (ethylene glycol) functionalized gold surfaces improve DNA hybridization in complex media. *Biointerphases* **2006**, *1* (2), 82-92.
181. Tokarzewicz, A.; Romanowicz, L.; Sveklo, I.; Gorodkiewicz, E., The development of a matrix metalloproteinase-1 biosensor based on the surface plasmon resonance imaging technique. *Analytical Methods* **2016**, *8* (34), 6428-6435.
182. Gupta, G.; Sharma, P. K.; Sikarwar, B.; Merwyn, S.; Kaushik, S.; Boopathi, M.; Agarwal, G. S.; Singh, B., Surface plasmon resonance immunosensor for the detection of Salmonella typhi antibodies in buffer and patient serum. *Biosensors & Bioelectronics* **2012**, *36* (1), 95-102.
183. Aubé, A.; Charbonneau, D. M.; Pelletier, J. N.; Masson, J.-F., Response Monitoring of Acute Lymphoblastic Leukemia Patients Undergoing L-Asparaginase Therapy: Successes and Challenges Associated with Clinical Sample Analysis in Plasmonic Sensing. *ACS Sensors* **2016**, *1* (11), 1358-1365.

184. Gujar, R. B.; Ansari, S. A.; Mohapatra, P. K., Highly Efficient Composite Polysulfone Beads Containing a Calix[4]arene-mono-crown-6 Ligand and Room Temperature Ionic Liquid for Radio-caesium Separations: Remediation of Environmental Samples. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **2016**, *55* (48), 12460–12466.
185. Song, Y.; Hu, J.; Tang, J.; Gu, W.; He, L.; Ji, X., Real-Time X-ray Imaging Reveals Interfacial Growth, Suppression and Dissolution of Zinc Dendrites Dependent on Anions of Ionic Liquid Additives for Rechargeable Battery Applications. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2016**, *8* (46), 32031–32040.
186. Safa, M.; Mokhtarani, B.; Mortaheb, H. R.; Tabar Heidar, K., Oxidative desulfurization of model diesel using ionic liquid 1-octyl-3-methylimidazolium hydrogen sulfate: an investigation of ultrasonic irradiation effect on performance. *Energy & Fuels* **2016**, *30* (12), 10909–10916.
187. Wu, Z.; Chen, C.; Wan, H.; Wang, L.; Li, Z.; Li, B.; Guo, Q.; Guan, G., Fabrication of Magnetic NH₂-MIL-88B (Fe) Confined Brønsted Ionic Liquid as Efficient Catalyst in Biodiesel Synthesis. *Energy & Fuels* **2016**, *30* (12), 10739–10746.
188. Tian, T.; Hu, Q.; Wang, Y.; Gao, Y. a.; Yu, L., Effect of Imidazolium-Based Surface-Active Ionic Liquids on the Orientation of Liquid Crystals at Various Fluid/Liquid Crystal Interfaces. *Langmuir* **2016**, *32* (45), 11745–11753.
189. Genovese, M.; Lian, K., Ionic Liquid-Derived Imidazolium Cation Linkers for the Layer-by-Layer Assembly of Polyoxometalate-MWCNT Composite Electrodes with High Power Capability. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2016**, *8* (29), 19100-19109.
190. Robertson, L. A.; Gin, D. L., Effect of an n-Alkoxy-2,4-hexadiene Polymerizable Tail System on the Mesogenic Properties and Cross-Linking of Mono-Imidazolium-Based Ionic Liquid Crystal Monomers. *ACS Macro Letters* **2016**, *5* (7), 844-848.
191. Martin, R. M.; Mori, D. I.; Noble, R. D.; Gin, D. L., Curable Imidazolium Poly(ionic liquid)/Ionic Liquid Coating for Containment and Decontamination of Toxic Industrial Chemical-Contacted Substrates. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **2016**, *55* (22), 6547-6550.
192. Zheng, Z.; Xu, Q.; Guo, J.; Qin, J.; Mao, H.; Wang, B.; Yan, F., Structure–Antibacterial Activity Relationships of Imidazolium-Type Ionic Liquid Monomers, Poly(ionic liquids) and Poly(ionic liquid) Membranes: Effect of Alkyl Chain Length and Cations. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2016**, *8* (20), 12684-12692.
193. Lee, B. S.; Chi, Y. S.; Lee, J. K.; Choi, I. S.; Song, C. E.; Namgoong, S. K.; Lee, S. G., Imidazolium ion-terminated self-assembled monolayers on Au: Effects of counteranions on surface wettability. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126* (2), 480-481.
194. Eletxigerra, U.; Martinez-Perdiguero, J.; Barderas, R.; Pingarron, J. M.; Campuzano, S.; Merino, S., Surface plasmon resonance immunosensor for ErbB2 breast cancer biomarker determination in human serum and raw cancer cell lysates. *Analytica Chimica Acta* **2016**, *905*, 156-162.
195. Xiao, Y.; Gao, X. G.; Maragh, S.; Telford, W. G.; Tona, A., Cell Lines as Candidate Reference Materials for Quality Control of ERBB2 Amplification and Expression Assays in Breast Cancer. *Clinical Chemistry* **2009**, *55* (7), 1307-1315.
196. Dinares, I.; de Miguel, C. G.; Ibanez, A.; Mesquida, N.; Alcalde, E., Imidazolium ionic liquids: A simple anion exchange protocol. *Green Chemistry* **2009**, *11* (10), 1507-1510.
197. Marcilla, R.; Blazquez, J. A.; Rodriguez, J.; Pomposo, J. A.; Mecerreyes, D., Tuning the solubility of polymerized ionic liquids by simple anion-exchange reactions. *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry* **2004**, *42* (1), 208-212.
198. Cancer Statistics Center.
<https://cancerstatisticscenter.cancer.org/module/BmVYeqHT>.

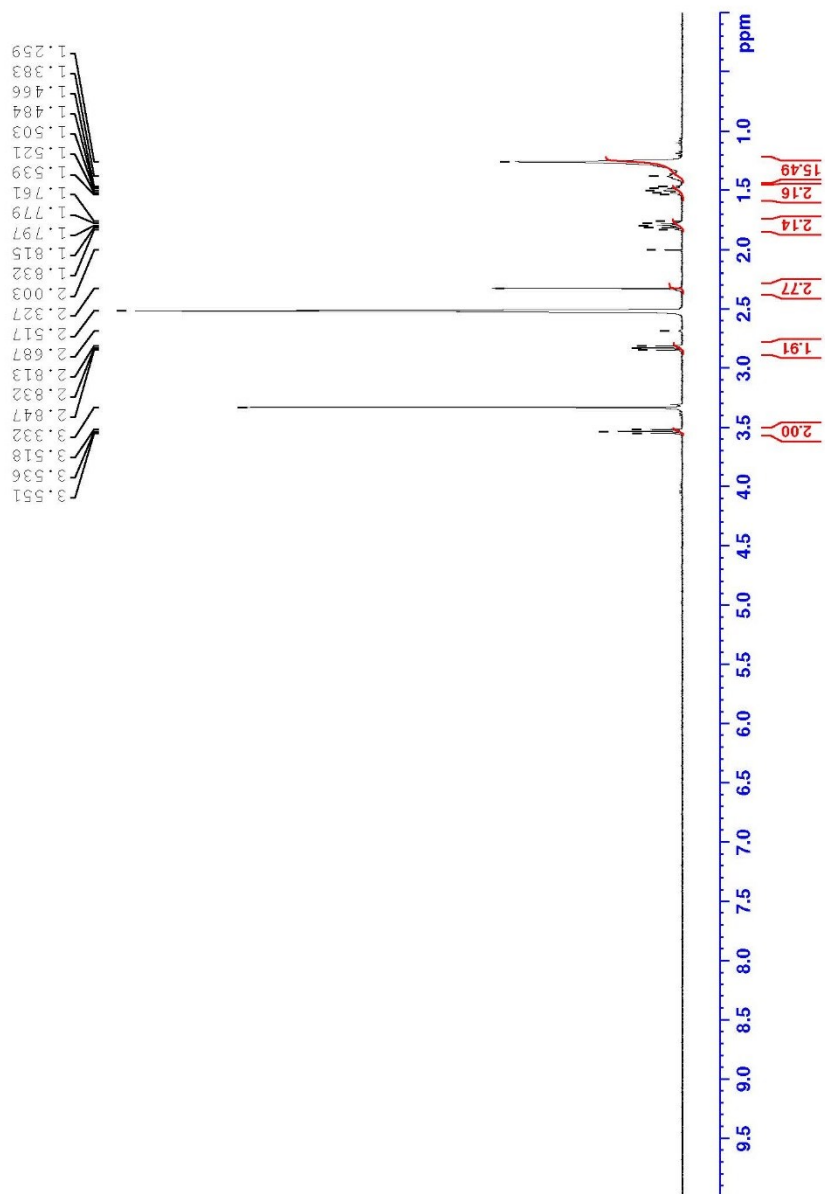
199. Leukemia statistics. <http://www.cancer.ca/en/cancer-information/cancer-type/leukemia/statistics/?region=qc>.
200. Place, A. E.; Stevenson, K. E.; Vrooman, L. M.; Harris, M. H.; Hunt, S. K.; O'Brien, J. E.; Supko, J. G.; Asselin, B. L.; Athale, U. H.; Clavell, L. A.; Cole, P. D.; Kelly, K. M.; Laverdiere, C.; Leclerc, J.-M.; Michon, B.; Schorin, M. A.; Welch, J. J. G.; Lipshultz, S. E.; Kutok, J. L.; Blonquist, T. M.; Neuberg, D. S.; Sallan, S. E.; Silverman, L. B., Intravenous pegylated asparaginase versus intramuscular native *Escherichia coli* L-asparaginase in newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukaemia (DFCI 05-001): a randomised, open-label phase 3 trial. *Lancet Oncology* **2015**, *16* (16), 1677-1690.
201. Pui, C.-H.; Robison, L. L.; Look, A. T., Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* **2008**, *371* (9617), 1030-1043.
202. Silverman, L. B.; Gelber, R. D.; Dalton, V. K.; Asselin, B. L.; Barr, R. D.; Clavell, L. A.; Hurwitz, C. A.; Moghrabi, A.; Samson, Y.; Schorin, M. A.; Arkin, S.; Declerck, L.; Cohen, H. J.; Sallan, S. E., Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Dana-Farber Consortium Protocol 91-01. *Blood* **2001**, *97* (5), 1211-1218.
203. Landau, H.; Lamanna, N., Clinical manifestations and treatment of newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia in adults. *Current hematologic malignancy reports* **2006**, *1* (3), 171-9.
204. Liu, C.; Kawedia, J. D.; Cheng, C.; Pei, D.; Fernandez, C. A.; Cai, X.; Crews, K. R.; Kaste, S. C.; Panetta, J. C.; Bowman, W. P.; Jeha, S.; Sandlund, J. T.; Evans, W. E.; Pui, C. H.; Relling, M. V., Clinical utility and implications of asparaginase antibodies in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* **2012**, *26* (11), 2303-2309.
205. 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* (1), 299-302.
206. Vaisocherova, H.; Brynda, E.; Homola, J., Functionalizable low-fouling coatings for label-free biosensing in complex biological media: advances and applications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2015**, *407* (14), 3927-3953.
207. Zhao, S. S.; Bakar, N.; Toulouse, J. L.; Pelechacz, D.; Robitaille, R.; Pelletier, J. N.; Masson, J.-F., Miniature multi-channel SPR instrument for methotrexate monitoring in clinical samples. *Biosensors & Bioelectronics* **2015**, *64*, 664-670.
208. Breault-Turcot, J.; Masson, J.-F., Nanostructured substrates for portable and miniature SPR biosensors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2012**, *403* (6), 1477-1484.
209. Couture, M.; Zhao, S. S.; Masson, J.-F., Modern surface plasmon resonance for bioanalytics and biophysics. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2013**, *15* (27), 11190-11216.
210. Vaisocherova, H.; Yang, W.; Zhang, Z.; Cao, Z.; Cheng, G.; Piliarik, 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* (20), 7894-7901.
211. 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* (32), 10141-10148.
212. Charbonneau, D. M., Aubé, A., Rachel, N. M., Guerrero, V., Delorme, K., Breault-Turcot, J., Masson, J. F., Pelletier, J. N., Development of an efficient bioreceptor for detecting serum asparaginase antibodies using surface plasmon resonance. *Unpublished work, Université de Montréal* **2016**.
213. Breault-Turcot, J.; Masson, J.-F., Microdialysis SPR: diffusion-gated sensing in blood. *Chemical Science* **2015**, *6* (7), 4247-4254.

214. Špringer, T.; Bocková, M.; Homola, J., Label-Free Biosensing in Complex Media: A Referencing Approach. *Analytical Chemistry* **2013**, *85* (12), 5637-5640.

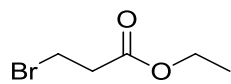
ANNEXE

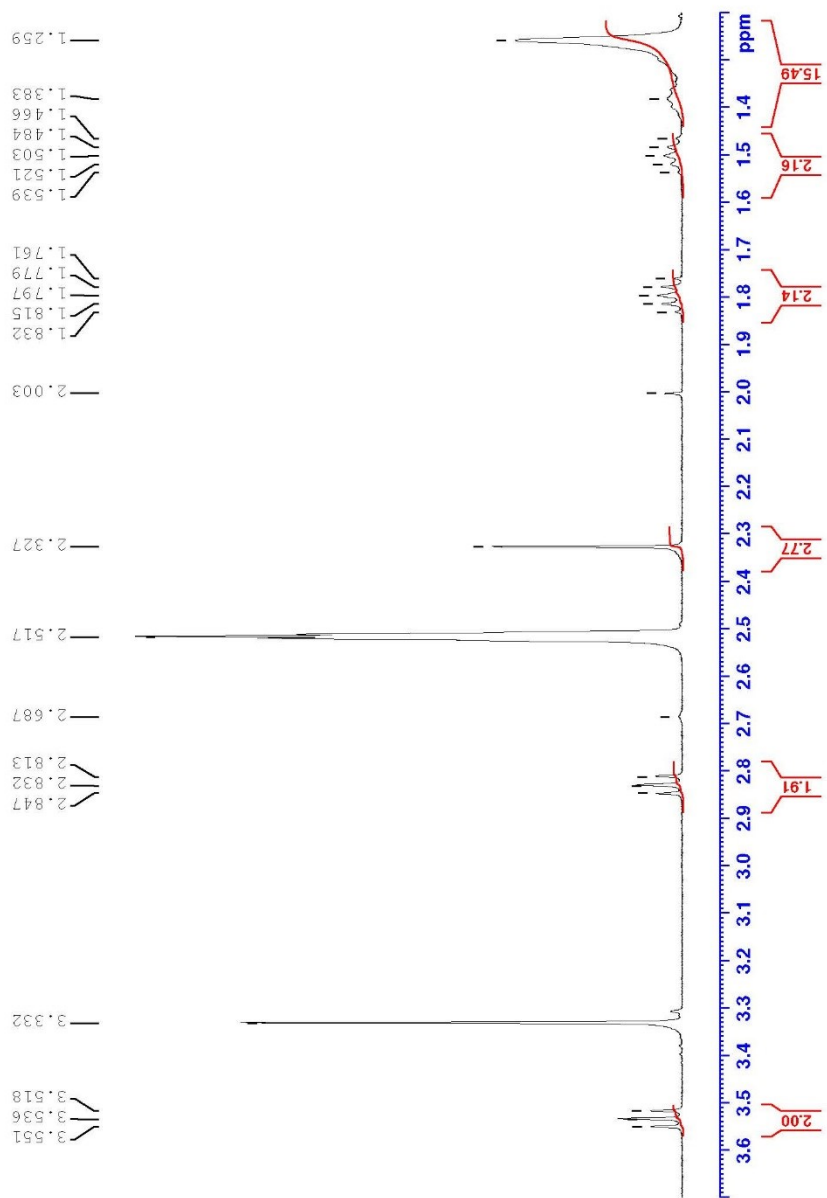
La présente annexe regroupe les spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN) mesurés lors de la synthèse des liquides ioniques, ainsi que les résultats d'analyse en masse exacte pour confirmer la nature des liquides ioniques synthétisés.

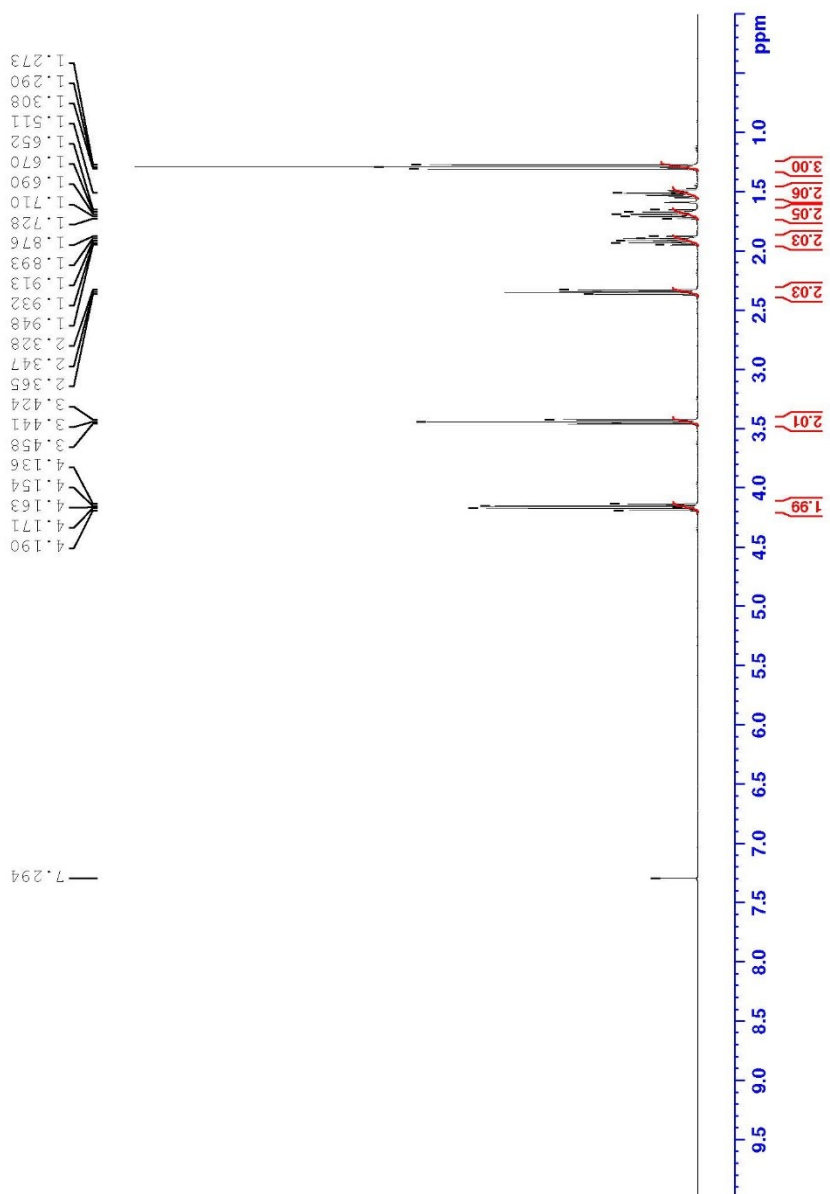
Pour tous les spectres RMN, la première page (gauche) montre le spectre complet, avec tous les pics présents. La seconde page (droite) montre un agrandissement du spectre, généralement dans la région de bas déplacement chimique, pour bien voir la multiplicité des pics. Le nom de la molécule, sa structure et les conditions d'analyse ne sont donnés que sur la première page de chacune des molécules afin d'éviter la redondance.



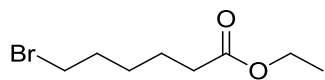
Ethyl-3-bromopropionate, 1H, 400 MHz, CDCl₃

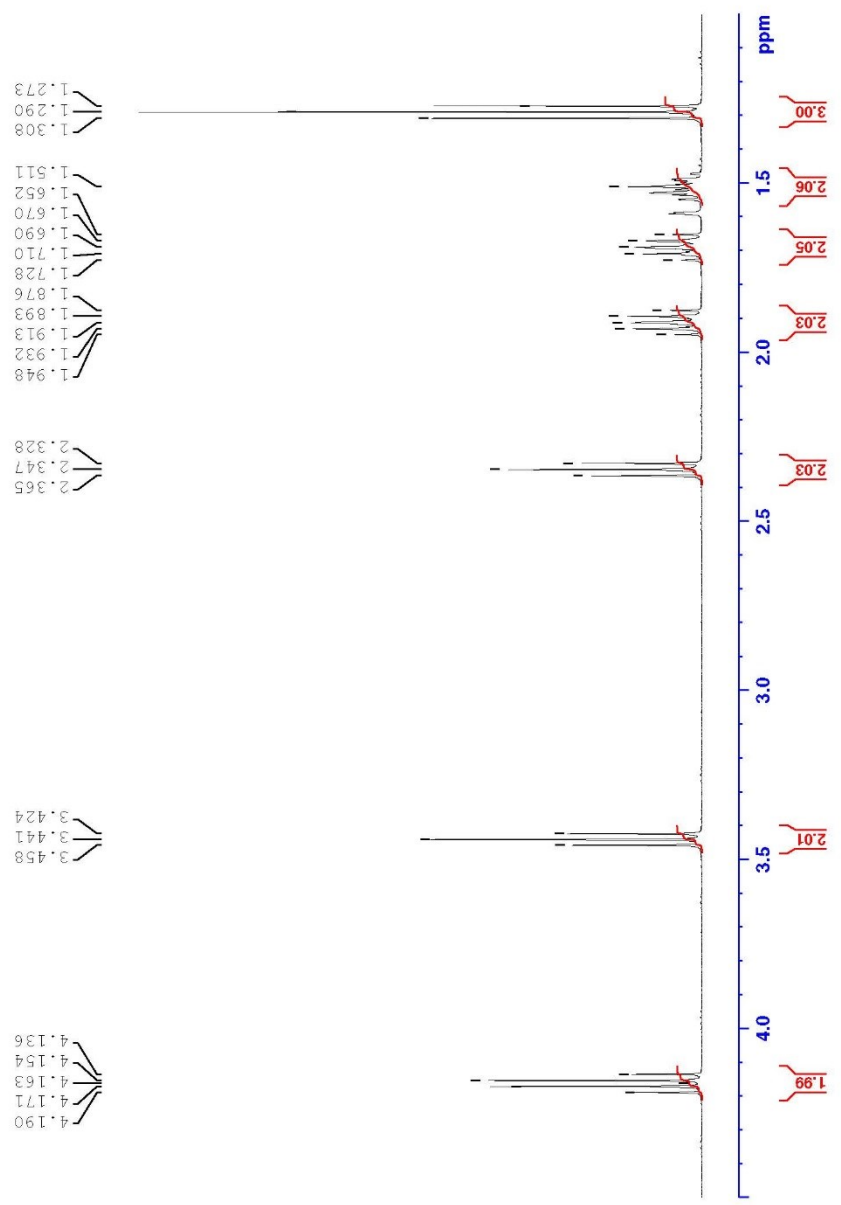


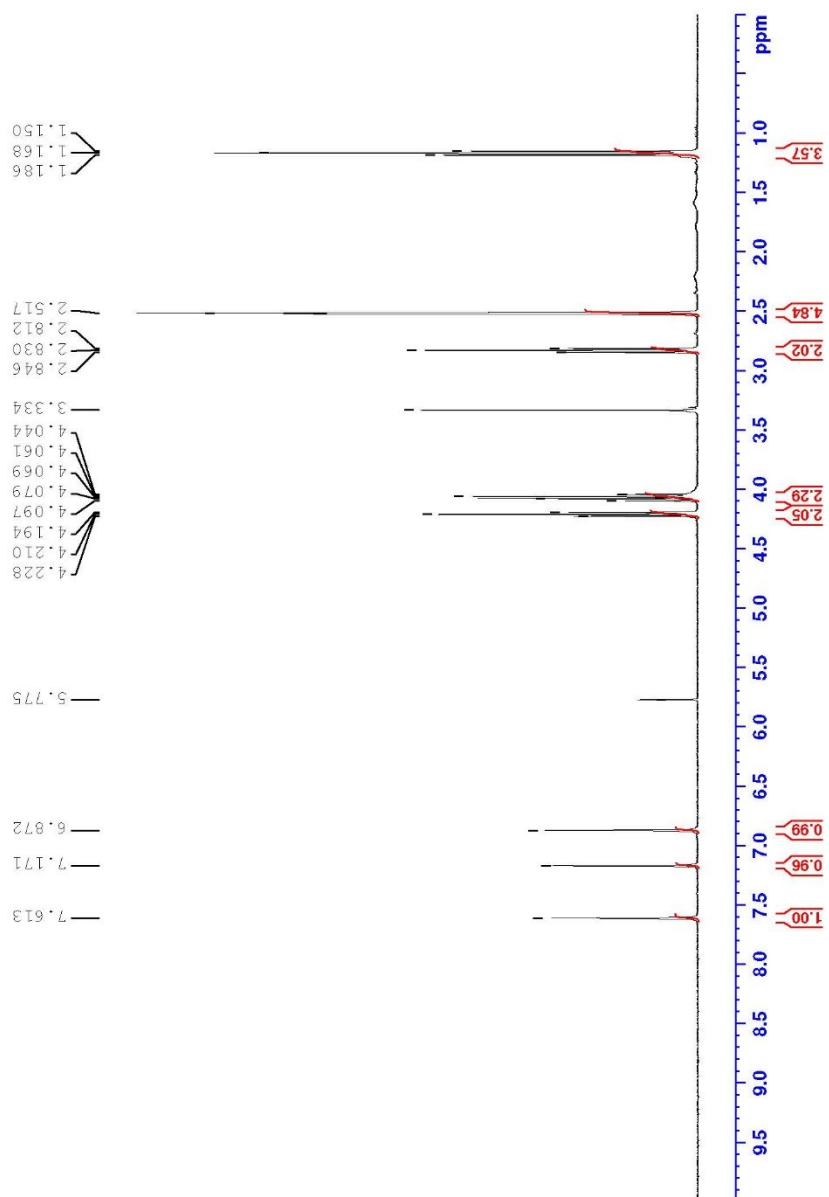




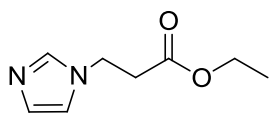
Ethyl-3-bromohexanoate, ^1H , 400 MHz, CDCl_3

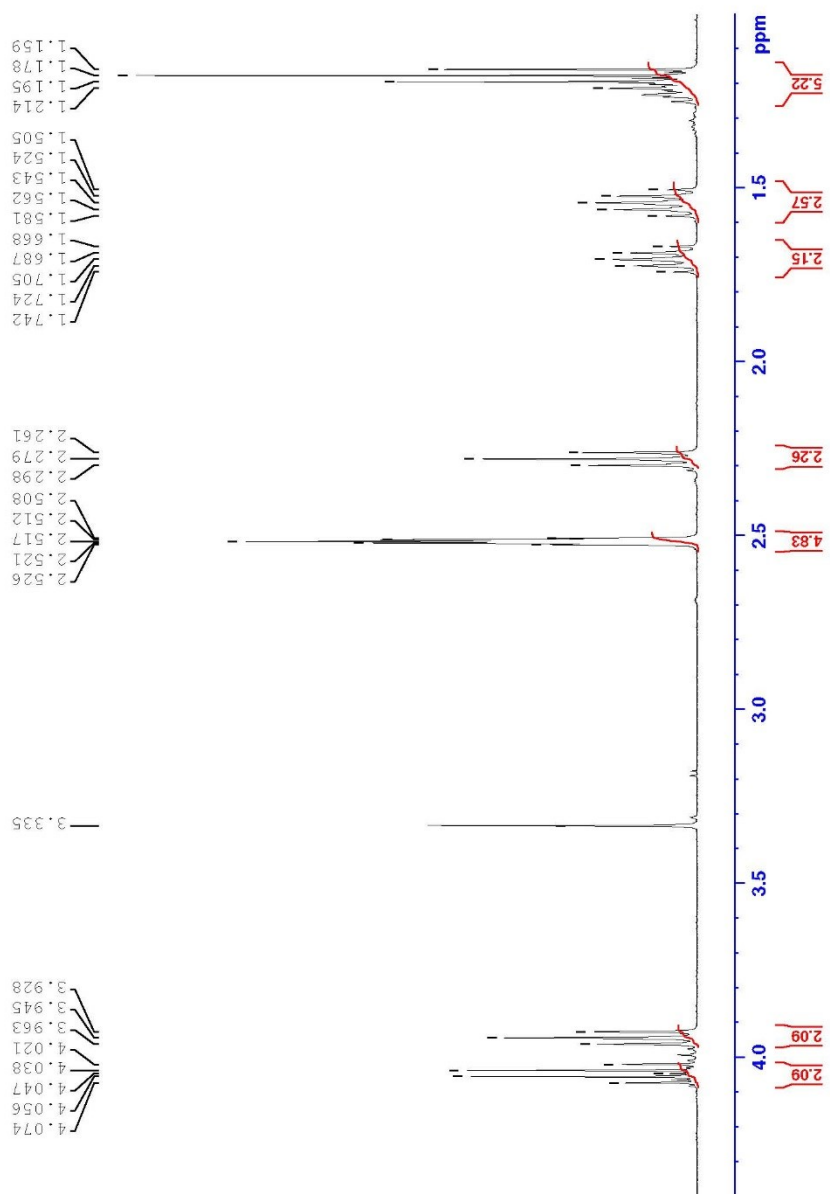


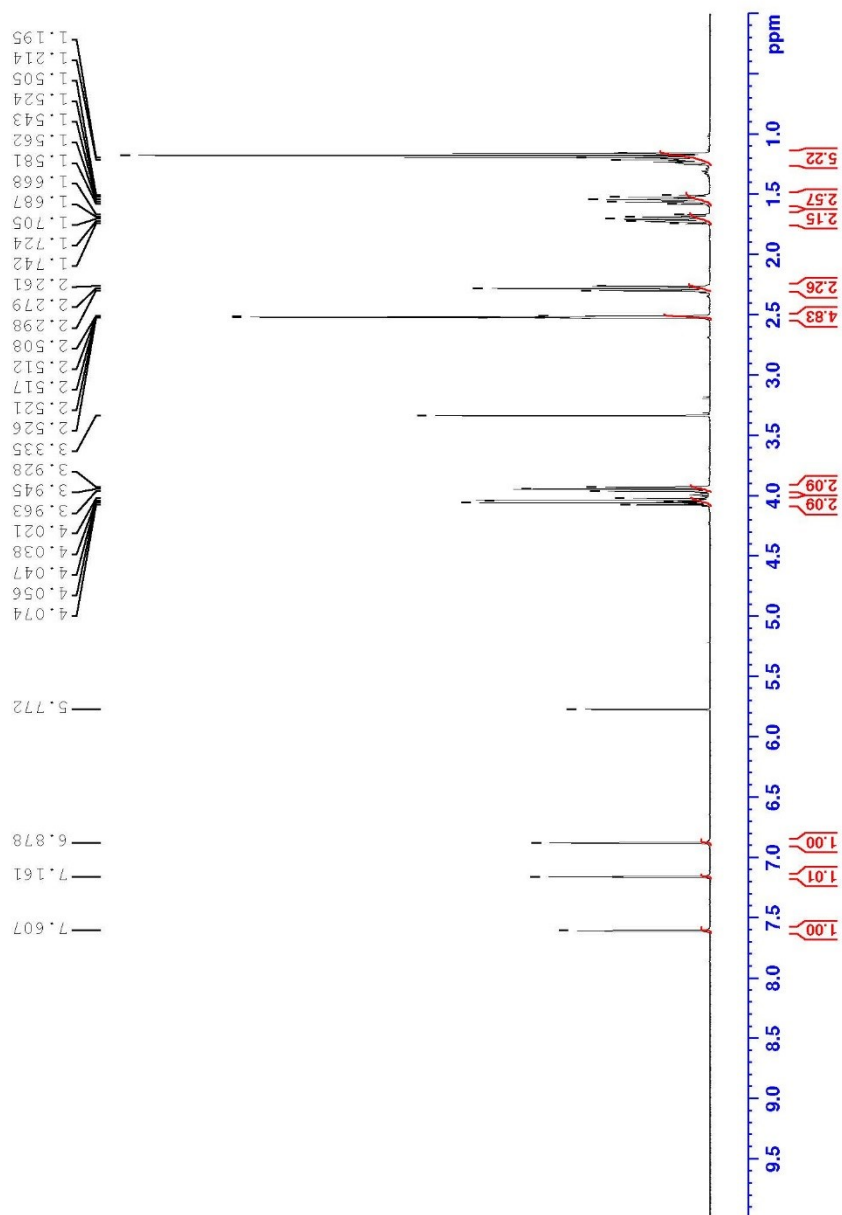




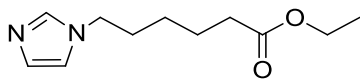
Ethyl 3-(1H-imidazol-1-yl)propanoate, 1H, 400 MHz, DMSO-d₆

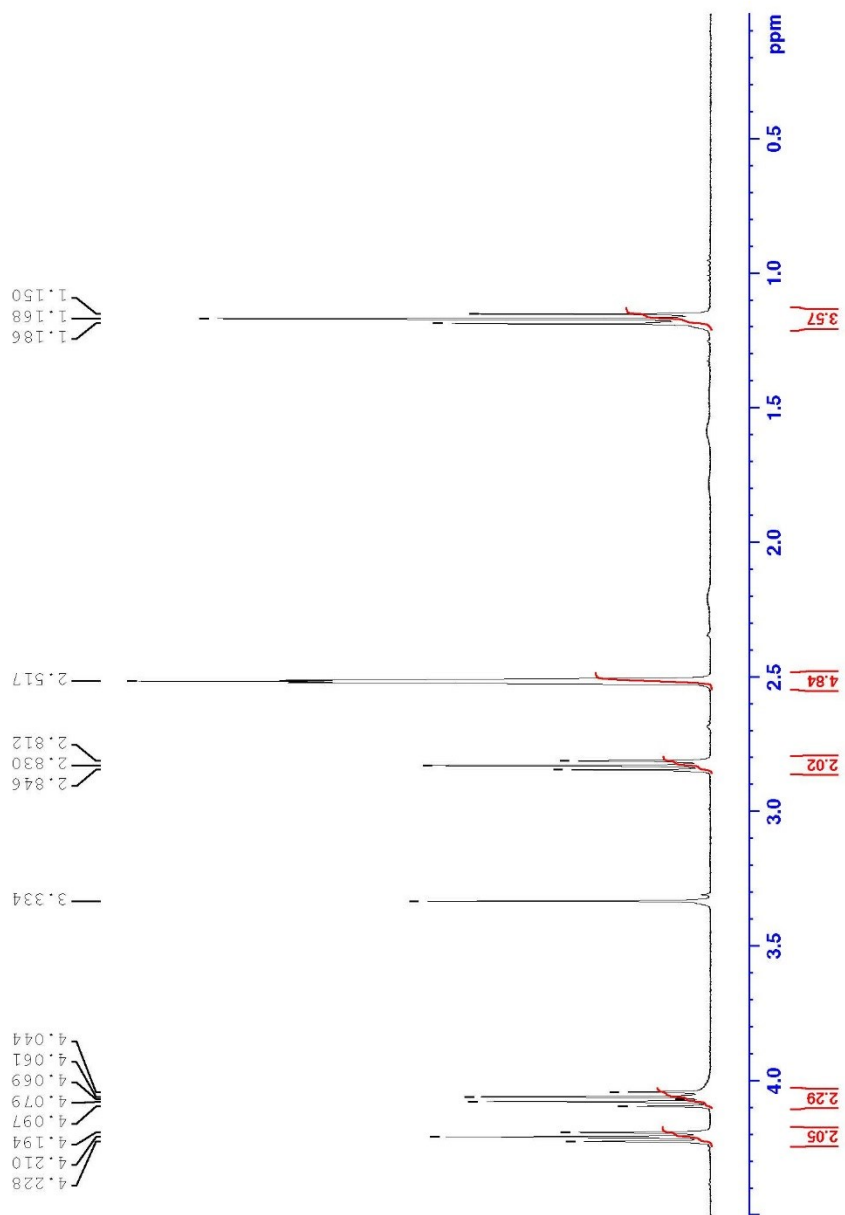


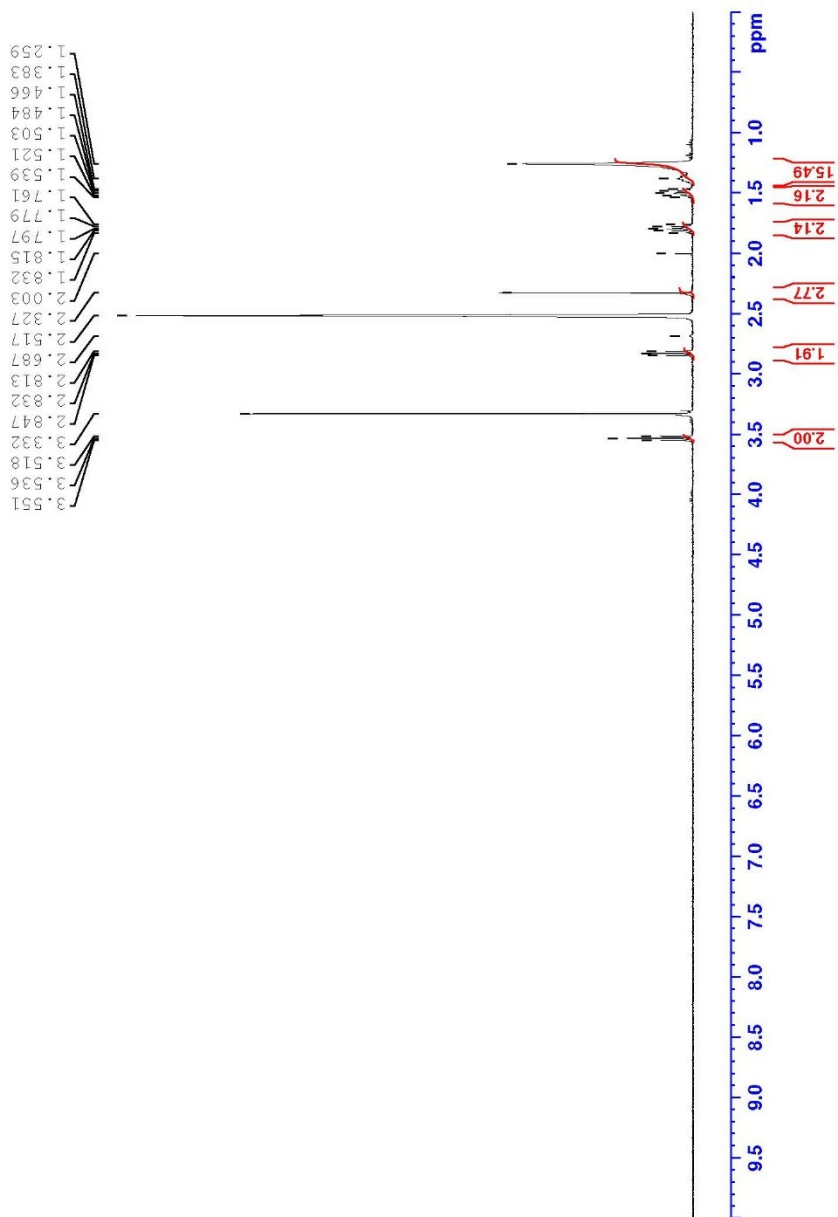




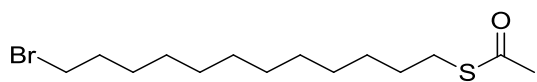
Ethyl 6-(1H-imidazol-1-yl)hexanoate, ¹H, 400 MHz, DMSO-d₆

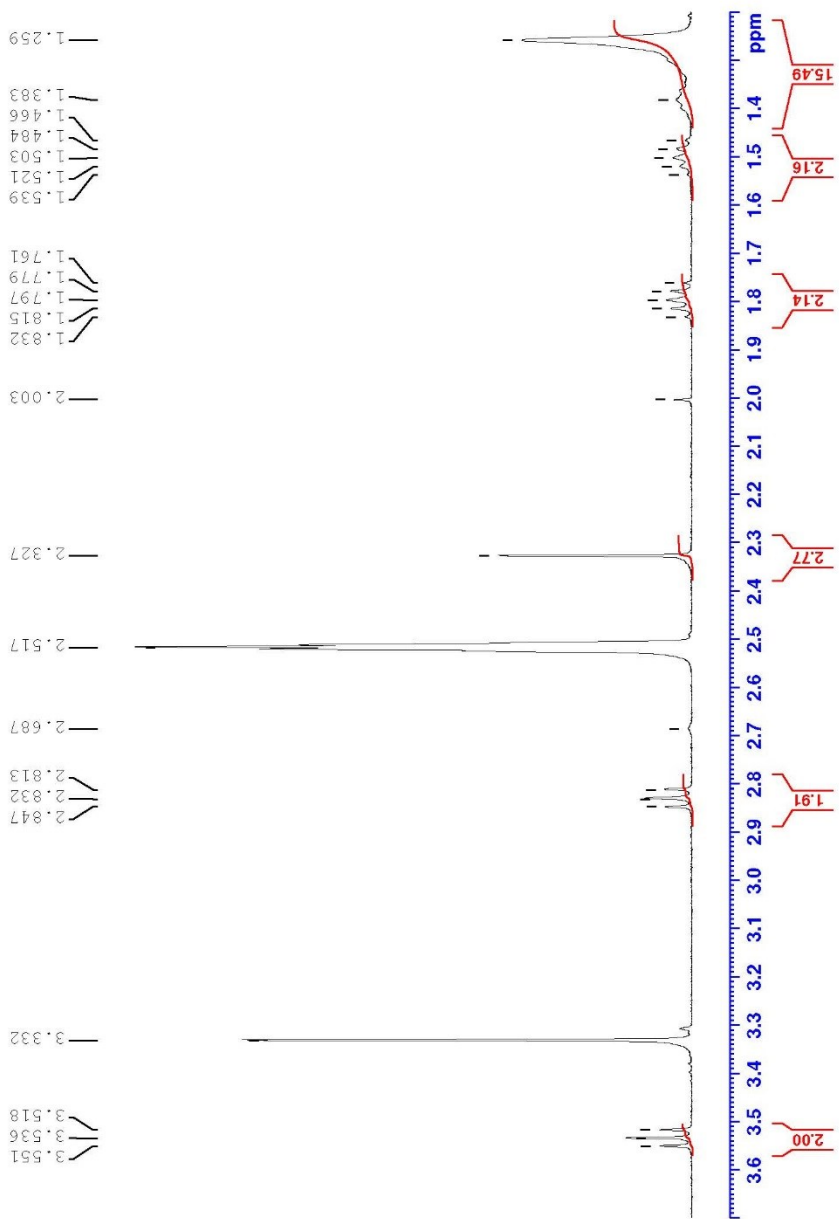


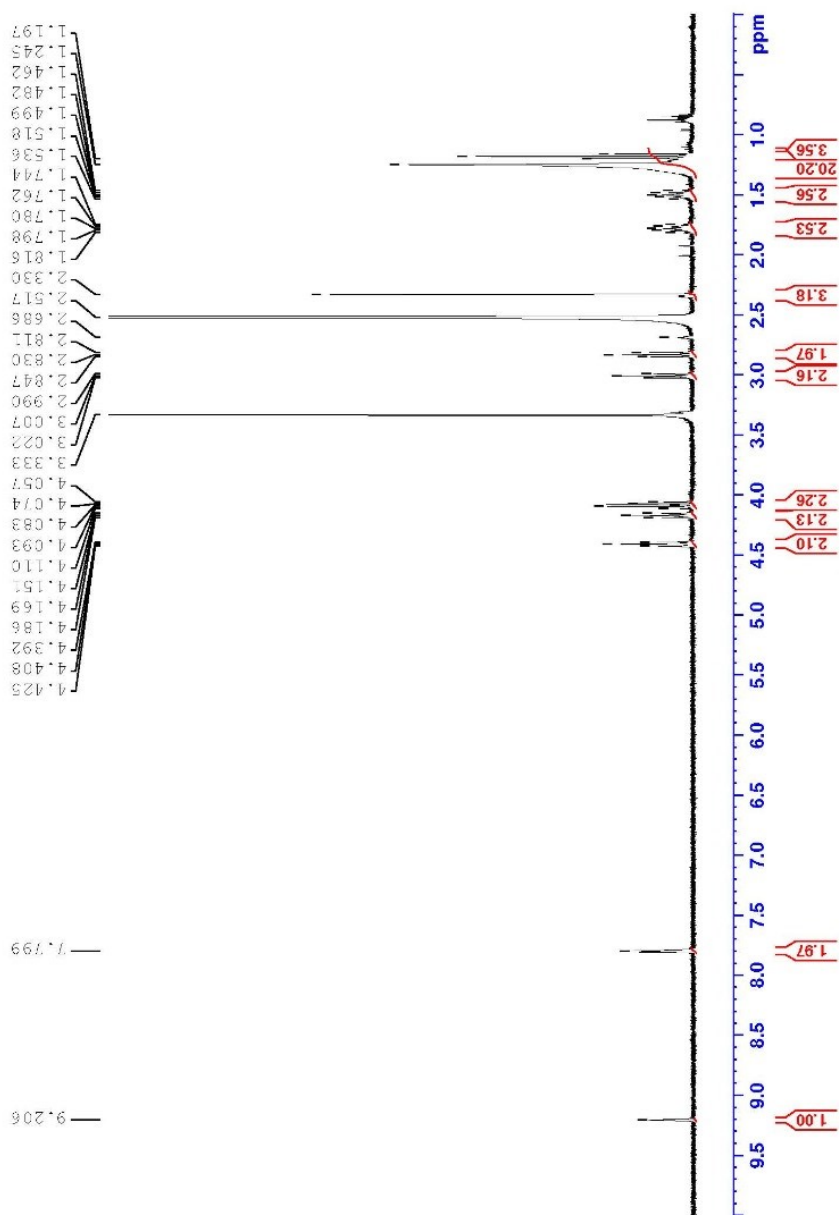




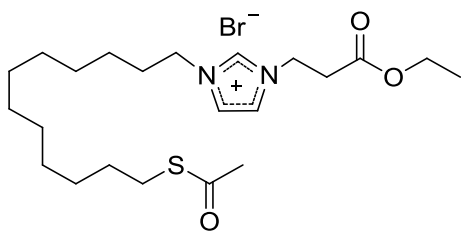
S-(12-bromododecyl) ethanethioate, ¹H, 400 MHz, DMSO-d₆

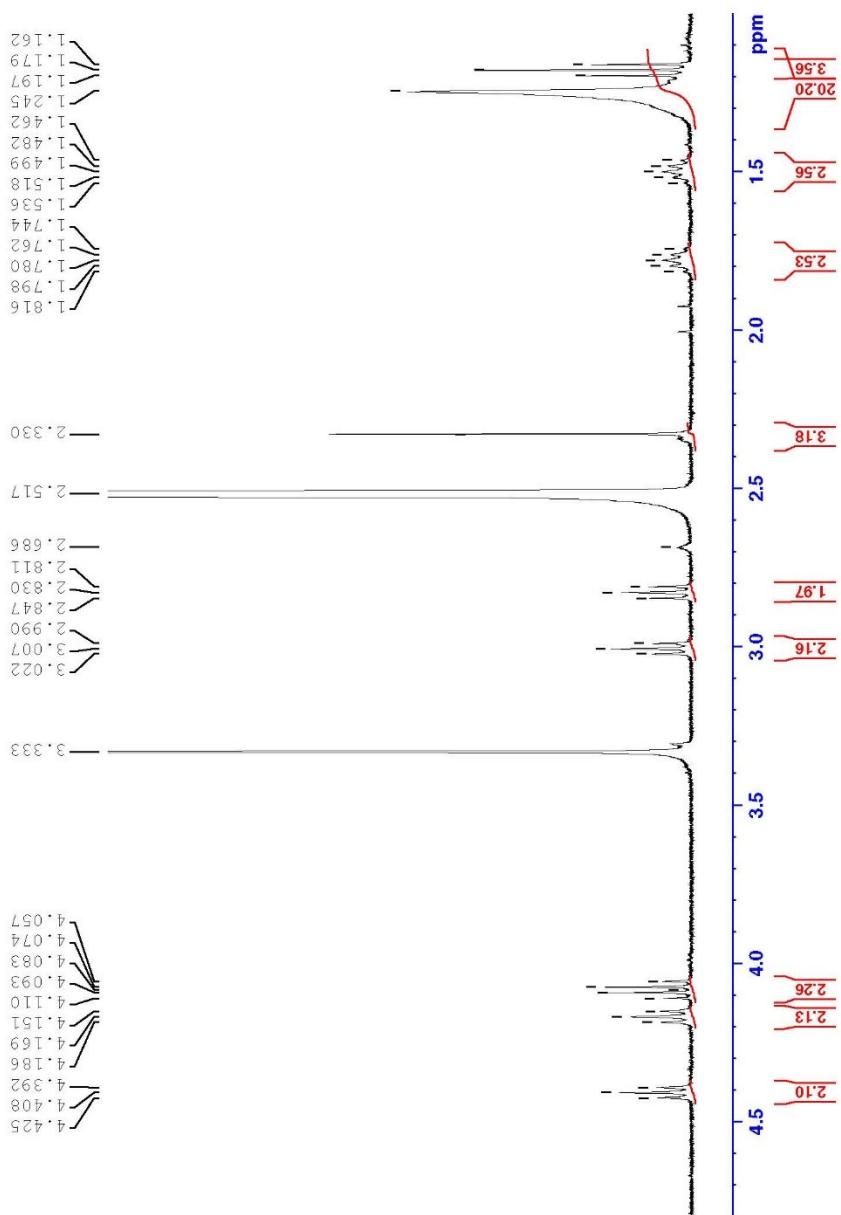


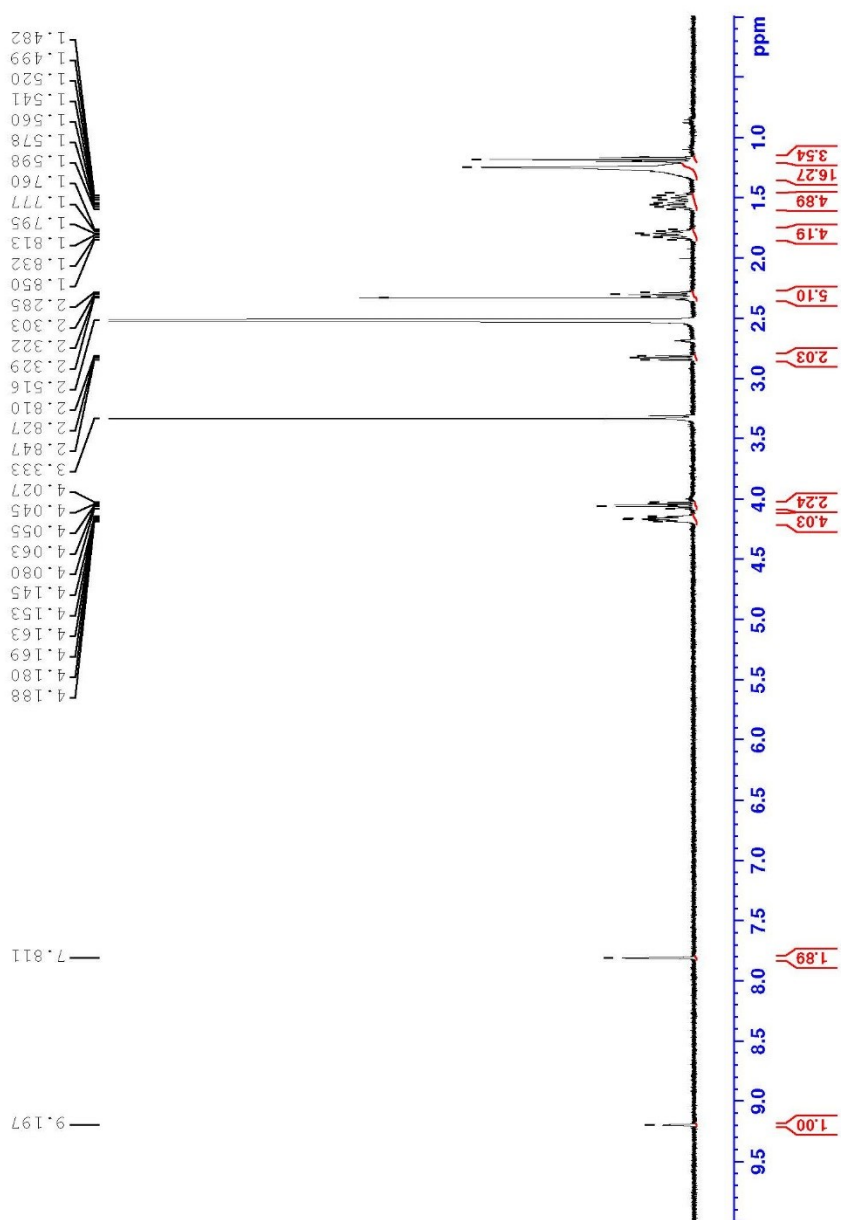




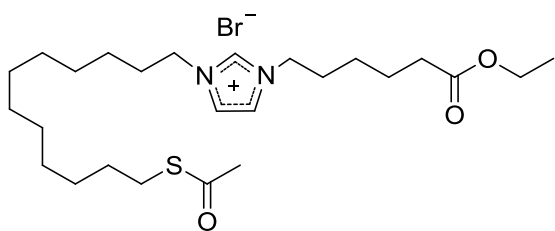
3-(12-(acetylthio)dodecyl)-1-(3-ethoxy-3-oxopropyl)-1H-imidazol-3-ium bromide, ^1H , 400 MHz, DMSO- d_6

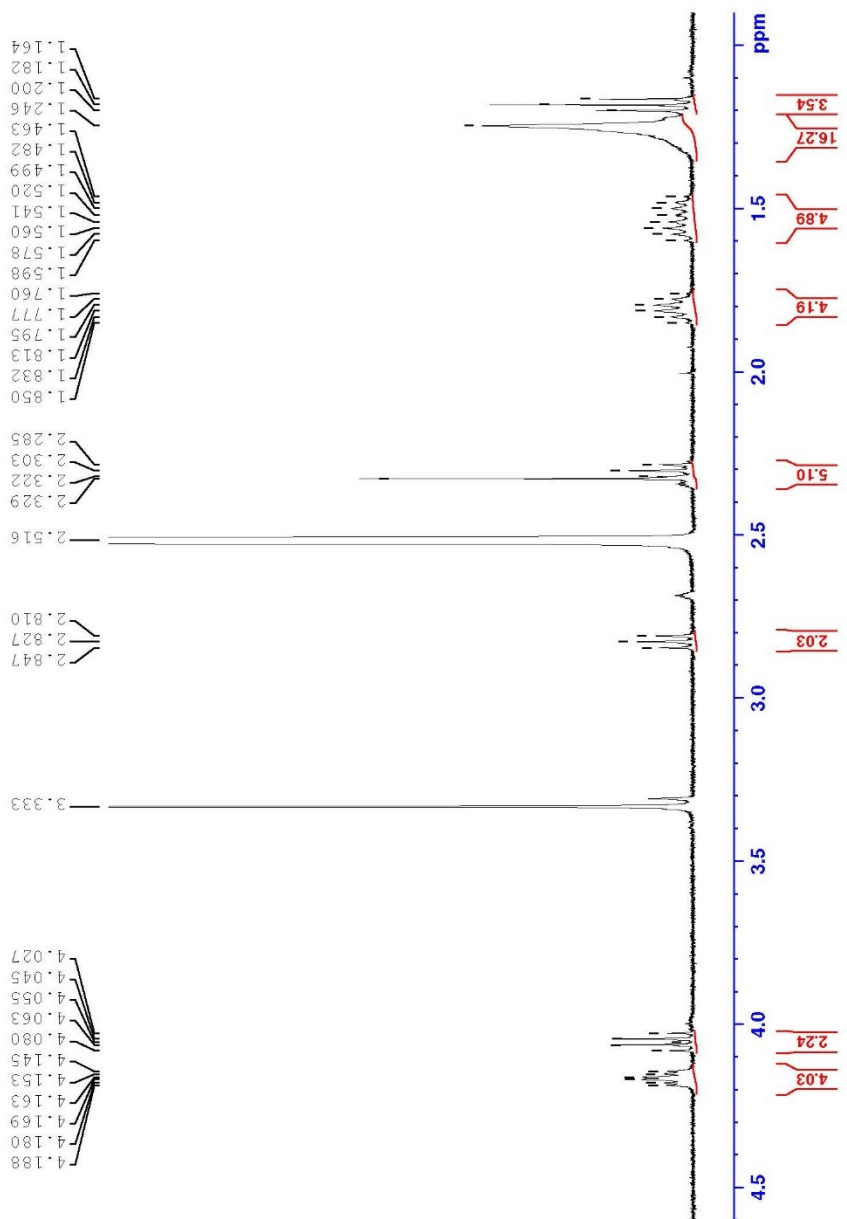


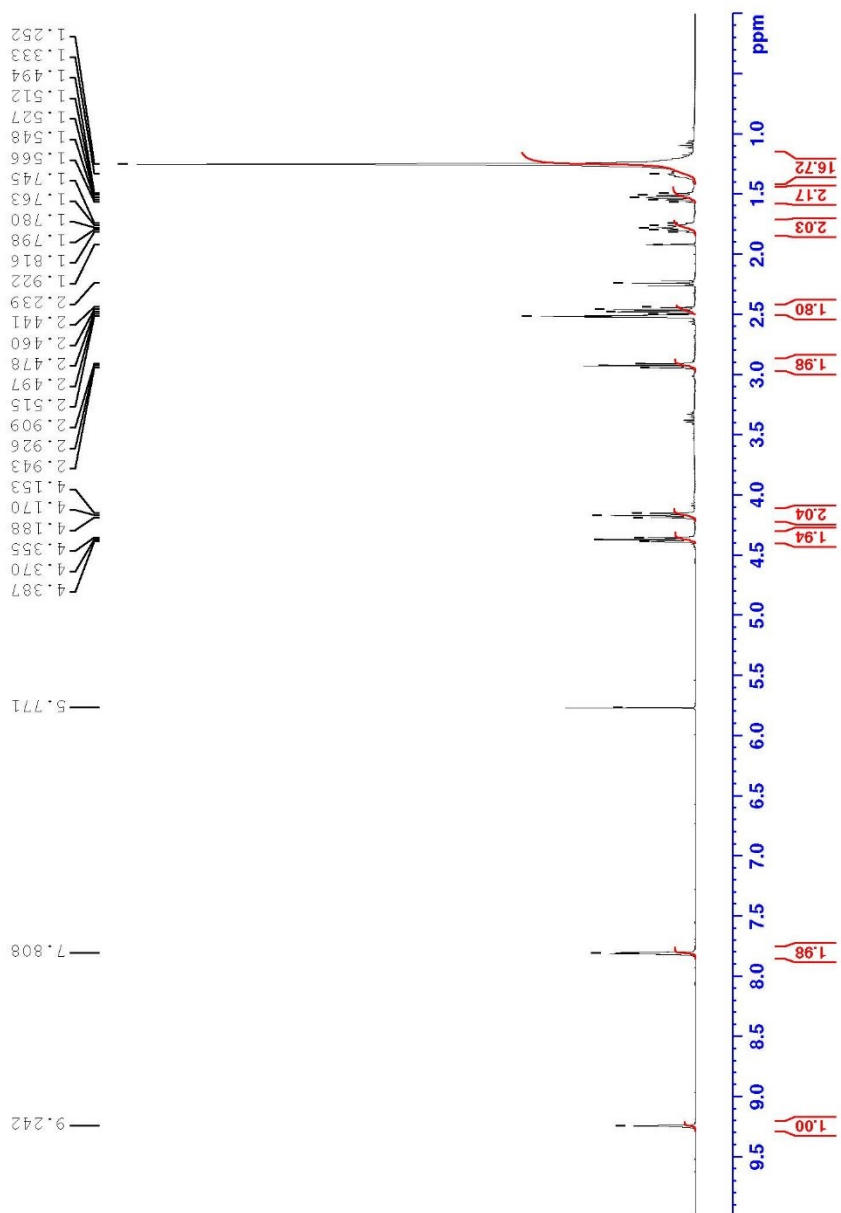




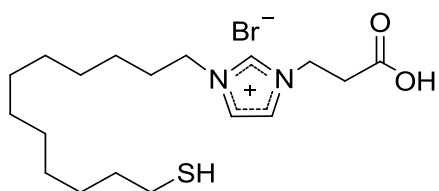
**3-(12-(acetylthio)dodecyl)-1-(6-ethoxy-6-oxohexyl)-
1H-imidazol-3-ium bromide, ^1H , 400 MHz, DMSO- d_6**

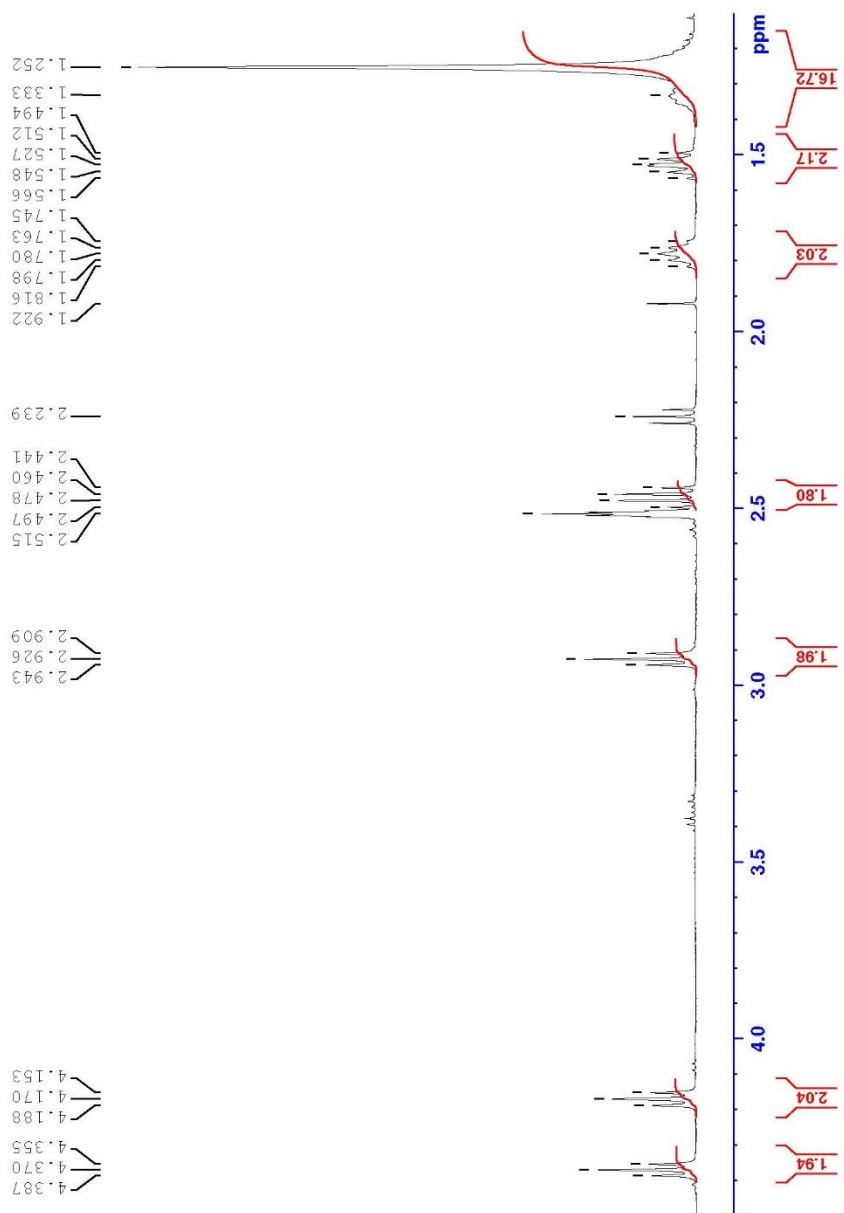


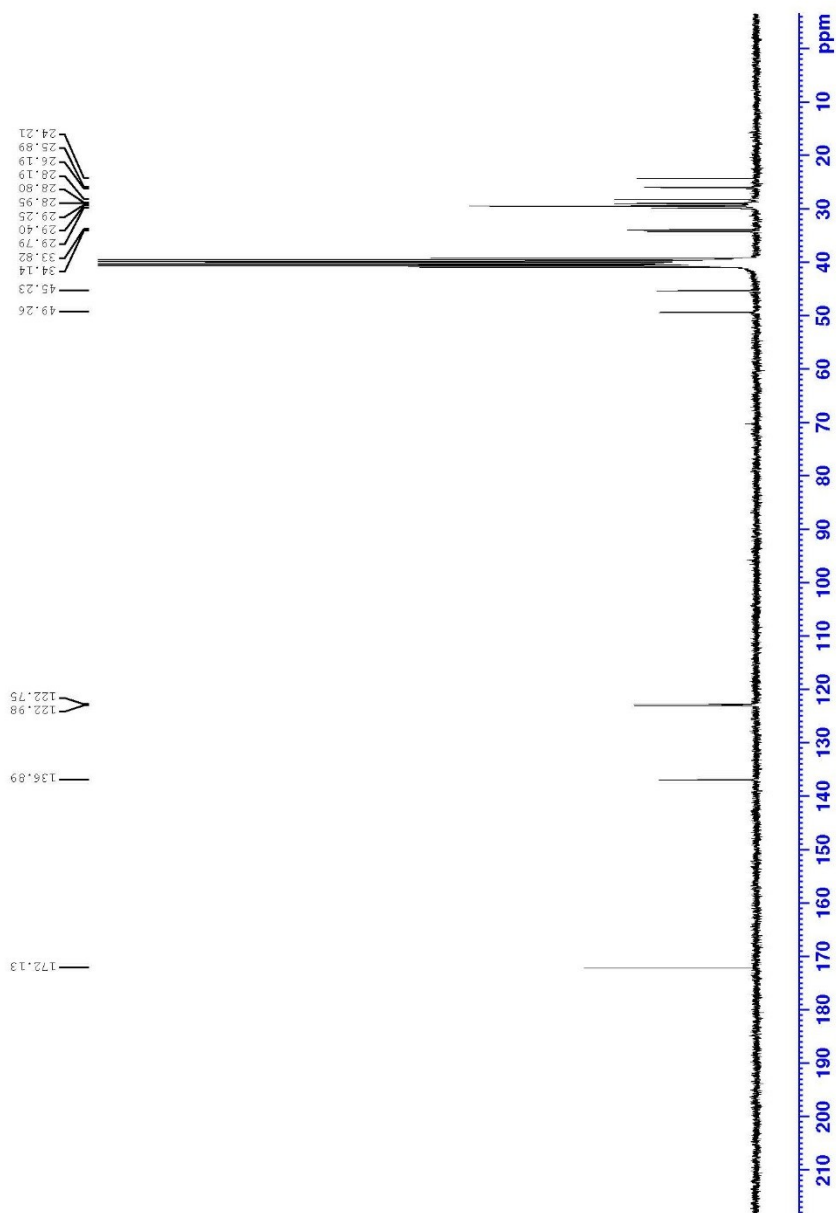




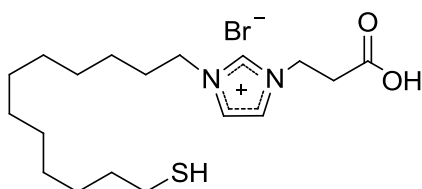
1-(2-carboxyethyl)-3-(12-mercaptododecyl)-1H-imidazol-3-ium bromide, ¹H, 400 MHz, DMSO-d₆

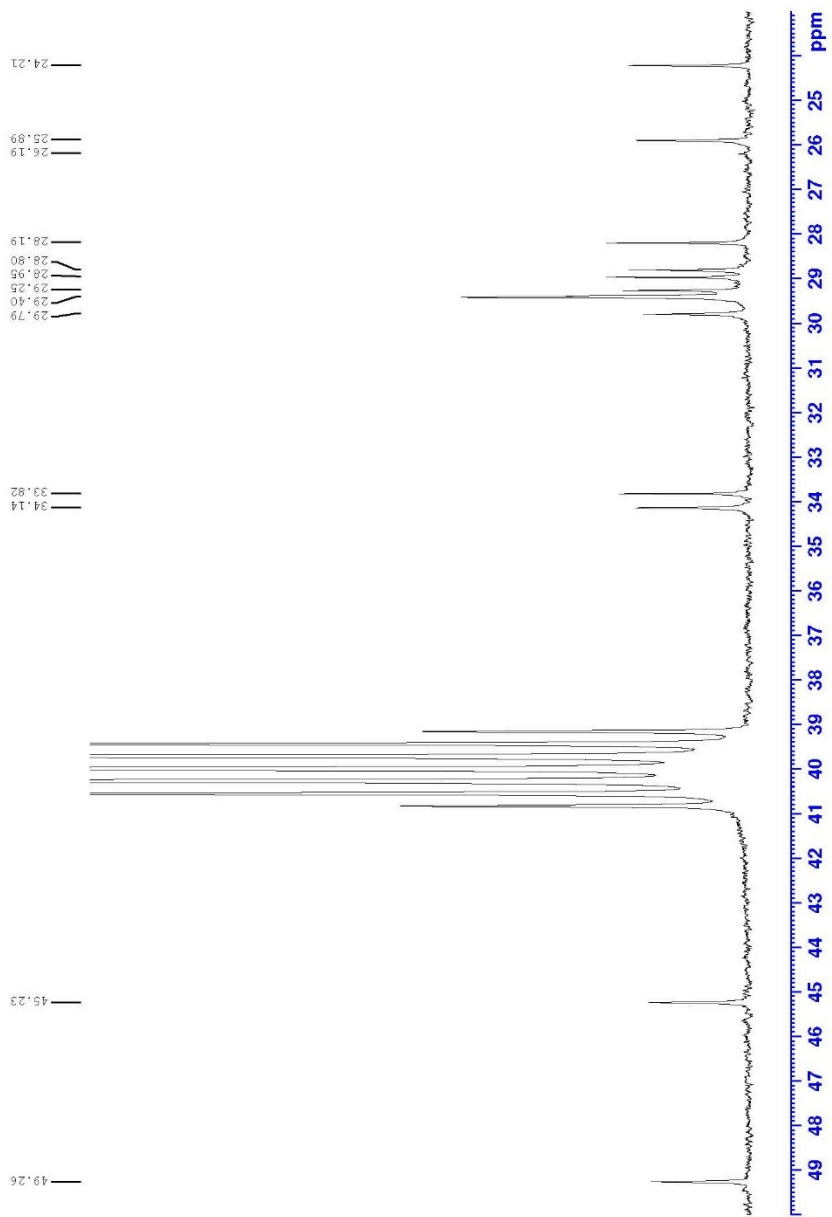


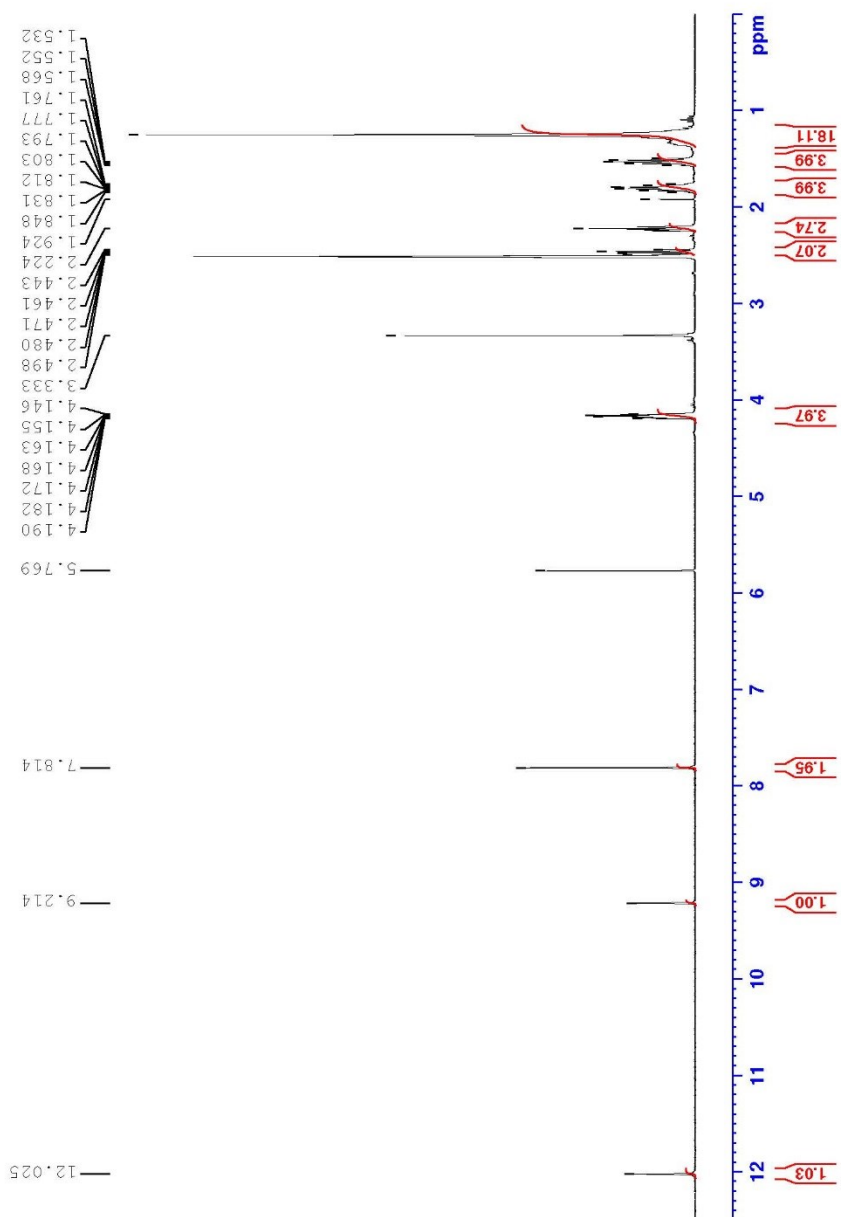




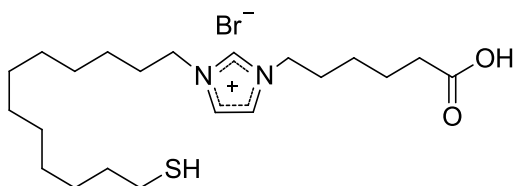
1-(2-carboxyethyl)-3-(12-mercaptododecyl)-1H-imidazol-3-ium bromide, ¹³C, 300 MHz, DMSO-d₆

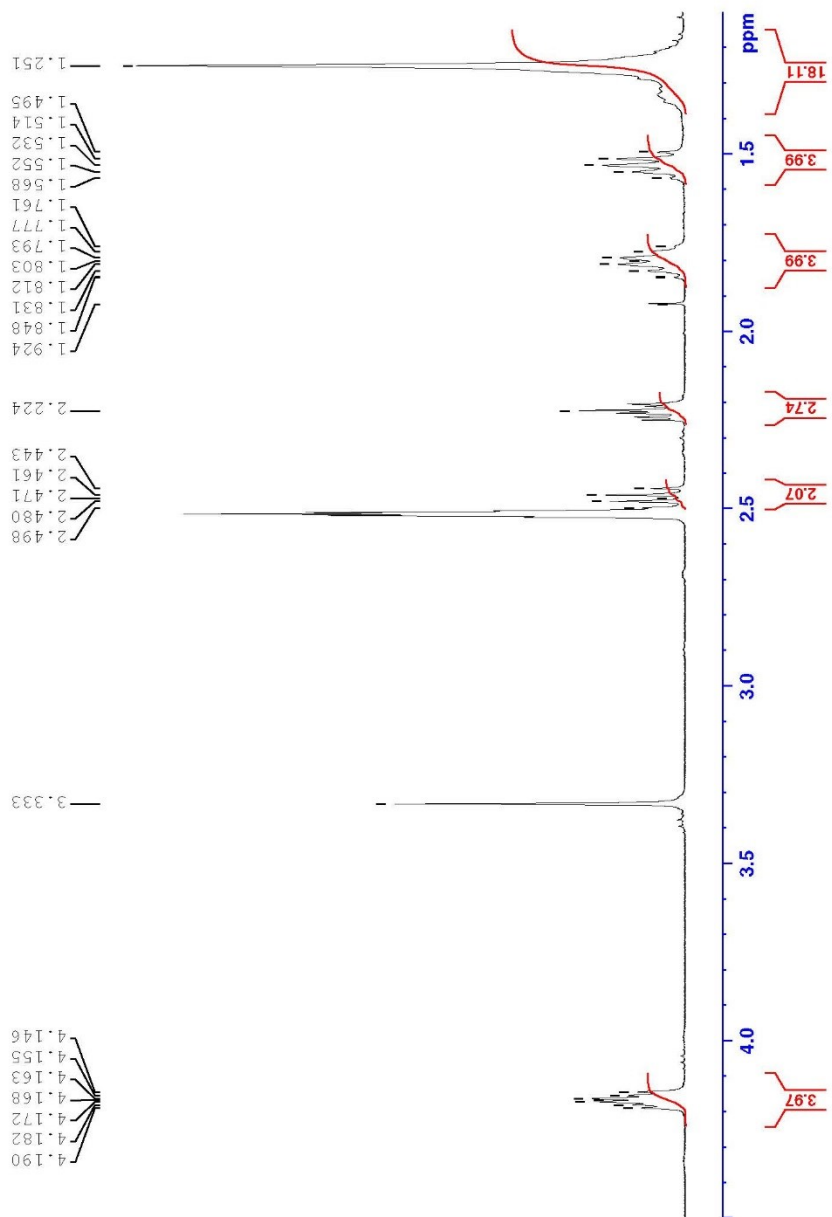


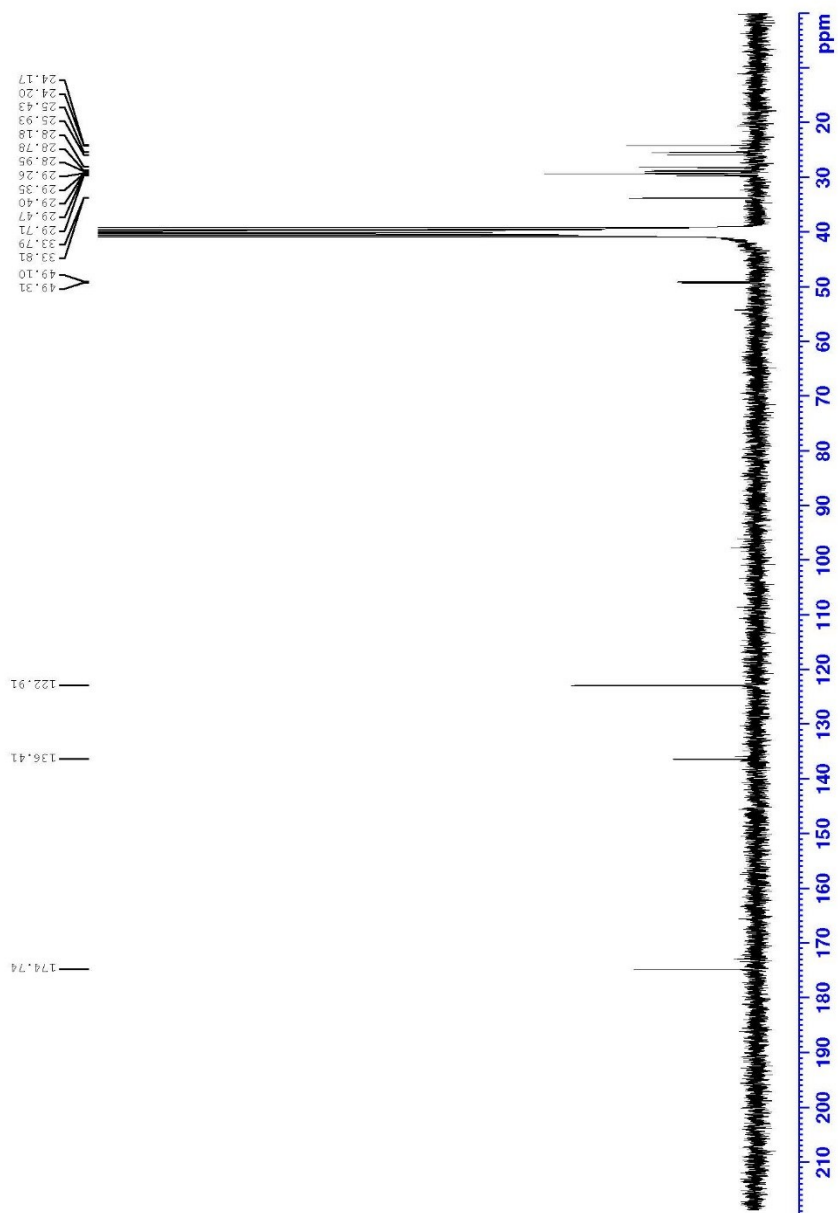




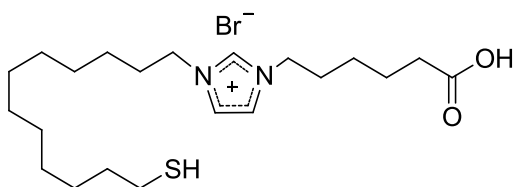
1-(5-carboxypentyl)-3-(12-mercaptododecyl)-1H-imidazol-3-ium bromide, ¹H, 400 MHz, DMSO-d₆

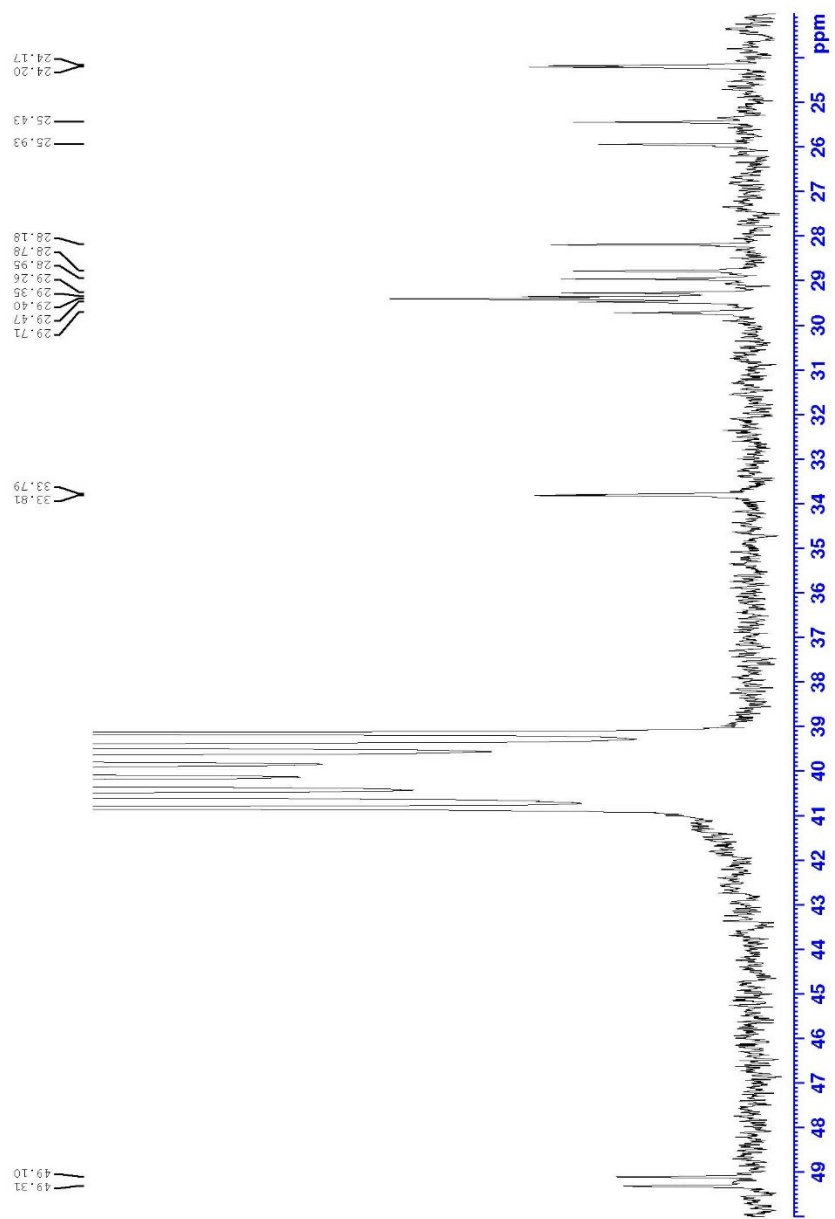






1-(5-carboxypentyl)-3-(12-mercaptododecyl)-1H-imidazol-3-ium bromide, ^{13}C , 300 MHz, DMSO-d6



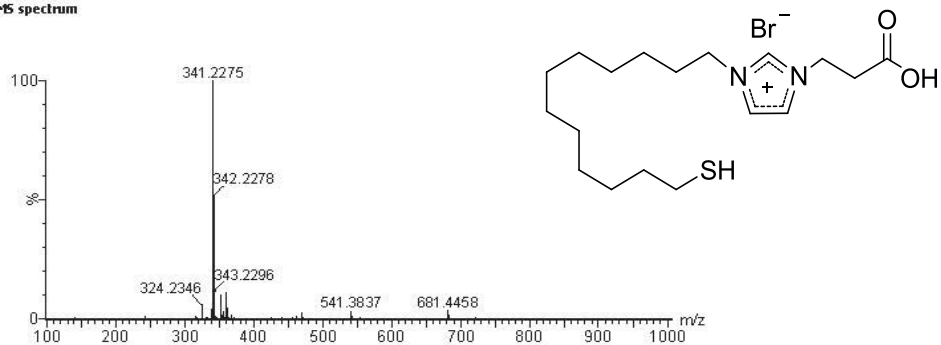


1-(2-carboxyethyl)-3-(12-mercaptododecyl)-1H-imidazol-3-ium bromide

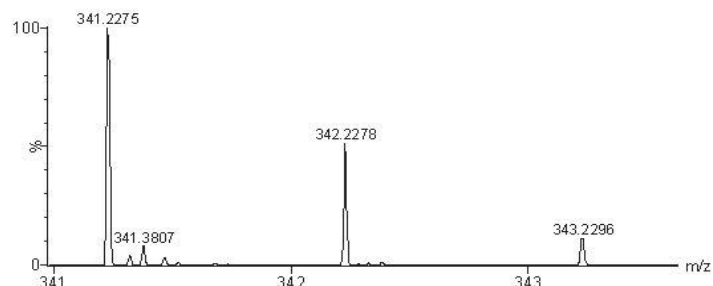
Masse Exacte

Data File AA-LJA **Sample Name** AA-LJA
Analysis Date December 15, 2016 **User Name** Simon
Acq Method ESI_Pos **DA Method** ESI_Pos
Instrument Synapt G2-Si
Comment

MS spectrum



MS zoomed spectrum



Ion	Ion Formula	Expe. m/z	Calc. m/z	Diff (ppm)	Diff (mDa)
(M+)	C ₁₈ H ₃₃ N ₂ O ₂ S	341.22750	341.22630	-3.52	-1.20

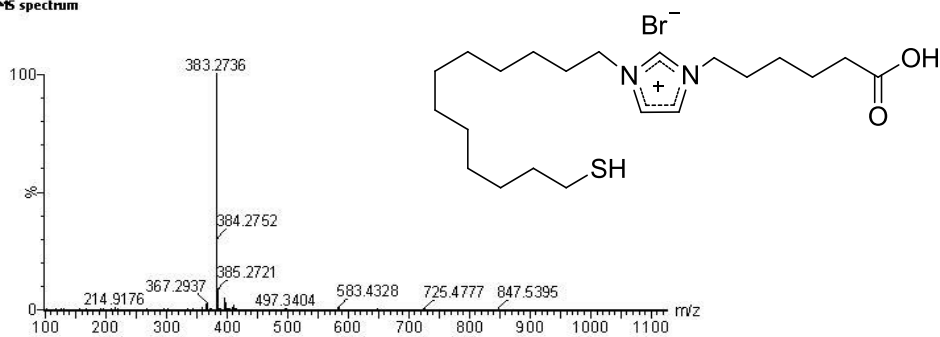
1-(5-carboxypentyl)-3-(12-mercaptododecyl)-1H-imidazol-3-ium bromide

Masse Exacte

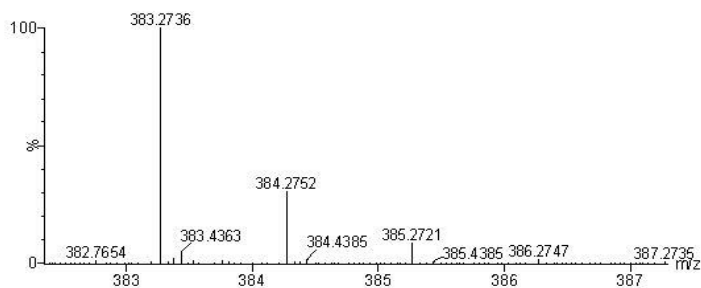
Data File AA-LIB
Analysis Date December 15, 2016
Acq Method ESI_Pos
Instrument Synapt G2-Si
Comment

Sample Name AA-LIB
User Name Simon
DAMethod ESI_Pos

MS spectrum



MS zoomed spectrum



Ion	Ion Formula	Expe. m/z	Calc. m/z	Diff (ppm)	Diff (mDa)
(M+)	C ₁₈ H ₃₁ N ₂ O ₂ S	383.27360	383.27320	-1.04	-0.40