

Université de Montréal

Étude d'interactions biologiques à l'aide de la résonance des plasmons de surface et de la spectroscopie de fluorescence

Par

Jérémie Labrecque-Carbonneau

Département de chimie, Université de Montréal

Faculté des arts et des sciences

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

Août 2016

©Jérémie Labrecque-Carbonneau, 2016

# Résumé

L'étude d'interactions biologiques est d'une importance primordiale pour la compréhension des mécanismes complexes se produisant dans tout être vivant. Ces interactions peuvent se produire entre protéines, oligonucléotides ou peptides, mais ne se limitent pas à ces catégories de biomolécules. Ces interactions biologiques entre biomolécules sont caractérisées par leur degré d'affinité et la cinétique de leur liaison. Il est donc important d'avoir des outils analytiques permettant de mesurer ces propriétés afin de caractériser des interactions entre biomolécules d'intérêt. L'objectif de ce mémoire était d'optimiser la résonance des plasmons de surface (SPR) pour l'étude de systèmes biologiques peu étudiés et pour caractériser l'interaction entre deux molécules biologiques. Cette technique repose sur l'assemblage de récepteurs à la surface d'un prisme recouvert d'une mince couche d'or. L'une des biomolécules étudiées est attachée à la surface du prisme tandis que la seconde est injectée en solution dans une cellule fluide recouvrant le prisme. Le signal produit résulte de la liaison entre les deux biomolécules et permet de déterminer les paramètres thermodynamiques ( $K_D$ ) et cinétiques ( $k_{on}$  et  $k_{off}$ ) associés au complexe. Ces propriétés seront exploitées dans ce mémoire pour établir des capteurs SPR permettant de caractériser l'interaction de la protéine CD36 (« Cluster of Differentiation-36 ») avec des peptides homologues au GHRP-6 (« Growth Hormone Releasing Peptide-6 »), l'interaction d'un ganglioside (GM1) avec la sous-unité B de la toxine cholérique (CTB) et un peptide synthétique, l'interaction entre des cytokines et le récepteur protéique soluble EB13 (« Epstein-Barr virus Induced gene-3 ») et l'interaction entre la protéine fluorescente verte (GFP) et une autre protéine provenant d'un collaborateur. Les capteurs SPR développés durant ce mémoire ont permis l'étude d'interactions pour lesquelles peu de solutions disponibles. Le mémoire décrira aussi brièvement un prototype d'appareil pouvant mesurer un signal de fluorescence provenant soit de la solution submergeant le biocapteur ou de sa surface lors de la même expérience.

**Mots clés :** Résonance des plasmons de surface, interactions biologiques, affinité, cinétique, biomolécules, fluorescence.

# Abstract

The understanding of biological interactions is of utmost importance if we are to comprehend the complex mechanisms taking place in living beings. These interactions can involve proteins, oligonucleotides and peptides, but are not limited to these types of biomolecules. Biological interactions are characterized by their affinity and binding kinetics. Therefore, it is extremely important to have an analytical tool able to measure these properties in order to characterize the interaction between biological molecules. This Master's research had the objective to optimize surface plasmon resonance spectroscopy (SPR) to study biological interactions of poorly characterized biomolecular interactions and to measure both affinity and kinetic parameters of the binding between several sets of relevant biological molecules. The SPR technique relies on the immobilization of a biological receptor on a gold-coated prism to create a biosensor. One of the studied biomolecules is anchored on the surface while the other one is flowed through a fluidic cell placed on top of the prism. The resulting measured signal results from the binding between the two biomolecules and allows us to determine thermodynamic ( $K_D$ ) and kinetic ( $k_{on}$  and  $k_{off}$ ) parameters associated with the biological complex. These properties of SPR were exploited in this thesis to study the interaction between the protein CD36 (Cluster of Differentiation 36) and peptides homologous to the GHRP-6 (Growth Hormone Releasing Peptide 6), the interaction between a ganglioside (GM1) and the Cholera toxin B sub-unit (CTB) and a synthetic peptide, the interaction of cytokines and the proteinaceous soluble receptor EB13 (Epstein-Barr virus Induced Gene 3) and the interaction between GFP (Green Fluorescent Protein) and another protein provided by a collaborator. The sensors developed for this Master's project allowed us to study complex interactions for which few standard methods of analysis exist. This Master's thesis also briefly describes an instrument prototype able to monitor either bulk or surface fluorescence during the SPR assay.

**Keywords:** Surface plasmon resonance, biological interactions, affinity, kinetic, biomolecules, fluorescence.

# Table des matières

Résumé .....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux .....	vi
Liste des figures .....	vii
Liste des symboles et abréviations .....	xiii
Remerciements.....	xvii
Chapitre 1 : Introduction .....	1
1.1 Résonance des plasmons de surface (SPR).....	2
1.1.1 Historique de la résonance des plasmons de surface.....	2
1.1.2 Théorie de la résonance des plasmons de surface .....	4
1.1.3 Types d'instrumentation.....	6
1.2 Biocapteurs .....	8
1.2.1 Principe d'un biocapteur.....	8
1.2.2 Fonctionnement d'un biocapteur à base de SPR.....	9
1.2.3 Détection d'événement de reconnaissance moléculaire .....	11
1.3 Chimie de surface .....	12
1.3.1 Adsorption non-spécifique .....	13
1.3.2 Surface de polyéthylène glycol .....	14
1.3.3 Surface de dextran.....	15
1.3.4 Surface d'alcanethiol .....	15
1.3.5 Surfaces zwitterioniques.....	16
1.3.6 Surfaces peptidiques.....	18
1.4 Méthodes d'immobilisation de récepteurs .....	19
1.4.1 Couplage peptidique.....	20
1.4.2 Hexamère d'histidine.....	21
1.4.3 Fusion de vésicules .....	23
1.5 Interactions biomoléculaires .....	24
1.5.1 Affinité .....	25
1.5.2 Cinétique.....	28
1.5.3 Limitation par le transport de masse (LTM) .....	30

1.6	Spectroscopie de fluorescence .....	32
1.6.1	Théorie .....	32
1.6.2	Fluorescence exaltée par un métal (MEF) .....	35
1.7	Objectif du mémoire .....	37
Chapitre 2 : Partie expérimentale.....		38
2.1	Résonance des plasmon de surface.....	38
2.1.1	Formation des substrats d'or.....	38
2.1.2	Formation des monocouches auto-assemblées .....	38
2.1.3	Acquisition des sensorgrammes .....	38
2.2	Interaction entre la CD36 et des peptides dérivés du GHRP-6.....	39
2.2.1	Immobilisation de la protéine CD36 à l'aide d'une étiquette de polyhistidine.....	39
2.2.2	Détermination des constantes d'affinité des différents peptides.....	40
2.3	Interaction entre le gène 3 induit du virus Epstein-Barr (EBI3) et des cytokines.....	40
2.3.1	Immobilisation de l'EBI3 et détection de cytokines à l'aide d'un couplage peptidique.....	40
2.3.2	Contrôle négatif pour la liaison de l'IL-6.....	41
2.3.3	Liaison du complexe EBI3/IL-6 au récepteur gp130 .....	41
2.3.4	Détermination de la constante de dissociation pour la liaison de l'IL-6 à l'EBI3.....	42
2.4	Interaction entre le GM1 et un peptide synthétique .....	42
2.4.1	Immobilisation du GM1 incorporé à une vésicule.....	42
2.4.2	Détermination des constantes de dissociation pour la sous-unité B de la toxine du choléra (CTB) et un peptide synthétique pour le GM1.....	43
2.5	Interaction entre la BP et la GFP.....	43
2.5.1	Immobilisation de la BP par couplage peptidique et liaison de la GFP .....	43
2.5.2	Immobilisation de la BP ou de la GFP à l'aide d'une étiquette de polyhistidine .....	44
2.5.3	Détermination de la constante de dissociation pour la liaison de la GFP et de la BP ....	44
2.6	Fluorescence .....	44
2.6.1	Préparation des substrats pour la détection d'ADN marqué .....	44
2.6.2	Acquisition des mesures pour l'ADN marqué.....	45
2.6.3	Préparation des substrats pour la détection de Rhodamine 6G .....	46
2.6.4	Acquisition des mesures de fluorescence pour la rhodamine 6G .....	46
Chapitre 3 : CD36 et peptides dérivés du GHRP-6.....		48
3.1	Immobilisation de la CD36.....	48
3.1.1	Dégradation de la CD36 au fil du temps .....	49

3.2	Analyse de peptides.....	50
3.3	Conclusion.....	55
Chapitre 4 : Interaction entre un peptide et le GM1.....		56
4.1	Immobilisation du GM1 au capteur.....	56
4.2	Liaison de la CTB au GM1 immobilisé.....	59
4.3	Liaison du peptide G23 au GM1.....	62
4.4	Conclusion.....	65
Chapitre 5 : Interactions entre des cytokines et l'EBI3.....		66
5.1	Interaction entre l'IL-6 et l'EBI3.....	66
5.2	Interaction entre l'IL-11 et l'EBI3.....	69
5.3	Détermination du $K_D$ de l'IL-6 pour l'EBI3.....	72
5.4	Interaction entre le complexe EBI3/IL-6 et le gp130.....	73
5.5	Conclusion.....	75
Chapitre 6 : Interaction entre les protéines BP et GFP.....		76
6.1	Immobilisation du récepteur.....	77
6.2	Détermination de la constante de dissociation de la GFP.....	79
6.3	Conclusion.....	85
Chapitre 7 : Combinaison de la SPR et de la fluorescence.....		86
7.1	Premier prototype d'instrument.....	86
7.2	Deuxième prototype d'instrument.....	90
7.3	Validation du second prototype.....	92
7.3.1	Suivi de la formation d'une couche de polyélectrolytes par SPR.....	93
7.3.2	Mesures de fluorescence en temps réel.....	96
7.3.3	Quantification par fluorescence.....	101
7.4	Conclusion.....	103
Chapitre 8 Conclusions.....		104
8.1	Perspectives.....	106
Bibliographie.....		108

# Liste des tableaux

Tableau 3.1 : Constante de dissociation et amplitude du déplacement SPR mesuré pour chaque peptide testé(n≥6).....	52
Tableau 4.1 : Constantes de dissociation trouvées pour la liaison d'analytes au GM1.....	64
Tableau 5.1 : Réponses SPR pour la détection de cytokines sur deux récepteurs biologiques.....	72
Tableau 6.1 : Comparaison des valeurs des constantes de dissociation obtenues par différentes méthodes à base de SPR ou de fluorescence.....	84
Tableau 7.1 : Paramètres analytiques pour la courbe d'étalonnage de la R6G obtenue avec le module de fluorescence.....	102

# Liste des figures

Figure 1.1 : Nombre de publications selon la base de données Thomson Reuters en utilisant <i>Surface plasmon resonance</i> comme mot-clé.....	3
Figure 1.2 : Schématisation d'un plasmon de surface à l'interface d'un métal et d'un milieu diélectrique excité par une source de lumière polarisée. Le plasmon de surface excité se propage le long de l'interface sur une distance de l'ordre du micromètre et décroît avec la distance.....	4
Figure 1.3 : Excitation d'un plasmon de surface par un faisceau lumineux à l'aide d'un prisme ou d'un réseau de diffraction .....	5
Figure 1.4 : Représentation des composantes nécessaires à un instrument à base de résonance des plasmons de surface à interrogation de longueurs d'ondes.....	7
Figure 1.5 : Organisation des différentes composantes d'un biocapteur fonctionnant à l'aide de la résonance des plasmons de surface et mesurant des changements de longueur d'onde d'absorption suite à l'interaction entre deux biomolécules causant un changement de l'indice de réfraction local à la surface du capteur.....	9
Figure 1.6 : Représentation d'un sensorgramme pour la détection d'un analyte (cercle bleu) par des anticorps (formes noires) fixés à une surface.....	12
Figure 1.7 : Défauts dans un film d'or brisant l'uniformité de la monocouche auto-assemblée et permettant à des protéines de s'adsorber de manière non-spécifique au capteur.....	13
Figure 1.8 : Structures moléculaires de deux alcanethiols, 11-MUA et 16-MHA, fréquemment utilisés pour la fabrication de SAM sur une surface d'or.....	16
Figure 1.9 : Liquides ioniques à base d'imidazolium modifiés avec une biotine (A) et une fonction acide (B). X <sup>-</sup> représente un contre-anion quelconque.....	17

Figure 1.10 : Structure moléculaire du peptide 3-MPA-LHDLHD utilisé dans le cadre de l'obtention des résultats présentés au chapitre 3. La section en magenta correspond au 3-MPA permettant de lier le peptide à la surface d'or et les acides aminés identifiés en vert, bleu et rouge correspondent respectivement à la leucine, l'histidine et l'acide aspartique.....	19
Figure 1.11 : Séquence des étapes permettant l'immobilisation d'une protéine avec une étiquette de polyhistidine. La partie rouge représente la monocouche de départ, la partie bleue le ligand de chélation, $M^{2+}$ un cation métallique et les sections vertes sont les résidus d'histidine de l'étiquette de polyhistidine attachée à la protéine.....	22
Figure 1.12 : Exemple fictif d'un ensemble de données respectant l'isotherme de Langmuir. Les points noirs représentent les valeurs expérimentales, la ligne bleue la modélisation de l'équation 1.8 et la ligne hachée noire la valeur déterminée pour le $K_D$ .....	28
Figure 1.13 : Diagramme de Jablonski représentant les processus d'absorption (flèches bleue et magenta), de fluorescence (flèches vertes) et de phosphorescence (flèches rouges). Les processus de conversion interne et inter-systèmes sont également montrés avec les flèches hachurées.....	33
Figure 2.1 : Image du second prototype du module de fluorescence.....	47
Figure 2.2 : Schéma du système optique développé pour la détection de fluorescence provenant de la surface du capteur SPR.....	47
Figure 3.1 : Diminution du signal mesuré par SPR lors de l'immobilisation de la CD36 au fil du temps avec un entreposage à 4°C entre chaque mesure .....	50
Figure 3.2 : Structure moléculaire du GHRP-6 ou L-histidyl-D-tryptophyl-L-alanyl-L-tryptophyl-D-phenylalanyl-L-lysineamide, un peptide synthétique reconnu pour lier la CD36. Les azapeptides testés par SPR sont tous dérivés de ce peptide.....	51
Figure 3.3 : Structures des peptides, le MT69 et le ST8. Les différences entre ces peptides et le GHRP-6 sont montrés en bleu et en rouge. Les atomes d'azote rouges remplacent un carbone- $\alpha$ et les régions bleues sont des modifications chimiques additionnelles.....	53
Figure 3.4 : Sensorgrammes montrant le comportement de deux peptides différents. En A, le ST8, a un $K_D$ de 12 $\mu$ M et en B, le MT69, a un $K_D$ de 5,9 $\mu$ M. L'amplitude de leur signal mesurée est respectivement de 1,9 et de 3,7nm.....	54

Figure 4.1 : Structure moléculaire du GM1. À gauche on retrouve les unités de sucres responsables de la reconnaissance moléculaire avec les molécules dans le milieu extracellulaire et à droite on retrouve la chaîne d'acide stéarique et une sphingosine permettant l'ancrage du GM1 à la membrane cellulaire.....57

Figure 4.2 : Schéma d'une vésicule exposant le GM1. Les bâtonnets noirs représentent les molécules de POPC s'assemblant en bicouche et la molécule rouge est le GM1 s'incorporant à la vésicule.....58

Figure 4.3 : Fusion d'une vésicule sur un substrat d'or fonctionnalisé avec de l'ODT. Les chaînes inclinées présentes initialement forment la monocouche d'ODT et les chaînes noires s'incorporant dans la monocouche sont les phospholipides de la vésicule. En rouge, on a le récepteur GM1 toujours exposé à la solution.....59

Figure 4.4 : Sensorgramme pour la détermination de la constante de dissociation de la CTB sur le GM1 immobilisé à la surface du capteur SPR.....60

Figure 4.5 : Modélisation de l'isotherme de Langmuir à partir des données expérimentales obtenues pour la liaison de la CTB au GM1 ( $R^2=0,9578$ ). La ligne hachurée indique la valeur de la constante de dissociation déterminée.....61

Figure 4.6 : Sensorgramme pour la détermination de la constante de dissociation du peptide G23 sur le GM1 immobilisé à la surface du capteur SPR.....63

Figure 4.7 : Modélisation de l'isotherme de Langmuir à partir des données expérimentales obtenues pour la liaison du peptide G23 au GM1 ( $R^2=0,9916$ ). La ligne hachurée indique la valeur de la constante de dissociation déterminée.....64

Figure 5. 1 : Sensorgrammes pour la détection d'une solution de 680nM d'IL-6. En A, l'EBI3 est employé comme récepteur tandis qu'en B le G-CSFR a été immobilisé. L'immobilisation des récepteurs à l'aide d'un couplage peptidique est suivie de la désactivation des groupes réactifs. Finalement, la liaison de l'IL-6 est montrée.....67

Figure 5.2 : Comparaison de la liaison de l'IL-6 sur l'EBI3 (courbe grise) et sur le G-CSFR (courbe noire). Dans les deux cas, une solution de 680 nM d'IL-6 dans du PBS pH 7,4 a été injectée à la surface du capteur. Les données sont directement tirées des sensorgrammes de la figure 5.1, mais on été mises à 0 pour superposer les injections d'IL-6.....69

Figure 5.3 : Sensorgramme pour la liaison de l'IL-11 au récepteur EBI3. Une solution de 680nM d'IL-11 a été utilisée pour la détection. L'immobilisation de l'EBI3, la désactivation des sites actifs et la liaison de l'IL-11 sont montrées.....	70
Figure 5.4 : Liaison de l'IL-6 et de l'IL-11 sur le récepteur EBI3 immobilisé à la surface du capteur. La concentration des cytokines utilisée est de 680 nM dans du PBS pH 7,4.....	71
Figure 5.5 : Modélisation de l'isotherme de Langmuir à partir des données expérimentales obtenues pour la liaison de l'IL-6 à l'EBI3 ( $R^2=0,992$ ). La ligne hachurée indique la valeur de la constante de dissociation déterminée.....	71
Figure 5.6 : Sensorgrammes normalisés pour la réponse SPR mesurée lors de la liaison au gp130 du complexe IL-6/EBI3 (gris foncé) et de l'EBI3 humain seul (gris pâle). Les solutions de complexe et d'EBI3 ont une concentration de 90 nM.....	72
Figure 6.1 : Immobilisation de la GFP à l'aide d'une étiquette de polyhistidine et injection d'une solution de protéine BP.....	77
Figure 6.2 : Immobilisation de la GFP à l'aide d'une réaction de couplage peptidique suivie de l'injection de solutions de BP de concentrations entre 0,5 nM et 1000 nM.....	78
Figure 6.3 : Immobilisation de la BP à l'aide d'une réaction de couplage peptidique suivie de l'injection d'une solution de GFP à 1,7 $\mu$ M.....	79
Figure 6.4 : Sensorgramme pour la détermination de la constante de dissociation de la GFP pour la protéine BP immobilisée.....	80
Figure 6.5 : Modélisation de l'isotherme de Langmuir à partir des données expérimentales obtenues pour la liaison de la GFP à la BP ( $R^2=0,9865$ ). La ligne hachurée indique la valeur de la constante de dissociation déterminée.....	81
Figure 6.6 : Réponse SPR pour l'injection de différentes solutions de GFP à une couche de protéines BP immobilisées sur cinq biocapteurs différents. L'axe y a été corrigé pour la ligne de base et l'axe des x ajusté pour superposer les différents essais. Les concentrations de GFP injectées sont de 0,1 $\mu$ M (rouge), 0,3 $\mu$ M (jaune), 0,9 $\mu$ M (mauve), 2,7 $\mu$ M (vert) et 8,1 $\mu$ M (cyan). Avant et après l'injection des solutions de GFP le capteur est rincé dans du PBS pH 7,4.....	82

Figure 6.7 : Modélisation de l'isotherme de Langmuir à partir des données expérimentales obtenues pour la liaison de la GFP à la BP à l'aide de la seconde méthode ( $R^2=0,9194$ ). La ligne hachurée indique la valeur de la constante de dissociation déterminée.....83

Figure 7.1 : Schéma du module de fluorescence développé. Les flèches vertes représentent le parcours optique des photons de la source d'excitation et les flèches jaunes le parcours optique des photons de fluorescence. Le prisme d'or se trouve sous le module de sorte que le faisceau de la source d'excitation soit focalisée à sa surface.....87

Figure 7.2: Mesure SPR-Fluorescence à l'aide du premier prototype d'instrument développé. Le panneau A montre le signal SPR obtenu pour la fonctionnalisation du capteur avec un brin d'ADN de capture et l'hybridation avec ce brin d'un second brin complémentaire marqué du fluorophore JOE. Le panneau B montre la moyenne et l'écart-type des mesures de fluorescence prises à la fin de chacune de ces étapes.....89

Figure 7.3 : Cellule fluide de PDMS employée avec le second prototype de système combinant la SPR et la fluorescence. Cette dernière est dotée d'une grande cellule de mesure et d'un plus petit canal de référence. Cette cellule permet donc toujours de corriger les réponses SPR avec le canal de référence et maximise l'aire utilisable pour les mesures de fluorescence.....91

Figure 7.4 : Les vis sur l'image A permettent de déplacer le module de fluorescence sur l'axe longitudinal du prisme tandis que les vis de l'image B permettent de le déplacer sur la largeur du prisme.....92

Figure 7.5 : Spectres d'excitation (ligne hachurée) et d'émission (ligne solide) de la rhodamine 6G.....93

Figure 7.6 : Structures moléculaires de la rhodamine 6G (A), du poly(hydrochlorure d'allylamine (B) et du polystyrène sulfonate (C).....94

Figure 7.7 : Schéma de l'assemblage couche-par-couche du PAH et du PSS sur un film d'or fonctionnalisé avec l'acide 3-mercaptopropionique. Dans la figure, un assemblage PAH/PSS/PAH est montré.....95

Figure 7.8 : Assemblage des bicouches polymériques sur la surface du capteur suivi par SPR. Cinq cycles successifs d'injections de PAH et de PSS sont faits avec une injection de NaCl 0,1 M entre chaque solution de polymère. De l'eau déionisée est ajoutée à la toute fin.....96

Figure 7.9 : Signal fluorescent en temps réel pour l'injection des différentes solutions de R6G sur l'assemblage polymérique .....97

Figure 7.10 : Signal normalisé moyen mesuré par l'APD pour les différentes concentrations de R6G injectées. Le graphique A montre les valeurs obtenues pour la fluorescence mesurée dans les solutions de fluorophores, tandis que le graphique B montre celles obtenues après le rinçage de chacune des solutions par l'eau déionisée. Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type sur chacune des mesures.....98

Figure 7.11: Modélisation de l'isotherme de Langmuir à partir des données de fluorescence expérimentales pour les fluorophores liés à la surface du capteur. ( $R^2=0,977$ ).....100

Figure 7.12: Courbe d'étalonnage pour la détection de la R6G en solution obtenue avec le module de fluorescence. L'équation de la courbe est  $y=154,32x +49,716$ . Le coefficient de détermination est de 0,9935.....101

# Liste des symboles et abréviations

- 3-MPA : Acide 3-mercaptopropionique (*3-mercaptopropionic acid*)
- 11-MUA : Acide 11-mercaptoundécanoïque (*11-mercaptoundecanoic acid*)
- 16-MHA : Acide 16-mercaptohexadécanoïque (*16-mercaptohexadecanoic acid*)
- ADN : Acide désoxyribonucléique
- ANS : Adsorption non-spécifique
- APD : Photodiode Avalanche (*Avalanche photodiode*)
- ARMD : Dégénérescence maculaire liée à l'âge (*Age-related macular degeneration*)
- ATR : Réflexion totale interne (*Attenuated total reflectance*)
- BSA : Albumine de sérum bovin (*Bovine serum albumin*)
- CTB : Sous-unité B de la toxine du choléra (*Cholera toxin B sub-unit*)
- DMF : N,N-Diméthyleformamide
- EBI3 : Gène 3 induit du virus d'Epstein-Barr (*Epstein-Barr virus induced gene 3*)
- EDC : 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
- EDTA : Acide éthylène diamine tétraacétique (*ethylenediaminetetraacetic acid*)
- ELISA : Dosage d'immunoabsorption par enzyme liée (*enzyme-linked immunosorbent assay*)
- $\epsilon_s$  : Permittivité du milieu diélectrique
- $\epsilon_m$  : Permittivité du métal
- FRET : Transfert d'énergie entre molécules fluorescentes (*Fluorescence resonance energy transfer*)
- G-CSFR : Récepteur du facteur de stimulation des colonies de granulocytes (*Granulocyte colony-stimulating factor receptor*)
- GFP : Protéine fluorescente verte (*Green fluorescent protein*)
- GHRP : Peptide de relâche de l'hormone de croissance (*Growth hormone releasing peptide*)
- HBSS : Solution saline balancée de Hank (*Hank's balanced salt solution*)
- hCG : Hormone chorionique ganotrope humaine (*human chorionic gonotropin*)
- IL-6 : Interleukine 6
- IL-11 : Interleukine 11

IMAC : chromatographie d'affinité (*Immobilized metal ion affinity chromatography*)

kDa : Kilodalton

L.D. : Limite de détection

LED : Light-emitting diode (Diode électroluminescente)

LI : Liquide ionique

$k_F$ : Taux d'émission de fluorescence

$k_m$ : Taux d'émission radiative associé au métal

$k_{nr}$ : Taux de désactivation non-radiative.

LTM : Limitation par le transport de masse

$\eta$  : Indice de réfraction

MEF : Fluorescence exaltée par un métal (*metal-enhanced fluorescence*)

MeOH : Méthanol

NHS : N-hydroysuccinimide

NTA : Acide nitrilotriacétique (*Nitrilotriacetic acid*)

ODT : Octadécylthiol

PAH : Poly(hydrochlorure d'allylamine ( *Poly(allyamine hydrochloride)* )

PBS : Tampon phosphate salin (*Phosphate buffered saline*)

PC : Phosphatidylcholine

PCR : Réaction en chaîne par polymérase (*Polymerase chain reaction*)

PDMS : Polydiméthylsiloxane

PE : Phosphatidyléthanolamine

PEG : Polyéthylène glycol

PEO : Oxyde de polyéthylène

PMT : Tube photomultiplicateur (*photomultiplier tube*)

POPC : 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-phosphocholine

PS : Phosphatidylsérine

PSS : Polystyrène sulfonate

QCM : Microbalance à quartz (*Quartz crystal microbalance*)

R6G : Rhodamine 6G

RMN : Résonance magnétique nucléaire

$\Phi$  : Rendement quantique

$\Phi_m$  : Rendement quantique d'un fluorophore couplé avec une structure métallique

SAM : Monocouche auto-assemblée (*self assembled monolayer*)

SPR : Résonance des plasmons de surface (*Surface plasmon resonance*)

$\tau$  : Temps de vie de l'état excité d'un fluorophore

$\tau_m$  : Temps de vie de l'état excité d'un fluorophore couplé avec une structure métallique

$\Theta$  : Angle d'incidence du faisceau lumineux incident

*À mon grand-père Roch, premier scientifique de  
la famille et un modèle pour moi sur bien des aspects.  
J'espère que ce mémoire est à la hauteur de tes attentes  
et que tu es heureux de me voir marcher dans tes pas.*

# Remerciements

Je tiens particulièrement à remercier mes parents, Yvan Carbonneau et Sylvie Labrecque, qui m'ont soutenu dans toutes les facettes de ma vie jusqu'à ce jour. Sans leur soutien au quotidien et la confiance qu'ils me témoignent, je n'aurais sans aucun doute jamais persévéré jusqu'à ce point. Je remercie aussi ma sœur pour son support et son appui lorsque le besoin s'en fait sentir. Bien entendu, je ne peux pas passer sous silence le support indéfectible de ma copine, Stéphanie Guindon, qui malgré sa profonde incompréhension de ce que je faisais au quotidien ces deux dernières années s'est intéressée à ce défi qu'est la maîtrise. Sa confiance inébranlable en moi m'a encouragé à persévérer ces six dernières années et je l'espère pour plusieurs encore.

Bien entendu, je tiens à remercier tous les membres du groupe avec qui j'ai cheminé ces dernières années : Julien Breault-Turcot pour ses conseils toujours avisés qu'il donnait sans compter, Alexandra Aubé pour m'avoir pris comme stagiaire et son attitude positive en tout temps, Maxime Couture, Hugo-Pierre Poirier-Richard et Mathieu Ratel avec qui j'ai passé beaucoup de temps dès mon premier stage en 2012 et avec qui ont été aimables en tout temps (bon...ça ne s'applique pas à Hugo) et évidemment Félix Lussier et Geneviève Granger avec qui j'ai eu le plaisir de faire mon baccalauréat et d'entamer ma maîtrise. Je remercie également tous les autres membres du groupe avec qui j'ai eu le plaisir de travailler.

En plus de tous ces gens, je ne peux passer sous silence la contribution plus silencieuse de gens avec qui j'ai passé beaucoup de temps ces dernières deux années. En premier lieu, Simon Comtois-Marotte (qui croit que je ne peux pas différencier une rocher d'une patate), Élisabeth-Ann Kranjec et Audrey Gosselin Janelle avec qui j'ai longuement discuté jour après jour en prenant mon café matinal. Les moments passés ensemble m'étaient très chers et le sont toujours aujourd'hui. Un merci particulier à Thierry aussi pour l'attention particulière qu'il portait à la plante de mes pieds. Également, un gros merci à tous les membres de l'atelier du département de chimie, Jean-François Myre, Martin Lambert, Louis Beaumont, Yves Teasdale, Antoine Hamel et Cédric Ginart, qui m'ont tous à un moment donné un coup de main.

Finalement, un immense merci pour mon directeur de recherche Jean-François Masson qui m'a donné l'occasion d'effectuer des travaux dans son groupe, m'a encadré au fil des ans et a fait de moi un scientifique plus complet que je ne l'aurais espéré. Sous sa tutelle, j'ai pu apprendre énormément

et il a toujours été présent m'épauler et me donner des pistes de solutions lorsque des problèmes survenaient.

# Chapitre 1 : Introduction

Ce mémoire est consacré à l'étude d'interactions biologiques, un aspect crucial des sciences de la santé. En effet, ces interactions impliquant un récepteur et un analyte sont primordiales pour plusieurs domaines, qu'il s'agisse du développement de médicaments, de la pharmacologie ou pour poser un diagnostic médical. Afin d'étudier de tels systèmes biologiques, l'utilisation de biocapteurs est devenue une des méthodes de choix en recherche. Les biocapteurs utilisent un support solide servant de transducteur et permettant l'immobilisation d'une molécule biologique. L'exposition de ce récepteur greffé à la surface du transducteur à une solution d'un analyte permet de caractériser l'interaction entre l'analyte et le récepteur immobilisé à l'aide du signal généré par le transducteur. La fabrication de ces biocapteurs est un défi en elle-même et n'est pas identique pour chaque système biologique étudié. En effet, l'interaction entre deux molécules en solution est différente de l'interaction entre ces mêmes molécules si l'une d'entre elles est fixée à une surface. De plus, afin de reproduire l'activité biologique du récepteur sur le biocapteur, il est important de s'assurer que la surface utilisée soit biocompatible et qu'elle oriente idéalement le site actif où se produit la liaison vers la solution contenant l'analyte. La résonance de plasmons de surface est devenue l'une des techniques de prédilection employée en recherche pour l'analyse d'interactions biologiques et la spectroscopie de fluorescence est une autre technique employée très fréquemment dans le domaine des sciences biologiques. L'utilisation de ces méthodes sera démontrée pour l'étude d'interactions entre différentes séries de biomolécules.

Cette introduction aura pour but de détailler certains principes nécessaires à la compréhension des résultats montrés à partir du chapitre 3. Ainsi, la spectroscopie de résonance des plasmons de surface (SPR), la technique principale derrière les résultats présentés dans ce mémoire, sera décrite. Ensuite, une brève description de ce qu'est un biocapteur sera donnée. Les concepts de chimie de surface nécessaires à la formation d'un biocapteur optique fonctionnant à l'aide de la SPR seront par la suite établis. Différentes techniques d'immobilisation de récepteurs biologiques seront aussi détaillées. Également, les paramètres thermodynamiques et cinétiques pouvant être déterminés à partir des résultats obtenus par SPR seront montrés. Finalement, différents aspects de la spectroscopie de fluorescence seront étayés afin de conclure cette introduction. Chacune de ces sections a pour objectif

de montrer les limitations et les contraintes associées aux expériences réalisées, mais également comment ces difficultés peuvent être surmontées.

## 1.1 Résonance des plasmons de surface (SPR)

Cette section couvrira l'histoire et les fondements de la spectroscopie de la résonance des plasmons de surface, ainsi que les types d'instrumentations à base de résonance des plasmons de surface. Cette technique est celle qui fut employée pour l'étude de chacun des systèmes biologiques présentés dans ce mémoire. Les prochaines sous-sections permettront au lecteur d'avoir une vue d'ensemble et une bonne compréhension des principes de base physiques derrière le phénomène.

### 1.1.1 Historique de la résonance des plasmons de surface

La résonance des plasmons de surface est une technique utilisée en chimie analytique depuis le début des années 1990 avec l'apparition du premier instrument commercial fabriqué par Pharmacia Biosensor AB© (Suède). Cependant, la découverte du phénomène date du début des années 1900 lorsque Wood fit l'observation d'une diffraction inhabituelle de la lumière polarisée sur des réseaux de diffraction<sup>1-2</sup>. Ne pouvant expliquer le phénomène, il le décrit comme une anomalie. Par la suite, au début des années 1950, Pines et Bohm<sup>3-5</sup> posèrent l'hypothèse comme quoi l'absorption de lumière serait due à l'excitation des électrons dans la bande de conduction du film métallique. Ces électrons oscillent à la surface du film métallique et sont ce qu'on appelle *plasmon de surface*. Plus tard, en 1968, Otto<sup>6</sup> et Kretschmann<sup>7</sup> montrèrent que les plasmons de surface pouvaient être excités en utilisant une géométrie de réflexion totale interne (ATR). Le premier instrument commercial basé sur le principe de la SPR fut vendu par Biacore en 1990<sup>8</sup> et fonctionnait à l'aide d'un prisme, d'un laser et d'une barrette de diodes. Plusieurs modèles apparurent par la suite (Biacore 1000, 2000, 3000, X) et permirent à la résonance des plasmons de surface de devenir une technique fréquemment utilisée et établie dans le domaine de la recherche.

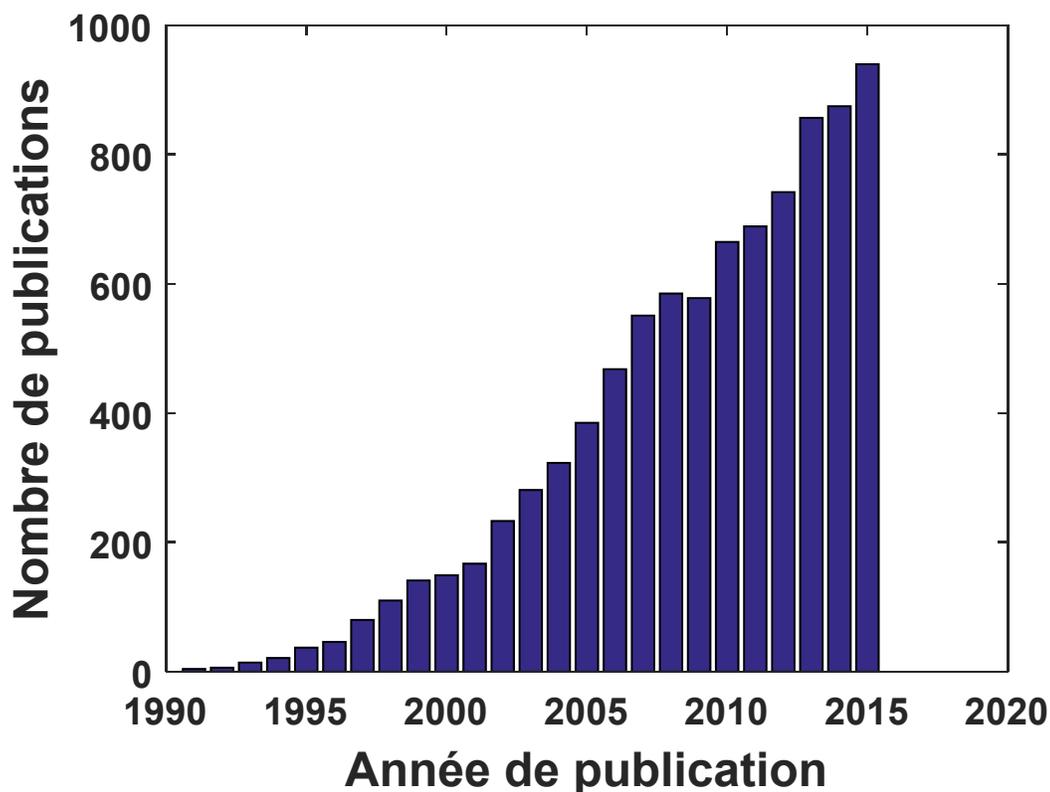


Figure 1.1 : Nombre de publications selon la base de données Thomson Reuters en utilisant SPR et plasmon comme mots-clés. Les chiffres obtenus sont des approximations, puisque certaines publications peuvent être comptées plus d’une fois.

La figure 1.1 montre bien l’essor de la technique et l’intérêt que lui portent les chercheurs dans le domaine de la recherche. L’émergence de cette technique a fait en sorte que le nombre de compagnies fabriquant des appareils à base de résonance des plasmon de surface a également augmenté énormément. On retrouve notamment des appareils produits par BioNavis, Horiba, Bio-Rad, BiOptix, Affinité Instruments, Texas Instruments, Biosensing Instruments et Sensia. Certains de ces appareils permettent de faire de l’imagerie, de l’électrochimie ou d’autres mesures optiques en plus des mesures SPR conventionnelles.

### 1.1.2 Théorie de la résonance des plasmons de surface

Afin de bien comprendre le phénomène physique de la SPR, il est crucial de bien saisir ce que sont les plasmons de surface. Les plasmons sont l'oscillation collective des électrons de conduction à la surface d'un mince film métallique, tel qu'illustré à la figure 1.2. Tous les métaux ne supportent pas de plasmons de surface et ceux généralement utilisés sont l'or et l'argent. En effet, afin de supporter un plasmon de surface, la partie réelle de la constante diélectrique du métal doit être négative et sa composante imaginaire doit être faible<sup>9</sup>. Tous les métaux ne répondent pas à ces critères et les longueurs d'onde ou les angles permettant la résonance ne seront pas les mêmes d'un métal à un autre.

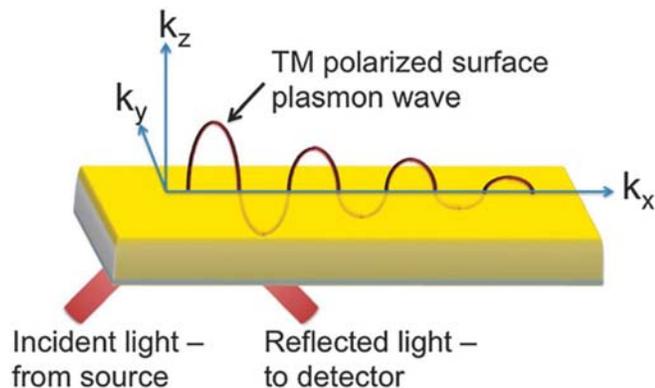


Figure 1.2 : Schématisation d'un plasmon de surface à l'interface d'un métal et d'un milieu diélectrique excité par une source de lumière polarisée. Le plasmon de surface excité se propage le long de l'interface sur une distance de l'ordre du micromètre et décroît avec la distance<sup>10</sup>. Reproduit avec la permission de la Société Royale de Chimie (RSC).

Ces oscillations d'électrons peuvent être excitées par une source lumineuse sous certaines conditions et dans ce cas la lumière et les plasmons de surface sont dits en *résonance*. Afin d'entrer en résonance, les vecteurs d'onde du faisceau lumineux incident et des plasmons de surface doivent être égaux. Toutefois, cette condition n'est pas possible sans passer par un prisme en réflexion totale interne ou par l'entremise d'un réseau de diffraction. La figure 1.3 montre ce phénomène.

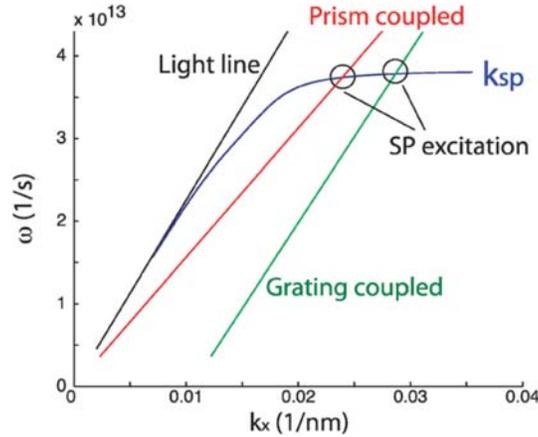


Figure 1.3 : Excitation d'un plasmon de surface par un faisceau lumineux à l'aide d'un prisme ou d'un réseau de diffraction<sup>10</sup>. Reproduit avec la permission de la Société Royale de Chimie (RSC).

Ainsi, on voit à la Figure 1.3 que le vecteur d'onde d'un faisceau lumineux (en noir) n'est jamais égal à celui du plasmon de surface (bleu), mais que si on couple la source lumineuse et le film métallique à l'aide d'un prisme (rouge) ou d'un réseau de diffraction (vert), la lumière incidente peut maintenant entrer en résonance. Les équations des vecteurs d'onde de la lumière incidente et des plasmons de surface sont inscrites ci-dessous :

$$k_x = \frac{2\pi}{\lambda} \eta_D \sin\theta \quad \text{Équation 1.1}$$

$$k_{SP} = \frac{2\pi}{\lambda} \sqrt{\frac{\epsilon_m \epsilon_s}{\epsilon_m + \epsilon_s}} \quad \text{Équation 1.2}$$

où  $k_x$  et  $k_{SP}$  sont respectivement les vecteurs d'onde de la lumière incidente et des plasmons de surface. Dans ces équations,  $\lambda$  correspond à la longueur d'onde de la source lumineuse,  $\eta_D$  à l'indice de réfraction du prisme,  $\theta$  à l'angle d'incidence du faisceau lumineux sur le film métallique,  $\epsilon_m$  à la permittivité électrique du métal et  $\epsilon_s$  à la permittivité électrique de la solution submergeant la couche métallique. Dans la plupart des instruments commerciaux, des diodes laser sont utilisées comme source lumineuse, donc  $\lambda$  est tenue constante, mais il est également possible d'utiliser une source polychromatique et de fixer l'angle d'incidence de la source lumineuse. En fixant l'un de ces paramètres ( $\lambda$  ou  $\theta$ ), on constate que l'autre paramètre varie en fonction de  $\epsilon_s$ . La permittivité de la solution peut également être reliée à l'indice de réfraction ( $\eta$ ) de cette même solution :

$$\epsilon_s = \eta^2 \quad \text{Équation 1.3}$$

Ainsi, lorsque l'indice de réfraction de la solution change, une variation de  $\lambda$  ou  $\Theta$  sera observée. Néanmoins, comme onde évanescente ne pénètre que d'environ 200 à 300nm dans la solution, c'est l'indice de réfraction local, à proximité du film métallique, qui est mesuré. De plus, comme onde décroît exponentiellement, la sensibilité est beaucoup plus élevée à de courtes distances du film métallique. Nous reviendrons sur cet aspect dans la section 1.2. Ainsi, la résonance des plasmons de surface repose sur l'interaction entre des photons et onde générée à la surface d'une couche métallique par ses électrons de conduction. La résonance entre les vecteurs d'onde du faisceau incident et du plasmon de surface dépend de l'indice de réfraction, ou plutôt de la constante diélectrique, du milieu submergeant le capteur et le suivi en temps réel de l'angle ou de la longueur d'onde où survient cette résonance permet notamment de détecter des évènements de reconnaissance moléculaire.

### 1.1.3 Types d'instrumentation

Les biocapteurs optiques à base de résonance des plasmons de surface peuvent fonctionner de différentes manières. La manière la plus classique est appelée configuration Kretschmann où le film métallique est déposé à la surface d'un prisme et la source lumineuse est dirigée au travers du substrat de manière à illuminer le dos du film métallique en réflexion totale interne. Ainsi, onde évanescente générée sonde le plasmon de surface sur le film métallique. Dans cette configuration, différentes approches peuvent également être utilisées. Comme mentionné à la section 1.1.2, afin d'exciter un plasmon de surface, les vecteurs d'onde de la lumière incidente et celui du plasmon de surface doivent être égaux. Cette condition peut être remplie en interrogeant les angles ou les longueurs d'onde auxquels se produit la résonance.

Dans le cas où on interroge les angles, deux méthodes sont possibles. Il est possible d'utiliser un laser, une source monochromatique, et d'irradier un prisme hémisphérique sur lequel est déposée la couche métallique. Dans ce cas, la longueur d'onde est fixée et le prisme est monté sur un goniomètre de manière à pouvoir faire varier l'angle d'incidence. Le détecteur utilisé sous cette configuration est un tube photomultiplicateur. Cette manière de faire permet d'obtenir une excellente résolution spectrale (due à la précision des goniomètres), mais le temps d'acquisition d'un spectre est très long puisqu'il faut balayer toute la gamme d'angles. De plus, puisqu'il faut incorporer le goniomètre, ce genre d'instrument est typiquement plus encombrant. La seconde manière de procéder

est de focaliser une source monochromatique au dos du film métallique de manière à interroger tous les angles simultanément. La lumière réfléchi sera ensuite dirigée vers une barrette de diodes sur laquelle tous les angles pourront être interrogés simultanément. Cette manière de procéder permet d'obtenir des mesures rapides, mais repose sur un excellent alignement optique.

Au lieu d'interroger les angles, il est également possible d'interroger les longueurs d'onde auxquelles se produit la résonance. Pour se faire, il suffit d'utiliser un prisme de Dove et une source polychromatique. La lumière blanche générée par la source est collimatée avant de pénétrer le prisme, est réfléchi en ATR et est collectée par un spectrophotomètre. Ainsi, toutes les longueurs d'onde sont mesurées simultanément et il est possible de déterminer la longueur d'onde à laquelle se produit la résonance. Cette manière de faire permet de miniaturiser l'instrument et d'assurer la rapidité des mesures, mais souffre d'une résolution un peu moindre que les systèmes à interrogation d'angles<sup>11</sup>.

Un dernier type d'instrumentation SPR repose sur un principe d'imagerie. Pour ce faire, on utilise une source polychromatique dont le faisceau est étendu sur une large zone de la couche métallique<sup>11</sup>. Il est ensuite réfléchi sur une caméra d'imagerie permettant d'analyser plusieurs points en parallèle. Dans cette configuration, au lieu de suivre le déplacement de la bande SPR à chaque pixel de la caméra, on suit la variation du pourcentage de réflectivité. Cette variation sera plus élevée pour un déplacement de la bande prononcé et vice versa. Ces changements de réflectivité sont attitrés à chaque pixel de la caméra et il est possible de concevoir des micros réseaux sur la surface du capteur afin de faire du multiplexage ou faire des images d'échantillons biologiques<sup>12</sup>.

L'instrument utilisé pour toutes les expériences de ce mémoire en résonance des plasmons de surface est un instrument à interrogation de longueurs d'onde utilisant un spectrophotomètre. La figure 1.4 illustre son fonctionnement et les différentes composantes nécessaires.

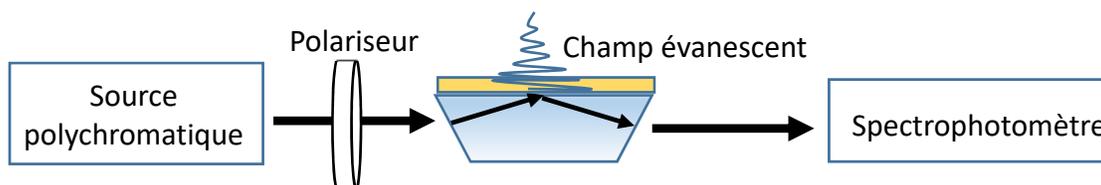


Figure 1.4 : Représentation des composantes nécessaires à un instrument à base de résonance des plasmons de surface à interrogation de longueurs d'ondes.

## 1.2 Biocapteurs

Les biocapteurs sont des outils analytiques pouvant détecter de manière sélective la présence d'un composé d'intérêt dans un échantillon. De tels outils peuvent notamment être basés sur des méthodes électrochimiques<sup>13-16</sup>, acoustiques<sup>17-18</sup> ou optiques<sup>19-22</sup>. Un biocapteur est généralement constitué d'un élément de reconnaissance moléculaire et d'un transducteur. L'élément de reconnaissance moléculaire est une molécule ou une structure apte à réagir et lier spécifiquement un analyte. Pour sa part, le transducteur sert de détecteur et permet la conversion de l'événement de reconnaissance moléculaire en un signal physique détectable (e.g. courant électrique, signal optique, etc.). Les biocapteurs ayant le plus de succès d'un point de vue commercial sont le glucomètre et les tests de grossesse. Le glucomètre repose sur un principe électrochimique et permet de doser la teneur en glucose dans un échantillon de sang. Le test de grossesse, pour sa part, repose sur la capture de l'hormone chorionique gonadotrope humaine (hCG) contenu dans un échantillon d'urine et génère un changement de couleur détectable<sup>23</sup>. Cette section décrira le principe général d'un biocapteur et comment la résonance des plasmons de surface peut être employée pour concevoir des biocapteurs.

### 1.2.1 Principe d'un biocapteur

Les biocapteurs reposent tous sur un principe similaire. En premier lieu, un certain récepteur moléculaire doit être immobilisé sur un transducteur. Ce récepteur doit évidemment être sélectif à l'analyte devant être détecté. Dans le cas d'un biocapteur optique fonctionnant avec le principe de la résonance des plasmons de surface, le transducteur est le film métallique et le récepteur y sera greffé à l'aide d'une des multiples méthodologies ayant été développées. Dans ce cas, le transducteur permet de convertir la liaison de l'analyte au récepteur, qui elle induit un changement de l'indice de réfraction local, en un changement de l'angle ou de la longueur d'onde de résonance pouvant être mesuré. Finalement, le transducteur doit être relié à un ordinateur afin de traiter les données obtenues et permettre l'affichage de la réponse mesurée par le biocapteur<sup>11</sup>. La figure 1.5 montre la relation des différentes composantes d'un biocapteur optique basé sur la résonance des plasmons de surface.

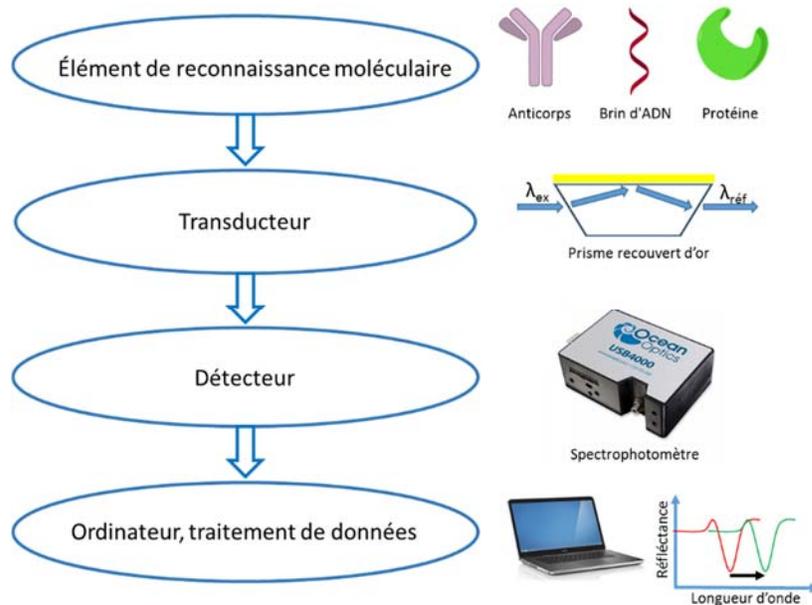


Figure 1.5 : Organisation des différentes composantes d'un biocapteur fonctionnant à l'aide de la résonance des plasmons de surface et mesurant des changements de longueur d'onde d'absorption suite à l'interaction entre deux biomolécules causant un changement de l'indice de réfraction local à la surface du capteur.

### 1.2.2 Fonctionnement d'un biocapteur à base de SPR

Un biocapteur SPR repose sur les mêmes principes qu'un glucomètre ou un test de grossesse. Un récepteur sélectif à l'analyte d'intérêt est greffé à la surface du film métallique afin de pouvoir lier l'analyte dans une matrice quelconque. Il existe différentes approches pour lier un récepteur à la surface métallique et nous en verrons quelques-unes en détail à la section 1.3. Les récepteurs couramment utilisés dans le cadre d'analyse de biomolécules sont des anticorps<sup>24</sup>, des protéines<sup>25</sup> ou des brins de polynucléotides<sup>26</sup> (ADN ou ARN), mais ne se limitent pas à ces derniers. Le choix du récepteur dépendra de l'analyte à lier. Si on veut détecter de plus petites molécules, d'autres méthodologies peuvent être employées, telles les polymères à empreintes moléculaires<sup>27-28</sup> ou les

aptamères<sup>29-30</sup>. Néanmoins, dans le contexte de l'étude d'analytes biologiques, ces méthodes sont moins fréquentes et ne seront pas couvertes dans ce chapitre.

Le rôle de transducteur en SPR est joué par la mince couche de métal déposée sur la surface du prisme et permet de convertir le changement d'indice de réfraction causé par la liaison de la cible aux récepteurs en un signal optique mesurable. En effet, la liaison de l'analyte aux récepteurs module les propriétés diélectriques locales de la solution recouvrant le film métallique. Ainsi, l'angle ou la longueur d'onde auquel la lumière incidente est en résonance avec le plasmon de surface sera également modulé par la liaison de l'analyte au récepteur. Ce changement est mesuré par un détecteur optique (PMT, barrette de diode, spectrophotomètre) et le signal résultant est transmis à l'ordinateur afin de visualiser l'évènement de reconnaissance entre la cible et le récepteur<sup>11</sup>. Comme mentionné à la section 1.1, l'onde évanescente formée par la réflexion totale interne du faisceau à l'interface prisme/métal ne sonde que quelques centaines de nanomètres au-delà de la surface du film métallique. De surcroît, la sensibilité de cette onde évanescente diminue de façon exponentielle en s'éloignant de l'interface métal/solution, de telle sorte que la technique n'est très sensible que sur quelques dizaines de nanomètres au-dessus du métal<sup>11</sup>.

De plus, étant donné que la SPR est sensible aux modulations de la constante diélectrique du milieu recouvrant le film métallique, cela fait de la SPR une technique de détection universelle. En effet, n'importe quelle molécule se liant à la surface modifiera la permittivité de la solution et induira un signal. Ceci fait en sorte que la SPR ne nécessite pas de marqueur sur l'analyte pour qu'il soit détecté. Ce facteur est un avantage si on compare la SPR à la fluorescence, la spectroscopie Raman ou l'électrochimie, qui eux nécessitent généralement un marquage à base de fluorophore, de rapporteur Raman ou de groupement électro-actif<sup>20</sup>. Néanmoins, cela implique aussi qu'il est primordial de s'assurer de la sélectivité de la surface préparée, puisqu'il n'y a aucun moyen de discriminer la contribution spécifique du signal de sa contrepartie non-spécifique<sup>31</sup>. Les techniques permettant d'assurer une excellente sélectivité aux capteurs à base de SPR seront exposées à la section 1.3. Un autre avantage de la SPR par rapport à d'autres techniques analytiques est sa capacité à analyser des échantillons opaques ou turbides. Contrairement à d'autres techniques optiques comme la spectroscopie de fluorescence ou d'absorption UV-visible, la solution étudiée n'a pas à être translucide afin d'effectuer la mesure. Ceci est un avantage marqué pour l'analyse d'une matrice complexe non diluée<sup>32</sup>.

### 1.2.3 Détection d'événement de reconnaissance moléculaire

Suite à la fabrication d'un biocapteur approprié, il est possible de détecter la liaison d'un analyte au récepteur fixé sur le capteur. Cette détection s'effectue généralement en temps réel. Différentes solutions sont injectées à l'aide d'une cellule fluïdique sur la surface du capteur et le déplacement de la bande d'absorption du plasmon de surface peut être suivi au fil de l'expérience. On appelle *sensorgramme* l'évolution dans le temps de la position de la bande SPR. Les sensorgrammes décrivant la liaison d'un analyte à un récepteur peuvent typiquement être séparés en trois segments distincts. Un sensorgramme fictif est montré à la figure 1.6. Initialement, le biocapteur n'est pas exposé à l'analyte (A). Puis, la solution d'analyte est injectée à la surface du biocapteur pour un temps donné (B) Finalement, la solution d'analyte est remplacée par le tampon utilisé initialement (C). Ainsi, lors de l'injection de la solution contenant l'analyte, la liaison de ce dernier avec le récepteur se traduira par un déplacement de la bande SPR durant la phase d'association. Ensuite, lorsque la solution d'analyte est remplacée par le tampon d'analyse, on observe dans la phase de dissociation et les molécules d'analytes libres seront retirées de la solution et certaines des molécules liées se dissocieront également pour rétablir l'équilibre. Comme nous le verrons à la section 1.5, ces courbes permettent de caractériser les interactions moléculaires.

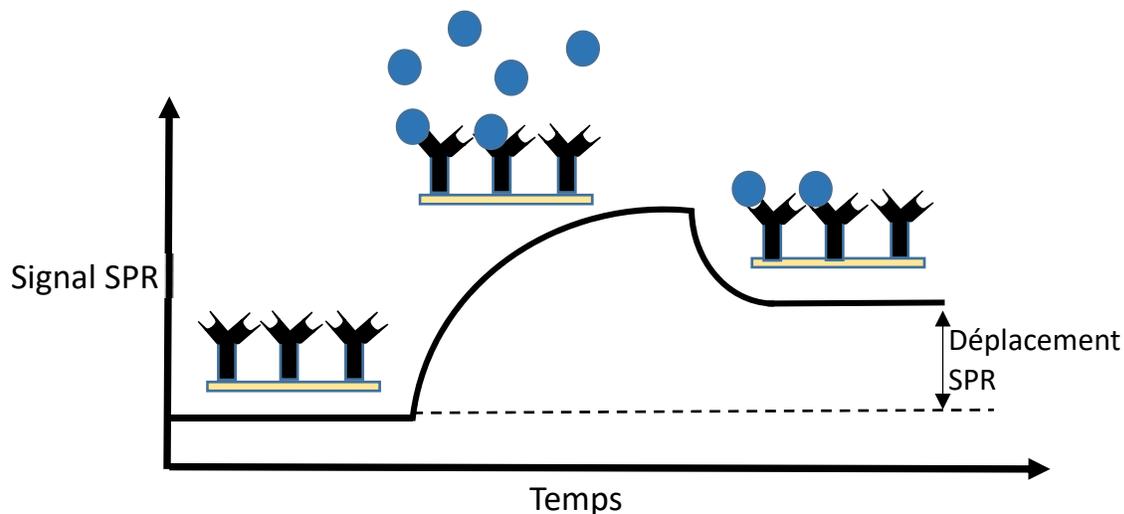


Figure 1.6 : Représentation d'un sensorgramme pour la détection d'un analyte (cercles bleus) par des anticorps (en noir) fixés à une surface. La figure précédente montre l'évolution temporelle du signal SPR lorsque le biocapteur n'est pas en présence d'analyte (A), puis lorsque l'analyte est injecté (B) et finalement remplacé par le tampon initial (C). Il est donc possible d'observer en temps réel la liaison d'un analyte au récepteur et sa dissociation lorsque la solution d'analyte est remplacée.

### 1.3 Chimie de surface

Étant donné que le signal mesuré par le capteur SPR n'est pas spécifique à un analyte donné, il est crucial de pouvoir limiter au maximum l'adsorption non-spécifique (ANS) des différents constituants des matrices étudiées. Dans le cadre de l'étude d'un échantillon biologique, ces matrices peuvent être du sérum sanguin<sup>33-35</sup>, du sang<sup>36-37</sup>, de l'urine<sup>38-39</sup> ou de la salive<sup>40-41</sup>. Ces matrices contiennent chacune un mélange de protéines ou autres molécules susceptibles d'induire un signal non-spécifique. Des surfaces ont donc été développées au fil des années afin de permettre l'analyse de ces matrices complexes en limitant l'adsorption non-spécifique de leurs constituants. Également, diverses approches permettant de lier les récepteurs à la surface du capteur ont été développées. Ces méthodologies seront décrites dans cette section.

### 1.3.1 Adsorption non-spécifique

L'un des plus grands défis associés au développement de capteur à base de résonance des plasmons de surface est l'adsorption non-spécifique de la matrice sur le capteur. Cette adsorption engendre un signal ne pouvant être discerné du signal provenant de la liaison de l'analyte sur le récepteur. L'adsorption non-spécifique de protéines dépend de plusieurs facteurs tels la morphologie du film métallique utilisé<sup>42</sup> (présence de défauts) et des propriétés propres à chaque protéine. Différents chercheurs étudièrent ce phénomène et tentèrent de tirer des conclusions, mais la propension des protéines à s'adsorber de manière non-spécifique reste difficile à expliquer de manière absolue. Les conclusions tirées reviennent principalement sur les propriétés des protéines comme leur charge, leur taille, leur polarité et la stabilité de leur conformation<sup>43</sup>. Plusieurs types d'interactions peuvent en effet être impliqués dans le processus d'adsorption : les forces de Van der Waals, les forces électrostatiques, les liaisons hydrogènes et des interactions  $\pi$ -métal<sup>44-45</sup>.

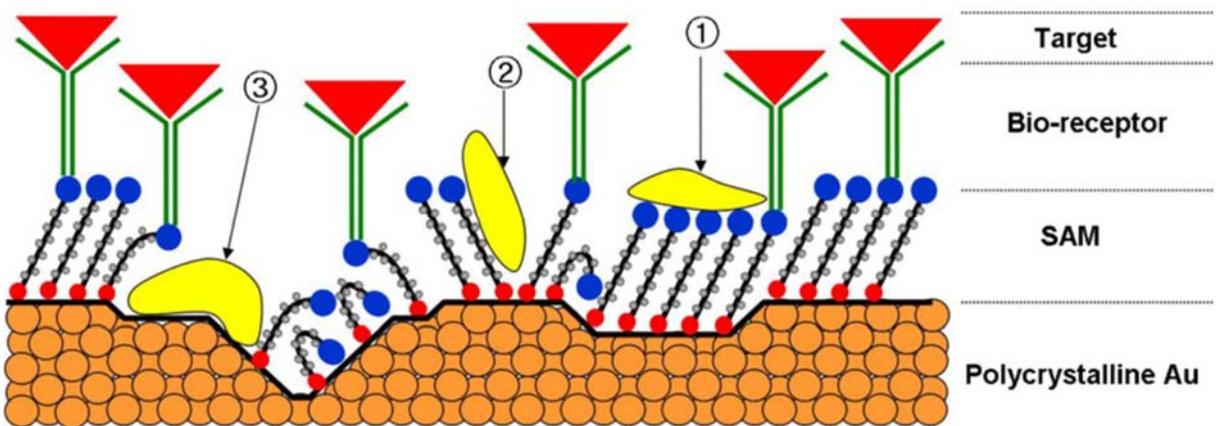


Figure 1.7 : Défauts dans un film d'or brisant l'uniformité de la monocouche auto-assemblée (SAM) et permettant à des protéines de s'adsorber de manière non-spécifique au capteur<sup>42</sup>. L'analyte peut notamment s'adsorber sur le film d'or comme montré en (1) où il s'adsorbe sur la monocouche à un endroit dépourvu de récepteur moléculaire, en (2) à un endroit où la monocouche montre des défauts et en (3) à un endroit du film d'or dépourvu de monocouche. (Reproduit avec l'autorisation de la source 43)

Pour cette raison, il est primordial de comparer les résultats obtenus avec des surfaces de référence, ne liant pas l'analyte. Ceci permet d'isoler en partie la composante du signal provenant de l'adsorption non-spécifique. Il est également possible de diluer les échantillons dans un tampon approprié de manière à réduire la concentration des molécules présentes dans l'échantillon, mais cette méthode ajoute une étape supplémentaire à l'analyse et contourne le problème au lieu de le régler. Une autre manière de limiter l'adsorption non-spécifique est d'incorporer des surfactants dans les solutions contenant l'analyte afin de perturber les interactions entre la surface et les protéines contenues dans l'échantillon<sup>46</sup>. De nouveau, on ajoute une étape additionnelle à l'analyse. Une manière plus intéressante de limiter l'ANS est plutôt de fabriquer des capteurs dotés de surfaces inertes vis-à-vis des de la majorité des constituants des matrices biologiques. Il faut également s'assurer de la biocompatibilité de ces surfaces, car on ne souhaite pas perdre l'activité biologique des récepteurs greffés sur celle-ci. Les prochaines sections traiteront des surfaces les plus utilisées.

### 1.3.2 Surface de polyéthylène glycol

Le polyéthylène glycol (PEG) ou oxyde de polyéthylène (PEO) est une des surfaces, introduite vers la fin des années 1990, ayant démontré l'une des meilleures capacités à limiter l'ANS<sup>47-48</sup>. De manière générale, il est admis que la propriété du PEG à réduire l'adsorption non-spécifique des protéines est due à la répulsion stérique induite par les chaînes polymériques rivées à la surface. En effet, les chaînes empêchent les protéines d'atteindre la surface du capteur et par le fait même, de s'adsorber de manière irréversible. L'efficacité du polymère à bloquer l'accès aux protéines est accrue si le polymère est attiré par la surface, créant un réseau plus dense à la surface du capteur. Néanmoins, même si le polymère n'est pas attiré par la surface, les branches polymériques servent également de barrière cinétique et limitent l'ANS des protéines. Aussi, plus la densité de polymère à la surface du capteur augmente, plus son efficacité à limiter l'ANS est élevée. Des études montrent que des polymères di-blocks<sup>49</sup> ou tri-blocks<sup>47</sup> de différents polymères permettent d'augmenter la densité en surface et limitent encore davantage l'adsorption non-spécifique de protéines.

### 1.3.3 Surface de dextran

Le dextran est un polymère de glucose hydrophile fréquemment utilisé pour attacher des anticorps ou autres biomolécules à une surface. La plupart des capteurs commerciaux vendus par la compagnie Biacore sont recouverts CM-Dextran, un polymère carboxyméthylé, de telle sorte que son utilisation est très répandue<sup>25, 50</sup>. Comme il s'agit d'un polymère, au lieu de former une surface plane en 2D, on obtient plutôt une matrice tridimensionnelle permettant de lier beaucoup de récepteurs dans le volume occupé par le polymère. Toutefois, une bonne partie de ces récepteurs se trouveront loin de la surface métallique, donc dans une zone où la sensibilité est moins élevée. Le plus grand défaut du dextran est sa faible résistance à l'adsorption non-spécifique dans un milieu biologique complexe<sup>51</sup>. Néanmoins, les analyses sur des films recouverts de dextran se produisant dans un tampon fonctionnent généralement très bien.

### 1.3.4 Surface d'alcanethiol

Les couches les plus utilisées dans les laboratoires de recherche académique sont probablement celles à base d'une chaîne alkyle dotée d'une fonction thiol à l'une de ses extrémités. En effet, les thiols sont connus pour former un lien covalent avec les surfaces métalliques<sup>52</sup>. Cette propriété a donc été utilisée sur des films d'or ou d'argent afin de fabriquer des monocouches sur les surfaces de biocapteurs à base de SPR. Un des avantages de ces couches est qu'elles sont bifonctionnelles, c'est-à-dire qu'elles peuvent être dotées d'une fonction thiol à une extrémité et d'une autre fonction permettant de lier un récepteur à l'autre extrémité (typiquement une amine ou un acide carboxylique). Parmi les alcanethiols employés le plus fréquemment on retrouve les acides 11-mercaptopundécanoïque et 16-mercaptohexadécanoïque, montrés à la figure 1.8.

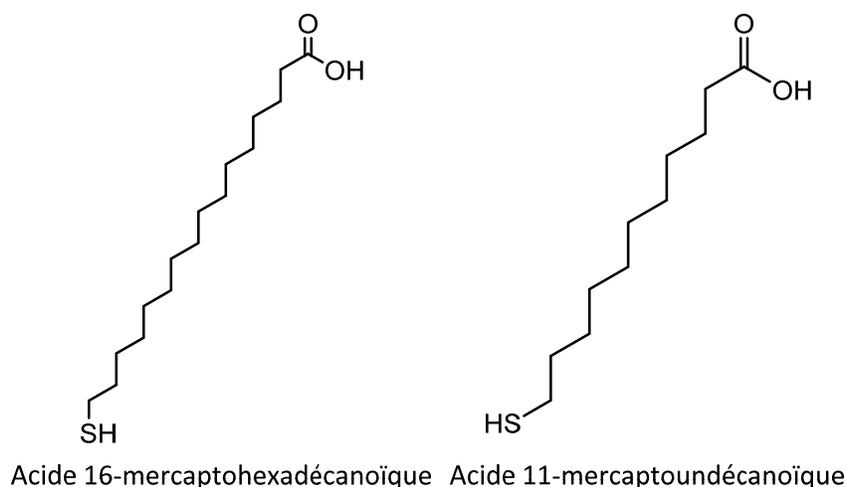


Figure 1.8 : Structures moléculaires de deux alcanethiols, 11-MUA et 16-MHA, fréquemment utilisés pour la fabrication de SAM sur une surface d'or.

Les alcanethiols ont comme caractéristique principale une chaîne carbonée de longueur variable permettant leur empilement compact lors de la formation de la monocouche grâce aux interactions hydrophobes entre les différentes chaînes. Également, comme l'atome de soufre d'une fonction thiol ou disulfure a une grande affinité pour l'or ou l'argent, cela permet aux alcanethiols de former une monocouche auto-assemblée spontanément lorsqu'ils sont exposés à un substrat métallique<sup>53</sup>. Des mesures expérimentales ont permis de déterminer que l'épaisseur des films obtenus correspondait à une inclinaison des alcanethiols de 30° par rapport à la normale et que ces derniers formaient des îlots cristallins très denses dû aux interactions de Van der Waals entre les chaînes hydrophobes<sup>44</sup>.

### 1.3.5 Surfaces zwitterioniques

Un zwitterion est une molécule dotée de charges formelles positive et négative, mais dont la charge nette est zéro. Comme l'une des interactions possiblement impliquées dans le phénomène de l'ANS des protéines est de nature électrostatique, une surface neutre permettrait peut-être de la minimiser. Des surfaces mixtes constituées de deux différents alcanethiols chargés positivement et négativement furent testées par Whitesides<sup>54</sup>. Les alcanethiols utilisés étaient notamment modifiés avec des amines quaternaires<sup>54</sup> et des groupement sulfonates. La formation de la monocouche à partir

d'un mélange 1:1 de ces molécules chargées ne correspond pas exactement à la définition d'un zwitterion, mais la surface obtenue expose en théorie des quantités égales de charges positives et négatives et la charge de surface se devrait d'être à peu près nulle. Les résultats démontrent que pour une monocouche constituée uniquement d'un ou l'autre des alcanethiols chargés, on obtient presque une monocouche de protéines adsorbées tandis que pour la monocouche mixte des mêmes alcanethiols chargés, on diminue à <1% d'une monocouche de protéines adsorbées<sup>54</sup>. Des résultats similaires furent observés pour des monocouches d'alcanethiols incorporant les charges positive et négative sur une seule molécule<sup>54</sup>.

Un autre type de surface zwitterionique étudié est basé sur des liquides ioniques (LI). Les liquides ioniques sont des sels organiques dont la température de fusion est inférieure à 100°C. Certains d'entre eux sont même liquides à température ambiante. Les liquides ioniques sont fréquemment construits à l'aide d'un cœur d'imidazolium ramifié et différents anions peuvent être utilisés<sup>55</sup>. Les LI servant à fabriquer des monocouches sur une surface métallique nécessitent seulement l'introduction d'un groupement thiol (-SH) sur l'une des chaînes alkyles de l'imidazole. Le liquide ionique peut ensuite être modifié de nouveau pour permettre la liaison directe d'un récepteur moléculaire ou à l'aide d'une fonction acide (-COOH) ou amine (-NH<sub>2</sub>) permettant de lier de manière covalente le récepteur. Des liquides ioniques modifiés avec une fonction acide et dérivé avec une biotine ont montré de bons résultats en terme de résistance à l'adsorption non-spécifique dans du sérum et pour conserver l'activité biologique d'une enzyme greffée à la surface<sup>56</sup>.

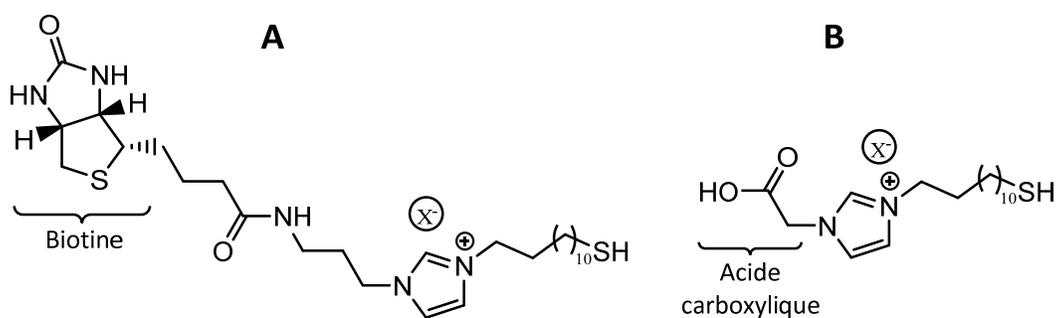


Figure 1.9: Liquides ioniques à base d'imidazolium modifiés avec une biotine (A) et une fonction acide carboxylique (B). X<sup>-</sup> représente un contre-anion quelconque.

### 1.3.6 Surfaces peptidiques

Des peptides peuvent également être utilisés comme surface sur un biocapteur en SPR. L'un de leur grand avantage est leur facilité de synthèse et leur large gamme de propriétés. En effet, il est possible de synthétiser des peptides ayant les caractéristiques voulues en utilisant un support solide et les acides aminés dotés des propriétés adéquates. Cette section ne rentrera pas dans les détails de la synthèse peptidique sur support solide, mais brièvement il est possible de synthétiser n'importe quel peptide en ajoutant les acides aminés désirés de manière séquentielle. Chaque couplage d'acide aminé est suivi d'une série de lavages afin de retirer de la résine tous les réactifs nécessaires au couplage précédent<sup>33, 57-58</sup>. Les monocouches peptidiques offrent une versatilité très intéressante pour la fabrication d'un biocapteur : comme on peut dicter les propriétés du peptide avec le choix des acides aminés le composant, on peut développer très aisément différents peptides pour différentes matrices complexes. De plus, ils ont une biocompatibilité très élevée puisqu'ils sont constitués d'acides aminés. Par exemple, il a été montré que des peptides exposant à la solution un acide aminé polaire, l'acide aspartique, réduisaient de manière considérable l'ANS des protéines dans le sérum<sup>33,57</sup>. Toutefois, si la matrice utilisée est un lysat cellulaire, ces mêmes peptides ne minimisent plus efficacement l'ANS. Au contraire, il a été montré que des peptides avec un caractère plus hydrophobe et basique limitaient d'avantage l'ANS du matériel contenu dans le lysat cellulaire<sup>59</sup>. L'ordre des acides aminés dans un peptide joue également un rôle clé. Par exemple, si on prend deux peptides constitués de leucine (L), de phénylalanine (F) et d'histidine (H) dans deux séquences distinctes, on observe deux comportements diamétralement différents en termes de réduction de l'ANS du lysat cellulaire. Le peptide 3-MPA-LFHLFH-OH montre 584 ng/cm<sup>2</sup> de matériel adsorbé tandis que le peptide 3-MPA-FLLHH-OH montre une adsorption de l'ordre de 187 ng/cm<sup>2</sup><sup>59</sup>. Les résultats montrés dans ce mémoire ont été pour la plupart obtenus en utilisant une monocouche formée d'un peptide constitué d'acide aspartique (D), d'histidine et de leucine (3-MPA-LHDLHD-OH), illustré ci-dessous à la figure 1.10 ci-dessous. Une monocouche composée de ce peptide a montré une forte réduction de l'adsorption non-spécifique dans le sérum<sup>60</sup>, donc limite l'ANS de la majorité des protéines. Cette faible ANS peut notamment s'expliquer par la charge formelle nulle du peptide, puisqu'il contient des résidus d'histidine et d'acide aspartique.

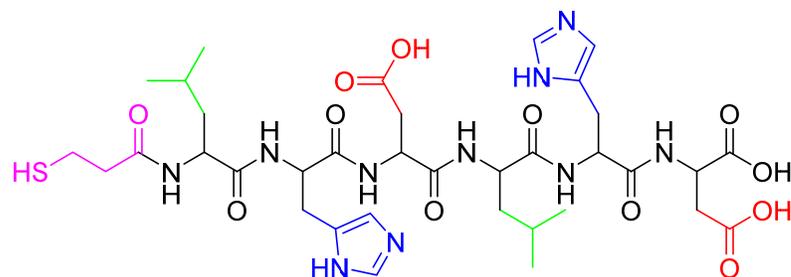


Figure 1.10 : Structure moléculaire du peptide 3-MPA-LHDLHD utilisé dans le cadre de l'obtention des résultats présentés au chapitre 3. La section en magenta correspond au 3-MPA permettant de lier le peptide à la surface d'or et les acides aminés identifiés en vert, bleu et rouge correspondent respectivement à la leucine, l'histidine et l'acide aspartique.

## 1.4 Méthodes d'immobilisation de récepteurs

Afin de fixer les récepteurs biologiques au biocapteur SPR, plusieurs méthodes ont été développées afin de greffer plusieurs classes de biomolécules. Ces méthodes d'immobilisation reposent sur différents types d'interaction : il est en effet possible de lier un récepteur de manière covalente<sup>61-62</sup>, électrostatique<sup>63-65</sup>, par adsorption physique ou chimique<sup>66</sup>, par réticulation<sup>67</sup>, par piégeage dans une matrice polymérique<sup>68</sup> ou par affinité<sup>69-71</sup>. L'un des plus grands défis associés à l'immobilisation de récepteurs biologiques à une surface est le maintien de leur activité biologique. Le site actif du récepteur immobilisé doit conserver sa capacité de reconnaissance vis-à-vis de ses cibles biologiques. Cette capacité de reconnaissance peut être diminuée si le récepteur est mal orienté ou si la liaison avec la surface implique un groupe fonctionnel du site actif. Au besoin, il est possible d'immobiliser des récepteurs biologiques à un substrat avec une orientation précise ou au contraire de manière aléatoire. Cette section traitera de quelques-unes des méthodes d'immobilisation les plus fréquemment employées lors de la fabrication d'un biocapteur.

### 1.4.1 Couplage peptidique

Les récepteurs moléculaires utilisés en SPR étant souvent des protéines, leur liaison à une surface par l'entremise d'un couplage peptidique est devenue une méthode prisée par les chercheurs. Ce genre de couplage repose sur la formation d'un lien peptidique (amide) entre un acide carboxylique et une amine primaire. Ainsi, il est possible de lier n'importe quelle protéine à une surface ayant à sa surface un acide carboxylique d'exposé par l'entremise du N-terminal de la protéine ou par l'une de ses lysines exposées. Cette technique est donc applicable à n'importe quelle protéine, mais en contrepartie, les protéines seront liées avec une orientation aléatoire sur la surface ou avec de multiples points de liaison. En effet, comme différents sites de la protéine peuvent réagir avec la fonction acide carboxylique, les récepteurs seront exposés avec différentes orientations. Ce phénomène entraîne différentes conséquences, notamment une réduction de l'affinité observée entre le récepteur et sa cible à cause des différentes orientations du récepteur, générant ainsi une gamme d'affinités. L'affinité mesurée sera une moyenne plutôt que la valeur vraie<sup>72</sup>. Ainsi, la formation d'un lien covalent entre le récepteur et le substrat ne permet généralement pas d'orienter le récepteur d'une quelconque manière. Malgré l'absence d'orientation associée à l'immobilisation d'une protéine par la formation d'un lien peptidique, cette méthode reste une méthode privilégiée pour l'étude d'interactions biomoléculaires. L'un de ses avantages est qu'elle fonctionne pour toutes les protéines ou autres biomolécules contenant une amine primaire pouvant réagir avec la surface du capteur. Cependant, les paramètres thermodynamiques ou cinétiques étudiés seront probablement légèrement sous-estimés compte tenu de l'orientation aléatoire des différents récepteurs immobilisés.

Il existe différentes méthodologies pour former le lien peptidique entre la protéine et la surface d'or, mais l'une des plus utilisées repose sur la combinaison de deux réactifs : le N-hydroysuccinimide (NHS) et 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC). Ces réactifs permettent l'activation de l'acide carboxylique exposé de la surface et génèrent un intermédiaire, un ester succinimide, aisément remplacé suite à l'attaque nucléophile des amines primaires (N-terminal et Lysine)<sup>73</sup>. Une étape finale consiste à neutraliser les sites réactifs n'ayant potentiellement pas réagis avec une protéine à l'aide d'une solution d'éthanolamine 1M ou de tampon contenant 0,1% de BSA.

## 1.4.2 Hexamère d'histidine

Si une orientation spécifique du récepteur à la surface est nécessaire, des hexamères d'histidine («His-tag»), un segment de 6 histidines successives, peuvent être utilisés pour coupler différentes biomolécules à une surface. Ces étiquettes peuvent être ajoutées à l'une des extrémités (C-terminal ou N-terminal) d'une protéine par modification génétique. Ces segments riches en histidine sont connus pour avoir une grande affinité pour différents métaux de transitions comme le  $\text{Cu}^{2+}$ , le  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  et le  $\text{Co}^{2+}$ . Le même concept est utilisé depuis 1975 en chromatographie d'affinité (IMAC)<sup>74</sup>. Les cations sont immobilisés par chélation à l'aide d'un ligand fixé sur une phase solide. Le ligand est généralement un polyacide comme l'acide iminodiacétique permettant de former un ligand tridenté. Aujourd'hui, les ligands les plus utilisés sont basés sur l'acide nitrilotriacétique (NTA)<sup>75</sup>. Dans le contexte d'un biocapteur, le ligand est accroché à la surface d'une quelconque manière, mais le plus souvent on formera un lien covalent avec la monocouche couvrant le film métallique. Par exemple, il est possible de faire un couplage peptidique entre une monocouche de 3-MPA-LHDLHD-OH et l'hydrate de  $\text{N}_\alpha, \text{N}_\alpha$ -bis(carboxyméthyle)-L-lysine, un dérivé de l'acide iminodiacétique<sup>60</sup>. Une solution d'un complexe métallique, par exemple le  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , est ensuite exposée au peptide modifié de manière à trapper par chélation les cations  $\text{Cu}^{2+}$  en surface. Une fois cette étape complétée, il est possible de conserver les substrats d'or pour de longues périodes. Pour immobiliser les protéines avec les étiquettes de polyhistidine, il suffit de mettre en contact la solution de protéines avec la surface modifiée avec les ions métalliques. L'étiquette polyhistidine de la protéine sera attirée par les cations métalliques à la surface du capteur et permettra la liaison dans une orientation particulière de la protéine.

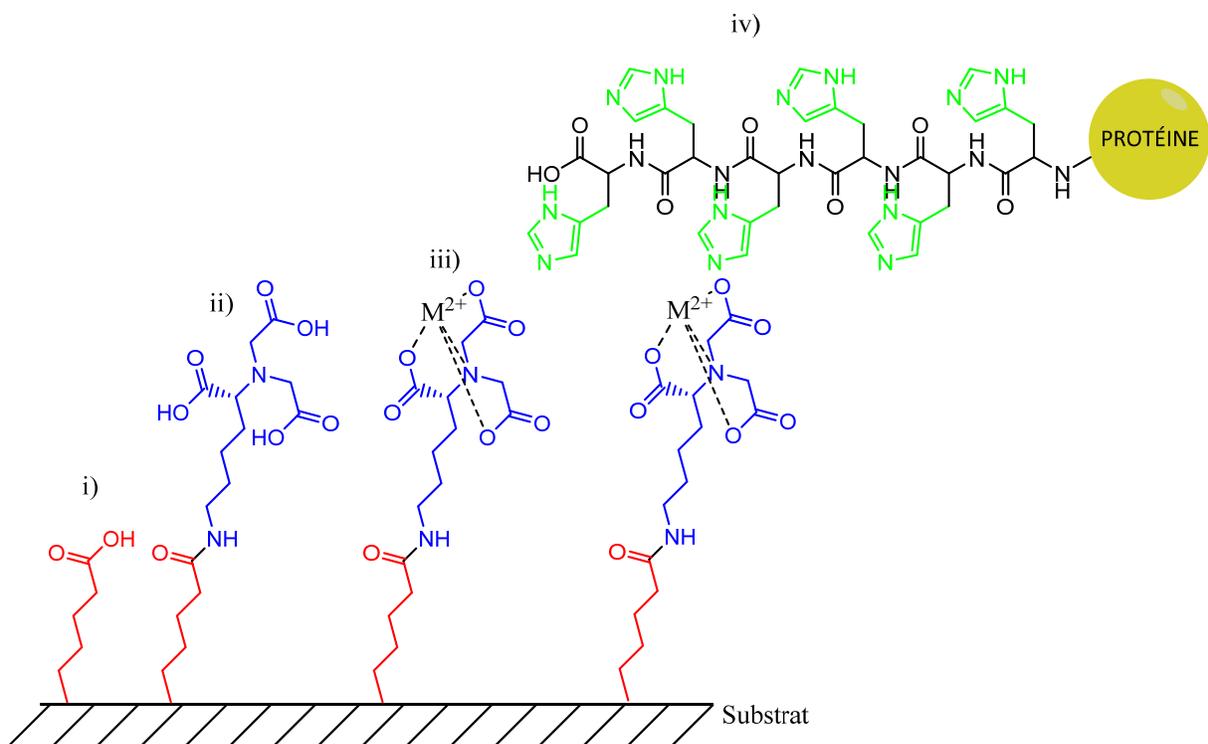


Figure 1.11 : Séquence des étapes permettant l'immobilisation d'une protéine avec une étiquette de polyhistidine. La partie rouge représente la monocouche de départ, la partie bleue le ligand de chélation,  $M^{2+}$  un cation métallique et les sections vertes sont les résidus d'histidine de l'étiquette de polyhistidine attachée à la protéine.

Un des désavantages de ce genre d'immobilisation est son incompatibilité avec l'utilisation d'agents chélatants comme l'EDTA ou le Tris, des additifs fréquemment utilisés dans les tampons pour l'analyse de biomolécules<sup>75</sup>. Cette méthode d'immobilisation permet par contre d'orienter le récepteur à la surface en fonction de l'emplacement de l'étiquette de polyhistidine sur ce dernier. Advenant une orientation optimale du récepteur, les données thermodynamiques et cinétiques obtenues seront probablement plus précises et exactes, mais comme les étiquettes de polyhistidine sont généralement attachées aux C-terminal ou N-terminal, il faut s'assurer que le site actif du récepteur n'implique pas les extrémités de la séquence d'acides aminés. Advenant qu'elles le soient, il est également possible d'attacher l'étiquette de polyhistidine à une boucle exposée de la protéine<sup>76</sup>.

### 1.4.3 Fusion de vésicules

Une autre méthode d'immobilisation de récepteurs biologiques repose sur l'utilisation de vésicules contenant le récepteur d'intérêt. Les vésicules sont constituées de différents phospholipides comme la phosphatidylcholine (PC), la phosphatidylsérine (PS) ou la phosphatidyléthanolamine (PE). Ces molécules étant amphiphiles, c'est-à-dire qu'elles possèdent une section hydrophobe et hydrophile, s'assemblent spontanément en vésicules lorsqu'elles sont suspendues dans une solution aqueuse. En effet, étant constituées d'une queue apolaire, une longue chaîne d'hydrocarbures, et d'une tête polaire, ces molécules s'assembleront spontanément de manière à minimiser les contacts entre leur section hydrophobe et l'eau environnante. Les assemblages sphériques obtenus peuvent être constitués d'une ou plusieurs bicouches de phospholipides et trappent une petite quantité d'eau entre chaque bicouche<sup>77</sup>. Ces bicouches exposent vers l'extérieur les têtes polaires des phospholipides tandis que les chaînes aliphatiques se font face. Un tel arrangement est favorisé pour de multiples raisons : les têtes hydrophiles sont exposées à la solution aqueuse, les queues hydrophobes sont stabilisées entre elles par des interactions de type Van der Waals et l'effet hydrophobe. Les vésicules formées peuvent néanmoins être fusionnées sur une surface 2D et s'assembler en monocouche de phospholipides<sup>78-79</sup> ou en bicouches<sup>80-81</sup>.

Afin de former une monocouche de phospholipides, une monocouche très hydrophobe comme l'octadécylthiol (ODT) doit être formée sur la surface du prisme d'or. Ensuite, l'exposition d'une solution de vésicules à cette surface entraînera la rupture des vésicules sphériques et l'assemblage de larges îlots de phospholipides sur le substrat. Après un certain temps, ces îlots se rejoindront et formeront une monocouche complète<sup>78-79</sup>. Les têtes polaires des phospholipides feront toujours face à la solution aqueuse, tandis que leurs queues hydrophobes s'assembleront vis-à-vis des chaînes hydrophobes de la monocouche organique. Cette rupture est possible, car l'énergie interfaciale du film 2D de phospholipides est moins élevée que celle des vésicules sphériques<sup>78</sup>. Il est également possible de former des bicouches de phospholipides sur un substrat solide dénué de monocouche hydrophobe, mais dans ce cas le substrat est fréquemment du verre ou un autre matériau sur lequel est déposée une mince couche de SiO<sub>2</sub><sup>81</sup>. La fusion de vésicules sur une matrice de dextran est également possible<sup>50</sup>. L'un des aspects intéressants des vésicules est la facilité avec laquelle on peut les fabriquer et leur incorporer différentes classes de molécules. À titre d'exemple, l'insertion de fluorophores dans des

vésicules est un outil de choix pour l'étude de membranes biologiques<sup>82</sup>. Il est aussi possible d'insérer des récepteurs moléculaires à ces vésicules, de sorte que lors de leur fusion sur le substrat, ces récepteurs soient exposés. Par exemple, une série de gangliosides ont été insérés dans des vésicules qui ont par la suite été fusionnées à un substrat. Les paramètres cinétiques et thermodynamique de la liaison entre la toxine du choléra (CT) et les différents gangliosides ont ensuite été déterminés<sup>83</sup>. Cette manière de procéder permet de simuler une membrane biologique et peut s'avérer pertinente pour l'étude de récepteurs membranaires. Cette méthodologie est employée au chapitre 4 du mémoire afin d'étudier l'interaction entre le GM1 et un peptide synthétique.

## 1.5 Interactions biomoléculaires

La mesure des interactions biomoléculaires développées entre une molécule en solution et un récepteur greffé à une surface sont cruciales dans une multitude de domaines, qu'il s'agisse de l'industrie alimentaire, la découverte de médicaments, les sciences biologiques ou la médecine. En effet, plusieurs processus biologiques fondamentaux se produisent à une interface<sup>84</sup>. Il est donc primordial de pouvoir étudier ce genre d'interactions afin de mieux comprendre ces systèmes biologiques complexes. Auparavant, on décrivait les interactions entre un analyte et un récepteur comme une clé et une serrure, mais on sait maintenant que ces interactions sont beaucoup plus complexes et que le système analyte-récepteur représente plutôt un système moléculaire<sup>85</sup>. En effet, si la liaison de l'analyte nécessite un site particulier, cette liaison peut également entraîner des changements conformationnels chez le récepteur. L'élucidation de ces changements moléculaires est principalement réalisée à l'aide des rayons-X et de la résonance magnétique nucléaire (RMN)<sup>85</sup>. Par contre, les biocapteurs SPR sont en mesure de mesurer les interactions entre molécules biologiques en temps réel. Ces dernières ont des paramètres cinétiques et thermodynamique qui sont utiles afin de caractériser et comprendre de tels systèmes, néanmoins des défis sont associés à la mesure de tels paramètres. En particulier, les analytes doivent se lier à des récepteurs immobilisés à la surface du capteur, typiquement beaucoup plus grande que les espèces étudiées. La surface étant beaucoup plus grande que la taille des récepteurs moléculaires, cela fait en sorte que l'adsorption non-spécifique peut devenir problématique. En effet, l'adsorption non-spécifique des espèces provenant de la matrice peut

alors générer une contribution significative du signal mesuré, ce qui limite l'intérêt des mesures obtenues.

Aussi, la réaction entre l'analyte et le substrat sera fréquemment sous des conditions dites limitées par le transport de masse. Dans ce cas, les modèles mathématiques utilisés pour déterminer les paramètres thermodynamiques et cinétiques deviennent plus complexes. Traditionnellement, des analyses de van't Hoff sont utilisées pour déterminer les paramètres thermodynamiques, tandis que des techniques à flux arrêté (*stopped-flow*) permettent l'obtention de paramètres cinétiques<sup>85</sup>. Pour sa part, la SPR permet de dériver les paramètres thermodynamiques et cinétiques d'un même ensemble de mesures. Cette section aura pour objectif de décrire ces paramètres, leur importance et les défis associés à leur obtention.

### 1.5.1 Affinité

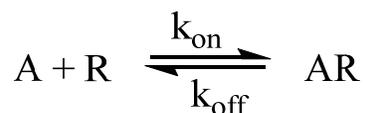
L'affinité d'une cible (protéine, nucléotides, peptide, etc.) pour un récepteur représente la propension à l'équilibre de celle-ci à se lier au récepteur. Elle symbolise la force de la liaison entre la molécule cible et le récepteur. C'est donc une information très pertinente à connaître si on étudie l'interaction entre deux molécules. Pour une réaction bimoléculaire entre un analyte A et un récepteur R formant un complexe AR, la constante d'association symbolisée par  $K_A$  est décrite par l'équation 1.4 :

$$K_A = \frac{[AR]}{[A][R]} \quad \text{Équation 1.4}$$

Toutefois, on utilise plus fréquemment la constante de dissociation afin de caractériser l'affinité :

$$K_D = \frac{[A][R]}{[AR]} = \frac{1}{K_A} \quad \text{Équation 1.5}$$

Ainsi, la constante de dissociation est l'inverse de la constante d'association. Cette constante est exprimée avec des unités de concentration ( $\text{mol L}^{-1}$ ) et représente la concentration d'analyte pour laquelle la moitié des récepteurs présents seront sous la forme AR. Pour la cinétique d'une réaction bimoléculaire, on aurait :



Et lorsque  $[A]=K_D$ , on obtient  $[AR]=[R]$ . Donc, plus la valeur du  $K_D$  est faible, plus l'affinité de A pour R est élevée. Pour ce type d'analyse,  $[R]$  et  $[AR]$  ne sont pas les concentrations en solution du récepteur et du complexe, mais bien leur quantité à la surface du substrat. La quantité  $[AR]$  peut être estimée à l'aide du signal SPR mesuré lors de l'expérience, puisque le signal résulte de la diffusion de matériel provenant de la solution à l'interface métal-solution. Donc, la quantité de AR,  $[AR]$ , sera proportionnelle au signal mesuré lorsqu'une certaine concentration de A,  $[A]$ , sera exposée au biocapteur.

Comme mentionné plus tôt, la valeur du  $K_D$  est valide lorsque le système est à l'équilibre. Cet équilibre est atteint lorsque les concentrations de réactifs et de produits ne varient plus, c'est-à-dire lorsque les constantes cinétiques d'association ( $k_{\text{on}}$ ) et de dissociation ( $k_{\text{off}}$ ) sont égales. L'atteinte de cet équilibre peut prendre plus ou moins de temps et une valeur faible de  $K_D$  n'implique pas une cinétique rapide ou vice-versa.

Afin de déterminer les constantes d'affinité à partir de mesures SPR, on utilise un isotherme d'adsorption. Les isothermes sont des modèles mathématiques permettant de décrire des processus d'adsorption d'un adsorbat, l'analyte, sur un substrat en fonction de la concentration en solution de l'adsorbat. Il existe plusieurs isothermes, dont celles de Langmuir, de Freundlich et de Frumkin, Fowler et Guggenheim (FFG). L'isotherme de Langmuir est l'un des plus simple et repose sur 3 hypothèses :

1. Tous les sites d'adsorption ont la même affinité pour l'analyte.
2. L'adsorbat forme une monocouche sur le substrat.
3. L'énergie d'adsorption est indépendante du recouvrement de surface.

Ce modèle permet mathématiquement de déterminer le  $K_D$  d'un analyte à partir des valeurs d'adsorption de différentes concentrations de l'analyte. L'équation de Langmuir peut s'écrire de ces manières :

$$\Gamma = \frac{K_{ads}[A]}{1+K_{ads}[A]} \Gamma_{max} \quad \text{Équation 1.6}$$

ou

$$\Gamma = \frac{[A]}{[A]+K_D} \Gamma_{max} \quad \text{Équation 1.7}$$

Dans l'équation de Langmuir,  $\Gamma$  représente le recouvrement par unité de surface de l'adsorbat sur le substrat pour une certaine concentration de A,  $\Gamma_{max}$  représente le recouvrement lorsque tous les sites du substrat pouvant lier l'analyte sont occupés,  $K_{ads}$  est la constante d'adsorption (ou d'association) et  $K_D$  est la constante de dissociation. Les valeurs de  $\Gamma$  et  $\Gamma_{max}$  sont définies en fonction de la masse d'adsorbant disponible, mais il est possible de définir un taux de recouvrement à partir du nombre de sites de liaison disponibles. Dans ce cas, l'équation s'écrit ainsi :

$$\theta = \frac{K_{ads}[A]}{1+K_{ads}[A]} = \frac{[A]}{[A]+K_D} \quad \text{Équation 1.8}$$

Dans cette forme de l'équation,  $\theta$  est le taux de recouvrement du substrat, c'est-à-dire un nombre entre 0 et 1 où 0 représente l'absence d'analyte à la surface du capteur et 1 la saturation des sites de liaisons du substrat. Afin de déterminer la valeur de la constante de dissociation d'un analyte à partir des résultats SPR, on utilise une variation de l'équation 1.6 ou 1.7:

$$R = \frac{K_{ads}[A]}{1+K_{ads}[A]} R_{max} = \frac{[A]}{[A]+K_D} R_{max} \quad \text{Équation 1.9}$$

Ici, le recouvrement  $\Gamma$  a été remplacé par R, la réponse SPR mesurée pour chaque concentration et  $\Gamma_{max}$  par  $R_{max}$ , la réponse SPR obtenue si tous les sites du capteur permettant la liaison de l'analyte sont occupés. Comme énoncé plus haut, la quantité de complexe AR formée est directement proportionnelle au signal SPR mesuré. Ainsi, en traçant un graphique de  $R$  vs  $[A]$ , on devrait obtenir une courbe correspondant à un isotherme de Langmuir si la gamme de concentrations de A testées est appropriée. De manière générale, on utilisera une gamme de concentrations couvrant de 3 à 4 ordres de grandeur et incluant la valeur du  $K_D$ .

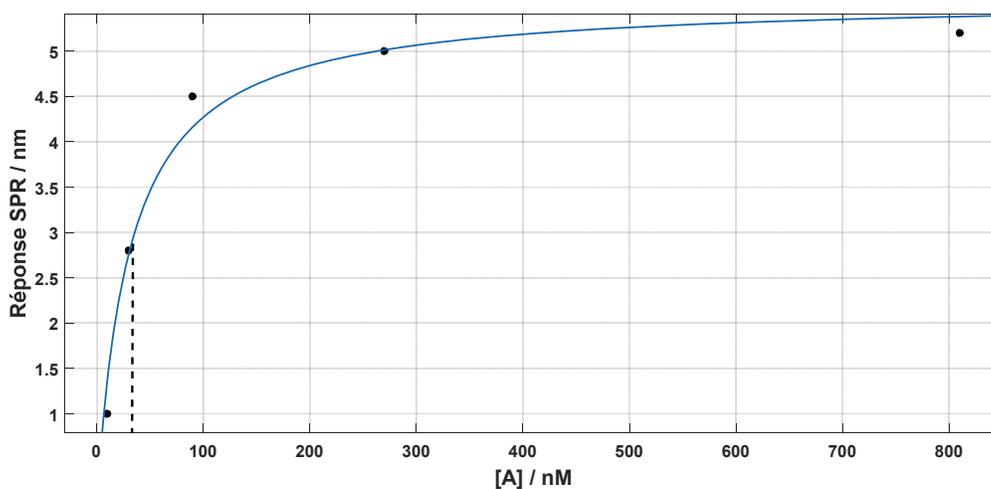


Figure 1.12 : Exemple fictif d'un ensemble de données respectant l'isotherme de Langmuir. Les points noirs représentent les valeurs expérimentales, la ligne solide la modélisation de l'équation 1.8 et la ligne hachée la valeur déterminée du  $K_D$ .

Pour déterminer la valeur du  $K_D$ , il suffit d'utiliser un logiciel permettant de déterminer les paramètres d'une équation à partir de données expérimentales, comme illustré à la figure 1.12.

## 1.5.2 Cinétique

En plus de l'affinité, un paramètre thermodynamique, il est possible de déterminer les paramètres cinétiques de l'interaction biomoléculaire étudiée. Ces paramètres, généralement identifiés  $k_{on}$  et  $k_{off}$ , représentent respectivement la vitesse à laquelle la liaison entre le récepteur et l'analyte se produit et la vitesse de la dissociation du complexe formé. Les unités de ces constantes sont  $\text{mol}^{-1} \text{s}^{-1}$  pour le  $k_{on}$  et  $\text{s}^{-1}$  pour le  $k_{off}$ . Les processus d'association et de dissociation se produisent constamment lors d'une expérience et on peut donc définir un autre paramètre<sup>85</sup> :

$$k_{obs} = k_{on}[A] + k_{off} \quad \text{Équation 1.10}$$

Le paramètre cinétique observé,  $k_{obs}$ , est donc défini à partir des constantes de vitesse d'association et de dissociation et dépend également de la concentration d'analyte en solution. Dans

une solution à forte teneur en analyte, la liaison se produira plus rapidement que dans une solution où l'analyte est très dilué. Il est possible de déterminer  $k_{obs}$  à l'aide d'une équation décrivant la liaison de l'analyte au récepteur<sup>85</sup> :

$$R(t) = \frac{k_{on}[A]R_{max}}{k_{on}[A]+k_{off}} \times (1 - e^{-(k_{on}[A]+k_{off})t}) \quad \text{Équation 1.11}$$

Ici,  $R(t)$  est la réponse SPR générée par la liaison de l'analyte au récepteur en fonction du temps,  $t$ . En traçant  $k_{obs}$  en fonction de différentes concentrations de A, on obtient une droite dont la valeur de la pente est  $k_{on}$  et dont la valeur de l'ordonnée à l'origine est  $k_{off}$ . Il est également possible d'extraire la valeur de la constante thermodynamique de dissociation,  $K_D$ , à partir des constantes cinétiques :

$$K_A = \frac{k_{on}}{k_{off}} \quad \text{Équation 1.12}$$

ou

$$K_D = \frac{k_{off}}{k_{on}} \quad \text{Équation 1.13}$$

Néanmoins, les valeurs d'affinité obtenues par le biais des paramètres cinétiques dévient de celles obtenues par l'isotherme de Langmuir, car les interactions biologiques sont sévèrement affectées par le transport de masse. L'équation 1.11, sous des conditions où le transport de masse est limité, n'est plus valide et les valeurs cinétiques obtenues ne seront pas exactes<sup>85</sup>. Les valeurs cinétiques obtenues par une analyse du  $k_{obs}$  sous des conditions de LTM se trouveront généralement entre celles de la constante de vitesse de transport de masse et de la constante de vitesse intrinsèque du couple de biomolécules impliquées. Toutefois, l'écart entre les valeurs obtenues et la valeur réelle peut être de quelques ordres de grandeur<sup>86</sup>. La prochaine section discutera des manières de déterminer si une expérience se déroule sous des conditions de limitation par le transport de masse (LTM) et des conséquences associées à ce phénomène.

### 1.5.3 Limitation par le transport de masse (LTM)

La limitation par transport de masse est un phénomène à considérer lors de réactions dans lesquelles l'un des partenaires est immobilisé. En effet, la cible de ce récepteur immobilisé sur un substrat doit pouvoir atteindre le récepteur. Différents modes de transport de masse (convection, diffusion, migration) peuvent permettre à un analyte d'atteindre un récepteur immobilisé, mais pour les études réalisées dans le cadre de ce mémoire, seule la diffusion est significative. On considère qu'une réaction est limitée par le transport de masse lorsque la vitesse de la formation de l'interaction entre les deux partenaires est beaucoup plus rapide que celle du transport de masse de l'analyte au récepteur<sup>85</sup>. Dans ce cas, le temps requis pour transporter l'analyte du cœur de la solution au récepteur est supérieur au temps de formation de l'interaction entre l'analyte et le récepteur. Ainsi, le transport de masse limite la vitesse de formation du complexe AR, puisque l'analyte A est transporté au récepteur beaucoup plus lentement que le temps nécessaire pour la formation du complexe.

Différentes méthodes peuvent être employées afin de déterminer si un système est sujet à la limitation par transport de masse. L'une des méthodes la plus utilisée est l'addition de glycérol aux solutions utilisées afin d'augmenter leur viscosité<sup>85</sup>. En effet, comme énoncé ci-dessus, sous des conditions de LTM, la vitesse de formation du complexe AR est dictée par la vitesse de transport de l'analyte A au récepteur R. Donc, en augmentant la viscosité des solutions d'analyte, on diminue encore davantage la vitesse de transport de l'analyte. Ceci se traduit par une vitesse de formation du complexe encore plus faible. Néanmoins, on ne devrait pas voir d'effet sur l'affinité, donc sur le signal à l'équilibre, outre le temps requis pour l'atteindre.

La LTM a aussi des implications au niveau du  $k_{off}$ . En effet, on a vu que la LTM affecte la valeur mesurée du  $k_{on}$  si cette dernière est plus rapide que la vitesse de transport de l'analyte. Toutefois, la valeur du  $k_{off}$  sera également erronée sous des conditions de LTM. En effet, le  $k_{off}$  décrit la vitesse à laquelle l'analyte A se dissocie du récepteur R. Cependant, si la vitesse de transport de l'analyte du cœur de la solution au substrat est lente, l'inverse est également vrai. Ainsi, lorsque A se dissocie de R, comme sa diffusion vers le cœur de la solution est lente, il est probable qu'il se lie de nouveau au récepteur. La valeur du  $k_{off}$  observée est donc moindre que la valeur réelle. Dans des systèmes à flux continu, ce phénomène est un peu moins important grâce au débit imposé, mais dans des systèmes statiques, où les solutions ne sont pas injectées en continu, l'effet de la LTM sur la valeur du  $k_{off}$  est plus

prononcé. Schuck et Minton<sup>86</sup> ont proposé un modèle à deux compartiments afin déterminer les vraies valeurs de  $k_{on}$  et  $k_{off}$  de systèmes sous LTM :

$$\frac{dR_t}{dt} = \frac{-k_{off}R_t}{1 + \frac{k_{on}}{k_{tr}}(B_{max} - R_t)} \quad \text{Équation 1.14}$$

Cette équation différentielle décrit un système à deux compartiments où le premier est le cœur de la solution et le second l'interface solution-substrat. Dans l'équation,  $k_{tr}$  représente le transport entre les deux compartiments.

Une seconde méthode permettant de minimiser l'effet de la LTM sur la valeur mesurée du  $k_{off}$  est l'ajout de ligand ayant une grande affinité pour l'analyte au tampon utilisé pour la dissociation. Ces ligands ont pour rôle de lier les analytes se dissociant du récepteur afin d'empêcher qu'ils se lient à nouveau au récepteur<sup>85</sup>. Néanmoins, afin d'appliquer cette méthode, il est nécessaire de trouver un ligand ayant une grande affinité pour l'analyte et qui n'interagira pas avec le récepteur.

En résumé, la LTM peut avoir un impact très important sur les valeurs des paramètres cinétiques mesurés d'un système biologique. Différentes méthodes peuvent être employées pour déterminer si un système donné est soumis à la LTM ou pour en réduire les impacts. En plus de ces méthodes, deux solutions expérimentales peuvent être employées pour réduire la LMT : réduire la capacité de la surface utilisée (la quantité de récepteurs) et augmenter si possible le débit des solutions injectées. Ces deux facteurs peuvent prévenir la LTM d'un système légèrement affecté par le transfert de masse. En résumé, les résultats obtenus par résonance des plasmons de surface permettent de déterminer des paramètres thermodynamiques et cinétiques importants pour la caractérisation d'interaction biologiques, mais ces résultats sont sujets à certaines limitations, le transport de masse étant la plus importante. Différentes approches permettent de déterminer si on se trouve en situation limitée par le transport de masse et il existe également certains moyens permettant de diminuer l'impact de la LTM sur les résultats obtenus.

## 1.6 Spectroscopie de fluorescence

La spectroscopie de fluorescence est une méthode optique utilisée dans plusieurs applications, qu'il s'agisse du contrôle des aliments<sup>87</sup>, d'imagerie en microbiologie<sup>88</sup>, comme détecteur pour différents types de séparation moléculaire, pour la détection de polluants environnementaux<sup>89</sup> ou la détection de molécules dans des échantillons biologiques<sup>90</sup>. La fluorescence est une technique de choix pour l'analyse de biomolécules, d'où l'intérêt de l'utiliser en tandem avec la SPR pour la caractérisation de systèmes biologiques. Cette section discutera de la théorie de la spectroscopie de fluorescence et du couplage entre un fluorophore (ou marqueur fluorescent) et un substrat plasmonique.

### 1.6.1 Théorie

La fluorescence est un phénomène de luminescence subi par une molécule ou une particule dont un électron a été excité par une source lumineuse. L'émission du photon se fait à partir de l'état singulet  $S_1$  du fluorophore suite à son excitation à partir de l'état fondamental  $S_0$ . Dépendamment de la longueur d'onde utilisée, l'électron peut également être promu au niveau  $S_2$  du fluorophore, mais un processus de conversion interne permettra habituellement sa relaxation à l'état électronique  $S_1$  avant l'émission du photon de fluorescence. En effet, le temps de vie moyen d'un électron à l'état  $S_1$  avant sa relaxation à l'état fondamental est de l'ordre de  $10^{-5}$ - $10^{-10}$ s tandis que la relaxation entre les états  $S_2 \rightarrow S_1$  est de l'ordre de  $10^{-12}$  seconde<sup>91-93</sup>. La figure 1.13 montre les différentes transitions électroniques possible sous la forme d'un diagramme de Jablonski.

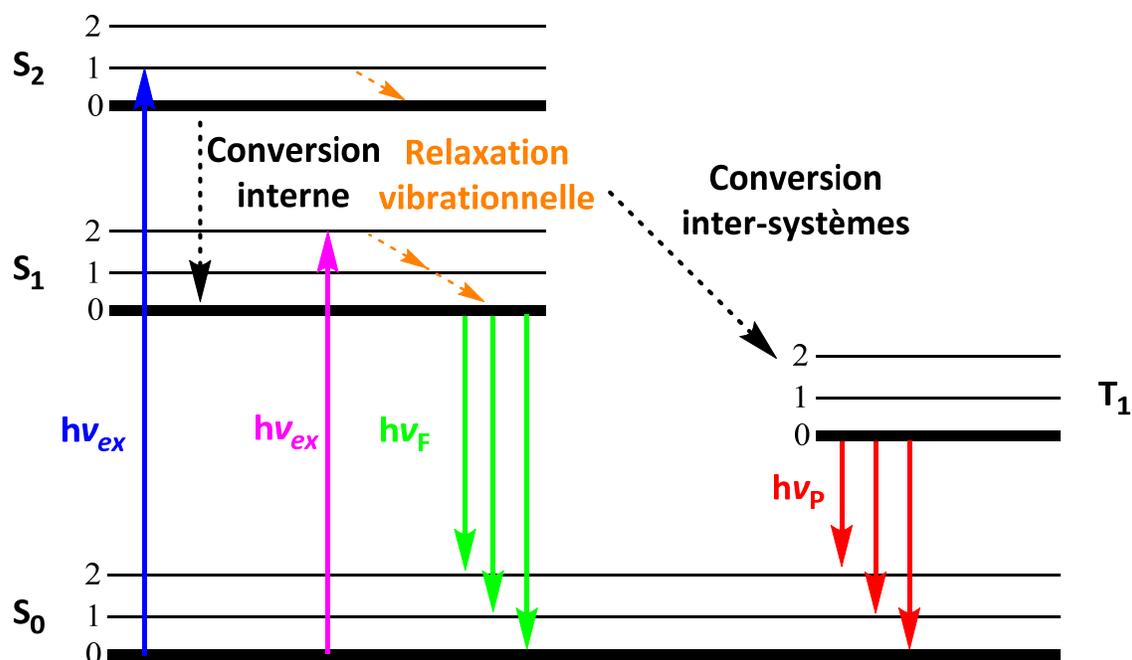


Figure 1.13 : Diagramme de Jablonski représentant les processus d'absorption (flèches bleue et magenta), de relaxation vibrationnelle (flèches oranges), de fluorescence (flèches vertes) et de phosphorescence (flèches rouges). Les processus de conversion interne et inter-systèmes sont également montrés avec les flèches hachurées.

Le diagramme de Jablonski ci-dessus montre les processus d'absorption menant à la fluorescence ou à la phosphorescence. Les lignes représentent les niveaux vibrationnels (0,1,2) des états électroniques singulets ( $S_0$ ,  $S_1$  et  $S_2$ ) et triplet ( $T_1$ ). On constate que le photon émis lors du processus de fluorescence ( $h\nu_F$ ) est d'énergie inférieure que le photon nécessaire pour l'excitation de l'électron ( $h\nu_{ex}$ ). Ceci est dû au fait que l'émission du photon se fait à partir du niveau vibrationnel fondamental de l'état électronique  $S_1$ , alors que l'électron est excité à un niveau vibrationnel plus énergétique des états électroniques  $S_1$  ou  $S_2$ . La différence entre les longueurs d'onde d'absorption et d'émission est appelée *déplacement de Stokes*.

Afin de fluorescer, une molécule doit remplir certaines conditions. La molécule doit notamment être rigide afin de minimiser la dissipation d'énergie par vibrations. Cette rigidité passe par une importante conjugaison et la présence de cycles aromatiques. Ces caractéristiques feront également

en sorte que la molécule soit planaire, ce qui contribue aussi à son efficacité de fluorescence. Les molécules fluorescentes voient leur efficacité décrite par leur rendement quantique ( $\Phi$ )<sup>91, 93</sup> :

$$\Phi = \frac{k_F}{k_F + k_{nr}} \quad \text{Équation 1.15}$$

Ce rendement quantique, décrit par l'équation 1.15, est le rapport des photons émis et absorbés. Dans l'équation,  $k_F$  représente le taux d'émission de fluorescence et  $k_{nr}$  le taux de désactivation non-radiative. Ainsi, pour un fluorophore dont le taux d'émission de fluorescence est beaucoup plus grand que le taux de désactivation non-radiative, le rendement quantique sera près de 1 tandis qu'il sera près de 0 dans le cas inverse. La désactivation non-radiative comprend tous les phénomènes menant au retour de l'électron au niveau électronique fondamental sans émettre de photon. Ces taux d'émission et de désactivation permettent également de déterminer un autre important paramètre en spectroscopie de fluorescence, soit le temps de vie<sup>91</sup> :

$$\tau = \frac{1}{k_F + k_{nr}} \quad \text{Équation 1.16}$$

Ce temps de vie,  $\tau$ , correspond au temps moyen passé par un fluorophore à l'état excité avant de retourner à l'état fondamental, que cela soit par un processus radiatif ou non.

En plus des processus de désactivation non-radiatifs propres aux fluorophores, d'autres circonstances peuvent faire en sorte de diminuer l'émission d'un fluorophore. L'un des plus fréquents est la désactivation par collision, c'est-à-dire lorsqu'un fluorophore à l'état excité entre en collision avec une autre molécule en solution, appelée *désactivateur*. Le fluorophore retourne dans ce cas à l'état fondamental sans émettre de photon, car l'énergie est transférée au désactivateur. L'équation de Stern-Volmer<sup>92</sup> décrit efficacement la diminution d'intensité de fluorescence en présence d'un désactivateur en solution<sup>92</sup> :

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K[Q] \quad \text{Équation 1.17}$$

Dans l'équation de Stern-Volmer,  $F_0$  représente l'intensité de fluorescence attendue en l'absence de désactivateur,  $F$  l'intensité en présence de désactivateur,  $K$  la constante de désactivation de Stern-Volmer et  $[Q]$  la concentration en désactivateur. Ainsi, pour différentes concentrations de désactivateur, on obtient une droite de  $\frac{F_0}{F}$  par rapport à  $[Q]$  dont la pente est  $K$  et l'ordonnée à l'origine égale à l'unité<sup>92</sup>. Il existe plusieurs sortes de désactivateurs, incluant l'oxygène dissout, les halogènes,

les amines ou certaines molécules pauvres en électrons et leurs mécanismes de désactivation varient en fonction du désactivateur<sup>93</sup>. Si le désactivateur est le fluorophore en soi, on parle alors d'auto-désactivation.

Étant donné tous les critères nécessaires pour fluorescer, une faible proportion des molécules organiques fluorescent, ce qui fait en sorte que la spectroscopie de fluorescence est une méthode analytique très sensible, puisque le signal de fond est presque nul. Également, chaque fluorophore a un spectre d'excitation et d'émission qui lui est propre, ce qui fait en sorte que la détection est également très sélective. En choisissant adéquatement certains fluorophores, il est possible de faire de la détection en multiplexage si leurs longueurs d'onde d'émission respectives ne se chevauchent pas.

## 1.6.2 Fluorescence exaltée par un métal (MEF)

Un phénomène de la spectroscopie de fluorescence fait en sorte que le couplage de cette méthode avec la résonance des plasmons de surface est très intéressant. Ce phénomène se nomme *fluorescence exaltée par un métal*, ou MEF. Le MEF repose sur le couplage des plasmons de surface d'une structure métallique avec un fluorophore. Pour que le couplage ait lieu, le fluorophore et la structure métallique doivent se situer à très courte distance. Ce couplage entraîne plusieurs effets bénéfiques sur le processus de la fluorescence émise, décrits par les équations du rendement quantique et du temps de vie qui sont modifiées avec l'ajout d'un terme,  $k_m$ , pour le taux d'émission radiatif associé au métal :

$$\Phi_m = \frac{k_F + k_m}{k_F + k_m + k_{nr}} \quad \text{Équation 1.18}$$

Et

$$\tau_m = \frac{1}{k_F + k_m + k_{nr}} \quad \text{Équation 1.19}$$

On constate que la proximité d'une surface métallique au fluorophore permet d'augmenter le rendement quantique et de diminuer le temps de vie de l'état excité du fluorophore. Inversement, en fluorescence conventionnelle, une diminution du temps de vie signifie généralement une diminution

du rendement quantique, car une diminution du temps de vie est généralement associée à une augmentation de  $k_{nr}$ <sup>91</sup>.

L'interaction des fluorophores avec les structures métalliques peut se produire via trois mécanismes distincts<sup>94</sup>. Le premier est un transfert d'énergie du fluorophore au métal, se traduisant par l'amortissement du dipôle du moment de transition du fluorophore. Ce mécanisme mène à un processus de désactivation non-radiative. Le second mécanisme repose sur la concentration du champ électrique ressentit par un fluorophore à proximité de structures métalliques, car ces dernières agissent comme des antennes (effet paratonnerre). Le champ électrique étant confiné à proximité du métal, si un fluorophore est situé près du métal, il ressentira un champ électrique plus intense, ce qui augmente son taux d'excitation. Le troisième mécanisme est fondé sur l'augmentation du taux d'émission radiative en présence d'un métal. S'il est reconnu que les fluorophores peuvent être désactivés pas un transfert d'énergie s'ils sont trop près d'un métal (mécanisme 1), les mécanismes 2 et 3 contribuent à amplifier l'émission d'un fluorophore. Également, pour qu'un fluorophore bénéficie d'une amplification intéressante, il est important que la bande d'absorption de la structure métallique chevauche le plus possible les bandes d'excitation et d'émission du fluorophore<sup>94-95</sup>.

Compte tenu de la grande variété de structures métalliques pouvant être synthétisées et de leurs propriétés optiques modulables, il est possible d'amplifier le signal fluorescent de la grande majorité des fluorophores disponibles. Finalement, comme les structures métalliques peuvent être plasmoniques, il est intéressant de coupler une technique comme la résonance des plasmons de surface à la fluorescence, une technique pouvant directement bénéficier de la présence du métal sous des conditions appropriées.

## 1.7 Objectif du mémoire

Ce mémoire a pour objectif de démontrer différentes techniques d'immobilisation d'un récepteur biologique à un capteur SPR et de mesurer son interaction avec des analytes biologiques par SPR. L'interaction entre le récepteur et l'analyte sera décrite par son affinité ou par la cinétique de la liaison. Plusieurs récepteurs biologiques seront ainsi étudiés et les difficultés rencontrées pour chaque cas seront énoncées et les solutions trouvées seront discutées. Ce mémoire décrira donc le développement de capteurs adaptés à des problématiques complexes pour lesquelles il n'existe pas nécessairement de solution générique. De nouvelles interactions protéine-protéine seront étudiées et l'utilisation d'un type de récepteur peu utilisé, un ganglioside, sera également démontrée. De plus, un prototype d'instrument pouvant mesurer la fluorescence émise par un fluorophore a également été conçu. Les résultats préliminaires obtenus seront montrés et les perspectives associées à cet axe de recherche seront énumérées.

Finalement, les avantages d'un appareil mesurant à la fois une réponse SPR et de fluorescence seront démontrés dans le cadre de l'étude d'interactions biologiques. La complémentarité de ces deux méthodes sera illustrée. Les perspectives de ces travaux de recherche seront enfin mentionnées.

## Chapitre 2 : Partie expérimentale

### 2.1 Résonance des plasmon de surface

#### 2.1.1 Formation des substrats d'or

Les substrats d'or utilisés pour les essais de SPR sont déposés sur de petits prismes de Dove (12,176 x 20 x 3 mm) en verre BK7. L'appareil utilisé pour effectuer la déposition de métaux est un pulvérisateur cathodique (Cressington, 308R). Les prismes utilisés sont préalablement nettoyés par une solution *piranha* (3 :1 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) puis minutieusement rincés avec de l'eau déionisée. Les prismes sont finalement conservés dans de l'éthanol ou de l'eau jusqu'à leur utilisation. Une mince couche d'environ 1nm de chrome métallique est déposée sur les prismes avant la déposition d'une couche d'environ 50nm d'or. Les prismes couverts d'or sont finalement conservés dans un pétri scellé jusqu'à leur utilisation.

#### 2.1.2 Formation des monocouches auto-assemblées

Les prismes recouverts d'or préparés au préalable sont généralement modifiés avec une monocouche auto-assemblée. La méthode utilisée pour former des monocouches auto-assemblées sur les films métalliques (Or, Argent) repose sur l'utilisation de molécules dotées d'une fonction thiol ou disulfure. Des solutions de ces molécules de concentration de 1mg mL<sup>-1</sup> sont préparées dans du DMF et appliquées sur les surfaces métalliques des prismes pour environ 16h. Les prismes sont par la suite abondamment rincés avec de l'éthanol et de l'eau, puis séchés. Les prismes secs sont finalement entreposés dans un pétri scellé enveloppé de papier d'aluminium jusqu'à leur utilisation.

#### 2.1.3 Acquisition des sensorgrammes

Les essais à base de SPR sont réalisés à l'aide d'un système à interrogation de longueurs d'onde développé au laboratoire. Le système est constitué de 4 diodes électroluminescentes (LED), d'un polariseur monté sur un moteur, de 4 fibres optiques permettant la collecte de la lumière et d'un

spectrophotomètre *Ocean Optics USB4000*. Une carte électronique permet le contrôle de l'instrument à l'aide d'une interface *LabView*. Le prisme est inséré dans un porte-échantillon au travers duquel la lumière des LEDs est illuminée et la lumière réfléchie passe au travers du polariseur et est collectée par les fibres optiques afin d'être analysée par le spectrophotomètre. Les 4 LEDs permettent d'illuminer 4 zones distinctes de la surface du prisme, donc chaque essai permet l'obtention de 3 mesures (canaux A, B et C) et d'un signal de référence (canal D). Une cellule fluïdique en PDMS permettant d'injecter des solutions au-dessus des zones sondées par les DELs est déposée sur le prisme et un levier vient écraser la cellule fluïdique sur le prisme. Ce levier permet d'assurer l'étanchéité de la cellule fluïdique et permet d'enligner des tubes d'entrée et de sortie sur la cellule fluïdique. Les DELs sont illuminées successivement pour balayer les quatre canaux et 10 mesures d'un temps d'intégration de 35ms sont réalisées pour chacun des canaux. L'interface *LabView* permet d'observer le signal brut pour chacun des canaux en temps réel, mais également d'obtenir le sensorgramme, c'est-à-dire le déplacement de la bande SPR au fil de l'expérience. Les sensorgrammes sont finalement sauvegardés en fichier texte à la fin de l'essai. Les sensorgrammes des canaux A, B et C peuvent ensuite être corrigés avec le canal de référence D et moyennés à l'aide du logiciel *MatLab*. Les volumes d'injections sont d'environ 350µL, ce volume permettant de remplacer complètement les solutions précédentes.

## 2.2 Interaction entre la CD36 et des peptides dérivés du GHRP-6

### 2.2.1 Immobilisation de la protéine CD36 à l'aide d'une étiquette de polyhistidine

La surface des prismes est fonctionnalisée au préalable dans un pétri en submergeant les prismes des solutions nécessaires et en les rinçant minutieusement avec de l'eau déionisée entre chaque étape<sup>60</sup>. En premier lieu, les fonctions acides carboxyliques de la monocouche peptidique (3-MPA-LHDLHD-OH) sont activées avec un mélange aqueux 1 :1 de solutions d'EDC (350 mM) et de NHS (110 mM) pour 5 min. Ensuite, une solution aqueuse d'hydrate de N $\alpha$ , N $\alpha$ -Bis(carboxyméthyle)-L-lysine (29 mM) est appliquée pour 2h. Finalement, une solution de sulfate de cuivre pentahydraté (110 mM) est appliquée pour une période de 2h. Les prismes sont par la suite insérés dans le système SPR et une ligne de base est obtenue dans un tampon phosphate (PBS 1X, Corning Cellgro) de pH 7,4. Une solution de CD36 (produite au laboratoire du Pr. Ong, Faculté de Pharmacie, Université de Montréal) à 5 µg mL<sup>-1</sup>

<sup>1</sup> est ensuite injectée pour 20 min, puis rincée avec du PBS (pH 7,4) pour 5 min. Les solutions de peptides à analyser peuvent par la suite être injectées.

## 2.2.2 Détermination des constantes d'affinité des différents peptides

Après l'immobilisation de la CD36, des solutions de peptides de concentrations croissantes entre 550 nM et 35  $\mu$ M sont injectées successivement et rincées par du PBS. Chaque solution de peptide est exposée au capteur pour une durée de 5 min et ces solutions sont statiques au-dessus de la surface du prisme. La valeur de la constante de dissociation est déterminée à l'aide du logiciel *Matlab* et du modèle mathématique de l'isotherme de Langmuir en utilisant les valeurs obtenues des déplacements de la bande SPR pour chaque concentration de peptides.

## 2.3 Interaction entre le gène 3 induit du virus Epstein-Barr (EBI3) et des cytokines

### 2.3.1 Immobilisation de l'EBI3 et détection de cytokines à l'aide d'un couplage peptidique

Cette immobilisation se fait sur un prisme fonctionnalisé par une monocouche peptidique de 3-MPA-LHDLHD-OH. Une ligne de base en présence de PBS à pH 4,5 est obtenue. Ensuite, un mélange aqueux 1 :1 de solutions d'EDC (350 mN) et de NHS (110 mM) est injecté afin d'activer les -COOH terminaux de la monocouche peptidique pour 5 min. La solution d'activation est ensuite rincée avec le PBS (pH 4,5) pour 5 min. Une solution de la protéine EBI3 (produite par Salma Chehboun, laboratoire du Pr. Gauchat, Département de pharmacologie, U. Montréal) à 5  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> dans du PBS à pH 4,5 est ensuite injectée pour 15 min. Cette solution est également rincée avec le PBS (pH 4,5) pour une durée de 5 min. Par la suite, une solution d'éthanolamine 1 M (pH 8,5) est injectée pour 5 min afin de désactiver les fonctions acides carboxyliques activées résiduelles à la surface du prisme. Cette solution est par la suite rincée avec du PBS (pH 7,4) pour 3 min puis pour 5 min avec du PBS (pH 7,4) contenant 0,1 %BSA. Cette solution est de nouveau rincée par du PBS (pH 7,4) pour 3 min. Par la suite, une solution de d'interleukines (IL-6 ou IL-11), provenant de R&D Systems, Minneapolis, à 680 nM est injectée pour

20 min, puis rincée de nouveau avec du PBS (pH 7,4). Le déplacement de la bande SPR entre les deux injections de PBS (pH 7,4) est utilisé pour mesurer la liaison des cytokines à l'EBI3.

### 2.3.2 Contrôle négatif pour la liaison de l'IL-6

La protéine G-CSFR (R&D Systems, Minneapolis) a été utilisée comme récepteur de référence afin de valider la spécificité de la liaison entre l'IL-6 et l'EBI3 immobilisé. Le G-CSFR a été immobilisé à l'aide d'un couplage peptidique de la même manière que l'EBI3. Le tampon utilisé tout au long de l'expérience est toutefois le PBS (pH 7,4). Finalement, une solution d'IL-6 à 680 nM a été injectée pour 20 min puis rincée avec du PBS (pH 7,4) afin de déterminer l'ampleur de la liaison entre l'IL-6 et le G-CSFR.

### 2.3.3 Liaison du complexe EBI3/IL-6 au récepteur gp130

Le récepteur protéique gp130 (R&D Systems, Minneapolis) a été immobilisé à la monocouche par un couplage peptidique. Une ligne de base a été obtenue dans du PBS (pH 7,4) pour 5 min. Ensuite, un mélange aqueux 1:1 de solutions d'EDC (350 mM) et de NHS (110 mM) est injecté afin d'activer les -COOH terminaux de la monocouche peptidique pour 5 min. La solution d'activation est ensuite rincée avec le PBS (pH 7,4) pour 5 min. Une solution de gp130 à  $5\mu\text{g mL}^{-1}$  est ensuite injectée pour 20 min. Cette solution est également rincée avec le PBS (pH 7,4) + 0,1 %BSA pour une durée de 5 min. Par la suite, une solution d'éthanolamine 1 M (pH 8,5) est injectée pour 5 min afin de bloquer les sites fonctions acides carboxyliques activées résiduelles à la surface du prisme. Cette solution est ensuite rincée avec du PBS (pH 7,4) + 0,1 %BSA pour 5 min. Par la suite, une solution du complexe EBI3/IL-6 à 90 nM est injectée pour 15 min, puis rincée de nouveau avec du PBS (pH 7,4). Une solution de 90 nM d'EBI3 a été utilisée comme contrôle négatif sur une surface préparée exactement comme celle pour la liaison du complexe EBI3/IL-6.

### 2.3.4 Détermination de la constante de dissociation pour la liaison de l'IL-6 à l'EBI3

Pour déterminer le  $K_D$  de l'interaction entre l'IL-6 et l'EBI3, l'EBI3 a été immobilisé comme décrit plus haut. Par la suite, au lieu d'injecter une seule concentration d'IL-6, plusieurs solutions de cytokines de concentrations croissantes entre 0,1 et 4,9  $\mu\text{M}$  furent injectées successivement et finalement rincées avec du PBS (pH 7,4). La valeur de la constante de dissociation est déterminée à l'aide du logiciel *Matlab* et du modèle mathématique de l'isotherme de Langmuir en utilisant les valeurs des déplacements de la bande SPR pour chaque concentration d'IL-6.

## 2.4 Interaction entre le GM1 et un peptide synthétique

### 2.4.1 Immobilisation du GM1 incorporé à une vésicule

Le ganglioside GM1 est incorporé dans des vésicules en préparant une solution contenant 5 mol% de GM1 et 95 mol% de 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-phosphocholine (POPC) dans un mélange 2:1  $\text{CHCl}_3$ :MeOH dans un ballon. Ensuite, le solvant est évaporé et le mélange de lipides et de GM1 est dissout dans de l'eau déionisée. La suspension de liposomes est finalement extrudée au travers d'un filtre en polycarbonate d'une porosité de 50 nm afin d'obtenir de petites vésicules unilamellaires de tailles uniformes (SUV). La préparation des vésicules a été réalisée par Isabelle St-Jean du laboratoire du Pr. Leclair (Faculté de Pharmacie, U. Montréal). La surface du prisme est fonctionnalisée à l'aide d'une solution d'octadécylthiol (ODT) dans du 1,4-dioxane afin de former une monocouche très hydrophobe. Pour l'immobilisation du GM1, le prisme est par la suite inséré dans le système SPR. Une ligne de base est obtenue dans une solution saline balancée de Hank à pH=6,5 (HBSS). Ensuite, la solution de vésicules est injectée à la surface du prisme pour 30 min. Par la suite, cette solution est rincée avec du HBSS pour 5 min. Les solutions d'analyte peuvent maintenant être injectées.

## 2.4.2 Détermination des constantes de dissociation pour la sous-unité B de la toxine du choléra (CTB) et un peptide synthétique pour le GM1

Après la fusion des vésicules contenant le GM1 à la surface du prisme, des solutions de CTB de concentrations croissantes entre 0,0431 et 431 nM ou des solutions du peptides synthétique, G23, de concentrations croissantes entre 0,01 $\mu$ M et 100 $\mu$ M sont injectées successivement à la surface du capteur pour une durée de 5 min. Ces solutions sont préparées dans du HBSS. Finalement, les solutions sont rincées avec du HBSS. Les valeurs des constantes de dissociation sont déterminées à l'aide du logiciel *Matlab* et du modèle mathématique de l'isotherme de Langmuir en utilisant les valeurs des déplacements de la bande SPR pour chaque concentration de CTB ou de G23. Le G23 a été synthétisé par Biomatik (Wilmington) et a pour séquence peptidique HLNILSTLWKYRC.

## 2.5 Interaction entre la BP et la GFP

### 2.5.1 Immobilisation de la BP par couplage peptidique et liaison de la GFP

La protéine BP est immobilisée sur une monocouche de peptide par une réaction de couplage peptidique. Une ligne de base dans du PBS p(H=7,4) est obtenue. Ensuite, un mélange aqueux 1:1 de solutions d'EDC (350 mN) et de NHS (110 mM) est injecté afin d'activer les -COOH terminaux de la monocouche peptidique pour 5 min. La solution d'activation est ensuite rincée avec le PBS (pH 7,4) pour 5 min. Une solution de BP à 5  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> est ensuite injectée pour 20 min. Cette solution est ensuite rincée avec du PBS (pH 7,4) pour une durée de 5 min. Par la suite, une solution d'éthanolamine 1 M (pH 8,5) est injectée pour 5 min afin de bloquer les sites activés restant. Cette solution est par la suite rincée avec du PBS (pH 7,4) pour 5 min. Des solutions de GFP peuvent ensuite être injectées à la surface du capteur.

## 2.5.2 Immobilisation de la BP ou de la GFP à l'aide d'une étiquette de polyhistidine

La surface des prismes est fonctionnalisée au préalable dans un pétri en submergeant les prismes des solutions nécessaires et en les rinçant minutieusement avec de l'eau déionisée entre chaque étape. En premier lieu, les fonctions acides carboxyliques de la monocouche sont activées avec un mélange aqueux 1:1 de solutions d'EDC (350 mM) et de NHS (110 mM) pour 5 min. Ensuite, une solution d'hydrate de  $N\alpha$ ,  $N\alpha$ -Bis(carboxyméthyle)-L-lysine (29 mM) est appliquée pour 2 heures. Finalement, une solution de sulfate de cuivre pentahydraté (100 mM) est appliquée pour une période de 2h. Les prismes sont par la suite insérés dans le système SPR et une ligne de base est obtenue dans du PBS (pH 7,4). Une solution de BP ou de GFP à  $15 \mu\text{g mL}^{-1}$  est ensuite injectée pour 15 min, puis rincée avec du PBS (pH 7,4) pour 5 min. Des solutions d'analyte peuvent ensuite être injectées.

## 2.5.3 Détermination de la constante de dissociation pour la liaison de la GFP et de la BP

La constante de dissociation pour la liaison de la GFP à la BP a été déterminée par deux méthodes différentes. Dans le premier cas, des solutions de GFP de concentrations de 0,10 à 8,1  $\mu\text{M}$  ont été injectées successivement sur le même capteur. Dans le second cas, les mêmes concentrations de GFP ont été injectées sur des capteurs différents. Les valeurs du  $K_D$  ont été évaluées à partir des déplacements de la bande SPR pour chaque concentration avec le modèle mathématique de l'isotherme de Langmuir en utilisant le logiciel *Matlab*. Pour les deux cas, le récepteur BP était immobilisé par un couplage peptidique.

## 2.6 Fluorescence

### 2.6.1 Préparation des substrats pour la détection d'ADN marqué

Un tampon est préparé pour l'utilisation des brins d'ADN et contient 300mM NaCl, 20mM phosphate et 1mM EDTA à pH 7. Un brin d'ADN de capture de 45 nucléotides possédant à l'extrémité

3' une fonction thiol a été synthétisé par IDT (Coralville, Iowa) . Un second brin d'ADN de 35 bases azotées, complémentaire au brin de capture, a été synthétisé avec un fluorophore, le 1-(((4',5'-dichloro-3',6'-dihydroxy-2',7'-dimethoxy-3-oxospiro(isobenzofuran-1(3H),9'-(9H)xanthen)-6-yl)carbonyl)oxy) (JOE), à son extrémité 3'. Les séquences des brins d'ADN sont inscrites ci-dessous :

Brin de capture : 5'-TCA CCA CGC TTC AGA GAA ACG TAG AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA-  
3ThioMC3-D-3'

Brin marqué : 5'-TTT TTT TTT TTC TAC GTT TCT CTG AAG CGT GGT GA -JOE-3'

Le prisme d'or est inséré dans l'appareil SPR et une ligne de base dans le tampon est obtenue pour 5 min. Ensuite, une solution de 5  $\mu$ M du brin d'ADN de capture est injectée pour 35 min à la surface du capteur. Cette solution est rincée par le tampon pour 5 min avant d'injecter une solution de 1  $\mu$ M du brin d'ADN marqué pour 15 min. Finalement, cette solution est également rincée avec le tampon.

## 2.6.2 Acquisition des mesures pour l'ADN marqué

La formation du capteur est suivie en temps réel par SPR et de manière ponctuelle par fluorescence à l'aide d'un module de fluorescence monté sur un rail et un actionneur linéaire permettant de mesurer la fluorescence émise dans les quatre canaux du système SPR. Les mesures SPR se prennent en continu jusqu'à l'acquisition des mesures de fluorescence, s'interrompent pour les mesures de fluorescence et redémarrent par la suite. La source d'excitation pour le fluorophore greffé au brin d'ADN est une diode laser (Oz Optics, 50 mW) de 532 nm. L'actionneur linéaire permet de sonder les 4 canaux un à la suite des autres. Un temps d'intégration de 100 ms est utilisé et 20 mesures sont prises par canal à chaque balayage. La diode laser est utilisée à puissance maximale. Généralement, au moins trois balayages des canaux sont réalisés pour s'assurer de la stabilité du signal mesuré.

### 2.6.3 Préparation des substrats pour la détection de Rhodamine 6G

Les prismes couverts d'or sont fonctionnalisés avec une monocouche de 3-MPA afin d'octroyer une charge négative au film d'or. Une méthode de déposition couche-par-couche de polyélectrolytes est employée afin de former des bicouches de polymères. Le polyélectrolyte cationique utilisé est le poly(hydrochlorure d'allylamine, PAH) et le polyélectrolyte anionique est le polystyrène sulfonate (PSS). Des solutions de  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  dans une solution aqueuse de NaCl 0,1 M sont préparées. Afin de former les bicouches polymériques, des cycles d'injections NaCl 0,1 M, PAH, NaCl 0,1 M, PSS sont faits successivement et la formation des couches est suivie par SPR. Les injections de polyélectrolytes durent 2 min tandis que les rinçages de NaCl durent 1 minute. Après 5 cycles, le capteur est rincé avec de l'eau déionisée, de telle sorte que l'assemblage de polyélectrolytes formé expose une couche anionique.

### 2.6.4 Acquisition des mesures de fluorescence pour la rhodamine 6G

La rhodamine 6G (R6G) est utilisée pour les mesures de fluorescence. Sur le même capteur modifié avec les bicouches de polyélectrolytes, des solutions de rhodamine et d'eau déionisée sont injectées successivement. Des solutions de R6G de 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 25 et 50  $\mu\text{M}$  sont préparées dans de l'eau déionisée. Les injections de R6G durent 3 min et les rinçages à l'eau déionisée durent 1 minute. Le signal de fluorescence est mesuré en temps réel durant toute la séquence d'injections de solutions de R6G et d'eau déionisée. Une diode laser (Oz Optics, 50 mW) de 532 nm à puissance maximale est utilisée en tant que source d'émission. La fibre optique de la diode est connectée à un module de fluorescence fait sur mesure afin de pouvoir sonder la surface du prisme au travers de la cellule fluide. Le module de fluorescence est constitué d'une lentille collimatant le faisceau du laser sur un miroir dichroïque. Le faisceau est ensuite dirigé dans une lentille de focalisation puis sur la surface du capteur. La lumière réfléchie et les photons de fluorescence sont de nouveau captés par la lentille de focalisation, sont transmis par le miroir dichroïque, filtrés par un filtre d'émission et sont focalisés à travers une lentille sur une photodiode de silicium (APD130A2, ThorLabs). La photodiode est connectée au système SPR et les données sont affichées dans l'interface *Labview*. Les intensités de fluorescence obtenues pour chaque étape ont été moyennées avec les 100 derniers points de chaque injection de solution de fluorophore ou d'eau déionisée et ces valeurs ont ensuite été normalisées par rapport à la valeur de la concentration la plus élevée.

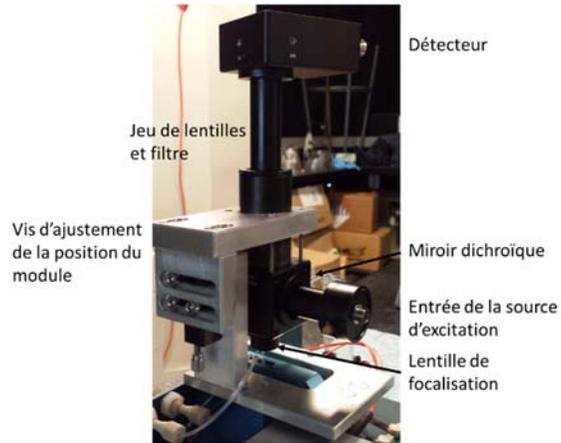


Figure 2.1 : Image du second prototype du module de fluorescence utilisé pour les essais avec la R6G.

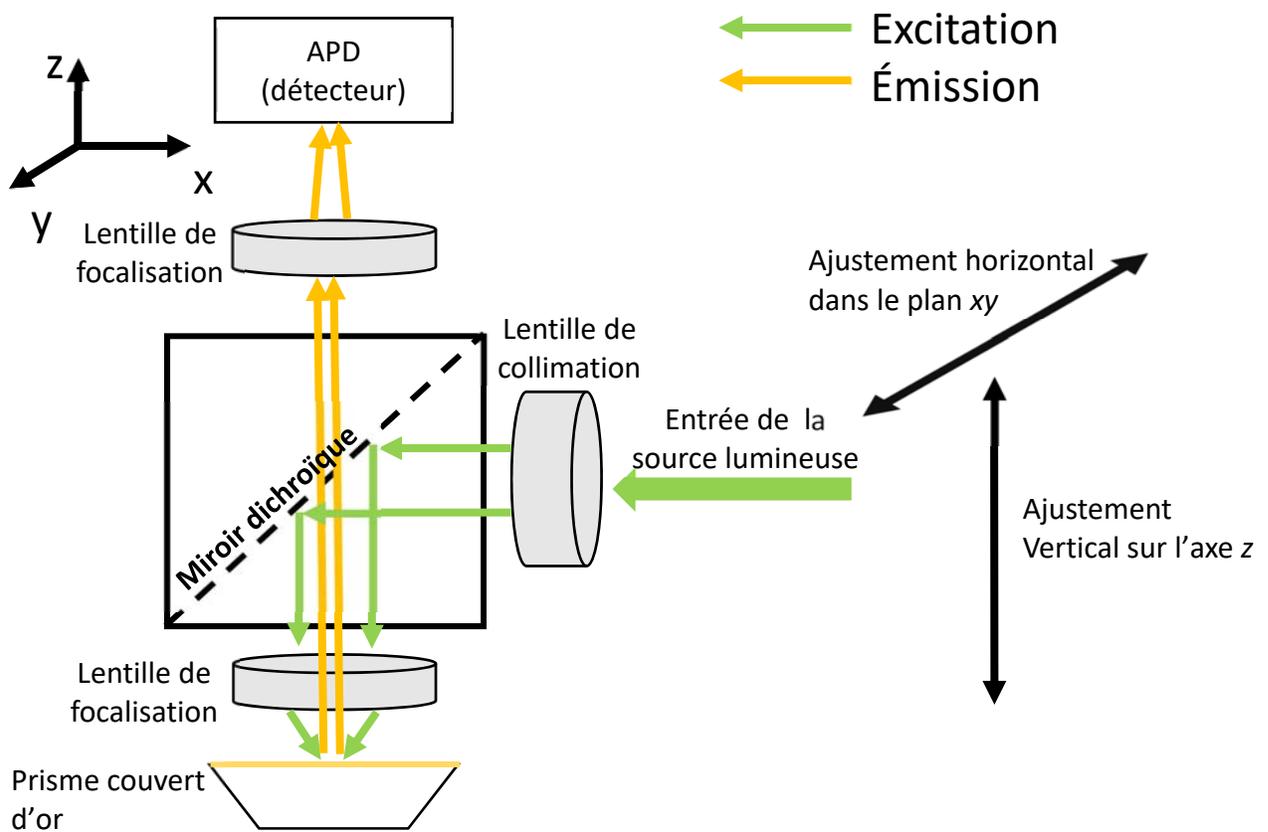


Figure 2.2 : Schéma du système optique développé pour la détection de fluorescence provenant de la surface du capteur SPR.

## Chapitre 3 : CD36 et peptides dérivés du GHRP-6

La CD36 (*Cluster of Differentiation 36*), est un récepteur de type éboueur de classe B exprimé à la surface de plusieurs types de cellules. Ce récepteur est également impliqué dans plusieurs processus biologiques associés à des pathologies, comme l'athérosclérose et la dégénérescence maculaire liée à l'âge (ARMD)<sup>96</sup>. Il est également reconnu que la CD36 est un récepteur du peptide de la relâche de l'hormone de croissance (GHRP)<sup>97</sup>. Afin de valider le potentiel thérapeutique de certains peptides synthétiques dérivés de la GHRP, une méthodologie basée sur la résonance des plasmons de surface a été développée<sup>98</sup> et mise en application. L'affinité de ces nouveaux ligands pour la CD36 et l'amplitude du signal mesuré a permis d'établir une certaine relation entre la structure et l'activité des différentes classes de peptides testées. Ce chapitre décrira la méthodologie employée pour réaliser les essais SPR et montrera les résultats obtenus pour les différents peptides testés. Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec les groupes de recherche des professeurs Huy Ong (UdeM, Pharmacie) et William D. Lubell (UdeM, Chimie).

### 3.1 Immobilisation de la CD36

Afin de tester l'affinité des ligands dérivés du GHRP pour la CD36, l'ectodomaine de la CD36 humaine (résidus 30 à 439) a été amplifié par PCR et l'expression de la protéine s'est faite dans des cellules d'insectes. La production de la CD36 a été réalisée par Petra Pohankova du laboratoire du professeur Ong. La protéine exprimée contenait également une étiquette de polyhistidine au N-terminal. Étant seulement constituée de l'ectodomaine de la CD36, la protéine utilisée correspond donc seulement à la portion de la protéine qui se prolonge dans le milieu extracellulaire. Néanmoins, la liaison des peptides est présumée se produire dans cette région.

La méthode d'immobilisation, à l'aide d'une étiquette de polyhistidine, a été choisie pour bien exposer la boucle exposée par les cellules normalement, la liaison des peptides étant sensée se produire dans cette région de la protéine. L'immobilisation de la CD36 s'est déroulée sur une monocouche du peptide 3-MPA-LHDLHD-OH sur laquelle un analogue du NTA a été greffé à l'aide d'une réaction de couplage peptidique. Ce dérivé de NTA greffé est une molécule permettant quatre sites de coordination pouvant former un complexe avec un cation métallique. Une solution de sulfate de cuivre

est finalement utilisée afin de retenir les cations  $\text{Cu}^{2+}$  à la surface du capteur. Les cations  $\text{Ni}^{2+}$  et  $\text{Co}^{2+}$  sont également fréquemment employés pour l'immobilisation de protéines dotées d'une étiquette de polyhistidine. Le nickel permet une bonne efficacité d'immobilisation, mais est sujet à retenir de manière non-spécifique des protéines contenant des segments riches en histidine. Pour sa part, le cobalt réagit de manière plus spécifique que le nickel avec les étiquettes de polyhistidine. Toutefois, le cuivre lie plus fortement les étiquettes de polyhistidine que le nickel ou le cobalt, de telle sorte qu'il permet la plus grande capacité de liaison, mais également la plus faible sélectivité. Pour cette raison, le cuivre est généralement utilisé exclusivement pour des solutions de protéines purifiées et non dans des mélanges complexes<sup>99</sup>. Puisque la CD36 est déjà purifiée, le cuivre a été employé afin de maximiser son adsorption sur la surface du capteur.

### 3.1.1 Dégradation de la CD36 au fil du temps

Une nette diminution du signal SPR mesuré lors de l'immobilisation de la CD36 a été observée au fil du temps. La diminution du signal observée a été attribuée à la dégradation de la protéine en solution. La réponse SPR mesurée pour l'immobilisation de la protéine pour différentes périodes est illustrée à la figure 3.1. La protéine étant produite dans le laboratoire de professeur Ong suite à un long processus, l'analyse de peptides devait être coordonnée à la production de protéines. Les peptides étudiés n'étant pas tous synthétisés au même moment, il est possible que certains aient été exposés à de la CD36 fraîche ou non, la CD36 étant conservée au réfrigérateur ( $4^{\circ}\text{C}$ ) dès sa réception. Certains peptides ont également été testés avec différentes productions de CD36. Afin de s'assurer que l'activité de la CD36 entre chaque production soit similaire, le peptide YGR100 a été utilisé comme contrôle afin de valider que les valeurs de constantes d'affinité mesurées soient similaires. Ce peptide a été choisi car c'est l'un des premiers peptides synthétisés et il permet de comparer la réponse obtenue avec les différentes productions de CD36 afin de s'assurer de la réponse de cette dernière. La baisse d'activité de la CD36 est observable par le signal moindre résultant de son immobilisation, mais également par l'amplitude plus faible des signaux générés suite à l'injection des différentes concentrations de peptides. Toutefois, malgré des réponses SPR légèrement différentes d'un essai à l'autre pour chaque concentration, les valeurs mesurées d'affinité du YGR100 pour différents essais ne variaient que d'environ 7% (voir tableau 3.1). Ainsi, malgré de légères variations d'activité entre les différentes productions de CD36, les résultats obtenus semblent néanmoins fiables.

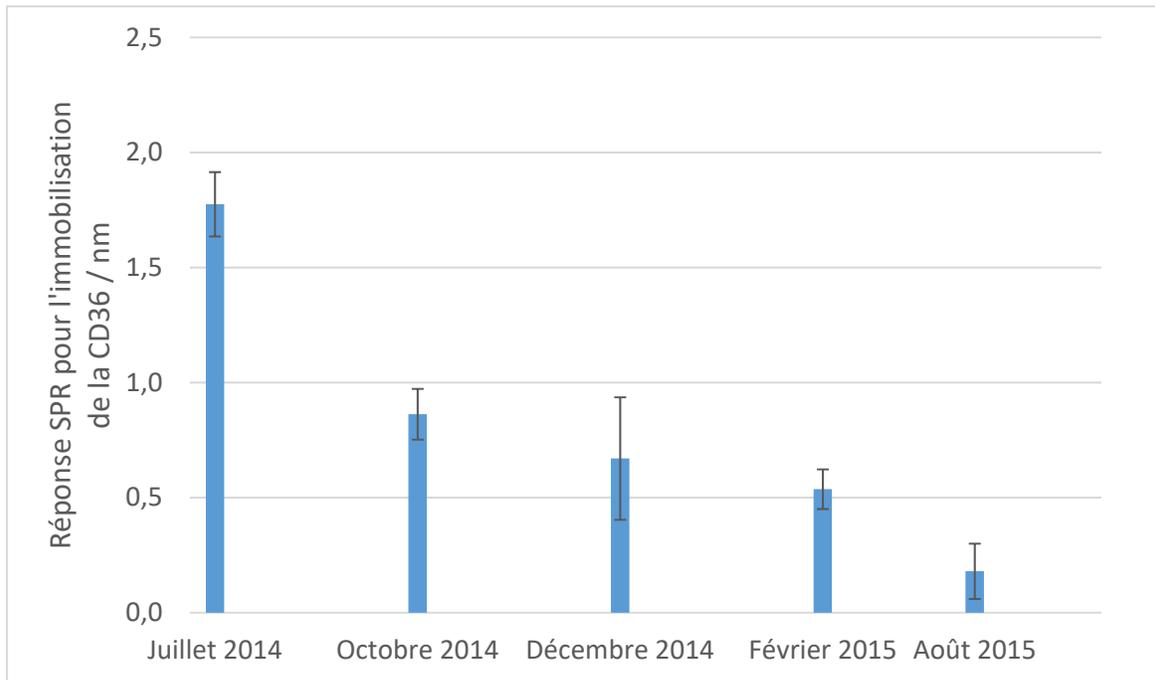


Figure 3.1 : Diminution du signal mesuré par SPR lors de l'immobilisation de la CD36 au fil du temps avec un entreposage à 4°C de la protéine entre chaque mesure.

## 3.2 Analyse de peptides

Des azapeptides dérivés du GHRP-6 ont été synthétisés dans le laboratoire du professeur W.D. Lubell de l'Université de Montréal. Les azapeptides sont des peptides dont au moins l'un des acides aminés a son carbone en alpha du carbonyle remplacé par un atome d'azote<sup>97</sup>. La structure moléculaire du GHRP-6 est illustrée à la figure 3.2.

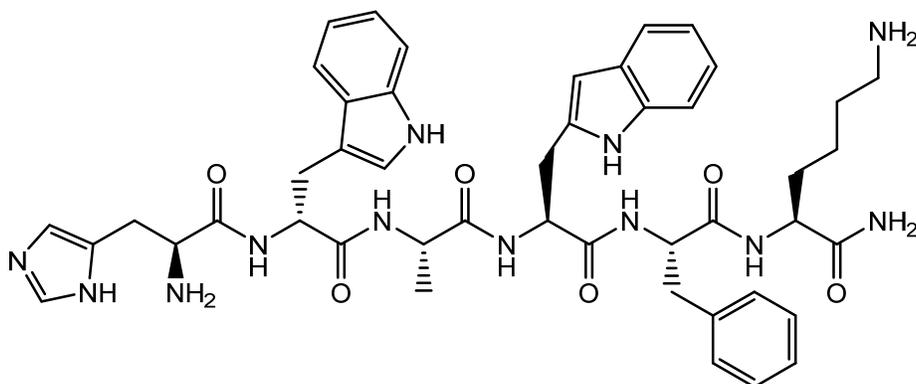


Figure 3.2 : Structure moléculaire du GHRP-6 ou L-histidyl-D-tryptophyl-L-alanyl-L-tryptophyl-D-phenylalanyl-L-lysineamide, un peptide synthétique reconnu pour lier la CD36. Les azapeptides testés par SPR sont tous dérivés de ce peptide.

Plusieurs analogues de ces peptides ont été synthétisés afin de générer une importante bibliothèque de peptides. Seuls les peptides les plus performants d'un point de vue biologique ont été testés par SPR et seront présentés dans cette section. Afin de comprendre l'effet des peptides sur la CD36, la constante de dissociation ( $K_D$ ) et l'amplitude du signal mesuré ont été étudiés pour chaque peptide. La constante de dissociation nous a permis de comparer les affinités des différents peptides pour la CD36. Pour sa part, l'amplitude du signal ( $\Delta\lambda_{SPR_{max}}$ ) nous donne une idée de l'effet qu'a la liaison du peptide sur la structure de la CD36. Nous pensons en effet que cette valeur de mesurée de  $\Delta\lambda_{SPR_{max}}$  est reliée à un changement de conformation de la CD36 suite à la liaison des ligands. Il faut comprendre que les peptides utilisés ont des structures moléculaires très semblables et devraient donc normalement donner une réponse SPR similaire. Ils sont également de très faibles poids moléculaires et ne devraient pas donner lieu à un signal si élevé. Par contre, si la CD36 change de conformation, cela pourrait induire indirectement une augmentation du signal mesuré par le capteur. Des changements allostériques pourraient être impliqués dans l'augmentation inattendue du signal mesuré. Les interactions allostériques sont présentes lorsque la liaison d'un ligand à un récepteur est affectée par la liaison d'un autre ligand. Lorsque les deux ligands sont identiques, on parle alors d'interaction homotrope<sup>100</sup>. Différents modèles décrivent l'interaction entre un analyte et un récepteur, dont l'*hypothèse de l'ajustement induit*. Ce modèle prédit que l'interaction entre l'analyte et le récepteur est souple, au contraire du modèle de la clé et de la serrure, et que la liaison de l'analyte au récepteur peut induire

un changement conformationnel du récepteur pouvant augmenter l'affinité de l'analyte pour le récepteur<sup>100</sup>. Les valeurs obtenues pour différents peptides sont montrées dans le tableau 3.1.

Tableau 3.1 : Constante de dissociation et amplitude du déplacement  
SPR mesurées pour chaque peptide testé (n≥6)

Peptides	$K_D / \mu\text{M}$	$\Delta\lambda\text{SPR}_{\text{max}} / \text{nm}$
<b>YGR100</b>	2,8±0,2	1,0±0,1
<b>azaLys-6</b>	4,1±0,7	1,6±0,2
<b>YGR445-5</b>	2,4±0,4	1,3±0,3
<b>YGR445-6A</b>	8,8±0,6	0,57±0,06
<b>YGR445-6B</b>	13±3	1,5±0,2
<b>MT52</b>	>35μM	1,9±0,3
<b>MT53</b>	22±2	1,9±0,1
<b>MT68</b>	8±1	1,5±0,2
<b>MT69</b>	5,9±0,9	3,7±0,1
<b>MT80</b>	3,7±0,2	1,54±0,01
<b>MT81</b>	1,4±0,2	1,6±0,4
<b>MT86</b>	3,3±0,4	1,1±0,2
<b>MT91</b>	7,0±0,6	1,13±0,07
<b>ST1</b>	2±1	1,9±0,1
<b>ST5</b>	15±3	1,6±0,2
<b>ST6</b>	7±1	1,79±0,07
<b>ST7</b>	14±2	3,3±0,6
<b>ST8</b>	12±3	1,9±0,2

À partir du tableau 3.1, on peut voir que des légères modifications (voir figure 3.3 pour des exemples de modifications structurales) dans la structure des peptides synthétisés engendrent des propriétés tout à fait différentes en ce qui a trait à leur interaction avec la CD36. Ainsi, certains peptides peuvent avoir une très grande affinité (un  $K_D$  faible), mais un  $\Delta\lambda\text{SPR}_{\text{max}}$  faible tandis que d'autres ont au contraire ont une affinité plus faible pour la CD36, mais génère toutefois un  $\Delta\lambda\text{SPR}_{\text{max}}$  significativement plus élevé. Si notre hypothèse comme quoi le  $\Delta\lambda\text{SPR}_{\text{max}}$  est relié à un changement de conformation s'avère vraie, cela serait en ligne avec le postulat de la section 1.5 énonçant que les interactions moléculaires sont mieux représentées par des systèmes moléculaires complexes que par une simple clé et une serrure.

Les structures des peptides MT69 et ST8 sont montrées à la figure 3.4. Leurs structures sont dérivées de celle du GHRP-6, mais de petites modifications ont permis de moduler l'interaction de ces peptides avec la CD36. Chaque peptide synthétique s'est vu modifié à l'aide d'un atome d'azote remplaçant un carbone- $\alpha$  et avec une ou plusieurs autres modifications chimiques. Par exemple, un carbonyle du ST8 a été remplacé par un sulfonyle tandis que me MT69 montre un motif pipéridine attaché par une courte chaîne de carbones à l'atome d'azote. Ainsi, le balayage d'acides aza-aminés sur des peptides structurellement analogues au GHRP-6 a permis d'induire certaines conformations aux peptides et d'obtenir plus d'information concernant le site actif. En effet, le remplacement du carbone  $\alpha$  par un azote impose une restriction conformationnelle et favorise un motif en tour  $\beta$  à la position du résidu aza<sup>97</sup>. Cette conformation induite permet d'élucider davantage la conformation nécessaire à un peptide afin de lui permettre de se lier efficacement au site actif de la CD36. Les modifications chimiques additionnelles effectuées en plus du remplacement du carbone- $\alpha$  par un atome d'azote permettent également de davantage comprendre l'importance de chaque acide aminé et le type d'interaction impliqué lors de la liaison entre le peptide et la CD36.

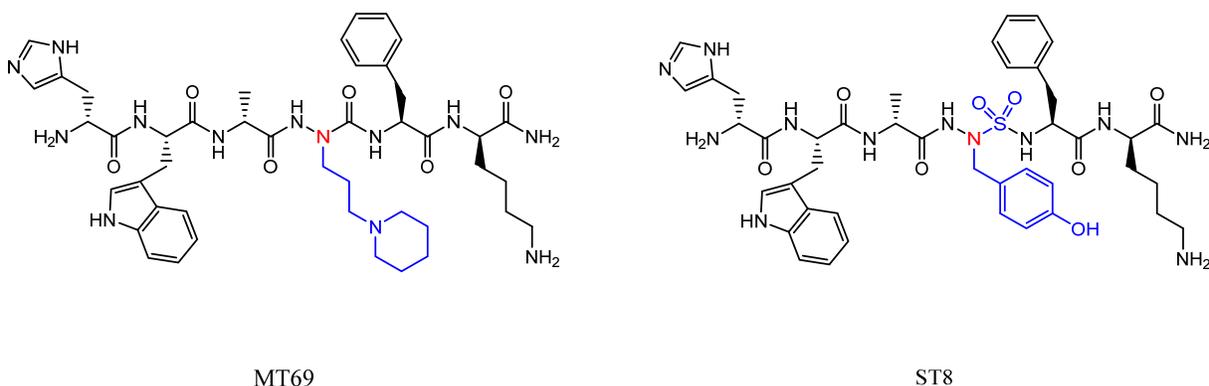


Figure 3.3 : Structures des peptides MT69 et ST8. Les différences entre ces peptides et le GHRP-6 sont montrés en bleu et en rouge. Les atomes d'azote rouges remplacent un carbone- $\alpha$  et les régions bleues sont des modifications chimiques additionnelles.

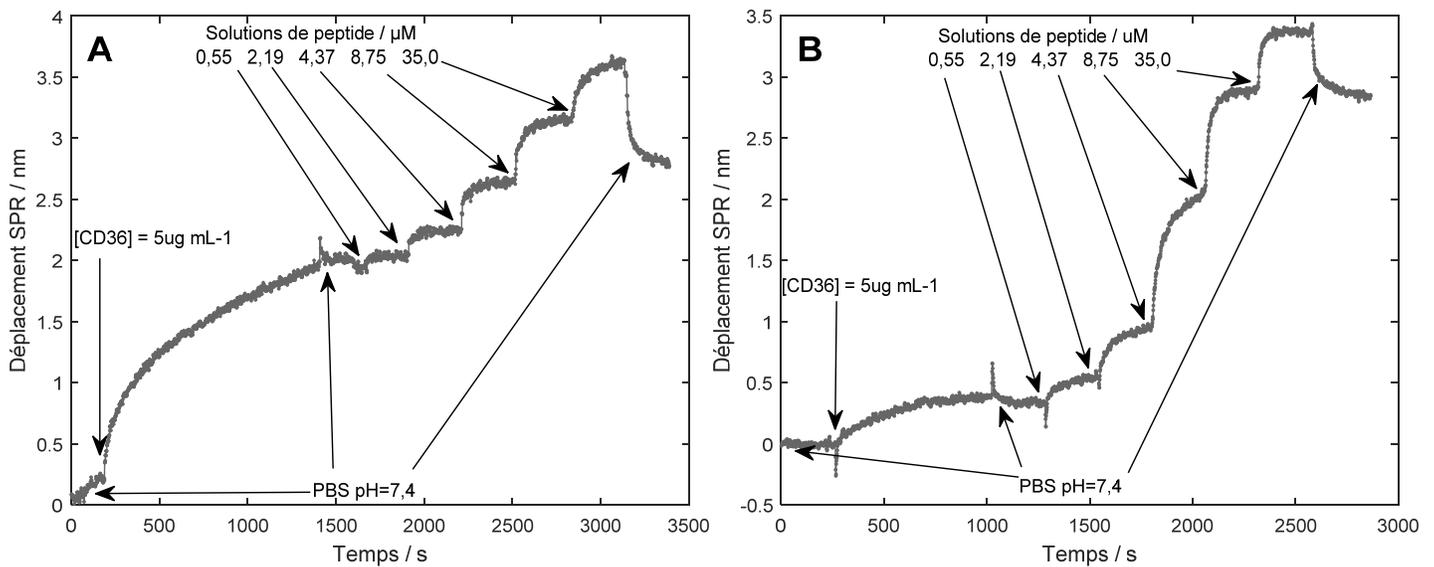


Figure 3.4: Sensorgrammes montrant le comportement de deux peptides différents. En A, le ST8, a un  $K_D$  de  $12\mu\text{M}$  et en B, le MT69, a un  $K_D$  de  $5,9\mu\text{M}$ . L'amplitude maximale de leur signal mesurée est respectivement de 1,9 et de 3,7nm.

Dans la figure 3.4, on observe les sensorgrammes obtenus pour l'immobilisation de la CD36 et l'injection d'une série de cinq solutions des peptides ST8 (gauche) et MT69 (droite). Comme montrée précédemment, ces deux peptides sont très similaires et montrent pourtant deux comportements très différents lors de leur interaction avec la CD36 immobilisée. En premier lieu, la constante de dissociation du MT69 est environ deux fois plus faible que celle du ST8, malgré l'homologie des deux peptides. Également, les déplacements SPR mesurés pour les solutions de MT69 sont beaucoup plus grands que ceux mesurés pour le ST8 et ce même si le signal mesuré pour l'immobilisation de la CD36 est plus faible dans le cas du MT69. Ainsi, les signaux mesurés plus élevés ne sont vraisemblablement pas dus à une quantité plus élevée de CD36 immobilisée à la surface du capteur. Les variations structurales des peptides semblent donc avoir un effet très important sur l'interaction entre ces derniers et la CD36.

### 3.3 Conclusion

En somme, l'étude de l'interaction entre différents peptides de structures homologues au GHRP-6 a été réalisée par SPR. Les peptides synthétiques étudiés sont tous légèrement modifiés par rapport au GHRP-6 et ces modifications modulent fortement l'interaction entre la CD36 et les différents peptides. Afin de comparer l'affinité de chaque peptide pour la CD36, la constante de dissociation associée à chaque peptide a été déterminée. De plus, l'amplitude des réponses SPR obtenues pour la liaison des peptides étant très différentes d'un peptide à l'autre, l'hypothèse qu'un changement allostérique soit responsable des différences observées pour l'affinité des différents peptides est proposée.

# Chapitre 4 : Interaction entre un peptide et le GM1

Les gangliosides sont des récepteurs présents à la surface de plusieurs types de cellules et sont constitués d'un glycosphingolipide et d'un ou plusieurs acides sialiques. Le terme *ganglioside* a été donné à cette famille de molécule en 1942 par Ernst Klenk suite à la découverte de nouveaux lipides isolés des ganglions de cellules du cerveau<sup>101</sup>. Les gangliosides sont principalement impliqués dans la reconnaissance moléculaire par les cellules de différentes espèces présentes dans le milieu extracellulaire et dans le processus d'adhésion entre différentes cellules. Les gangliosides sont donc des récepteurs biologiques au même titre que les anticorps ou les séquences d'ADN ou d'ARN. Toutefois, ils ne sont pas constitués d'acides aminés ou de nucléotides, mais bien de sucres et d'un nombre variable d'acides sialiques. La reconnaissance des gangliosides dépend d'ailleurs de ces sucres et ces résidus d'acide sialique<sup>102</sup>. En plus des résidus de sucre et d'acide, les gangliosides comprennent également deux chaînes hydrophobes permettant leur ancrage dans la membrane cellulaire.

En tant que récepteur impliqué dans la reconnaissance cellulaire, l'affinité du ganglioside GM1 pour un peptide pouvant potentiellement servir de véhicule pour l'administration d'un médicament a été investiguée. Ce peptide pourrait par la suite être conjugué à un médicament et favoriser son absorption par des cellules exprimant le GM1. L'affinité pour une cible connue du GM1, la sous-unité B de la toxine du choléra (CTB), a également été mesurée afin de valider la méthode. Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec le laboratoire du professeur Grégoire Leclair (UdeM, Pharmacie) et l'étudiante à la maîtrise Isabelle St-Jean, qui s'est chargée de préparer les liposomes et de fournir les analytes.

## 4.1 Immobilisation du GM1 au capteur

Le GM1 est l'un des récepteurs de la famille des gangliosides et est donc constitué des résidus de sucres et des chaînes hydrophobes propres à la famille des gangliosides.

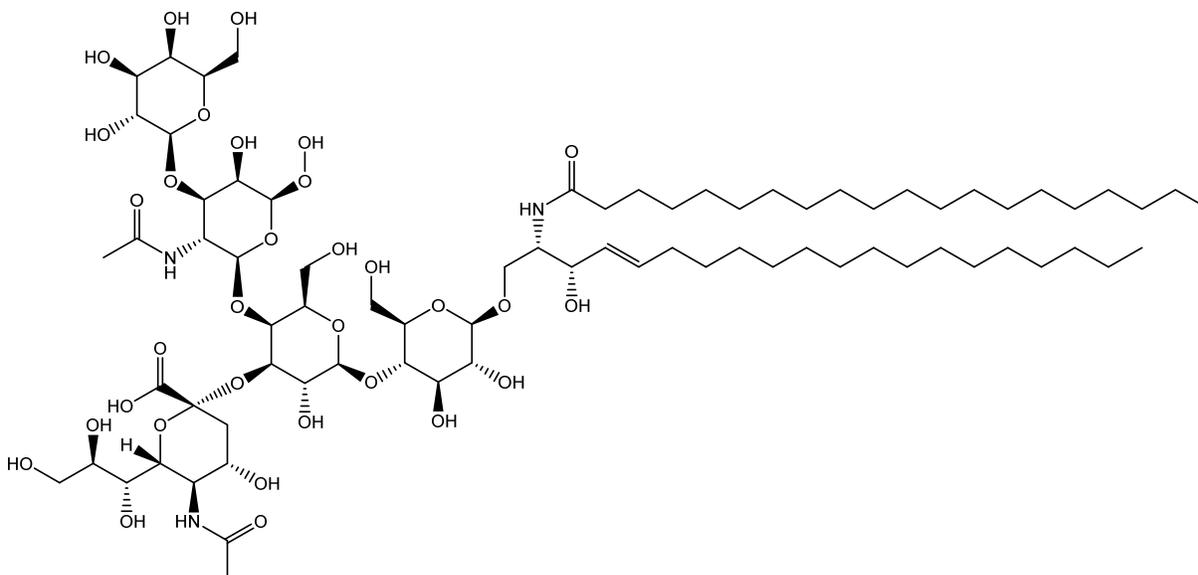


Figure 4.1 : Structure moléculaire du GM1. À gauche on retrouve les unités de sucres responsables de la reconnaissance moléculaire avec les molécules dans le milieu extracellulaire et à droite on retrouve la chaîne d'acide stéarique et une sphingosine permettant l'ancrage du GM1 à la membrane cellulaire.

Tel qu'illustré sur la figure 4.1, il n'y a pas d'amine primaire disponible permettant d'immobiliser le récepteur à l'aide d'un couplage peptidique. Également, il est établi que la reconnaissance moléculaire est due aux unités de sucres du ganglioside et non à sa portion hydrophobe, donc une technique d'immobilisation orientée permettant d'exposer spécifiquement les résidus de sucre serait favorable. La greffe d'une étiquette de polyhistidine, comme pour la CD36, n'est toutefois pas envisageable. Cependant les longues chaînes hydrophobes du ganglioside peuvent être mises à profit en reproduisant une membrane cellulaire à la surface du capteur. En effet, en incorporant ces chaînes de manière contrôlée vers la surface du capteur, la région du GM1 responsable de la reconnaissance moléculaire serait orientée vers la solution.

Afin d'immobiliser de manière orientée le GM1 à la surface d'un capteur, il est possible de mimer une membrane cellulaire à la surface du prisme. Pour ce faire, on peut préparer des vésicules contenant une certaine quantité de GM1. La préparation de ces vésicules est simple et rapide. Il suffit de mélanger dans un mélange de  $\text{CHCl}_3$  et de MeOH des phospholipides et le GM1. Ensuite, l'évaporation du solvant mène à l'obtention d'un mince film contenant le mélange de phospholipides et de GM1. La suspension de ce film dans une solution aqueuse permet finalement l'obtention de

vésicules constituées des phospholipides et du GM1. Les chaînes hydrophobes du GM1 s'incorporent dans la membrane de phospholipides, on s'assure ainsi de l'orientation du GM1.

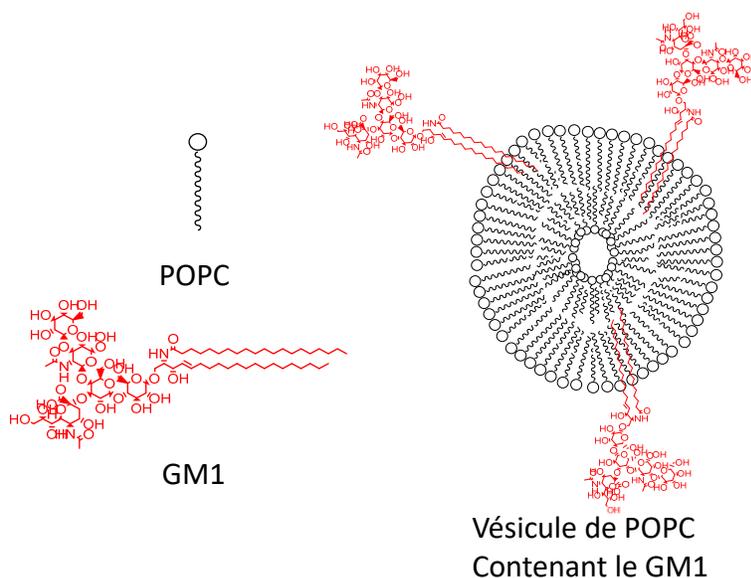


Figure 4.2 : Schéma d'une vésicule exposant le GM1. Les bâtonnets noirs représentent les molécules de POPC s'assemblant en bicouche et la molécule rouge est le GM1 s'incorporant à la vésicule.

L'assemblage de ces vésicules est favorisé, car il permet de limiter les interactions entre les chaînes hydrophobes et le milieu aqueux environnant, mais une certaine tension de surface existe néanmoins de par la forme sphérique de la vésicule. Il est possible d'utiliser cette tension de surface pour entraîner la rupture des vésicules de manière contrôlée. En fonctionnalisant la surface d'or du prisme avec une monocouche très hydrophobe, il est en effet possible d'entraîner la rupture des vésicules pour former un film continu en 2D à la surface du prisme.

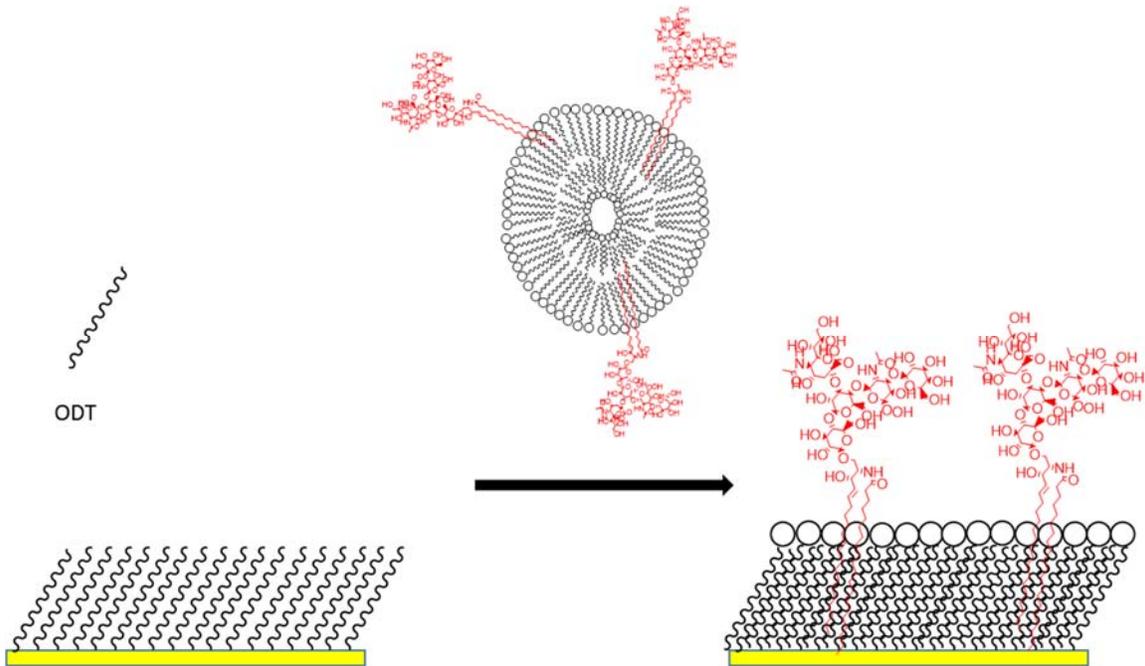


Figure 4.3 : Fusion d'une vésicule sur un substrat d'or fonctionnalisé avec de l'ODT. Les chaînes inclinées présentes initialement forment la monocouche d'ODT et les chaînes noires s'incorporant dans la monocouche sont les phospholipides de la vésicule. En rouge, on a le récepteur GM1 toujours exposé à la solution.

L'énergie interfaciale de cette géométrie plane étant plus faible que celle des vésicules, ces dernières s'ouvrent spontanément afin de former cette monocouche mixte d'alcanethiols et de phospholipides<sup>78</sup>. Les queues hydrophobes des phospholipides étant toujours orientées vers le capteur, les récepteurs GM1 incorporés au préalable aux vésicules sont toujours exposés à la solution submergeant le capteur, les rendant du coup accessibles pour les analytes injectés<sup>78</sup>.

## 4.2 Liaison de la CTB au GM1 immobilisé

La toxine du choléra est la protéine responsable des épidémies de la maladie. Cette protéine est constituée de 6 sous-unités protéiques : une sous-unité A et cinq sous-unités B<sup>103</sup>. La sous-unité A est responsable de l'activité biologique associée au choléra, tandis que les sous-unités B permettent la

liaison du complexe aux cellules<sup>83</sup>. Il est connu que le GM1 est l'un des principaux récepteurs membranaires auquel se lie la CTB. Afin de valider l'immobilisation du GM1 sur le capteur suite à la fusion de vésicules, la liaison de la CTB a été étudiée.

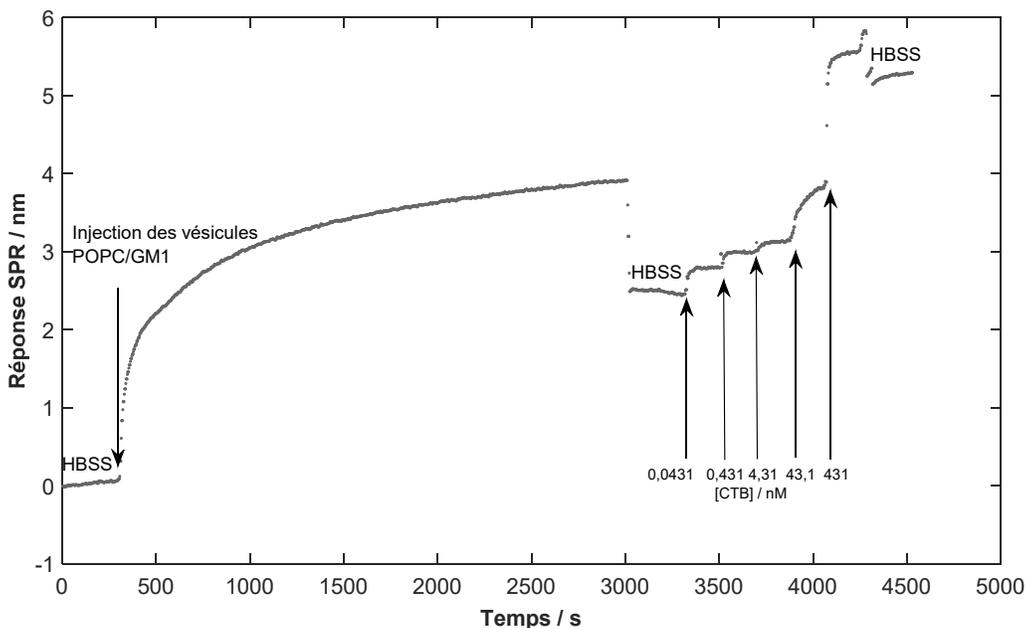


Figure 4.4 : Sensorgramme pour la détermination de la constante de dissociation de la CTB sur le GM1 immobilisé à la surface du capteur SPR.

Le GM1 a été immobilisé en mode *online* sur un capteur fonctionnalisé avec l'ODT, puis des solutions de CTB de 0,0431 nM à 431 nM ont été injectées successivement. La fusion de la vésicule sur la surface du prisme est facilement identifiable et génère une réponse SPR très forte, car les phospholipides de la vésicule et le GM1 forment une couche très compacte à la surface du prisme. On constate aussi que lors du rinçage, le signal diminue. Cette diminution s'explique potentiellement par le rinçage des phospholipides en solution n'ayant pu se lier au capteur. En effet, si le signal SPR mesuré très près de la surface du capteur est plus sensible, les espèces présentes en solution sondées par le champ évanescent ( $\approx 200\text{nm}$ ) vont tout de même générer un signal. Puisque les vésicules sont de gros assemblages moléculaires, leur impact sur l'indice de réfraction est non négligeable. Ces dernières, même si elles ne sont pas directement liées au capteur, génèrent un signal significatif qui s'estompe après le rinçage de la solution par le tampon. Il se peut aussi que certaines de vésicules immobilisées

au capteur décrochent également lors du rinçage, ce qui viendrait aussi expliquer la diminution de signal observé. Par la suite, les cinq solutions de CTB sont injectées l'une à la suite de l'autre et on obtient une réponse claire du capteur, même pour la solution à 43,1 pM, signe d'une interaction assez forte entre l'analyte et le récepteur.

À partir des résultats obtenus pour les différentes concentrations de CTB, la constante de dissociation de la CTB et du GM1 a été déterminée à l'aide du logiciel MatLab. Les données obtenues sont illustrées à la figure 4.4.

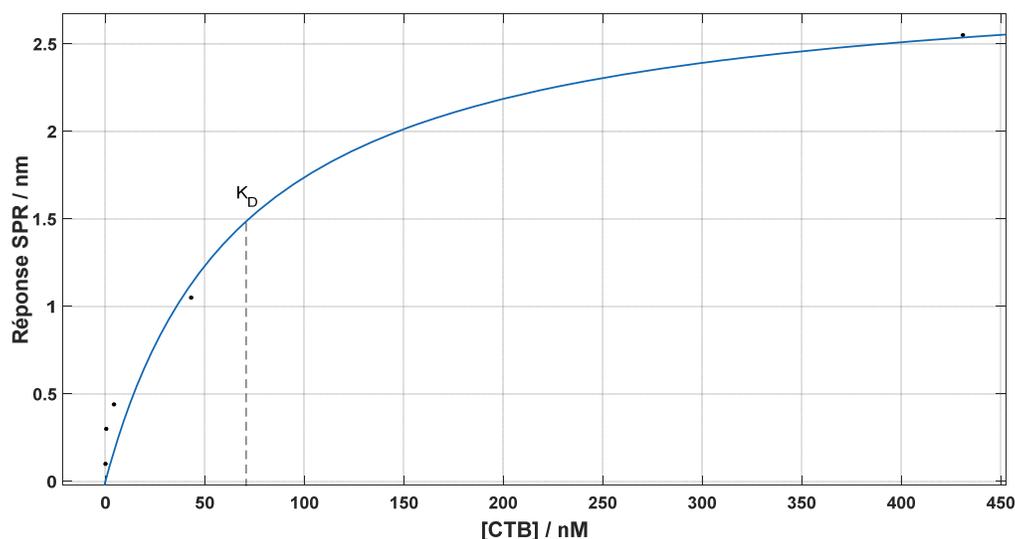


Figure 4.5 : Modélisation de l'isotherme de Langmuir à partir des données expérimentales obtenues pour la liaison de la CTB au GM1 ( $R^2=0,9578$ ). La ligne hachurée indique la valeur de la constante de dissociation déterminée.

La constante de dissociation extraite de ces valeurs expérimentales est de  $57 \pm 17$  nM, une valeur en accord avec celles trouvées dans la littérature. En effet, des valeurs de  $K_D$  entre le picomolaire ( $460 \text{ pM}^{104}$ ) et le nanomolaire ( $1,1 \text{ nM}^{105}$ ,  $50 \text{ nM}^{104}$ ) sont rapportées pour le système GM1-CTB, mais les valeurs sont typiquement de l'ordre du bas nanomolaire<sup>106</sup>. Ces différentes valeurs sont également obtenues à l'aide de différentes méthodes (ITC<sup>104</sup>, SPR<sup>83, 103</sup>, fluorescence<sup>106</sup>), ce qui explique en partie la disparité entre les résultats trouvés. Plusieurs facteurs peuvent influencer la valeur de la constante de dissociation obtenue par SPR, qu'il s'agisse du tampon utilisé pour l'interaction ou du type de phospholipides utilisés pour former les vésicules. En effet, si différents phospholipides sont utilisés pour la préparation des vésicules contenant le GM1, celles-ci formeront une membrane légèrement

différente à la surface du capteur et l'orientation du GM1 ne sera pas nécessairement la même. Également, l'interaction sera différente si on utilise la sous-unité B de la toxine seule ou la toxine complète. Comme la toxine complète est constituée de 5 sous-unités B, un effet d'avidité pourrait être observé et les valeurs de  $K_D$  en seront affectées. Les données obtenues et la reproductibilité (n=3) sont montrées au tableau 4.1.

### 4.3 Liaison du peptide G23 au GM1

La valeur de la constante de dissociation obtenue pour la CTB étant en accord avec les valeurs trouvées dans la littérature, il semble que l'immobilisation du GM1 soit adéquate pour permettre la liaison d'analyte et la construction d'un biocapteur SPR. Le peptide synthétique, G23 (HLNILSTLWKYRC), a ensuite été testé afin de déterminer s'il pourrait servir de véhicule pour un médicament. Ce peptide a montré une certaine affinité pour le GM1 et a été utilisé comme médiateur à la surface de polymérosomes permettant de faciliter le transport à travers la barrière hématoencéphalique<sup>107</sup>. En effet, si la constante de dissociation du complexe peptide-GM1 est suffisamment petite pour que ce dernier soit utilisable cliniquement, des tests avec le médicament conjugué au peptide pourront être réalisés par la suite. La méthodologie employée est identique à celle ayant permis l'étude de l'interaction entre le GM1 et la CTB, mais les solutions de CTB ont été remplacées par des solutions du peptide G23 dans la gamme de concentrations de 0,01 à 100  $\mu$ M.

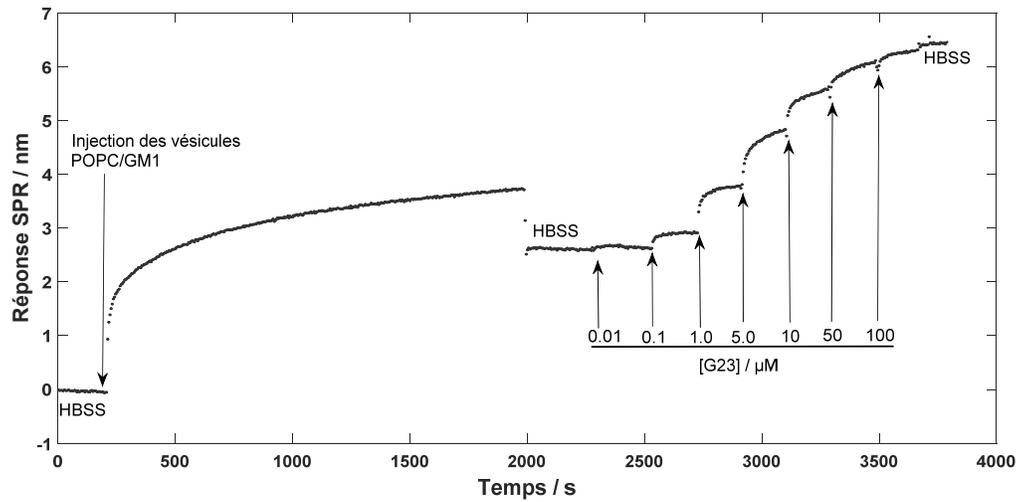


Figure 4.6 : Sensorgramme pour la détermination de la constante de dissociation du peptide G23 sur le GM1 immobilisé à la surface du capteur SPR.

Tout comme pour l'étude de l'interaction entre la CTB et le GM1, on observe un grand signal SPR associé à la fusion des vésicules sur la surface du capteur. La même diminution du signal est également observable après l'étape de rinçage. Ensuite, pour chaque injection des solutions de G23, un signal mesurable est observé. Finalement, comme pour l'interaction CTB-GM1, la constante de dissociation associée à la liaison du G23 au GM1 a été déterminée à partir des données expérimentales à l'aide de l'isotherme de Langmuir.

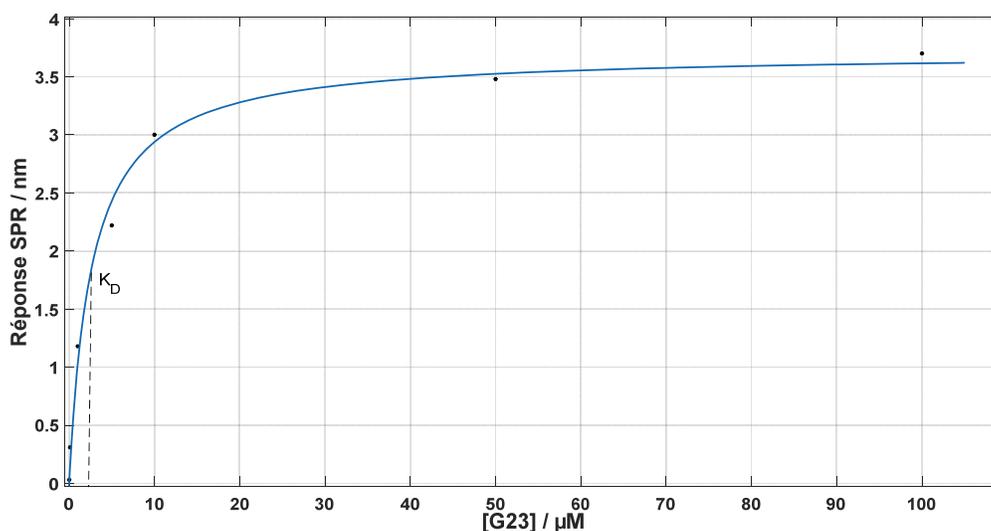


Figure 4.7 : Modélisation de l’isotherme de Langmuir à partir des données expérimentales obtenues pour la liaison du peptide G23 au GM1 ( $R^2=0,9916$ ). La ligne hachurée indique la valeur de la constante de dissociation déterminée.

Les données obtenues respectent très bien le modèle et la gamme de concentrations utilisée est adéquate. La constante de dissociation moyenne déterminée est de  $2,1 \pm 0,7 \mu\text{M}$  (tableau 4.1). Ces résultats incitèrent notre collaboratrice Isabelle St-Jean et le professeur Grégoire Leclair à conjuguer le peptide à un espaceur et à un médicament afin de tester l’efficacité du G23 dans une prodrogue. À ce jour, l’essai de perméabilité développé pour déterminer si la conjugaison du peptide G23 à un antibiotique, la pipéracilline, permet l’amélioration de l’absorption intestinale de l’antibiotique n’est pas concluant. Des travaux utilisant un marqueur fluorescent seront réalisés pour évaluer l’évolution spatiale du peptide G23 de part et d’autre de la membrane cellulaire utilisée pour l’essai de perméabilité.

Tableau 4.1 : Constantes de dissociation trouvées pour la liaison d’analytes au GM1.

Récepteur	Analyte	Intervalle de concentration	$K_D$ moyen (n=3)	Écart-type	%RSD
GM1	CTB	0,0431-431nM	57nM	17nM	30
GM1	G23	0,01-100 $\mu\text{M}$	2,1 $\mu\text{M}$	0,7 $\mu\text{M}$	33

## 4.4 Conclusion

En somme, la fusion de vésicules sur une monocouche d'ODM très hydrophobe a permis l'immobilisation du récepteur GM1 à la surface du capteur. La détection de deux analytes du GM1, la sous-unité B de la toxine du choléra et le peptide G23, a été possible par SPR et les constantes de dissociation de ces deux analytes ont également été déterminées. La valeur du  $K_D$  obtenue pour la CTB,  $57 \pm 17$  nM, étant proche des valeurs théoriques obtenues par d'autres méthodes (entre 460 pM et 50 nM), la méthodologie employée semble adéquate. L'affinité trouvée du G23 pour le GM1 est suffisante pour le tester comme constituant d'une prodrogue. Le médicament conjugué au peptide G23 n'étant pas disponible au moment des tests, il n'a pas été possible de tester la liaison de la prodrogue par SPR. Ainsi, la SPR a montré son utilité pour la découverte de potentiels nouveaux médicaments ou traitements. L'étude de l'interaction de deux molécules pour le GM1, faisant partie d'une classe de récepteurs peu étudiés, a également montré des résultats très encourageant en ce qui a trait à l'étude de récepteurs non protéiques. L'utilisation de vésicules pour l'immobilisation de molécules à la surface d'un capteur pourrait également être étendue à d'autres types de molécules pouvant s'incorporer dans la vésicule comme des fluorophores organiques ou d'autres classes de récepteurs.

# Chapitre 5 : Interactions entre des cytokines et l'EBI3

La protéine EBI3, aussi appelé IL-27B, est une sous-unité de deux cytokines distinctes, soient l'IL-27 et l'IL-35. Ces deux cytokines sont reconnues pour avoir des effets bénéfiques dans des modèles de maladies infectieuses ou auto-immunes. L'IL-27 peut déclencher la signalisation dans les cellules T, B et les myélocytes<sup>108</sup>. Pour sa part, l'IL-35 est impliquée dans la fonction de régulation des cellules T<sup>109</sup>. Les cytokines IL-27 et IL-35 sont toutes deux constituées de deux sous-unités, respectivement p28/EBI3 et p35/EBI3 et ces complexes ne forment pas de lien covalent lors de leur assemblage<sup>110</sup>. Étant donné que les sous-unités p28 et p35 peuvent être produites indépendamment, l'administration d'EBI3 ou de l'un de ses dérivés pourrait avoir un effet thérapeutique si ces derniers parviennent à lier les sous-unités p28 ou p35 libres en solution.

Il a également été montré que l'activité de l'EBI3 est liée à sa capacité à moduler la trans-signalisation de l'IL-6, bien que cette capacité soit plus faible que celle du récepteur soluble IL-6R $\alpha$ . La liaison de l'EBI3 à l'IL-6 pourrait promouvoir les fonctions pro-inflammatoires de l'IL-6 à travers la modulation de sa trans-signalisation<sup>99, 111</sup>.

Afin de déterminer si l'EBI3 pourrait être administré afin de générer un effet thérapeutique, la résonance des plasmons de surface a été utilisée afin de vérifier si l'EBI3 lie véritablement l'IL-6. La spécificité de l'interaction a également été validée et la liaison du complexe IL-6/EBI3 à un récepteur responsable de la transduction du signal, le gp130, a été montrée. Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec le laboratoire du professeur Jean-François Gauchat (UdeM, Pharmacologie) et l'étudiante au doctorat Salma Chehboun. Salma Chehboun s'est chargée de fournir le matériel biologique et de fournir l'expertise biologique pour bâtir les essais de résonance des plasmons de surface.

## 5.1 Interaction entre l'IL-6 et l'EBI3

Afin de déterminer si l'EBI3 est en mesure de lier l'IL-6, une méthodologie a été développée pour l'immobilisation de l'EBI3 à la surface du capteur et la détection subséquente de l'IL-6. L'EBI3 a

été immobilisé sur une monocouche peptidique de 3-MPA-LHDLHD-OH à l'aide d'une réaction de couplage peptidique impliquant l'EDC et le NHS. Un tampon phosphate de pH 4,5 a été employé pour toutes les étapes de l'immobilisation du récepteur, car l'EBI3 utilisé n'est pas stable au pH physiologique en solution. Par la suite, pour la détection de l'IL-6, le PBS 1X à pH 7,4 a été utilisé. Afin de bien bloquer les sites activés par la réaction impliquant l'EDC/NHS, du PBS pH 7,4 auquel a été ajouté 0,1% de BSA a été injecté avec la solution d'IL-6. Une solution de 680nM d'IL-6 dans le PBS a ensuite été injectée pour une durée de 20 min afin de permettre la liaison de la cytokine à l'EBI3. Afin de confirmer que l'IL-6 lie l'EBI3 sélectivement, la réponse SPR mesurée lors de sa liaison a été comparée à la réponse obtenue avec un second récepteur, le G-CSFR (figure 5.2). Le G-CSFR fait partie de la superfamille des récepteurs de cytokines<sup>99</sup>, mais aucune interaction entre ce dernier et l'IL-6 n'est rapportée dans la littérature à notre connaissance. De plus le G-CSFR est très similaire au gp130, une sous-unité de certains récepteurs de cytokines IL-6. Le domaine extracellulaire du G-CSFR partage en effet 46% de sa séquence avec le gp130<sup>112</sup>. Ce récepteur est donc approprié pour servir de contrôle négatif pour la liaison de l'IL-6. La figure 5.1 illustre les sensorgrammes typiques obtenus dans les deux cas de figure.

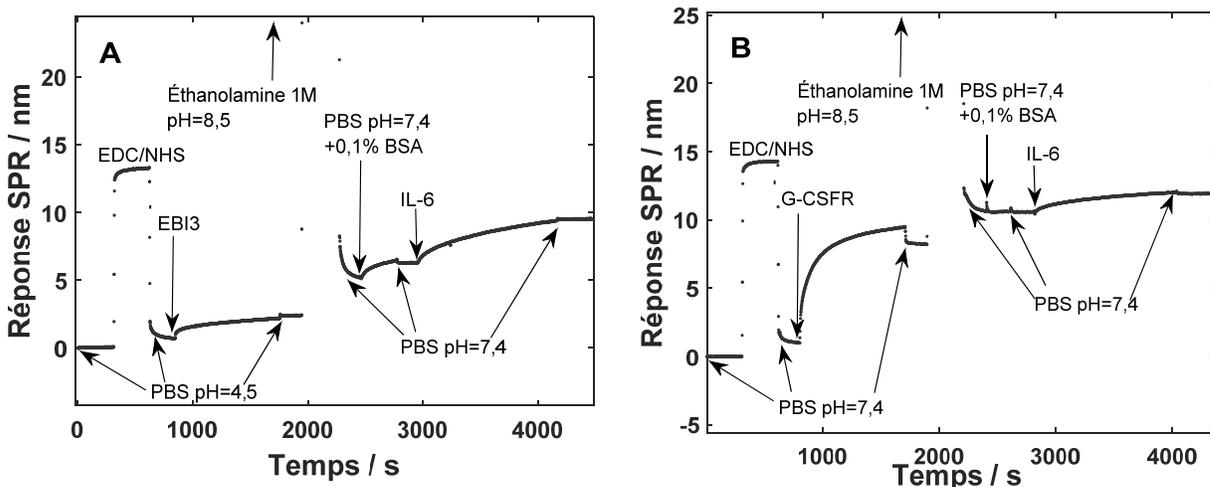


Figure 5.1 : Sensorgrammes pour la détection d'une solution de 680nM d'IL-6. En A, l'EBI3 est employé comme récepteur tandis qu'en B le G-CSFR a été immobilisé. L'immobilisation des récepteurs à l'aide

d'un couplage peptidique est suivie de la désactivation des groupes réactifs sur les fonctions acides carboxyliques de la monocouche peptidique. Finalement, la liaison de l'IL-6 est montrée.

L'analyse pour les deux récepteurs s'est déroulée de la même manière à l'exception de l'utilisation de PBS pH 7,4 tout au long de l'essai impliquant le G-CSFR, ce dernier étant stable en solution à pH physiologique. On observe un signal beaucoup plus élevé pour l'adsorption du G-CSFR par rapport à l'adsorption de l'EBI3 (environ à 900s sur les sensorgrammes de la figure 5.1) et ce, même si les concentrations utilisées sont les mêmes dans les deux cas, soit 204 nM. Ceci s'explique par la différence de masse molaire des deux récepteurs. En effet, l'EBI3 a un poids moléculaire d'environ 35kDa tandis que celui du G-CSFR est de 110kDa. Étant plus volumineux que l'EBI3, il n'est pas étonnant que l'immobilisation du G-CSFR induise une plus grande réponse que celle de l'EBI3. Le signal mesuré pour l'immobilisation du G-CSFR est de  $\Delta\lambda=7.1$  nm tandis que celui mesuré pour l'immobilisation de l'EBI3 est de  $\Delta\lambda=2.4$  nm. Le rapport des signaux mesurés correspond presque qu'exactement à celui des masses molaires du G-CSFR et de l'EBI3, ce qui est attendu. Également, comme le pH du tampon utilisé dans les deux réactions d'immobilisation n'est pas le même, cela peut peut-être entraîner une légère différence de réactivité, bien que la réaction de couplage peptidique à base d'EDC et de NHS soit sensée être efficace entre un pH de 4,5 et le pH physiologique<sup>110</sup>. L'absence de signal associé à la liaison de la BSA contenue dans le PBS injecté après l'éthanolamine montre peut-être aussi que le G-CSFR couvre plus efficacement la surface du capteur que l'EBI3.

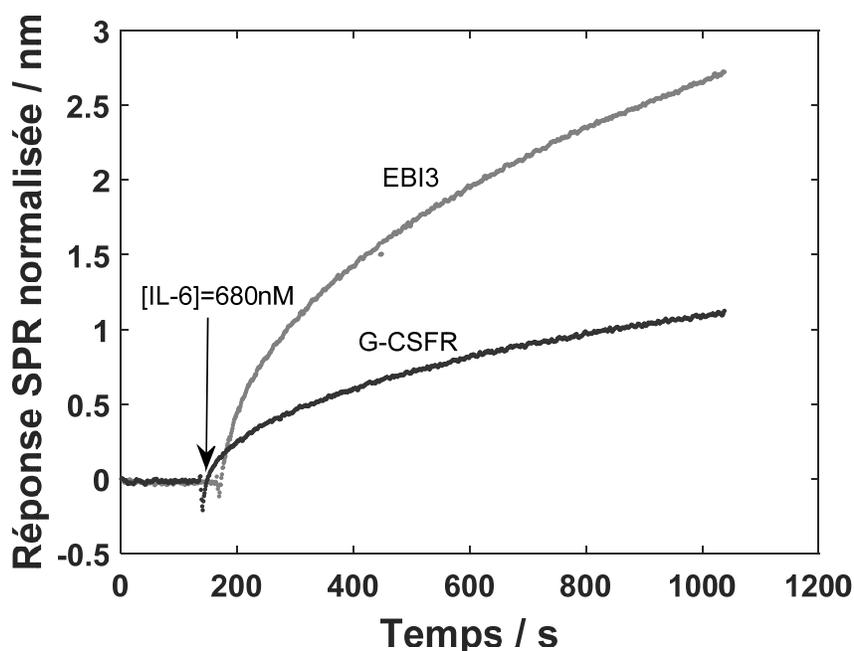


Figure 5.2 : Comparaison de la liaison de l'IL-6 sur l'EBI3 (courbe grise) et sur le G-CSFR (courbe noire). Dans les deux cas, une solution de 680nM d'IL-6 dans du PBS pH 7,4 a été injectée à la surface du capteur. Les données sont directement tirées des sensorgrammes de la figure 5.1, mais ont été mises à 0 pour superposer les injections d'IL-6.

Tel qu'illustré à la figure 5.2, la liaison de l'IL-6 génère une réponse près de trois fois plus importante sur l'EBI3 que sur le G-CSFR immobilisé. Les réponses SPR des deux courbes présentées et leur échelle de temps ont été mises à zéro afin de pouvoir les superposer le plus adéquatement possible. Vu la ressemblance du G-CSFR avec un des récepteurs connus de l'IL-6, il n'est pas si surprenant d'observer une liaison entre eux. Ceci dit, la liaison entre l'IL-6 et l'EBI3 est clairement démontrée par ces résultats.

## 5.2 Interaction entre l'IL-11 et l'EBI3

Ensuite, la spécificité de la liaison de l'IL-6 à l'EBI3 a été évaluée en utilisant une autre interleukine, l'IL-11. L'IL-11 est une cytokine tout comme l'IL-6 et présente des fonctions biologiques similaires à celle-ci. Vu leur ressemblance, l'IL-11 a été utilisée afin de valider si la liaison observée entre

l'EBI3 et l'IL-6 est spécifique à l'IL-6 ou plutôt partagée avec d'autres cytokines. Pour comparer la liaison de l'IL-11 à l'EBI3, une expérience comme celle avec l'IL-6 a été réalisée (voir figure 5.3).

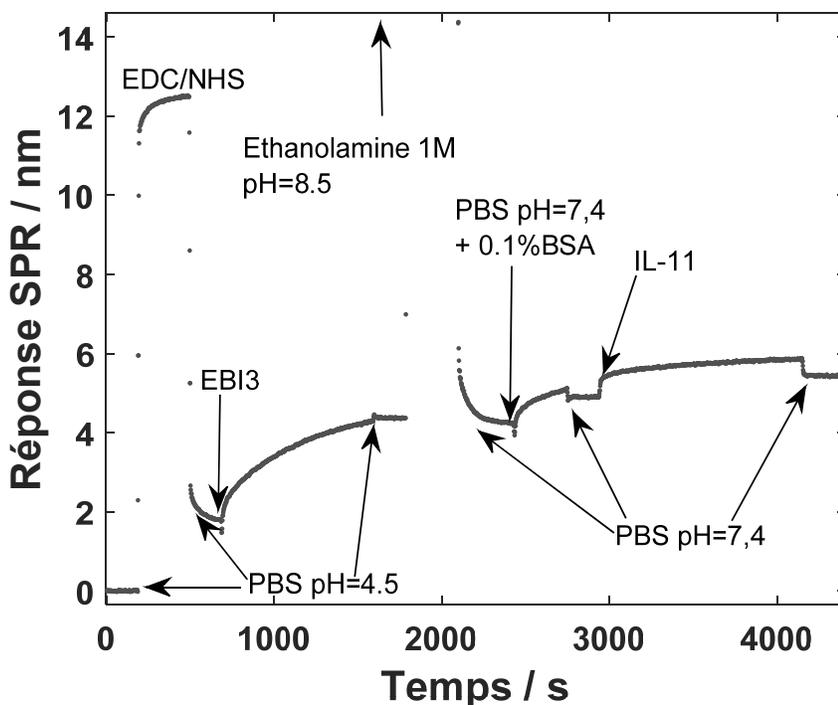


Figure 5.3 : Sensorgramme pour la liaison de l'IL-11 au récepteur EBI3. Une solution de 680nM d'IL-11 a été utilisée pour la détection. L'immobilisation de l'EBI3, la désactivation des sites actifs et la liaison de l'IL-11 sont montrées.

Le sensorgramme obtenu pour la liaison de l'IL-11 à l'EBI3 a des caractéristiques communes avec celui obtenu pour la liaison de l'IL-6. En effet, on observe encore la liaison de BSA après l'étape de désactivation avec l'éthanolamine et l'amplitude de la réponse SPR pour l'immobilisation de l'EBI3 est très similaire à celle pour l'expérience avec l'IL-6. Ceci semble montrer que les capteurs fabriqués pour étudier l'interaction des cytokines IL-6 et IL-11 avec l'EBI3 sont similaires. La plus grande différence entre le sensorgramme de l'IL-11 et celui de l'IL-6 réside dans la portion où se produit la liaison entre les cytokines et l'EBI3. Alors que pour l'IL-6, on observait une réponse SPR de près de 3nm après 20 min d'incubation, cette réponse est d'environ 1nm pour la même durée d'incubation de la solution d'IL-11

(figure 5.4). Également, la réponse SPR mesurée pour la liaison de l'IL-6 ne diminue presque pas lors du rinçage avec le PBS, alors que celle pour la liaison de l'IL-11 chute environ de moitié lorsque la solution de cytokines est remplacée par le PBS. L'interaction entre l'IL-11 et l'EBI3 semble donc beaucoup plus faible qu'elle entre l'IL-6 et l'EBI3. La comparaison des courbes de liaison des deux cytokines, IL-6 et IL-11, à l'EBI3 est montrée à la figure 5.4.

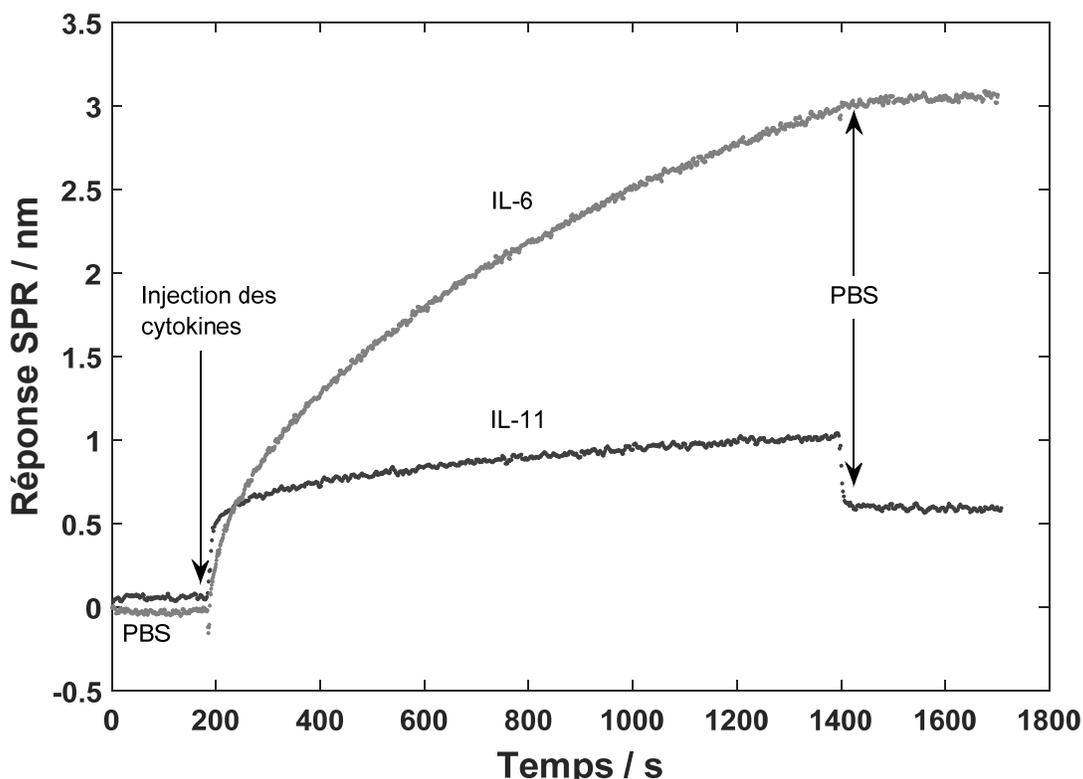


Figure 5.4 : Liaison de l'IL-6 et de l'IL-11 sur le récepteur EBI3 immobilisé à la surface du capteur. La concentration des cytokines utilisée est de 680nM dans du PBS pH 7,4.

La pente pour la liaison de l'IL-11 à l'EBI3 semble légèrement plus élevée que pour l'IL-6, malgré l'atteinte d'un plateau très rapidement. Cette différence entre les pentes pourrait indiquer que l'IL-11 se lie plus rapidement à l'EBI3, mais l'affinité de l'IL-11 pour l'EBI3 immobilisé est toutefois beaucoup plus faible que celle de l'IL-6, comme expliqué plus haut. Il est toutefois impossible de tirer des conclusions définitives sur l'interaction de l'IL-11 avec l'EBI3 à partir des sensorgrammes de la figure 5.4. Le tableau 5.1 résume les résultats obtenus pour la liaison de l'IL-6 au récepteur EBI3 et G-CSFR et

pour la liaison de l'IL-11 à l'EBI3. Les résultats montrés dans le tableau sont la moyenne des canaux de trois capteurs distincts, sauf pour l'IL-11 ou deux capteurs furent utilisés.

Tableau 5.1 : Réponses SPR pour la détection de cytokines sur deux récepteurs biologiques.

Récepteur utilisé	[Récepteur] / nM	Analyte	Réponse / nm	Écart-type / nm (n≥6)	%RSD
EBI3	204	IL-6	2,7	0,3	9
EBI3	204	IL-11	0,53	0,04	7
G-CSFR	204	IL-6	1,1	0,3	26

Ces résultats montrent bien que l'IL-6 lie de manière spécifique l'EBI3 et que l'EBI3 n'interagit pas fortement avec une autre cytokine de la famille de l'IL-6. Ces résultats sont encourageants pour la potentielle utilisation de l'EBI3 à des fins thérapeutiques utilisant la trans-signalisation de l'IL-6.

### 5.3 Détermination du $K_D$ de l'IL-6 pour l'EBI3

En sachant que l'IL-6 lie le récepteur EBI3, la détermination de la constante de dissociation de l'interaction entre les deux biomolécules a été tentée. Pour y arriver, la même démarche que pour les systèmes biologiques précédent a été employée. L'EBI3 a été immobilisé par l'entremise d'un couplage peptidique et les différentes solutions d'IL-6 ont été injectées successivement par la suite. Les déplacements de la bande SPR associés à chaque concentration d'IL-6 ont ensuite été tracés par rapport à la concentration d'IL-6 appropriée de la même manière que les expériences montrées précédemment.

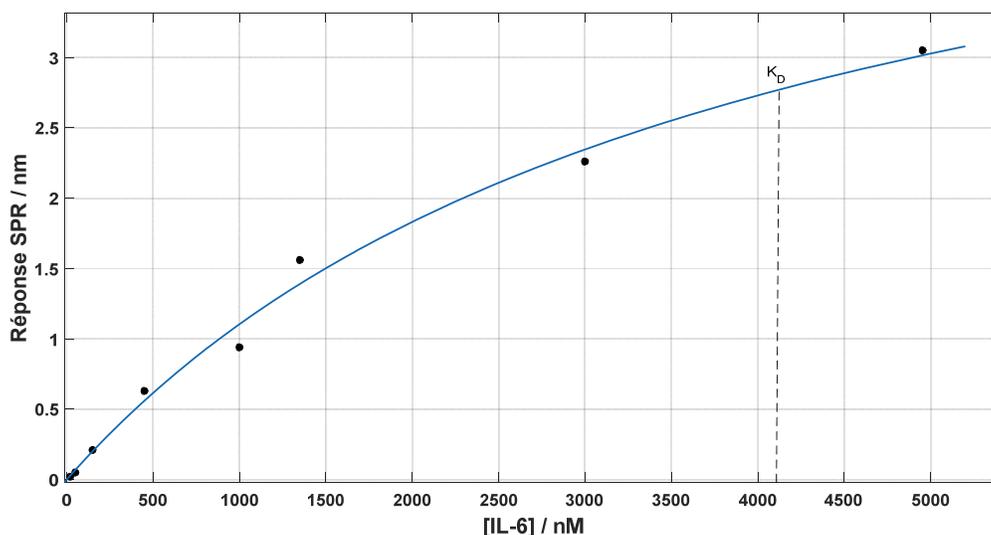


Figure 5.5 : Modélisation de l'isotherme de Langmuir à partir des données expérimentales obtenues pour la liaison de l'IL-6 à l'EBI3 ( $R^2=0,992$ ). La ligne hachurée indique la valeur de la constante de dissociation déterminée.

La valeur moyenne de la constante de dissociation obtenue est de  $4,1 \pm 0,2 \mu\text{M}$  ( $n=4$ ). Toutefois, contrairement aux expériences précédentes avec le GM1, la valeur déterminée est très élevée et sort presque de la gamme de concentrations utilisée. La saturation de la réponse SPR n'est pas encore atteinte et il se peut que la valeur obtenue par le modèle de l'isotherme de Langmuir soit un peu moins exacte. Il aurait été intéressant de tester la liaison d'une ou deux concentrations supplémentaires d'IL-6, mais ce ne fut pas possible par manque d'IL-6.

## 5.4 Interaction entre le complexe EBI3/IL-6 et le gp130

Le gp130 est une sous-unité protéique transmembranaire commune aux récepteurs de la famille de cytokines IL-6 et est essentiel à la transduction du signal. Les complexes formés par les cytokines de la famille de l'IL-6 lient le gp130 et ce dernier permet la transduction du signal produit par la liaison des cytokines à leurs récepteurs<sup>111</sup>. Le complexe IL-6/IL-6R doit donc lier le gp130 pour générer

un effet biologique. Afin de s'assurer un effet biologique, il est donc crucial que le complexe IL-6/EBI3 formé soit également en mesure de lier le gp130 afin d'induire la transduction du signal.

Afin de s'assurer que c'est bel et bien le cas, le gp130 a été immobilisé à l'aide d'un couplage peptidique à une monocouche peptidique. À la suite des étapes de désactivation (éthanolamine et PBS+0,1%BSA), une solution du complexe IL-6/EBI3 à 90nM a été injectée pour 15 min afin de voir si une liaison entre le complexe et le gp130 se produisait. Afin de comparer l'amplitude de la réponse de la liaison du complexe IL-6/EBI3 au gp130, la liaison d'EBI3 seul au gp130 a été étudiée de la même manière.

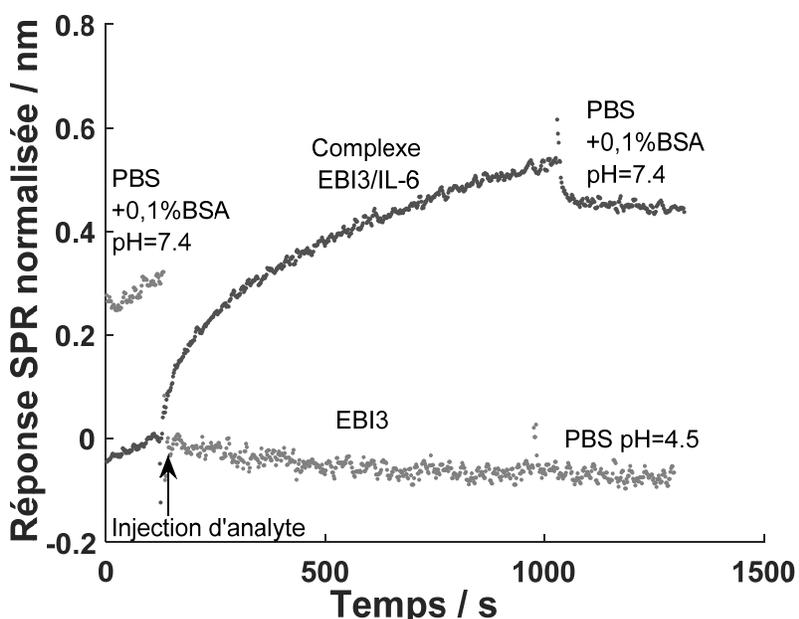


Figure 5.6 : Sensorgrammes normalisés pour la réponse SPR mesurée lors de la liaison au gp130 du complexe IL-6/EBI3 (noir) et de l'EBI3 humain seul (gris). Les solutions de complexe et d'EBI3 ont une concentration de 90nM.

La figure 5.6 montre une réponse SPR très nette lors de l'injection de la solution du complexe IL-6/EBI3, mais aucun signal n'est observé lors de l'injection d'une solution de même concentration d'EBI3 seul. La diminution de signal observée à l'injection de l'EBI3 correspond à une différence d'indice de réfraction des solutions utilisées. En effet, l'EBI3 n'est pas stable à un pH physiologique, donc il a été injecté et rincé dans du PBS à pH 4,5. Pour sa part, le complexe IL-6/EBI3 est stable à pH 7,4, donc tous les rinçages et les solutions ont été faits dans le PBS pH 7,4. Malgré tout, aucun signal n'a pu être décelé

entre l'injection de la solution d'EBI3 seul et son rinçage après 15 min. Ceci montre que le complexe IL-6/EBI3 est en mesure de lier le gp130, tandis que l'EBI3 seul ne l'est pas. Puisque le complexe peut lier le gp130, il est raisonnable de croire que le gp130 pourrait induire la transduction du signal suite à la liaison de l'IL-6/EBI3 et générer un effet biologique.

## 5.5 Conclusion

En résumé, il a été montré que l'IL-6 est en mesure de lier le récepteur soluble EBI3. La spécificité de l'interaction a été montrée à l'aide d'un récepteur de référence, le G-CSFR, et un signal environ 3 fois plus élevé a été observé pour la liaison de l'IL-6 à l'EBI3 par rapport au G-CSFR. Afin de s'assurer que l'EBI3 ne lie pas systématiquement toutes les cytokines, la liaison de l'IL-11, une cytokine dans la même famille que l'IL-6, a été testée sur l'EBI3 et une réponse beaucoup plus faible que pour l'IL-6 a été obtenue. Il semble donc que l'interaction observée entre l'IL-6 et l'EBI3 soit spécifique. La constante de dissociation de l'IL-6 pour l'EBI3 immobilisé a été déterminée et évaluée à environ 4 $\mu$ M. Finalement, la liaison du complexe IL-6/EBI3 au gp130 a été vérifiée et comparée à la liaison d'EBI3 humain seul. Le complexe pouvant lier le gp130 immobilisé, l'EBI3 semble être une cible prometteuse pouvant être injectée afin de générer un effet thérapeutique.

## Chapitre 6 : Interaction entre les protéines BP et GFP

Le suivi *in vivo* en temps réel de protéines à courts temps de vie est un défi important en biologie. L'utilisation de protéines communes, nécessitant plusieurs dizaines de min avant de mûrir et devenir fluorescentes, n'est donc pas appropriée pour répondre à cette problématique. En effet, les protéines naturellement fluorescentes doivent subir des modifications permettant à leur chromophore intrinsèque, typiquement un court peptide irrégulier, de fluorescer. Ces modifications sont fréquemment concomitantes avec un repliement de la protéine fluorescente<sup>113</sup>. Pour sa part, la GFP utilisée dans cette étude devient fluorescente sans nécessiter de cofacteurs ou d'enzyme, mais seulement avec de l'oxygène et une source lumineuse de longueur d'onde appropriée, ce qui en fait un marqueur de choix pour l'analyse *in vivo* en biologie<sup>114</sup>. Afin de répondre à cette problématique, des couples de protéines ont été développés. Ces paires de protéines comprennent une protéine fluorescente (GFP) et une seconde protéine partenaire (protéine BP, *binding partner*) ayant pour rôle d'interagir avec la GFP. La liaison par reconnaissance de la GFP à BP génèrera une augmentation marquée de la fluorescence de la GFP. Afin de détecter des protéines cibles à court temps de vie, ces dernières seront génétiquement fusionnées à la BP et l'interaction de la GFP à la protéine fusionnée avec BP permettra la détection de la protéine recherchée grâce à l'augmentation de la fluorescence mesurée suite à la formation du complexe. Comme la fluorescence de la GFP est très rapide, il sera possible de détecter la présence de la protéine cible fusionnée génétiquement à la protéine BP dès la liaison de la GFP. Dans cette étude, nous utiliserons la SPR afin de valider la liaison de reconnaissance de la GFP à la BP afin de comparer les valeurs obtenues avec celles obtenues par spectroscopie de fluorescence. Ces travaux sont réalisés en collaboration avec le laboratoire du professeur Roberto Chica (U. d'Ottawa, Chimie et Sciences Biomoléculaires) et l'étudiant au doctorat Matthew Eason. Mathew Eason s'est chargé de nous fournir les échantillons de protéines (GFP et BP) pour réaliser les essais en résonance des plasmons de surface.

## 6.1 Immobilisation du récepteur

Le premier récepteur immobilisé est la GFP et l'immobilisation fut tentée par l'entremise d'une étiquette de polyhistidine greffée sur la protéine. Afin de confirmer si la GFP immobilisée de cette manière était susceptible de lier la protéine BP, une solution de BP à  $1,125 \mu\text{M}$  a été injectée. Malheureusement, aucune réponse ne fut observée, tel qu'illustré sur la figure 6.1.

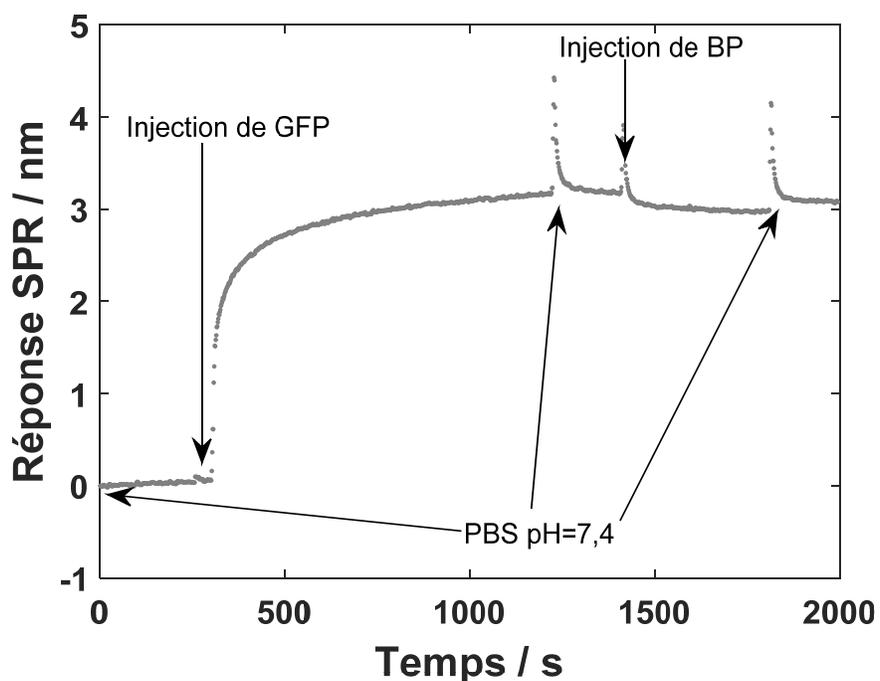


Figure 6.1 : Sensorgramme pour l'immobilisation de la GFP à l'aide d'une étiquette de polyhistidine et injection d'une solution de protéine BP.

L'immobilisation de la GFP a ensuite été tentée à l'aide d'un couplage peptidique, mais la réponse mesurée lors de l'injection de solutions de protéines BP entre  $0,5\text{nM}$  et  $1000\text{nM}$  n'a pas non plus mené à l'observation d'un signal SPR. Le sensorgramme de la figure 6.2 montre bien l'absence de liaison observée.

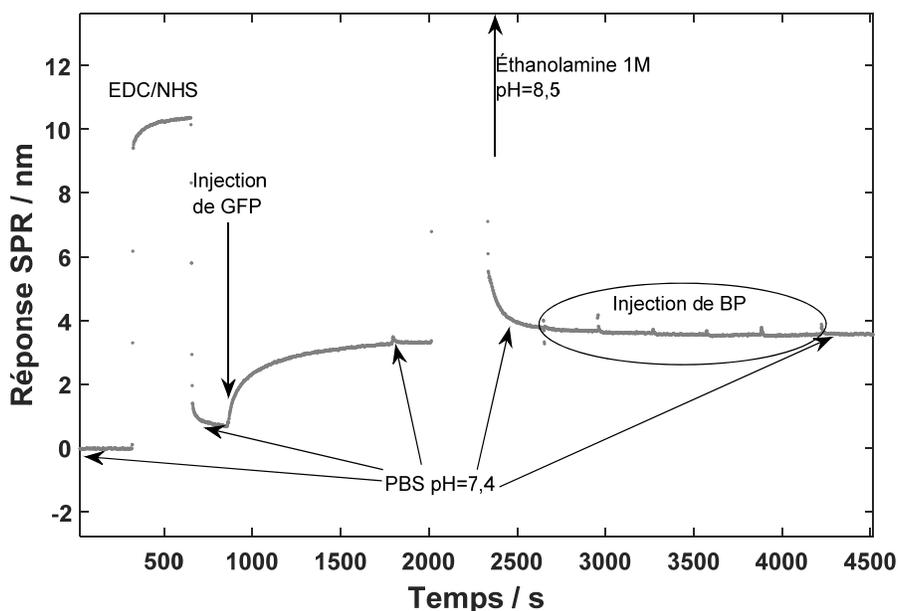


Figure 6.2 : Sensorgramme pour l'immobilisation de la GFP à l'aide d'une réaction de couplage peptidique suivie de l'injection de solutions de BP de concentrations entre 0,5 nM et 1000 nM.

Puisque la GFP immobilisée en surface ne semble pas en mesure de lier la protéine BP, le schéma inverse a été tenté. La protéine BP a donc été immobilisée à la surface du capteur par un couplage peptidique et une solution de GFP y a été injectée par la suite. Immédiatement, une réponse est observée pour la liaison de la GFP à la protéine BP immobilisée. Dans la figure 6.3, la concentration de protéines BP utilisée pour l'immobilisation est de  $1\mu\text{M}$  et la concentration de GFP injectée est de  $1,7\mu\text{M}$ . La quantité de BP utilisée pour les prochains essais sera diminuée à  $0,33\mu\text{M}$  afin de limiter le transport de masse et de tenter de garder la capacité de la surface basse. Ce schéma ayant comme récepteur la protéine BP immobilisée et la GFP comme l'analyte est choisi pour la détermination de la constante de dissociation de la GFP pour la protéine BP.

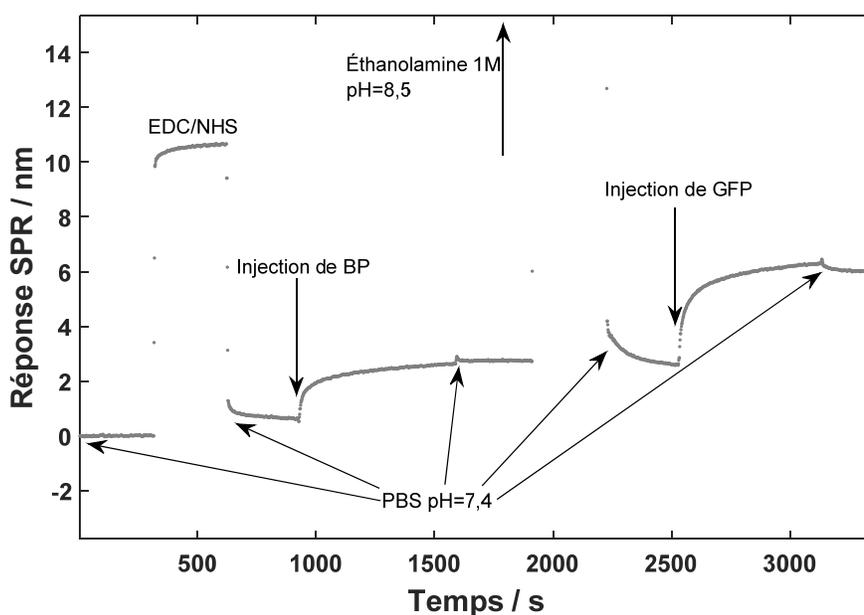


Figure 6.3 : Sensorgramme pour l'immobilisation de la BP à l'aide d'une réaction de couplage peptidique suivie de l'injection d'une solution de GFP à  $1,7 \mu\text{M}$ .

## 6.2 Détermination de la constante de dissociation de la GFP

Afin de déterminer par SPR l'affinité de la GFP pour la protéine BP, la protéine BP a été immobilisée à la surface du capteur par un couplage peptidique. La BP présente également la présence d'une étiquette de polyhistidine, mais celle-ci est à proximité du site de liaison de la GFP. Les essais tentés en immobilisant la BP par l'entremise de son étiquette de polyhistidine se sont donc soldés par une affinité presque nulle. La concentration de BP utilisée pour l'immobilisation est de  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  et une réponse d'environ 2 nm est obtenue pour la liaison de la protéine. Pour l'étude de l'affinité de la GFP pour la BP, deux méthodes ont été employées. La première est similaire à celles montrées auparavant et se déroule avec des injections successives de solutions de GFP à la surface du capteur. Les étapes classiques pour l'activation des groupements acides carboxyliques avec l'EDC et le NHS ainsi que la désactivation des sites résiduels par de l'éthanolamine ont également été effectuées avant d'injecter les différentes concentrations de GFP. La figure 6.4 montre un sensorgramme typique obtenu pour cet

essai et la figure 6.5 montre la modélisation des données expérimentales permettant de déterminer la valeur de la constante de dissociation.

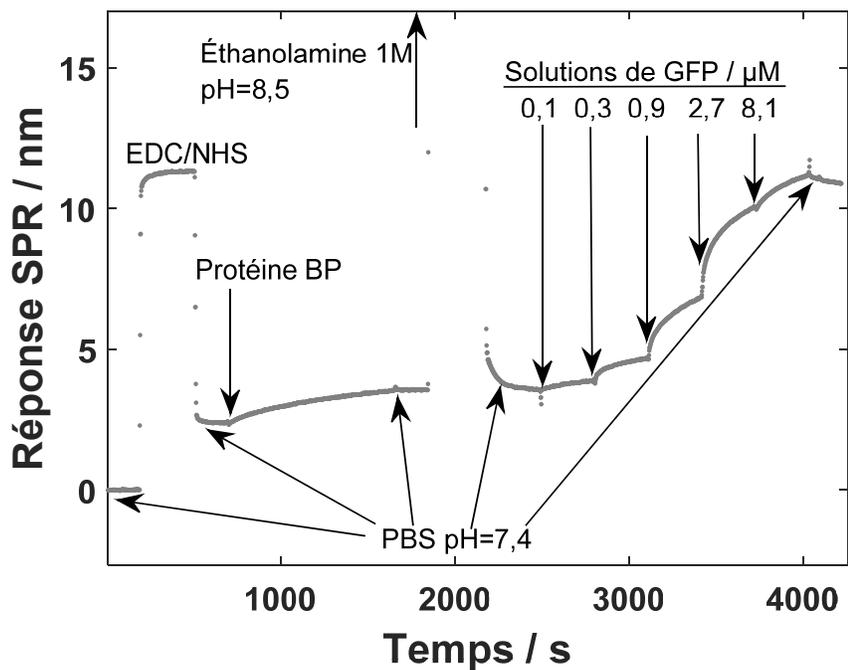


Figure 6.4 : Sensorgramme pour la détermination de la constante de dissociation de la GFP pour la protéine BP immobilisée.

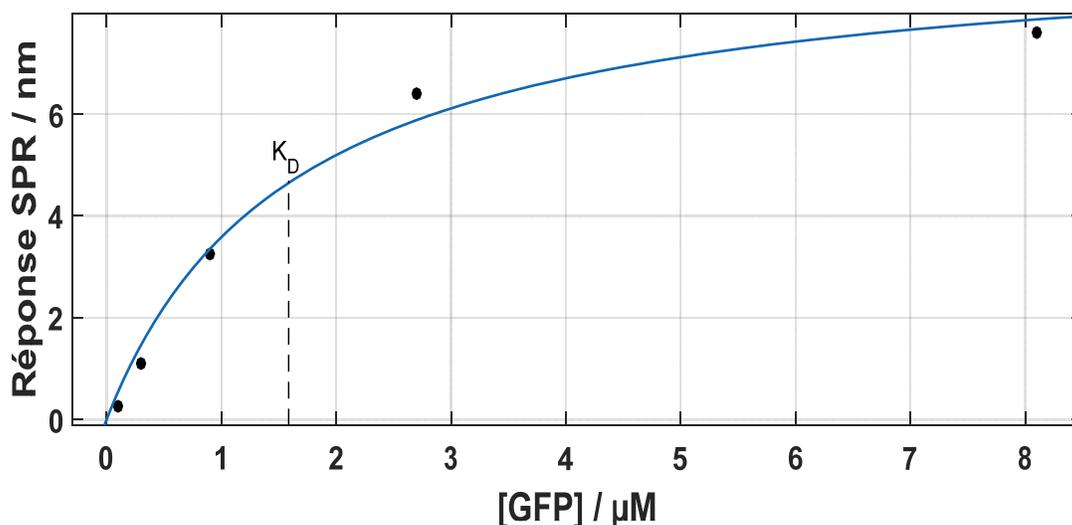


Figure 6.5 : Modélisation de l'isotherme de Langmuir à partir des données expérimentales obtenues pour la liaison de la GFP à la BP ( $R^2=0,9865$ ). La ligne hachurée indique la valeur de la constante de dissociation déterminée.

Comme pour les autres interactions biologiques étudiées précédemment, l'isotherme de Langmuir a été utilisée comme modèle afin de déterminer la constante de dissociation à partir des données expérimentales. La valeur de la constante de dissociation obtenue de cette façon est d'environ  $1,6 \mu\text{M}$ . Toutefois, la valeur mesurée par un essai à base de fluorescence en solution permettait d'obtenir une valeur entre 100 et 200 nM. Bien entendu, l'interaction entre deux protéines en solution ne sera pas identique à celle entre les mêmes protéines si l'une d'entre elles est immobilisée sur un substrat. En solution, les deux protéines ont la flexibilité nécessaire pour exposer leur section respective nécessaire à l'interaction. Au contraire, si l'une des protéines est fixée à un substrat, elle ne sera pas en mesure de se déplacer pour favoriser l'interaction. La valeur d'affinité mesurée à l'aide d'une technique impliquant que l'une des protéines soit immobilisée sera donc vraisemblablement inférieure à celle mesurée en solution. Toutefois, étant de presque un ordre de grandeur plus élevé que celle obtenue en solution, une seconde méthode pour déterminer la constante de dissociation a été utilisée.

Cette seconde méthode nécessite une quantité de récepteurs (BP) plus élevée que celle utilisée jusqu'à présent, car chaque solution d'analyte est injectée individuellement sur un capteur recouvert de la protéine BP. Il peut être possible de régénérer le capteur de différentes manières en ajoutant une solution perturbant l'interaction entre la GFP et la BP, mais chaque interaction nécessite typiquement

une bonne optimisation des conditions afin de conserver la même activité du récepteur après chaque cycle de régénération. Une méthode de régénération utilisant de l'acide phosphorique et du surfactant Tween20 pour régénérer le capteur a été réalisée, mais la liaison d'une même solution de GFP à la BP ne permettait plus d'obtenir des réponses reproductibles. Une quantité résiduelle de surfactant à la surface peut expliquer un dépliement de la protéine BP immobilisée à la surface du capteur, ce qui expliquerait la faible reproductibilité obtenue. Des tests supplémentaires (rinçages additionnels, concentration de Tween20 utilisée) devraient être effectués pour optimiser la méthode de régénération. Un capteur par concentration de GFP fut donc utilisé pour la détermination de la constante de dissociation de la GFP à l'aide de la seconde méthode.

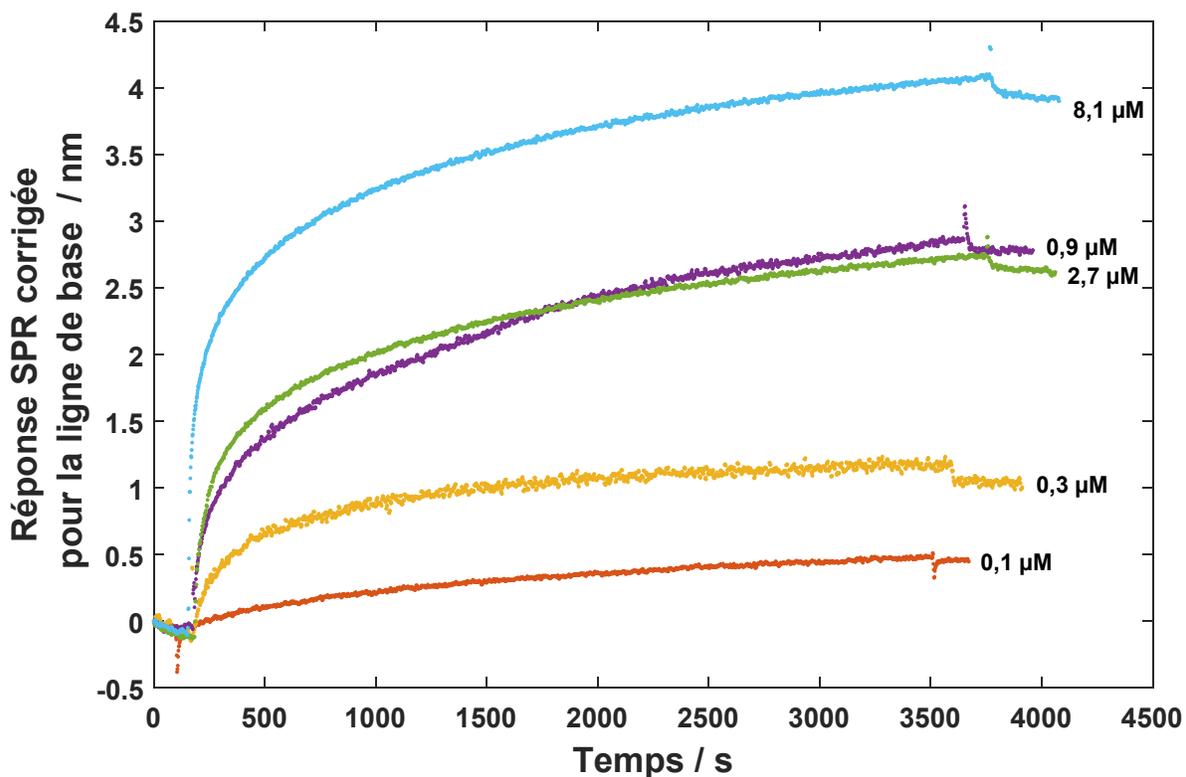


Figure 6.6 : Réponse SPR pour l'injection de différentes solutions de GFP à une couche de protéines BP immobilisées sur cinq biocapteurs différents. L'axe y a été corrigé pour la ligne de base et l'axe des x ajusté pour superposer les différents essais. Les concentrations de GFP injectées sont de 0,1 µM (rouge), 0,3 µM (jaune), 0,9 µM (mauve), 2,7 µM (vert) et 8,1 µM (cyan). Avant et après l'injection des solutions de GFP, le capteur est rincé dans du PBS pH 7,4.

Dans la figure 6.6 sont présentées les courbes de réponse pour la liaison de la GFP à la protéine BP immobilisée à la surface du capteur. Comme mentionné plus haut, chaque solution de GFP a été injectée individuellement sur un capteur, donc cinq capteurs ont dû être préparés. Les courbes ci-dessus sont les réponses moyennes des trois canaux de mesures de chaque capteur. Les axes ont été modifiés afin de pouvoir superposer adéquatement les injections d'analyte. Un phénomène inusité est observable avec les solutions de GFP de 0,9 et 2,7  $\mu\text{M}$ . En effet, le signal de la solution à 0,9  $\mu\text{M}$  (mauve) est légèrement plus élevé que celui à 2,7  $\mu\text{M}$  (en vert). Selon Matthew Eason, de l'Université d'Ottawa, un phénomène similaire se produit en solution, mais son origine est à ce jour inexplicable. Outre ce phénomène étrange, les autres solutions de GFP donnent lieu à une réponse croissante tel qu'attendu. Maintenant, afin de déterminer la constante de dissociation de la GFP à partir de ces données, les données expérimentales seront utilisées pour modéliser l'isotherme de Langmuir comme auparavant.

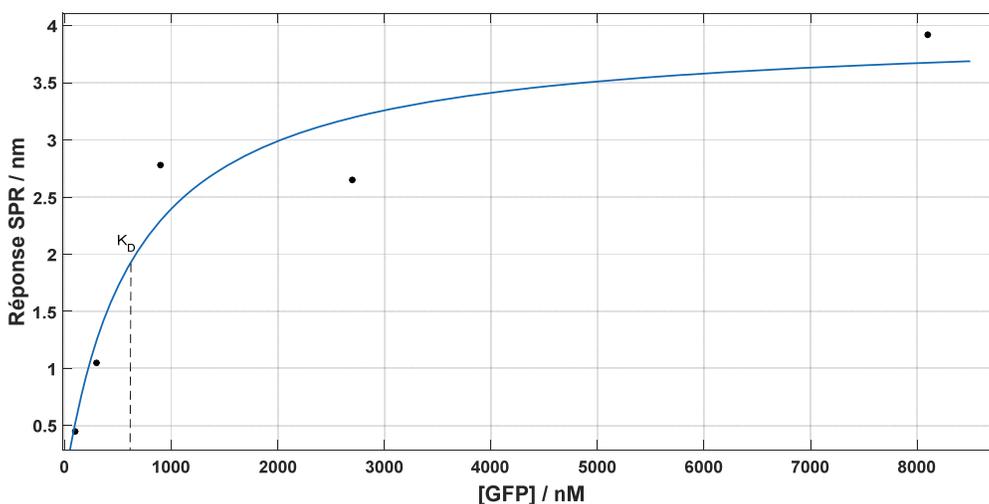


Figure 6.7 : Modélisation de l'isotherme de Langmuir à partir des données expérimentales obtenues pour la liaison de la GFP à la BP à l'aide de la seconde méthode ( $R^2=0,9194$ ). La ligne hachurée indique la valeur de la constante de dissociation déterminée.

La courbe obtenue à l'aide des données expérimentales de la deuxième série d'essais respecte bien l'isotherme de Langmuir, sauf pour les solutions de GFP à 0,9 et 2,7  $\mu\text{M}$ , où les valeurs dévient légèrement du modèle. Toutes les valeurs sont toutefois considérées dans la modélisation de la figure 6.7. Néanmoins, il est possible d'observer la pente abrupte à basse concentration et l'atteinte d'un plateau à plus haute concentration de GFP, comme prédit par l'isotherme de Langmuir. Le  $K_D$  obtenu

avec ces données est d'environ 0,49  $\mu\text{M}$ , soit une valeur bien plus proche de celle obtenue en solution par fluorescence. Cette méthode utilisant un capteur par concentration d'analyte a le désavantage de consommer plus de récepteur et de prendre plus de temps, mais les signaux obtenus pour chaque concentration sont propres à chaque solution. Dans la première méthode, les solutions sont injectées les unes après les autres et les réponses utilisées pour chaque solution comprennent également les réponses des solutions injectées auparavant. À partir de ces résultats, il semble que de procéder de la seconde manière permet d'obtenir des valeurs d'affinité plus exacte qu'en injectant toutes les solutions d'analytes à la surface d'un seul capteur.

Tableau 6.1 : Comparaison des valeurs des constantes de dissociation obtenues par différentes méthodes à base de SPR ou de fluorescence

Type de méthode	Type d'essai	$K_D$ / $\mu\text{M}$	Écart-type / nM (n $\geq$ 3)	%RSD
Injections successives	Surface	1,6	97	6
Injections individuelles	Surface	0,49	93	19
Fluorescence <sup>1</sup>	Solution	100-200	<i>nd</i>	<i>nd</i>

<sup>1</sup>Valeurs rapportées par Matthew Eason de l'U. d'Ottawa.

Le tableau précédent illustre les différentes valeurs de  $K_D$  obtenues pour l'interaction de la GFP avec la protéine BP. On constate que la méthode impliquant les injections individuelles de chaque solution d'analyte permet d'obtenir une valeur beaucoup plus proche de la valeur obtenue en solution, mais la variabilité sur cette valeur est également beaucoup plus élevée que celle obtenue par injections successives. Puisque la méthode d'injections individuelles requiert un capteur pour chaque solution, il est possible que les différents capteurs utilisés aient des sensibilités légèrement différentes et que les réponses mesurées pour une même concentration ne soient pas tout à fait équivalentes, tandis que la méthode à injections successives utilise le même capteur pour une série de solutions. Puisqu'il est possible de déterminer une constante de dissociation à partir d'un seul capteur, le coefficient de variation sur les valeurs de  $K_D$  mesurées avec la méthode d'injections successives est beaucoup plus faible que pour les valeurs obtenues à partir de plusieurs capteurs différents.

La méthode d'obtention de la constante de dissociation la plus efficace serait probablement basée sur un instrument dont la surface du capteur est dotée de plusieurs puits pouvant être analysés

en parallèle. Un instrument SPR d'imagerie<sup>115</sup> ou un capteur SPR utilisé en transmission<sup>116</sup> permettraient ce multiplexage sur un seul capteur. De cette manière, la surface d'un seul capteur pourrait être fonctionnalisée avec le récepteur et toutes les injections se feraient individuellement sur ce même capteur.

## 6.3 Conclusion

Somme toute, lors de l'étude de l'interaction entre deux biomolécules, le choix du récepteur importe énormément. Nous avons vu que l'immobilisation de la GFP, de deux manières différentes, ne permettait pas à la BP de s'y lier, mais qu'au contraire si la BP était immobilisée, il était possible d'y lier par la suite la GFP. De plus, une seconde approche pour la détermination de constante de dissociation a été montrée. Bien que cette technique nécessite plus de temps et de récepteurs, les résultats obtenus semblent plus près de ceux obtenus par des techniques en solution. La variabilité sur ces résultats est néanmoins plus grande que pour les résultats obtenus à l'aide d'un seul capteur, mais il serait possible de réduire ce %RSD en utilisant une géométrie permettant un plus grand multiplexage tel qu'un instrument d'imagerie.

# Chapitre 7 : Combinaison de la SPR et de la fluorescence

Comme démontré dans les chapitres précédents, la résonance des plasmons de surface permet de caractériser l'interaction entre un analyte et un récepteur biologique fixé à une surface. Néanmoins, de par l'absence de spécificité du signal mesuré, il pourrait être intéressant d'ajouter une autre méthode de détection en parallèle. L'une des techniques montrant le plus de potentiel est la spectroscopie de fluorescence. En effet, cette méthode est déjà employée pour la caractérisation de phénomènes biologiques, donc il serait possible de comparer les résultats obtenus avec d'autres méthodes établies. Également, à l'inverse du signal SPR, le signal mesuré par fluorescence est très spécifique, alors si l'analyte est marqué d'un fluorophore il deviendrait possible de discriminer les vrais des faux positifs. De plus, la fluorescence étant employée depuis de nombreuses années avec des cibles biologiques, il est possible d'obtenir une multitude de biomolécules (protéines, nucléotides, etc.) marquées avec divers fluorophores. Finalement, les mesures SPR sont compatibles avec les mesures en fluorescence. La mesure du signal SPR se fait par le prisme, alors que les mesures de fluorescence s'obtiendraient avec un détecteur situé au-dessus du biocapteur. Ainsi, la conception d'un appareil pouvant mesurer les deux signaux est réaliste d'un point de vue instrumental.

## 7.1 Premier prototype d'instrument

Afin de permettre la détection d'un événement de reconnaissance moléculaire par SPR et par fluorescence, l'appareil utilisé a dû être modifié afin d'incorporer un module permettant l'excitation du fluorophore et la détection des photons émis. Le module de fluorescence est doté d'une entrée de fibre optique Fc afin de permettre la connexion directe d'une source lumineuse. Le faisceau entrant est ensuite collimaté au travers d'une lentille et réfléchi à l'aide d'un miroir dichroïque approprié. Les photons sont par la suite focalisés par une lentille vers la surface du biocapteur. Finalement, les photons de la source d'excitation et les photons de fluorescences sont collectés par la même lentille de focalisation et transmis au travers du miroir dichroïque avant d'être de nouveau focalisés vers la surface d'une photodiode.

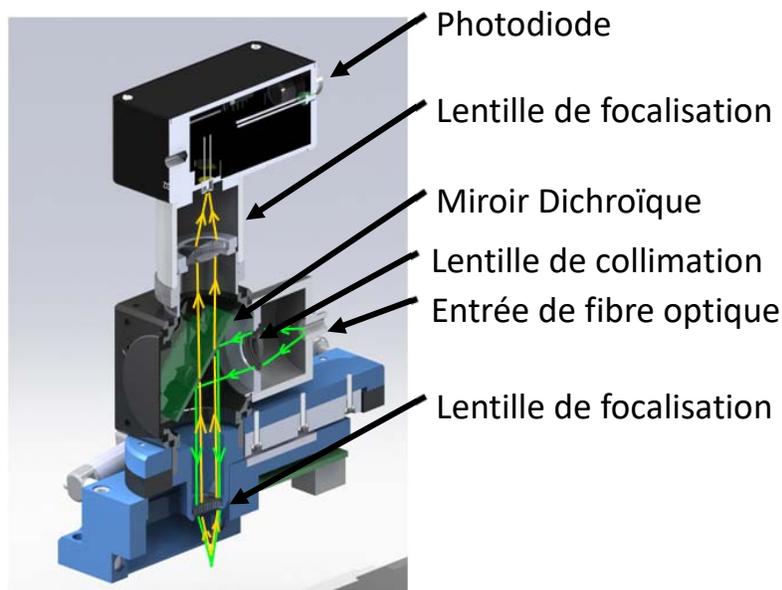


Figure 7.1 : Schéma du module de fluorescence développé. Les flèches vertes représentent le parcours optique des photons de la source d'excitation et les flèches jaunes, le parcours optique des photons de fluorescence. Le prisme d'or se trouve sous le module de sorte que le faisceau de la source d'excitation soit focalisé à sa surface.

La première version du module est montée sur un actionneur linéaire qui permet le balayage des quatre canaux du capteur. Ce balayage des quatre canaux permet une sensibilité et une reproductibilité suffisante du signal mesuré dans le cœur de la solution et a permis de réaliser une expérience similaire à une expérience par dosage d'immunoabsorption par enzyme liée (ELISA) à même le système SPR pour la détection de la PSA<sup>117</sup>. Néanmoins, les photons détectés dans ce cas-ci proviennent de fluorophores présents dans le cœur de la solution et non de la surface du capteur. L'efficacité d'excitation et d'émission est donc très élevée. Dans l'optique de caractériser la liaison d'un analyte à un récepteur fixé à un substrat, il est beaucoup plus intéressant de détecter la fluorescence provenant de molécules d'analyte liées aux récepteurs, donc confinées à la surface du capteur.

Toutefois, plusieurs défis sont associés à cette détection de fluorescence en surface. Entre autres, les fluorophores sont réputés pour s'auto-désactiver en solution si leur concentration est trop élevée et leur confinement à la surface du capteur pourrait causer cette auto-désactivation. Un autre de ces défis est le nombre de molécules fluorescentes excitées beaucoup plus faible étant donné

qu'elles sont limitées à la surface du biocapteur. La sensibilité de cette détection est donc plus faible que pour une détection de fluorescence dans le cœur de la solution, où un plus grand volume susceptible de contenir des espèces fluorescentes est sondé. De plus, les surfaces métalliques sont reconnues pour désactiver les fluorophores qui sont très près de la surface par un transfert de charge<sup>118</sup>.

Ainsi, l'émission de l'analyte fluorescent sera probablement plus faible puisqu'il sera typiquement situé à une distance de l'ordre de 10 à 20 nanomètres du film métallique. Finalement, pour une détection dans le cœur de la solution, la distance focale de la lentille focalisant les photons au substrat n'est pas cruciale, mais pour la détection de molécules situées à la surface du biocapteur, il est primordial de pouvoir focaliser adéquatement le faisceau. Le prototype actuel ne permet pas de varier la position verticale du module de fluorescence, ce qui fait en sorte que le plan focal sondé est fixe et n'est pas nécessairement propice à l'excitation des analytes liés au substrat et à la collecte des photons émis par ces derniers. Un autre défi engendré par l'efficacité plus faible des processus d'excitation et d'émission est la stabilité du signal mesuré. Comme le module de fluorescence se déplace au fil de l'expérience afin de sonder les 4 canaux, la fibre optique de la source d'excitation se déplace et différents modes de propagation peuvent ainsi contribuer à l'excitation. Le résultat de ces différents modes de propagation est un signal de fond qui peut varier de près de 20%, ce qui rend la détection de faibles signaux de fluorescence très difficile.

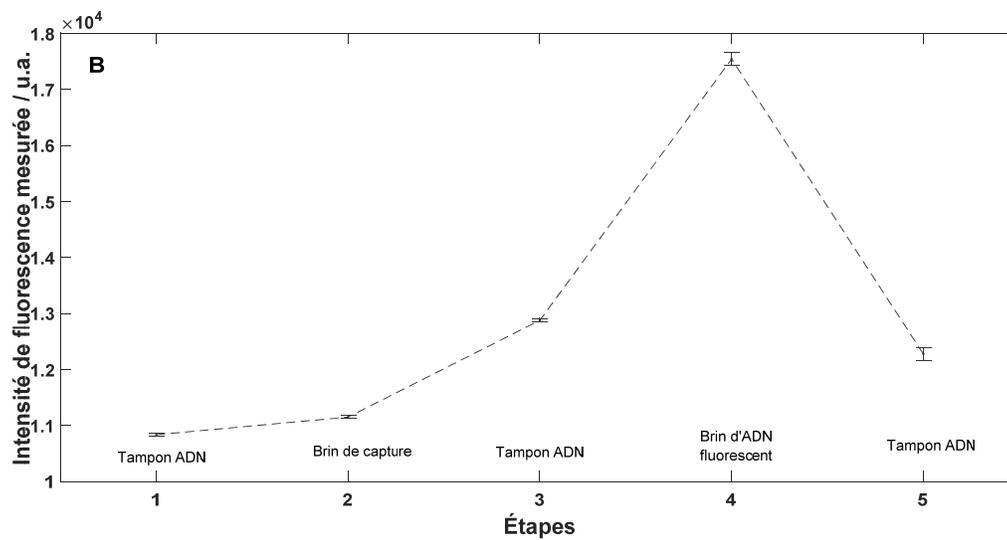
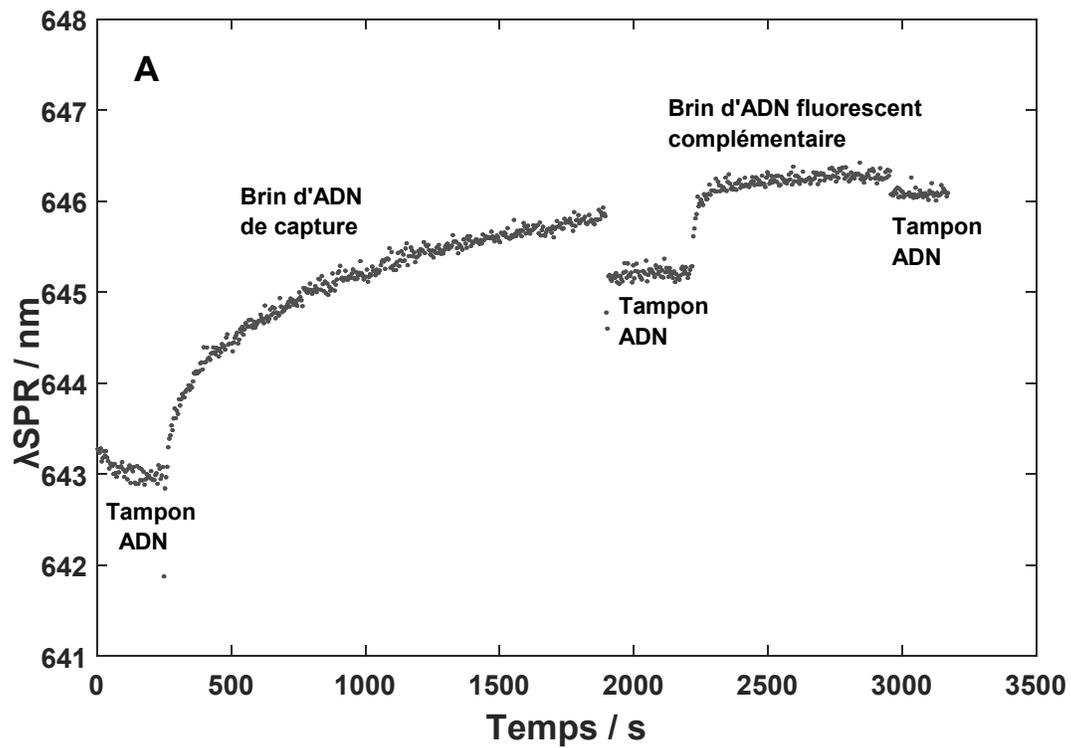


Figure 7.2: Mesure SPR-Fluorescence à l'aide du premier prototype d'instrument développé. Le panneau A montre le signal SPR obtenu pour la fonctionnalisation du capteur avec un brin d'ADN de capture et l'hybridation avec ce brin d'un second brin complémentaire marqué du fluorophore JOE. Le panneau B montre la moyenne et l'écart-type des mesures de fluorescence prises à la fin de chacune de ces étapes.

Sur la figure 7.2, il est possible de constater les lacunes de l'instrument pour la détection de fluorescence émise à partir de la surface du capteur. En premier lieu, le signal de fond varie énormément. En effet, lors des étapes 1 à 3 il ne devrait pas y avoir de photons de fluorescence, donc le signal de ces trois étapes devrait être identique. Toutefois, on observe plutôt une augmentation du signal mesuré par la photodiode de silicium. Ceci s'explique probablement par le déplacement de la fibre optique d'excitation lors du balayage des différents canaux et la propagation de différents modes dans la fibre. Par la suite, lors de l'injection de la solution du brin complémentaire d'ADN marqué par la fluorophore, le signal de fluorescence mesuré augmente, ce qui est tout à fait explicable par la présence des brins d'ADN marqués dans la solution sondée. Finalement, lorsque cette solution est rincée et remplacée par le tampon, l'intensité de fluorescence chute environ au niveau mesuré dans le tampon ayant précédé le brin marqué (étape 3). Cette observation peut s'expliquer de deux manières. La première hypothèse est que le brin d'ADN complémentaire marqué ne s'est pas lié au brin de capture, donc l'appareil ne peut pas mesurer par de fluorescence. Toutefois, les données SPR obtenues montrent bien que le brin d'ADN marqué s'est lié à la surface. Ainsi, la seconde hypothèse expliquant l'absence de fluorescence à l'étape 5 est que l'appareil utilisé n'est pas suffisamment performant pour détecter la fluorescence émise par des fluorophores confinés à même le capteur ou que l'auto-extinction des fluorophores à la surface est trop importante. Des modifications au module de fluorescence doivent donc être apportées pour permettre leur détection. Ces modifications ont été implantées dans un second prototype d'instrument.

## 7.2 Deuxième prototype d'instrument

Afin de pallier aux limitations associées au premier prototype, un second instrument a été conçu afin de permettre la détection de fluorescence provenant de la surface du biocapteur. Le module de fluorescence, inchangé de celui de la première version, est maintenant monté sur une structure à laquelle est fixée un micromanipulateur (ThorLabs, Newton). Grâce au micromanipulateur, il est possible de déplacer verticalement la structure supportant le module de fluorescence. Le module de fluorescence s'apparente donc maintenant à un microscope confocal permettant de modifier la distance entre la lentille de focalisation et la surface du biocapteur. Cependant, l'actionneur linéaire permettant de sonder les quatre canaux a dû être retiré pour permettre l'installation du support et du

micromanipulateur. Il n'est donc plus possible de prendre des mesures en sondant automatiquement les différents canaux.

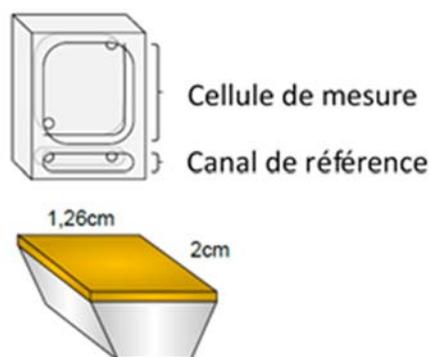


Figure 7.3 : Cellule fluïdique de PDMS employée avec le second prototype de système combinant la SPR et la fluorescence. Cette dernière est dotée d'une grande cellule de mesure et d'un plus petit canal de référence. Cette cellule permet donc toujours de corriger les réponses SPR avec le canal de référence et maximise l'aire utilisable pour les mesures de fluorescence.

Malgré la perte de l'actionneur linéaire, il est encore possible de déplacer la position du module de fluorescence par rapport à la surface du prisme, mais il est maintenant nécessaire de le faire manuellement en desserrant quatre vis. La cellule fluïdique utilisée est également différente de l'ancienne. Puisqu'il n'est maintenant possible que de faire les mesures en un point, la cellule fluïdique utilisée consiste en une seule cellule de mesure plus grande et d'un canal de référence. La taille de la cellule de mesure permet de modifier l'endroit où sonde le module de fluorescence au besoin en desserrant les vis le maintenant en position. Ces vis, montrées à la figure 7.4, permettent de déplacer latéralement le module de fluorescence dans deux directions. Le canal de référence permet encore d'obtenir un signal de référence pour les mesures SPR avec lequel les variations de l'instrument pourront être corrigées.



**A**



**B**

Figure 7.4 : Les vis sur l'image A permettent de déplacer le module de fluorescence sur l'axe longitudinal du prisme tandis que les vis de l'image B permettent de le déplacer sur la largeur du prisme.

### 7.3 Validation du second prototype

Afin de valider le module de fluorescence fixé au microcontrôleur, son efficacité de collection et la stabilité du signal mesuré ont été testées. Puisqu'il est dorénavant possible de déplacer le module le long de l'axe vertical, on s'attend à mesurer un signal de fluorescence plus important provenant des molécules immobilisées à la surface après avoir ajusté la distance focale adéquatement. De plus, comme le module ne se déplace plus, la fibre optique de la source d'excitation ne devrait pas transmettre différents modes de propagation, ce qui devrait se traduire par un signal de fond beaucoup plus stable. Afin de vérifier si c'est bel et bien le cas, la fluorescence de la rhodamine 6G (R6G) adsorbée sur des polyélectrolytes a été mesurée.

### 7.3.1 Suivi de la formation d'une couche de polyelectrolytes par SPR

Le fluorophore choisi pour valider le bon fonctionnement du module de fluorescence confocal est la R6G. Il s'agit d'un fluorophore organique positivement chargé absorbant dans le visible autour de 532nm et émettant des photons à environ 555nm (dans l'eau).

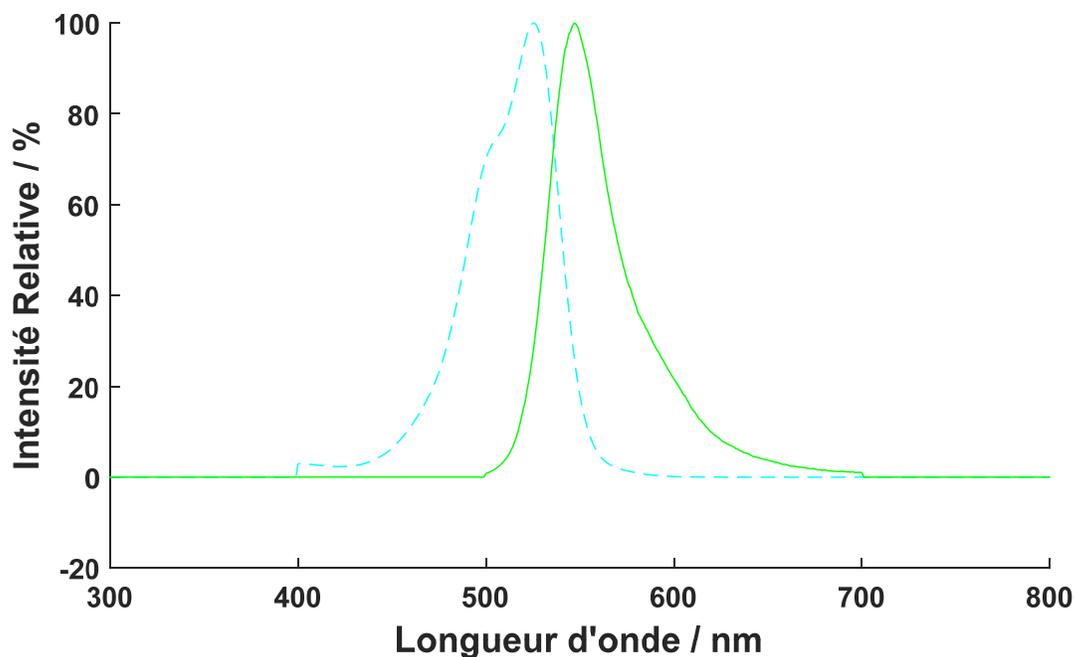


Figure 7.5 : Spectres d'excitation (ligne hachurée) et d'émission (ligne solide) de la rhodamine 6G.

Étant chargé positivement, il est possible d'adsorber ce fluorophore à une surface négativement chargée. Pour ce faire, un assemblage couche-par-couche de polyelectrolytes a été choisi. Ce genre d'assemblage repose sur l'interaction électrostatique de polymères chargés positivement et négativement. Les polymères choisis sont le poly(hydrochlorure d'allylamine (PAH) et le polystyrène sulfonate (PSS).

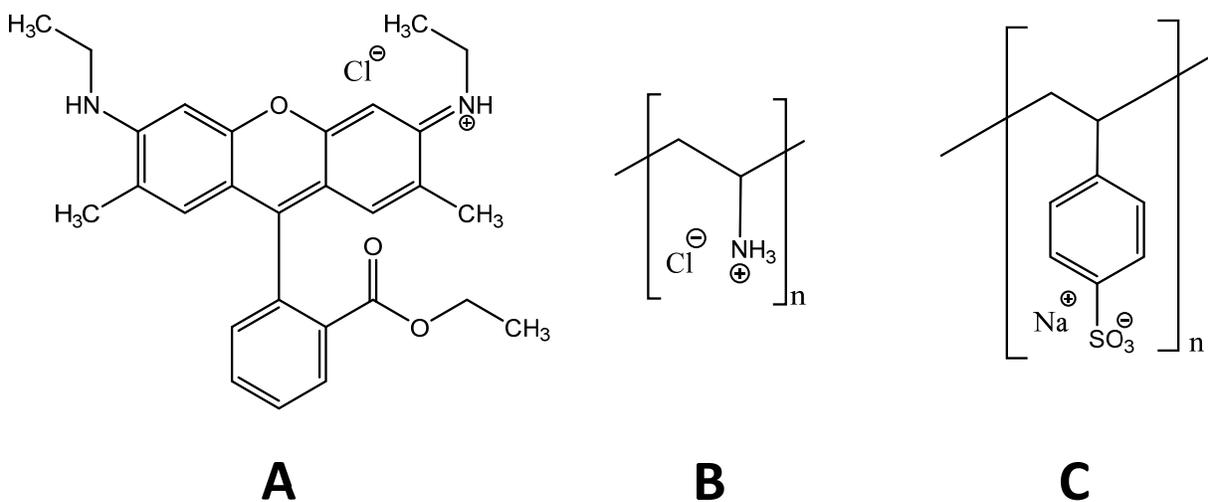


Figure 7.6 : Structures moléculaires de la rhodamine 6G (A), du poly(hydrochlorure d'allylamine (B) et du polystyrène sulfonate de sodium (C).

Les techniques à base d'assemblage couche-par-couche ont servi très fréquemment dans le domaine de la recherche et permettent de fabriquer des espaceurs nanométriques de manière contrôlée avec une bonne reproductibilité<sup>119-120</sup>. Afin de favoriser l'adsorption électrostatique de la première couche polymérique, la surface du capteur a été préalablement fonctionnalisée avec une monocouche d'acide 3-mercaptopropionique afin de faire en sorte que la surface du capteur soit dotée d'une charge négative dans l'eau. Des injections de PAH et de PSS successives entrecoupées d'injections d'une solution de NaCl 0,1 M permettent ensuite l'assemblage de couches polymériques à la surface du capteur.

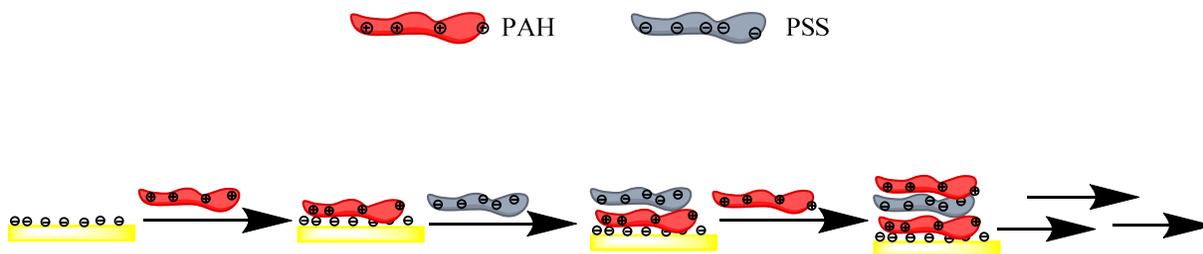


Figure 7.7 : Schéma de l'assemblage couche-par-couche du PAH et du PSS sur un film d'or fonctionnalisé avec l'acide 3-mercaptopropionique. Dans la figure, un assemblage PAH/PSS/PAH est montré.

L'épaisseur d'une bicouche de PAH/PSS a été déterminée comme étant d'environ 2,9nm par QCM et SPR<sup>119</sup>. Afin de tester l'efficacité du second prototype du module de fluorescence dans le cadre d'un biocapteur, un assemblage de 10 couches successives a été formé. Cet espaceur devrait donc théoriquement avoir une épaisseur d'environ 15 nm. Cette épaisseur correspond à une distance raisonnable du film métallique pour un essai typique impliquant une monocouche à la surface du prisme, un récepteur et la détection d'une cible. Le dernier polyelectrolyte ayant été ajouté étant le PSS, l'assemblage polymérique formé est doté d'une charge négative à sa surface. Cette charge permet à la rhodamine 6G, chargée positivement, de s'adsorber sur l'espaceur. L'adsorption des couches polymériques a été suivie par SPR, tel qu'illustré sur la figure 7.8.

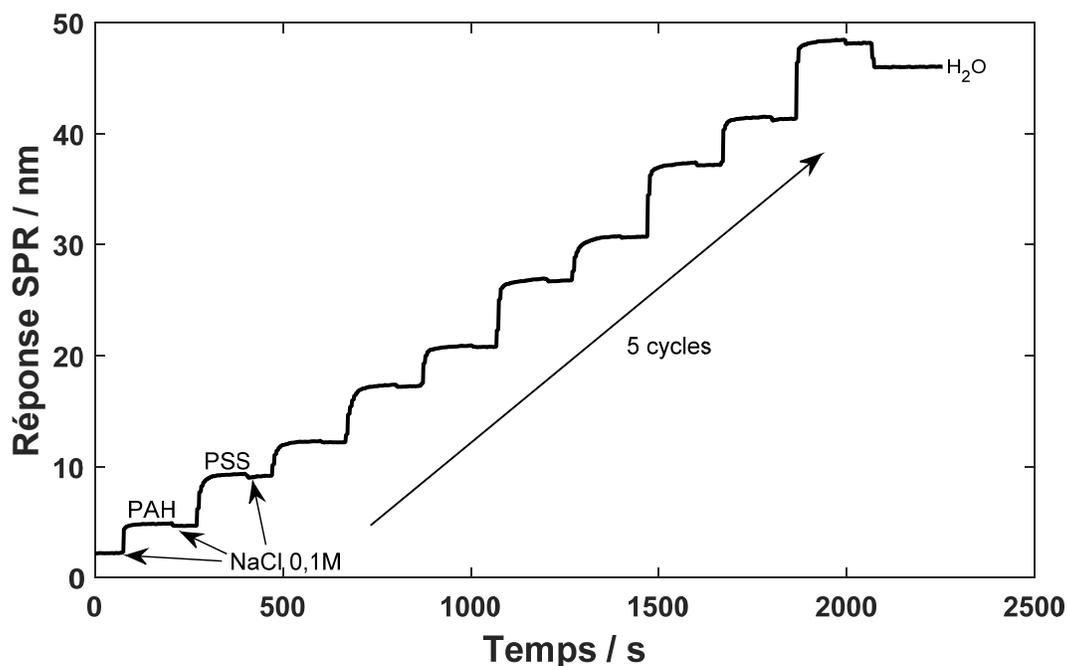


Figure 7.8 : Assemblage des bicouches polymériques sur la surface du capteur suivi par SPR. Cinq cycles successifs d'injections de PAH et de PSS sont faits avec une injection de NaCl 0,1 M entre chaque solution de polymère. De l'eau déionisée est ajoutée à la toute fin.

Le suivi de la formation des bicouches de polymère se fait par SPR avant d'ajouter les solutions de R6G. Même s'il s'agit d'une procédure bien établie, il est toujours intéressant de pouvoir s'assurer que le substrat utilisé pour l'essai est modifié de manière appropriée. Ce suivi par SPR permettrait aussi de suivre la fabrication d'un biocapteur et de s'assurer que la liaison du récepteur se déroule bien avant d'injecter les analytes par exemple. Avec cette version du module de fluorescence, il n'est présentement pas possible d'obtenir les données SPR et de fluorescence en parallèle. Ainsi, il faut interrompre l'acquisition des données SPR puis commencer celle des données de fluorescence.

### 7.3.2 Mesures de fluorescence en temps réel

Afin de valider si la nouvelle version du module de fluorescence permet de détecter la fluorescence de fluorophores adsorbés à la surface du capteur, des solutions de différentes

concentrations de R6G ont été injectées successivement à la surface du capteur. Chaque injection de fluorophore a été précédée d'un minutieux rinçage avec de l'eau déionisée afin de retirer toute trace de R6G dans la cellule de mesure. Pour ce volet de l'expérience, la détection s'est faite par fluorescence et non par SPR. La diode laser a été utilisée à pleine puissance pour l'acquisition des mesures de fluorescence. Ainsi, le signal mesuré par l'APD a été sauvegardé en temps réel pour toute la durée de l'expérience durant laquelle les différentes solutions de R6G ont été injectées. La cinétique est montrée à la figure 7.9.

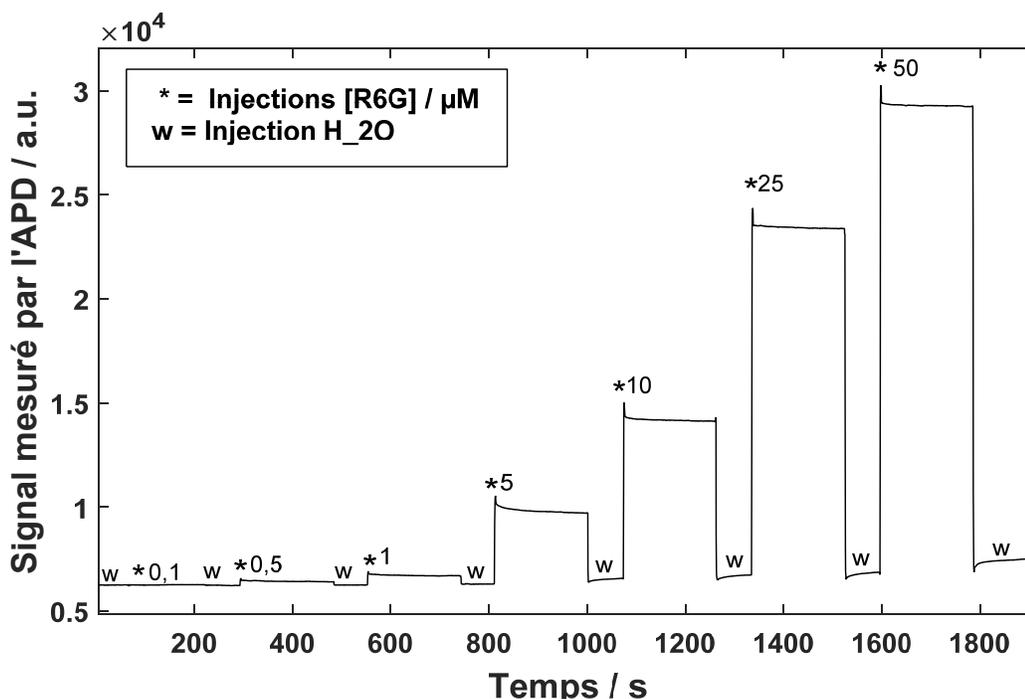


Figure 7.9 : Signal fluorescent en temps réel pour l'injection des différentes solutions de R6G sur l'assemblage polymérique.

Dans la figure précédente, il est possible d'observer la variation du signal mesuré par l'APD au fil du temps. Les w symbolisent l'injection d'eau déionisée avant et après chaque injection de R6G et les \* dénotent les injections des différentes solutions de R6G. La concentration en micromolaire est indiquée à droite des \*. Cet essai a permis d'observer deux types de détection : la fluorescence de la rhodamine 6G en solution et celle en surface. La fluorescence mesurée dans les solutions de fluorophores est en effet principalement générée par les fluorophores libres en solution, tandis que les lectures de fluorescence obtenues par après lors du rinçage avec l'eau déionisée sont issues des

fluorophores résiduels adsorbés au capteur. Tel qu'attendu, l'intensité de fluorescence associée aux fluorophores adsorbés est beaucoup plus faible que celle mesurée lorsque les solutions de R6G remplissent la cellule de mesure. Trois essais ont été réalisés afin de juger de la reproductibilité des signaux mesurés. La figure 7.10 montre deux courbes obtenues à partir des résultats bruts mesurés.

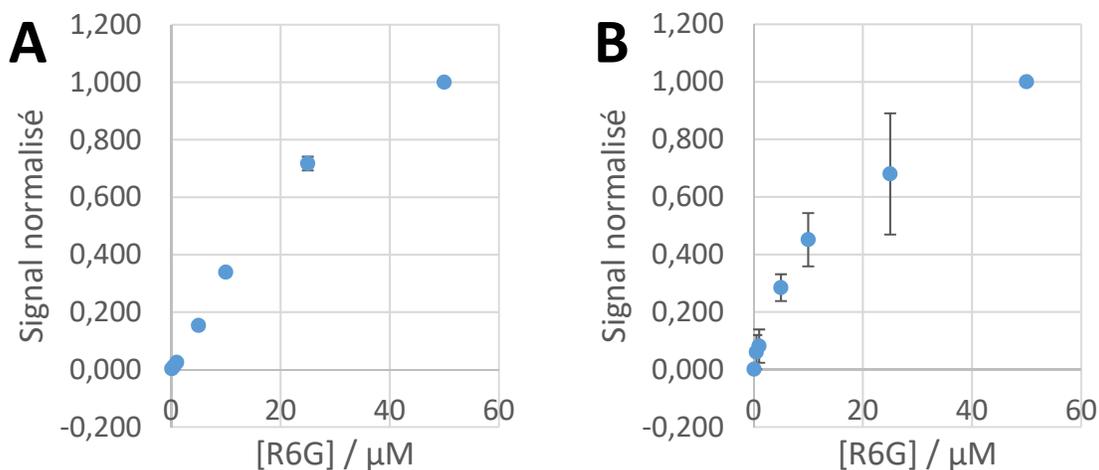


Figure 7.10 : Signal normalisé moyen mesuré par l'APD pour les différentes concentrations de R6G injectées. Le graphique A montre les valeurs obtenues pour la fluorescence mesurée dans les solutions de fluorophores, tandis que le graphique B montre celles obtenues après le rinçage de chacune des solutions par l'eau déionisée. Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type sur chacune des mesures.

Les valeurs présentées dans la figure 7.10 sont normalisées par rapport à la valeur obtenue pour la solution la plus concentrée, car pour l'un des trois capteurs testés, une différence était notable dans les lectures de fluorescence. En effet, les signaux mesurés étaient significativement plus faibles que pour les deux autres essais. Cette différence provient probablement d'un ajustement de la distance entre le capteur et le module de fluorescence non optimal, menant à une sensibilité moindre pour l'un des trois essais. Le panneau A montre la fluorescence mesurée pour les différentes solutions de fluorophores en solution. Les solutions de R6G utilisées avaient des concentrations de 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 25 et 50  $\mu\text{M}$ . La linéarité obtenue pour la figure A est très bonne dans l'intervalle de concentration de 0,1 à 25  $\mu\text{M}$  et la déviation à 50  $\mu\text{M}$  s'explique par l'auto-désactivation de la R6G à plus haute

concentration. La précision des mesures de fluorescence prises en solution est également très bonne, avec des barres d'erreur très faibles.

Le graphique du panneau B montre de son côté les résultats de fluorescence obtenus après le rinçage des différentes solutions de fluorophores injectées. Ainsi, la fluorescence mesurée devrait uniquement provenir des fluorophores adsorbés à la surface du capteur. Dans ce cas, la linéarité est moins bonne que pour les mesures du graphique A, mais l'intensité mesurée pour des concentrations croissantes de R6G augmente néanmoins. Deux facteurs peuvent potentiellement expliquer l'absence de linéarité observée dans le graphique B. En premier lieu, comme les fluorophores sont confinés à la surface du capteur, la distance entre eux est petite plus faible que lorsqu'ils sont en solution. Leur auto-désactivation se produit donc peut-être à de plus faible concentration dans ce cas et le signal mesuré ne serait donc pas linéaire avec l'augmentation de la concentration de R6G. En effet, ce phénomène est observé notamment pour l'imagerie de biomolécules<sup>121</sup>. Les fluorophores s'agrègent en effet à la surface des protéines et forment des zones très denses en fluorophores qui favorisent l'auto-désactivation de fluorescence plutôt que le processus radiatif. Les fluorophores organiques, étant souvent constitués de cycles aromatiques, sont sujet à des empilements- $\pi$ , ce qui leur permet de s'accumuler dans de très petites zones. Un autre facteur à tenir en compte est l'adsorption. Comme on mesure la fluorescence provenant de fluorophores adsorbés à la surface du capteur, le signal résultant peut être décrit par une isotherme d'adsorption. La figure suivante montre la modélisation de Langmuir avec les données expérimentales.

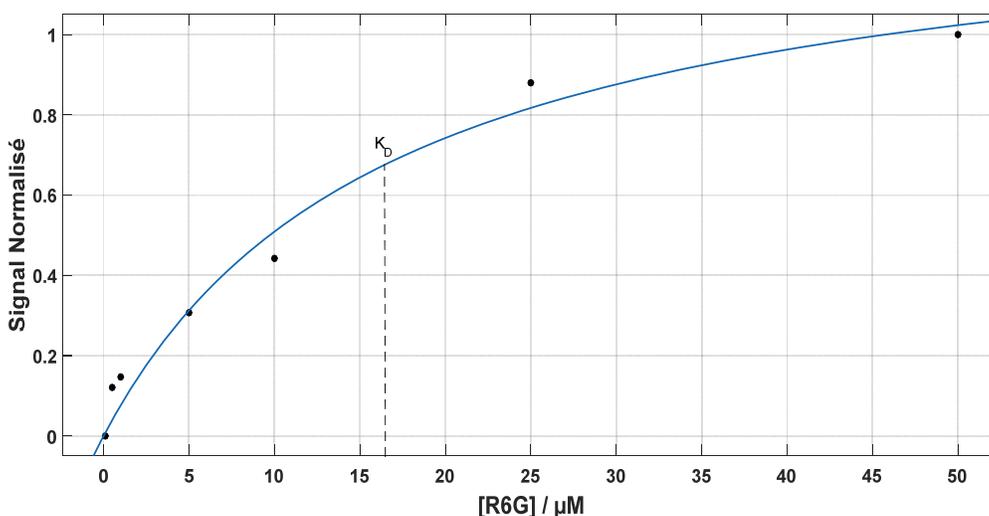


Figure 7.11 : Modélisation de l'isotherme de Langmuir à partir des données de fluorescence expérimentales pour les fluorophores liés à la surface du capteur. ( $R^2=0,977$ )

Dans la figure précédente, on constate que les valeurs obtenues correspondent effectivement assez bien au comportement prédit par l'isotherme de Langmuir. Il est même possible d'extraire une valeur de  $K_D$  d'environ  $16 \mu\text{M}$  pour l'adsorption de la rhodamine 6G à l'assemblage de polyélectrolytes. Toutefois, l'isotherme de Langmuir est basée sur des postulats impliquant notamment que l'analyte a une affinité équivalente pour chaque site du substrat et qu'il se forme une monocouche d'adsorbat. Les assemblages de polyélectrolytes formés ne sont pas rigoureusement uniformes sur l'ensemble du capteur, donc il est probable que l'affinité de l'analyte soit mieux représentée par une distribution de valeurs plutôt que par une unique valeur. Également, les molécules de R6G peuvent s'agréger par empilement- $\pi$ <sup>122</sup>. L'adsorption de la R6G aux bicouches de polyélectrolytes n'est probablement pas idéalement décrite par l'isotherme de Langmuir, mais au besoin des isothermes plus complexes comme celle de Freundlich ou celle de Frumkin-Fowler-Guggenheim peuvent être utilisées pour modéliser des processus d'adsorption plus complexes.

En plus de cette linéarité moindre, les résultats du panneau B de la figure 7.10 ont des barres d'erreur beaucoup plus grandes que celles associées aux mesures de fluorescence du panneau A. Les mesures du panneau B sont issues des molécules de R6G liées à la surface de trois capteurs différents. Puisque l'assemblage de polyélectrolyte n'est pas parfaitement uniforme, il est possible qu'une

certaines variabilités existent entre les différents capteurs utilisés et que les signaux mesurés fluctuent beaucoup plus d'un capteur à l'autre. Les mesures en solution ne sont pas sujettes à cette variabilité, puisque le signal mesuré provient principalement des fluorophores en solution dans la cellule de mesure.

### 7.3.3 Quantification par fluorescence

Même si le but du module de fluorescence consiste à détecter la fluorescence émise par les fluorophores à la surface du capteur, il serait néanmoins intéressant de pouvoir quantifier une solution contenant un analyte fluorescent. Un essai similaire à un ELISA pourrait être effectué à même le système SPR, comme montré précédemment<sup>117</sup>.

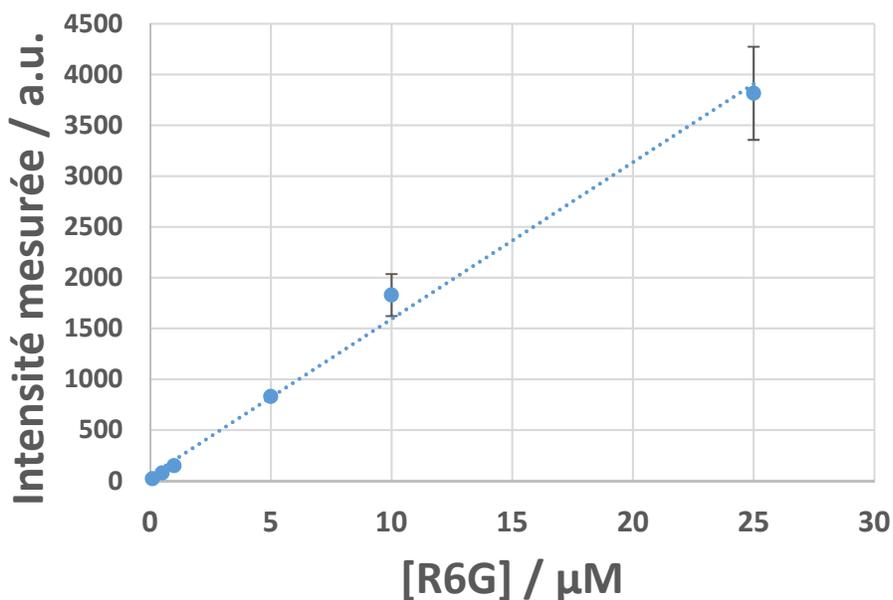


Figure 7.12 : Courbe d'étalonnage pour la détection de la R6G en solution obtenue avec le module de fluorescence. L'équation de la courbe est  $y=154,32x +49,716$ . Le coefficient de détermination est de 0,9935.

Il a été possible de construire une courbe d'étalonnage à partir des données expérimentales obtenues en solution. Le domaine linéaire de la courbe est entre 0,1 et 25 µM et la précision sur les mesures est très bonne avec des coefficients de variation entre 1 et 12%, sauf pour les solutions à 0,1 µM. La limite de détection a été évaluée à 79 nM à l'aide de l'équation suivante :

$$L.D. = \frac{3 \times s_{blanc}}{S} \quad \text{Équation 7.1}$$

Dans l'équation 7.1,  $s_{blanc}$  est l'écart-type sur les valeurs du blanc et S la sensibilité de la méthode, soit la pente de la droite d'étalonnage. L'écart-type du blanc a été déterminé à partir des mesures obtenues par l'APD pour les premiers points dans l'eau déionisée, avant l'injection de la première solution de R6G. Ces résultats ne sont pas les meilleurs ayant été obtenus pour la détection de R6G. En effet, la détection de R6G avec une limite de détection de  $6 \times 10^{-15}$  M et un domaine linéaire de plus de quatre ordres de grandeur ont déjà été rapportés<sup>123</sup>, mais à l'aide d'un système de détection dédié à la fluorescence et beaucoup plus complexe que celui utilisé ici. Le système conçu pour fonctionner à même l'instrument SPR permet néanmoins d'obtenir une bonne sensibilité et une bonne reproductibilité des mesures de fluorescence obtenues.

Tableau 7.1 : Paramètres analytiques pour la courbe d'étalonnage de la R6G obtenue avec le module de fluorescence.

Domaine de linéarité	Coefficient de détermination	%RSD des étalons <sup>1</sup>	Limite de détection / nM
0,1-25µM	0,9935	1 à 12	79

<sup>1</sup>À l'exception de [R6G]=0,1 µM

## 7.4 Conclusion

En somme, le premier module de fluorescence conçu n'avait pas la sensibilité nécessaire pour détecter la fluorescence issue de molécules confinées à la surface du capteur. Toutefois, en installant le module de fluorescence à un micromanipulateur, il est désormais possible d'optimiser la distance entre le module et le capteur afin d'augmenter l'efficacité d'excitation et de collection. Le second prototype de module de fluorescence développé a permis la détection de fluorescence issue de la R6G localisée à la surface du capteur avec une sensibilité adéquate. La détection et la quantification de R6G en solution a également été montrée et les performances obtenues, quoiqu'inférieures à d'autres montrées par le passé, sont intéressantes et pourraient servir dans le cadre de la détection d'analyte fluorescent en solution. Afin de valider ou d'infirmer l'hypothèse d'auto-extinction, il serait possible de diluer la R6G avec une seconde espèce non-fluorescente cationique en mesure de se lier à la surface de polyélectrolytes. En augmentant la quantité de cette seconde espèce par rapport à la quantité de R6G, on devrait voir moins d'auto-extinction.

## Chapitre 8 Conclusions

Au final, les travaux réalisés dans le cadre de ce mémoire ont permis d'exploiter la résonance des plasmons de surface pour la caractérisation d'interactions entre biomolécules. En plus de détecter les événements de reconnaissance moléculaires, les résultats obtenus par SPR permettent d'extraire des paramètres thermodynamiques ou cinétiques propres aux interactions étudiées. D'autres techniques permettent de caractériser ces interactions, mais la plupart requièrent des marqueurs (fluorescence) ou nécessitent une instrumentation plus complexe (RMN, rayons X). De plus, la SPR est une technique optique sondant l'interface du capteur et de la solution le submergeant. Ceci en fait une technique intéressante pour l'analyse d'interactions où l'un des partenaires est immobilisé à une surface, tel un récepteur biologique fixé à la membrane cellulaire d'une cellule. Il a également été montré que la SPR permet d'utiliser une grande variété de modifications de la surface du capteur permettant d'analyser toute sorte de récepteurs biologiques, qu'il s'agisse de grandes protéines ou de récepteurs plus petits comme un ganglioside. Les méthodes d'immobilisation sont également très versatiles et peuvent être variées de manière à optimiser l'interaction entre le récepteur immobilisé et l'analyte en choisissant une méthode d'immobilisation orientée par exemple.

La résonance des plasmons de surface a été utilisée pour la caractérisation de différents peptides synthétiques analogues au GHRP-6, une cible connue de la protéine CD36. Cette dernière est impliquée dans différentes pathologies comme l'athérosclérose et la DMLA et la SPR a permis l'étude de l'interaction de plusieurs peptides à potentiel thérapeutique afin de les trier selon leur affinité et déterminer lesquels liaient le mieux la protéine. Afin de bien exposer la boucle de l'ectodomaine de la CD36, une immobilisation orientée à l'aide d'une étiquette de polyhistidine a été choisie. Les valeurs de constante de dissociation obtenues sont situées entre 1 et plus de 35 $\mu$ M pour des aza-peptides ayant différentes modifications structurales.

Également, la SPR a servi à caractériser l'interaction entre un autre peptide et un nouveau récepteur, le GM1. Le GM1, un ganglioside, est constitué de deux chaînes hydrophobes, l'acide stéarique et un sphingosine, ainsi que d'un oligosaccharide. Ne s'agissant pas d'une protéine, les techniques d'immobilisation traditionnelles ne s'appliquaient pas avec ce récepteur. Le GM1 a donc été inséré dans des vésicules de POPC et ces vésicules modifiées ont ensuite été exposées à la surface du capteur modifié avec une monocouche d'ODT. Finalement, les vésicules se sont ouvertes et se sont

déposées sur la surface du capteur, exposant ainsi la tête polaire du GM1, comme c'est également le cas à la surface des cellules. Ce capteur a permis de déterminer la constante de dissociation d'un peptide, le G23, pour le GM1 afin de valider si ce peptide pourrait ou non servir de constituant dans une prodrogue et aider à lier le médicament. L'interaction entre la CTB et la surface modifiée avec le GM1 a également été étudiée afin de confirmer l'exactitude des mesures obtenues. La valeur de la constante de dissociation trouvée pour le couple G23-GM1 est de  $2,1 \pm 0,7 \mu\text{M}$  tandis que celle pour le couple CTB-GM1 est de  $57 \pm 17 \text{ nM}$ . Les valeurs théoriques pour la liaison de la CTB au GM1 sont typiquement dans le haut picomolaire ou le bas nanomolaire.

La SPR peut également servir à découvrir de nouvelles interactions entre biomolécules. L'interaction entre la cytokine IL-6 et l'EBI3 a été montrée par SPR et un  $K_D$  de  $4,1 \pm 0,2 \mu\text{M}$  a été obtenu. Différents contrôles ont été faits pour s'assurer de la spécificité de la liaison entre l'IL-6 et l'EBI3. Un autre récepteur a été utilisé au lieu de l'EBI3 avec l'IL-6 et une autre cytokine a été exposée à l'EBI3 immobilisé afin de montrer que l'IL-6 et l'EBI3 réagissent bien spécifiquement ensemble. Ayant démontré la formation du complexe IL-6/EBI3, la liaison de ce complexe avec le gp130, un récepteur responsable de la transduction de signal à la membrane de cellules, a été montrée afin de déterminer si la formation de ce complexe pourrait avoir des effets thérapeutiques.

L'interaction entre une protéine BP produite dans le laboratoire du professeur Chica (U. d'Ottawa) et la GFP a été également caractérisée. La constante de dissociation de la GFP pour la BP a été déterminée à l'aide de deux méthodes différentes et les résultats obtenus par la seconde méthode ont permis d'obtenir une valeur du  $K_D$  plus près de celle obtenue avec un essai de fluorescence en solution, soit  $486 \pm 93 \text{ nM}$ .

En dernier lieu, le développement d'un module de fluorescence pouvant être utilisé à même le système SPR a été développé. La spectroscopie de fluorescence est en effet une technique qui se couple très bien à la SPR et permet d'obtenir des informations complémentaires. Si la SPR est une technique intéressante en soit, elle n'est pas dénuée de limitations pour autant. L'absence de sélectivité du signal mesuré est probablement sa plus grande limite. En effet, tout matériel s'adsorbant à la surface du capteur est susceptible d'induire un signal que on ne peut distinguer du signal provenant de la liaison de l'analyte. En utilisant un module de fluorescence et des analytes marqués, il pourrait notamment être possible de comparer les résultats obtenus par SPR et par fluorescence afin de réduire les faux positifs associés à l'adsorption non-spécifique. De plus, comme la SPR sonde l'interface du capteur par

en dessous à l'aide d'une onde évanescente, il est possible de venir sonder la surface par fluorescence à l'aide d'une géométrie d'épifluorescence.

Les performances d'un deuxième prototype de module de fluorescence ont été déterminées en détectant la fluorescence émise de la rhodamine 6G en solution et adsorbée à la surface du capteur sur des couches de polyélectrolytes. La détection en solution a permis d'obtenir une droite d'étalonnage avec un domaine linéaire allant du nanomolaire au bas micromolaire et une limite de détection d'environ 80nM. La détection en surface n'a pas permis une détection aussi sensible que celle en solution ni une linéarité, mais il a néanmoins été possible de détecter un signal croissant pour des concentrations croissantes de R6G. L'adsorption de la rhodamine à la surface a également été montrée grâce à l'isotherme de Langmuir, phénomène expliquant en partie l'absence de linéarité du signal mesuré pour la rhodamine adsorbée.

## 8.1 Perspectives

La caractérisation par SPR de systèmes biologiques n'est plus marginale, il s'agit plutôt d'une méthode bien établie. Il reste néanmoins de l'espace pour de nouvelles chimies de surface ou méthodes d'immobilisation permettant d'améliorer encore davantage la résistance à l'adsorption non-spécifique ou de permettre d'immobiliser de nouvelles classes de récepteurs. Pour sa part, le système couplant la SPR et la fluorescence nécessite encore un peu de travail. En effet, il n'est pas possible de mesurer en parallèle le signal SPR et de fluorescence sans interrompre l'acquisition de l'un ou l'autre. Ceci limite la résolution temporelle accessible lors de l'expérience et ne permet pas d'obtenir les deux détections afin de caractériser le même événement de reconnaissance moléculaire. Afin de régler ce problème, le logiciel devra être légèrement modifié afin de permettre l'acquisition synchronisée du signal SPR et de fluorescence. Également, afin d'améliorer le signal provenant des fluorophores adsorbés à la surface du capteur, le jeu de lentilles responsables de la collection des photons pourrait être amélioré pour focaliser plus efficacement le faisceau laser sur l'échantillon et le faisceau de photons émis sur le détecteur afin de maximiser le signal détecté. Le système SPR-Fluorescence devrait également être testé avec un véritable système biologique impliquant par exemple un anticorps ou un brin d'ADN marqué d'un fluorophore.

De plus, advenant des performances intéressantes, le détecteur utilisé, l'APD, pourrait être remplacé par une fibre optique connectée à un spectrophotomètre afin d'obtenir des données plus complexes. Un spectrophotomètre permettrait par exemple de bâtir un essai FRET et d'obtenir des informations structurelles par rapport à l'interaction de l'analyte au récepteur. Il serait également possible d'utiliser la spectroscopie Raman pour identifier les analytes liés à la surface au lieu d'utiliser la fluorescence. Une autre technique de luminescence comme l'électrochimiluminescence pourrait également être utilisée au besoin. Un système permettant d'utiliser l'électrochimiluminescence est toujours à un stade préliminaire, mais la surface d'or du capteur SPR se prête très bien à ce système et peut servir d'électrode de travail. Le potentiel de cet instrument couplant la SPR et une seconde technique optique est donc très grand et pourrait aider à la caractérisation de systèmes biologiques.

# Bibliographie

1. Wood, R. W., XLII. On a remarkable case of uneven distribution of light in a diffraction grating spectrum. *Philos. Mag. Series 6* **1902**, 4 (21), 396-402.
2. Wood, R. W., XXVII. Diffraction gratings with controlled groove form and abnormal distribution of intensity. *Philos. Mag. Series 6* **1912**, 23 (134), 310-317.
3. Bohm, D.; Pines, D., A Collective Description of Electron Interactions. I. Magnetic Interactions. *Physical Review* **1951**, 82 (5), 625-634.
4. Bohm, D.; Pines, D., A Collective Description of Electron Interactions: III. Coulomb Interactions in a Degenerate Electron Gas. *Physical Review* **1953**, 92 (3), 609-625.
5. Pines, D.; Bohm, D., A Collective Description of Electron Interactions: II. Collective vs Individual Particle Aspects of the Interactions. *Physical Review* **1952**, 85 (2), 338-353.
6. Otto, A., Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection. *Zeitschrift für Physik* **1968**, 216 (4), 398-410.
7. Kretschmann, E.; Raether, H., Notizen: Radiative Decay of Non Radiative Surface Plasmons Excited by Light. *Z. Naturforsch. A* **1968**, 23 (12).
8. Liedberg, B.; Nylander, C.; Lundström, I., Biosensing with surface plasmon resonance, I--how it all started. *Biosens. Bioelectron.* **1995**, 10 (8), i-ix.
9. Couture, M.; Zhao, S. S.; Masson, J. F., Modern surface plasmon resonance for bioanalytics and biophysics. *Phys Chem Chem Phys* **2013**, 15 (27), 11190-216.
10. Couture, M.; Zhao, S. S.; Masson, J. F., Modern surface plasmon resonance for bioanalytics and biophysics. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, 15 (27), 11190-11216.
11. Masson, J. F., *CHM6110: Notes de cours*. 2015.
12. Forest, S.; Breault-Turcott, J.; Chaurand, P.; Masson, J. F., Surface Plasmon Resonance Imaging-MALDI-TOF Imaging Mass Spectrometry of Thin Tissue Sections. *Anal. Chem.* **2016**, 88 (4), 2072-2079.
13. Pumera, M.; Ambrosi, A.; Bonanni, A.; Chng, E. L. K.; Poh, H. L., Graphene for electrochemical sensing and biosensing. *Trac-Trends Anal. Chem.* **2010**, 29 (9), 954-965.
14. Shao, Y. Y.; Wang, J.; Wu, H.; Liu, J.; Aksay, I. A.; Lin, Y. H., Graphene Based Electrochemical Sensors and Biosensors: A Review. *Electroanalysis* **2010**, 22 (10), 1027-1036.
15. Wang, J., Electrochemical biosensors: Towards point-of-care cancer diagnostics. *Biosens. Bioelectron.* **2006**, 21 (10), 1887-1892.
16. Wang, J.; Xu, D. K.; Kawde, A. N.; Polsky, R., Metal nanoparticle-based electrochemical stripping potentiometric detection of DNA hybridization. *Anal. Chem.* **2001**, 73 (22), 5576-5581.
17. Lange, K.; Rapp, B. E.; Rapp, M., Surface acoustic wave biosensors: a review. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, 391 (5), 1509-1519.
18. Marx, K. A., Quartz crystal microbalance: A useful tool for studying thin polymer films and complex biomolecular systems at the solution-surface interface. *Biomacromolecules* **2003**, 4 (5), 1099-1120.
19. Haes, A. J.; Van Duyne, R. P., A nanoscale optical biosensor: Sensitivity and selectivity of an approach based on the localized surface plasmon resonance spectroscopy of triangular silver nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124 (35), 10596-10604.
20. Homola, J., Present and future of surface plasmon resonance biosensors. *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, 377 (3), 528-39.

21. Nath, N.; Chilkoti, A., A colorimetric gold nanoparticle sensor to interrogate biomolecular interactions in real time on a surface. *Anal. Chem.* **2002**, *74* (3), 504-509.
22. Vollmer, F.; Arnold, S., Whispering-gallery-mode biosensing: label-free detection down to single molecules. *Nat. Methods* **2008**, *5* (7), 591-596.
23. Masson, J. F., *Chapitre 13: Présentation SPR*. 2014.
24. Karlsson, R.; Michaelsson, A.; Mattsson, L., Kinetic-Analysis of monoclonal antibody-antigen interactions with a new biosensor based analytical system. *J. Immunol. Methods* **1991**, *145* (1-2), 229-240.
25. Johnsson, B.; Lofas, S.; Lindquist, G., Immobilization of proteins to a carboxymethyl-dextran-modified gold surface for biospecific interactions analysis in surface-plasmon resonance sensors. *Anal. Biochem.* **1991**, *198* (2), 268-277.
26. Jordan, C. E.; Frutos, A. G.; Thiel, A. J.; Corn, R. M., Surface Plasmon Resonance Imaging Measurements of DNA Hybridization Adsorption and Streptavidin/DNA Multilayer Formation at Chemically Modified Gold Surfaces. *Anal. Chem.* **1997**, *69* (24), 4939-4947.
27. Matsui, J.; Akamatsu, K.; Hara, N.; Miyoshi, D.; Nawafune, H.; Tamaki, K.; Sugimoto, N., SPR sensor chip for detection of small molecules using molecularly imprinted polymer with embedded gold nanoparticles. *Anal. Chem.* **2005**, *77* (13), 4282-4285.
28. Riskin, M.; Tel-Vered, R.; Bourenko, T.; Granot, E.; Willner, I., Imprinting of molecular recognition sites through electropolymerization of functionalized Au nanoparticles: Development of an electrochemical TNT sensor based on pi-donor-acceptor interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (30), 9726-9733.
29. Polonschii, C.; David, S.; Tombelli, S.; Mascini, M.; Gheorghiu, M., A novel low-cost and easy to develop functionalization platform. Case study: Aptamer-based detection of thrombin by surface plasmon resonance. *Talanta* **2010**, *80* (5), 2157-2164.
30. Zhang, J.; Wang, L. H.; Pan, D.; Song, S. P.; Boey, F. Y. C.; Zhang, H.; Fan, C. H., Visual cocaine detection with gold nanoparticles and rationally engineered aptamer structures. *Small* **2008**, *4* (8), 1196-1200.
31. Masson, J. F.; Battaglia, T. M.; Cramer, J.; Beaudoin, S.; Sierks, M.; Booksh, K. S., Reduction of nonspecific protein binding on surface plasmon resonance biosensors. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *386* (7-8), 1951-9.
32. Bhunia, A. K., *High Throughput Screening for Food Safety Assessment*. 1 ed.; Woodhead Publishing: 2014; p 550.
33. Bolduc, O. R.; Pelletier, J. N.; Masson, J. F., SPR Biosensing in Crude Serum Using Ultralow Fouling Binary Patterned Peptide SAM. *Anal. Chem.* **2010**, *82* (9), 3699-3706.
34. Gonzales, N. R.; Schuck, P.; Schlom, J.; Kashmiri, S. V. S., Surface plasmon resonance-based competition assay to assess the sera reactivity of variants of humanized antibodies. *J. Immunol. Methods* **2002**, *268* (2), 197-210.
35. 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.
36. Breault-Turcot, J.; Masson, J. F., Microdialysis SPR: diffusion-gated sensing in blood. *Chem. Sci.* **2015**, *6* (7), 4247-4254.
37. Vikinge, T. P.; Hansson, K. M.; Sandstrom, P.; Liedberg, B.; Lindahl, T. L.; Lundstrom, I.; Tengvall, P.; Hook, F., Comparison of surface plasmon resonance and quartz crystal microbalance in the study of whole blood and plasma coagulation. *Biosens. Bioelectron.* **2000**, *15* (11-12), 605-613.

38. Hong, S. C.; Lee, J.; Shin, H. C.; Kim, C. M.; Park, J. Y.; Koh, K.; Kim, H. J.; Chang, C. L.; Lee, J., Clinical immunosensing of tuberculosis CFP-10 in patient urine by surface plasmon resonance spectroscopy. *Sens. Actuator B-Chem.* **2011**, *160* (1), 1434-1438.
39. Trevino, J.; Calle, A.; Rodriguez-Frade, J. M.; Mellado, M.; Lechuga, L. M., Single- and multi-analyte determination of gonadotropic hormones in urine by Surface Plasmon Resonance immunoassay. *Anal. Chim. Acta* **2009**, *647* (2), 202-209.
40. Mitchell, J. S.; Lowe, T. E., Ultrasensitive detection of testosterone using conjugate linker technology in a nanoparticle-enhanced surface plasmon resonance biosensor. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *24* (7), 2177-2183.
41. Stevens, R. C.; Soelberg, S. D.; Near, S.; Furlong, C. E., Detection of cortisol in saliva with a flow-filtered, portable surface plasmon resonance biosensor system. *Anal. Chem.* **2008**, *80* (17), 6747-6751.
42. Choi, S.; Chae, J., Methods of reducing non-specific adsorption in microfluidic biosensors. *J. Microelectromech. Syst.* **2010**, *20* (7), 075015.
43. Dhruv, H. D. Controlling Nonspecific Adsorption of Proteins at Bio-Interfaces for Biosensor and Biomedical Applications. Utah State, 2009.
44. Porter, M. D.; Bright, T. B.; Allara, D. L.; Chidsey, C. E. D., Spontaneously organized molecular assemblies. 4. Structural characterization of n-alkyl thiol monolayers on gold by optical ellipsometry, infrared spectroscopy, and electrochemistry. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109* (12), 3559-3568.
45. Ozboyaci, M.; Kokh, D. B.; Wade, R. C., Three steps to gold: mechanism of protein adsorption revealed by Brownian and molecular dynamics simulations. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, *18* (15), 10191-200.
46. Brogan, K. L.; Shin, J. H.; Schoenfisch, M. H., Influence of surfactants and antibody immobilization strategy on reducing nonspecific protein interactions for molecular recognition force microscopy. *Langmuir* **2004**, *20* (22), 9729-35.
47. Pavey, K. D.; Olliff, C. J., SPR analysis of the total reduction of protein adsorption to surfaces coated with mixtures of long- and short-chain polyethylene oxide block copolymers. *Biomaterials* **1999**, *20* (9), 885-890.
48. McPherson, T.; Kidane, A.; Szleifer, I.; Park, K., Prevention of Protein Adsorption by Tethered Poly(ethylene oxide) Layers: Experiments and Single-Chain Mean-Field Analysis. *Langmuir* **1998**, *14* (1), 176-186.
49. Bergstrand, A.; Rahmani-Monfared, G.; Ostlund, A.; Nyden, M.; Holmberg, K., Comparison of PEI-PEG and PLL-PEG copolymer coatings on the prevention of protein fouling. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2009**, *88A* (3), 608-615.
50. Erb, E. M.; Chen, X. Y.; Allen, S.; Roberts, C. J.; Tandler, S. J. B.; Davies, M. C.; Forsen, S., Characterization of the surfaces generated by liposome binding to the modified dextran matrix of a surface plasmon resonance sensor chip. *Anal. Biochem.* **2000**, *280* (1), 29-35.
51. Masson, J. F.; Battaglia, T. M.; Davidson, M. J.; Kim, Y. C.; Prakash, A. M.; Beaudoin, S.; Booksh, K. S., Biocompatible polymers for antibody support on gold surfaces. *Talanta* **2005**, *67* (5), 918-25.
52. Kennedy, B. P.; Lever, A. B. P., Studies of the Metal-Sulfur Bond. Complexes of the Pyridine Thiols. *Can. J. Chem.* **1972**, *50* (21), 3488-3507.
53. Bain, C. D.; Troughton, E. B.; Tao, Y. T.; Evall, J.; Whitesides, G. M.; Nuzzo, R. G., Formation of Monolayer Films by the Spontaneous Assembly of Organic Thiols from Solution onto Gold. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111* (1), 321-335.

54. Holmlin, R. E.; Chen, X. X.; Chapman, R. G.; Takayama, S.; Whitesides, G. M., Zwitterionic SAMs that resist nonspecific adsorption of protein from aqueous buffer. *Langmuir* **2001**, *17* (9), 2841-2850.
55. Marsh, K. N.; Boxall, J. A.; Lichtenthaler, R., Room temperature ionic liquids and their mixtures—a review. *Fluid Phase Equilib.* **2004**, *219* (1), 93-98.
56. Ratel, M.; Provencher-Girard, A.; Zhao, S. S.; Breault-Turcot, J.; Labrecque-Carbonneau, J.; Branca, M.; Pelletier, J. N.; Schmitzer, A. R.; Masson, J. F., Imidazolium-based ionic liquid surfaces for biosensing. *Anal. Chem.* **2013**, *85* (12), 5770-7.
57. Bolduc, O. R.; Clouthier, C. M.; Pelletier, J. N.; Masson, J. F., Peptide Self-Assembled Monolayers for Label-Free and Unamplified Surface Plasmon Resonance Biosensing in Crude Cell Lysate. *Anal. Chem.* **2009**, *81* (16), 6779-6788.
58. 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.
59. 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.
60. 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.
61. M. M. Elnashar, M., Review Article: Immobilized Molecules Using Biomaterials and Nanobiotechnology. *J. Biomat. Nanobiotech.* **2010**, *01* (01), 61-77.
62. Scouten, W.; Luong, J.; Stephenbrown, R., Enzyme or protein immobilization techniques for applications in biosensor design. *Trends Biotechnol.* **1995**, *13* (5), 178-185.
63. Chang, Z.; Chen, M.; Fan, H.; Zhao, K.; Zhuang, S.; He, P.; Fang, Y., Multilayer membranes via layer-by-layer deposition of PDDA and DNA with Au nanoparticles as tags for DNA biosensing. *Electrochim. Acta* **2008**, *53* (6), 2939-2945.
64. Heller, A., Electrical wiring of redox enzymes. *Accounts Chem. Res.* **1990**, *23* (5), 128-134.
65. Ji, X.; Jin, B.; Jin, J.; Nakamura, T., Voltammetry of immobilized cytochrome c on novel binary self-assembled monolayers of thioctic acid and thioctic amide modified gold electrodes. *J. Electroanal. Chem.* **2006**, *590* (2), 173-180.
66. Topoglidis, E.; Cass, A. E.; Gilardi, G.; Sadeghi, S.; Beaumont, N.; Durrant, J. R., Protein Adsorption on Nanocrystalline TiO(2) Films: An Immobilization Strategy for Bioanalytical Devices. *Anal. Chem.* **1998**, *70* (23), 5111-3.
67. Gade, V. K.; Shirale, D. J.; Gaikwad, P. D.; Savale, P. A.; Kakde, K. P.; Kharat, H. J.; Shirsat, M. D., Immobilization of GOD on electrochemically synthesized Ppy-PVS composite film by cross-linking via glutaraldehyde for determination of glucose. *React. Funct. Polym.* **2006**, *66* (12), 1420-1426.
68. Prieto-Simon, B.; Campas, M.; Marty, J. L., Biomolecule Immobilization in Biosensor Development: Tailored Strategies Based on Affinity Interactions. *Protein Peptide Lett.* **2008**, *15* (8), 757-763.
69. Chung, J. W.; Park, J. M.; Bernhardt, R.; Pyun, J. C., Immunosensor with a controlled orientation of antibodies by using NeutrAvidin-protein A complex at immunoaffinity layer. *J. Biotechnol.* **2006**, *126* (3), 325-33.
70. Kobayashi, Y.; Anzai, J.-i., Preparation and optimization of bienzyme multilayer films using lectin and glyco-enzymes for biosensor applications. *J. Electroanal. Chem.* **2001**, *507* (1-2), 250-255.
71. Ricci, F.; Volpe, G.; Micheli, L.; Palleschi, G., A review on novel developments and applications of immunosensors in food analysis. *Anal. Chim. Acta* **2007**, *605* (2), 111-29.

72. Kim, D.; Herr, A. E., Protein immobilization techniques for microfluidic assays. *Biomicrofluidics* **2013**, *7* (4), 41501.
73. Hermanson, G. T., *Bioconjugate techniques*. Academic press: 2013.
74. Porath, J.; Carlsson, J. A. N.; Olsson, I.; Belfrage, G., Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* **1975**, *258* (5536), 598-599.
75. Block, H.; Maertens, B.; Spriestersbach, A.; Brinker, N.; Kubicek, J.; Fabis, R.; Labahn, J.; Schäfer, F., Chapter 27 Immobilized-Metal Affinity Chromatography (IMAC). **2009**, *463*, 439-473.
76. Roche His-Tag. <https://lifescience.roche.com/campaigns/DeveloperTips/protein-purification/his-tag.html> (accessed 2016-07-04).
77. Bangham, A. D.; Horne, R. W., Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. *J. Mol. Biol.* **1964**, *8* (5), 660-IN10.
78. Woodward, J. T.; Meuse, C. W., Mechanism of formation of vesicle fused phospholipid monolayers on alkanethiol self-assembled monolayer supports. *J. Colloid Interf. Sci.* **2009**, *334* (2), 139-45.
79. Jenkins, A. T. A.; Neumann, T.; Offenhausser, A., Surface plasmon microscopy measurements of lipid vesicle adsorption on a micropatterned self-assembled monolayer. *Langmuir* **2001**, *17* (2), 265-267.
80. Leonenko, Z. V.; Carnini, A.; Cramb, D. T., Supported planar bilayer formation by vesicle fusion: the interaction of phospholipid vesicles with surfaces and the effect of gramicidin on bilayer properties using atomic force microscopy. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1509* (1-2), 131-147.
81. Morigaki, K.; Tawa, K., Vesicle fusion studied by surface plasmon resonance and surface plasmon fluorescence spectroscopy. *Biophys. J.* **2006**, *91* (4), 1380-1387.
82. Boldyrev, I. A.; Zhai, X.; Momsen, M. M.; Brockman, H. L.; Brown, R. E.; Molotkovsky, J. G., New BODIPY lipid probes for fluorescence studies of membranes. *J. Lipid. Res.* **2007**, *48* (7), 1518-32.
83. Kuziemko, G. M.; Stroh, M.; Stevens, R. C., Cholera toxin binding affinity and specificity for gangliosides determined by surface plasmon resonance. *Biochemistry* **1996**, *35* (20), 6375-84.
84. Hall, D., Chapter 4 Kinetic Models Describing Biomolecular Interactions at Surfaces. In *Handbook of Surface Plasmon Resonance*, The Royal Society of Chemistry: 2008; pp 81-122.
85. de Mol, N. J.; Fischer, M. J. E., Chapter 5 Kinetic and Thermodynamic Analysis of Ligand-Receptor Interactions: SPR Applications in Drug Development. In *Handbook of Surface Plasmon Resonance*, The Royal Society of Chemistry: 2008; pp 123-172.
86. Schuck, P.; Minton, A. P., Analysis of mass transport-limited binding kinetics in evanescent wave biosensors. *Anal Biochem* **1996**, *240* (2), 262-72.
87. Karoui, R.; Blecker, C., Fluorescence Spectroscopy Measurement for Quality Assessment of Food Systems—a Review. *Food Bioprocess Tech.* **2010**, *4* (3), 364-386.
88. Petryayeva, E.; Algar, W. R.; Medintz, I. L., Quantum Dots in Bioanalysis: A Review of Applications Across Various Platforms for Fluorescence Spectroscopy and Imaging. *Appl. Spectrosc.* **2013**, *67* (3), 215-252.
89. Mahanama, K. R. R.; Gundel, L. A.; Daisey, J. M., Selective Fluorescence Detection of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Environmental Tobacco Smoke and Other Airborne Particles. *Int. J. Environ. An. Chem.* **1994**, *56* (4), 289-309.
90. Lei, L. M.; Wu, Y. S.; Gan, N. Q.; Song, L. R., An ELISA-like time-resolved fluorescence immunoassay for microcystin detection. *Clin. Chim. Acta* **2004**, *348* (1-2), 177-180.
91. Lakowicz, J. R., **2006**.
92. Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Crouch, S. R., *Principles of Instrumental Analysis*. 6 ed.; 2006; p 1056.
93. Lakowicz, J. R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3 ed.; 2006.

94. Deng, W.; Xie, F.; Baltar, H. T.; Goldys, E. M., Metal-enhanced fluorescence in the life sciences: here, now and beyond. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15* (38), 15695-708.
95. Aslan, K.; Lakowicz, J. R.; Geddes, C. D., Plasmon light scattering in biology and medicine: new sensing approaches, visions and perspectives. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9* (5), 538-44.
96. Houssier, M.; Raoul, W.; Lavalette, S.; Keller, N.; Guillonneau, X.; Baragatti, B.; Jonet, L.; Jeanny, J. C.; Behar-Cohen, F.; Coceani, F.; Scherman, D.; Lachapelle, P.; Ong, H.; Chemtob, S.; Sennlaub, F., CD36 deficiency leads to choroidal involution via COX2 down-regulation in rodents. *PLoS Med.* **2008**, *5* (2), e39.
97. Proulx, C.; Picard, E.; Boeglin, D.; Pohankova, P.; Chemtob, S.; Ong, H.; Lubell, W. D., Azapeptide analogues of the growth hormone releasing peptide 6 as cluster of differentiation 36 receptor ligands with reduced affinity for the growth hormone secretagogue receptor 1a. *J. Med. Chem.* **2012**, *55* (14), 6502-11.
98. Lambert-Lanteigne, P. Application du SPR dans le criblage des ligands synthétiques du CD36 et sa validation. UdeM, Université de Montréal, 2012.
99. Bagley, C. J.; Woodcock, J. M.; Stomski, F. C.; Lopez, A. F., The structural and functional basis of cytokine receptor activation: lessons from the common beta subunit of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin-3 (IL-3), and IL-5 receptors. *Blood* **1997**, *89* (5), 1471-82.
100. Voet, D., Voet, J.G., *Biochimie*. 2005; p 1583.
101. Christie, W. Gangliosides.  
<http://lipidlibrary.aocs.org/Primer/content.cfm?ItemNumber=39329> (accessed 08-08-2016).
102. Aman, A. T.; Fraser, S.; Merritt, E. A.; Rodighiero, C.; Kenny, M.; Ahn, M.; Hol, W. G.; Williams, N. A.; Lencer, W. I.; Hirst, T. R., A mutant cholera toxin B subunit that binds GM1- ganglioside but lacks immunomodulatory or toxic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98* (15), 8536-41.
103. Williams, T. L.; Jenkins, A. T., Measurement of the binding of cholera toxin to GM1 gangliosides on solid supported lipid bilayer vesicles and inhibition by europium (III) chloride. *J Am Chem Soc* **2008**, *130* (20), 6438-43.
104. Masserini, M.; Freire, E.; Palestini, P.; Calappi, E.; Tettamanti, G., Fuc-GM1 ganglioside mimics the receptor function of GM1 for cholera toxin. *Biochemistry* **1992**, *31* (8), 2422-2426.
105. Cuatrecasas, P., Interaction of *Vibrio cholerae* enterotoxin with cell membranes. *Biochemistry* **1973**, *12* (18), 3547-3558.
106. Shi, J.; Yang, T.; Cremer, P. S., Multiplexing ligand-receptor binding measurements by chemically patterning microfluidic channels. *Anal. Chem.* **2008**, *80* (15), 6078-84.
107. Georgieva, J. V.; Brinkhuis, R. P.; Stojanov, K.; Weijers, C. A.; Zuilhof, H.; Rutjes, F. P.; Hoekstra, D.; van Hest, J. C.; Zuhorn, I. S., Peptide-mediated blood-brain barrier transport of polymersomes. *Angew Chem Int Ed Engl* **2012**, *51* (33), 8339-42.
108. Batten, M.; Li, J.; Yi, S.; Kljavin, N. M.; Danilenko, D. M.; Lucas, S.; Lee, J.; de Sauvage, F. J.; Ghilardi, N., Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17-producing T cells. *Nat. Immunol.* **2006**, *7* (9), 929-36.
109. Collison, L. W.; Workman, C. J.; Kuo, T. T.; Boyd, K.; Wang, Y.; Vignali, K. M.; Cross, R.; Sehy, D.; Blumberg, R. S.; Vignali, D. A., The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* **2007**, *450* (7169), 566-9.
110. Jones, L. L.; Vignali, D. A., Molecular interactions within the IL-6/IL-12 cytokine/receptor superfamily. *Immunol. Res.* **2011**, *51* (1), 5-14.
111. Taga, T.; Kishimoto, T., Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu. Rev. Immunol.* **1997**, *15*, 797-819.

112. Layton, J. E.; Shimamoto, G.; Osslund, T.; Hammacher, A.; Smith, D. K.; Treutlein, H. R.; Boone, T., Interaction of Granulocyte Colony-stimulating Factor (G-CSF) with Its Receptor: EVIDENCE THAT Glu19 of G-CSF INTERACTS WITH Arg288 OF THE RECEPTOR. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274* (25), 17445-17451.
113. Remington, S. J., Fluorescent proteins: maturation, photochemistry and photophysics. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2006**, *16* (6), 714-21.
114. Stepanenko, O.; Verkhusha, V.; Kuznetsova, I.; Uversky, V.; Turoverov, K., Fluorescent Proteins as Biomarkers and Biosensors: Throwing Color Lights on Molecular and Cellular Processes. *Curr. Protein Pept. Sc.* **2008**, *9* (4), 338-369.
115. Ouellet, E.; Lund, L.; Lagally, E. T., Multiplexed surface plasmon resonance imaging for protein biomarker analysis. *Methods Mol. Biol.* **2013**, *949*, 473-90.
116. Couture, M.; Live, L. S.; Dhawan, A.; Masson, J. F., EOT or Kretschmann configuration? Comparative study of the plasmonic modes in gold nanohole arrays. *Analyst* **2012**, *137* (18), 4162-4170.
117. Breault-Turcot, J.; Poirier-Richard, H. P.; Couture, M.; Pelechacz, D.; Masson, J. F., Single chip SPR and fluorescent ELISA assay of prostate specific antigen. *Lab Chip* **2015**, *15* (23), 4433-4440.
118. Enderlein, J., Single-molecule fluorescence near a metal layer. *Chemical Physics* **1999**, *247* (1), 1-9.
119. Caruso, F.; Niikura, K.; Furlong, D. N.; Okahata, Y., 1. Ultrathin Multilayer Polyelectrolyte Films on Gold: Construction and Thickness Determination. *Langmuir* **1997**, *13* (13), 3422-3426.
120. Guo, Y. M.; Geng, W.; Sun, J. Q., Layer-by-Layer Deposition of Polyelectrolyte-Polyelectrolyte Complexes for Multilayer Film Fabrication. *Langmuir* **2009**, *25* (2), 1004-1010.
121. Zhegalova, N. G.; He, S.; Zhou, H.; Kim, D. M.; Berezin, M. Y., Minimization of self-quenching fluorescence on dyes conjugated to biomolecules with multiple labeling sites via asymmetrically charged NIR fluorophores. *Contrast Media Mol. I.* **2014**, *9* (5), 355-62.
122. Liu, C.-M.; Xiong, R.-G.; You, X.-Z.; Chen, W.; Kristjánssdóttir, Á. G.; Matsson, O.; Mikkelsen, K. V.; Senning, A., Crystal Structures and Luminescence Spectra of Transition Metal Complexes of Rhodamine 6G: R<sub>2</sub>[CuCl<sub>4</sub>].3H<sub>2</sub>O and R<sub>2</sub>[MnCl<sub>4</sub>].(EtOH)<sub>1/2</sub> [R = 9-(2-Ethoxycarbonyl)phenyl-3,6-bis(ethylamino)-2,7-dimethylxanthylium]. *Acta Chem. Scand.* **1998**, *52*, 883-890.
123. Hahn, J. H.; Soper, S. A.; Nutter, H. L.; Martin, J. C.; Jett, J. H.; Keller, R. A., Laser-Induced Fluorescence Detection of Rhodamine-6G at 6 × 10<sup>-15</sup> M. *Appl. Spectrosc.* **1991**, *45* (5), 743-746.

