

Université de Montréal

Quantification des immunoglobulines A par résonance des plasmons de surface pour identifier les
individus IgA-déficients

Par

Caroline Dubois

Département de chimie à l'Université de Montréal, Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Maîtrise
en chimie, option analytique

Décembre 2023

© Caroline Dubois, 2023

Université de Montréal

Unité académique : département de chimie/Université de Montréal/Pavillon MIL, Faculté des arts
et des sciences / Université de Montréal

Ce mémoire intitulé

**Quantification des immunoglobulines A par résonance des plasmons de surface pour
identifier les individus IgA-déficients**

Présenté par

Caroline Dubois

A été évalué(e) par un jury composé des personnes suivantes

Karen Waldron

Président-rapporteur

Jean-François Masson

Directeur de recherche

Pierre Chaurand

Membre du jury

Résumé

Le but de ce projet, en collaboration avec Héma-Québec, était de développer une méthode point de service (POC) pour la quantification des immunoglobulines A (IgA) dans un petit volume de plasma humain. Les IgA jouent un rôle important au niveau de notre système immunitaire, surtout au niveau des bio fluides sur les muqueuses comme la salive. On peut les retrouver normalement dans le plasma à des concentrations plus grandes que 2000 ng/mL pour la majorité des gens. Dans le cas d'une personne immunosupprimée, une concentration plus basse que 500 ng/mL est observée. La déficience en IgA est souvent associée à des maladies auto-immunes comme la maladie de Crohn. Ces individus peuvent éprouver un choc anaphylactique à la suite d'une transfusion de sang, ce qui nous motive à utiliser la résonance des plasmons de surface (SPR) sur place à des collectes de sang et dans les milieux hospitaliers.

Pour réaliser ce capteur d'immunodéficience en IgA, un anticorps primaire spécifique aux IgA fut lié à un peptide formant une monocouche auto-assemblée sur une surface d'or du capteur SPR. Un deuxième anticorps a été utilisé pour quantifier spécifiquement cet analyte dans une matrice humaine complexe. Plusieurs étapes ont été optimisées pour obtenir une limite de détection basse, soit l'étape d'immobilisation de l'anticorps de capture, le type d'anticorps, le pH pour l'immobilisation, la détection secondaire, la validation dans différentes matrices biologiques, parmi d'autres. Le capteur a été validé avec quelques échantillons cliniques et la réponse SPR fut comparée avec ELISA. Ainsi, nous anticipons que cette méthode pourrait être utile à des collectes de sang pour assurer les réserves de sang déficient en IgA.

Mots-clés : SPR, IgA, déficience en IgA, Point de service (POC), collectes de sang, immunosuppression, choc anaphylactique, plasma, chimie surface, plasmonique

Abstract

The goal of this project, in collaboration with Héma-Québec, was to develop a point-of-care (POC) method to quantify immunoglobulin A (IgA) in a small volume of human plasma. Immunoglobulin A play an important role in immunity, specifically in biofluids on mucosae like saliva. It can generally be found in plasma at concentrations higher than 2000 ng/mL for most people. In the case of an immunosuppressed individual, a concentration under 500 ng/mL is observed. IgA-deficiency is often associated with autoimmune diseases, such as Crohn's disease. These individuals may experience an anaphylactic shock following a blood transfusion, which motivated us to use surface plasmon resonance (SPR) on site at blood drives and in a hospital setting.

SPR quantifies the interactions between biomolecules. It is a complementary technique to ELISA that can test more rapidly individuals susceptible of being IgA-deficient in a hospital setting or at blood drives. To develop an IgA SPR sensor, a specific capture antibody to IgA was bound to a peptide monolayer on the gold surface. A second antibody was used to specifically quantify IgA in a complex matrix. Multiple steps were optimized to achieve the low detection limits required for IgA detection, such as the capture antibody immobilisation step, type of antibody, pH of immobilisation buffer, secondary detection, validation in different biological matrices, among others. The SPR sensor was validated with a few clinical samples, and compared to ELISA, to demonstrate the potential. As such, we envision that this rapid method may be used at blood drives to ensure sufficient reserves of IgA-deficient blood.

Keywords: SPR, IgA, IgA deficiency, Point-of-Care (POC), plasma, blood drives, immunosuppression, anaphylactic shock, surface chemistry, plasmonics

Table des matières

Résumé	I
Abstract	II
Table des matières	III
Liste des figures	V
Liste des sigles et abréviations	VIII
Remerciements	VIII
Chapitre 1 : Introduction	1
IgA/transfusion	1
Défi	5
La résonance des plasmons de surface	7
Objectifs	20
Chapitre 2 : A portable surface plasmon resonance (SPR) sensor for the detection of Immunoglobulin A in plasma	23
Abstract	24
Background/Objective:	24
Study Design/Methods:	24
Results/Findings:	24
Discussion:	25
Introduction	25
Materials and methods	27
Method overview	27
Preparation of the SPR gold prisms	29
Construction of the IgA biosensor	29

Sample measurements	30
Spiked sample measurements.....	31
Sample preparation.....	31
ELISA.....	31
Statistical analyses.....	32
Results	33
Immobilization of the primary antibody and pH optimization	33
Initial calibration	33
Calibration in plasma	35
Clinical samples	35
Performance with IgA concentrations near the threshold	37
Discussion	39
Limitations	40
Conclusion.....	42
Acknowledgements	42
Conflict of interest.....	42
Supporting information	43
Conclusions et perspectives	47
Références bibliographiques	49

Liste des figures

- Figure 1** Les différentes structures des IgA (gauche) avec un schéma plus détaillé de la forme sécrétrice dimérisé qui peut se retrouver dans le plasma (droite). Adapté avec permission de la référence 4; Copyright 2001 Springer Nature2
- Figure 2** Les différentes fonctions des IgA au niveau cellulaire pour bloquer les infections (a) neutralisation des bactéries et des virus (b) chaînes liées pour bloquer les interactions des bactéries et des virus (c) interaction avec la surface des protéines sur les bactéries pour influencer leurs fonctions (d) augmentation des réponses due au IgA sur les plaques de Peyer (e) la liaison des bactéries aux muqueuses. Adapté avec permission de la référence 8; Copyright 2021 Annual Reviews.....3
- Figure 3** La concentration d'IgA dans le sérum dans une population générale adulte (gauche) et par groupe d'âge et sexe (droite). Adapté avec permission de la référence 3; Copyright 2007 Oxford University Press4
- Figure 4** Diagramme de la procédure de décision sur les tests de IgA et d'anti-IgA produit par la Société Canadienne du sang. (Gris-Situation ou résultats; Turquoise-Questions directives; Rouge-Tests ou conseils pour arriver à une décision)5
- Figure 5** Représentation de (A) la SPR propagatrice et (B) la SPR localisée. Adapté avec permission de la référence 42; Copyright 2020 Royal Society of Chemistry8
- Figure 6** Impact de l'épaisseur de l'or sur le prisme sur le plasmon de surface (a) et sur la variation des mesures selon l'épaisseur du film d'or (b). Adapté avec permission de la référence 38; Copyright 2000 Elsevier9
- Figure 7** Représentation graphique du phénomène de la SPR (a) la condition de résonance qui implique l'atténuation du moment de la lumière (b) la courbe SPR obtenue avec la réflectivité et l'angle (ou la longueur d'onde) en polarisation p.9
- Figure 8** Les différentes possibilités pour le fonctionnement des appareils SPR; (a) monochromatique (b) polychromatique (c) Imagerie avec la variation de l'intensité de la lumière. Adapté avec permission de la référence 40; Copyright 2009 Humana Press..... 12
- Figure 9** Quelques exemples d'instruments SPR portables : (a) instrument SPREETA avec système de pompe intégré; (b) instrument polychromatique portable; (c) un système SPR relié à un

téléphone intelligent; (d) SPR sur fibre optique. Adapté avec permission de la référence 42; Copyright 2020 Royal Society of Chemistry12

Figure 10 Représentation schématique et graphique de l'interaction entre un récepteur et l'analyte.....14

Figure 11 Les signaux SPR observés dans des conditions de saturation en analyte, à l'équilibre et de faible concentration. Adapté avec permission de la référence 33; Copyright 2017 Royal Society of Chemistry15

Figure 12 Les différentes étapes observées en SPR (1) ligne de base (2) association (3) dissociation (4) régénération. Adapté avec permission de la référence 33; Copyright 2017 Royal Society of Chemistry17

Figure 13 Schématique de la réaction d'activation d'un acide carboxylique avec EDC/NHS pour une liaison covalente avec un amine (anticorps de capture). Adapté avec permission de la référence 51; Copyright 2010 American Chemical Society.....19

Figure 14 La distribution des produits IgA-déficients obtenu par Héma-Québec. Adapté avec permission de la référence 17; Copyright 2010 Wiley.....22

Figure 15 Representation of the SPR protocol. **(A)** Illustration of the different steps. To begin, buffer is injected (the stabilization phase). IgA in the sample is added and binds to the antibodies (the association phase). Buffer is injected a second time to remove interferents (the dissociation phase). A secondary antibody is then added and interacts with IgA (the secondary detection phase). Glycine is then injected to release IgA from the primary antibodies (the regeneration phase). This is followed by a wash with buffer to return to the baseline. **(B)** Illustration of the principles of SPR. A polarizer lets light penetrate with the right orientation (p polarization) onto the gold surface, creating an evanescent wave and exciting the surface plasmon. The molecules binding on the surface will affect the surface plasmon and change how light is reflected, thus permitting accurate quantification of analytes.28

Figure 16 Calibration curves of IgA with the secondary detection (a) in PBS supplemented with 0.1% BSA and 0.005% Tween20 (b) in immunoglobulin-depleted human serum (c) in IgA-deficient plasma (negative reference) diluted 1:1 with buffer (d) in IgA-deficient plasma (negative reference) diluted 1:4 with buffer. All calibrations were carried out with IgA concentrations ranging between 62.5 ng/mL to 2000 ng/mL, except for that in 1:1 diluted IgA-deficient plasma (0 to 2000 ng/mL, in (c)).34

Figure 17 Representative signals obtained during the 15-minute secondary detection for a normal plasma sample and an IgA-deficient plasma sample36

Figure 18 IgA-deficient samples (i.e., negative reference, and samples #1-4) and normal samples (positive reference, samples #5-6) tested with the optimized SPR protocol.....36

Figure 19 Signals obtained for IgA-deficient plasma samples spiked with 400, 500, 600 and 1000 ng/mL of IgA. Representative binding curves are shown on the right of each panel, and the ratios obtained (vs. the sample spiked with 500 ng/mL) are shown on the left (blue dotted line represents the error on the 500 ng/mL measurement). (A) sample #7 (B) sample #8 (C) sample #9.....38

Liste des sigles et abréviations

Ig : Immunoglobulines (*Immunoglobulin 's*)

SIg : Immunoglobulines sécrétrices (*Secretory immunoglobulins*)

IgG : Immunoglobulines G (*Immunoglobulin G*)

IgM : Immunoglobulines M (*Immunoglobulin M*)

IgE : Immunoglobulines E (*Immunoglobulin E*)

IgA : Immunoglobulines A (*Immunoglobulin A*)

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

POC : Point de service (*Point-of-Care*)

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

LOD : Limite de détection (*Limit of detection*)

ELISA: Dosage immuno-enzymatique (*Enzyme-linked immunosorbent assay*)

k_x : Vecteur d'onde de la lumière en x (*Wave vector of light in x*)

k_0 : Vecteur d'onde de la lumière (*Wave vector of light*)

η_D : Indice de réfraction du prisme (*Refractive index of prism*)

θ_{inc} : Angle d'incidence (*Angle of incidence*)

k_{sp} : Vecteur d'onde du plasmon de surface (*Wave vector of surface plasmon*)

ϵ_m : Constante diélectrique du métal (*Dielectric constant of the metal*)

ϵ_s : Constante diélectrique de la solution (*Dielectric constant of the solution*)

η_s : Indice de réfraction de la solution (*Refractive index of the solution*)

λ : Longueur d'onde (*Wavelength*)

θ : Angle de la lumière (*Angle of light*)

R : Réflectivité (*Reflectivity*)

I_p : Intensité de la lumière en polarisation p (*Intensity of light in polarization p*)

I_s : Intensité de la lumière en polarisation s (*Intensity of light in polarization s*)

V_{ads} : Vitesse d'adsorption (*Adsorption speed*)

k_{ads} : Constante d'adsorption (*Adsorption constant*)

c_a : Concentration de l'analyte (*Concentration of analyte*)

θ_a : Fraction de la surface couverte avec l'analyte (*Fraction of the surface covered with the analyte*)

v_{des} : Vitesse de désorption (*Desorption speed*)

k_{des} : Constante de désorption (*Desorption constant*)

$\Delta\lambda_{SPR}$: Signal SPR (*SPR signal*)

K : Constante thermodynamique (*Thermodynamic constant*)

C : Concentration totale (*Total concentration*)

$\Delta\lambda_{SPR,sat}$: Signal SPR à saturation (*SPR signal at saturation*)

Γ : Concentration à la surface (*Surface concentration*)

ρ : densité de l'analyte (*Density of analyte*)

l_d : distance de pénétration (*Penetration distance*)

m : Pente de la courbe (*Curve slope*)

b : Ordonnée à l'origine (*Y intercept*)

η_a : Indice de refraction de l'analyte (*Refractive index of analyte*)

η_s : Indice de refraction de la solution (*Refractive index of the solution*)

RU : Unité de réfraction (*Refractive unit*)

$SD(0)$: Écart-type des blancs (*Standard deviation of blanks*)

LOD : Limite de detection (*Limit of detection*)

PPP : Plasma pauvre en plaquettes (*Platelet-poor plasma*)

Rxn : Réaction (*Reaction*)

Rxns : Réactions (*Reactions*)

SPW : Vague du plasmon de surface (*Surface plasmon wave*)

RI : Indice de réfraction (*Refractive index*)

ΔR : Variation du signal SPR (*variation of the SPR signal*)

3MPA : Acide 3-mercaptopropionique (*3-Mercaptopropionic acid*)

BSA : Albumine de sérum bovin (*Bovine serum albumin*)

R_{\max} : Signal SPR à saturation (*Saturated SPR signal*)

R_{eq} : Signal SPR à l'équilibre (*SPR signal at equilibrium*)

K_D : Constante de dissociation (*Dissociation constant*)

LFA : Test immunochromatographique (*Lateral flow assay*)

SERS : Spectroscopie Raman amplifié en surface (*Surface-enhanced Raman spectroscopy*)

GLEIA : Immunoessai électrochimique lié à l'or (*Gold-Linked Electrochemical Immunoassay*)

ω : Fréquence angulaire (*Angular frequency*)

ω_p : Fréquence du plasma (*Plasma frequency*)

β : Angle de réfraction de la lumière (*Refraction angle of light*)

Je dédie cet ouvrage à mes parents
Mes supports tout au long de mes études

Remerciements

J'aimerais exprimer ma reconnaissance envers toutes les personnes qui ont rendu la réalisation de ce projet et de mon mémoire de maîtrise possible.

En premier lieu, j'aimerais adresser mes sincères remerciements à mon directeur de recherche, **Jean-François Masson**, pour m'avoir donné la chance de faire partie de son groupe. Son support et son expertise ont su m'orienter dans la bonne direction et parfaire mes connaissances.

Je suis entièrement reconnaissante à ma famille et mes proches qui m'ont permis et encouragés à suivre ce chemin. Merci à mes parents pour m'avoir inculqué l'importance de trouver ma passion.

Je tiens aussi à remercier tous mes collègues dans le groupe de recherche. J'aimerais souligner **Malama Chisanga, Gregory Wallace, Abdelhadi Djaïleb** et **Benjamin Charron** pour leur introduction au laboratoire et leur aide sur la SPR.

Je souhaite exprimer ma gratitude envers tout l'équipe de Héma-Québec pour m'avoir chaleureusement accueilli et permis de conclure mon projet, en particulier **Danny Brouard**, mon co-directeur de recherche, et **Jonathan Robidoux**. Merci à vous pour m'avoir aidé au travers des parties difficiles de mon projet. J'apprécie le temps que vous avez pris pour me partager vos connaissances. Un gros merci à **Samuel Rochette** pour m'avoir appris beaucoup sur la rédaction d'un article. Merci à **Stanko Josimov** pour l'aide sur certaines infographies.

Enfin, je souhaite remercier toutes les personnes qui m'ont apporté du soutien et qui ont contribué, d'une manière ou d'une autre, à la réalisation et la réussite de ce mémoire.

Chapitre 1 : Introduction

IgA/transfusion

Les immunoglobulines sécrétrices (SIg) englobent les immunoglobulines G, M, E et A. Chaque type de SIg ont leurs fonctions propres lors d'une infection^{1,2}. Les immunoglobulines G (IgG) sont les SIg qui sont présentes en plus grande quantité dans le corps humain et activent le système complémentaire^{1,3}. Les immunoglobulines M (IgM) sont les premières immunoglobulines à être exprimés lors du développement des cellules B et sont en première ligne pour les réponses immunitaires². Les immunoglobulines D (IgD) sont présentes en petite quantité et leur fonction n'est pas claire. Cependant, elles joueraient un rôle dans l'inhibition de pathogènes spécifiques avec l'interaction de leur protéine comme la *Moraxella catarrhalis*². Les immunoglobulines E (IgE) sont responsables de certaines réactions allergiques, l'asthme et la réponse à des infections par des vers parasites². Bien que tous ces protéines soient importantes pour le bon fonctionnement de notre corps, les immunoglobulines A (IgA) sont présentes en plus grandes quantités dans les bio fluides sur les muqueuses comme la salive et peut donner une idée plus générale sur le fonctionnement du système immunitaire pour un individu puisqu'elles ont un impact direct sur la neutralisation des bactéries et virus^{1,2,3,4,5}.

Les immunoglobulines A (IgA) jouent un rôle important dans l'immunité mucoale et peuvent se retrouver dans les larmes, la salive, le plasma et autres (gastro-intestinal, urogénital and respiratoire)^{6,7,8}. L'absence des IgA est relié à une augmentation d'infections mucoales. Les IgA peuvent se retrouver sous plusieurs structures : monomérique, dimérique et dimérique sécrétrice^{3,4,5,9}. Dans le plasma et les muqueuses, on retrouverait principalement la structure dimérisée sécrétrice qui est composé de deux chaines lourdes relié par une chaine J, quatre chaines

légères (deux sur chaque chaînes lourdes) et une composante sécrétrice illustrée par un S (**Figure 1**).

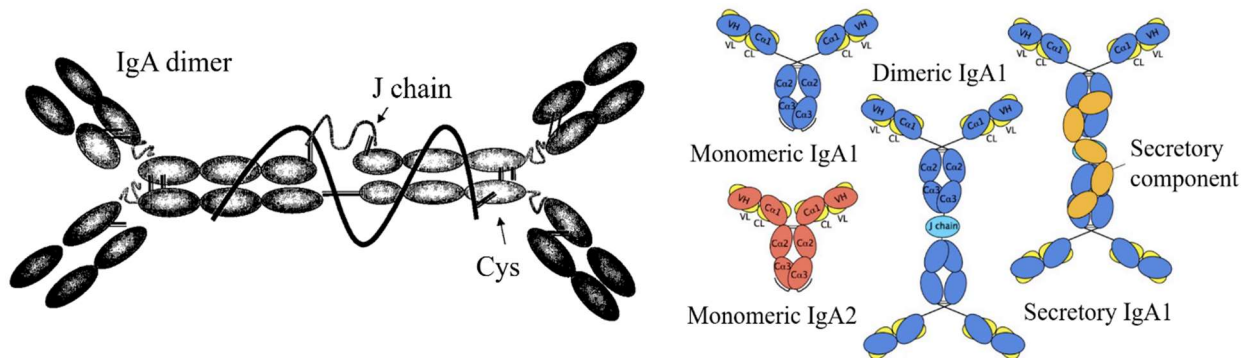


Figure 1 Les différentes structures des IgA (gauche) avec un schéma plus détaillé de la forme sécrétrice dimérisé qui peut se retrouver dans le plasma (droite). Adapté avec permission de la référence 4; Copyright 2001 Springer Nature

Plus précisément, les IgA ont des mécanismes permettant de bloquer ou de modifier les fonctions des bactéries et des virus^{2,8} (**Figure 2**). Tout d’abord, les IgA vont neutraliser les bactéries et les virus en les empêchant d’interagir avec l’hôte. Par exemple, les IgA peuvent prévenir la diarrhée en se liant aux sites actifs des enzymes de pathogènes comme *Escherichia coli* pour prévenir leur interaction avec la flore intestinale⁸. En effet, les IgA contribuent non seulement à l’immunité mucoale, mais aussi à garder un microbiome en santé. Aussi, au lieu d’interagir directement avec les pathogènes, elles peuvent créer des chaînes entre elles pour empêcher le passage des bactéries et induire leur agglutination. Il est plus facile pour les intestins d’évacuer les bactéries sous leur forme agglutinée⁸. Ensuite, elles peuvent venir se lier aux protéines sur les bactéries et modifier leur fonction, donc la bactérie ne peut plus nuire au système immunitaire. Ces modifications sont faites au niveau transcriptionnel, donc vont altérer l’expression des protéines à la surface des bactéries. De plus, leur interaction avec les plaques de Peyer augmente les réponses

des IgA et augmente la capture des bactéries par les cellules M. Ceci est fait par transcytose médiée par un récepteur à la surface des plaques de Peyer, augmentant la fonction des IgA et l'affinité avec les pathogènes^{2,8}. Enfin, les IgA peuvent se lier aux bactéries et aux muqueuses en même temps, réduisant leur transport et leurs interactions.

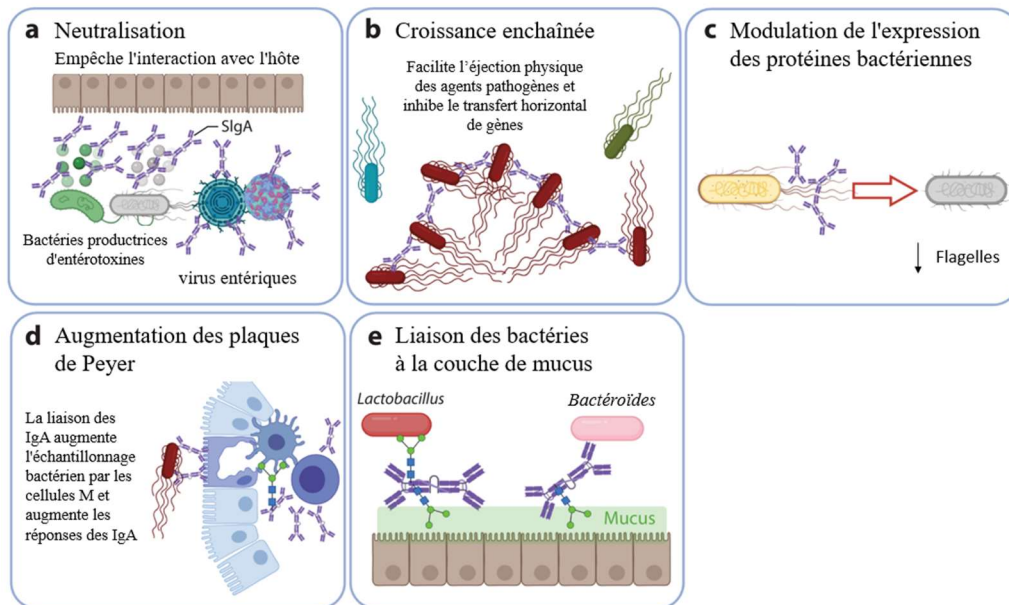


Figure 2 Les différentes fonctions des IgA au niveau cellulaire pour bloquer les infections (a) neutralisation des bactéries et des virus (b) chaînes liées pour bloquer les interactions des bactéries et des virus (c) interaction avec la surface des protéines sur les bactéries pour influencer leurs fonctions (d) augmentation des réponses due au IgA sur les plaques de Peyer (e) la liaison des bactéries aux muqueuses. Adapté avec permission de la référence 8; Copyright 2021 Annual Reviews

La déficience en IgA est définie par une concentration plasmatique plus basse que 500 ng/mL (plus grande que 2000 ng/mL normalement et en moyenne 2×10^6 ng/mL, **Figure 3**)^{3,10,11} et est causée notamment par des maladies auto-immunes, comme la maladie de Crohn, des

allergies sévères, certaines infections et des maladies inflammatoires^{4,9,12,13,14}. Au-dessus d'une concentration de 2000 ng/mL, il n'est plus nécessaire de suivre l'individu puisqu'il n'est pas considéré IgA déficient et à risque d'un choc anaphylactique. Cette condition peut être identifiée pour 0.1%–0.5% de la population générale et pour 0.03%–0.25% de donneurs de sang en santé^{4,15}. Par contre, ces individus sont normalement asymptomatiques^{4,16}, donc ils ne sont pas au courant de leur condition. Ainsi, ils sont à risques de subir un choc anaphylactique sévère lors d'une transfusion de sang.

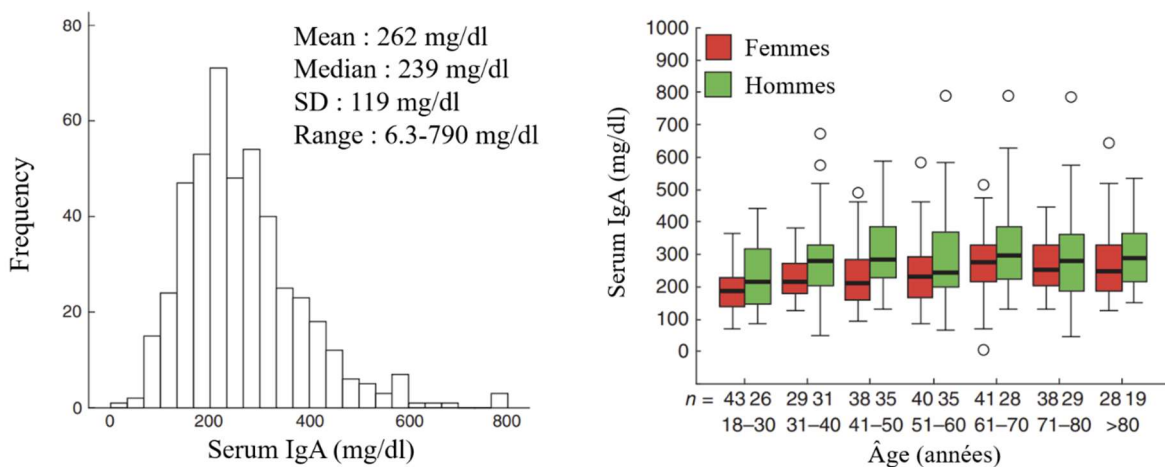


Figure 3 La concentration d'IgA dans le sérum dans une population générale adulte (gauche) et par groupe d'âge et sexe (droite). Adapté avec permission de la référence 3; Copyright 2007 Oxford University Press

Les chocs anaphylactiques chez les individus IgA déficients sont potentiellement causés par la présence d'anti-IgA dans leur sang^{10,11,17}. En 1968, 17% des transfusés étaient IgA-déficient et ont testés positifs pour des anti-IgA¹¹. En 2015, la présence d'anti-IgA fut rapporté dans le sang de seulement 1 individu sur 1200¹⁰. Typiquement, les réactions anaphylactiques sont causées par une incompatibilité sanguine, comme le groupe de sang. Dans ce cas-ci, lors d'une transfusion, ce serait causé par un gros volume de sang incompatible puisqu'il est plus riche en IgA par rapport au

sang du récipient. Aussi, la différence au niveau des globules blanches, l'âge du patient et son historique médical pourrait le mettre plus à risque de subir une réaction anaphylactique^{10,17,18}. Ainsi, l'accent est mis sur la reconnaissance des symptômes et sur une intervention rapide. Un algorithme permet d'identifier les patients qui peuvent être à risque et les tests sont adaptés en fonction¹⁹ (**Figure 4**). Par contre, en identifiant les donneurs de sang IgA-déficient, des réserves de sang déficient en IgA peuvent être constituées pour éviter de transfuser du sang non-compatible. Ceci réduirait les chances que les patients immunosupprimés vivent un choc anaphylactique.

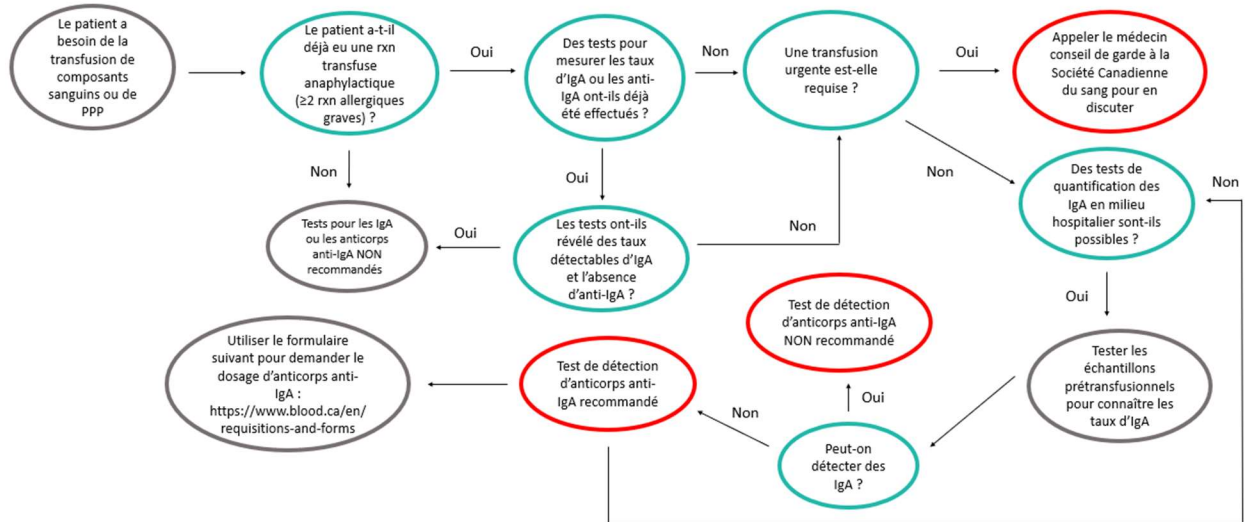


Figure 4 Diagramme de la procédure de décision sur les tests de IgA et d'anti-IgA produit par la Société Canadienne du sang. (Gris-Situation ou résultats; Turquoise-Questions directives; Rouge- Tests ou conseils pour arriver à une décision)

Défi

Tel que démontré dans la section précédente, la détection des IgA peut avoir une grande importance dans le milieu clinique. Par exemple, les banques de sang peuvent faire un test sur les échantillons de sang qui sont potentiellement IgA-déficient, leur permettant de maintenir des

réserves de sang et un registre de donneurs IgA-déficient^{15,17}. Également, un patient ayant besoin d'une transfusion de sang urgente peut être testé pour la déficience en IgA, s'il présente une possibilité d'avoir cette condition. Ceci pourrait prévenir un choc anaphylactique^{16,17,18,20,21}. Ces tests peuvent être faits directement à l'hôpital ou dans une banque de sang (s'il y a un manque de ressources). Les IgA sont normalement déterminés, entre autres, par immunoessais comme le dosage immuno-enzymatique (ELISA), buvardage Western, par test immunologique électrochimique lié à l'or (GLEIA), par cytométrie, par test turbidométrique et par néphélométrie^{22,23,24,25,26,27,28}. Cet analyte peut aussi être déterminer par immunoessai électrochimique, électrophorèse sur gel, spectroscopie Raman amplifié en surface (SERS), par fluorescence et avec des nanoparticules sur une membrane LFA²⁹.

Les banques de sang, comme Héma-Québec, vont typiquement quantifier les IgA par dosage immuno-enzymatique (ELISA). Par contre, cette méthode prend un minimum de 24h pour obtenir un résultat, requiert un spécialiste et peut être difficilement adapté pour être fait en mode point-of-care (POC). Une méthode POC doit être rapide, précise, spécifique, mobile et peu coûteuse, pour qu'un travailleur de la santé de première ligne puisse l'utiliser avec une formation appropriée^{30,31}. De plus, cette méthode doit être très sensible et robuste aux variations biologiques dans des échantillons complexes. Par exemple, il n'est pas rare de retrouver des échantillons de sang et de plasma lipémiques, ceux-ci présentant des caractéristiques moléculaires différentes grâce à la haute concentration de lipides, ce qui peut induire un effet de matrice dans les mesures. Cette problématique nous encourage à développer un protocole avec une méthode plus adaptée aux besoins de POC comme la résonance des plasmons de surface.

La résonance des plasmons de surface

La résonance des plasmons de surface (SPR) est une méthode qui est typiquement utilisée pour étudier les interactions entre biomolécules^{32,33,34,35,36,37,38,39,40,41}. Il y a deux types de spectroscopies SPR : la résonance des plasmons de surface propagatrice et la SPR localisée (**Figure 5**). En premier, la SPR propagatrice a lieu sur un film d'or à la surface d'un prisme. En fait, la lumière polarisée, qui est composée d'une composante électrique et magnétique, sera en réflexion totale interne avec un angle ou une longueur d'onde spécifique. Le champ évanescent de la composante électrique (perpendiculaire à la surface) va pénétrer la couche d'or et va venir exciter les électrons à la surface (attirés et répulsés). L'oscillation collective des électrons induit une résonance, soit le plasmon de surface. Avec une distance de pénétration d'environ 200 nm, le plasmon de surface est affecté par son environnement, donc une interaction entre biomolécules (ajout de masse et changement d'indice de réfraction) changera l'angle ou la longueur d'onde de résonance, mesurée par un détecteur. La résonance des plasmons de surface localisée implique l'oscillations induite par la lumière des électrons dans les nanoparticules qui sont plus petite que la longueur d'onde de la lumière (typiquement de 10 à 100 nm).

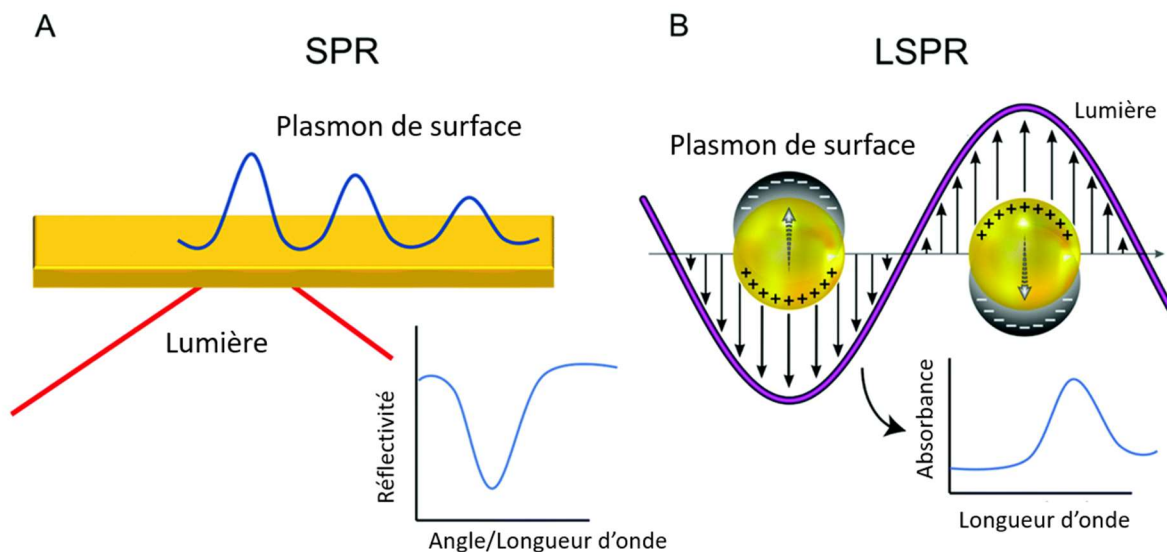


Figure 5 Représentation de (A) la SPR propagatrice et (B) la SPR localisée. Adapté avec permission de la référence 42; Copyright 2020 Royal Society of Chemistry

L'excitation directe des électrons est possible pour les nanoparticules (la SPR localisée), mais pour obtenir un plasmon à la surface d'un film de métal, il faut respecter quelques critères. En premier, la constante diélectrique du métal doit être négative pour avoir une continuité de champ électrique, ce qui est le cas pour l'or et l'argent. L'épaisseur du film de métal doit aussi être considérée³⁸, puisque s'il est trop épais le plasmon n'aura pas lieu, car les électrons ne peuvent pas être excités. S'il est trop mince le plasmon sera plus atténué, car le champ sera compressé résultant à une moins bonne propagation (**Figure 6**).

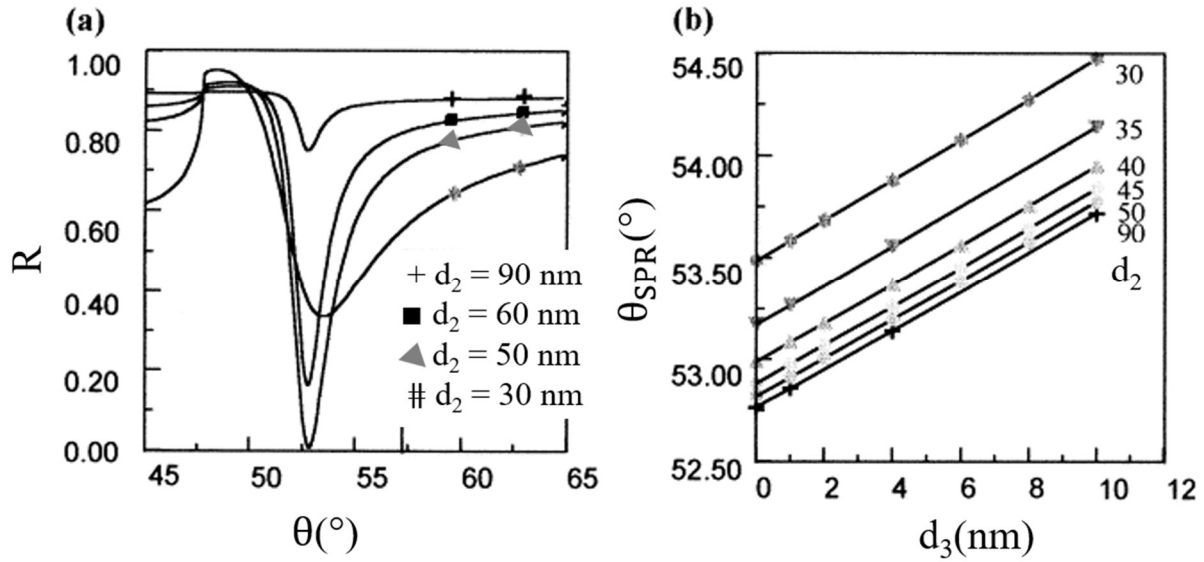


Figure 6 Impact de l'épaisseur de l'or sur le prisme sur le plasmon de surface (a) et sur la variation des mesures selon l'épaisseur du film d'or (b). Adapté avec permission de la référence 38; Copyright 2000 Elsevier

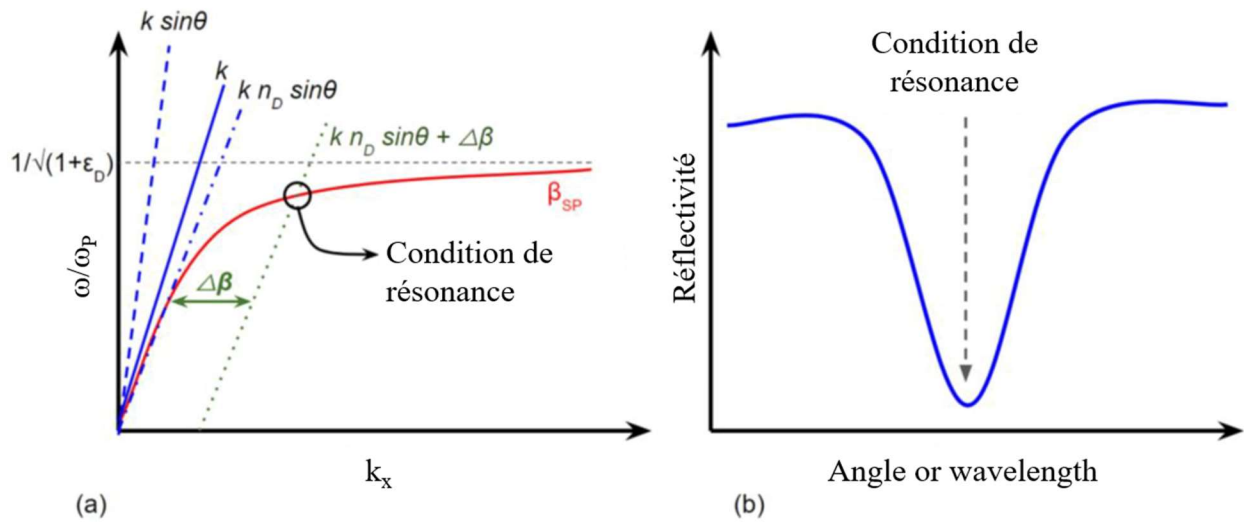


Figure 7 Représentation graphique du phénomène de la SPR (a) la condition de résonance qui implique l'atténuation du moment de la lumière (b) la courbe SPR obtenue avec la réflectivité et l'angle (ou la longueur d'onde) en polarisation p.

Aussi, l'excitation du plasmon de surface dépend de l'égalité entre le vecteur d'onde de la lumière en x (k_x) (Eqn 1) et le vecteur du plasmon de surface k_{sp} (Eqn 2), puisque la lumière ne croise jamais le plasmon de surface. Le vecteur d'onde de la lumière sur l'axe des x (lumière polarisée p) dépend de l'indice de réfraction du prisme (η_D), le vecteur d'onde de la lumière (k_0) et l'angle d'incidence (θ_{inc}). Un matériau avec un haut indice de réfraction (milieu de propagation diélectrique) permet que la lumière en réflexion totale interne ait un vecteur d'onde plus grand (**Figure 7, a**). Ceci réduit le moment de la lumière pour qu'elle croise celui du plasmon. Le vecteur du plasmon de surface dépend des constantes diélectriques réelles et imaginaires (de la solution (ϵ_s) et du métal (ϵ_m)) et du vecteur d'onde de la lumière^{36,38,39,40,41}.

$$k_x = k_0 \eta_D \sin \theta_{inc} \quad (1)$$

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

Ainsi, lorsque l'indice de réfraction de la solution (η_s) changera, il sera possible de voir un changement du comportement de la lumière (Eqn 3), puisque celle-ci sera absorbée.

$$k_{sp} = k_0 \left(\frac{\epsilon_m \eta_s^2}{\epsilon_m + \eta_s^2} \right)^{1/2} \quad (3)$$

$$k_0 = \frac{2\pi}{\lambda} \quad (4)$$

$$k_x = \frac{2\pi}{\lambda} \eta_D \sin \theta \quad (5)$$

Si on combine les équations (Eqn 1) et (Eqn 4), ceci révèle que les seuls facteurs qui peuvent être variés sont la longueur d'onde (λ) et l'angle de la lumière (θ) (Eqn 5). Ainsi, un graphique avec la réflectivité et une de ces variables peut être obtenu (**Figure 7, b**). La réflectivité (R) est calculée avec l'intensité de la lumière en polarisation p (I_p) et s (I_s) (Eqn 6). La polarisation p a lieu lorsque

le champ électrique de la lumière est perpendiculaire à l'interface, tandis que la polarisation s a lieu lorsque le champ magnétique de la lumière est perpendiculaire à la surface d'or. En fait, un polariseur est utilisé pour orienter la lumière pour obtenir 100% de la lumière dans une ou l'autre orientation. Pour exciter les électrons et obtenir un champ évanescent, le champ électrique doit pénétrer la surface et faire osciller les électrons, donc est la polarisation p et est utilisé pour prendre des mesures. Pour obtenir une référence instrumentale, le champ électrique doit être parallèle à la surface pour obtenir aucun champ évanescent, ce qui est défini comme la polarisation s.

$$R = \frac{I_p}{I_s} \times 100 \quad (6)$$

La possibilité de faire varier l'angle et la longueur d'onde explique la variété d'instruments SPR⁴². Il en existe plusieurs, mais les principaux sont les suivants : monochromatique, polychromatique et imagerie (**Figure 8**). Les appareils monochromatiques fonctionnent avec la variation de l'angle, donc des mesures à plusieurs angles doivent être faites pour construire la courbe SPR. Bien qu'ils soient plus précis, ces appareils requièrent normalement des tables stabilisatrices, donc ils sont volumineux et la prise de spectre prend plus de temps puisque plusieurs points doivent être acquis pour construire la courbe de réflectivité SPR et mesurer une variation sur la surface. Les SPR pour faire de l'imagerie (**Figure 8c**) peuvent être fait avec un angle et une longueur d'onde fixes, mais l'intensité de la lumière est variée à des endroits spécifiques à l'interface et capturée par une caméra CCD. Les appareils polychromatiques (**Figure 8b**) utilisent seulement la variation de la longueur d'onde avec un angle fixe. Ceci permet d'avoir un instrument plus petit, portable et les mesures peuvent être effectuées rapidement et suivies en temps réel (**Figure 9**). L'aspect portable de l'instrument est fondamental pour permettre des mesures sur le terrain^{30,42,43}.

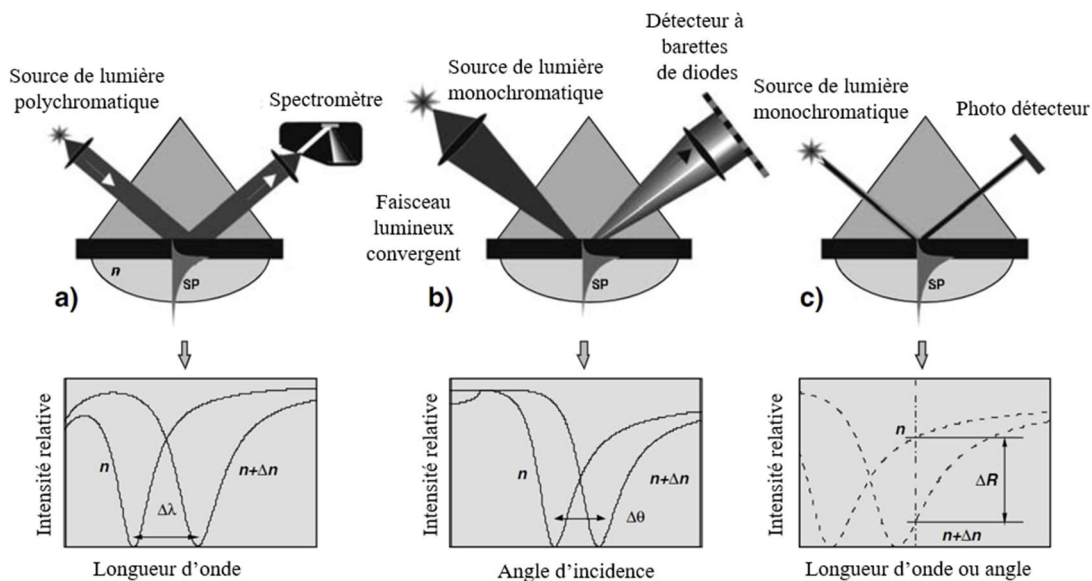


Figure 8 Les différentes possibilités pour le fonctionnement des appareils SPR; (a) monochromatique (b) polychromatique (c) Imagerie avec la variation de l'intensité de la lumière.

Adapté avec permission de la référence 40; Copyright 2009 Humana Press

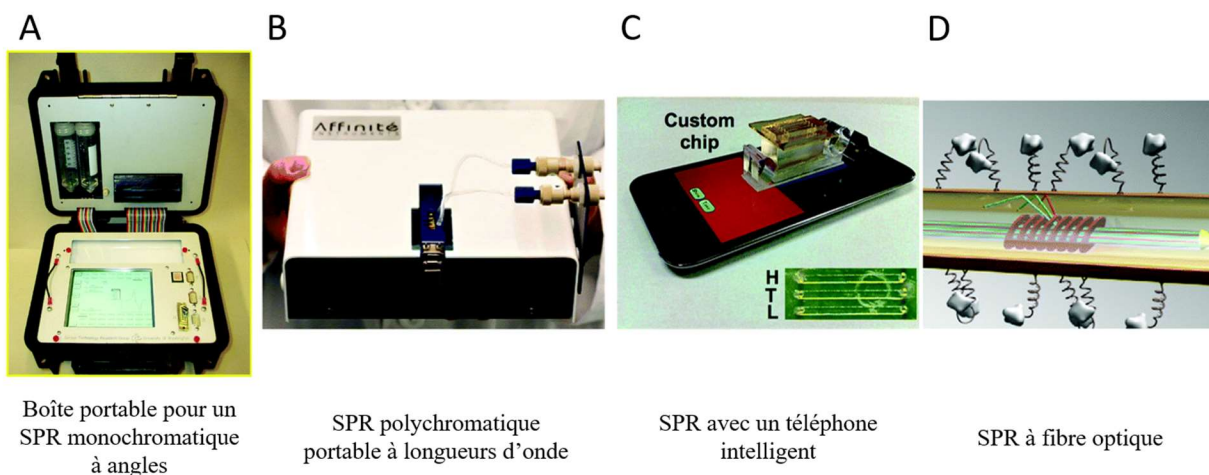


Figure 9 Quelques exemples d'instruments SPR portables : (a) instrument SPREETA avec système de pompe intégré; (b) instrument polychromatique portable; (c) un système SPR relié à un téléphone intelligent; (d) SPR sur fibre optique. Adapté avec permission de la référence 42;

Copyright 2020 Royal Society of Chemistry

Le champ évanescent est affecté par des interactions avec la surface d'or à une distance de pénétration d'environ 200 nm. En effet, même les interactions non-spécifiques (interférentes) peuvent faire varier la réponse SPR (signal parasite), car la technique SPR mesure un changement physique à l'interface et non une signature spectrale moléculaire. Lorsqu'une molécule interagit avec la surface d'or, ceci change l'indice de réfraction, changeant la densité optique à l'interface, donc comment la lumière est réfractée. Alors, en modifiant la surface d'or pour empêcher les interférences, un récepteur va reconnaître spécifiquement l'analyte. Ceci est réalisé en profitant de l'adsorption connue des thiols à la surface d'or où il est possible de la protéger en y déposant un peptide, capable de minimiser les interactions parasites, greffé d'un groupement thiol. L'assemblage de ce peptide est défini comme une monocouche auto-assemblée (SAM) et celle-ci empêchera des interactions directes provenant des injections suivant l'étape de désactivation avec l'éthanolamine et l'étape de blocage avec la BSA (pour bloquer les espaces qui pourraient être disponibles entre les molécules liées à la surface). Des interactions non-désirées ou interactions non-spécifiques peuvent être des anticorps et/ou des biomolécules qui ne sont pas l'analyte. Typiquement, lorsque notre échantillon est une matrice complexe comme du sérum, du plasma, du sang, de l'urine ou de la salive, les biomolécules vont avoir tendance à se coller aux surfaces comme celle d'or et d'interagir avec d'autres molécules. Graphiquement, un déplacement de la courbe SPR vers des longueurs d'onde ou des angles plus élevés devrait être observée (**Figure 10**). Le changement du pic SPR est proportionnel à la quantité d'analyte³⁴.

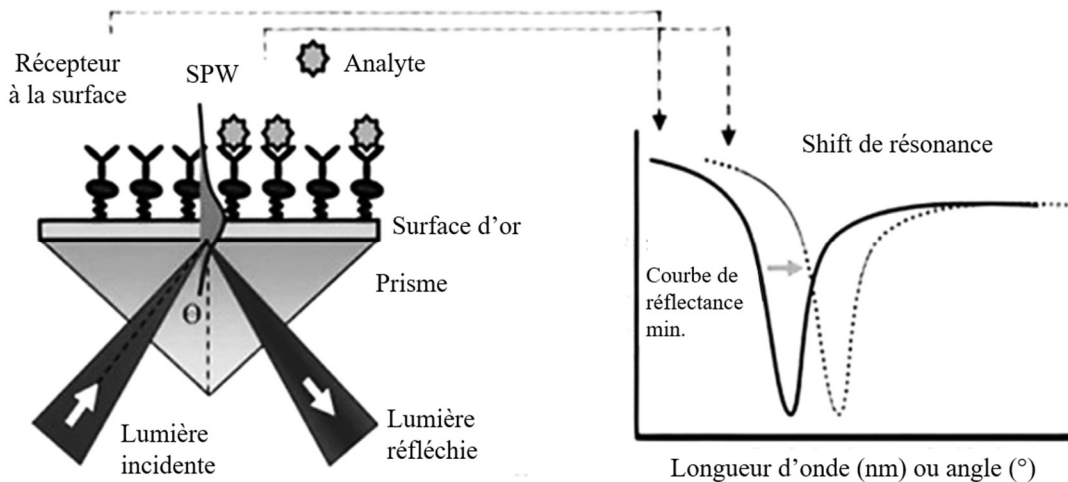


Figure 10 Représentation schématique et graphique de l'interaction entre un récepteur et l'analyte.

La cinétique d'adsorption des molécules à la surface d'or ou entre elles dépend de la vitesse d'adsorption (V_{ads}) (Eqn 7) et de désorption (v_{des}) (Eqn 8) (**Figure 11**). La vitesse d'adsorption est calculée avec la constante d'adsorption (k_{ads}), la concentration de l'analyte (c_a) et la fraction de la surface couverte avec l'analyte (θ_a). La vitesse de désorption est calculée avec la constante de désorption (k_{des}) et la fraction de la surface couverte avec l'analyte (θ_a). Avec une faible concentration d'analyte, on se retrouve dans la zone de faible sensibilité ($c \ll K$). Les premières molécules de l'analyte peuvent interagir avec tous les sites d'interaction. On se retrouve à l'équilibre lorsqu'on se situe dans la zone de haute sensibilité, la zone linéaire ($c \cong k$). À l'équilibre, la vitesse d'adsorption est égale à la vitesse de désorption où on peut distinguer la constante thermodynamique K et la concentration totale C de l'analyte (Eqn 9). Finalement, une réponse SPR saturée ($\Delta\lambda_{SPR,sat}$) est observée lorsque tous les sites d'interactions sont occupés par l'analyte et que le signal analytique plafonne ($c \gg K$). La concentration d'analyte à la surface (Γ)³³ peut être

calculée avec la densité de l'analyte (ρ), la distance de pénétration (ld), l'indice de réfraction de l'analyte (η_a) et de la solution (η_s), la pente de la courbe (m) et le signal SPR ($\Delta\lambda_{SPR}$) (Eqn 10).

$$v_{ads} = k_{ads} C_a(1 - \theta_a) \quad (7)$$

$$v_{des} = k_{des} \theta_a \quad (8)$$

$$\Delta\lambda_{SPR} = \frac{KC}{1 + KC} \times \Delta\lambda_{SPR,sat} \quad (9)$$

$$\Gamma = \rho \left(\frac{-ld}{2} \right) \ln \left(1 - \frac{\Delta\lambda_{SPR}}{m(n_a - n_s)} \right) \quad (10)$$

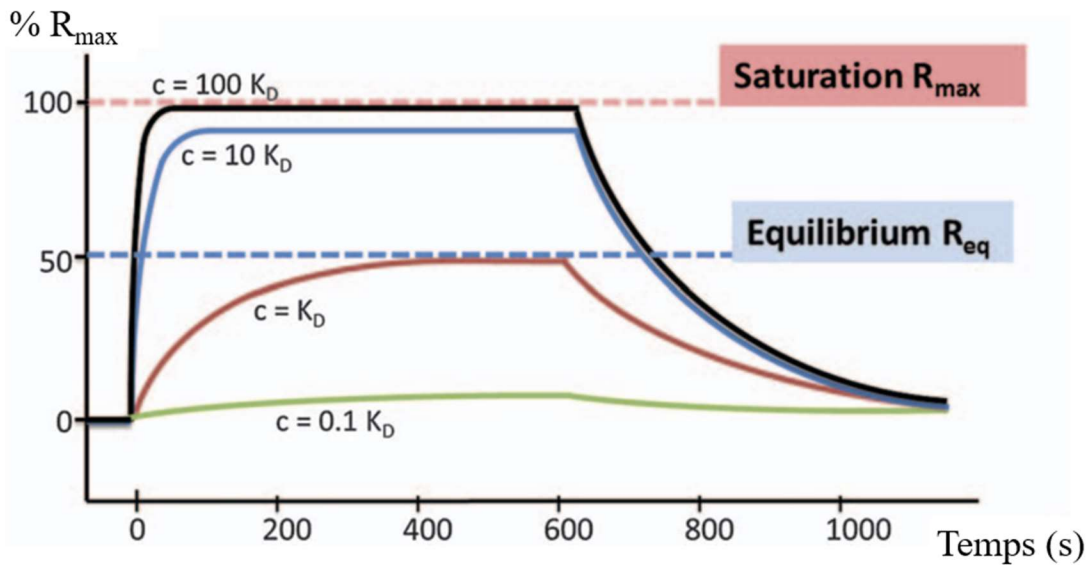


Figure 11 Les signaux SPR observés dans des conditions de saturation en analyte, à l'équilibre et de faible concentration. Adapté avec permission de la référence 33; Copyright 2017 Royal Society of Chemistry

Les étapes principales d'une expérience en SPR sont les suivantes³³ : la mesure du signal de fond, l'étape d'association (analyte-récepteur), l'étape de dissociation et la régénération (**Figure**

12). En premier, le signal de fond, qui établit la ligne de base, est mesuré en l'absence de l'analyte, donc le bruit de fond de l'instrument vient de la présence du récepteur lié à la surface dans une solution tampon (**Figure 12, étape 1**). Ensuite, l'étape d'association dès l'introduction de l'analyte est représentée par un signal croissant (**Figure 12, étape 2**). Il n'est pas anormal de voir un pic lors de l'injection à cause du changement de pression dans les canaux de la cellule microfluidique causé par l'injection. Ce pic peut être négligé en autant qu'il l'est pour toutes les mesures. L'étape de dissociation est normalement observée à la suite d'un lavage (**Figure 12, étape 3**). Cette étape permet d'enlever les interférents et les biomolécules faiblement liées. Non seulement ceci favorise la réduction des signaux venant des interactions non-spécifiques, mais elle permet d'associer le signal à seulement l'analyte fortement lié. Une détection secondaire avec un deuxième anticorps peut être utilisée pour bien reconnaître seulement l'analyte d'intérêt. Finalement, la régénération, qui peut être fait en milieu acide ou basique, permet de dissocier l'analyte du récepteur en endommageant peu la surface (**Figure 12, étape 4**). Ceci permet de faire une nouvelle analyse sur le même prisme. Une nouvelle ligne de base est établie au début de chaque nouvelle mesure (**Figure 12, étape 5**). Dans le cas d'une détection secondaire, un signal négatif peut être observé avec les concentrations plus faible d'analyte. Ceci est causé par l'injection de l'anticorps secondaire qui a un impact sur la surface. En d'autres mots, le flux de l'injection peut décrocher les anticorps de capture (récepteurs) plus faiblement liés. C'est pour cette raison qu'il n'est pas anormal de voir des réponses négatives aux plus faibles concentrations sur une courbe d'étalonnage mesurée par SPR. En effet, un signal négatif peut toujours être considérée dans la zone de quantification et être au-dessus de la LOD.

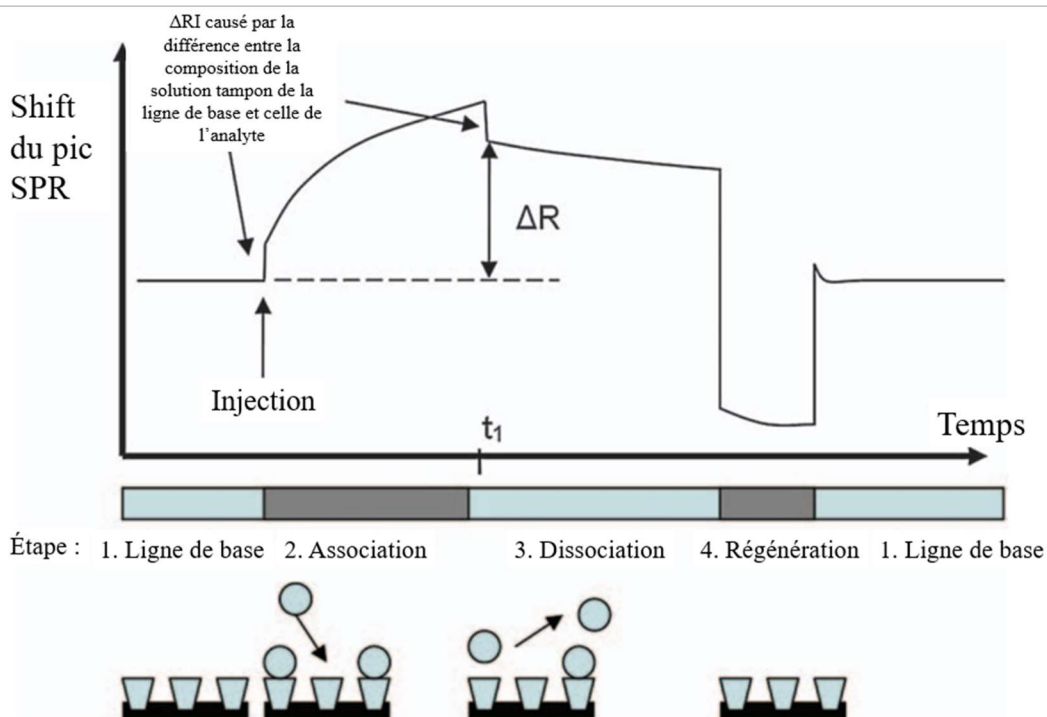


Figure 12 Les différentes étapes observées en SPR (1) ligne de base (2) association (3) dissociation (4) régénération. Adapté avec permission de la référence 33; Copyright 2017 Royal Society of Chemistry

Pour détecter avec confiance un analyte, la chimie de surface doit permettre de réduire les interactions non-spécifiques possibles dans les matrices complexes avec des protéines de masses molaires élevés, notamment IgG et fibrinogène⁴⁴. La fonctionnalisation de la surface d'or peut être faite avec une SAM, des polymères volumineux, le couple de protéine avidine-streptavidine, des protéines et les acides nucléiques (ADN). Pour la reconnaissance, des récepteurs comme des anticorps, des aptamères, l'ADN, des oligonucléotides et des polymères à empreinte moléculaire sont communément utilisés. Pour ce projet, plusieurs étapes ont été optimisées pour réduire le plus possible les interactions non-spécifiques. En premier, la surface d'or est recouverte d'une monocouche autoassemblée composée d'un peptide avec un acide carboxylique et une terminaison

thiol, l'acide 3-mercaptopropionique (3-MPA-LHDLHD-COOH). Cette monocouche empêche des interférents de la matrice biologique de se lier ou d'interagir directement avec la surface d'or sur le prisme^{44,45,46,47}. Ce peptide est activé^{48,49} au C-terminal par réaction avec un mélange aqueux 1:1 de chlorhydrate de 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC) et N-hydroxysuccinimide (NHS)^{50,51,52,53}, suivie d'un lavage avec une solution d'acétate de sodium à un pH de 4.5 pour créer un environnement propice pour liaison avec l'anticorps de capture (**Figure 13**). Ensuite, l'anticorps de capture est préparé et introduit avec le même tampon. Le pH de celui-ci permet la déprotonation partielle des amines des lysines de l'anticorps de capture, étant proche de leurs pK_a. À un bas pH, les chaînes aspartates du peptide sont déprotonées permettant un rapprochement électrostatique facilitant le reste de la réaction. EDC va venir se lier à l'oxygène au C-terminal de l'acide carboxylique pour créer un ester instable. Ensuite, un remplacement est fait avec le NHS pour obtenir un ester semi-stable. Le NHS-ester formé au C-terminal du peptide monocouche est très réactif envers les amines primaires neutres de l'anticorps de capture permettant sa liaison à la surface, donc une liaison amide stable. L'excès de groupements NHS est ensuite désactivé à l'aide d'une solution d'éthanolamine (pH 8.5) pour éviter des interactions croisées avec l'analyte et les composés dans la matrice de l'échantillon. L'immobilisation des anticorps de capture n'est pas parfaitement orientée avec les régions légères vers le haut surtout dans le cas d'anticorps polyclonaux. De plus, l'efficacité de l'immobilisation n'est pas de 100% et peut varier selon le protocole utilisé^{54,55}.

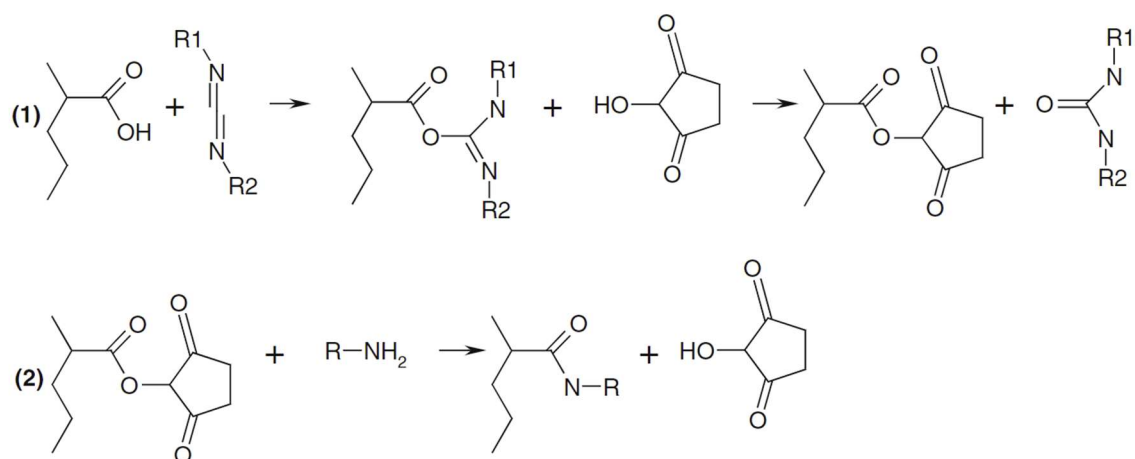


Figure 13 Schématic de la réaction d'activation d'un acide carboxylique avec EDC/NHS pour une liaison covalente avec un amine (anticorps de capture). Adapté avec permission de la référence 51; Copyright 2010 American Chemical Society

Ensuite, la surface fonctionnalisée avec l'anticorps de capture est lavée avec un tampon contenant de l'albumine de sérum bovin (BSA) et un surfactant (Tween20). La BSA va agir comme étape de blocage et le Tween20 va réduire l'agrégation entre les molécules. Lorsque l'analyte (IgA) est introduit, soit dans un tampon ou une matrice complexe, l'anticorps de capture va spécifiquement le reconnaître. Dans le cas d'une matrice comme le plasma, une détection secondaire avec un deuxième anticorps contre l'analyte est nécessaire. Une réponse abrupte et qui plafonne rapidement est observé. Ceci est dû à tous les composants et interférents que l'on peut retrouver dans le plasma humain qui peuvent interagir ou coller temporairement à la surface. Un lavage avec le tampon permet de réduire les interactions non-spécifiques et on obtient un signal qui correspond à la concentration d'IgA avec l'anticorps secondaire. Ce signal croissant va toujours être proportionnel avec la concentration de l'analyte. La régénération est faite avec du chlorhydrate de glycine avec un pH ajusté au besoin à 2.2.

Plusieurs étapes ont dû être optimisées pour déterminer avec confiance les IgA dans un échantillon de plasma. En premier, le pH de la solution d'acétate a été optimisée avec l'anticorps de capture polyclonal choisi. Bien qu'il soit important de retrouver un pH plus bas que le point isoélectrique de l'anticorps pour favoriser le rapprochement électrostatique, le signal d'immobilisation de l'anticorps pourrait varier entre les pH. Aussi, la réponse d'une même concentration d'IgA était différente selon le pH du tampon. Ensuite, la concentration de l'anticorps de capture pour l'immobilisation devait être optimisée. Le signal SPR devait démontrer une certaine saturation et une bonne réponse pour la même concentration d'IgA. Après avoir établi une courbe d'étalonnage dans un tampon, des courbes d'étalonnage avec détection secondaire peuvent être comparés à plusieurs concentrations d'anticorps. Par la suite, différents fluides biologiques ont été utilisées pour observer la robustesse du protocole. Quelques changements sont normalement faits lorsque la matrice est plus complexe, par exemple des lavages.

Objectifs

Le but de ce projet de maîtrise fut de développer un protocole pour déterminer les IgA dans des échantillons en matrice complexe pour être utilisées en milieu clinique ou avec les banques de sang. En effet, 84.2 % des produits sanguins IgA-déficients provenant de Héma-Québec¹⁷ sont utilisés pour des transfusions et dont l'historique est connu. Pour permettre des analyses sur place, le protocole combiné à l'instrument doit satisfaire à des critères POC. Il faut souligner que le but n'est pas de remplacer la méthode ELISA, qui est un standard pour la détection hautement sensible et sélective des biomolécules²³. En fait, les deux méthodes pourraient bien s'agencer pour combler des besoins différents. Lorsqu'on doit faire un nombre élevé d'échantillons, un protocole ELISA est mieux adapté. Par contre, dans des cas plus particuliers, notre approche SPR pourrait être plus rapide.

De plus, la quantification des IgA par SPR doit permettre l'identification des individus plus proches du seuil de déficience de 500 ng/mL. Si la quantification est faite entre 400 et 2000 ng/mL, il serait possible d'identifier les individus immunodéficients. Les individus avec une concentration plus basse que 500 ng/mL sont plus à risque d'un choc anaphylactique^{17,18,21,56}, mais il n'est pas impossible que quelqu'un avec une concentration plus basse que 2000 ng/mL soit à risque aussi. Alors, ceci démontre l'importance d'être capable de différencier et de catégoriser les échantillons dans cette gamme.

Un objectif important est axé sur l'amélioration de l'aspect POC de l'instrument. En premier, pour des mesures par exemple lors d'une collecte de sang, le prisme devrait être pré-fonctionnalisé et prêt à utiliser. Un travailleur de la santé devrait pouvoir simplement l'insérer sans endommager la surface du prisme. Ainsi, une cartouche peut être développée pour minimiser l'erreur humaine. Aussi, la cartouche pourrait être facilement disposée et réduire le contact avec le plasma. Avec un algorithme, il serait possible d'injecter l'échantillon et avoir une lumière rouge et verte pour indiquer si la personne est déficiente ou non en IgA. Ceci rendrait l'analyse beaucoup plus rapide et facile. En fait, le but serait qu'un travailleur de la santé puisse manipuler l'instrument avec un minimum de formation. Seulement le sang ou le plasma d'un individu serait idéalement analysé sur un prisme, mais avec l'optimisation de la régénération, il pourrait être possible de mesurer plus qu'un échantillon sur une même interface. La méthode décrite permettrait d'associer les bons composants sanguins aux individus immunodéficients. Les composants sanguins IgA-déficients sont distribués aux hôpitaux provenant de services sanguins comme Héma-Québec (Figure 14).

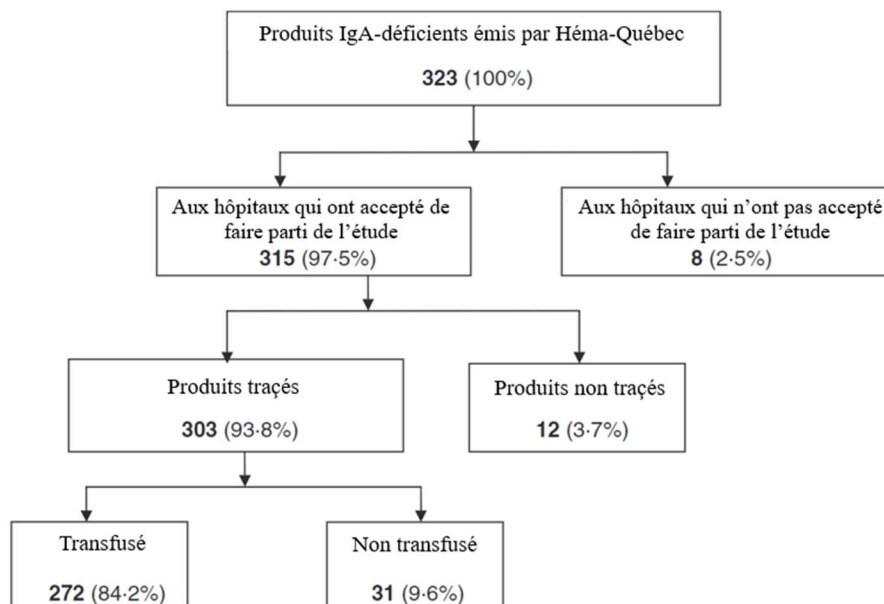


Figure 14 La distribution des produits IgA-déficients obtenu par Héma-Québec. Adapté avec permission de la référence 17; Copyright 2010 Wiley

Chapitre 2 : A portable surface plasmon resonance (SPR) sensor for the detection of Immunoglobulin A in plasma

Caroline Dubois (1), Éric Ducas (2), Audrey Laforce-Lavoie (2), Jonathan Robidoux (2), Samuel Rochette (2), Alexandre Delorme (1), Ludovic S. Live (3), Danny Brouard (2), Jean-François Masson (1)**

(1) Département de chimie, Quebec center for Advanced Materials, Regroupement Québécois sur les Matériaux de Pointe, and Centre interdisciplinaire de Recherche sur le Cerveau et l'Apprentissage, Institut Courtois, Université de Montréal, H2V 0B3, Montréal, Canada

(2) Héma-Québec, Affaires médicales et innovation, 1070, avenue des Sciences-de-la-Vie, Québec City, Québec, Canada, G1V 5C3

(3) Affinité Instruments, 1250 rue Guy, Suite 600, Montréal, Québec, H3H 2L3

Corresponding authors: jf.masson@umontreal.ca

danny.brouard@hema-quebec.qc.ca

Cet article a été soumis à Transfusion

Contribution des auteurs :

J'ai effectué la vaste majorité des expériences et rédigé l'article. Éric Ducas, Audrey Laforce-Lajoie, Jonathan Robidoux et Alexandre Delorme ont contribué à certaines manipulations : à l'investigation, la validation et la provision de ressources. Samuel Rochette a participé à l'écriture et révision de l'article lors de la version originale. Ludovic S. Live a participé

à la méthodologie et au logiciel. Danny Brouard et Jean-François Masson ont participé à la supervision, l'administration du projet et à l'acquisition du financement.

Abstract

Background/Objective: A life-threatening anaphylactic shock can occur if a patient with undiagnosed IgA deficiency (i.e., IgA levels <500 ng/mL) receives IgA-containing blood, hence the need for a rapid, point-of-care (POC) method for IgA deficiency screening. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) is routinely used to detect IgA, but this method requires trained specialists and oftentimes ≥ 24 h to obtain a result. We report on a surface plasmon resonance (SPR)-based protocol to identify IgA-deficient patients or donors within one hour.

Study Design/Methods: The SPR sensor relies on the detection of IgAs captured by primary antibodies conjugated to the SPR chip and quantified with secondary antibodies. The sensor was calibrated from 0 to 2000 ng/mL in buffer, in IgA-depleted human serum, and in plasma samples from IgA-deficient individuals. A critical concentration of 500 ng/mL was set for IgA-deficiency. The optimized sensor was then tested on eight plasma samples with a known IgA status (determined by ELISA), including five with IgA-deficiency and three with normal IgA levels.

Results/Findings: The limit of detection was calculated at 0.03 $\mu\text{g/mL}$ in buffer and 0.4 $\mu\text{g/mL}$ in diluted plasma. The results obtained fully agreed with ELISA among the eight plasma samples tested. The protocol distinguished IgA-deficient from normal samples, even for samples with an IgA concentration closer to the threshold.

Discussion: In conclusion, we developed a reliable POC assay for the quantification of IgA in plasma. This test may permit POC testing at blood drives and centralized centers to maintain reserves of IgA-deficient blood, and in-hospital testing of blood recipients.

Introduction

Immunoglobulin A (IgA) is mainly involved in mucosal immunity and is abundant in tears, saliva, serum, plasma and other body mucosae (gastrointestinal, urogenital and respiratory)^{6,7,8}. IgA deficiency is defined by a plasma concentration lower than 500 ng/mL (vs. 2×10^6 ng/mL in normal individuals)^{3,10,11} and is associated with auto-immune diseases like Crohn's disease, severe allergies, and inflammatory diseases^{4,9,12,13,14}. Monitoring is not necessary over the concentration of 2000 ng/mL, since individuals over this threshold are not considered IgA deficient and at risk for an anaphylactic shock. This condition is found in 0.1%–0.5% of the general population and in 0.03%–0.25% of healthy blood donors^{4,15}. However, most patients with IgA deficiency are asymptomatic^{4,16} and are therefore unaware of their condition. As a result, they are at risk of experiencing a life-threatening anaphylactic shock if they inadvertently receive IgA-containing blood.

Therefore, IgA detection tests can have important clinical applications. For example, blood services test blood samples that may be IgA deficient, which helps them maintain reserves of IgA-deficient blood and a registry of IgA-deficient donors¹⁵. A patient in need of a transfusion might also be tested for IgA deficiency if the condition is suspected, which might prevent an anaphylactic shock^{16,17,18,20,21}. Such tests may be carried out directly at the hospital, or at a partner blood service if the hospital lacks the necessary resources.

Blood services typically detect IgA deficiency by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). However, this method oftentimes takes at least 24 hours to obtain the results, requires a trained specialist, and importantly, may not be amenable to a point-of-care (POC) procedure. A POC method must be rapid, accurate, specific, mobile, and inexpensive, so that a front-line healthcare worker can use it with appropriate training^{30,31}. Furthermore, it should be highly sensitive and robust to biological variations in the composition of the sample (e.g., lipemic samples).

A POC method that may enable the detection of IgA deficiency is surface plasmon resonance (SPR) sensing, which is commonly used to study interactions between biomolecules^{32,33,34,35,36,37,38,39,40,41}. SPR is a biosensor that relies on a change in the wavelength or angle of light (known as the shift) absorbed by a thin gold mirror with the variation of the refractive index caused by the change of mass on the gold surface of a prism. Polarized light in total internal reflection by the prism will generate an evanescent field, with one of its components penetrating the gold surface and exciting a collective oscillation of the electrons, the so-called surface plasmon (**Figure 14**). The resulting surface plasmon reflects mass changes (i.e., biomolecular interactions) at the surface of the prism, which change how light is refracted back to the detector. This is especially useful to measure biomolecules using biomolecular interaction at the surface between biomolecular binding partners.

Unlike ELISA, SPR may be amenable to a POC approach^{32,41,43,57,58,59,60}, as it is fast, portable, specific, and convenient to use. Among the different instrumental configuration of SPR, polychromatic SPRs are especially conducive to miniaturisation, making them smaller and thus suitable for POC applications^{30,42,43}. Therefore, we developed a POC protocol (based on a

polychromatic SPR) capable of detecting IgA in complex samples, with a view to using this approach for clinical and blood bank applications.

Materials and methods

Method overview

The SPR-based quantification of IgA shares similarities with an ELISA sandwich immunoassay. IgA binds to a primary capture antibody linked to a peptide adsorbed on the gold prism. Then, a secondary antibody specifically recognizes and binds the captured IgA. SPR differs from ELISA in that the secondary antibody does not need to be conjugated with an enzyme (e.g., horseradish peroxidase) for detection, i.e., the binding of the (unconjugated) secondary antibody to IgA is directly measured by the SPR instrument and provides the analytical signal. Since the molecular weight of bound component directly influences the shift's magnitude, the measurable shift of IgA binding to the primary antibody is greatly blurred by nonspecific binding of components from protein-rich matrix like plasma. The secondary detection permits the direct and specific detection of IgA, isolating it from other plasma components in the sample matrix. The magnitude of the observed shift thus can be associated to the concentration of IgA with a calibration curve.

The first step of the protocol consisted in a baseline stabilization in buffer supplemented with 0.1 % BSA and 0.005% Tween20. After stabilization, the association phase is initiated by the binding of IgA with an IgA-specific antibody. The dissociation phase occurs after a wash that removes loosely antibody-bound IgA and other non-specifically adsorbed components. To reuse the sensor, a regeneration phase then releases IgA from the primary antibodies and cleans the gold

surface for a subsequent analysis (**Figure 15**). Background noise was reduced through the use of a negative reference (i.e., buffer spiked with IgG, human serum depleted of IgA with a purification column⁶¹, or an IgA-deficient plasma or serum sample), whose signal is subtracted to that of a test sample to isolate a specific binding signal.

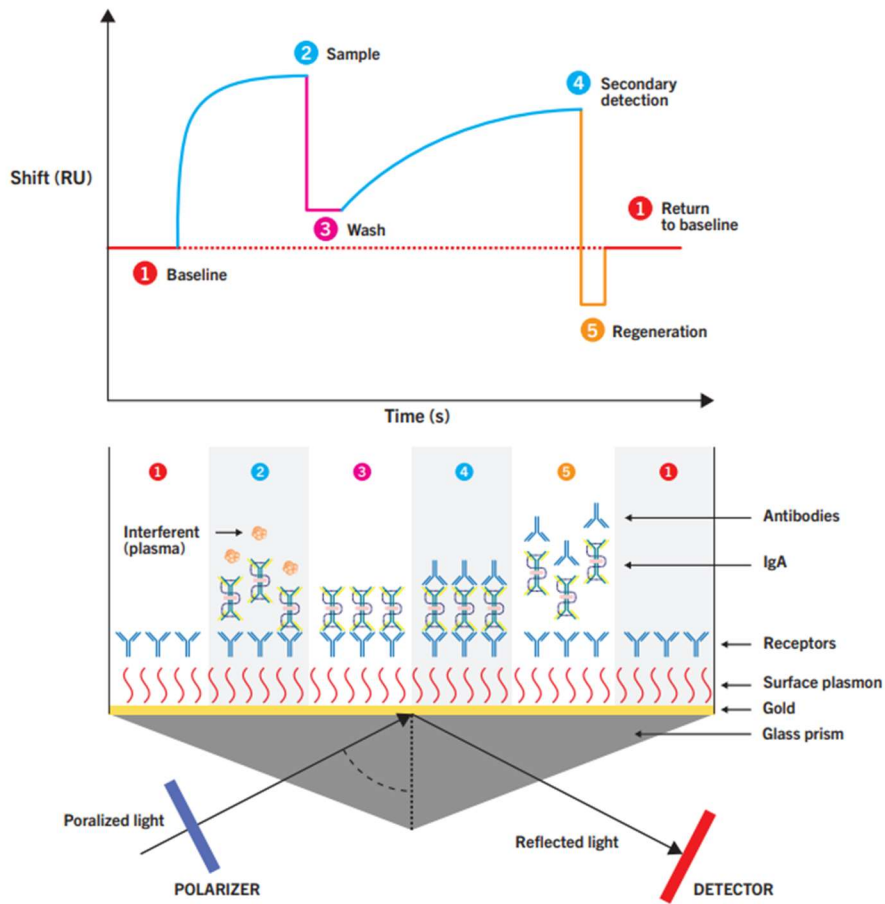


Figure 15 Representation of the SPR protocol. (A) Illustration of the different steps. To begin, buffer is injected (the stabilization phase). IgA in the sample is added and binds to the antibodies (the association phase). Buffer is injected a second time to remove interferents (the dissociation phase). A secondary antibody is then added and interacts with IgA (the secondary detection phase). Glycine is then injected to release IgA from the primary antibodies (the regeneration phase). This

is followed by a wash with buffer to return to the baseline. **(B)** Illustration of the principles of SPR. A polarizer lets light penetrate with the right orientation (p polarization) onto the gold surface, creating an evanescent wave and exciting the surface plasmon. The molecules binding on the surface will affect the surface plasmon and change how light is reflected, thus permitting accurate quantification of analytes.

Preparation of the SPR gold prisms

The gold coating and the peptide self-assembled monolayer (SAM) on the SPR detection prisms were optimized as previously described^{46,48,49,50,62,63,64,65}. Briefly, bare prisms were coated with 2 nm of chromium and 50 nm of gold with a Cressington coating system. Commercial prisms were used for the clinical samples. All prisms were coated overnight with a peptide SAM (3MPA-LHDLHD-COOH) solution of 100 µg/mL in N-N-dimethylformamide (DMF). They were then rinsed, dried, and stored for up to two weeks in adapted containers covered in foil at 4–8°C. Prisms were taken out 15 minutes before the start of the assay to equilibrate at room temperature.

Construction of the IgA biosensor

The initial steps were similar to those previously described for other analytes^{46,48,49,50,62,63,64,65}. Briefly, a SPR prism was inserted in the SPR system, and a spectral reference was carried out in water before starting the functionalization of the sensor. To begin, a 1:1 ratio of 400 mM aqueous EDC (N-[3-dimethylaminopropyl]-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride) and 100 mM aqueous NHS (n-hydroxysuccinimide) was injected for 2 minutes (120 seconds) into each channel to activate the SAM. An aqueous solution (500 µL) of 10 mM sodium acetate (pH 4.5) was then injected for 30 seconds to optimize the environment and wash off the previous reagent.

The subsequent steps were optimized for IgA detection. The primary polyclonal antibody was diluted at 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in 10 mM sodium acetate pH 4.5, and 300 μL was injected in each channel for 20 minutes (1200 seconds). Sodium acetate was then reinjected for 30 seconds to wash off unbound antibodies. A volume of 600 μL of 1 M ethanolamine hydrochloride pH 8.5 (ETA) was injected for 10 minutes (600 seconds) to deactivate peptide sites that were still active. The running buffer solution (PBS, 0.1% BSA [blocking agent], 0.005% Tween20 [Surfactant]) was injected to wash off the ETA and to stabilize the baseline for a maximum of 4 minutes (240 seconds) (**Figure S1**). A sample was then injected. The protocol was optimized on a polychromatic 2-channel SPR system with a flame spectrometer (Ocean insight, FL, USA), a negative reference (with natural human reactive pooled animal IgG), and three technical replicates of the sample. The protocol was optimized with calibration curves from 0 to 2000 ng/mL of IgA in four different environments: buffer, SIg depleted human serum, diluted 1:1 plasma and diluted 1:4 plasma.

Sample measurements

Samples of 300 μL (60 μL of sample diluted 1:4 with 240 μL of buffer) were injected in each channel for 4 minutes (240 seconds) after stabilisation of the baseline. Fifteen minutes later (900 seconds), 500 μL of the buffer solution was injected for 2 minutes (120 seconds) to wash the surface of all non-binding interferents. Secondary detection was carried out with 300 μL of 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of the same polyclonal antibody used on the gold surface for primary detection. After 15 minutes (900 seconds), the analytical signal was read, and the prism was then regenerated up to 7 times with 300 μL of glycine hydrochloride 10 mM (pH 2.2) for 10 seconds and with 500 μL of buffer for 4 minutes (240 seconds). A 4-channel SPR instrument was used with two replicates of the test samples; a positive reference and a negative reference were also used for internal calibration. The six samples were tested consecutively on the same prism, with IgA-deficient

samples tested first to minimize potential carryover effects between IgA-deficient and normal samples (from less concentrated to more concentrated samples). Normally, only one analysis would be carried out on a prism in a POC application, but, for practical reasons, samples were tested starting from the least concentrated to the most concentrated (as measured by ELISA).

Spiked sample measurements

Plasma samples were doped to establish the performance of the SPR sensor near the threshold concentration of 500 ng/mL and these were treated as described previously. Three more IgA-deficient samples (from three donors) were spiked with 400, 500, 600, and 1000 ng/mL of natural human reactive goat IgA. The negative reference consisted in an untreated (i.e., non-spiked) IgA-deficient plasma. The correction with this reference permitted the binding curve to be associated with the spiked concentration.

Sample preparation

Biological samples were provided by Héma-Québec, the only blood service operating in the province of Québec, Canada. Plasma was obtained by blood centrifugation of vials with anticoagulants (1300 g, 10 minutes). Plasma samples were stored at -20°C. The samples were thawed at room temperature if stored in an Eppendorf or at 37°C (in a water bath) if stored in a 50 mL centrifuge tube.

ELISA

A volume of 100 µL of the primary antibody (3 µg/mL in sodium carbonate buffer pH 9.6, 0.05 M) was added to the wells of a 96-well plate. The plate was then incubated at 4°C for 16–24 hours, followed by 30 minutes at room temperature. The plate was washed 4 times with PBS and dried (with a paper towel in between washes). A volume of 200 µL of a blocking solution (PBS 0.001M pH 7.4, casein 0.001 M, and NaCl 0.15 M) was added to each well, and the plate was

incubated at 37°C for 30 minutes. The wells were emptied and dried with a paper towel. The calibration curve, which ranged from 0 to 20 ng/mL, was derived from triplicate measurements of each concentration and a negative control. Four dilutions of each sample were tested along with an internal control (seracon). A volume of 100 µL of the standards/samples was deposited in the wells, and the plate was incubated 60 minutes at 37°C. The plate was then washed four times with PBS and dried in-between washes. Then, 100 µL of the HRP-conjugated antibody (diluted 1/100) was added to each well (Jackson ImmunoResearch). The plate was then incubated 60 minutes at 37°C and washed 4 times with PBS and dried. A volume of 100 µL of TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) was deposited in each well, and the plate was stored in a dark room for 30 minutes. Then, 100 µL of sulfuric acid 1M were added to the wells to stop the reaction. The absorbance was measured at 450 nm, with a reference at 630 nm.

Statistical analyses

For each calibration, the LOD was calculated as follows:

$$\text{LOD} = \frac{(3 * \text{SD}(0)) - b}{m}$$

The standard deviation of 6 blanks (SD(0)), the gradient (m) and the y-axis intercept (b) permitted to obtain a value in ng/mL. The LOD was calculated with the reference channel for all calibrations except the one in depleted human serum, which was calculated using the standard deviation of the smallest concentration. The calibration curve was corrected with the reference channel because of the strong non-specific interactions caused by the matrix. The correlation of the measurements obtained for each calibration was assessed with the Pearson correlation coefficient.

Results

Immobilization of the primary antibody and pH optimization

For a proper immobilisation of the primary antibody, the pH of the buffer must produce a partially positively charged antibody permitting an electrostatic pull to the partially negative surface (peptide). The sodium acetate solution was tested at pH values of 4.5, 5.5, 6.5 and 7.5. This range was chosen because it overlapped with the buffer zone of the solution (pH 3.7 to 5.6),⁶⁶ and because it was below the isoelectric point of the antibody (pH 8.5).

The interaction with IgA must also be considered when optimizing the pH. At a pH of 4.5, a strong and reproducible (CV=2%) immobilisation curve was observed (**Figure S1**), with adequate binding of the antigen at different concentrations (**Figure S2**). At pHs of 6.5 and 7.5, a slightly weaker immobilisation curve was observed after 20 minutes (1200 seconds), and some poorly reproducible binding occurred (CV=40%), likely because these pHs were outside the buffer zone. For each pH, six shifts with 500 ng/mL of IgA were measured with different immobilization pHs and confirmed that the optimal pH was of 4.5.

Initial calibration

The protocol was initially calibrated in PBS supplemented with 0.1% BSA and 0.005% Tween20 (**Figure 16A**). Albeit poorly representative of the complexity of biological samples, this buffer was a valid starting point to optimize the assay. IgG was used as a reference (with the same concentrations as IgA). The LOD was of 0.03 µg/mL. Notably, unlike subsequent calibrations, the washing step (normally performed after injecting the sample) was skipped for this initial calibration.

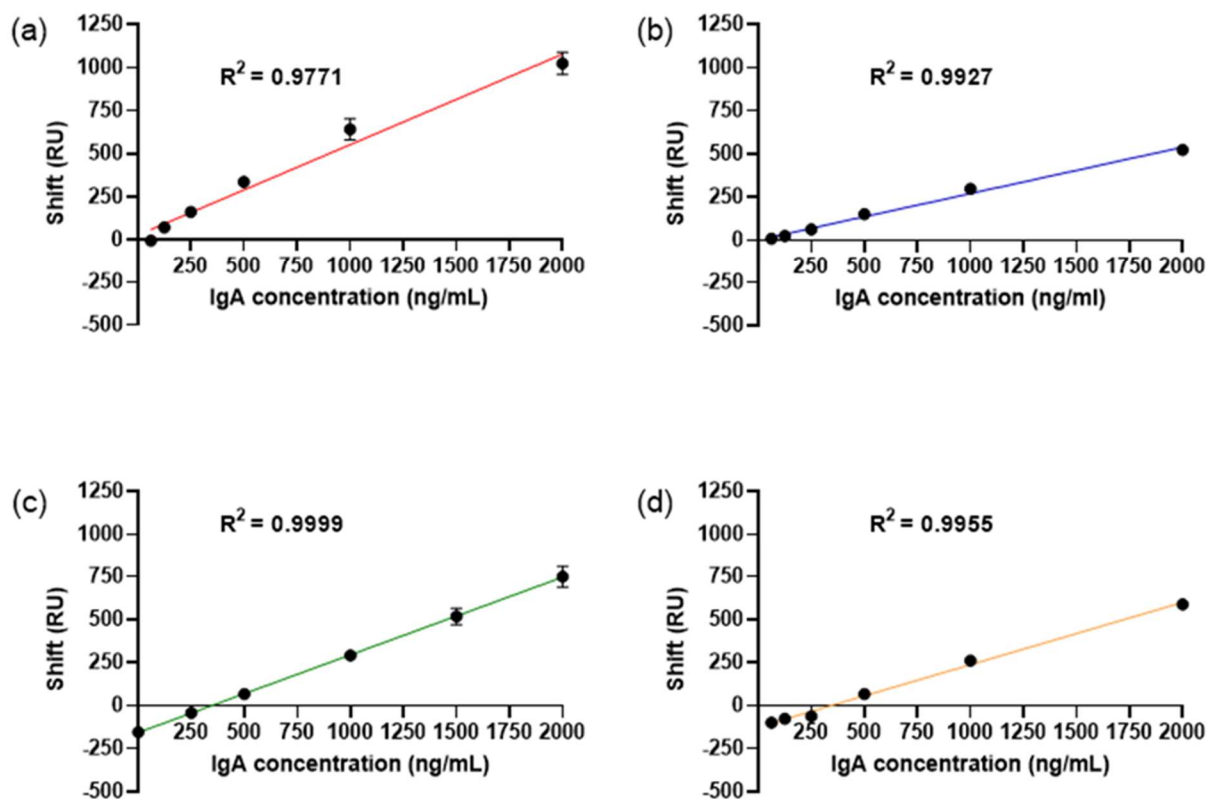


Figure 16 Calibration curves of IgA with the secondary detection (a) in PBS supplemented with 0.1% BSA and 0.005% Tween20 (b) in immunoglobulin-depleted human serum (c) in IgA-deficient plasma (negative reference) diluted 1:1 with buffer (d) in IgA-deficient plasma (negative reference) diluted 1:4 with buffer. All calibrations were carried out with IgA concentrations ranging between 62.5 ng/mL to 2000 ng/mL, except for that in 1:1 diluted IgA-deficient plasma (0 to 2000 ng/mL, in (c)).

Abbreviation: RU = refractive unit

The protocol was then calibrated in immunoglobulin-depleted serum, a matrix with an intermediate level of complexity. A LOD of 0.03 $\mu\text{g/mL}$ was obtained in this matrix (**Figure 16B**), probably in part due to the adsorption of residual IgA and the non-specific adsorption of residual immunoglobulins (which can occur in human plasma and blood)^{45,64}.

Calibration in plasma

Lastly, the protocol was calibrated in immunoglobulin-containing plasma. In this round of calibration, IgA-deficient plasma (i.e., the negative reference) was spiked with IgA. The dose-response relationship was linear, but the LOD was calculated at 0.6 $\mu\text{g/mL}$ (**Figure 15C**). This relatively high LOD may be due to non-specific interactions (e.g., anti-IgA binding [as detected by ELISA], other competing ligands) blocking the binding of IgA in reference and test samples. To mitigate matrix effects, the IgA-deficient plasma was diluted 1:4, and the LOD was reduced to 0.4 $\mu\text{g/mL}$ (**Figure 15D**). This dilution factor was retained in subsequent experiments with clinical samples.

Clinical samples

The protocol was finally tested on eight clinical samples, including five IgA-deficient samples (negative reference and samples #1-4) and 3 normal samples (positive reference and samples #5-6), whose IgA statuses were ascertained by ELISA (**Figure S3**). The shift markedly increased for normal samples and modestly decreased for IgA-deficient samples, thus discriminating IgA-deficient samples (i.e., with >500 ng/mL of IgA) from normal samples (i.e., with >500 ng/mL of IgA; **Figure 16**). Normal samples (i.e., #5-6) had shifts of 693 to 766 RU (i.e., 2259 to 2458 ng/mL), whereas IgA-deficient samples (i.e., #1-4) had shifts of -75.5 to -39.4 RU (i.e., $<$ LOD) (**Figure 17**).

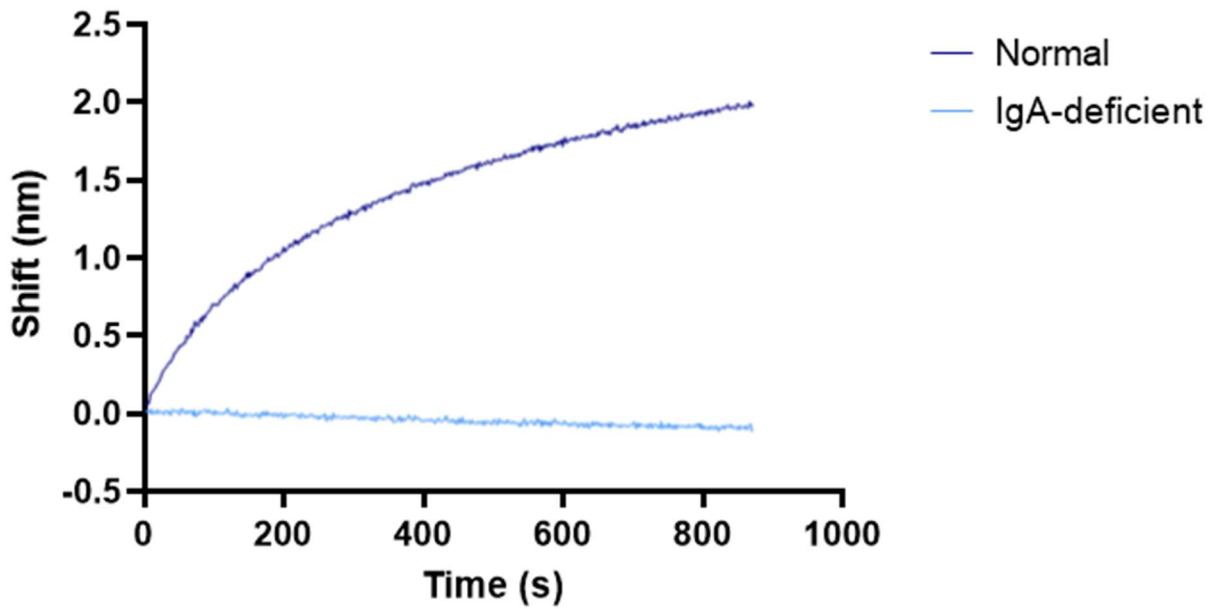


Figure 17 Representative signals obtained during the 15-minute secondary detection for a normal plasma sample and an IgA-deficient plasma sample

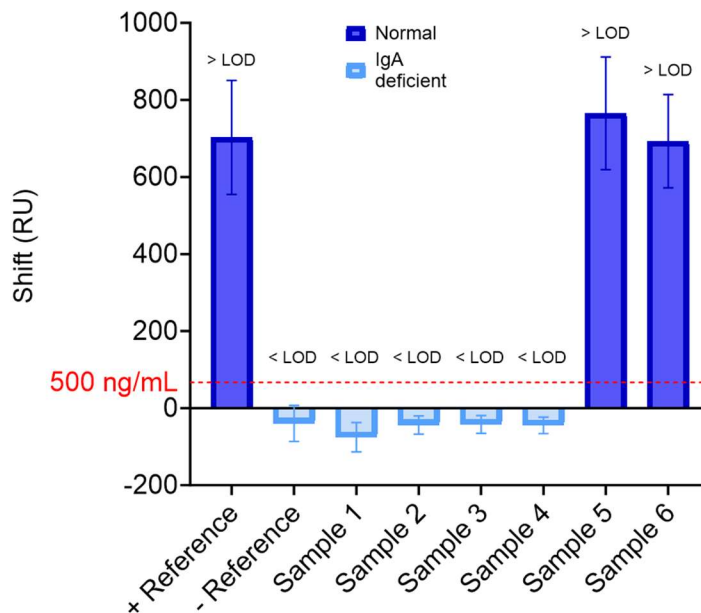


Figure 18 IgA-deficient samples (i.e., negative reference, and samples #1-4) and normal samples (positive reference, samples #5-6) tested with the optimized SPR protocol

Performance with IgA concentrations near the threshold

Three other IgA-deficient samples (i.e., #7-9) were spiked with 400, 500, 600, and 1000 ng/mL of IgA to assess the performance of the protocol for concentrations near 500 ng/mL (i.e., the threshold that defines IgA deficiency; **Figure 18**). The results confirmed the sensitivity of the protocol: the standard deviations were small, and the spiked IgA concentrations correlated well. The binding curves associated with the samples spiked with 400, 600, and 1000 ng/mL of IgA could be clearly distinguished from those of the samples spiked with 500 ng/mL (i.e., the threshold). The standard deviations barely overlapped, showing that it is possible to distinguish concentrations closer to the threshold.

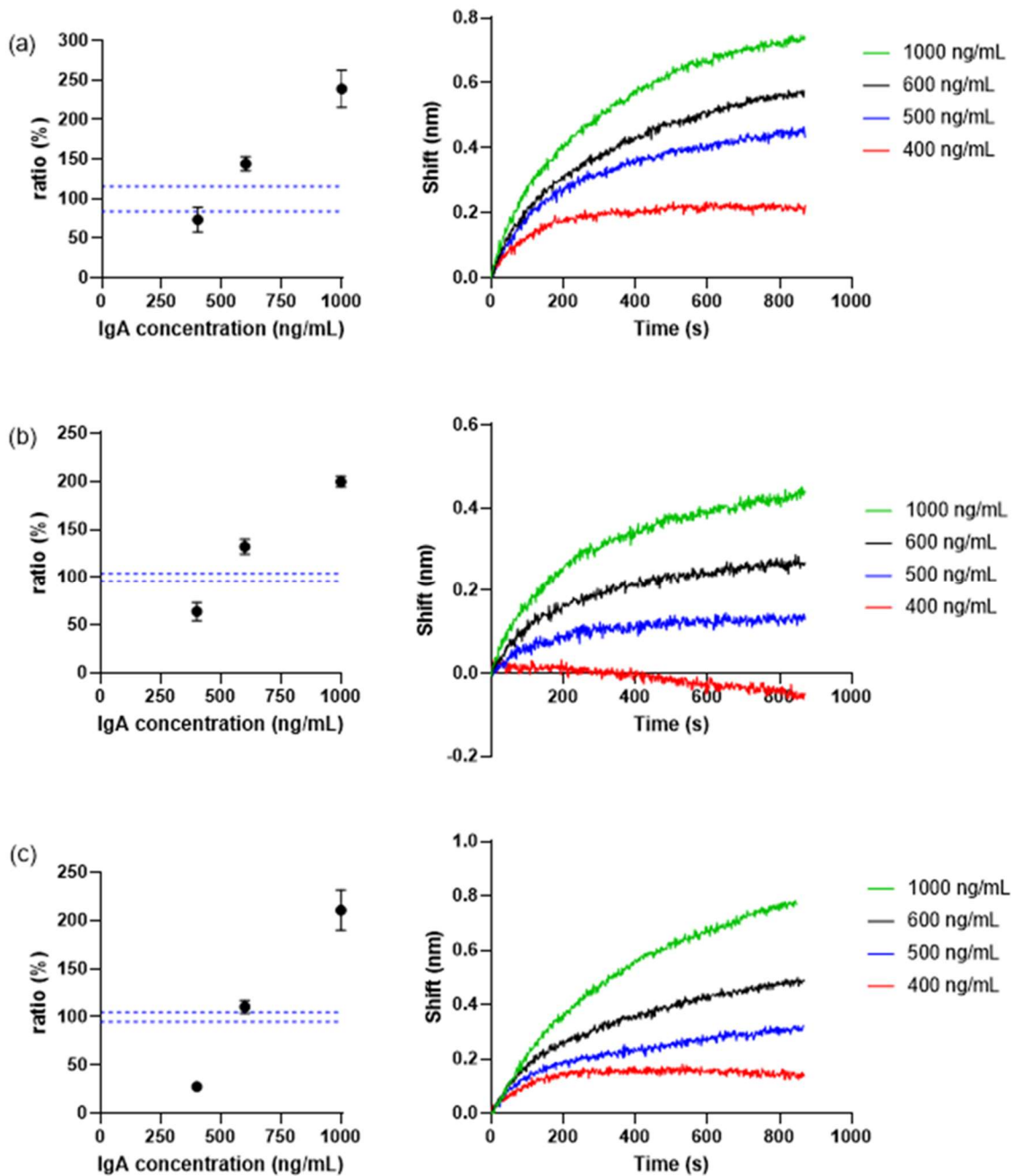


Figure 19 Signals obtained for IgA-deficient plasma samples spiked with 400, 500, 600 and 1000 ng/mL of IgA. Representative binding curves are shown on the right of each panel, and the ratios obtained (vs. the sample spiked with 500 ng/mL) are shown on the left (blue dotted line represents the error on the 500 ng/mL measurement). (A) sample #7 (B) sample #8 (C) sample #9.

Discussion

The key to optimizing an SPR protocol is to have an adequate surface chemistry, which will ensure that the capture antibody binds its cognate antigen with minimal unspecific binding. This is especially important when detecting biomolecules in a complex matrix like plasma, which contains large competing ligands (e.g., such as IgG and fibrinogen). In this study, we developed a protocol that can discriminate IgA-deficient from normal samples, has a low LOD, and can be carried out within less than an hour (including the treatment of the blood sample to obtain plasma).

A key strength of the protocol described herein is its ability to reduce non-specific interactions by using three layers at the surface of the gold prism, namely the SAM, a primary antibody, and BSA. Binding specificity is additionally ensured by the chemical activation (with EDC/NHS) and deactivation (with ETA) of the peptide, which permits a better immobilization of the primary antibody with its lysines on the SAM. Moreover, the dilution of the plasma sample enabled us to reduce the LOD and the impact of the matrix on the readings. The protocol also includes an additional washing step to reduce interferences caused by lipemic plasma samples, which might occur more frequently in the context of blood donation (since donors are free to eat before a donation).

Another strength of our protocol is its ability to distinguish samples with IgA concentrations in the vicinity of the 500 ng/mL threshold (and above the LOD). The SPR curves of IgA-deficient samples spiked with 400 ng/mL, 600 ng/mL, or 1000 ng/mL could generally be distinguished from those of samples spiked with 500 ng/mL. Our protocol thus seems highly quantitative, at least for concentrations up to 2000 ng/mL.

Our SPR-based protocol may complement ELISA when test results need to be generated rapidly. ELISA may be optimal for high-throughput screening, whereas SPR may be better suited

for POC testing of a few samples. For example, a preoperative immunocompromised patient with suspected IgA deficiency might need to be tested for IgA deficiency to ensure that he will be given the compatible blood product. With SPR, this test could be done at the bedside in 32 minutes (once the plasma has been isolated), with a minimum volume of blood. Hospital blood banks maintain reserves of IgA-deficient blood in the event an IgA-deficient individual needs an urgent blood transfusion or has a planned surgery. The alternative would be to test the patient by ELISA 2-3 days before surgery, with added constraints. Another potential application of our protocol could be to test donors at blood drives and fixed centers when IgA deficiency is known or suspected (based on associated conditions [e.g., Crohn's disease]). Donors found to be IgA-deficient could then be enrolled in a registry and help provide hospitals with IgA-deficient blood products.

Compared to a normal SPR, a cartridge SPR system would be a better POC approach, since it is optimized for the analysis of a single sample. The prisms can be pre-functionalized and inserted in the 3D printed cartridges (**Figure S4**), permitting the assay to be started simply by inserting the cartridge in the device. The cartridge contains the pre-functionalized prism and a built-in microfluidic system. This would limit the risk of damaging the surface, improve the repeatability and reliability of the assay, and might also alleviate the need for time-consuming technician training. Additional tests are underway to assess the performance of this system, which seems promising to achieve the end goal of developing an SPR system that could be used by someone with limited training.

Limitations

Despite its many strengths, our study is subject to some limitations. To begin, IgA-deficient samples were run before other (more concentrated) samples, even though the regeneration step normally enables the analysis of multiple samples on the same prism. This procedure mitigated the

risk of carryover effects (as glycine regeneration does not eliminate all matrix components), but it may have inflated the sensitivity of our protocol — at least when reusing the same prism multiple times. This limitation was deemed acceptable because (1) in a hospital setting, the prism would be used only once per sample and hence would not require a regeneration, and (2) obtaining a precise estimate of sensitivity was not critical to this preliminary assessment of the protocol; further research is underway to better characterize its performance. However, in a blood drive setting (where several donors may be tested everyday), finding a more efficient regeneration buffer could make testing less costly, since at least six donors could be tested with a single prism. Therefore, more research should be dedicated to finding a more efficient regeneration buffer.

Moreover, as mentioned above, a relatively low number of biological samples were tested, and so further research is needed to better estimate the sensitivity and specificity of the protocol. Variations in biological samples (e.g. lipemia) can influence our readings and should be considered, but given the fact that sample 4 is lipemic, we expect that this limitation should not be too important. Indeed, the composition of every plasma sample is different, making it imperative that future testing of more biological samples be done to confirm our protocol.

Lastly, our protocol/approach is not yet entirely POC, since it still needs to be carried out by a trained specialist with substantial experience. Further research is needed to create a device equipped with an algorithm presenting the results in the form of a red (i.e., IgA-deficient sample) or green light (normal sample). This device would contain the prism in a cartridge, enabling an easy disposal and limiting exterior factors. The tests around the threshold concentration revealed some limitations. As much as it confirmed the distinction between IgA-deficient and normal samples, it has also proved some variability between testing. These variations can be caused by the microfluidic system and the prisms. Additionally, small deviation overlaps are noticed between

samples, due to the biological differences of the samples and other instrumental variations (e.g. flow rate, bubbles, consistency of injection). The addition of a threshold reference (500 ng/mL) could give a better indication of the IgA-deficiency of a sample.

Conclusion

In conclusion, the protocol described herein successfully distinguished IgA-deficient from normal plasma samples and distinguish samples at lower concentrations. This protocol has a low LOD, can be carried out in only 32 minutes, and is a significant step forward to developing a POC approach for IgA testing. However, further studies are necessary to characterize the performance of the protocol, to improve its efficiency for real-world use, and optimize it for POC applications. Although preliminary, this assessment paves the way to the development of a POC device and protocol that can be used by a user with little to no training. Besides IgA, this protocol could be leveraged for other biomarkers, like ferritin, which could be detected in serum, plasma and whole blood. Further research is dedicated to improving the POC experience.

Acknowledgements

The authors would like to thank Stanko Josimov for help with figures. The authors would like to thank the financial contributions from MITACS, Université de Montréal, Héma-Québec, Affinité Instruments, the Natural Science and Engineering Research Council of Canada and the Canadian Foundation for Innovation.

Conflict of interest

JFM and LSL have financial interest in Affinité Instruments.

Supporting information

Figures on sensor preparation and the list of chemicals are provided in supporting information.

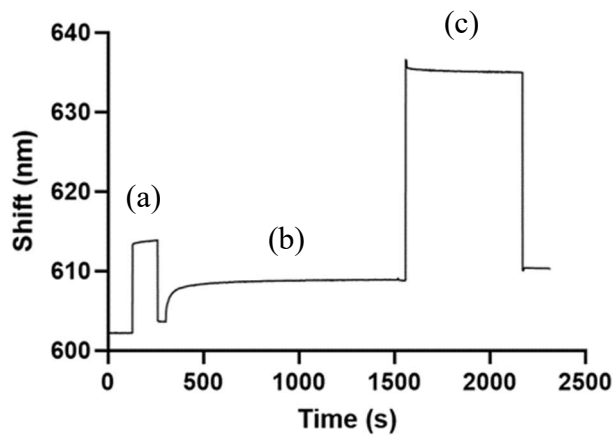


Figure S1 – The variation in SPR signal during chemical preparation of the gold surface (with 3MPA-LHDLHD-COOH) before the analysis of IgA samples; (a) Addition of EDC/NHS, (b) Immobilisation of polyclonal antibody, (c) Injection of ethanolamine.

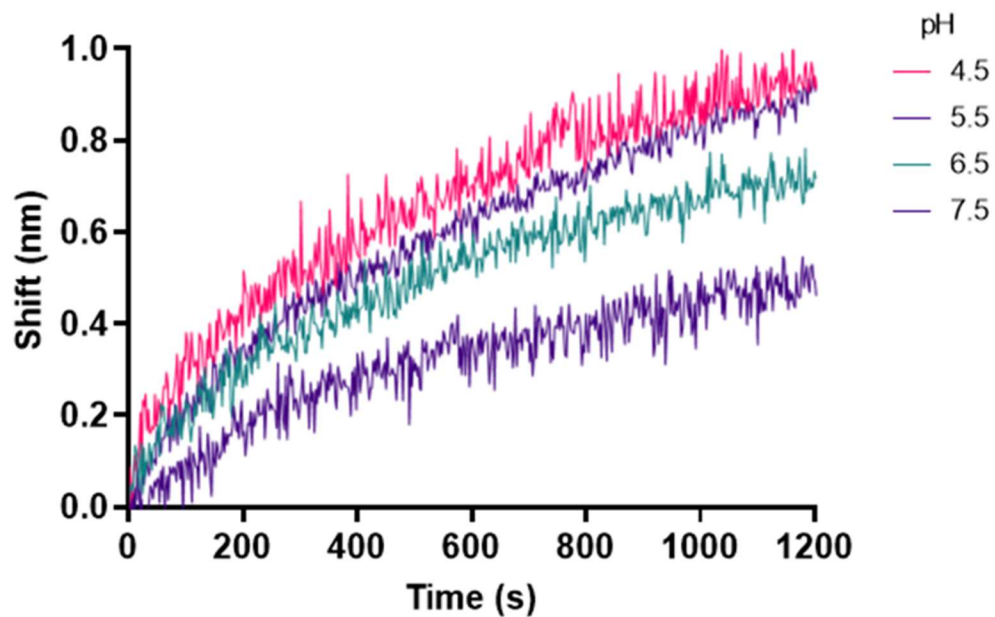


Figure S2 – The binding curves of 500 ng/mL of IgA (in buffer alone) immobilized with sodium acetate of pH 4.5 to 7.5.

qSPR cartridge lid - 2022-03-15.STEP.png



Figure S3 – Representation of a 4-channel cartridge with a built-in microfluidic system enclosing a gold prism.

Table S1

List of the products used for the SPR measurements

Reagent	Provider	Head office	Catalog Number
Commercial prisms	Affinité Instruments	Montréal, QC, CAN	NA
1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide	Sigma-Aldrich	MO, USA	E6383-5G
n-hydroxysuccinimide	Sigma-Aldrich	MO, USA	130672-5G
Sodium acetate	Fischer scientific	PA, USA	S7670-250G
Polyclonal goat antibody	Jackson Immunoresearch	PA, USA	109-005-011
Human IgA subclasses standard Serum	Cedarlane	Burlington, ON, CAN	NOR-04
Human Gamma Globulin (IgG)	Jackson Immunoresearch	PA, USA	009-000-002
Ethanolamine hydrochloride	Sigma-Aldrich	MO, USA	E6133-100G
Tween20	M.P. Biomedicals	Irvine, CA, USA	NA
PBS	Fischer scientific	PA, USA	21-040-CV
Bovine serum albumin	Sigma-Aldrich	MO, USA	05470-5G
Immunoglobulin depleted serum	Cedarlane	Burlington, ON, CAN	HS2001-25-100ML
Glycine hydrochloride	Sigma-Aldrich	MO, USA	G7126-500G

Conclusions et perspectives

En conclusion, le protocole SPR développé a permis l'identification des IgA dans une matrice complexe : le plasma. La majorité des individus IgA-déficients sont asymptomatiques ce qui nous a encouragé à développer un protocole pour les identifier. Ce test peut être fait à un hôpital par exemple avant une chirurgie. Aussi, le sang prélevé lors des collectes ou à des centres de dons peut être testé pour sa concentration en IgA. Ceci permettrait d'assurer des réserves de sang IgA-déficient et les distribuer aux services hospitaliers.

Le protocole SPR a été établi avec l'optimisation de chaque étape. Pour l'immobilisation de l'anticorps de capture, le pH du tampon et la concentration d'anticorps ont été optimisés. La concentration de l'anticorps pour la détection secondaire a été ajustée en fonction de la réponse de notre analyte. Cette courbe d'étalonnage a été adaptée pour englober les concentrations clés et ce qui est biologiquement pertinent. Ensuite, ce protocole a été mis à l'épreuve avec différentes matrices biologiques complexes. Plusieurs courbes d'étalonnage ont été effectuées dans différents biofluides pour évaluer leur impact sur les signaux SPR mesurés. Ainsi, une courbe a été faite dans un plasma déficient en IgA dilué 1 : 4 avec un tampon PBS et ceci a été retenu pour la suite du projet. Les échantillons cliniques ont démontré que le protocole permet de faire la différenciation entre les échantillons de plasma IgA-déficient et normaux.

La distinction entre les échantillons normaux et IgA-déficients était possible, même s'ils étaient proches de la concentration clé de 500 ng/mL. La LOD de 0.03 µg/mL se retrouve au-dessous de ce seuil et nous permet ainsi de quantifier les IgA dans la gamme de concentrations biologiquement importantes. Aussi, la distinction entre les échantillons de plus petites concentrations permet d'évaluer la gravité de la déficience en IgA pour informer et choisir le bon

composé sanguin pour une personne nécessitant une transfusion. Ce protocole peut être fait en 32 minutes, permettant une réponse rapide pour un individu ayant besoin d'une transfusion de sang, par exemple pour une chirurgie. Ce protocole peut servir de modèle pour la quantification de différents biomarqueurs dans des matrices complexes comme le sérum, le plasma et le sang.

En revanche, des recherches plus approfondies seront dédiées à améliorer l'aspect POC dans le but que l'instrument et le protocole puisse être utilisés par un individu avec peu de formation. Plusieurs variations instrumentales peuvent influencer les résultats, comme des bulles dans les canaux. Il faut toujours une personne expérimentée pour reconnaître les subtilités de la méthode. Un instrument à cartouche pourrait rendre les mesures plus accessibles. Le premier aspect serait la pré-fonctionnalisation de la surface d'or du prisme. Ainsi, il serait possible de simplement insérer la cartouche dans l'instrument et injecter l'échantillon directement. Dans le futur, on vise un coût compétitif pour les cartouches, l'instrument et le coût d'opération. Une autre amélioration serait de réduire le temps de mesure puisqu'il est important d'avoir un temps le plus petit possible pour identifier un individu qui pourrait potentiellement avoir un choc anaphylactique à la suite d'une transfusion de sang. De plus, l'amélioration de l'étape de régénération permettrait d'analyser plus d'un individu sur un prisme, réduisant les déchets et l'étape de changer la cartouche.

Bref, de plus amples recherches concentrées sur l'amélioration de l'aspect POC en utilisant différentes molécules comme la ferritine seraient intéressantes dans le futur. Pour des molécules volumineuses comme celle-là, l'usage de nanoparticules pour la détection secondaire est nécessaire. En effet, la combinaison du plasmon de surface et l'oscillation des électrons de la nanoparticule augmente la réponse observée. Ceci réduit la limite de détection, donc permet de quantifier l'analyte à de bien plus petites concentrations dans des matrices complexes. Finalement, l'objectif de cette maîtrise a été atteint pour l'identification des individus IgA-déficients.

Références bibliographiques

- 1- Schroeder, H. W. et Cavacini, L. (2010). Structure and function of immunoglobulins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2), S41-S52. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.046>
- 2- Strugnell, R. A. et Wijburg, O. L. C. (2010). The role of secretory antibodies in infection immunity. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 656-667. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2384>
- 3- Gonzalez-Quintela, A., Alende, R., Gude, F., Campos, J., Rey, J., Meijide, L. M., Fernandez-Merino, C. et Vidal, C. (2007). Serum levels of immunoglobulins (IgG, IgA, IgM) in a general adult population and their relationship with alcohol consumption, smoking and common metabolic abnormalities. *Clinical and Experimental Immunology*, 151(1), 42-50. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2007.03545.x>
- 4- Cunningham-Rundles, C. (2001). Physiology of IgA and IgA Deficiency. *Journal of Clinical Immunology*, 21(5), 303-309. <https://doi.org/10.1023/a:1012241117984>
- 5- De Sousa-Pereira, P. et Woof, J. M. (2019). IgA: Structure, Function, and Developability. *Antibodies*, 8(4), 57-86. <https://doi.org/10.3390/antib8040057>
- 6- Yel, L. (2010). Selective IgA Deficiency. *Journal of Clinical Immunology*, 30(1), 10-16. <https://doi.org/10.1007/s10875-009-9357-x>
- 7- Swain, S., Selmi, C., Gershwin, M. E. et Teuber, S. S. (2019). The clinical implications of selective IgA deficiency. *Journal of Translational Autoimmunity*, 2, 100025-100030. <https://doi.org/10.1016/j.jtauto.2019.100025>
- 8- Hand, T. W. et Reboldi, A. (2021). Production and Function of Immunoglobulin A. *Annual Review of Immunology*, 39(1), 695-718. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-102119-074236>
- 9- Woof, J. M. et Kerr, M. A. (2006). The function of immunoglobulin A in immunity. *The Journal of Pathology*, 208(2), 270-282. <https://doi.org/10.1002/path.1877>
- 10- Sandler, G. S. (2006). How I manage patients suspected of having had an IgA anaphylactic transfusion reaction. *Transfusion*, 46(1), 10-13. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2006.00686.x>
- 11- Rachid, R. et Bonilla, F. A. (2012). The role of anti-IgA antibodies in causing adverse reactions to gamma globulin infusion in immunodeficient patients: A comprehensive review of the literature. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 129(3), 628-634. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.06.047>
- 12- Guo, X., Meng, G., Liu, F., Zhang, Q., Liu, L., Wu, H., Du, H., Shi, H., Xia, Y., Liu, X., Li, C., Bao, X., Su, Q., Gu, Y., Fang, L., Yu, F., Yang, H., Yu, B., Sun, S., Wang, X., Zhou, M., Jia, Q., Chen, X., Huang, G., Song, K. et Niu, K. (2016). Serum levels of immunoglobulins in an adult population and their relationship with type 2 diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 115, 76-82. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2016.03.007>

- 13- Sadeghian, M. H., Keramati, M. R., Ayatollahi, H., Manavifar, L., Enaiati, H. et Mahmoudi, M. (2010). Serum immunoglobulins in patients with iron deficiency anemia. *Indian J Hematol Blood Transfus*, 26(2), 45-48. <https://doi.org/10.1007/s12288-010-0025-3>
- 14- Hammarström, L., Vorechovsky, I. et Webster, D. (2001). Selective IgA deficiency (SIgAD) and common variable immunodeficiency (CVID). *Clinical and Experimental Immunology*, 120(2), 225-231. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2000.01131.x>
- 15- Palmer, D. S., O'Toole, J., Montreuil, T., Scalia, V., Yi, Q.-L., Goldman, M. et Towns, D. (2010). Screening of Canadian Blood Services donors for severe immunoglobulin A deficiency. *Transfusion*, 50(7), 1524-1531. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2010.02588.x>
- 16- Latiff, A. H. A. et Kerr, M. A. (2007). The clinical significance of immunoglobulin A deficiency. *Annals of Clinical Biochemistry: International Journal of Laboratory Medicine*, 44(2), 131-139. <https://doi.org/10.1258/000456307780117993>
- 17- Robitaille, N., Delage, G., Long, A., Thibault, L. et Robillard, P. (2010). Allergic transfusion reactions from blood components donated by IgA-deficient donors with and without anti-IgA: a comparative retrospective study. *Vox Sanguinis*, 99(2), 136-141. <https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.2010.01326.x>
- 18- Sandler, S. G., Eder, A. F., Goldman, M. et Winters, J. L. (2015). The entity of immunoglobulin A-related anaphylactic transfusion reactions is not evidence based. *Transfusion*, 55(1), 199-204. <https://doi.org/10.1111/trf.12796>
- 19- Khandelwal, A. Clarke, G. Goldman, M. *Anaphylactic transfusion reactions and IgA deficiency. Canadian Blood services.* <https://professionaleducation.blood.ca/en/transfusion/publications/anaphylactic-transfusion-reactions-and-iga-deficiency> (Consulted in October 2022).
- 20- Lieberman, P., Nicklas, R. A., Oppenheimer, J., Kemp, S. F., Lang, D. M., Bernstein, D. I., Bernstein, J. A., Burks, A. W., Feldweg, A. M., Fink, J. N., Greenberger, P. A., Golden, D. B., James, J. M., Kemp, S. F., Ledford, D. K., Lieberman, P., Sheffer, A. L., Bernstein, D. I., Blessing-Moore, J., Cox, L., Khan, D. A., Lang, D., Nicklas, R. A., Oppenheimer, J., Portnoy, J. M., Randolph, C., Schuller, D. E., Spector, S. L., Tilles, S. et Wallace, D. (2010). The diagnosis and management of anaphylaxis practice parameter: 2010 update. *J Allergy Clin Immunol*, 126(3), 477-480.e471-442. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.06.022>
- 21- Kiani-Alikhan, S., Yong, P. F. K., Grosse-Kreul, D., Height, S. E., Mijovic, A., Suddle, A. R. et Ibrahim, M. A. A. (2010). Successful desensitization to immunoglobulin A in a case of transfusion-related anaphylaxis. *Transfusion*, 50(9), 1897-1901. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2010.02662.x>
- 22- Alzate, M. A., Manrique, L. G., Bolaños, N. I., Duarte, M., Coral-Alvarado, P., & González, J. M. (2015). Simultaneous detection of IgG, IgM, IgA complexes and C3d attached to erythrocytes by flow cytometry. *International Journal of Laboratory Hematology*, 37(3), 382-389. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12297>

- 23- Cook, A. M., Faustini, S. E., Williams, L. J., Cunningham, A. F., Drayson, M. T., Shields, A. M., Kay, D., Taylor, L., Plant, T., Huissoon, A., Wallis, G., Beck, S., Jossi, S. E., Perez-Toledo, M., Newby, M. L., Allen, J. D., Crispin, M., Harding, S., & Richter, A. G. (2021). Validation of a combined ELISA to detect IgG, IgA and IgM antibody responses to SARS-CoV-2 in mild or moderate non-hospitalised patients. *J Immunol Methods*, 494, 113046-113052. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2021.113046>
- 24- Dasso, J., Lee, J., Bach, H., & Mage, R. G. (2002). A comparison of ELISA and flow microsphere-based assays for quantification of immunoglobulins. *Journal of Immunological Methods*, 263(1), 23-33. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(02\)00028-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-1759(02)00028-5)
- 25- Li, R., Wen, Y., Yang, L., Qian, Q.-s., Chen, X.-x., Zhang, J.-q., Li, X., Xing, B.-s., Qiao, S., & Zhang, G. (2023). Development of an enzyme-linked immunosorbent assay based on viral antigen capture by anti-spike glycoprotein monoclonal antibody for detecting immunoglobulin A antibodies against porcine epidemic diarrhea virus in milk. *BMC Veterinary Research*, 19(1), 46. <https://doi.org/10.1186/s12917-023-03605-4>
- 26- Swami, A. N., Kale, L. M., Choudhary, S. H., Singh, A. K., Aldhuwayhi, S. D., & Thakare, A. (2022). Estimation of serum immunoglobulin G and immunoglobulin A levels in oral submucous fibrosis patients. *Natl J Maxillofac Surg*, 13(1), 67-71. https://doi.org/10.4103/njms.NJMS_238_20
- 27- Osaki, S., Wakida, S.-i., Saito, M., & Tamiya, E. (2021). Towards On-site Determination of Secretory IgA in Artificial Saliva with Gold-Linked Electrochemical Immunoassay (GLEIA) Using Portable Potentiostat and Disposable Printed Electrode. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 193(5), 1311-1320. <https://doi.org/10.1007/s12010-020-03332-8>
- 28- Pineda-Martínez, S., Hernández-Islas, J. L., Escobedo-Torres, M. P., Paredes-Alonzo, I. E., López-Candiani, C., Correa, D., & Vela-Amieva, M. (2016). Immunoglobulin Concentrations in Plasma and Saliva During the Neonatal Period. *Pediatrics & Neonatology*, 57(3), 213-218. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pedneo.2015.06.005>
- 29- Nimse, S. B., Sonawane, M. D., Song, K.-S., & Kim, T. (2016). Biomarker detection technologies and future directions. *The Analyst*, 141(3), 740-755. <https://doi.org/10.1039/c5an01790d>
- 30- Chen, Y. T., Lee, Y. C., Lai, Y. H., Lim, J. C., Huang, N. T., Lin, C. T. et Huang, J. J. (2020). Review of Integrated Optical Biosensors for Point-Of-Care Applications. *Biosensors (Basel)*, 10(12). <https://doi.org/10.3390/bios10120209>
- 31- Hemmi, A., Usui, T., Moto, A., Tobita, T., Soh, N., Nakano, K., Zeng, H., Uchiyama, K., Imato, T. et Nakajima, H. (2011). A surface plasmon resonance sensor on a compact disk-type microfluidic device. *J Sep Sci*, 34(20), 2913-2919. <https://doi.org/10.1002/jssc.201100446>
- 32- Masson, J.-F. (2017). Surface Plasmon Resonance Clinical Biosensors for Medical Diagnostics. *ACS Sensors*, 2(1), 16-30. <https://doi.org/10.1021/acssensors.6b00763>

- 33- Schasfoort, R. B. M. (2017). Introduction to Surface Plasmon Resonance. Dans (p. 1-26). The Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/9781788010283-00001>
- 34- Yesudasu, V., Pradhan, H. S. et Pandya, R. J. (2021). Recent progress in surface plasmon resonance based sensors: A comprehensive review. *Heliyon*, 7(3), e06321. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06321>
- 35- Mariani, S. et Minunni, M. (2014). Surface plasmon resonance applications in clinical analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406(9-10), 2303-2323. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-7647-5>
- 36- Couture, M., Zhao, S. S. et Masson, J.-F. (2013). Modern surface plasmon resonance for bioanalytics and biophysics. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 15(27), 11190. <https://doi.org/10.1039/c3cp50281c>
- 37- Geilfuss, D., Boukherroub, R., Dostalek, J., Knoll, W., Masson, J.-F., Baeumner, A. J. et Szunerits, S. (2022). Can classical surface plasmon resonance advance via the coupling to other analytical approaches? [Review]. *Frontiers in Analytical Science*, 2. <https://doi.org/10.3389/frans.2022.1091869>
- 38- Caide, X. et Sui, S.-F. Characterization of surface plasmon resonance biosensor. (2000). *Sensors and Actuators B: Chemical*, 66(1), 174-177. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0925-4005\(00\)00372-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0925-4005(00)00372-5)
- 39- Gupta, B. D. et Verma, R. K. Surface Plasmon Resonance-Based Fiber Optic Sensors: Principle, Probe Designs, and Some Applications. (2009). *Journal of Sensors*, 979761. <https://doi.org/10.1155/2009/979761>
- 40- Piliarik, M., Vaisocherová, H. et Homola, J. (2009). Surface Plasmon Resonance Biosensing. *Methods in Molecular Biology: Biosensors and Biodetection*, 65-88. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-567-5_5
- 41- Prabowo, B., Purwidyantri, A. et Liu, K.-C. (2018). Surface Plasmon Resonance Optical Sensor: A Review on Light Source Technology. *Biosensors*, 8(3), 80. <https://doi.org/10.3390/bios8030080>
- 42- Masson, J.-F. (2020). Portable and field-deployed surface plasmon resonance and plasmonic sensors. *The Analyst*, 145(11), 3776-3800. <https://doi.org/10.1039/d0an00316f>
- 43- Wang, D.-S. et Fan, S.-K. (2016). Microfluidic Surface Plasmon Resonance Sensors: From Principles to Point-of-Care Applications. *Sensors*, 16(8), 1175. <https://doi.org/10.3390/s16081175>
- 44- Breault-Turcot, J., Chaurand, P. et Masson, J.-F. (2014). Unravelling Nonspecific Adsorption of Complex Protein Mixture on Surfaces with SPR and MS. *Analytical Chemistry*, 86(19), 9612-9619. <https://doi.org/10.1021/ac502077b>
- 45- Bolduc, O. R., Pelletier, J. N. et Masson, J.-F. (2010). SPR Biosensing in Crude Serum Using Ultralow Fouling Binary Patterned Peptide SAM. *Analytical Chemistry*, 82(9), 3699-3706. <https://doi.org/10.1021/ac100035s>

- 46- Bolduc, O. R., Lambert-Lanteigne, P., Colin, D. Y., Zhao, S. S., Proulx, C., Boeglin, D., Lubell, W. D., Pelletier, J. N., Féthière, J., Ong, H. et Masson, J.-F. (2011). Modified peptide monolayer binding His-tagged biomolecules for small ligand screening with SPR biosensors. *The Analyst*, 136(15), 3142. <https://doi.org/10.1039/c1an15235a>
- 47- Rodriguez Emmenegger, C., Brynda, E., Riedel, T., Sedlakova, Z., Houska, M. et Alles, A. B. (2009). Interaction of Blood Plasma with Antifouling Surfaces. *Langmuir*, 25(11), 6328-6333. <https://doi.org/10.1021/la900083s>
- 48- Djaileb, A., Charron, B., Jodaylami, M. H., Thibault, V., Coutu, J., Stevenson, K., Forest, S., Live, L. S., Boudreau, D., Pelletier, J. N. et Masson, J.-F. (2020). A Rapid and Quantitative Serum Test for SARS-CoV-2 Antibodies with Portable Surface Plasmon Resonance Sensing. *American Chemical Society (ACS)*. <https://dx.doi.org/10.26434/chemrxiv.12118914.v1>
- 49- Djaileb, A., Hojjat Jodaylami, M., Coutu, J., Ricard, P., Lamarre, M., Rochet, L., Cellier-Goetghebeur, S., Macaulay, D., Charron, B., Lavallée, É., Thibault, V., Stevenson, K., Forest, S., Live, L. S., Abonnenc, N., Guedon, A., Quessy, P., Lemay, J.-F., Farnós, O., Kamen, A., Stuiblé, M., Gervais, C., Durocher, Y., Cholette, F., Mesa, C., Kim, J., Cayer, M.-P., De Grandmont, M.-J., Brouard, D., Trottier, S., Boudreau, D., Pelletier, J. N. et Masson, J.-F. (2021). Cross-validation of ELISA and a portable surface plasmon resonance instrument for IgG antibody serology with SARS-CoV-2 positive individuals. *The Analyst*, 146(15), 4905-4917. <https://doi.org/10.1039/d1an00893e>
- 50- Wickramathilaka, M. P., & Tao, B. Y. (2019). Characterization of covalent crosslinking strategies for synthesizing DNA-based bioconjugates. *Journal of Biological Engineering*, 13(1), 63-72. <https://doi.org/10.1186/s13036-019-0191-2>
- 51- Fischer, M. J. E. (2010). Amine Coupling Through EDC/NHS: A Practical Approach. In N. J. Mol & M. J. E. Fischer (Eds.), *Surface Plasmon Resonance: Methods and Protocols* (pp. 55-73). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-670-2_3
- 52-Bart, J., Tiggelaar, R., Yang, M., Schlautmann, S., Zuilhof, H., & Gardeniers, H. (2009). Room-temperature intermediate layer bonding for microfluidic devices. *Lab on a Chip*, 9(24), 3481. <https://doi.org/10.1039/b914270c>
- 53-Asiaei, S., Smith, B., & Nieva, P. (2015). Enhancing conjugation rate of antibodies to carboxylates: Numerical modeling of conjugation kinetics in microfluidic channels and characterization of chemical over-exposure in conventional protocols by quartz crystal microbalance. *Biomicrofluidics*, 9(6), 064115. <https://doi.org/10.1063/1.4937929>
- 54-Sarcina, L., Delre, P., Graziano, G., Stefanachi, A., Blasi, D., Picca, R. A., Di Franco, C., Leonetti, F., Scamarcio, G., Bollella, P., Mangiatordi, G. F., Macchia, E., & Torsi, L. (2023). Controlling the Binding Efficiency of Surface Confined Antibodies through the Design of Mixed Self-Assembled Monolayers. *Advanced Materials Interfaces*, 10(12). <https://doi.org/10.1002/admi.202300017>
- 55-Tricase, A., Blasi, D., Favia, A., Stefanachi, A., Leonetti, F., Colafemmina, G., Torsi, L., & Scamarcio, G. (2021). Surface composition of mixed self-assembled monolayers on Au by infrared

attenuated total reflection spectroscopy. *Applied Surface Science*, 559, 149883. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2021.149883>

56- Soutar, R., McSparran, W., Tomlinson, T., Booth, C. et Grey, S. (2023). Guideline on the investigation and management of acute transfusion reactions. *British Journal of Haematology*, 201(5), 832-844. <https://doi.org/10.1111/bjh.18789>

57- Palmer, D. S., O'Toole, J., Montreuil, T., Scalia, V. et Goldman, M. (2012). Evaluation of particle gel immunoassays for the detection of severe immunoglobulin A deficiency and anti-human immunoglobulin A antibodies. *Transfusion*, 52(8), 1792-1798. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2011.03513.x>

58- Goudarzi, S., Ahmadi, A., Farhadi, M., Kamrava, S. K., Saghafi, S. et Omidfar, K. (2015). Development of a new immunochromatographic assay using gold nanoparticles for screening of IgA deficiency. *Iran J Allergy Asthma Immunol*, 14(1), 105-112.

59- Liu, D., Wang, J., Wu, L., Huang, Y., Zhang, Y., Zhu, M., Wang, Y., Zhu, Z. et Yang, C. (2020). Trends in miniaturized biosensors for point-of-care testing. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 122, 115701. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115701>

60- Suleman, S., Shukla, S. K., Malhotra, N., Bukkitgar, S. D., Shetti, N. P., Pilloton, R., Narang, J., Nee Tan, Y. et Aminabhavi, T. M. (2021). Point of care detection of COVID-19: Advancement in biosensing and diagnostic methods. *Chemical Engineering Journal*, 414, 128759. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.128759>

61- Celprogen. *Human Immunoglobulins (IgG, IgA, IgM and IgE) Depleted Serum solution: 50ml*. <https://celprogen.com/human-immunoglobulins-igg-iga-igm-and-ige-depleted-serum-solution-50ml/> (consulted in January 2022).

62- Hojjat Jodaylami, M., Djaïleb, A., Ricard, P., Lavallée, É., Cellier-Goetghebeur, S., Parker, M. F., Coutu, J., Stuible, M., Gervais, C., Durocher, Y., Desautels, F., Cayer, M. P., de Grandmont, M. J., Rochette, S., Brouard, D., Trottier, S., Boudreau, D., Pelletier, J. N. et Masson, J. F. (2021). Cross-reactivity of antibodies from non-hospitalized COVID-19 positive individuals against the native, B.1.351, B.1.617.2, and P.1 SARS-CoV-2 spike proteins. *Sci Rep*, 11(1), 21601. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00844-z>

63- Chisanga, M., Stuible, M., Gervais, C., L'Abbé, D., Cass, B., Bisson, L., Pelletier, A., Lord-Dufour, S., Durocher, Y., Boudreau, D., Trottier, S., Pelletier, J. N. et Masson, J.-F. (2022). SERS-based assay for multiplexed detection of cross-reactivity and persistence of antibodies against the spike of the native, P.1 and B.1.617.2 SARS-CoV-2 in non-hospitalised adults [10.1039/D2SD00073C]. *Sensors & Diagnostics*, 1(4), 851-866. <https://doi.org/10.1039/D2SD00073C>

64- Bolduc, O. R. et Masson, J. F. (2008). Monolayers of 3-mercaptopropyl-amino acid to reduce the nonspecific adsorption of serum proteins on the surface of biosensors. *Langmuir*, 24(20), 12085-12091. <https://doi.org/10.1021/la801861q>

65- Malone, M., Masson, J.-F., Beaudoin, S. et Booksh, K. (2005). Novel surface coatings for antibody attachment to surface plasmon resonance sensors. Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering, 6007. <https://doi.org/10.1117/12.630744>

66- Dawson R, Elliot D, Elliot W, Jones KM. 1986. Data for Biochemical Research. 3rd ed. Oxford Science Publ.