

Université de Montréal

Couplage d'un instrument SPR portable à un
bioréacteur : étude de monocouches mixtes et
d'algorithmes d'extraction de constantes d'affinité.

Par Philippe Blain

Département de chimie

Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade Maître ès sciences (M.Sc.) en
chimie

© Philippe Blain, 2020/10/27

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Alexis Vallée-Bélisle

Président-rapporteur

Jean-François Masson

Directeur de recherche

Mario Jolicoeur

Codirecteur

Gregory Decrescenzo

Membre du jury

Résumé

Même si les anticorps sont plus connus pour leur capacité à neutraliser les agents infectieux en se liant aux antigènes via leurs paratopes, leurs fragments cristallisables (Fc) sont aussi impliqués dans la signalisation des réponses immunitaires en se liant à des récepteurs spécifiques. Les interactions entre les récepteurs et les anticorps sont reconnues pour être affectées par la glycosylation des anticorps. Pour observer la cinétique de telles interactions biologiques, une des méthodes les plus utilisées est la spectroscopie de résonance des plasmons de surface (SPR). La synthèse et l'analyse, via SPR, d'anticorps en laboratoire sont un procédé long et exigeant si toutes les étapes sont réalisées manuellement.

La possibilité d'effectuer le couplage d'un appareil SPR commercial à un bioréacteur pourrait être envisagée, mais le coût d'achat et d'opération d'un tel appareil SPR limiterait l'utilité d'un tel projet pour une possible utilisation à plus grande échelle. C'est pourquoi le couplage d'un appareil SPR de faible coût et d'un bioréacteur serait avantageux. Cela permettrait de superviser la synthèse des anticorps et leur affinité au récepteur en temps "réel".

Ce mémoire de maîtrise explorera le développement de deux des composantes nécessaires pour la réalisation de ce couplage entre le SPR et un bioréacteur, soit la chimie de surface pour passiver le capteur SPR et un algorithme d'optimisation par nuée de particules (Particles swarm Optimisation) évolutive. L'algorithme réalisera une corrélation du signal obtenue d'un instrument P4-SPR aux équations cinétiques décrivant les interactions entre les anticorps et leurs récepteurs dans le but d'obtenir les constantes cinétiques et thermodynamiques (K_d, k_{on}, k_{off}). De plus, ce mémoire présentera une étude qui a été réalisée afin de minimiser l'adsorption non spécifique des molécules composant le biocapteur et maximiser le signal de l'anticorps Trastuzumab (TZM), utilisé dans le couplage de l'instrument P4-SPR au bioréacteur, sur des monocouches de composition variée.

Mots Clés : Constantes d'affinité, algorithme, SPR, anticorps, PSO, corrélation non-linéaire.

Abstract

While antibodies are best known to help the neutralization of pathogens by binding to the antigens with their paratope, their crystallizable fragment region (Fc region) is also used to trigger immune response by binding to specific receptors. Interactions between receptors and antibodies are known to be affected by the glycosylation the antibodies. To observe the kinetic of those interactions, one of the favored method is surface plasmon resonance (SPR). However, a substantial time may have elapsed between synthesis of a modified antibody and its test in a SPR apparatus as the two are not coupled and oftentimes in different laboratories. The coupling of a SPR and a bioreactor would accelerate the process, but using a commercial instrument would limit its usefulness due to the high price and high cost of use of these SPR instruments. This is why the coupling of a low-cost SPR to a bioreactor is of interesting in the context of glycosylated antibody production. This could permit to monitor the synthesis of the antibody and its affinity to the target receptor in near real time.

This masters' thesis will show the development of two of the essential components, consisting in the surface chemistry to passivate the SPR chip and an algorithm using an evolving PSO (Particles Swarm Optimisation), to estimate kinetic and thermodynamics constants (K_d, k_{on}, k_{off}) by correlating the signal obtained of a P4-SPR instrument to the kinetic and thermodynamics equations describing the interactions between antibodies and their receptors. The thesis also presents the results of the tests while trying to minimize nonspecific adsorption of the molecules used for the biosensor on multiple self-assembled monolayers (SAM) and maximize signal of the antibody named Trastuzumab (TZM) and used in the coupling of the P4-SPR to the bioreactor.

Keywords: affinity constants, algorithm, SPR, antibodies, PSO, non-linear correlation.

Table des matières

Résumé	i
Abstract	ii
Table des matières	iii
Liste des tableaux.....	vi
Liste des figures.....	vii
Liste des sigles et des abréviations	xii
Remerciement	xiv
Chapitre 1 : Introduction	1
1.1 Préambule.....	1
1.1.1 Mise en contexte	1
1.1.2 Objectif et approche proposée.....	2
1.1.3 Plan du mémoire	4
1.2 Résonance des plasmons de surface	5
1.2.1 Historique	5
1.2.2 Théorie	6
1.2.3 Instrumentation.....	8
1.3 Monocouche autoassemblée	11
1.3.1 Historique des monocouches autoassemblées	11
1.3.2 Théorie des monocouches autoassemblées	12
1.4 Anticorps et leur cinétique en SPR.....	17
1.4.1 Anticorps.....	17

1.4.2 Cinétique des interactions Antigène-Anticorps	19
1.5 Technique analytique : Biocapteur SPR et transport de masse	21
1.5.1 Biocapteur SPR	21
1.5.2 Transport de Masse	22
1.5.3 Test biomoléculaire réalisé via SPR	25
1.6 Algorithme d'optimisation	28
1.6.1 Nelder-Mead	29
1.6.2 PSO	30
1.7 Conclusion	36
Chapitre 2 : Chimie de surface des monocouches	37
2.1 Introduction	37
2.2 Montages moléculaires testés	37
2.3 Méthodologie expérimentale	39
2.3.1 Appareils utilisés	39
2.3.2 Test SPR	39
2.4 Résultats expérimentaux et discussion	44
2.4.1 Monocouche de 16-mercaptohexadecanoïque, 1-dodécane-thiol,	45
2.4.2 Monocouche de C5	47
2.4.3 Monocouche d'acide 3-mercaptopropionique-LHDLHD	48
2.4.4 Monocouche de PEG	49
2.5 Conclusion des tests sur diverses monocouches	52
Chapitre 3 : Algorithme de corrélation	55
3.1 Introduction	55
3.2 Caractéristiques nécessaires au programme	55
3.3 Élément technique du programme	56

3.3.1 Langage de programmation.....	56
3.3.2 Portabilité et format final du programme.....	57
3.4 Développement du programme.....	58
3.4.1 Critère d'optimisation.....	58
3.4.2 Première version : Nelder-Mead.....	60
3.4.3 Deuxième version : Nelder-Mead et PSO.....	63
3.4.4 Troisième version : PSO.....	65
3.4.5 Quatrième version : PSO et algorithme évolutif.....	65
3.5 Résultat de l'algorithme final.....	71
3.5.1 Test : Nombre d'itérations maximal du programme.....	73
3.5.2 Test : Nombre d'itérations entre les découvertes d'un nouveau Best G	77
3.5.3 Test : Pourcentage de chance de mutation.....	80
3.5.4 Test : Pourcentage de mutation.....	83
3.5.5 Conclusion des tests réalisés avec l'algorithme.....	86
Conclusion et Perspective future.....	87
Bibliographie.....	89
Annexes.....	94

Liste des tableaux

Tableau 1 : Impact des variables initiales sur les résultats de l'algorithme de Nelder-Mead, utilisé dans Matlab sous le nom de fminsearchbnd pour obtenir les valeurs de K_d et R_{max} après corrélation avec l'équation (26) en utilisant les données représentées à la Figure 40 où la valeur de K_d et R_{max} initial sont respectivement $1.20 \times 10^{-12} M$ et $1.54 u$	62
Tableau 2 : Valeurs des variables K_d et R_{max} obtenues de la corrélation, en utilisant l'algorithme hybride Nelder-Mead-PSO, avec des valeurs théoriques obtenues avec l'équation (26), utilisant pour les cinq tests comme valeur de K_d et R_{max} respectivement $6.33 \times 10^{-7} M$ et 2.563 (intervalle recherché : $R_{max} : [0, 4]$, $K_d : [10^{-12}, 1]$).	63
Tableau 3 : Valeur moyenne de la meilleure corrélation réalisée avec les données de l'Annexe A.1 - obtenue durant le test 5, variation du pourcentage de mutation.....	85
Tableau 4 : Valeur des constantes utilisées dans l'équation (26) pour créer les valeurs utilisées dans la corrélation réalisée par l'algorithme PSO évolutif du chapitre 3.5	94

Liste des figures

Figure 1 : Schéma global du montage proposé pour permettre le couplage d'une P4-SPR à un Bioréacteur créer un montage automatisé.....	3
Figure 2 : Champ électrique évanescent causé par l'excitation des plasmons de surface excitée par un faisceau lumineux en réfraction totale interne, selon la configuration de Kretschmann.....	7
Figure 3 : Instrument SPR dans la configuration de Kretschmann. (A) Longueur d'onde fixe et interrogation de l'angle incident. (B) Angle fixe et interrogation de la longueur d'onde.	9
Figure 4 : A) P4-SPR branché à un ordinateur portable. B) Cellule fluidique à quatre canaux, dont 3, pour réaliser un triplicata de mesure (3 premières flèches en partant du haut) et le dernier servant de référence. ¹⁶	10
Figure 5 : Représentation d'une chaîne alkyle adsorbée sur une surface d'or et de son groupement de tête et celui terminal.	12
Figure 6 : Formation d'une SAM composée d'alcane thiolés sur une surface d'or ²⁵	13
Figure 7 : Réaction de formation d'un lien peptidique avec du EDC/NHS entre un groupement acide carboxylique d'une molécule composant la monocouche (R_1) et une amine primaire sur la molécule d'intérêt (R_4). Réaction faite à T_p en milieu aqueux ³⁰	15
Figure 8 : Représentation d'un anticorps de type IgG. 1 : Paratope. 2 : Chaîne légère (C_L en bleu et V_L en vert). 3 : Lien disulfure maintenant la cohésion des chaînes. 4 : Section V_H et C_H1 respectivement vert et bleu de la chaîne lourde. 5 : Section C_H2 et C_H3 respectivement bleu et jaune de la chaîne lourde. 6 : Fragment de liaison à l'antigène (Fab). 7 : Fragment cristallisable (F_c).....	18
Figure 9 : Modèle d'association représentant des interactions biomoléculaires 1) Modèle bimoléculaire simple. 2) Modèle bimoléculaire limité par le transport de masse. 3) Modèle bimoléculaire comprenant un changement de la conformation intramoléculaire. 4) Modèle bimoléculaire formant un dimère ⁴⁴	20
Figure 10 : Profil de vitesse théorique d'un fluide dans un cylindre de longueur infinie.....	23

Figure 11 : Représentation d'un signal SPR théorique obtenue par un essai direct, dans un canal en écoulement laminaire continue représenté par les flèches, entre un anticorps et son récepteur à plusieurs étapes du test ($K_{on} : 9,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ $K_{off} : 1 \times 10^{-2} \text{ S}^{-1}$). Ligne grise représentant la limitation entre la zone stagnante près du biocapteur et la zone avec une vitesse d'écoulement non nulle. Ligne bleue (étapes 1-3) phase d'association durant laquelle la solution tampon contenant les anticorps est injectée. Ligne orange (étapes 4-5) phase de dissociation réalisée en injectant une solution tampon. 27

Figure 12 : Exemple de déplacement simplifié et entrecoupé, réalisé par l'algorithme d'optimisation Nelder-Mead. Ceci est visualisé via les étapes de déplacement du simplex à travers l'équation connue sous le nom de <<Rosenbrock Banana Function>> 30

Figure 13 : Organigramme de programmation général d'une PSO minimisant la valeur du fit. Fit : valeur obtenue avec un ensemble de valeurs ; VC : Valeur courante des variables pour la particule; VC_Fit : Valeur courante du fit pour la particule; BP : valeur des variables du Best P de la particule; BP_Fit : Fit obtenu à partir du Best P de la particule; BG : valeur des variables du Best G de l'essaim; BG_Fit : Fit obtenu à partir du Best G de l'essaim. 32

Figure 14 : Représentation des trois vecteurs utilisés pour mettre en image le déplacement des particules de l'essaim utilisées durant la première itération du programme..... 33

Figure 15 : Représentation du déplacement des particules d'un essaim à chaque itération du programme. Flèche verte : vecteur cognitif. Flèche noire : vecteur aléatoire. Flèche rouge : vecteur social. Flèche bleue : vecteur final. Particule rouge : Solution offrant le meilleur fit découverte par l'essaim (Best G)..... 35

Figure 16 : Représentation des montages biologiques utilisés pour les tests réalisés via SPR avec (b) et sans (a) utilisation du complexe Biotine-Streptavidine. 38

Figure 17 : Cellule fluidique à 4 canaux dont 3 sont analytiques et 1 de référence utilisée en recouvrant le prisme de Dove recouvert d'une couche d'or. 40

Figure 18 : Cellule fluidique à 4 canaux indépendants utilisés dans les appareils P4-SPR. 41

Figure 19 : Variation du signal SPR normalisé par la différence de signal entre de l'eau désionisée (18,2 MΩ) et le tampon HSB-EP, associé à l'adsorption non spécifique et de trois protéines multipliées (l'anticorps TZM; le récepteur FcγRIIIa; K5) sur différentes monocouches de composition variée .A : 1-(carboxypentyl)-3-(mercaptododecyl)-imidazoliumbromide (C5) et 11-Mercapto-1-undecanol dans un ratio 1 :10 , B : 1-dodécanthiol, C : C5 et 1-dodécanthiol dans un ratio 1 :10 , D : acide 16-mercaptohexadecanoïque et 1-dodécanthiol dans un ratio 1 :1, E : C5 préactivé et 1-dodécanthiol dans un ratio 1 :10. 46

Figure 20 : Signal obtenue de l'essai direct et de l'adsorption non spécifique de l'anticorps TZM, la streptavidine(100 μM) et/ou de la streptavidine 10 fois plus concentrée (1000 μM) et du K5 biotinylé composant le montage biologique sur une surface composée de différent pourcentage de PEG biotinylé et PEG non biotinylé. A : 100% , B : 95% , C : 75% de PEG non biotinylé 51

Figure 21 : Pourcentage de chance associé à chaque rang, pour 15 rang total, selon la méthode de sélection par rang "Rank Sélection" et selon l'équation (29). Chaque pourcentage est arrondi. 69

Figure 22 : Pourcentage de différence totale moyenne entre les valeurs exactes et celles obtenues de la corrélation des données en fonction du nombre total d'itérations (voir Annexe A.1)..... 73

Figure 23 : Valeurs moyennes des constantes cognitives des meilleurs essais en fonction du nombre d'itérations maximal pour les essais de type V_{max} et $C_{constri}$... 74

Figure 24 : Pourcentage de différence totale moyenne entre les valeurs exactes et celles obtenues de la corrélation des données (voir Annexe A.1) selon le type d'essai et en fonction du nombre d'itérations total..... 75

Figure 25 : Durée de vie moyenne, en nombre d'itération, des meilleurs essais en fonction du nombre total d'itérations selon le type d'essai. 76

Figure 27 : Pourcentage d'essais de types $C_{constri}$ en fonction du nombre d'itérations maximum entre deux découvertes de nouveau Best G pour 200 tests de corrélation. 78

Figure 28 : Fit selon le type d'essai et en fonction du nombre d'itérations maximal entre chaque découverte de nouveaux Best G. 79

Figure 29 : Pourcentage moyen de différence total entre les variables moyennes obtenues de la corrélation et les valeurs ayant servie à la création des données utilisées dans la corrélation (voir Annexe A.1) selon le type d'essai et en fonction du nombre d'itérations maximal entre chaque découverte de nouveau Best G.	79
Figure 30 : Valeurs moyennes des constantes sociale et cognitive des meilleurs essais de types V_{max} en fonction du pourcentage de chance de mutation.	81
Figure 31 : Valeur moyenne de la constante de constriction en fonction du pourcentage de chance de mutation.	82
Figure 32 : Valeur moyenne de la constante sociale (a) et de la constante cognitive (b) des essais de types V_{max} en fonction du pourcentage de mutation.....	83
Figure 33 : Valeur moyenne de la constante de constriction des essais de types $C_{constri}$ en fonction du pourcentage de mutation.	84
Figure 34 : Pourcentage moyen de différence totale entre les variables moyennes obtenues de la corrélation et les valeurs ayant servi à la création des données utilisées dans la corrélation (voir Annexe A.1) en fonction du pourcentage de mutation pour chaque type d'essai.....	85
Figure 35 : Mise en graphique des valeurs obtenues via l'équation (26) en utilisant les valeurs du	94
Figure 36 : Spectre de masse du peptide 3-mercaptopropionnic-LHD-LHD, dégradé (a) et intact (b) ($[M+H]^+ = 837.50m/z$, $[M+2H]^{2+} = 419.34m/z$).....	96
Figure 37 : Signal SPR moyen obtenu à lors de l'hydratation de la surface de PEG par de l'eau désioniser (18,2mMΩ)	97
Figure 38 : Signal SPR lié à la stabilisation du signal d'une solution de HSB-EP dans les 3 canaux d'analyse sur une monocouche composée de 25% PEG biotinylé et 75% de PEG.	98
Figure 39 : Variation de signal SPR associer à l'essai direct entre l'anti-IgG lié à une monocouche de 16-mercaptophexadecanoic et de 1-dodecanthiol dans un ratio 1 :10 et de l'anti IgG pour des concentrations de 50,100,250,500,1000nm.	99
Figure 40 : Données théoriques obtenues à partir de l'équation (26) en utilisant un K_d égal à $1.20 \times 10^{-12}M$, un R_{max} égal à 1.54u et un R_a égal à 0u, à plusieurs concentration (10,50,100,250,500,750,1000pM).	100

Figure 41 : (a) Fit et (b) Pourcentage moyen de différence totale entre les variables moyennes obtenue de la corrélation et les valeurs ayant servi à la création des données utilisées dans la corrélation (voir Annexe A.1) en fonction du pourcentage de chance de mutation. 101

Figure 26 : Constante sociale et cognitive moyenne multipliée à la constante de constriction moyenne des essaims de types $C_{constri}$ en fonction du nombre d'itérations maximum entre deux découvertes de nouveau Best G..... 102

Liste des sigles et des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique

Best G : meilleure combinaison de variable déjà obtenue par l'essaim

Best P : meilleure combinaison de variable déjà obtenue par la particule

BSA : Albumine de sérum bovin

C5 : 1-(carboxypenthyl)-3-(mercaptododecyl)-imidazoliumbromide

DIC : N,N'-Diisopropylcarbodiimide

DLL : Bibliothèque de liens dynamiques

DMF : N,N-Diméthylformamide

Dodec : 1-dodecanthiol

EDC : Hydrochlorure de N-(3-diméthylaminopropyl)-N'-éthylcarbodiimide

Fab : Fragment de liaison à l'antigène

Fc : Fragment cristallisable

Fit : "fitness" des variables

GUI : interface graphique

HSB-EP : Tampon salin d'HEPES – EDTA Polysorbate 20 (0.01M HEPES, pH 7.4
0.15M NaCl, 3mM EDTA, 0.005% v/v Polysorbate 20)

IgG : Immunoglobulin G

LHD-LHD : 3-mercaptopropionic-LHD-LHD

LIB : Bibliothèque logicielle

16-MHA : acide 16-mercaptohexadécanoïque

11-MUO : 11-Mercapto-1-undécanol

NHS : N-hydroxysuccinimide

PDEA : 2-(2-pyridinyldithio)ethanamine

PDMS : polydiméthylsiloxane

PEG : Polyéthylène glycol

PSO : Optimisation par nuée de particules

RIU : Unité d'indice de réfraction

Rmax : Signal maximum obtenu une fois que tous les sites actifs sont occupés

SAM : Monocouche auto assemblée

SPR : Résonance des plasmons de surface

Tp : Température de la pièce

TSBG : nombre d'itérations sans nouveau Best G

TZM : Trastuzumab

U : Unité arbitraire

Remerciement

Ce mémoire est mon dernier “devoir” que j’aurais à rendre à un professeur et clairement mon plus massif. Le résultat final de toutes mes années d’étude. Je ne crois pas que je serais arrivé jusque-là sans les personnes qui m’ont entouré et je tiens à les remercier.

Le premier et non le moindre... Roulement de tambour. Jean-François Masson mon directeur de recherche, qui m’a permis de continuer dans mes études. Merci Jean-François de m’avoir donné ma chance et juste pour que tu le saches tu étais au top de ma liste au moment de me trouver un groupe de recherche pour ma maîtrise. Sans cette maîtrise je n’aurais jamais découvert que j’aimais aussi la programmation. Les secondes personnes que j’aimerais remercier seraient les membres du groupe que j’ai côtoyé tout au long de ma maîtrise. Donc à ceux dans le groupe : Benjamin Charron, Vincent Thibault, Gregory Wallace et Julien Coutu, Simon Forest, Geneviève Granger, Simon Laporte, Mengdi Lu, Félix Lussier, Hugo-Pierre Poirier-Richard, Trevor Théoret, Haifeng Zhou, Hu Zhu et Xingjuan Zhao. Je tiens à vous dire bonne chance et merci sans vous ma maîtrise aurait été vraiment moins amusante et intéressante.

Il ne faut pas oublier les personnes ayant participé au projet ayant servi de sujet à ma maîtrise : Benoît Liberelle, Mario Jolicoeur et Gregory De Crescenzo. Merci à toi Benoît d’avoir et d’avoir à partager le doux tumulte des analyses SPR qui ne fonctionne pas quand on le veut.

Je tiens aussi à remercier spécialement ma stagiaire Sophie Wesolowski sans qui je n’aurais jamais eu à ressentir l’expérience de paniquer parce qu’il n’y avait pas assez de travail à donner.

Merci aussi à mes amis que je me suis faits durant mon Bac. Qui, dans leur entrain à réaliser des études supérieures, m’ont convaincu de faire de même.

Je tiens aussi à remercier mes meilleurs amis Mathieu Arsenault Dumas, Cédric Billat, Frédéric Plourde et François Gauthier. Je ne serais jamais allé aussi loin sans des

amis comme ça. Chequé les gars maintenant vous être cités dans un "article" scientifique !!

Je tiens aussi à remercier mes parents, Sylvie Bush et Jérôme Blain et ma sœur, lolo alias Laurence Blain alias la banshee de Laval, qui sont généralement totalement perdus à chaque fois que je parle de chimie. Sans vous je ne sais pas ce que je ferais, vous êtes ma "plus meilleure" famille. Et surtout vous avez réussi m'endurer moi et mes projets de chimie.

Un merci spécial à ma grand-mère Marie-Paule Handfeild qui m'a poussé à m'intéresser dans les sciences.

Chapitre 1 : Introduction

1.1 Préambule

1.1.1 Mise en contexte

De nos jours, les procédés répétitifs et simples tendent à être automatisés. Cela permet de limiter les erreurs, la main d'œuvre, ainsi que de minimiser le temps perdu. Cela est aussi vrai dans le domaine de la recherche où les tâches répétitives abondent, autant dans la préparation d'échantillons que leur analyse. Certaines analyses, par exemple la mesure des interactions entre protéines et de leur cinétique, sont courantes et s'effectuent avec des techniques et appareils nécessaires pour lesquels l'automatisation est intéressante.

Ceci est utile dans le domaine de la recherche médicale pour développer plus de traitements basés sur les anticorps. Ce domaine en plein essor a déjà permis la création de traitements pour plusieurs maladies telles que la maladie de Crohn, l'arthrite rhumatoïde, le psoriasis, et plusieurs types de cancer¹. Naturellement, c'est le traitement du cancer qui attire le plus d'attention, puisqu'en 2016 près de 29.6% des décès au Canada sont attribuables au cancer. Il est aussi estimé que près de la moitié de la population aurait à faire face au cancer durant leur vie². Il est donc normal que le développement de traitements basés sur les anticorps, permettant une action plus ciblée et comportant généralement moins d'effet secondaire que la chimiothérapie seule, attire l'intérêt des chercheurs.

Bien que plusieurs techniques existent pour analyser les anticorps, une technique courante consiste à utiliser des biocapteurs immobilisés dont les interactions avec l'analyte sont suivies grâce à un appareil exploitant, par exemple, la résonance des plasmons de surface (SPR). Les tests réalisés avec cette méthode pouvant être de longue durée, l'automatisation de ces appareils est donc hautement désirée. La production d'anticorps et l'analyse de ceux-ci dans un montage automatisé ont déjà été effectuées en utilisant un bioréacteur pour la synthèse d'anticorps et un SPR commercial pour réaliser leur analyse³. Cependant, le prix des appareils SPR commercialement

disponibles apporte un aspect prohibitif à l'utilisation généralisée de cette technique. L'utilisation d'appareils SPR de plus faible prix serait donc nécessaire à la mise en place de stations de synthèse et d'analyse automatisées.

1.1.2 Objectif et approche proposée

Un système SPR compact est envisagé afin de permettre l'analyse rapide d'anticorps modifiés par la glycosylation de leur fragment cristallisable (Fc) et d'observer l'impact de cette glycosylation sur les interactions cinétiques, grâce aux constantes k_{on} et k_{off} , de l'anticorps avec son récepteur. Il sera nécessaire d'utiliser un réacteur pour synthétiser le matériel biologique, d'utiliser un appareil SPR pour réaliser l'analyse des anticorps, permettre le transfert milieu de culture contenant les anticorps à l'appareil SPR tout en permettant d'injecter les autres solutions nécessaires à l'analyse de ceux-ci et pour finir, utiliser un programme pour réaliser le traitement des données afin d'obtenir rapidement les constantes cinétiques, et le tout avec un minimum d'intervention humaine.

Spécifiquement, les objectifs du mémoire sont d'évaluer la construction biologique à la surface SPR et de créer un algorithme de traitement des données permettant l'analyse en temps réel des constantes cinétiques des anticorps produits dans un bioréacteur. Pour réaliser un grand nombre de tests tout en minimisant les interventions humaines, il serait nécessaire d'utiliser un montage biomoléculaire permettant de capturer et libérer le récepteur spécifique de l'anticorps d'intérêt une fois ceux-ci dégradés, le tout sans qu'il soit nécessaire de remplacer la surface active sondée par l'appareil SPR. Puisque les anticorps proviendront d'un bioréacteur et que l'analyse de ces anticorps impliquera l'injection d'une solution de protéines complexe dans l'appareil SPR, il sera nécessaire d'employer une monocouche capable de limiter l'adsorption non spécifique de ces protéines. Plusieurs monocouches de compositions variées ont donc été testées pour optimiser le signal provenant des interactions récepteur-analyte par rapport à celui de l'adsorption non spécifique. Pour ce qui est de la construction biologique à la surface SPR, le groupe du professeur G. De Crescenzo ayant travaillé sur de tels montages, ont fourni toutes les solutions nécessaires à la réalisation des tests sur les monocouches⁴. Cette construction biologique sera composée d'une paire de

protéines de haute affinité (K_{coil} et E_{coil}). Le E_{coil} sera préalablement lié au récepteur de l'anticorps tandis que le K_{coil} serait lié à la monocouche. Leurs interactions permettraient d'immobiliser temporairement le récepteur à la monocouche formant ainsi le biocapteur.

Comme indiqué précédemment, l'utilisation d'un appareil SPR de plus faible prix permettra la création de plusieurs montages et une utilisation plus généralisée, pour permettre le suivi de la synthèse et l'analyse de plusieurs molécules biologiques dans des réacteurs distincts. Un instrument SPR de type P4-SPR de la compagnie Affinité Instruments et développé dans le laboratoire du groupe Masson sera utilisé pour réaliser un tel montage. Cependant, l'appareil P4-SPR ne permet ni l'injection automatisée de solutions ni le traitement automatique des données, il a donc été proposé d'utiliser un système de pompes péristaltiques et de valves solénoïdes, le tout, contrôlé par un microcontrôleur pour permettre l'automatisation du transfert des anticorps du bioréacteur à la P4-SPR ainsi que de permettre l'injection d'autres solutions nécessaires à l'analyse des anticorps (Figure 1).

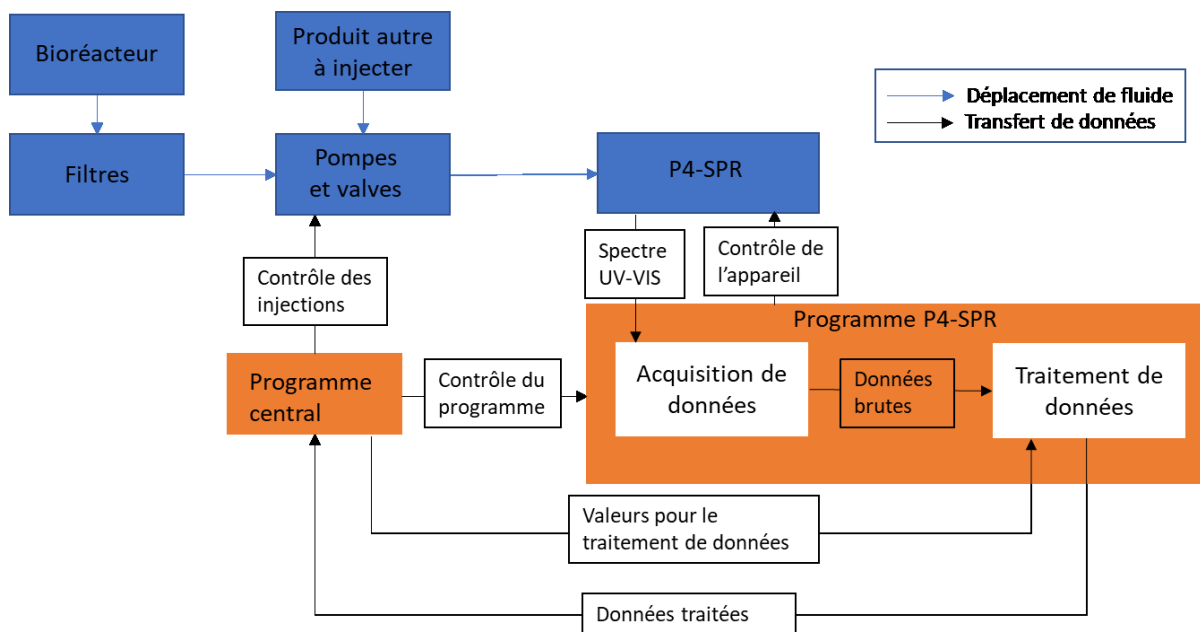


Figure 1 : Schéma global du montage proposé pour permettre le couplage d'une P4-SPR à un bioréacteur pour créer un montage automatisé permettant l'acquisition et le traitement de données en temps quasi-réel.

Il sera aussi nécessaire que l'appareil SPR soit modifié pour permettre de minimiser le temps d'attente entre chaque analyse. Une solution envisagée consiste à la modification de la cellule fluidique utilisée dans le système P4-SPR en augmentant le nombre total de canaux individuels pour permettre la réalisation de deux analyses de façon indépendante. De plus, le programme d'acquisition de données du système P4-SPR ne possède pas d'algorithme pour traiter les données pour extraire les constantes cinétiques et thermodynamiques, il sera nécessaire d'en construire un pouvant être intégré par la suite au programme réalisant l'analyse SPR automatisée. Le programme de traitement des données traitera les données produites durant la phase d'association et celle de dissociation immédiatement après l'acquisition des données.

Dans le plan initial, nous avons envisagé la création d'un programme central permettant la synchronisation et la communication entre les différentes parties du montage pour permettre son automatisation (Figure 1). Le programme central aurait permis d'ajouter les données nécessaires au traitement des données et de contrôler le montage de pompes et de valves solénoïdes.

1.1.3 Plan du mémoire

Ce mémoire sera divisé en deux parties distinctes. La première sera consacrée aux multiples tests d'adsorption non spécifique et de signal obtenu par des essais directs avec de multiples monocouches en utilisant le système P4-SPR pour valider la construction biologique. Cette partie inclura aussi toutes les modifications apportées au montage biologique initialement proposées ainsi que toutes les modifications apportées à la cellule fluidique dans le but de réaliser le couplage de la P4-SPR au bioréacteur. La seconde partie présentera les multiples programmes de corrélation non linéaire créés dans le but de déterminer la valeur des constantes cinétiques d'un couple de protéines à partir du signal SPR généré à partir d'équations cinétiques. Cette section discutera de mon cheminement, de mes hypothèses et autres éléments techniques qui m'ont permis d'arriver à mon programme final. Avant de discuter de ces aspects expérimentaux, une brève introduction est proposée pour jeter les bases théoriques associées au mémoire.

1.2 Résonance des plasmons de surface

1.2.1 Historique

Les premières observations du phénomène de résonance des plasmons de surface ont été faites par R.W Wood en 1902. Durant une expérience, impliquant l'illumination, par une lumière blanche polarisée, d'un miroir d'argent recouvert d'un réseau de diffraction à sa surface, il observa la présence de bandes "anormalement" sombre et lumineuse quand l'angle d'incidence de la lumière était à un angle particulier. Il observa également la disparition des bandes si la polarisation de la lumière incidente était modifiée⁵. En 1952, Palmer démontra qu'il était possible d'observer « l'anomalie » quand la lumière incidente était polarisée parallèlement à la surface métallique (polarisation P). Précédemment le phénomène avait seulement été observé quand la lumière était polarisée perpendiculairement à la surface (polarisation S)⁶. Durant la même année, Pines et Böhm ont suggéré que les photons causant les bandes sombres étaient absorbés par les électrons de la couche conductrice du métal pour causer une oscillation de ces électrons⁷. Le phénomène causant l'apparition de la résonance des plasmons de surface n'a pu être expliqué qu'en 1968 par Otto⁸. Durant la même année, Otto ainsi que Kretschmann et Raether ont, de façon indépendante, développé deux types montages différents pour produire un signal SPR⁹.

La configuration de Kretschmann, la plus commune des deux, comprend un prisme de verre permettant la réflectance totale atténuée directement recouverte d'un film nanoscopique de métal où se formera le plasmon. Cette configuration est la plus courante dans les appareils SPR commerciaux dus aux faits que ces appareils sont, pour la majorité, faits pour l'analyse d'échantillons liquides et que cette configuration est beaucoup plus simple. Comparativement, la configuration d'Otto requiert le contrôle nanométrique de la distance entre la surface du prisme de verre, où se produit la réflexion totale atténuée, et le film de métal réduit la force du plasmon formé¹⁰. Cette configuration est aussi beaucoup plus complexe à réaliser. La démonstration des premières applications biologiques de la SPR a été faite par Liedberg et ses collègues dans les années 1980. Leurs tests impliquaient l'observation de l'adhésion d'une couche

d'immunoglobuline G (IgG) à la surface d'un film d'argent ainsi que l'ajout d'anti-IgG se liant à l'IgG¹¹. À partir de ce moment, l'intérêt pour la SPR a grandi dans le domaine biologique, dû à la possibilité de l'utiliser pour suivre facilement la cinétique des interactions biologiques grâce à la grande sensibilité des appareils SPR ainsi que la possibilité d'obtenir des résultats quasiment en temps réel.

1.2.2 Théorie

La spectroscopie de résonance des plasmons de surface (SPR) peut être résumée comme étant une technique se basant sur la mesure de la constante diélectrique (par conséquent l'indice de réfraction) à la surface d'un film métallique, tel que Au, Ag, Al. Pour qu'un métal puisse former un plasmon de surface, il est indispensable que la valeur absolue de la constante diélectrique ($|\varepsilon_m|$) soit supérieure à celle du milieu en contact et que sa constante diélectrique possède une partie réelle négative (ε') et une partie imaginaire positive (ε'').

$$\varepsilon_m = \varepsilon' + i\varepsilon'' \quad (1)$$

Les plasmons de surface sont causés par l'oscillation collective des électrons libres de la bande de conduction, à la surface d'un métal une fois excitée par le champ électromagnétique de la lumière.¹² Cette oscillation collective peut être imaginée comme étant une vague se propageant parallèlement à l'interface métal-diélectrique (plan XY), dont l'intensité, le vecteur de champ, est maximal à l'endroit (dans le plan XY) où l'excitation s'est produite et dont l'intensité diminue exponentiellement à mesure que l'on s'éloigne de ce point d'origine. La distance de propagation (L) dans le plan XY peut être exprimée selon l'équation¹³ :

$$L = 1/[2\beta''] \quad (2)$$

Où β'' est la partie imaginaire de la constante de propagation β et où elle peut être remplacée pour donner l'équation suivante :

$$L = \frac{1}{\frac{\epsilon_m''}{(\epsilon_m')^2} \frac{\omega}{c} \left(\frac{\epsilon_m' \epsilon_d}{\epsilon_m' + \epsilon_d} \right)^{3/2}} \quad (3)$$

Où ϵ_m' et ϵ_m'' sont respectivement la partie réelle et imaginaire de la permittivité diélectrique du métal, ϵ_d est la permittivité diélectrique du milieu diélectrique, ω est la fréquence angulaire et c est la vitesse de la lumière dans le vide. Par exemple si le plasmon est formé entre 550 et 1000 nm la distance de propagation du plasmon serait entre 0,6 et 50 μm pour Au, 4 et 50 μm pour Ag et 6 et 14 μm pour Al ¹³.

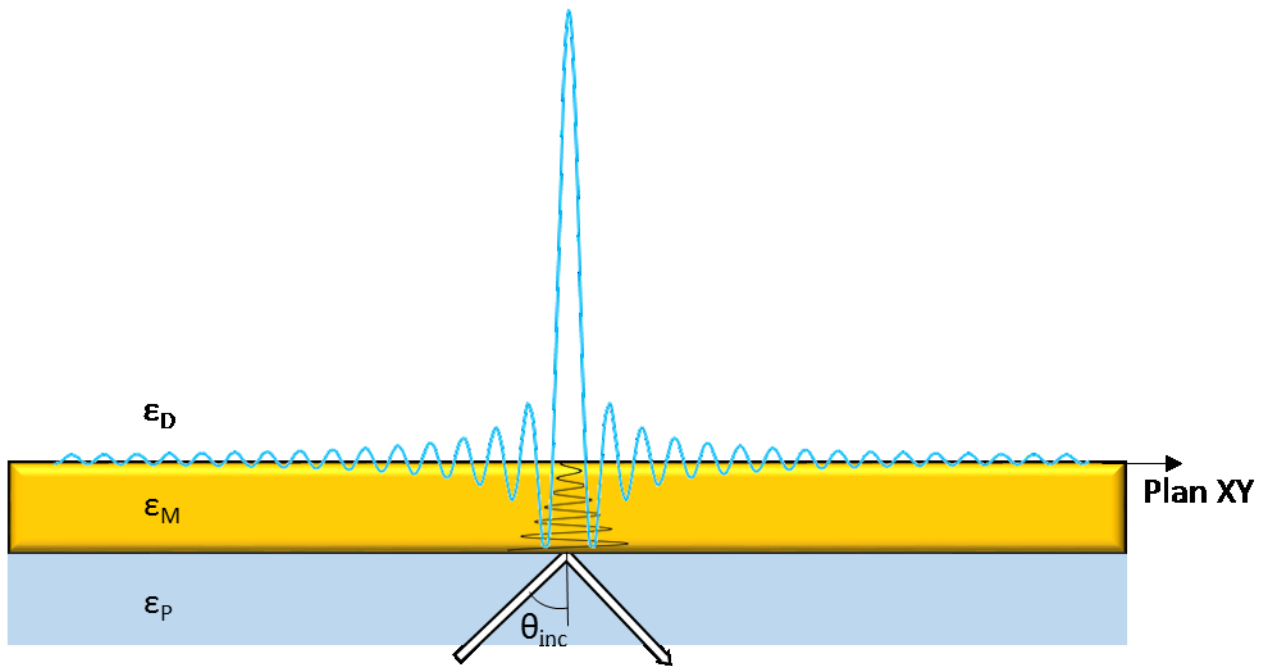


Figure 2 : Champ électrique évanescent causé par l'excitation des plasmons de surface excitée par un faisceau lumineux en réfraction totale interne, selon la configuration de Kretschmann.

L'onde du plasmon se propageant parallèlement au plan XY et étant polarisée transverse magnétique (TM), il est nécessaire que la lumière incidente ait son champ électrique perpendiculaire à la surface de métal (polarisation en p) pour causer une onde évanescente qui permettra la résonance. Pour que la résonance se produise et que le photon cause la formation d'un plasmon de surface à la surface du métal, il est nécessaire que le vecteur d'onde du plasmon de surface k_{sp} et le vecteur d'onde de la lumière

incidente polarisée p en réflexion totale interne dans la direction de l'axe des X (k_x) soient égaux. Ces deux valeurs peuvent être décrites selon les équations suivantes :

$$k_{sp} = \frac{2\pi}{\lambda} \left(\frac{\varepsilon_m \varepsilon_s}{\varepsilon_m + \varepsilon_s} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (4)$$

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

Dans ces équations ε est la permittivité diélectrique, m pour celui du métal et s est pour la solution en contact avec la surface de métal. η_D est l'indice de réfraction du prisme et θ_{inc} est l'angle de la lumière incidente. En observant ces deux équations, il est possible de voir que deux paramètres peuvent varier, l'angle d'incidence de la lumière polarisée et la longueur d'onde de la lumière. Pour exploiter le phénomène des plasmons de surface, il est nécessaire de garder l'une de ces variables à une valeur constante, soit en utilisant une lumière monochromatique et observer le changement de l'angle à laquelle le plasmon est formé ou maintenir une lumière blanche incidente à un angle donné et observer le rapport des intensités de la lumière polarisée en p et en s selon la longueur d'onde.

1.2.3 Instrumentation

Plusieurs modèles d'appareil SPR sont couramment utilisés. Dans la grande majorité des cas, la configuration de Kretschmann est utilisée (comme expliqué dans la partie historique). Les montages utilisant l'interrogation des angles en utilisant des pièces mobiles ont comme avantage d'obtenir des résultats de très grandes précisions, mais leur prise de mesure trop longue empêche leur utilisation pour suivre la cinétique d'une réaction. Il est aussi possible d'utiliser un montage interrogeant simultanément tous les angles possibles. Ce type de montage permet une prise extrêmement rapide des

mesures tout en gardant une grande précision. Mais, l'alignement et les pièces optiques doivent être parfaitement conçus et sont susceptibles à des variations d'origine mécanique.

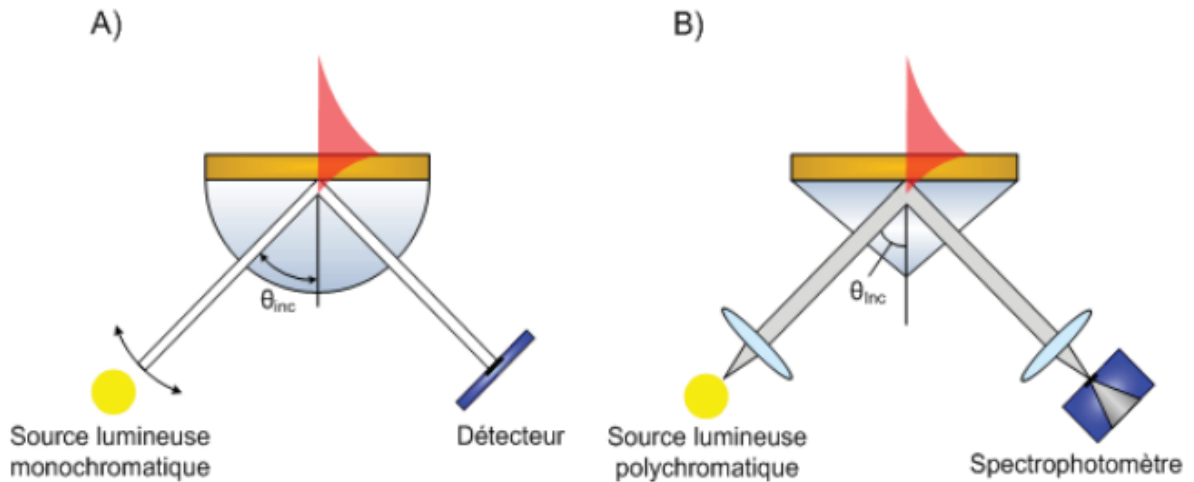


Figure 3 : Instrument SPR dans la configuration de Kretschmann. (A) Longueur d'onde fixe et interrogation de l'angle incident. (B) Angle fixe et interrogation de la longueur d'onde.

Les montages SPR utilisant l'interrogation de l'angle peuvent permettre l'observation de variations dans la concentration du milieu aqueux allant jusqu'à 10^{-12} M dans les meilleures conditions. Dans des conditions plus normales, il est possible d'observer des variations de l'indice de réfraction (RIU) allant jusqu'à 10^{-7} RIU ce qui en fait une technique très sensible aux analytes de faible concentration¹⁴. Mais, ce type d'appareil comprend des désavantages tels que son prix généralement élevé ainsi que sa propension à être difficile, voire impossible, à déplacer due à la fragilité de l'alignement des pièces.

Un troisième type de montage, moins commun, utilise l'interrogation de la longueur d'onde de la lumière sortante. Ce type de montage nécessitant peu de pièces mobiles permet de miniaturiser l'appareil SPR tout en étant peu sensible aux vibrations. Le temps d'acquisition pour ce genre de montage est très court puisqu'il n'est limité que par la vitesse d'acquisition du spectrophotomètre utilisé. Ceci permet aux SPR utilisant l'interrogation de la longueur d'onde d'être utilisés pour observer en temps réel la

cinétique d'une réaction. Un désavantage de cette méthode est qu'en utilisant une source lumineuse polychromatique, qui réalise une réflexion totale interne dans un prisme, il y aura une diffusion spectrale de la lumière ce qui cause un élargissement des bandes. Cet élargissement cause une diminution de la résolution. Avec ce type de montage, réalisant l'interrogation des longueurs d'onde, il est possible d'observer des variations entre 10^{-7} et 10^{-6} RIU¹⁵.

La résolution des appareils SPR utilisant l'interrogation de la longueur d'onde n'est que peu affectée par des variations de l'intensité de la lumière incidente puisque la technique utilise celle-ci, dans la polarisation s comme référence, pour observer les déplacements de la bande plasmonique qui est centré sur le maximum de photons absorbés et n'est pas dépendant du nombre de photons total.



Figure 4 : A) P4-SPR branché à un ordinateur portable. B) Cellule fluidique à quatre zones d'analyse, dont 3, pour réaliser un triplicata de mesure (3 premières flèches en partant du haut) et le dernier servant de référence.¹⁶

Dans le cadre de ce mémoire, un appareil SPR utilisant l'interrogation des longueurs d'onde et la configuration de Kretschmann a été utilisé. L'un des buts du projet étant de permettre l'analyse en temps quasi réel, et ce à bas prix, justifie l'utilisation de cet appareil. L'appareil utilisé est une P4-SPR développée par le groupe du professeur Jean-François Masson et commercialisée par la compagnie Affinité Instruments¹⁵.

L'appareil est facilement transportable grâce à sa petite taille et son alimentation

par deux câbles USB pouvant être installés sur un ordinateur portable. Tous les tests SPR présentés dans ce mémoire ont été faits en utilisant un prisme de Dove composé de BK7 recouvert d'une couche de Cr d'une épaisseur d'environ 5 nm sur la surface plane où il y a réflexion totale interne. La surface de Cr est par la suite recouverte d'une couche uniforme de Au d'environ 50 nm. Les cellules fluidiques utilisées sont composées de PDMS et comprennent quatre canaux pour réaliser un triplicata de mesure et une mesure de référence (voir figure plus haut). Pour remplir la section de la cellule fluidique réalisant le triplicata il est nécessaire d'avoir un minimum de 250 μ L de solution. Les prismes utilisés durant les tests sont habituellement fonctionnalisés en utilisant une solution composée de molécules thiolées dans le but de former une monocouche autoassemblée (SAM) sur la surface d'or pour limiter l'adsorption non spécifique des composés biologiques utilisés durant les tests.

1.3 Monocouche autoassemblée

1.3.1 Historique des monocouches autoassemblées

Les monocouches sont utilisées depuis longtemps. La première trace manuscrite de leur utilisation date du 18^e siècle av. J.-C. où une couche d'huile était déposée sur une surface d'eau pour prédire le futur en observant la façon dont l'huile se répandait à la surface de l'eau¹⁷. Par contre, les premières observations scientifiques des monocouches ont été faites par le philosophe romain Gaius Plinius Secundus Maior aussi nommé Pline l'Ancien, vers 50 av. J.-C., où il écrit que l'ajout d'huile à une surface d'eau faisait en sorte de réduire l'intensité des vagues permettant de mieux voir sous la surface de l'eau¹⁸. La première personne à étudier la tension superficielle de l'eau et créer un montage permettant de contrôler la formation et la dispersion des molécules hydrophobes sur une surface d'eau fut Agnes Pockels vers les années 1890¹⁹. Mais ce fut en 1946 que la première monocouche autoassemblée fut créée. Pickett, Zisman et Bigelow ont réussi à former une monocouche d'alcool arachidylique ($C_{20}H_{42}O$) sur une surface de pyrex quand l'alcool était dans une solution de cétane ($C_{16}H_{34}$)²⁰. Il a fallu attendre 1983 pour que soit démontré la possibilité de former une SAM à partir d'un composé thiolé sur un film d'Au, par Nuzzo et Allara²¹. Dû à leur capacité de modifier les caractéristiques de la surface

sur lequel elles sont formées, elles sont couramment utilisées pour former des couches protectrices contre l'eau et la saleté ainsi que pour réduire la friction entre les pièces de métal traitées.²¹

1.3.2 Théorie des monocouches autoassemblées

1.3.2.1 Formation d'une SAM

Les monocouches autoassemblées sont composées d'une couche de molécules hautement compacte et structurée, adsorbées ou liées de façon semi-covalente à une surface via un groupement de la molécule. La partie de la molécule en contact avec la surface est nommée le groupe de tête et la plus éloignée de la surface est nommée le groupe terminal. (Figure 5)

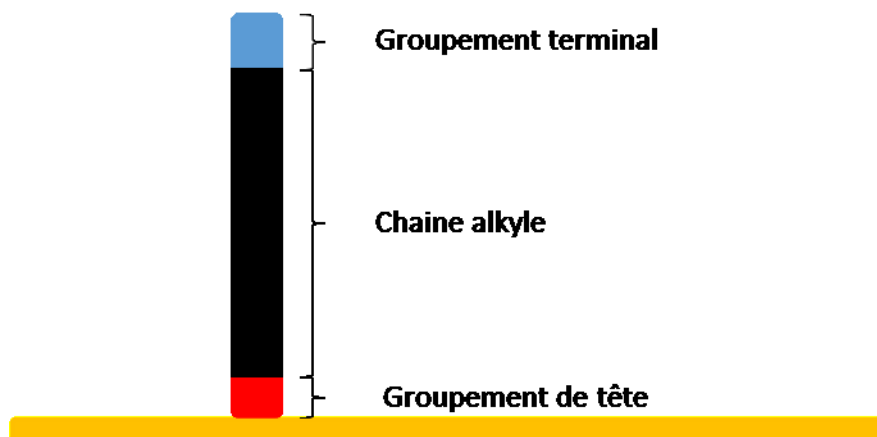


Figure 5 : Représentation d'une chaîne alkyle adsorbée sur une surface d'or et de son groupement de tête et celui terminal.

La formation d'une monocouche sur une surface est favorisée par de multiples facteurs et peut être séparée en plusieurs étapes dépendant des constituants de la monocouche et de la surface à laquelle celle-ci se forme.

Par exemple, la formation d'une monocouche composée d'un alcane thiolé sur un film d'Or se réaliserait en deux étapes. La première peut ne prendre que quelques minutes, dépendant de la concentration de molécule thiolé dans une solution appliquée sur la surface d'or. Durant ce laps de temps, le groupement thiolé de l'alcane réagira avec

la surface pour former une liaison semi-covalente de grande force (188.28kJ/mol), favorisant la formation de la monocouche. Durant cette étape, la formation de la monocouche peut être décrite par l'isotherme de Langmuir et la fin de cette étape près de 90% de la surface sera recouverte par la monocouche.^{22, 23} La concentration de la solution d'alcane dicte la vitesse de formation de la monocouche durant cette étape de sorte qu'en utilisant une solution contenant 1 mM de l'alcane la formation prendrait approximativement 1 min. Tandis que pour une solution de 1 μ M la première étape de la réaction durerait près de 2 heures.²⁴ Au début de la première étape les molécules liées à la surface peuvent être couchées sur la surface métallique à cause de la faible densité d'alcane thiolés. À mesure que la densité de la monocouche augmente, les chaînes des alcanes se redressent pour maximiser les interactions entre les chaînes alkyles.

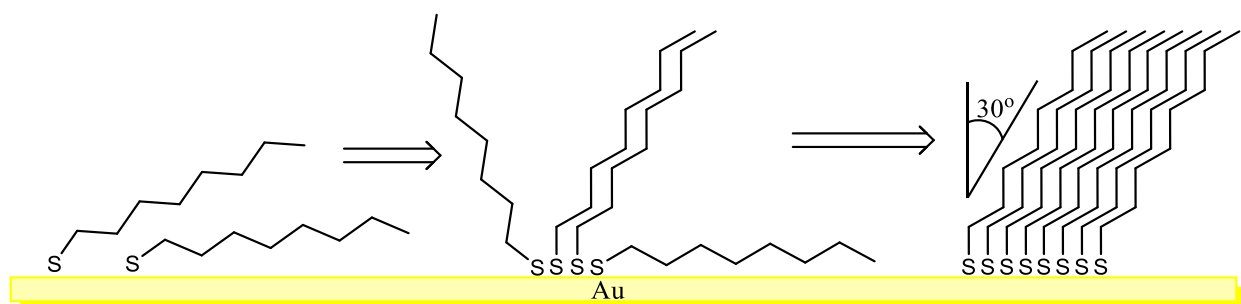


Figure 6 : Formation d'une SAM composée d'alcane thiolés sur une surface d'or²⁵

La seconde étape de la formation de la monocouche peut être décrite comme la cristallisation de celle-ci pour former un ou plusieurs blocs cristallins d'une molécule d'épaisseur. Cette étape comprend la réorganisation des molécules à la surface du métal pour minimiser le désordre organisationnel entre les chaînes. Cette étape est principalement animée par les interactions entre les divers groupements fonctionnels et la structure de la molécule formant la monocouche (interactions de Van der Waals, dipôle-dipôle, dipôle induit – dipôle induit ...). La réorganisation des molécules tend à maximiser les interactions favorables et à être limitée par la mobilité des molécules déjà liées à la surface. Si la molécule utilisée pour former la monocouche n'est pas une chaîne alkyle simple et comporte des groupements fonctionnels encombrants, la formation de la

monocouche se réalisera en une seule étape due à la mobilité réduite des molécules à la surface, ralentissant la formation de la monocouche²⁶.

Les molécules thiolées composant une monocouche peuvent se déplacer dans celle-ci ou même être désorbées selon la température²⁷. Dans le cas de la formation d'une SAM sur une surface d'or en utilisant deux molécules thiolées différentes, la formation de la SAM sera dictée par la cinétique d'adsorption des molécules, leurs diffusions dans la SAM et leurs groupements fonctionnels. Si les molécules ont une diffusion non nulle dans la SAM, il est possible que celle-ci se réorganise pour maximiser les interactions favorables avec les molécules voisines²⁸. Ce qui peut causer la ségrégation des molécules composant la SAM et former une monocouche composée d'îlots de composition homogène²⁹.

1.3.2.2 Utilisation des SAM pour des tests bioanalytiques

La propriété des SAM à modifier la surface où elles se forment les rendent particulièrement utiles dans le domaine des analyses biologiques. Ces monocouches peuvent être fonctionnalisées pour permettre de lier des molécules biologiques à la monocouche pour réaliser des tests variés nécessitant un biocapteur. Le second avantage d'utiliser une SAM pour réaliser ce genre de tests est la capacité des monocouches à limiter l'adsorption non spécifique de molécules de grande taille à la surface de celle-ci selon les groupements de la SAM étant exposés à la solution.

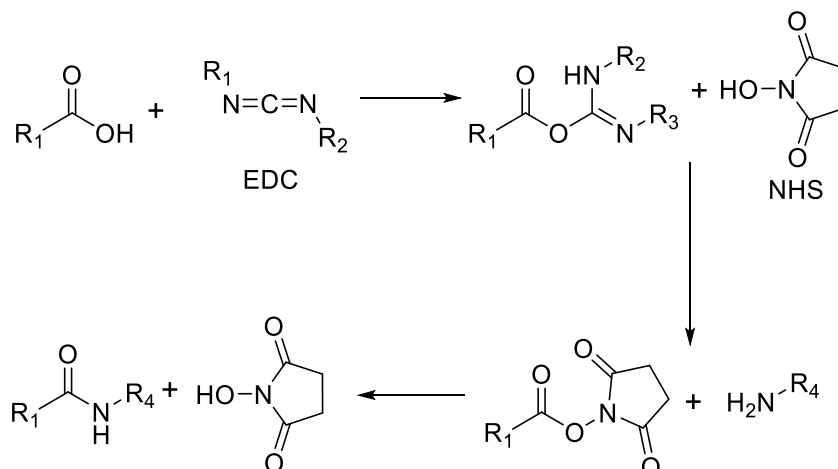


Figure 7 : Réaction de formation d'un lien peptidique avec du EDC/NHS entre un groupement acide carboxylique d'une molécule composant la monocouche (R₁) et une amine primaire sur la molécule d'intérêt (R₄). Réaction faite à Tp en milieux aqueux ³⁰.

Ces SAM sont généralement composées d'une ou plusieurs molécules comportant une chaîne alkyle liée à un groupement thiolé afin de permettre la formation d'une SAM de grande densité. Une SAM composée de molécules ayant un groupement acide carboxylique comme groupe terminal peut être liée à une molécule comportant une amine primaire en formant une liaison peptidique.

La formation d'un lien peptidique pour fonctionnaliser la SAM dans des conditions réactionnelles peu contraignantes (Figure 7), assure l'intégrité de la monocouche. Mais cette réaction n'étant pas spécifique quant à l'amine primaire réactive, il peut être nécessaire, dans le cas de la liaison d'une protéine comprenant plusieurs amines primaires, d'utiliser un ensemble de molécules pour remplacer la liaison peptidique entre la molécule d'intérêt et la monocouche. Si la protéine comporte plusieurs amines primaires il est possible que l'une d'elles réagisse et qu'une fois le lien peptidique formé celui-ci bloque le site actif rendant l'interaction récepteur-analyte impossible. Les molécules utilisées pour remplacer la liaison peptidique décrite précédemment servent de pont entre la monocouche et l'analyte en formant un couple de molécules de grande affinité, par exemple, un complexe de Cu, Co, Ni complexant avec une étiquette

polyhistidine, le couple Biotine/Streptavidine ou un couple de protéines de type Coil-Coil tel le couple E5_{coil} et K5_{coil}^{4, 31, 32} .

1.3.2.3 SAM : Adsorption non spécifique

En utilisant une surface dont la réactivité n'est pas spécifique à un analyte particulier en SPR, il est possible qu'une molécule s'adsorbe à la surface causant un signal indifférenciable de celui provenant de l'analyte d'intérêt même après le lavage de la surface. Dans ce cas, l'exactitude du test peut être mise en péril dû à l'adsorption non spécifique des molécules. L'adsorption non spécifique est causée par les interactions des forces hydrophobes, les forces de Van der Waals, les ponts hydrogène, les interactions ioniques ou par la formation de lien covalent et semi-covalent. Pour pallier ces problèmes, il est possible de recouvrir la surface d'une couche protectrice qui limitera l'adsorption non spécifique. Ces monocouches modifient la chimie de surface pour minimiser les forces et les interactions intermoléculaires entre les molécules s'adsorbant et la couche protectrice. Ce qui facilite l'expulsion des molécules adsorbées après un lavage³³.

Bien que les interactions entre les molécules biologiques et le groupement terminal des SAM soient complexes et différentes pour chaque cas, certaines corrélations peuvent être faites entre un groupement terminal et la capacité de la SAM à limiter l'adsorption non spécifique des biomolécules. Les SAM composées de molécules ayant un groupement terminal légèrement négatif ou zwitterionique tout en étant hydrophiles ont généralement une meilleure résistance à l'adsorption non spécifique que les autres molécules thiolées hydrophobes.³³⁻³⁷

Les monocouches les plus souvent utilisées pour leur capacité à limiter l'adsorption non spécifique des molécules biologiques sont les molécules thiolées comportant un groupement polyéthylène glycol près du groupement terminal (PEG). L'une des théories pour expliquer la faible adsorption non spécifique (*low-fouling*) des molécules biologiques sur les SAM impliquerait que l'eau de la couche hydratée de la SAM et son déplacement serait l'un des facteurs les plus importants pour évaluer les caractéristiques *low-fouling* de celle-ci. La couche hydratée de la monocouche de PEG se forme grâce aux interactions entre les atomes d'oxygène du polyéthylène glycol des

molécules composant la SAM et les atomes d'hydrogène de l'eau pour former des ponts hydrogènes. L'eau étant fortement retenue dans la couche hydratée son déplacement est entropiquement défavorisé. Ceci fait en sorte que les molécules de grande taille ne peuvent pas facilement interagir avec la couche hydratée et donc ne peuvent pas s'adsorber sur la monocouche^{34, 38}. La taille et le nombre de groupements polyéthylène glycol des molécules de PEG utilisées pour former une monocouche affectent sa capacité à limiter l'adsorption non spécifique. Il est normalement nécessaire de tester plusieurs molécules de PEG pour minimiser l'adsorption non spécifique. Bien que les monocouches de PEG soient connues pour leur capacité à limiter l'adsorption non spécifique dans une matrice simple, cette capacité n'est pas conservée pour les matrices complexes composées de protéines³³.

Des méthodes additionnelles peuvent être utilisées pour limiter l'adsorption non spécifique de molécules biologiques, telles que l'utilisation de protéines permettant de bloquer les sites d'adsorption (albumine de sérum bovin (BSA), caséine)³⁹. L'efficacité d'utilisation de molécules servant à bloquer l'adsorption non spécifique est portée à varier entre différents tests ³³.

1.4 Anticorps et cinétique d'interaction en SPR

1.4.1 Anticorps

Les anticorps sont des protéines produites par le système immunitaire, plus particulièrement les plasmocytes, dans le but de neutraliser un pathogène. Il existe 5 classes d'anticorps produit par les mammifères (IgA, IgD, IgE, IgM et IgG) ayant des rôles spécifiques. Ceux-ci sont souvent représentés sous la forme d'un Y, composé de deux chaînes lourdes et deux légères, visibles à la Figure 8, ayant respectivement et individuellement une masse molaire approximative de 50 kDa et 25 kDa⁴⁰.

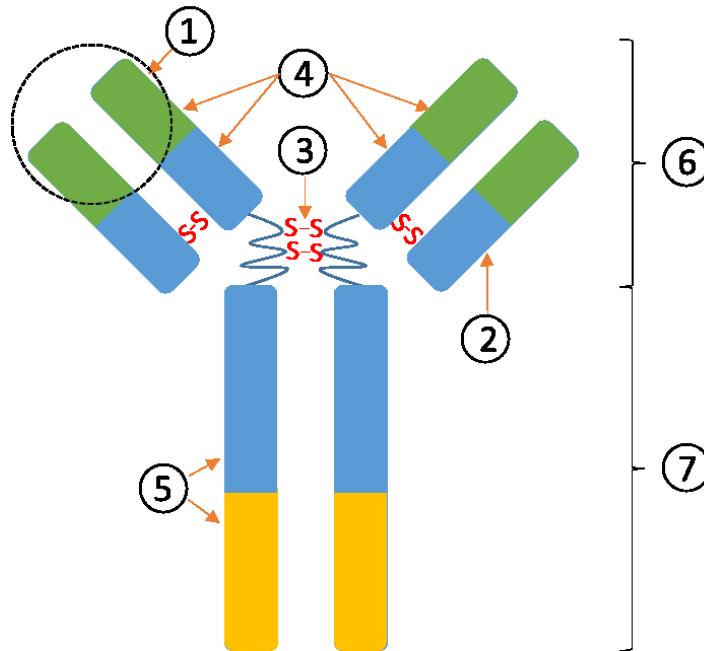


Figure 8 : Représentation d'un anticorps de type IgG. 1 : Paratope. 2 : Chaîne légère (C_L en bleu et V_L en vert). 3 : Lien disulfure maintenant la cohésion des chaînes. 4 : Section V_H et C_H1 respectivement vert et bleu de la chaîne lourde. 5 : Section C_H2 et C_H3 respectivement bleu et jaune de la chaîne lourde. 6 : Fragment de liaison à l'antigène (Fab). 7 : Fragment cristallisable (Fc).

Les deux chaînes lourdes sont liées par des liens disulfures et les chaînes légères sont aussi maintenues aux chaînes lourdes par des liens disulfures. Ces chaînes peuvent être séparées en 6 domaines, deux pour les chaînes légères C_L et V_L et 4 pour les chaînes lourdes V_H , C_H1 , C_H2 et C_H3 . De ces domaines, seulement deux servent à la liaison avec un antigène, les domaines V_H et V_L (Figure 8 #1). Ceux-ci forment le paratope et composent les domaines variables de l'anticorps. Le reste de l'anticorps étant relativement constant, le paratope est modifié pour avoir une haute affinité avec l'épitope d'un antigène. Le paratope se lie avec l'épitope de l'antigène en formant un complexe. Le paratope formant un étau autour de l'épitope. Les forces causant la formation du complexe proviennent d'un ensemble d'interactions entre le paratope et l'épitope telles que les ponts H, les forces de Van der Waals, les interactions électrostatiques et hydrophobes, le tout selon l'arrangement conformationnel entre leurs groupements. Ces interactions n'étant pas très fortes, comme le serait un lien covalent, il est possible pour l'anticorps de se séparer de l'antigène. Ce qui permet aux anticorps de limiter la formation

de complexe avec des molécules biologiques n'étant pas des pathogènes, mais comportant certaines parties ayant une affinité pour l'anticorps⁴⁰.

Les anticorps de type IgG sont séparés en deux catégories, monoclonal et polyclonal. Les anticorps monoclonaux sont produits par le plasmocyte B mère et ses plasmocytes B filles et ne peuvent réagir qu'avec un seul épitope d'un antigène. Les anticorps polyclonaux sont produits par un ensemble de divers plasmocytes B n'étant pas des répliques d'une même cellule et se lient avec divers épitopes d'un même antigène.⁴⁰
⁴¹ Bien que la partie Fab des anticorps soit essentiel, la partie Fc est tout aussi nécessaire au bon fonctionnement du système immunitaire. La Fc des anticorps de classe IgG peut varier grâce à de multiples possibles glycosylations. La plus connue est la glycosylation de l'asparagine 297 de chaque domaine C_H2 de la Fc. Celle-ci affecterait la conformation de l'anticorps dû aux interactions glycane-anticorps et glycane-glycane⁴². Puisque la conformation de la Fc de l'anticorps dicte son interaction avec ses possibles récepteurs, les variations du glycane permettent l'activation de diverses réponses immunitaires telles que la phagocytose cellulaire dépendante des anticorps (ADCP), la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC), la cytotoxicité dépendante du complément et les réponses anti-inflammatoires⁴³. Bien que les mécanismes intracellulaires de la glycosylation des anticorps soient connus, l'effet exact de la variation du glycane sur les interactions de chacun des récepteurs avec les anticorps reste incertain. Ce qui ralentit le bon développement des traitements se basant sur l'immunothérapie. Il serait donc utile de pouvoir réaliser diverses glycosylations sur des anticorps et observer leurs interactions avec leurs récepteurs grâce à un appareil permettant l'observation de la cinétique des interactions, telle que la SPR.

1.4.2 Cinétique des interactions Antigène-Anticorps

Les interactions anticorps-antigènes et anticorps-récepteur sont causées par un ensemble d'interactions faibles et donc par leur nature, réversible. Il est possible de représenter le cas le plus simple d'interaction, soit celle d'un anticorps monoclonal et d'un antigène unique immobilisé sur une surface comme étant ⁴⁴ :



Où A est le paratope de l'anticorps, B est épitope de l'antigène, k_{on} représente la constante d'association du complexe (unité en $M^{-1}s^{-1}$) et K_{off} est la constante de dissociation du complexe (unité en s^{-1}). Pour des interactions anticorps-antigène les valeurs observables sont généralement de l'ordre de $10^5 M^{-1}s^{-1}$ pour le k_{on} et $10^{-5} s^{-1}$ pour le k_{off} ⁴⁵. Ces constantes sont liées à la constante d'affinité K_a (M^{-1}) et sa constante inverse la constante de dissociation K_d (M), via l'équation suivante :

$$\frac{k_{on}}{k_{off}} = K_a = \frac{1}{K_d} = \frac{[AB]}{[A][B]} \quad (7)$$

Dans cette équation [A] représente la concentration d'anticorps [B] la concentration d'antigène et [AB] la concentration du complexe anticorps-antigène. Le K_d peut aussi être décrit comme étant la concentration d'analyte nécessaire pour former la moitié des complexes possibles une fois le système à l'équilibre. D'autres modèles peuvent être utilisés pour décrire des systèmes plus complexes ou représentant plus fidèlement la réalité d'une analyse.

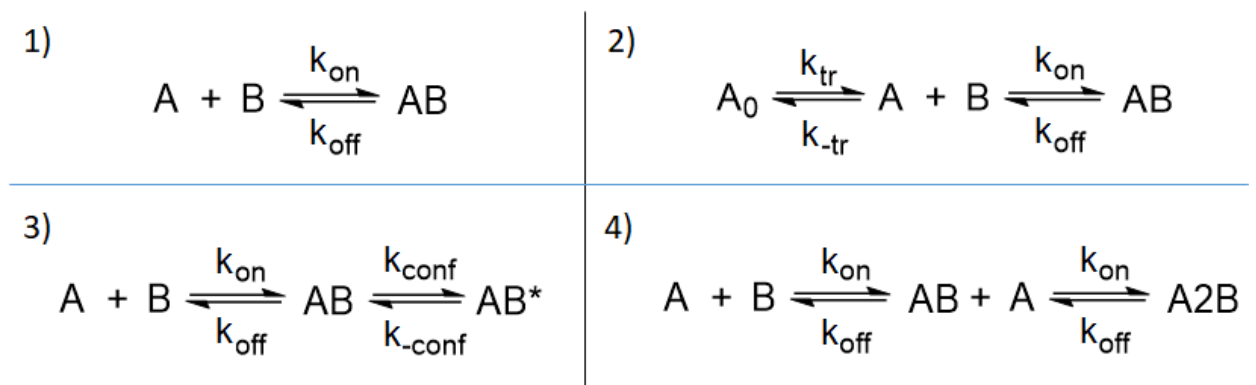


Figure 9 : Modèle d'association représentant des interactions biomoléculaires 1) Modèle bimoléculaire simple. 2) Modèle bimoléculaire limité par le transport de masse. 3) Modèle bimoléculaire comprenant un changement de la conformation intramoléculaire. 4) Modèle bimoléculaire formant un dimère ⁴⁴

Certains modèles peuvent être spécifiques à des interactions particulièrement prévalentes entre certains types d'anticorps et leur antigène. Ceux impliquant le transport de masse ne représentent pas seulement les interactions entre les deux protéines, mais aussi l'impact des composantes techniques du montage (modèle 2 de la Figure 9).

1.5 Technique analytique : Biocapteur SPR et transport de masse

Dans le cas d'une reconnaissance moléculaire, un biocapteur est composé d'un élément permettant la reconnaissance moléculaire spécifique à une molécule ou un groupement particulier d'une ou plusieurs biomolécules et d'un transducteur permettant l'obtention d'un signal amplifié. Plusieurs types de biocapteurs ont été développés au fil du temps, tels que ceux basés sur des enzymes, des anticorps, des protéines, des séquences ADN et bien d'autre⁴⁶. Le signal produit par la reconnaissance moléculaire peut être thermique, optique, massique ou électrochimique. Les techniques les plus souvent utilisées en association avec les biocapteurs sont la potentiométrie, l'ampérométrie, la conductimétrie, la spectrophotométrie, la fluorimétrie et la résonance des plasmons de surface.

1.5.1 Biocapteur SPR

À cause de la sensibilité des appareils SPR aux changements de la densité optique du milieu près de la surface métallique, l'intensité du signal obtenue pour une molécule sera proportionnelle à sa masse. Ceci fait en sorte que les molécules de taille importante, dont les molécules biologiques, même à de faibles concentrations peuvent être détectées sans amplification subséquente.

Pour réaliser ce genre de test, il est nécessaire d'utiliser un récepteur spécifique à l'analyte d'intérêt qui pourra être lié indirectement à la surface métallique par une surface intermédiaire. Une monocouche ou un polymère tel que le dextran peut être utilisé servir

d'intermédiaire entre la surface métallique et le récepteur et limiter l'adsorption non spécifique. Ceci pose problème puisque la SPR ne permet pas de différenciation entre les molécules détectées. C'est pourquoi il est important de réaliser les contrôles adéquats et d'utiliser une SAM résistante à l'adsorption non spécifique.

1.5.2 Transport de Masse

Idéalement, après l'injection de l'analyte dans un système celui-ci serait à une distance lui permettant d'interagir avec le biocapteur. Quand dans un système la migration d'un analyte vers son récepteur est une étape limitante, on dit que le mécanisme cinétique de la réaction est limité par le transport de masse. Le transport de masse peut être défini comme étant le mouvement d'un élément en solution d'une zone de haut potentiel chimique vers une zone de bas potentiel chimique via diffusion, tel que le déplacement d'un analyte diffusant vers une électrode durant une analyse électrochimique.

Dans le cas d'une analyse utilisant une surface sensible avec une profondeur sondable limitée, telle que la SPR, la présence d'éléments limitant le transport de masse cause l'ajout d'une "étape" à la réaction cinétique globale entre l'analyte et la surface active. Les équations décrivant le modèle simple ne peuvent pas être utilisées pour représenter un système limité par le transport de masse et d'autres équations doivent être utilisées. Ceci peut complexifier l'analyse des résultats si l'on tente d'obtenir les constantes cinétiques^{47, 48}. La limitation causée par le transport de masse peut être prise en considération dans le mécanisme cinétique de l'interaction entre l'analyte et son récepteur (Figure 9.2), où A_B représente l'analyte dans le "bulk" de la solution et K_{tr} la constante cinétique du transport de masse du "bulk" à la surface sensible.

Dans le cas de l'utilisation d'un biocapteur utilisé en flux continu où la surface active se trouverait sur les parois du canal et dont le flux d'analyte serait parallèle au biocapteur, si le débit n'est pas assez fort, le système pourrait se voir limité par le transport de masse. Le profil de vitesse d'un écoulement laminaire dans un canal est à son plus intense au centre et décroît rapidement pour devenir nul aux parois du canal (Figure 10).

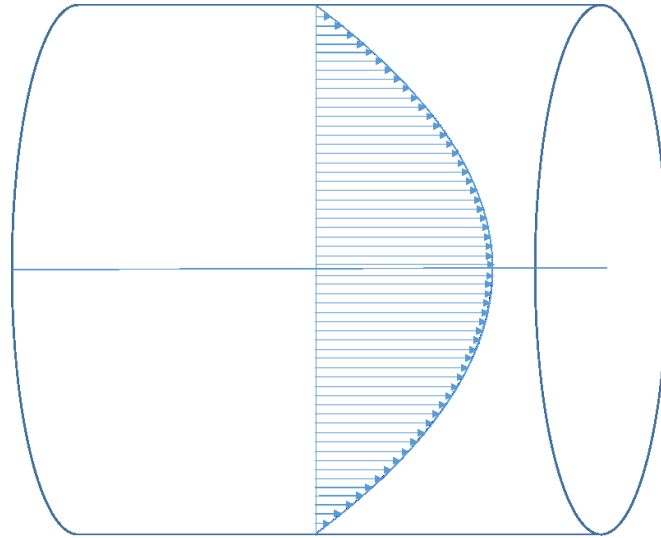


Figure 10 : Profil de vitesse théorique d'un fluide dans un cylindre de longueur infinie.

L'écoulement de liquide à une très courte distance de la paroi du canal peut aussi être assumé comme étant nul et donc formant une couche stagnante. L'épaisseur de la zone stagnante est inversement proportionnelle à la vitesse d'écoulement du liquide au centre du canal⁴⁴. Si la zone stagnante est trop grande, celle-ci peut causer une limitation due au transfert de masse.

Dans le cas d'une analyse SPR en utilisant une monocouche pour immobiliser le récepteur, il est possible de déterminer si le système est limité par le transfert de masse. Pour se faire, il est nécessaire de réaliser de multiples tests d'association et d'observer si une augmentation de la constante k_{on} se produit en augmentant le débit de la solution contenant l'analyte.

Dans le cas d'un système où une analyse réalisée avec un biocapteur dans un canal recevant un flux continu d'analyte, il est aussi possible d'estimer si le système est limité par le transport de masse avec les équations suivantes⁴⁹ :

$$MTL = \frac{L_r}{L_m + L_r} \quad (8)$$

$$L_r = k_{on} [B] \quad (9)$$

Où MTL étant une valeur quantitative permettant d'évaluer si le système est limité par le transport de masse. Plus la valeur de MTL est proche de 1 plus le système est limité par le transport de masse de l'analyte vers son récepteur. L_m est le coefficient de transport de masse ($m s^{-1}$). L_r est le coefficient d'Onsager du flux de la réaction ($m s^{-1}$). k_{on} est la constante d'association entre les deux protéines converties en $m^3 mol^{-1} s^{-1}$ et $[B]$ est la concentration de récepteur libre à la surface du récepteur en $mol m^{-2}$ qui peut être déterminé via l'équation suivante dans le cas où l'on considère que l'on est au temps zéro de l'analyse⁴⁴.

$$[B] = B_{max} \times C_{conv} \quad (10)$$

B_{max} étant le signal maximum obtenu quand tous les sites actifs du biocapteur ont réagi avec l'analyte. C_{conv} coefficient de conversion entre une unité de signal provenant de l'appareil utilisé pour réaliser le test par $mol m^{-2}$ ⁴⁹.

$$L_m = C_{Lm} \times \sqrt[3]{\frac{D^2 \times F}{h^2 \times b \times l_2}} \quad (11)$$

Dans l'équation (11), la valeur résultante de l'équation L_m est en fait une approximation. D est le coefficient de diffusion de l'analyte dans le milieu ($m^2 s^{-1}$), F est la vitesse d'écoulement de la solution ($\mu l min^{-1}$), h est la hauteur de la cellule fluidique (m), l et b sont respectivement la longueur de la cellule fluidique et la largeur (m). C_{Lm} est définie par l'équation suivante⁴⁹ :

$$C_{Lm} = 1.47 \times \frac{1 - \left(\frac{l_1}{l_2}\right)^{\frac{2}{3}}}{1 - \frac{l_1}{l_2}} \quad (12)$$

l_1 et l_2 sont la distance entre l'entrée de solvant de la cellule et respectivement le début de la zone d'analyse et la fin de la zone d'analyse.

En combinant toutes ces équations, l'on obtient :

$$MTL = \frac{k_a [B]}{1.47 \times \frac{1 - \left(\frac{l_1}{l_2}\right)^{\frac{2}{3}}}{1 - \frac{l_1}{l_2}} \times \sqrt[3]{\frac{D^2 \times F}{h^2 \times b \times l_2}} + k_a [B]} \quad (13)$$

En observant l'équation (13), il est possible de voir qu'en diminuant la concentration de récepteur à la surface du biocapteur il est possible de réduire l'effet du transfert de masse sur le système. Il est aussi possible d'augmenter la vitesse d'écoulement de l'analyte dans la cellule fluïdique pour obtenir le même effet.

1.5.3 Test biomoléculaire réalisé via SPR

1.5.3.1 Obtention des constantes cinétiques k_{on} et k_{off}

Les constantes cinétiques k_{on} et k_{off} , d'une interaction entre deux protéines, telles qu'observable dans l'équation (6) permettent de qualifier l'affinité entre ces deux protéines. Ce genre de test peut être réalisé en utilisant un appareil SPR. Les données peuvent être par la suite traitées pour obtenir les constantes cinétiques.

Pour obtenir les constantes cinétiques k_{on} et k_{off} , il est nécessaire de réaliser un essai direct avec le couple de protéines. Pour se faire, l'un des deux constituants, le récepteur ou l'anticorps, est immobilisé à la surface de la zone sondée. Puis l'analyte est injecté de façon continue dans l'appareil grâce à une pompe péristaltique. Durant l'injection, il serait possible d'observer une augmentation du signal en SPR en fonction du temps. Cette augmentation pourrait être décrite par des équations différentes selon le système et l'interaction entre l'analyte et le récepteur. Par exemple, un système sans limitation par transport de masse entre l'analyte et son récepteur (équation (6)) où le signal obtenu pourrait être décrit par l'équation (14)⁵⁰.

$$R_t = \frac{[A]R_{max}}{[A] + \frac{k_{off}}{k_{on}}} \times (1 - e^{-(k_{on}[A] + k_{off})t}) \quad (14)$$

Dans cette équation, R_t représente le signal au temps t depuis le début de l'ajout de l'analyte. R_{max} est le signal maximum obtenu une fois que tous les sites actifs sont

occupés et $[A]$ est la concentration d'analyte en solution pouvant interagir avec le récepteur.

Durant un essai direct, le signal augmente plus rapidement au moment de l'ajout de l'analyte, où tous les sites actifs sont libres (Figure 11 étape #1). Les anticorps dans le flux de solution peuvent passer dans la zone stagnante une fois à l'interface entre les deux milieux et se rendre aux récepteurs par diffusion pour interagir avec ceux-ci. L'augmentation du signal diminue rapidement jusqu'à être imperceptible, voire nulle, une fois l'équilibre atteint entre l'association et la dissociation de l'analyte et de son récepteur (étape #3 de la Figure 11). L'équilibre est identifiable par une stagnation du signal. La solution contenant l'analyte est par la suite remplacée par la solution tampon pour retirer les analytes n'ayant pas formé de complexes et ceux se dissociant pour empêcher leur possible réassociation à un récepteur (étape #4 de la Figure 11). En conservant le modèle d'interaction simple analyte-récepteur énoncé précédemment, il est aussi possible de décrire le signal obtenu durant la dissociation du complexe via l'équation (15)⁵⁰.

$$R_t = R_{eq} e^{-k_{off}t} \quad (15)$$

Où R_{eq} est la valeur du signal au temps zéro de la dissociation. Dans le cas où la dissociation serait limitée par le transport de masse il serait possible de décrire la variation du signal en fonction du temps par l'équation différentielle suivante :

$$\frac{dR_t}{dt} = \frac{-k_{off}R_t}{1 + \frac{k_{on}}{k_{tr}}(R_{max} - R_t)} \quad (16)$$

Dans cette équation k_{tr} représente la constante cinétique du transport de l'analyte de la masse au biocapteur.

L'injection du tampon est maintenue jusqu'à atteindre un nouveau plateau indiquant la fin de la dissociation des complexes (étape #5 de la Figure 11). Il est possible par la suite de nettoyer la surface et/ou de retirer les récepteurs, pour permettre d'effectuer un autre test sur la même surface.

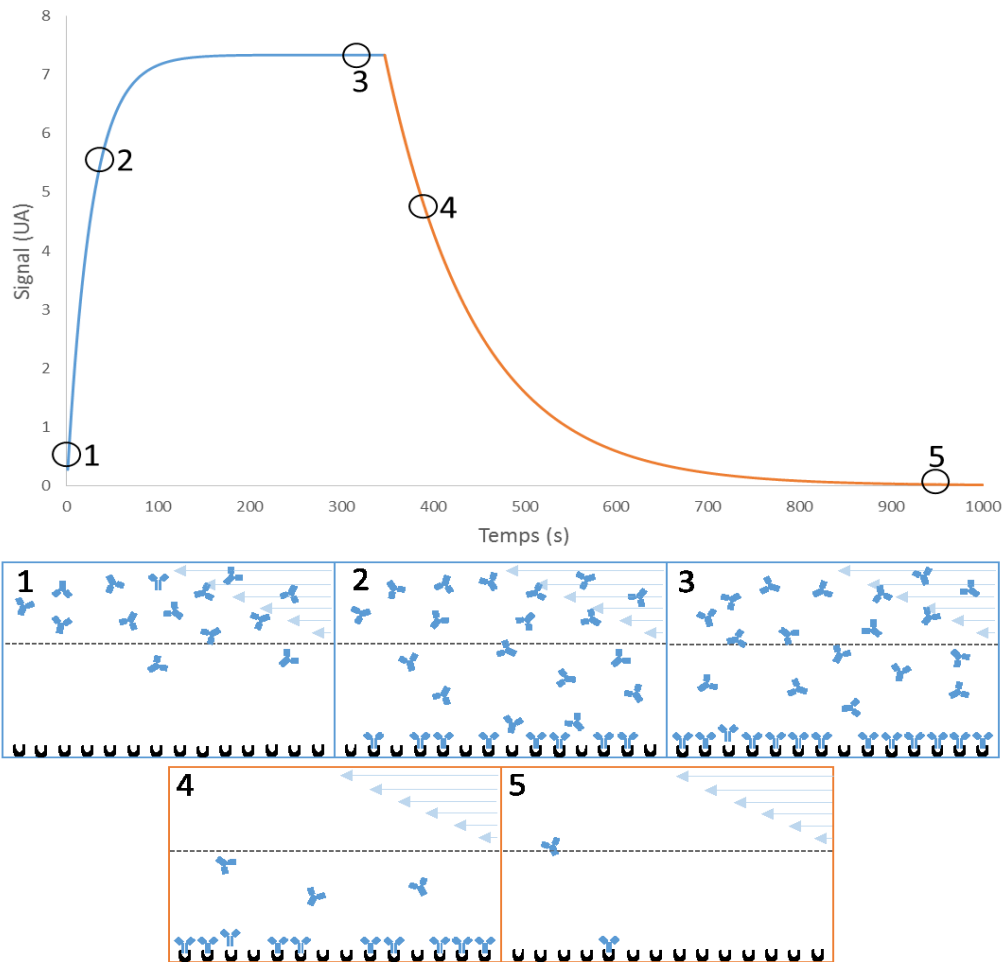


Figure 11 : Représentation d'un signal SPR théorique obtenue par un essai direct, dans un canal en écoulement laminaire continue représenté par les flèches, entre un anticorps et son récepteur à plusieurs étapes du test ($K_{on} : 9,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$ $K_{off} : 1 \times 10^{-2} \text{ S}^{-1}$). Ligne grise représentant la limitation entre la zone stagnante près du biocapteur et la zone avec une vitesse d'écoulement non nulle. Ligne bleue (étapes 1-3) phase d'association durant laquelle la solution tampon contenant les anticorps est injectée. Ligne orange (étapes 4-5) phase de dissociation réalisée en injectant une solution tampon.

1.5.3.2 Mesure du K_d pour deux molécules biologiques

Pour obtenir le K_d d'un couple de molécules à partir d'un appareil SPR, il est nécessaire de réaliser un essai direct. Une faible concentration d'analyte est alors injectée puis laissée à réagir jusqu'à atteindre l'équilibre. Si les données sont traitées par un programme, l'opération est répétée en augmentant la concentration de l'analyte jusqu'à ce qu'au moins 20% des récepteurs restant soient libres. Il est nécessaire

d'atteindre ce seuil d'occupation pour s'assurer d'obtenir des résultats facilement traitables avec un programme de corrélation.

Le signal, une fois le système à l'équilibre pour chaque concentration, est corrélé avec l'équation suivante⁴⁴ :

$$R_t = \frac{R_{max}[A]}{K_d + [A]} \quad (17)$$

Il est possible de réaliser une approximation des constantes en effectuant une corrélation entre les données et l'équation (17), en observant l'impact de la variation de chaque variable sur la corrélation.

Ceci est possible si l'équation utilisée possède peu de variables et si l'on connaît l'impact de chacune d'elles, mais devient exponentiellement difficile à mesure que le nombre de variables dans l'équation augmente. C'est pourquoi un algorithme utilisant un processus itératif est généralement utilisé pour réaliser la corrélation.

1.6 Algorithme d'optimisation

Le programme informatique permettant l'utilisation et l'acquisition de données avec le P4-SPR fut créé avec LabVIEW. La version de LabVIEW ayant été utilisé pour créer le programme ne permet que l'implémentation de codes écrits en LabVIEW, C et C++. Une autre contrainte étant que les codes écrits en C et C++ devraient être sous forme de DLL pour être implémentés. Devant l'impossibilité de trouver le code source d'un programme ou une librairie permettant le traitement des données SPR et remplissant tous les critères, il fut nécessaire de créer un tel programme.

Pour obtenir les constantes cinétiques associées aux interactions simples entre biomolécules, la méthode la plus simple est de créer un programme capable de corréler les données obtenues à une équation non linéaire.

Pour réaliser une telle corrélation le plus rapidement possible, il est nécessaire d'utiliser un algorithme d'optimisation heuristique ou métaheuristique. Un algorithme

d'optimisation heuristique permet de résoudre un problème plus rapidement qu'avec des méthodes standards en sacrifiant la précision et l'exactitude des résultats. Ces algorithmes sont normalement composés d'un arbre décisionnel permettant de choisir la prochaine méthode à adopter en fonction des informations présente connue⁵¹. Un algorithme métaheuristique est une version plus complexe ou d'un niveau plus élevé que l'algorithme heuristique. Ils sont utilisés pour trouver des solutions aux problèmes complexes comprenant des données manquantes ou imparfaites et ayant une large gamme de solutions possibles⁵². Les algorithmes heuristiques et métaheuristiques servant à réaliser une optimisation ne sont pas assurés de trouver la solution globalement optimale. Quand le programme converge vers une réponse qui n'est pas optimale, on dit qu'il converge vers un minimum/maximum local.

Pour utiliser une optimisation, il est nécessaire que l'algorithme permette de maximiser ou minimiser une valeur Y affectée par un nombre n de variables en faisant les faisant varier. Ceci serait possible en utilisant la méthode des moindres carrés.

1.6.1 Nelder-Mead

L'algorithme Nelder-Mead, un algorithme heuristique, fut créer par John Nelder et Roger Mead en 1965. Cette algorithme se base sur le déplacement d'un simplex, qui est un triangle représenté en n dimensions, selon l'évaluation faite pour chacun de ces sommets. Les déplacements sont organisés selon un ensemble de tests pour évaluer si le déplacement d'un sommet grâce à un des 4 déplacements possibles permet d'atteindre une meilleure valeur que celle précédemment connue. Les 4 déplacements possibles sont la réflexion, l'expansion, la contraction et le rétrécissement. À chaque itération, tous les sommets du simplex, sauf un, gardent leur position pour être comparés avec la nouvelle position obtenue. Ceci permet à l'algorithme d'adapter ses mouvements dépendants de la "topographie" immédiate et de la fonction à optimiser. Cet algorithme est connu pour rapidement trouver une solution. La raison de cette rapidité vient de la simplicité du programme. Cet algorithme ne nécessite pas de limites quant à l'intervalle de valeurs à chercher et requiert un critère pour indiquer l'arrêt de l'algorithme. Ce critère peut être un nombre d'itérations limitant le programme ou l'utilisation d'une tolérance qui

permet au programme de s'arrêter si la différence entre la position du sommet est inférieure à la valeur de la tolérance entre deux itérations⁵³.

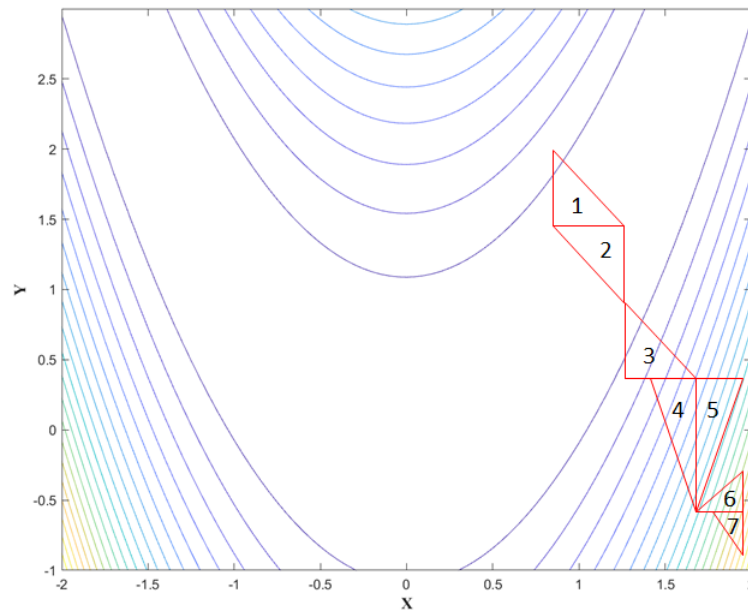


Figure 12 : Exemple de déplacement simplifié et entrecoupé, réalisé par l'algorithme d'optimisation Nelder-Mead. Ceci est visualisé via les étapes de déplacement du simplex à travers l'équation connue sous le nom de <<Rosenbrock Banana Function>>

Cet algorithme est connu pour s'arrêter dans des minimums locaux, dont il est incapable de sortir. C'est pourquoi cet algorithme est souvent couplé avec d'autres pour former un hybride compensant pour les lacunes de chacun des algorithmes avec leurs forces respectives.^{54, 55}

1.6.2 PSO

La particle swarm optimization (PSO), créé par James Kennedy et Russell Eberhart, est basée en partie sur le comportement d'agrégation des oiseaux ainsi que de l'intelligence en essaim. Le but étant que l'ensemble d'un groupe puisse bénéficier des trouvailles d'un de ces membres pour faire avancer le groupe vers un objectif commun.

Un essaim (*swarm*) est composé d'un ensemble d'entités normalement appelées particules. Après leur création, un nombre de valeurs équivalent au nombre de variables à optimiser leur sont attribuées entre un intervalle donné, et ce pour l'ensemble des particules.

Par la suite, la particule évalue sa combinaison de variables et lui attribue une valeur selon les critères désignés (*fit*). Le programme vise à maximiser ou minimiser le *fit* attribué à la combinaison de variables. La position des particules est modifiée à chaque itération du programme pour converger vers une combinaison de solutions permettant d'obtenir le meilleur résultat (*fit*). Les particules explorent les intervalles de valeurs définis grâce à la somme de trois vecteurs (Figure 14). Le premier (vecteur aléatoire) est créé au moment de la création de la particule et composé de valeurs aléatoires. Le second (vecteur cognitif) est modifié à chaque itération et déplace la particule vers la meilleure position (combinaison de valeur pour chaque variable) que la particule ait explorée (Best P). Le troisième (vecteur social) est aussi modifié à chaque itération et déplace la particule vers la meilleure position connue par l'ensemble des particules composant l'essaim (Best G).

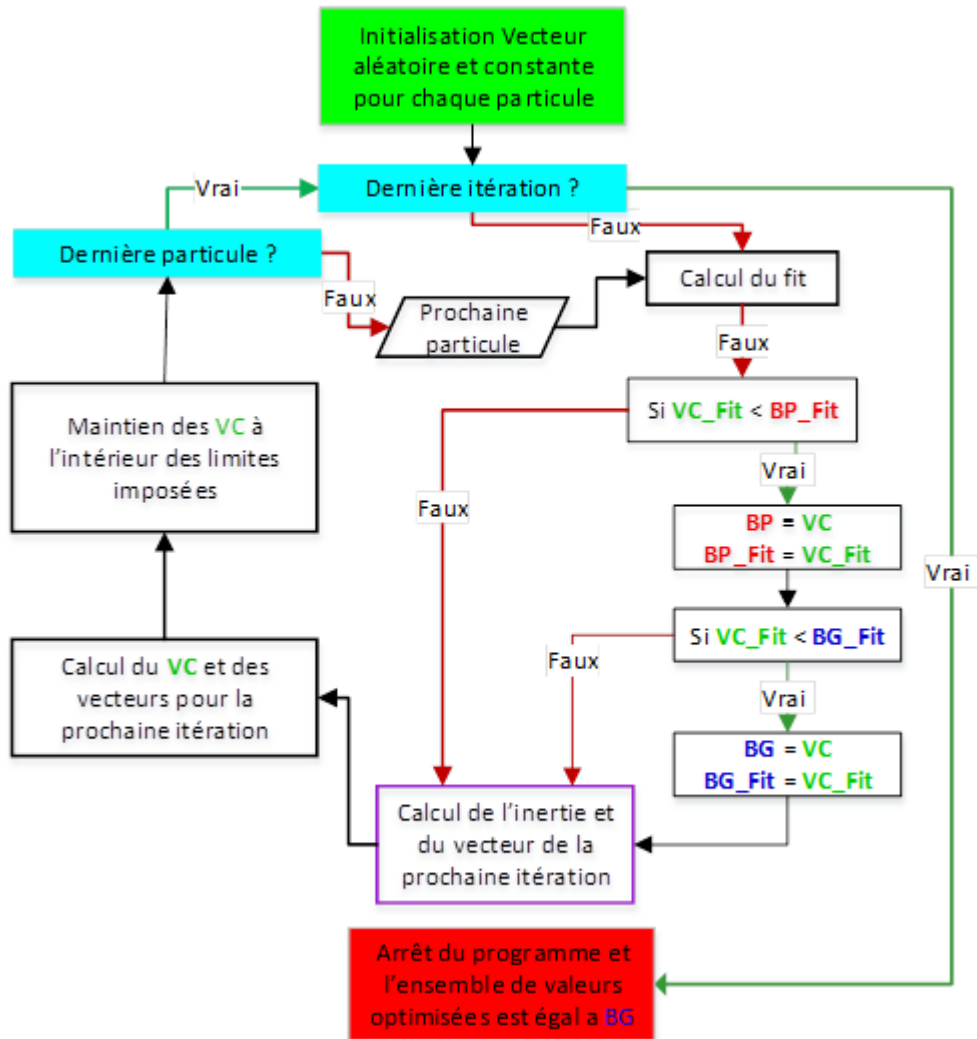


Figure 13 : Organigramme de programmation général d'une PSO minimisant la valeur du fit. Fit : valeur obtenue avec un ensemble de valeurs ; VC : Valeur courante des variables pour la particule; VC_Fit : Valeur courante du fit pour la particule; BP : valeur des variables du Best P de la particule; BP_Fit : Fit obtenu à partir du Best P de la particule; BG : valeur des variables du Best G de l'essaim; BG_Fit : Fit obtenu à partir du Best G de l'essaim.

Les vecteurs cognitif et aléatoire servent à limiter la convergence des particules et permettent à l'essaim d'explorer la surface sondée en ajoutant de la diversité au vecteur final de chaque particule puisque le Best P et le vecteur aléatoire sont uniques à chaque particule et peuvent envoyer celle-ci dans une direction autre que vers le Best G⁵⁶.

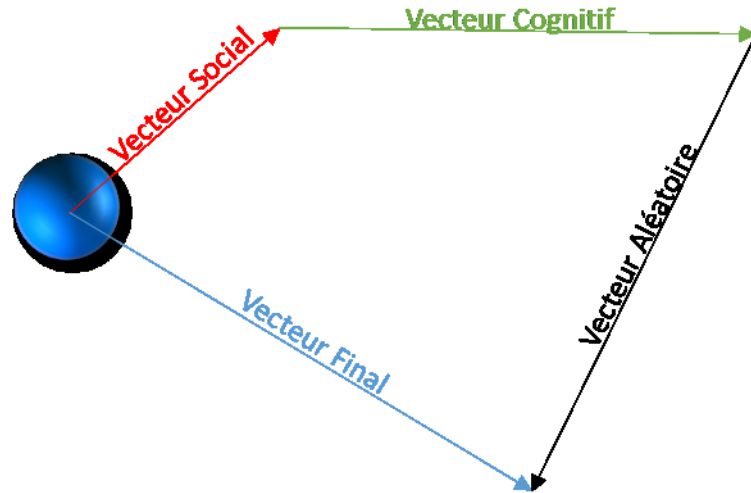


Figure 14 : Représentation des trois vecteurs utilisés pour mettre en image le déplacement des particules de l'essaim utilisées durant la première itération du programme.

L'inertie des particules est conservée entre les itérations en conservant un certain pourcentage du vecteur final de l'itération précédente. Ce pourcentage est dicté par la constante d'inertie (W_f). Celle-ci diminue à chaque itération pour atteindre son minimum au nombre maximum d'itérations du programme. La valeur de la constante d'inertie diminue linéairement avec les itérations, mais il est possible de modifier sa diminution selon les besoins. Le but de cette diminution est de s'assurer que les particules puissent explorer durant les premières itérations grâce au vecteur aléatoire. Puisque son influence sur le déplacement des particules n'est transmise que par l'inertie du vecteur final de l'itération précédente de la particule (transmission réalisée par les variables $w_{ij}^{(t)}$ de l'équation (18)). Ce qui permet à celle-ci de converger vers un point unique avant que le nombre d'itérations maximal soit atteint.

$$W_f = \prod_{i=0}^f \left(\text{inertie}_{max} - \frac{\text{inertie}_{max} - \text{inertie}_{min}}{\text{nb_iteration_tot}} \times i \right) \quad (18)$$

Il est possible de représenter le vecteur final (v_{ij}) et la position (P_{ij}) de la particule durant sa prochaine itération ($t+1$) par les équations suivantes⁵⁷ :

$$v_{ij}^{(t+1)} = wv_{ij}^{(t)} + c_{social}r_{1ij}^{(t)}(Best\ G_{ij}^{(t)} - P_{ij}^{(t)}) + c_{cognitive}r_{2ij}^{(t)}(Best\ P_{ij}^{(t)} - P_{ij}^{(t)}) \quad (19)$$

$$P_{ij}^{(t+1)} = v_{ij}^{(t+1)} + P_{ij}^{(t)} \quad (20)$$

Où

$$v_{ecteur\ social} = c_{social}r_{1ij}^{(t)}(Best\ G_{ij}^{(t)} - P_{ij}^{(t)}) \quad (21)$$

$$v_{ecteur\ cognitif} = c_{cognitive}r_{2ij}^{(t)}(Best\ P_{ij}^{(t)} - P_{ij}^{(t)}) \quad (22)$$

Dans l'équation (19) w représente la constante d'inertie, l'exposant t est le numéro de l'itération en cours, P la position de la particule et les r représentent une valeur aléatoirement entre 0 et 1 changée séquentiellement. Les valeurs de r servent à limiter la convergence des particules vers le Best G en rendant les déplacements de la particule plus chaotique et favoriser l'exploration.

Un autre élément utilisé pour contrôler la convergence des particules est l'utilisation de la constante sociale et la constante cognitive. Elles sont respectivement utilisées pour contrôler l'intensité de l'attraction de la particule vers le Best G et le Best P. Celles-ci ont généralement une valeur de 2.⁵⁷ Il serait possible d'imaginer le déplacement des particules vers le Best G au fil des itérations, comme étant semblable à un déclin gravitationnel. L'une des raisons pourquoi les constantes sociales et cognitives ont une valeur de 2, en conservant l'image d'un déclin gravitationnel, est de donner assez "d'énergie cinétique" aux particules pour ralentir la vitesse du déclin, mais pas assez pour empêcher le déclin vers le Best G.

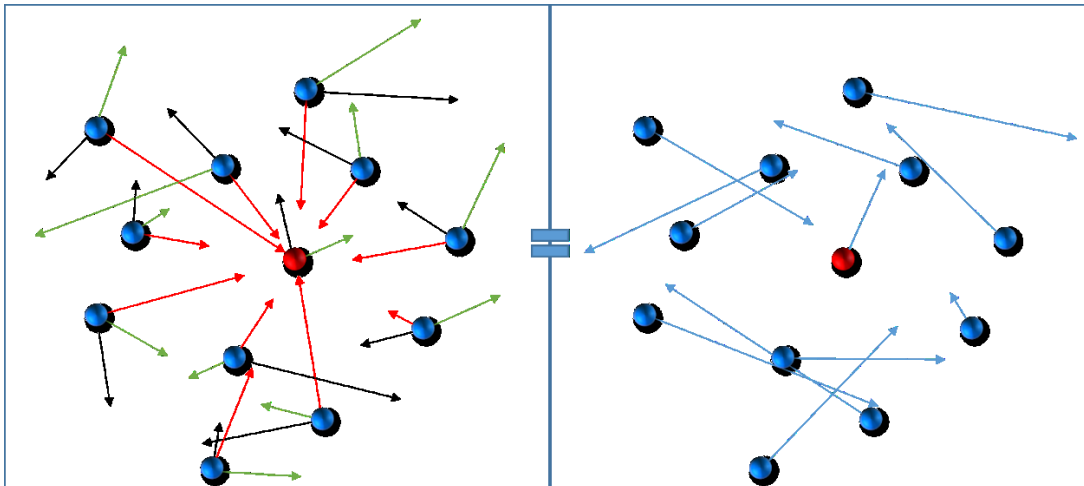


Figure 15 : Représentation du déplacement des particules d'un essaim à chaque itération du programme. Flèche verte : vecteur cognitif. Flèche noire : vecteur aléatoire. Flèche rouge : vecteur social. Flèche bleue : vecteur final. Particule rouge : Solution offrant le meilleur fit découverte par l'essaim (Best G)

L'algorithme est sujet à deux cas de problème pouvant mener à une valeur erronée. Le premier correspond au cas où les particules ne convergent pas ou trop lentement pour le nombre d'itérations données. Il est très rare que ce cas de figure survienne, le problème le plus courant est la convergence trop rapide des particules vers un Best G. Ceci fait en sorte de limiter la zone explorée par les particules et donc limite l'optimisation réalisée par l'essaim puisque l'optimum global pourrait être exclu de la zone sondée. Une multitude d'éléments peuvent causer ce problème et plusieurs modifications sont possibles pour limiter le phénomène.

L'algorithme PSO peut aussi être hybridé avec d'autres algorithmes métaheuristiques dans le but d'augmenter les chances de convergence vers un optimum global. L'hybridation ayant souvent pour but de maximiser la phase d'exploration, en permettant une exploration plus large et une convergence moins directe au début de la recherche.

1.7 Conclusion

Le présent chapitre sert à exposer les notions nécessaires à la compréhension de ce mémoire et du projet de couplage entre un biocapteur SPR et un bioréacteur auquel j'ai pris part. La théorie nécessaire à la compréhension des tests exposés dans le chapitre 2, comme la résonance des plasmons de surface, la formation des monocouches auto-assemblées et la théorie nécessaire à la compréhension des tests des cinétiques ont été exposées dans le but de comprendre les problèmes et les motivations prenant place durant cette partie du projet. L'autre partie de la théorie explique essentiellement le fonctionnement des divers composants des algorithmes discutés dans le chapitre 3. Cette partie avait comme objectif d'introduire les éléments de base des deux différents programmes, Nelder-Mead et PSO, utilisés durant la création du programme de corrélation.

Chapitre 2 : Chimie de surface des monocouches

2.1 Introduction

Le but du projet étant de créer un montage SPR permettant l'analyse en continu d'interactions entre un anticorps ayant son Fc glycosylé et un récepteur se liant à celle-ci, l'anticorps choisi pour les tests fut le Trastuzumab (TZM) et le récepteur le FcγRIIIa. Puisqu'il est nécessaire que la surface du capteur SPR puisse être régénérée lorsque les molécules du montage biologique sont dégradées, et réaliser une analyse subséquente, une paire de molécules servant à la capture et la libération du récepteur durant les tests fut requise.

L'utilisation d'un biocapteur SPR implique systématiquement la présence d'adsorption non spécifique. Il est donc nécessaire d'utiliser une monocouche pour minimiser celle-ci. Puisque chaque composante du montage biologique peut interagir de façon différente avec une monocouche d'une composition donnée, il est aussi nécessaire de tester une gamme de monocouches de compositions variées pour identifier celles à utiliser pour les tests de cinétiques. La surface ne doit pas nuire au signal causé par l'interaction de l'analyte à son récepteur. Dans le cadre de mon mémoire, je fus responsable de la préparation de toutes les monocouches, des manipulations de la P4-SPR et du traitement des données expérimentales. Tous les tests effectués ont été réalisés en collaboration avec Benoît Liberelle, du groupe de Gregory De Crescenzo, Benoît étant responsable de la préparation de toutes les solutions biologiques utilisées durant les tests.

2.2 Montages moléculaires testés

Puisque l'automatisation du système nécessite la possibilité de retirer et replacer les récepteurs qui auraient pu s'être dégradés durant les tests, le couple de molécules K5_{coil} et E5_{coil} fut utilisé comme système de capture et libération des récepteurs pour former les biocapteurs. Ce couple de molécules ayant prouvé leur fiabilité et leur

robustesse pour servir de système de capture et libération à des molécules biologiques, leur utilisation fut à la base de tous les montages biologiques réalisés durant les tests^{4, 58}.

Les premiers tests ont été réalisés en utilisant un seul anticorps soit le TZM et un récepteur spécifique au fragment cristallisable (FcγRIIIa) préalablement lié à un E5_{coil} (Figure 16). La liaison de ces deux protéines est suivie via SPR dans le but de d'étudier la cinétique des interactions entre ceux-ci. Le fragment K5_{coil}, complexant avec le E5_{coil}, se lie à une molécule de PDEA, par un lien disulfure dans le but de former un lien tout en assurant une orientation spécifique une fois la molécule liée. Le PDEA est attaché via un lien peptidique, à la monocouche de la plaque d'or. Des tests subséquents ont, par la suite, été réalisés où le PDEA servant de linker fut remplacé pour utiliser un complexe de biotine et streptavidine. Pour cet autre montage, le K5 ainsi que des molécules composant la monocouche furent préalablement liés à une biotine. Puis une streptavidine fut utilisée pour lier les deux molécules biotinylées (Figure 16 b). Le complexe biotine-streptavidine étant bien connu pour leurs très fortes interactions ($K_d = 10^{-14}$ M), il fut utilisé pour cette même capacité⁵⁹.

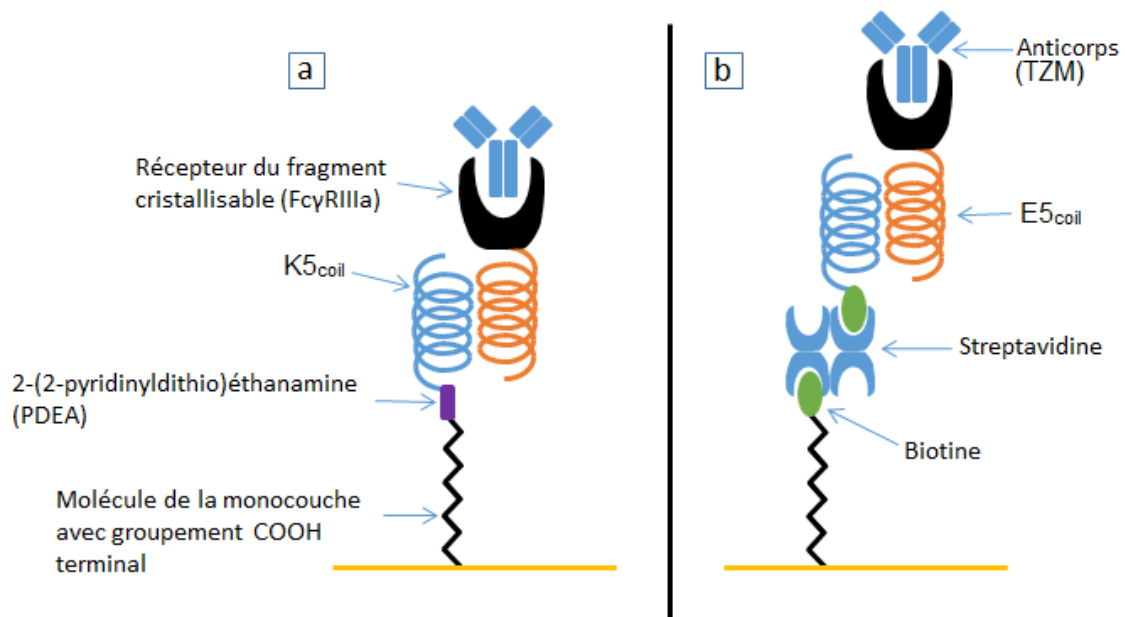


Figure 16 : Représentation des montages biologiques utilisés pour les tests réalisés via SPR avec (b) et sans (a) utilisation du complexe Biotine-Streptavidine.

Dans les deux montages exposés à la Figure 16, il serait possible de retirer le récepteur de l'anticorps en utilisant une solution de chlorure de guanidinium 6M, en séparant le complexe K5-E5 par un mécanisme d'agent chaotropique brisant les interactions entre les deux molécules. Ceci permet de retirer rapidement le récepteur étiqueté E5 du montage et de le remplacer par un autre récepteur étiqueté E5⁶⁰.

2.3 Méthodologie expérimentale

2.3.1 Appareils utilisés

L'instrument SPR utilisé durant les tests est la P4-SPR vendue par Affinité Instrument (Figure 4a). Les surfaces d'or utilisées pour les prismes de cet appareil SPR ont été formées en utilisant un pulvérisateur cathodique de modèle Cressington coating system 308 R.

2.3.2 Test SPR

2.3.2.1 Prisme SPR

Les prismes utilisés dans les appareils P4-SPR sont des prismes de Dove de 20 mm x 12 mm x 3 mm. Ceux-ci sont préalablement lavés dans une solution piranha durant une heure puis rincés à l'eau désionisée (18,2M Ω .cm) et conservés dans l'éthanol. Pour réaliser la déposition, les prismes sont séchés avant d'être déposés dans le pulvérisateur cathodique. Celui-ci est ensuite mis sous vide. Une couche de chrome d'une épaisseur de 1 nm est déposée pour servir d'adhésif entre le verre et la couche de 50 nm d'or qui est par la suite ajoutée.

2.3.2.2 Cellule fluidique

2.3.2.2.1 Cellule utilisée durant les tests

En plus du prisme de Dove, une cellule de PDMS est ajoutée à sa surface métallique pour permettre de contenir et guider les solutions injectées vers les 4 zones réalisant l'analyse de la P4-SPR. La cellule fluidique utilisée durant tous les tests SPR

exposés dans ce mémoire fut en forme de S telle qu'observable à la Figure 17. Les 3 premiers canaux observables à cette figure ont une forme de S pour permettre un triplicata de mesure en utilisant la même solution. Le quatrième canal sert de référence. Un minimum de 250 μ L de solution est nécessaire pour remplir le canal d'analyse.



Figure 17 : Cellule fluidique à 4 canaux, utilisée dans la P4-SPR, dont 3 en forme de S servant la réalisation d'un triplicata et 1 de référence utilisée en recouvrant le prisme de Dove recouvert d'une couche d'or.

2.3.2.2.2 Cellule utilisée pour le couplage avec le bioréacteur

Une fois la P4-SPR liée au bioréacteur, il sera nécessaire de minimiser le temps mort entre chaque test et augmenter le nombre de tests pouvant être réalisés simultanément. Ce qui serait possible en augmentant le nombre de canaux indépendant à la surface du prisme. Pour se faire, tout en minimisant les modifications à l'appareil P4-SPR, il serait nécessaire de remplacer la cellule fluidique en forme de S pour une cellule fluidique comportant 4 canaux distincts (Figure 18).

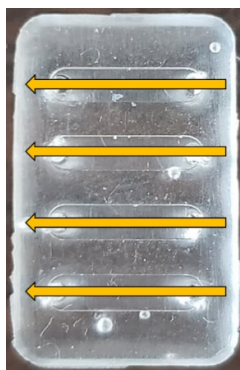


Figure 18 : Cellule fluïdique de PDMS à 4 canaux indépendants utilisés dans les appareils P4-SPR.

Pour ce faire, il fut délégué à Sophie Wesolowski, stagiaire de l'été 2018 du groupe Masson, de créer un nouveau moule pour permettre la création d'une telle cellule fluïdique. Cette nouvelle cellule fluïdique permettrait d'utiliser 2 canaux, dont un servant à l'analyse et le second de référence tandis que les deux autres canaux fonctionneraient selon le même principe de façon indépendante.

2.3.2.3 SAM

Une solution de 2 mM de molécules comprenant une chaîne alkyle thiolés (tel que l'acide 16-mercaptohexadécanoïque) dissoutes dans le N,N-diméthylformamide (DMF) est appliquée grâce à une micropipette sur la surface métallique d'un prisme de telle sorte à former une goutte bombée. Le prisme et la goutte à sa surface sont laissés à l'abri de la lumière et des vibrations durant 12 h ou une nuit. Par la suite, les prismes sont lavés 3 fois à l'éthanol puis autant de fois à l'eau désionisée (18,2M Ω .cm), et séchée avec un flux d'azote.

2.3.2.4 Montage SPR

Les prismes d'or fonctionnalisés sont insérés dans l'appareil P4-SPR puis recouverts d'une cellule de PDMS permettant de réaliser un triplicata de mesure et une mesure de référence (forme de S). Un bras métallique est par la suite abaissé sur la cellule fluïdique pour s'assurer de l'étanchéité du montage et permettre l'injection des solutions dans les canaux de la cellule. Avant l'allumage de l'appareil, de l'eau désionisée (18,2 M Ω .cm) est injectée. Une fois l'appareil allumé, celui-ci est stabilisé durant 30 min. Puis de l'eau désionisée (18,2 M Ω .cm) est encore une fois injectée suivie de l'injection du tampon utilisé durant les tests. Cela permettant d'obtenir un signal stable pour une éventuelle normalisation des résultats.

2.3.2.5 Essai direct

2.3.2.5.1 Préactivation de la surface au DIC/NHS

Dans le but de réaliser une liaison peptidique entre deux molécules, il est possible de préactiver les molécules ayant un groupement COOH pour former un lien peptidique avec une seconde molécule ayant une amine primaire en utilisant du DIC (N,N'-diisopropylcarbodiimide) et du NHS (N-hydroxysuccinimide). Pour se faire, une solution 0,4 M de DIC et 0,4 M de NHS dans le DMF est utilisé pour recouvrir la monocouche d'intérêt et laisser à réagir durant 12h ou une nuit. La monocouche doit par la suite être lavée trois fois à l'eau désionisée (18,2MΩ.cm). La monocouche une fois activée doit être utilisée rapidement après le lavage.

2.3.2.5.2 Montage K5_{coil} sans Biotine-Streptavidine

Du tampon (HSB-EP), est injecté pour réaliser une ligne de base autant dans le canal de mesure que dans celui de référence. Puis, pour permettre la liaison entre le 2-(2-pyridinyldithio)ethanamine (PDEA) et les molécules de la monocouche ayant un groupement COOH une solution fraîche de NHS (N-hydroxysuccinimide) (28 mg/mL) et EDC (hydrochlorure de N-(3-diméthylaminopropyl)-N'-éthylcarbodiimide) (78 mg/mL) dans de l'eau désionisée (18,2 MΩ.cm) est injecté dans le canal de mesure et laissé à réagir durant 5min (Figure 7). Le HSB-EP est injecté pour retirer les réactifs et laissé jusqu'à stabilisation du signal. Une solution de PDEA (12mg/mL) est injectée et laissée jusqu'à stabilisation du signal. Le tampon est injecté pour retirer le PDEA et laissé jusqu'à stabilisation du signal. Pour bloquer les sites activés par le EDC/NHS, mais n'ayant pas réagi avec le PDEA, une solution d'hydrochlorure d'éthanolamine 1M à pH 8,5 est injectée et mise à réagir durant 10min. Le tampon est injecté pour retirer l'éthanolamine. Une solution de 10μM de K5 dans un tampon d'acétate 100mM à pH 4.0 est par la suite injectée pour former un pont disulfure avec le PDEA. Après stabilisation du signal, le tampon est injecté pour retirer les molécules de K5 n'ayant pas réagi. Pour bloquer les molécules de PDEA n'ayant pas réagi une solution de cystéine (6mg/mL) et NaCl (28mg/mL) dans une solution tampon d'acétate 100mM à pH 4.0 est injecté et laisser à réagir durant 10min. Dans le but de retirer toute trace de cystéine et K5 potentiellement

restante, un lavage au tampon est effectué suivi d'un lavage en utilisant une solution de chlorure de guanidinium 6M et un dernier lavage avec le tampon de HSB-EP pour retirer le chlorure de guanidinium.

2.3.2.5.3 Montage K5_{coil} avec Biotine-Streptavidine

Du HSB-EP, servant de tampon, est injecté pour réaliser une ligne de base autant dans le canal de mesure que dans celui de référence. Puisque les molécules de la monocouche ont été préalablement étiquetées avec une biotine, une solution de streptavidine (100 μM) est injectée puis laissée à réagir durant 10 min. Du tampon est ajouté pour retirer la streptavidine libre en solution. Par la suite, une solution de molécule K5 préalablement liée à une biotine à partir de son acide glutamique terminal (10 μM) est laissée à réagir durant 10 min. L'excès de K5 n'ayant pas réagi est retiré en injectant du tampon.

2.3.2.5.4 Finalisation du montage

Après l'ajout du K5, le récepteur est ajouté en injectant une solution de récepteur étiqueté E5 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) qui est laissée à réagir jusqu'à stabilisation du signal. Du tampon est injecté dans les deux canaux dans le but de retirer tout récepteur n'ayant pas réagi et le signal est laissé à stabiliser pour réaliser une ligne de base. Il est par la suite possible d'injecter l'anticorps TZM (1000 nM) dans un tampon de HSB-EP et d'observer la formation du complexe récepteur-anticorps par le déplacement du signal jusqu'à stabilisation de celui-ci. L'anticorps peut être par la suite retiré en injectant de façon continue du tampon au moyen d'une pompe péristaltique. Si ces deux dernières étapes sont réalisées en utilisant une pompe péristaltique en utilisant un débit similaire durant les deux étapes il est possible de traiter les résultats pour obtenir les constantes k_{on} et k_{off} associées aux interactions entre le récepteur et l'anticorps injecté.

2.3.2.6 Adsorption non spécifique

La réalisation d'un test d'adsorption non spécifique dépend de l'analyte et de son environnement. Comme règle générale, il est nécessaire que l'environnement testé soit

identique à celui d'une analyse régulière, sans permettre à la molécule d'intérêt de se lier.

2.3.2.6.1 Test d'adsorption non spécifique K5, Récepteur, Anticorps TZM, Montage sans Biotine-Streptavidine

Le prisme est traité de la même façon que décrite dans la section 2.3.2.5.2 jusqu'après l'ajout de la solution de PDEA. Par la suite, du tampon est utilisé pour retirer le PDEA. Pour bloquer tous les sites actifs et refléter le plus fidèlement la surface qui serait utilisée pour les essais directs, tout en empêchant le PDEA actif de se lier avec le K5, une solution de cystéine (6 mg/mL) et NaCl (28 mg/mL) dans une solution tampon d'acétate 100 mM à pH 4.0 est injectée et laissée à réagir durant 10 min. Le tampon est injecté pour retirer la solution de cystéine. Puis, la solution d'analyte d'intérêt est injectée et laissée à adsorber durant 5 min. Par la suite, le tampon est injecté pour retirer la molécule d'intérêt du système. Le signal attribué à l'adsorption de la molécule d'intérêt est obtenu en calculant la différence de signal attribué au lavage via tampon avant et après l'injection de la molécule d'intérêt.

2.3.2.6.2 Test récepteur, montage sans Biotine-Streptavidine

Puisque les monocouches utilisées pour ces tests ont toutes été formées en utilisant des ratios différents de PEG et de PEG biotinylé aucun traitement préalable n'est nécessaire pour ce système.

2.4 Résultats expérimentaux et discussion

Les premiers tests SPR réalisés durant cette maîtrise furent axés sur l'adsorption non spécifique entre des monocouches de composition mixte et les macromolécules biologiques utilisées dans les tests de cinétique biologique précédemment décrits. Tous les résultats présentés dans cette section du mémoire ont été obtenus à l'issue d'un seul test et n'ont pas été reproduits à cause d'un manque de ressource.

Puisque les macromolécules biologiques ont plus de chance de s'adsorber non spécifiquement, les premiers tests furent concentrés sur la détection du K5, du FcγRIIIa et du TZM. Avec le changement du montage biologique pour un utilisant le complexe biotine-streptavidine, les tests ont, par la suite, inclus la Streptavidine et le K5 biotinylé.

Durant le traitement des résultats des monocouches, n'incluant pas le PEG, toutes les variations négatives du signal obtenues suite à l'ajout d'une molécule au système furent corrigées pour apparaître comme étant une variation égale à zéro. Puisque l'ajout d'une molécule à la surface de la zone sondée devrait causer une variation positive du signal ou pourrait ne pas varier si la densité du milieu n'est pas affectée de façon significative.

2.4.1 Monocouche de 16-mercaptohexadécanoïque et 1-dodécane-thiol

Les premiers tests ont été réalisés en utilisant une monocouche composée d'acide 16-mercaptohexadécanoïque et de 1-dodécane-thiol dans un ratio 1 :1. Le signal obtenu de l'essai direct (Figure 19 section D) indique que les molécules ont réussi à former le montage biologique et qu'il y a eu liaison du TZM à son récepteur. Par contre, le signal obtenu reste faible par rapport à d'autres essais directs utilisant des anticorps à des concentrations similaires. Par exemple, la différence de signal associé à l'injection d'une solution de 1000 nM d'IgG avec un biocapteur créé à partir d'une monocouche de 16-mercaptohexadécanoïque et de 1-dodécane-thiol dans un ratio 1 : 10 lié à de l'anti-IgG s'élevait à près de 12,5 nm (Annexe C Figure 38). Ce résultat est 558 fois plus grand que le signal obtenu avec l'ajout d'une solution de 1000 nM de TZM avec 10 fois plus de sites potentiellement actifs. Le faible signal obtenu du TZM serait explicable par le fait que son récepteur soit en grande partie absent de la monocouche au moment de l'injection du TZM.

Un test d'adsorption non spécifique a par la suite été réalisé dans le but d'évaluer la portion du signal pouvant être causé par l'adsorption de chacune des molécules du montage moléculaire sur une monocouche de même composition (Figure 19 section D). Celui-ci révèle que seul le TZM s'adsorbe. Cependant, près de la moitié du signal du TZM obtenu dans l'essai direct serait causé par l'adsorption non spécifique. Ceci étant indésirable, mais la variation du signal est assez grande pour ne pas être entièrement

attribuée au bruit qui peut causer une variation du signal d'environ 0,0057 nm. Cependant, ces signaux restent relativement faibles.

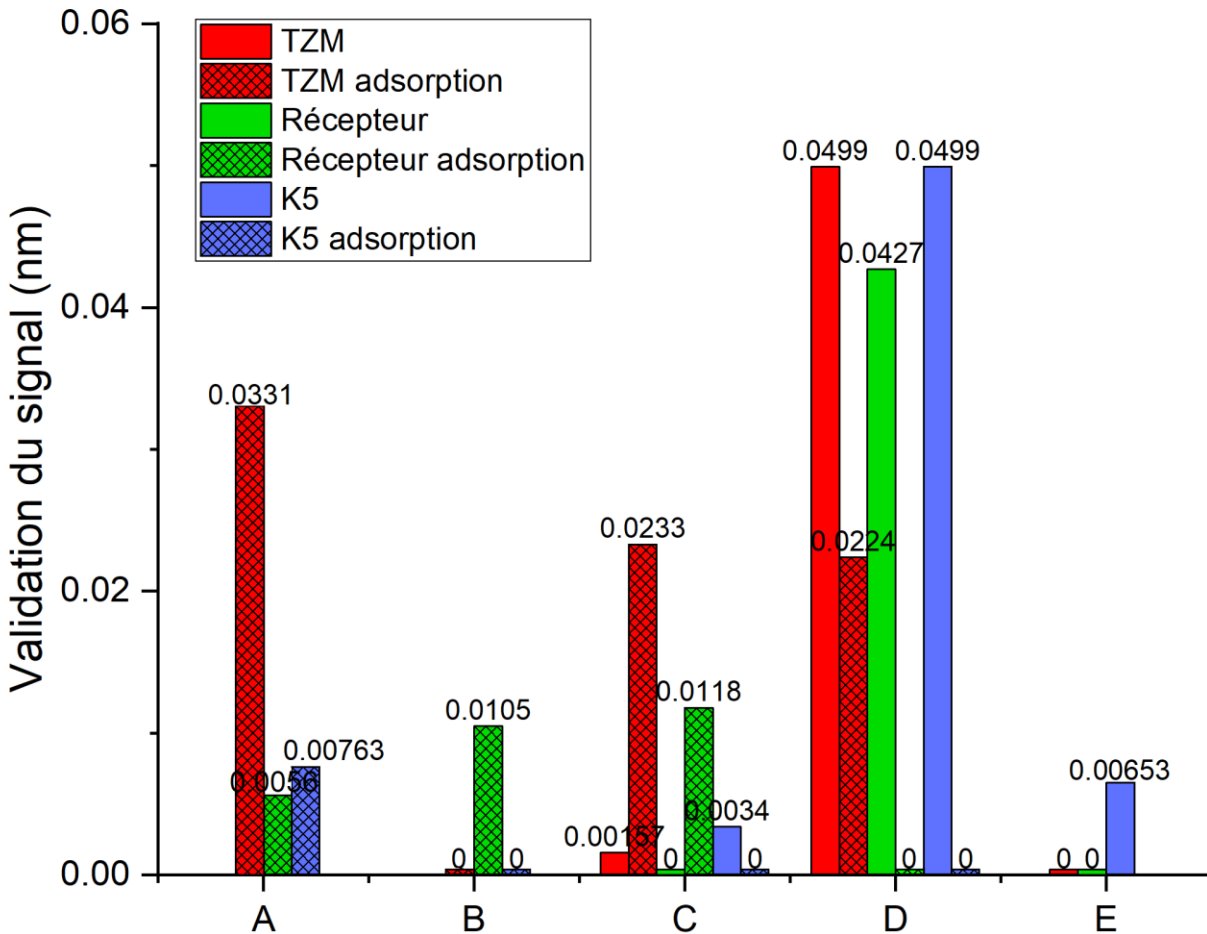


Figure 19 : Variation du signal SPR normalisé par la différence de signal entre de l'eau désionisée (18,2 M Ω) et le tampon HSB-EP, associé à l'adsorption non spécifique et de trois protéines (l'anticorps TZM; le récepteur Fc γ RIIIa; K5) sur différentes monocouches de composition variée .A : 1-(carboxypentyl)-3-(mercaptododecyl)-imidazoliumbromide (C5) et 11-Mercapto-1-undecanol dans un ratio 1 :10 , B : 1-dodécanthiol, C : C5 et 1-dodécanthiol dans un ratio 1 :10 , D : acide 16-mercaptohexadecanoïque et 1-dodécanthiol dans un ratio 1 :1, E : C5 préactivé et 1-dodécanthiol dans un ratio 1 :10.

Un test d'adsorption non spécifique en utilisant une monocouche entièrement composée de 1-dodécanthiol (Figure 19 section B) a par la suite été effectué dans le but

de déterminer la cause de l'adsorption non spécifique du TZM. Contrairement au test effectué en utilisant la monocouche de ratio 1 :1 acide 16-mercaptohexadecanoïque et 1-dodécanthiol, une adsorption non spécifique du récepteur a été observée, mais aucune ne fut observée pour le TZM.

2.4.2 Monocouche de C5

Le 1-(carboxypentyl)-3-(mercaptododecyl)-imidazoliumbromide (C5) fut choisi pour les résultats précédemment obtenus avec les monocouches composées ce liquide ionique⁶¹. Les monocouches de C5 utilisées pour un biocapteur pour l'IgG ayant permis l'obtention d'un signal de même intensité que celle composée d'acide 16-mercaptohexadecanoïque⁶¹. C'est pourquoi une monocouche de composition mixte dans un ratio 1 :10 de C5 : 1-dodécane-thiol fut initialement utilisée pour les tests. Mais comme il est possible de voir à la Figure 19 section C, le signal résultant de l'essai direct pour les trois analytes est plus faible que celui obtenu avec la monocouche d'acide 16-mercaptohexadecanoïque et de 1-dodécane-thiol (ratio 1 :1), (Figure 19 section D).

Le très faible signal fut attribué au fait que le groupement terminal COOH du C5 ne réagissait pas de façon suffisante avec le EDC/NHS pour qu'une assez grande quantité de sites soient activés et puisse former un lien peptidique. La réaction du C5 avec le EDC/NHS fut remplacée par une préactivation du C5 en utilisant du DIC/NHS, ce qui aurait permis d'obtenir une plus grande quantité de sites activés pour réagir avec le PDEA. Cette hypothèse fut basée sur le long temps de réaction ainsi que l'absence de certaines réactions secondaires présentes dans la formation d'un lien peptidique en utilisant du EDC/NHS⁶². Cependant, comme vu à la Figure 19 section E, le signal a presque doublé pour le K5 et aucune variation de signal associé à liaison du TZM ne fut détecté.

Bien que la variation de signal de l'essai direct soit presque nulle pour les deux tests impliquant le C5, un test d'adsorption non spécifique fut effectué (Figure 19 section C). Il est possible de voir que le niveau d'adsorption non spécifique du TZM est équivalent à celui précédemment observé pour l'acide 16-mercaptohexadecanoïque : 1-dodécane-thiol (1 :1) (Figure 19 section D) ainsi qu'un signal équivalent, pour le récepteur,

au test effectué avec la monocouche uniquement composée de 1-dodécane-thiol (Figure 19 section B). À partir des résultats, il est possible d'observer une tendance. La présence d'une monocouche plus hydrophobe semble causer une plus grande adsorption non spécifique du récepteur, tandis qu'une surface plus hydrophile semble causer une augmentation de l'adsorption non spécifique du TzM. Ceci semble être appuyé par les résultats obtenus en réalisant les mêmes tests en utilisant une monocouche de 11-mercaptopundécane et C5 (Figure 19 section A). Cependant, la présence d'adsorption non spécifique du K5, qui n'avait pas été observée pour les monocouches contenant du 1-dodécane-thiol, porte à croire que la présence de surface hydrophobe empêcherait l'adsorption non spécifique du K5.

Un élément inexplicable est que la variation du signal pour les essais directs des biomolécules pour les monocouches de C5 et 1-dodécane-thiol soit, pour le TzM et son récepteur, plus faible que le signal obtenu pour les tests d'adsorption non spécifique (Figure 19 section C). L'intensité du signal obtenu pour les tests avec le TzM et son récepteur devrait être équivalente ou plus grande que le signal obtenu pour le test d'adsorption non spécifique. Puisque la variation de signal causée par le phénomène d'adsorption non spécifique aurait dû faire partie de la variation de signal obtenu de l'essai direct. Ceci ne semble pas être le cas puisque le signal du TzM n'est que 6.7% de celui obtenu pour les tests d'adsorption non spécifique de celui-ci. De plus, aucune variation positive du signal associée à l'ajout du récepteur ne fut observée durant l'essai direct tandis que le signal de l'adsorption non spécifique de celui-ci fut équivalent à celui obtenu pour le 1-dodécane-thiol.

La présence d'une telle anomalie dans les résultats indique la présence d'un problème, qui n'a, jusqu'à présent, pas pu être expliqué. Ces données sont donc inutilisables pour arriver à une conclusion quant au signal obtenu pour les essais directs des molécules composant le montage biologique.

2.4.3 Monocouche d'acide 3-mercaptopropionique-LHDLHD

La dernière monocouche utilisant une chimie exempte du complexe Biotine-Streptavidine fut composée de l'acide 3-mercaptopropionique-LHDLHD. Ce peptide

ayant démontré une bonne capacité à limiter l'adsorption non spécifique dans le sérum bovin connue pour être riche en protéines variées⁶³. Ce peptide serait favorable pour les tests utilisant des protéines de tailles et compositions variées. Un essai direct et un test d'adsorption non spécifique furent réalisés. Mais après les résultats décevants des tests d'adsorption non spécifique du peptide, il m'a paru étrange que cette monocouche ait obtenu de bons résultats dans des tests antérieurs⁶³. Par la suite, j'ai reconsidéré la méthode de conservation du peptide dans le laboratoire. L'échantillon était conservé dans un dessiccateur à température pièce, et ce depuis plus d'un an, bien que protégé de la lumière, ces conditions m'ont semblé loin d'être optimales en considérant que l'échantillon en question était un peptide.

Le peptide utilisé durant les tests fut donc analysé au spectromètre de masse et comparé au spectre du peptide intact (Annexe B). Dans la partie (b) de la Figure 35 représentant le spectre de masse d'un échantillon de LHDLHD intact, il est possible d'observer un pic à 837.50 m/z et à 419.34 m/z qui peuvent être associés à $[M+1H]^{1+}$ et $[M+2H]^{2+}$ où M est le 3-mercaptopropionique-LHDLHD. Cependant, dans la partie (a) de la Figure 35, représentant le spectre de masse du peptide utilisé pour former les monocouches, aucun pic ne put être associé au 3-mercaptopropionique-LHDLHD. Ce qui indique la dégradation de l'échantillon de peptide utilisé pour les tests et donc que les données obtenues des tests sont inutilisables.

2.4.4 Monocouche de PEG

Dans les monocouches précédemment testées, seule la monocouche d'acide 16-mercaptophexadecanoïque : 1-dodécantiole (1 : 1) permit l'obtention d'un signal indiquant la bonne formation du montage biologique et seul un faible signal associé à la liaison du PDEA fut observé (environ 0,2 nm). Il fut donc supposé, dû aux faibles signaux obtenus dans les tests par le K5 que l'étape de liaison du K5 au PDEA soit limitante. Un autre montage biologique fut donc proposé dans le but de limiter la nécessité d'un pont disulfure formé durant le test en faveur du complexe biotine-streptavidine. Il fut aussi proposé d'utiliser une monocouche composée de PEG (tri(éthylène glycol)dodécylthiol), puisque celle-ci est connue pour limiter l'adsorption non spécifique et permettrait de confirmer le bon fonctionnement du montage.

Le premier test fut effectué dans le but d'observer l'adsorption non spécifique de l'anticorps et des autres molécules composant le montage sur une surface de PEG non biotinylé, puisque celle-ci constituerait la majorité de la monocouche pour les autres tests. Les deux tests subséquents utilisant du PEG biotinylé (tri(éthylène glycol)dodecylthiol biotinylé) furent réalisés en injectant le TZM en premier pour observer son adsorption non spécifique. De la streptavidine puis du K5 biotinylé furent injectés par la suite dans le but d'observer le signal résultant de la liaison de la streptavidine à la biotine de la monocouche et de la liaison du K5 biotinylé à la streptavidine liée à la monocouche.

Il m'est nécessaire de préciser que les résultats présentés la Figure 20 n'ont pas été normalisés en fonction du signal de l'eau et du tampon puisque la différence de variation entre les SAM est inférieure à 7% pour les 3 plaques utilisées. De plus, tous les tests furent effectués dans des conditions similaires (tous ont été effectués le même jour, sur le même appareil, les monocouches ont été formées en même temps). Ce qui n'était pas le cas pour les tests des monocouches n'utilisant pas de PEG. C'est pourquoi je n'ai pas cru bon d'appliquer cette correction.

2.4.4.1 Monocouche de PEG non biotinylé

Le premier test impliquant l'utilisation de PEG fut effectué en utilisant une monocouche entièrement composée de PEG dans le but d'observer l'adsorption non spécifique de plusieurs composantes du montage biologique. En observant la Figure 20, partie A, il est possible de remarquer qu'une seule des variations de signal est positive soit pour le K5 biotinylé, les autres étant négatives. Cela impliquerait une diminution de la densité dans la zone sondée par l'appareil. Ce qui pourrait être causé par l'hydratation de la monocouche de PEG qui causerait le déploiement des molécules de PEG et leur réorganisation à la surface, causant une diminution du signal causé par l'éloignement des groupements terminaux de la surface d'or (exemple de variation du signal : Annexe C Figure 36). Ce qui pourrait aussi expliquer pourquoi la variation négative de signal SPR diminuait entre l'injection des anticorps et la streptavidine.

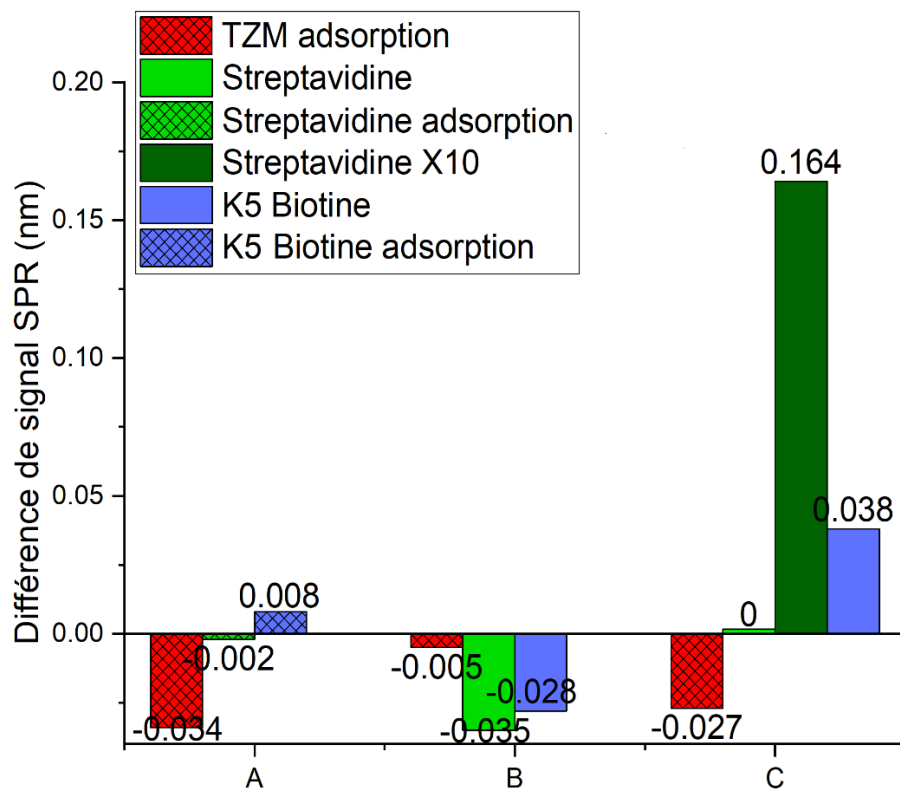


Figure 20 : Signal obtenue de l'essai direct et de l'adsorption non spécifique de l'anticorps TZM, la streptavidine(100 μ M) et/ou de la streptavidine 10 fois plus concentrée (1000 μ M) et du K5 biotinylé composant le montage biologique sur une surface composée de différent pourcentage de PEG biotinylé et PEG non biotinylé. A : 100% , B : 95% , C : 75% de PEG non biotinylé

Cependant, en considérant le faible signal obtenu pour chacune des molécules, il est possible d'assumer, même si le signal fut affecté par l'hydratation de la monocouche, que ces résultats tendent à indiquer que l'adsorption non spécifique causée par une monocouche composer de PEG serait négligeable.

2.4.4.2 Monocouche de 5% de PEG biotinylé et 95% de PEG non biotinylé

Le second test fut réalisé en utilisant une monocouche composée de 5% de PEG biotinylé et de 95% de PEG (Figure 20, section B). La variation négative du signal pour

les trois molécules indiquerait que la streptavidine n'a pas interagi avec les molécules de biotines liées à la monocouche.

Une autre possibilité serait que la quantité de streptavidine s'étant liée à la surface n'était pas assez importante pour obtenir un signal détectable. C'est pourquoi une monocouche ayant un plus grand ratio de PEG biotinylé fut testée.

2.4.4.3 Monocouche de 25% de PEG biotinylé et de 75% de PEG non biotinylé

La dernière monocouche fut créée en utilisant 25% de PEG biotinylé et 75% de PEG (Figure 20 section C). Puisque le signal associé à l'injection de la streptavidine ne fut pas détecté à la concentration normalement utilisée pour les autres tests (100 μ M), une seconde solution de streptavidine 10 fois plus concentrée fut injectée dans le but d'obtenir un signal détectable par la SPR, cette fois-ci observé. Un signal fut détecté pour le K5 biotinylé, précédemment impossible à détecter, impliquant la possible liaison de celui-ci à la monocouche.

Il est aussi possible de remarquer que la présence de PEG biotinylé dans la composition de la monocouche ne semble pas causer une augmentation de l'adsorption non spécifique de l'anticorps TZM. Cependant, il serait aussi possible que l'hydratation de la monocouche cause une décroissance du signal associé à l'adsorption non spécifique du TZM.

2.5 Conclusion des tests sur diverses monocouches

Les résultats des tests n'ont pas permis d'observer une monocouche ayant les caractéristiques requises pour être utilisées ultérieurement dans le couplage avec le bioréacteur. Seules les monocouches composées de PEG (25 :75 biotinylés : non biotinylé) ainsi que celle d'acide 16-mercaptohexadecanoïque et de 1-dodécane-thiol (1 :1) ont permis d'obtenir un signal durant l'essai direct supérieur au signal provenant de l'adsorption non spécifique pour les mêmes molécules sur la même monocouche, ou pour celle de PEG 25 :75, une monocouche de composition similaire (PEG non biotinylé). Ceci mène au principal problème observé, soit que le signal provenant des essais directs des

autres monocouches de composition mixte était, si celui-ci était plus grand que zéro, plus faible que le signal obtenu lors des tests d'adsorption non spécifique. Ceci ne devrait pas être possible et implique donc la présence d'un problème qu'il ne m'a pas été possible d'identifier durant ma maîtrise.

Ce problème est étonnant puisque les techniques utilisées pour créer le montage biologique sans streptavidine, soit l'utilisation du PDEA et le couple K5-E5 utilisés dans le but de former un complexe réversible ont permis, par le passé, l'obtention de signaux non négligeable à des concentrations plus basses que celle utilisée durant les tests réalisés durant ma maîtrise^{4, 58}. Le faible signal associé aux essais directs des protéines pourrait être en partie lié aux limitations causées par le transport de masse. Il serait possible de tester cette hypothèse en utilisant une pompe péristaltique pour injecter en continu une solution fraîche d'analyte ou faire en sorte que la pompe péristaltique soit installée pour injecter la solution d'analyte en circuit fermé. Ainsi, l'analyte serait préservé en permettant un brassage et la réinjection des molécules s'étant précédemment adsorbées dans la solution d'analyte. Si le signal d'adsorption non spécifique des molécules reste supérieur au signal de l'essai direct, il serait possible d'analyser plus en profondeur les molécules présentes à la surface de la zone sondée. Pour ce faire, la surface d'or serait utilisée comme cathode pour réduire le thiol des alcanes composant la monocouche⁶⁴. Cela permettrait de libérer les molécules composant et adsorbées à la surface de la monocouche. Il serait alors possible de récupérer les molécules pour les analyser grâce à la spectrométrie de masse. L'analyse et l'identification des molécules à la surface de la monocouche permettraient une meilleure compréhension des résultats observés durant les tests réalisés sur SPR. Il serait aussi possible de tester l'impact du solvant utilisé durant la formation de la monocouche. Puisque celui-ci à un impact non négligeable sur la qualité de la SAM⁶⁵.

Il m'est aussi nécessaire d'exprimer quelques recommandations pour la continuation de ce projet. Il serait nécessaire de répéter certains des tests pour confirmer les résultats. Cela n'ayant pas être fait dû à un manque de ressources. Il serait aussi intéressant d'observer l'impact de l'augmentation du ratio de PEG biotinyllé à 50% pour observer l'impact sur le signal obtenu ainsi que sur l'adsorption non spécifique. En

réalisant à nouveau les tests, il serait nécessaire de confirmer la liaison du PDEA à la monocouche. Pour se faire, une solution contenant des nanoparticules d'or serait injectée. Les nanoparticules d'or peuvent réagir avec le pont disulfure du PDEA et ce lié à celui-ci pour former deux liens semi-covalents. La taille des nanoparticules permettrait d'obtenir un signal d'une plus grande intensité que celui pouvant être obtenu de l'ajout du PDEA à la surface de la monocouche.

Il sera nécessaire de changer la composition du tampon utilisé pour les tests futurs. Puisqu'il est nécessaire de rappeler que la solution injectée dans la SPR, une fois le couplage au bioréacteur effectué, proviendra du bioréacteur. Ce substrat sera majoritairement composé de protéines, différentes de celle utilisée durant les tests faits dans ce chapitre. Il sera donc aussi nécessaire de réaliser des tests en ajoutant une gamme de protéines de composition similaire à ceux provenant du bioréacteur pour déterminer laquelle des monocouches serait plus apte à limiter l'adsorption non spécifique. Cela serait particulièrement révélateur puisque certaines monocouches de PEG subissent de l'adsorption non spécifique dans les matrices biologiques complexes contrairement aux monocouches de LHDLHD qui résiste mieux à l'adsorption non spécifique des protéines dans une matrice complexe et riche en protéines^{33, 63, 66}.

Chapitre 3 : Algorithme de corrélation

3.1 Introduction

Les périodes d'attente entre les tests des diverses monocouches décrits au chapitre 2 furent utilisées pour développer un programme de corrélation non linéaire. Aucune contrainte spécifique ne fut demandée pour la création de l'algorithme utilisé pour obtenir les constantes cinétiques. Quatre directives générales servirent à guider le développement du programme. Celle-ci étant que le programme devrait être précis, exact, permettre l'obtention des constantes cinétiques rapidement après l'obtention des données et implémentable dans un montage pouvant être modifié au cours de son développement.

3.2 Caractéristiques nécessaires au programme

Pour obtenir les valeurs des constantes cinétiques de la réaction en temps quasi réel, il est nécessaire que le programme d'acquisition des données puisse communiquer avec le programme qui traite ces données. Il est aussi nécessaire que le programme réalisant l'acquisition (écrit en LabVIEW) puisse signaler le début et la fin de l'envoi des données. Le programme de traitement doit aussi acquérir des données complémentaires nécessaires au fonctionnement de l'algorithme. Le temps de calcul doit aussi être suffisamment rapide pour permettre de traiter les données en moins de temps qu'il est nécessaire à la réalisation d'un test cinétique. Il serait donc possible que le programme de traitement des données sous forme de dll soit inséré dans le programme d'acquisition en l'ajoutant ou que celui-ci soit ajouté dans le programme contrôlant tout le montage et communique avec le programme d'acquisition via un pipeline ou un fichier partagé entre les deux programmes.

Les études qui traitent des valeurs des constantes cinétiques du couple anticorps-récepteur étudié étant rares, la possibilité de confirmer ou d'infirmer les valeurs obtenues est très limitée. Il est donc important que le programme réalisant la corrélation soit précis et exact. Puisqu'il est impossible qu'un programme teste toutes les valeurs pour chaque combinaison de variables, il est nécessaire que celui-ci puisse tendre vers la meilleure

combinaison de variables de façon autonome pour maximiser la corrélation. Pour se faire, le fit (somme des moindres carrés entre les données théoriques et expérimentales) sera minimisé pour obtenir les valeurs des constantes les plus exactes.

Un problème commun présent pour tous les algorithmes d'optimisation est la présence de minimums locaux pouvant détourner la recherche du programme de la meilleure corrélation.

Un algorithme qui débiterait près d'un minimum local pourrait converger vers celui-ci si les déplacements du programme ne se basent que sur la décroissance du fit pour trouver le minimum global, sans permettre une exploration plus poussée des zones avoisinantes. Si telle est le cas, le résultat de l'optimisation variera en fonction de la combinaison de valeur des variables initialement imposées au programme. C'est pourquoi les programmes d'optimisation métaheuristique ont généralement une partie de leur constituant ayant comme seul but de limiter une convergence trop rapide et de permettre une exploration plus poussée de la zone sondée. Bien que ces algorithmes soient plus sophistiqués, dans le cas où le résultat final ne peut être confirmé comme étant exact, la seule option possible pour s'assurer des valeurs est de répéter le test à partir de différents points initiaux. C'est pourquoi un algorithme permettant d'obtenir des résultats constants est de la plus haute importance pour réaliser la corrélation.

3.3 Élément technique du programme

Dans le but d'automatiser l'analyse d'anticorps, certains éléments ont dû être considérés dans le but de faciliter la création et l'implémentation du programme.

3.3.1 Langage de programmation

Le premier langage considéré fut LabVIEW. Il a comme avantage d'être compatible et facilement intégrable avec le programme d'acquisition de données étant aussi écrit en LabVIEW. Cependant, LabVIEW étant un langage graphique comportant une syntaxe différente des langages écrits, mes bases en informatique auraient été inutiles. De plus, il s'agit d'un langage propriétaire peu utilisé dans un cadre général, ce qui limite les sources d'aide.

Les premiers programmes fonctionnels ont été écrits en Matlab, un langage interprété principalement utilisé pour des calculs matriciels et souvent utilisé dans le domaine scientifique pour réaliser le traitement de données. Ce langage est relativement peu complexe au niveau de sa syntaxe puisqu'il ne demande pas une mise en place particulière pour fonctionner et vient avec une certaine quantité de fonctions complexes. Cependant, celui-ci comporte aussi des désavantages majeurs. Par exemple, si l'on désire réaliser un programme autonome (stand-alone) en utilisant Matlab il est aussi nécessaire que chaque ordinateur voulant exécuter ce programme ait une licence Matlab valide. Puisqu'il est propriétaire, très peu de langages de programmation sont compatibles avec lui. Cela ne permettrait pas la création d'un programme portable grâce à une librairie ou un exécutable comme programme autonome pouvant communiquer avec un programme écrit en LabVIEW.

Une autre possibilité aurait été l'utilisation du langage Python. Sa popularité étant grandissante à cause de sa simplicité, la facilité de sa lecture, sa grande communauté d'utilisateurs et le fait qu'il soit open source⁶⁷. Il aurait été possible d'utiliser ce langage pour créer une librairie utilisable par un programme LabVIEW en utilisant un programme de conversion pour créer une librairie liée dynamique (DLL). Il aurait aussi été possible de créer un programme autonome en utilisant un programme de conversion tel que py2exe, toutefois cette connaissance fut acquise plus tard.

Le langage informatique finalement choisi fut le C++. Le C++ est amplement utilisé et dû à sa longue popularité, standardisé en 1998⁶⁸, une grande communauté s'est formée assurant une grande quantité de ressources présente en ligne. Les librairies C++ peuvent être implémentées dans un programme LabVIEW. Même si ce langage comporte une syntaxe relativement compliquée par rapport aux autres langages considérés, le C++ a comme avantage de permettre la création de programmes parmi les plus rapides en termes de vitesse d'exécution.

3.3.2 Portabilité et format final du programme

Le programme informatique pouvait prendre deux formes pour permettre l'interaction de celui-ci avec le programme d'acquisition de la P4-SPR (en LabVIEW).

La première serait une librairie (dll). Il serait possible d'imaginer une librairie comme étant une partie de programme informatique amovible permettant d'ajouter des fonctionnalités sans les coder soi-même. Cela permettrait au programme d'acquisition de communiquer plus facilement les données puisque le programme de traitement serait déjà implémenté et optimisé au moment de la compilation. Mais le désavantage majeur serait que le déverminage de la librairie deviendrait plus complexe.

La seconde possibilité serait la création d'un programme indépendant du programme d'acquisition, comprenant une interface graphique utilisateur (GUI) pour permettre l'intégration et la modification des variables nécessaires au fonctionnement du programme de traitement de données. Il serait alors plus facile de localiser la cause des problèmes dans le code source. Le programme a donc été réalisé comme une librairie implémentée dans un programme indépendant comprenant un GUI dans le but de faciliter la création et la résolution des problèmes en lien avec le programme.

Un langage compatible supporté par Visual Studio et permettant de créer un GUI sur le logiciel a été choisi. Ce langage étant le CLI-CPP, se traduisant par Common Language Infrastructure pour C++ et comportant certaines variations syntaxiques du C++, mais restant compatible avec celui-ci.

3.4 Développement du programme

Le programme de corrélation a évolué tout au long de ma maîtrise. Certaines techniques ont été implémentées, puis modifiées, pour finir par être remplacées par d'autres approches plus performantes et plus récentes. Il reste nécessaire de préciser que les techniques utilisées ne sont pas nécessairement les plus efficaces ni les plus récentes en termes d'algorithme métaheuristique utilisé dans le but de réaliser une corrélation non linéaire pour obtenir les constantes cinétiques d'une réaction. Ceci étant en partie causé par la très grande quantité d'algorithmes et l'émergence constante de variation de plus anciens algorithmes sous de différents noms⁶⁹.

3.4.1 Critère d'optimisation

Pour permettre à un programme de réaliser une optimisation, il est nécessaire de spécifier la variable à maximiser ou minimiser. Dans le cas d'une corrélation entre une

courbe non linéaire et une formule donnée, il n'est pas possible d'utiliser un coefficient de corrélation pour déterminer la qualité de la corrélation. L'option la plus viable serait d'utiliser le moindre carré des résidus (Least Square Residuals) qui peut être obtenu par l'équation suivante⁷⁰ :

$$fit = S = \sum_{i=0}^n (y_i - f(x_i, v_0, v_1, \dots, v_k))^2 \quad (23)$$

Où S est la somme des résidus au carré de l'ensemble des valeurs (de i à n), où y_i est la valeur expérimentale associée à la valeur de x_i et f étant la fonction dépendante de x_i avec les paramètres v_0 à v_k . La valeur de la somme des résidus au carré étant appelée fit dans plusieurs éléments de littérature il en sera de même pour ce mémoire.

Donc, en tentant de minimiser la valeur du fit et en utilisant la bonne équation il est possible de faire relativement bien concorder les variables de l'équation théorique avec celles du système expérimental. Pour le programme créé dans ce mémoire, plus la valeur du fit est faible plus la corrélation tend à être bonne. Il n'est pas possible d'obtenir une valeur de fit égale à 0 même si l'on tente de corréler deux ensembles de données créés avec les mêmes variables.

La cause de ce manque d'exactitude vient du fait qu'en informatique les nombres avec valeurs décimales sont représentés sous une forme à point flottant selon la forme suivante⁷¹ :

$$[Signe] * 1. [Mantissa] * 2^{[Exposant]} \quad (24)$$

Cette méthode de représentation des nombres, a comme avantage de permettre de représenter des valeurs décimales et de réaliser des calculs de façon très rapide, mais cause aussi une perte de précision après chaque opération mathématique d'où le nom d'erreurs d'arrondis (round off error). Il est possible de minimiser l'impact de ce genre d'erreur en augmentant la quantité de bits alloués à la mantisse ou en utilisant des bibliothèques spécialisées. C'est pourquoi tous les éléments nécessitant un grand degré de

précision sont représentés par les variables de type double ou long double, les deux types de formats offrant la plus grande précision supportée par Visual Studio.

3.4.2 Première version : Nelder-Mead

Le premier test pour réaliser une corrélation entre des données expérimentales et une équation fut réalisé avec un programme écrit en Matlab. Celui-ci utilisant l'algorithme heuristique de Nelder-Mead pour réaliser l'optimisation. L'algorithme étant déjà implémenté dans la version de base de Matlab, il fut relativement simple à utiliser.

$$v_f = fminsearch(func, v_0) \quad (25)$$

La fonction `fminsearch`, équation (25), qui utilise l'algorithme de Nelder-Mead nécessite deux éléments, la fonction (`func`) avec laquelle les variables peuvent être évaluées pour obtenir un fit et un conteneur incluant les valeurs initiales des variables à évaluer (v_0).

À ce moment une seule équation avait été testée, soit celle pour obtenir le K_d en utilisant le signal SPR une fois le système à l'équilibre et à de multiples concentrations (équation (17)). Puisque la quantité de récepteurs actifs dans la zone sondée n'est pas connue entre chaque test, ni le signal par molécule d'analyte par récepteur, il n'est pas possible d'obtenir une valeur de R_{max} pour fixer celle-ci dans l'équation et permettre d'augmenter la probabilité d'obtenir une valeur de K_d exacte.

Les premiers tests de corrélation ont été réalisés à partir de données fournies par des utilisateurs des P4-SPR. Un problème fut observé quant au traitement des données brutes par les utilisateurs de SPR. Le problème étant que les personnes choisissent de manière subjective l'ensemble de données utilisées quand la concentration d'analyte est nulle ce qui affectait les résultats de la corrélation. Cela fait en sorte que la valeur utilisée ne reflète pas nécessairement la réalité du système et ajoute une source d'erreur que le programme ne peut pas considérer. C'est pourquoi l'équation utilisée fut modifiée pour ajouter une variable R_a (R_a : signal d'ajustement) dans le but de corriger la variation apportée par le prétraitement de données. La forme de la courbe n'étant pas affectée par la variable R_a .

$$R_t = \frac{R_{max}[A]}{K_d + [A]} + R_a \quad (26)$$

Après plusieurs tests, un autre problème apparut sous la forme de valeurs de variables aberrantes. Par exemple, la valeur de R_{max} étant équivalente à 0 ou la valeur de R_a et K_d égalaient 0. Ces valeurs étant impossibles, il fut déterminé que l'algorithme tombait dans des minimums locaux et sortait de la gamme de valeurs possibles. Pour remédier à ce problème, une librairie (fminsearchbnd⁷²) fut installée pour limiter le déplacement du simplex en lui imposant des barrières contraignant les valeurs possibles des variables. Cela permit de stopper la convergence de l'algorithme vers des valeurs aberrantes, mais n'empêcha pas la convergence du simplex vers des minimums locaux.

Un troisième problème apparut sous la forme de la variation des valeurs finales des variables en fonction des valeurs initiales. Une hypothèse sur la cause serait que le programme obéit à un ensemble de règles permettant seulement certaines actions possibles du simplex et donc le même trajet serait fait si la position pour les n sommets (le premier sommet provenant de la valeur initiale imposée au programme par l'utilisateur) du simplex était obtenue via une équation mathématique. Mais si les autres sommets étaient initialisés en utilisant des valeurs aléatoires, la valeur finale serait différente même si les variables initiales étaient les mêmes.

Donc en observant les tests 1 à 3 du Tableau 1, il est possible de voir que toutes les valeurs finales de K_d et de R_{max} sont identiques quand l'on utilise les mêmes valeurs d'initialisation, impliquant que le programme n'utilise aucune variable aléatoire durant l'initialisation de ses sommets.

Tableau 1 : Impact des variables initiales sur les résultats de l'algorithme de Nealder-Mead, utilisé dans Matlab sous le nom de fminsearchbnd pour obtenir les valeurs de K_d et R_{max} après corrélation avec l'équation (26) en utilisant les données représentées à la Figure 39 (Annexe C) où la valeur de K_d et R_{max} initial sont respectivement $1.20 \times 10^{-12} M$ et $1.54u$.

# Test	Valeur initiale		Valeur finale	
	K_d (M)	R_{max} (u)	K_d (M)	R_{max} (u)
1	2×10^{-6}	14	1.0541×10^{-11}	1.5373
2	2×10^{-6}	14	1.0541×10^{-11}	1.5373
3	2×10^{-6}	14	1.0541×10^{-11}	1.5373
4	2×10^{-6}	14.001	1.1353×10^{-11}	1.5373
5	2×10^{-6}	14.3	4.0168×10^{-15}	1.5359
6	2.03×10^{-6}	14.02	9.3961×10^{-13}	1.5375
7	2.2×10^{-6}	14.3	9.7196×10^{-12}	1.5391

Pour s'assurer que l'algorithme converge bien vers un minimum et que la valeur obtenue est bien le minimum global, il serait possible de faire varier très légèrement les valeurs initiales et de n'observer aucune variation ou une variation faible des variables finales. En observant le Tableau 1 pour les tests 4 à 7, où l'on fait varier les valeurs initiales utilisées pour positionner le simplex, il est possible de voir une variation non négligeable entre les valeurs finales une fois les variables optimisées par l'algorithme. Plus particulièrement dans le cas où une différence de $0.3u$ par rapport à la valeur originale de R_{max} (tests 1 à 3) cause une différence entre les valeurs finales du K_d de 4 ordres de grandeur, $10^{-11} M$ à $10^{-15} M$. Il n'est donc pas possible d'utiliser cet algorithme dans le but d'obtenir des valeurs de variables précises quand une corrélation est réalisée, dû à l'impact trop important de la valeur initiale sur le résultat de l'optimisation. Il fut donc nécessaire de modifier l'algorithme pour permettre de minimiser l'effet de ces deux problèmes.

3.4.3 Deuxième version : Nelder-Mead et PSO

Dans le but de minimiser l'impact de la position initiale traitée par l'algorithme le programme fut modifié. Pour compenser les défauts de l'algorithme de Nelder Mead, il fut hybridé avec l'algorithme PSO. Cet algorithme métaheuristique fut choisi pour sa facilité d'implémentation, sa rapidité et les résultats obtenus dans des situations variées.⁷³⁻⁷⁵ L'algorithme PSO réalisant l'initialisation de multiples particules de façon aléatoire entre un intervalle limité pour chaque variable (au total $21 \cdot n + 1$ particules sont initialisées, n étant le nombre de variables), il est possible de sonder la surface une première fois et de sélectionner les n meilleures particules selon leur fit. La position de celle-ci serait par la suite optimisée via l'algorithme de Nelder-Mead dans le but de faire converger celle-ci de façon rapide vers un minimum qui dans le meilleur des cas sera le minimum global⁵⁴.

La PSO continuerait par la suite de faire converger les particules optimisées vers le minimum global en utilisant les particules déjà optimisées comme guide pour les particules non optimisées. Permettant du même coup de sonder les zones entre leurs positions initiales et les positions optimisées par l'algorithme de Nelder-Mead et ainsi augmenter les chances d'obtenir une meilleure corrélation .

Tableau 2 : Valeurs des variables K_d et R_{max} obtenues de la corrélation, en utilisant l'algorithme hybride Nelder-Mead-PSO, avec des valeurs théoriques obtenues avec l'équation (26), utilisant pour les cinq tests comme valeur de K_d et R_{max} respectivement 6.33×10^{-7} M et 2.563 (intervalle recherché : $R_{max} : [0, 4]$, $K_d : [10^{-12}, 1]$).

# Test	K_d (M)	R_{max}
1	6.3×10^{-7}	2.6
2	6.3×10^{-7}	2.6
3	6.3×10^{-7}	2.6
4	6.3×10^{-7}	2.6
5	6.3×10^{-7}	2.6
Écart type	6×10^{-11}	1×10^{-4}

En observant l'écart type des résultats du Tableau 2, il est possible de remarquer que les valeurs résultantes ne varient pas de façon significative entre chaque test. Bien que les particules aient été initialisées de façon aléatoire, leur convergence vers une valeur particulière de façon répétitive permet d'observer l'amélioration apportée à l'algorithme Nelder-Mead par son hybridation avec une PSO.

Bien que l'algorithme soit rapide en nécessitant 0.382 seconde pour exécuter une analyse (AMD FX(tm)-4130 Quad-Core Processor 3.80GHz, système 64 bits). Quand celui-ci réalisait une corrélation dans le but d'obtenir le k_{on} et le k_{off} l'algorithme tombait fréquemment dans des minimums locaux si l'intervalle délimitant les valeurs possibles des variables était grand (soit un écart d'approximativement 8 ordres de grandeur en combinant toutes les variables).

L'hypothèse pour expliquer la tendance du programme à tomber dans des minimums locaux serait que les particules initialisées de façon aléatoire entre les intervalles pouvaient se retrouver inégalement réparties et dans certains cas se retrouver déjà dans une zone où la seule convergence possible pour l'algorithme Nelder-Mead soit vers un minimum local. Ceci ferait en sorte de négliger l'exploration des intervalles de variables et ferait en sorte de causer la convergence des autres particules vers le minimum local précédemment trouvé par le simplex.

Puisque le programme restait sujet à tomber de manière fréquente dans des minimums locaux, mais d'une précision accrue par rapport à l'algorithme de Nelder-Mead seul, il a été possible de conclure que la partie PSO de l'algorithme était la plus avantageuse à conserver. Le simplex, qui avait initialement pour but de causer une convergence rapide des particules s'avéra contre-productif à cause de l'effet de la convergence trop rapide des particules qui limitait l'exploration de celles-ci et réduisait donc les performances de l'algorithme⁷⁶. C'est pourquoi l'algorithme d'optimisation fut changé pour utiliser seulement la PSO.

3.4.4 Troisième version : PSO

Une version sans modification fut testée pour observer l'impact sur la convergence vers les minimums locaux par rapport à la précédente version hybridée du programme. Bien que des résultats similaires en termes de précision et d'exactitude ont pu être observés entre l'algorithme hybride (Nelder-Mead-PSO) et PSO, la présence de valeurs aberrantes résultant des tests de corrélation pour le k_{on} et k_{off} fut encore observée.

Un phénomène intéressant fut observé. En faisant varier la position de la valeur optimale par rapport aux limites des valeurs des variables, il fut possible de remarquer que la valeur optimale fut plus souvent trouvée quand celle-ci était centrée par rapport aux limites imposées. Dans le but de limiter l'obtention de résultats aberrants, l'algorithme PSO fut grandement modifié pour permettre une optimisation utilisant plusieurs essaims et ayant la capacité d'améliorer de façon autonome son optimisation.

3.4.5 Quatrième version : PSO et algorithme évolutif

3.4.5.1 Mise en contexte

La dernière version de l'algorithme fut réalisée sur Visual-Studio et inspirée d'un article décrivant leur propre algorithme d'une PSO dite "Darwinienne" ⁷⁷. Cette variante de la PSO se base sur le principe de l'évolution d'une espèce pour s'adapter à son environnement dans le but de survivre. Contrairement à d'autres types de PSO où un seul essaim est initialisé au démarrage du programme, l'algorithme décrit dans l'article présentait une initialisation de multiples essaims pouvant être l'une de deux espèces. Ces deux espèces furent créées avec un moyen de limiter le déplacement des particules entre chaque itération, pour l'un, une constante de constriction, et pour l'autre, une valeur de déplacement maximal pour chaque variable. Pour l'espèce affectée par la constante de constriction (C_{cons}), celle-ci étant une valeur entre 0 et 1 et servant à réduire le déplacement du vecteur final pour chaque particule de l'essaim, tel que représenté dans l'équation suivante :

$$v_{ij}^{(t+1)} = C_{cons} \left(w v_{ij}^{(t)} + c_{social} r_{1ij}^{(t)} \left(Best G_{ij}^{(t)} - P_{ij}^{(t)} \right) + c_{cognitive} r_{2ij}^{(t)} \left(Best P_{ij}^{(t)} - P_{ij}^{(t)} \right) \right) \quad (27)$$

Tandis que pour l'autre espèce, seulement la valeur maximum du vecteur final du déplacement des particules est limitée par une valeur V_{cmax} où $V_{min} \leq V_{cmax} \leq V_{max}$. Le vecteur n'est affecté par V_{cmax} que si la valeur du vecteur final est plus grande que V_{cmax} . Si tel est le cas, la valeur du vecteur final est changée pour être égale à V_{cmax} .

Ces deux espèces seront définies durant le reste de ce mémoire comme étant l'espèce C_{cons} et V_{max} , pour représenter respectivement l'espèce limitée par la constante de constriction et celle limitée par le maximum de déplacement du vecteur final.

Cet article indique que chacune de ces deux espèces serait favorisée pour un type de "surface". Celle de type C_{cons} serait avantagée quand la valeur optimale est obtenue en suivant un gradient continu, dû à la limitation du déplacement des particules. Pour celle de type V_{max} , leur capacité de se déplacer rapidement sur de longues distances leur permettrait une exploration plus large, mais moins exhaustive de la zone et donc plus efficace pour les "surfaces" irrégulières ou chaotiques.

L'article indique la présence d'un système de récompense de telle sorte que chaque fois qu'un essaim trouve un nouveau meilleur Best G celui-ci gagne une nouvelle particule. Si l'essaim ne réussit pas à trouver de nouveau Best G après x nombres d'itérations (x étant choisi à l'initialisation de l'algorithme) celui-ci perd une particule et son nombre d'itérations sans nouveau Best G (TSBG) est changé selon l'équation suivante :

$$TSBG = TSBG_{max} \left(1 - \frac{1}{N_m + 1} \right) \quad (28)$$

Où N_m est le nombre de particules mortes, pour l'essaim, depuis qu'il a trouvé un nouveau Best G. Si l'essaim tombe en deçà d'un certain nombre de particules, il est détruit. Le gain de particules permet donc à la fois d'augmenter les chances d'un essaim de découvrir un nouveau Best G en augmentant le nombre d'individus réalisant la recherche du minimum global, mais aussi d'augmenter la durée de vie de l'essaim en augmentant le nombre de particules à détruire avant sa destruction. À chaque itération

du programme, chaque essaim a une chance de produire un essaim fille dont la moitié de ses particules seront des copies de l'essaim mère et l'autre moitié d'un essaim aléatoire de la même espèce que l'essaim mère.

3.4.5.2 Version finale

Bien que cet article soit intéressant dans sa proposition de créer un algorithme capable de s'adapter à son environnement, le programme décrit n'a pas semblé aller assez loin dans l'implémentation de la partie "Darwinienne" du programme⁷⁷. C'est pourquoi mon programme fut créé en utilisant le programme décrit dans l'article comme base et en modifiant mon programme selon les avancées dans le domaine et en s'inspirant de certains phénomènes qui s'appliqueraient à un algorithme évolutif.

Certaines parties du programme exposé dans l'article furent conservées. Tel que la manière dont les essaims gagnent et perdent leurs particules, la présence des deux espèces d'essaims et la manière dont elles affectent les vecteurs finaux des particules ainsi que l'impossibilité de créer un essaim hybride. Ainsi que, l'équation (28) et sa fonction dans le procédé d'élimination des particules des essaims n'ayant pas trouvé de nouveau Best G. Les éléments restants furent modifiés pour incorporer des éléments de l'algorithme génétique⁷⁸.

Le premier élément majeur modifié fut les valeurs de C_{cons} , V_{cmax} , la constante sociale et la constante cognitive. Celles-ci n'auraient pas les mêmes valeurs pour chaque membre de la même espèce. Car la variable initialement choisie n'est pas nécessairement optimale à la corrélation. L'algorithme pourrait donc s'améliorer en éliminant les essaims ayant des variables nuisibles à leur exploration de la "surface" et par le procédé d'élimination conserver les plus aptes à découvrir de meilleures solutions. Au moment de la création d'un essaim, celui-ci a un pourcentage de chance de modifier la valeur de ces variables d'un certain pourcentage, telle une mutation. Cela permettrait d'augmenter la diversité de fonctionnement des essaims et donc d'augmenter les chances de créer un essaim plus optimisé à trouver le fit optimal. Pour s'assurer que les constantes des essaims restent sous contrôle, des limites furent appliquées quant aux

valeurs possibles de celle-ci. Dans l'éventualité où une constante serait hors de ces limites, la valeur de celle-ci serait changée pour être égale à celle de la valeur limite.

L'implication de chaque essaim parent sur le procédé de création de l'essaim fille fut considérée. Soit de savoir si l'essaim fille, au moment de sa création, devrait avoir seulement accès aux constantes d'un essaim parent ou des deux essaims parents. Il fut considéré que la possibilité de faire profiter les essaims filles des mutations des deux parents et non d'un seul en utilisant une création "sexuée" pourrait permettre une plus grande diversité des valeurs des constantes, ce qui bénéficierait à l'optimisation⁷⁹. C'est pourquoi la valeur des variables, avant mutation, de l'essaim fille serait le résultat de la moyenne des variables des deux essaims parents.

Une mutation des constantes se réaliserait initialement à la création des essaims et ces valeurs dicteraient celles des constantes de toutes les particules créées à l'initialisation de l'essaim. Cependant, la possibilité de gagner des particules permit l'implémentation du même modèle de création "sexuée", incluant la mutation de celles-ci, pour les particules d'un même essaim. Ce qui permettrait à celles-ci de profiter de l'élimination des particules les moins efficaces tout en ayant la possibilité de bénéficier de mutations aléatoires grâce aux nouvelles particules.

Avec cet ajout vient la nécessité d'implémenter un mode de sélection pour savoir quel duo de particules dans l'essaim servirait de parent pour générer la particule fille. Dans le cas contraire, la "pression" poussant les particules à s'adapter à leur milieu serait trop faible et ralentirait son "évolution"⁸⁰. Un problème est présent quant aux moyens de sélection des particules parentes. Il serait possible de proposer que les deux particules ayant le meilleur Best P fit soient choisies pour fournir leurs caractéristiques à la particule fille. Cependant, cela pourrait causer une diminution drastique de la diversité "génétique" des particules, une stagnation de l'évolution de celle-ci ou simplement une convergence trop rapide de l'essaim. Par exemple, dans le cas d'une particule ayant un Best P fit aberrant par rapport aux autres, celle-ci pourrait être systématiquement utilisée comme parent. Ceci ferait en sorte qu'au moins 50% de toutes les caractéristiques de la nouvelle particule proviendraient de la particule aux constantes aberrantes. Dans cette logique, les particules créées subséquentement dans cet essaim, et de manière générale l'essaim

seraient rapidement dominées par les caractéristiques prépondérantes de la particule⁸⁰. Pour régler ce problème systématique, il serait possible de faire en sorte que les particules parentes soient choisies au hasard et de faire en sorte que le pourcentage de chance de sélection attribué à chaque particule soit fait en utilisant la “Rank Selection”.

Pour cette méthode de sélection, les particules doivent être mises en ordre de la pire à la meilleure, puis un pourcentage de chance de sélection leur sont attribué en fonction de leur ordre. Le pourcentage de chance attribué est bien sûr biaisé pour favoriser les meilleures particules. Il est possible d’obtenir le pourcentage de chance attribué à chaque rang (Prc_R) selon l’équation suivante :

$$Prc_R = \frac{R}{\sum_{i=1}^N i} \times 100\% \quad (29)$$

Où R est le rang et N est le nombre total de rang. Avec cette méthode de sélection, le pourcentage de chance qu’une particule soit choisie n’est donc pas directement lié à la valeur du fit.

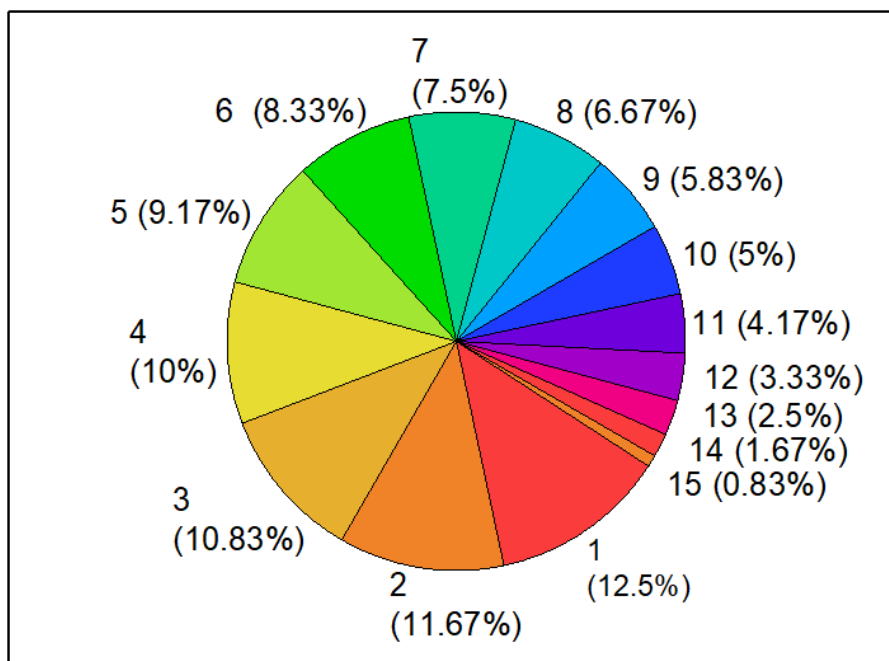


Figure 21 : Pourcentage de chance associé à chaque rang, pour 15 rang total, selon la méthode de “Rank Sélection” et selon l’équation (29). (Chaque pourcentage est arrondi)

En observant la Figure 21, il est possible de voir qu'une particule ayant une valeur de Best P fit particulièrement basse par rapport aux autres ne serait pas avantagée outre mesure dans ces chances d'être sélectionnée. Il serait donc impossible d'arriver à la situation d'une "super particule" dominant la création des particules d'un essaim.

Dans l'article ayant inspiré la création de mon programme, l'algorithme présenté permet à chaque essaim d'avoir une chance de générer un nouvel essaim, bien que simple, celui-ci est biaisé dans son fonctionnement pour deux raisons.

La première est la formule utilisée pour obtenir le pourcentage de chance d'un essaim de créer un autre essaim, soit $p=f/N_{tot}$ où f est un pourcentage obtenu aléatoirement et N_{tot} est le nombre total d'essaims vivants. Cette formule, bien qu'utile pour limiter la création d'un trop grand nombre d'essaims, favorise les premiers essaims testés par rapport aux suivants, puisque la valeur de N_{tot} augmente à mesure que les essaims sont créés. Ceci fait en sorte que les essaims, testés dans un ordre fixe (les essaims étant organisés en ordre croissant de 0 à N_{tot}), dans les index les plus bas sont toujours testés en premier, les favorisant par rapport à ceux étant dans les plus hauts index.⁷⁷

Le second est le critère permettant seulement aux essaims n'ayant pas perdu de particules, $N_m = 0$ (voir équation (28)), d'avoir une chance de se reproduire. Ceci limiterait les essaims pouvant devenir parent à ceux ayant la capacité de trouver continuellement un nouveau Best G en moins d'itérations que nécessaire pour perdre une particule. Ceci pourrait être efficace pour obliger une progression régulière des essaims vers un Best G, mais laisserait très peu de place à l'erreur pour chaque essaim dont plusieurs caractéristiques sont créées selon des variables aléatoires. Le fait qu'un essaim ne trouve pas de nouveau Best G en moins de x itérations une fois ne permet pas de juger de sa capacité à trouver le minimum global. Cependant, la capacité d'un essaim à survivre en trouvant constamment de nouveaux Best G ne peut être mise de côté. Il ne serait pas acceptable de permettre à un essaim ayant à peine assez de particules pour survivre de se reproduire, car cela l'identifierait comme un essaim ayant des caractéristiques peu optimisées pour trouver de nouveaux Best G.

Pour pallier ces deux problèmes de fonctionnement, il était nécessaire que la création des essais, par voie "sexuée", ne soit pas dépendante ni de leur ordre dans l'index ni de contrainte trop stricte. Il fut décidé qu'après un nombre d'itérations x , le programme permettrait la création du même nombre de nouveaux essais que le nombre d'essais détruits durant les x itérations en choisissant les essais parents par sélection par rang. Les essais se verraient attribuer leur rang en fonction de leur Best G fit. Cependant, pour qu'un essaim puisse être considéré comme parent potentiel, il devrait avoir un nombre de particules vivantes supérieur ou égal au nombre de particules à leur création. Ce qui permettrait aux essais d'avoir une marge d'erreur avant que ceux-ci soient considérés comme inaptes.

Une interface graphique a été créée en Cli-C++ pour permettre une interaction facile avec le programme contenu dans une librairie. Cette interface avait comme but de permettre le transfert des données au programme de corrélation. Une section du programme permettait aussi d'importer directement les valeurs de chaque constante à partir d'un document texte pour accélérer l'initialisation du programme (document de format txt). Il était aussi possible de réaliser plusieurs tests identiques pour obtenir des valeurs reflétant mieux l'impact des constantes indiquées.

3.5 Résultat de l'algorithme final

Bien qu'une grande quantité de tests furent réalisés durant le développement du programme, les résultats de ces tests ne furent pas utilisés dans leur entièreté.

$$R_t = \frac{k_{on}[A]R_{max}}{[A] + k_d} \times (1 - e^{-(k_{on}[A]+k_{off})t}) + R_a \quad (30)$$

Puisque les dernières versions du programme ont failli durant les corrélations utilisant l'équation (30), pour obtenir les valeurs de k_{on} et k_{off} , il fut décidé que ce test serait utilisé pour étudier les réactions et les résultats du programme face aux modifications des différentes variables du programme. De plus, le projet n'étant pas assez avancé pour permettre l'acquisition de données expérimentales utilisables pour

réaliser une corrélation, tous les tests de corrélation furent réalisés avec les valeurs théoriques indiquées dans l'annexe A.1.

Les valeurs initiales des constantes utilisées pour programme dans le but d'explorer l'impact de celles-ci sur les résultats finaux ont été spécifiées dans l'annexe A.2. Les valeurs initiales recommandées dans la littérature pour les constantes sociales et cognitives furent utilisées comme valeur initiale pour chaque essaim.⁵⁷ La valeur initiale de la constante de constriction spécifiée dans la littérature fut aussi utilisée⁷⁷. Les valeurs maximales et minimales possibles des constantes furent choisies de telle sorte à leur permettre de varier sans grande contrainte tout en gardant des valeurs limitant l'échec de la corrélation. Les valeurs maximales et minimales pour toutes les variables en rapport avec l'équation cinétique (équation (30)) furent choisies en considérant l'inclusion des valeurs ayant servi à la création des données expérimentales tout en étant assez larges pour s'approcher des conditions d'un test réel.

Le nombre maximum d'itérations, d'essaims et de particules par essaim ont été choisi arbitrairement en gardant en considération que l'augmentation de ces valeurs permettrait d'améliorer l'exactitude des résultats, mais augmenterait exponentiellement la durée de calcul. Pour s'assurer que les résultats générés par le programme ne soient pas marginaux, chaque modification testée fut répétée 200 fois pour obtenir leurs moyennes.

Le programme dans son état actuel ne permet pas de visualiser le déplacement des essaims durant le fonctionnement du programme, ce qui limite la compréhension de l'impact des variables sur le fonctionnement des essaims. Cependant, les tests suivants permettront d'observer l'impact de celles-ci et des modifications apportées à mon programme indiqué dans la section 3.4.5.2 sur le programme et sa capacité à réaliser une corrélation non linéaire précise et exacte.

3.5.1 Test : Nombre d'itérations maximal du programme

Dans le but d'observer plus en détail l'impact du nombre d'itérations sur le fit obtenu de la corrélation. L'hypothèse proposée étant que l'augmentation du nombre d'itérations maximales causerait une convergence plus lente et augmentant les chances de découvrir le minimum global et de minimiser le fit.

Cependant, il est nécessaire de rappeler que le fit n'est pas une valeur représentant parfaitement l'écart des valeurs théoriques et réelles obtenues grâce au programme.

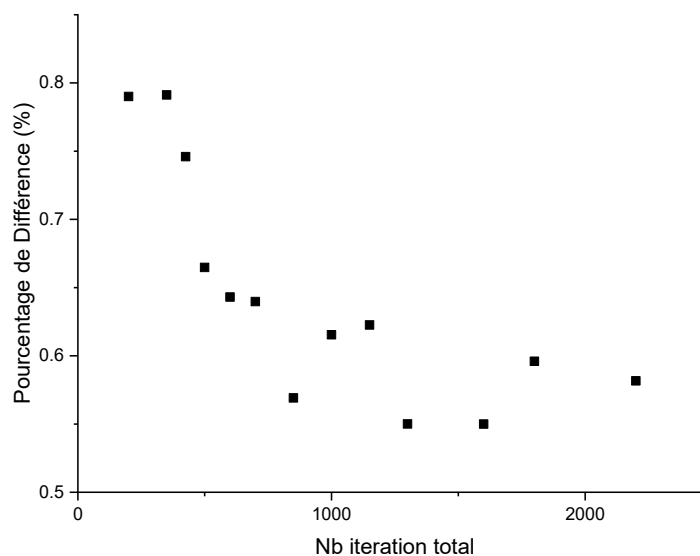


Figure 22 : Pourcentage de différence totale moyenne entre les valeurs exactes et celles obtenues de la corrélation des données en fonction du nombre total d'itérations (voir Annexe A.1).

La meilleure représentation de cet écart est le pourcentage de différence entre les valeurs obtenues grâce au programme et les valeurs réelles (Figure 22). À la Figure 22, il est possible de voir une diminution marquée du pourcentage de différence en fonction du nombre d'itérations total entre 350 à 600 itérations. Cette diminution indique une amélioration de la corrélation à mesure que le nombre d'itérations maximal augmente. Ceci confirme l'hypothèse initialement exposée, mais permet aussi de voir que l'amélioration n'est pas linéaire et celle-ci tend à devenir négligeable après 600 itérations.

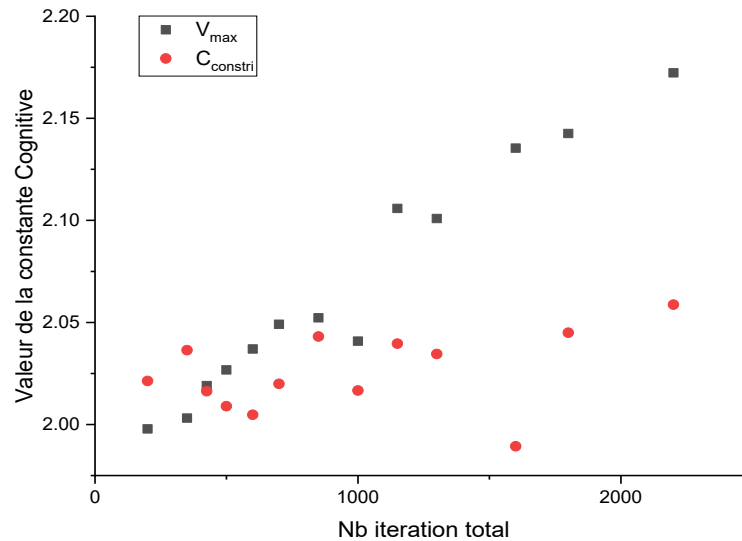


Figure 23 : Valeur moyenne des constantes cognitives des meilleurs essais en fonction du nombre d'itérations maximal pour les essais de type V_{\max} et C_{constri}

Un autre élément intéressant est l'impact du nombre d'itérations total sur les constantes des deux différents types d'essais (V_{\max} et C_{constri}). Par exemple, il est possible d'observer une croissance presque linéaire de la constante cognitive des essais de types V_{\max} en fonction du nombre d'itérations total (Figure 23). Une telle corrélation entre la valeur de la constante cognitive et le nombre d'itérations indique la présence d'une pression sélective.

La raison possible de la variation des constantes, en particulier la constante cognitive pour les essais de type V_{\max} et la constante sociale pour celles de type C_{constri} , serait qu'elles augmentent les chances de reproduction des essais. Puisque le programme favoriserait la reproduction des essais ayant le meilleur fit, il semblerait logique que l'évolution des essais favorise l'amélioration du fit plus que toute autre caractéristique. Ceci ne semble pas être le cas en observant la durée de vie moyenne des essais ainsi que leur pourcentage de différence respectif (Figure 25 et Figure 24). Les essais de type C_{constri} conservant une durée de vie équivalente à la moitié de la durée des tests sans améliorer leur corrélation. Il semblerait que l'évolution des essais de types V_{\max} , dont le pourcentage de différence varie de façon inversement

proportionnelle au nombre d'itérations total, en conservant une durée de vie très courte, semble pointer vers le fait que les mutations apportées bénéficient la découverte de meilleures corrélations. Il serait aussi possible que l'amélioration de la corrélation soit aussi causée par l'augmentation du temps de convergence.

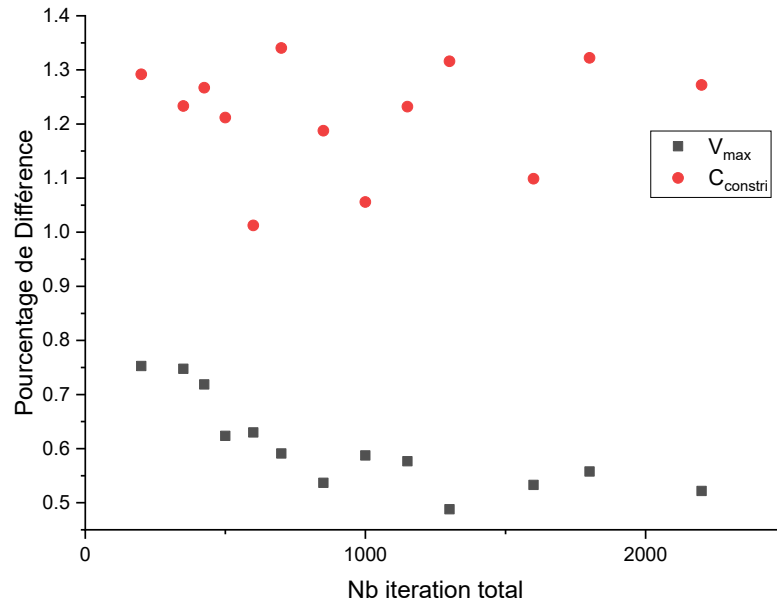


Figure 24 : Pourcentage de différence totale moyenne entre les valeurs exactes et celles obtenues de la corrélation des données (voir Annexe A.1) selon le type d'essai et en fonction du nombre d'itérations total.

Cependant, les essais de type C_{constri} semblent avoir une durée de vie moyenne proportionnelle au nombre d'itérations total (Figure 25). Les essais restant vivants pour près de la moitié des itérations du test, sans que le pourcentage de différence de celle-ci varie de manière significative (différence moyenne de $1.22\% \pm 0.06\%$). Ce phénomène impliquerait que la découverte du meilleur fit ne serait pas le seul élément permettant aux essais d'avoir un avantage pour s'assurer la transmission de ses informations à un essaim fille. Puisqu'une longue durée de vie augmenterait aussi les chances de reproduction de l'essai même si celui-ci est défavorisé à cause de son fit lors de la sélection des essais parents. Ceci est possible puisque les essais gagnent des particules, ce qui augmente leur durée de vie, à chaque nouveau Best G et non à chaque nouveau Best G apportant une amélioration substantielle à la corrélation. Ceci est, pour le moment, un point faible du programme.

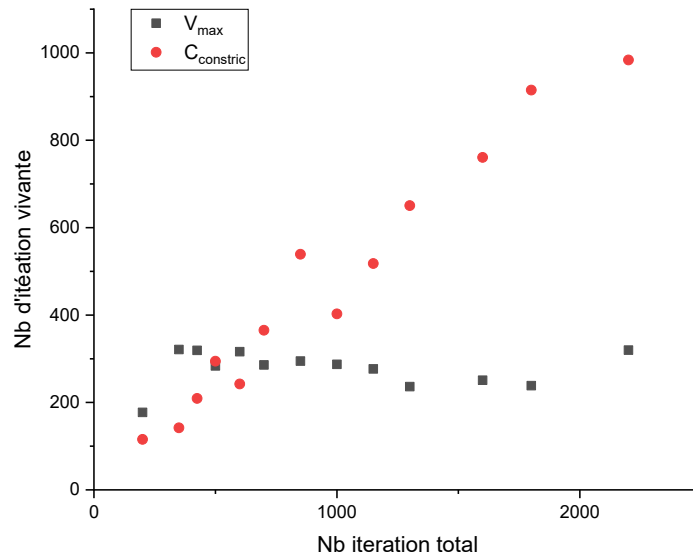


Figure 25 : Durée de vie moyenne, en nombre d'itération, des meilleurs essais en fonction du nombre total d'itérations selon le type d'essai.

Il serait possible d'émettre l'hypothèse que les essais de type $C_{constric}$ survivent plus longtemps à cause de leur constante de constriction réduisant le déplacement des particules d'environ 18% (valeur de la constante de constriction moyenne : 0.82 ± 0.01). Cela pourrait faire en sorte de ralentir leurs convergences et permettrait à l'essaim de découvrir de nouveaux Best G de façon plus régulière, et ce sans améliorer le fit final. Cependant, le fait que la constante de constriction soit systématiquement plus grande que sa valeur initiale (0,75) impliquerait qu'une réduction du déplacement des particules affecte négativement les essais et l'augmentation de la constante sociale pourrait aussi être une façon de réduire l'impact de la diminution du déplacement. Pour comprendre plus profondément l'impact des mutations sur les résultats des essais, il est nécessaire de réaliser davantage de tests.

En considérant le pourcentage de différence entre les données (Figure 22), tous les tests réalisés subséquemment seront faits en utilisant 1000 itérations totales, dans le but d'améliorer l'exactitude des résultats.

3.5.2 Test : Nombre d'itérations entre les découvertes d'un nouveau Best G

Une constante importante affectant les essais est le nombre d'itérations entre lesquels un essaim doit avoir découvert un nouveau Best G pour ne pas perdre de particules. Il serait attendu que la corrélation perde de son exactitude à mesure que le nombre d'itérations entre les événements augmente, puisqu'un faible nombre d'itérations ferait en sorte d'éliminer plus rapidement les essais les moins aptes à trouver de nouveaux Best G. Ce test permettra d'améliorer la compréhension de l'impact de la création de nouveaux essais grâce à des couples d'essais parents et la destruction des essais les moins aptes à découvrir de nouveau Best G sur les résultats de la corrélation.

En observant le pourcentage d'essaim de types $C_{constri}$ en fonction du nombre d'itérations maximum entre deux découvertes de nouveau Best G (Figure 26), il est possible d'observer qu'à partir d'environ 40 itérations entre chaque nouveau Best G, les essais de type $C_{constri}$ commencent à prévaloir sur V_{max} . Le pourcentage minimum d'essais est atteint à 7 itérations entre chaque nouveau Best G. Cet écart important est relativement étonnant en considérant que le fit des deux types d'essais est relativement similaire pour tous les résultats des tests (Figure 27). Il serait attendu que le nombre d'essais soit relativement équivalent. Une explication possible serait que les essais de type $C_{constri}$ soient inaptes initialement à obtenir de bons fits et qu'un faible nombre d'itérations maximales entre deux Best G, jusqu'à atteindre 7 itérations, cause une élimination plus rapidement ce type d'essais laissant la place à plus d'essais de type V_{max} . Cependant, si le nombre d'itérations maximal entre deux Best G descend sous 7, les deux types d'essais commencent à être affectés négativement et fait en sorte de rendre le phénomène d'élimination plus aléatoire.

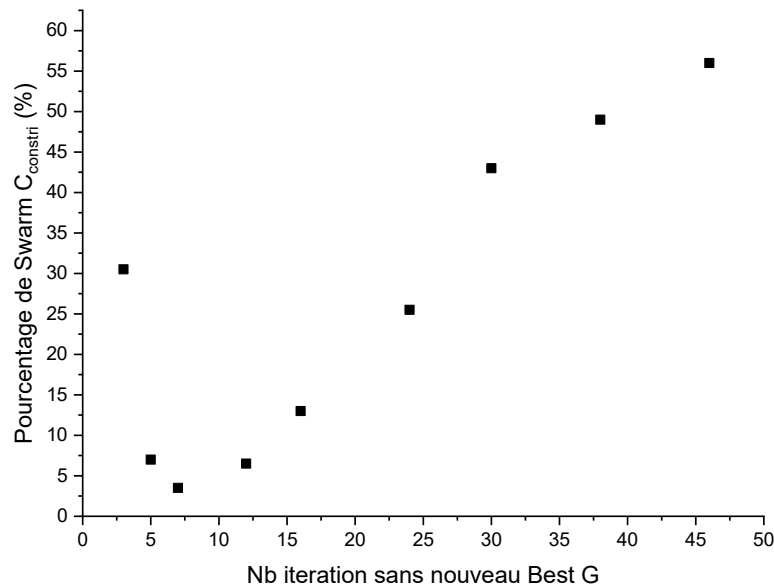


Figure 26 : Pourcentage d'essaims de types $C_{constri}$ en fonction du nombre d'itérations maximum entre deux découvertes de nouveau Best G pour 200 tests de corrélation.

Ceci semble être appuyé par la Figure 41(Annexe C) où il est possible de voir que le produit de la constante de constriction avec respectivement la constante sociale et cognitive tend à diminuer à mesure que le nombre d'itérations maximum entre deux découvertes augmentent, contrairement au fit qui augmente(Figure 27), entre 12 et 46 itérations. Ceci semble encore une fois impliquer, en considérant le fit en fonction de la constante de constriction, que les essaims de type $C_{constri}$ sont affectés négativement par leur constante de constriction. Cette donnée expliquerait pourquoi les constantes sociales et cognitives tendent aussi à augmenter, expliquant du même coup la propension de ce type d'essaims à être en minorité dans les tests (Figure 26). Le fait que les valeurs des produits constantes sociales et cognitives multipliées par la constante de constriction(Figure 41 Annexe C) soient liées au fit visible à la Figure 27 implique que le programme semble réussir à améliorer la corrélation grâce aux mutations des valeurs des constantes. Les résultats de ces tests impliqueraient aussi que la pression sélective serait à son plus haut si le nombre d'itérations maximal entre deux Best G se rapproche de 7.

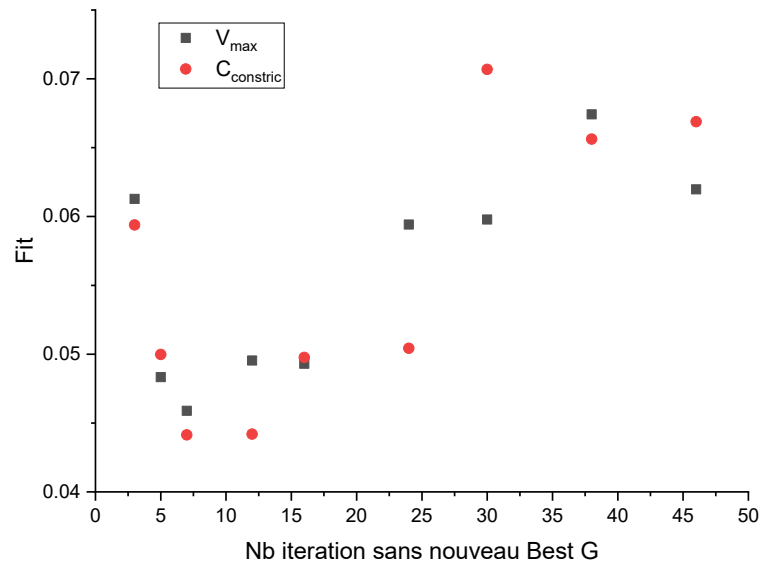


Figure 27 : Fit moyen selon le type d'essai et en fonction du nombre d'itérations maximal entre chaque découverte de nouveaux Best G.

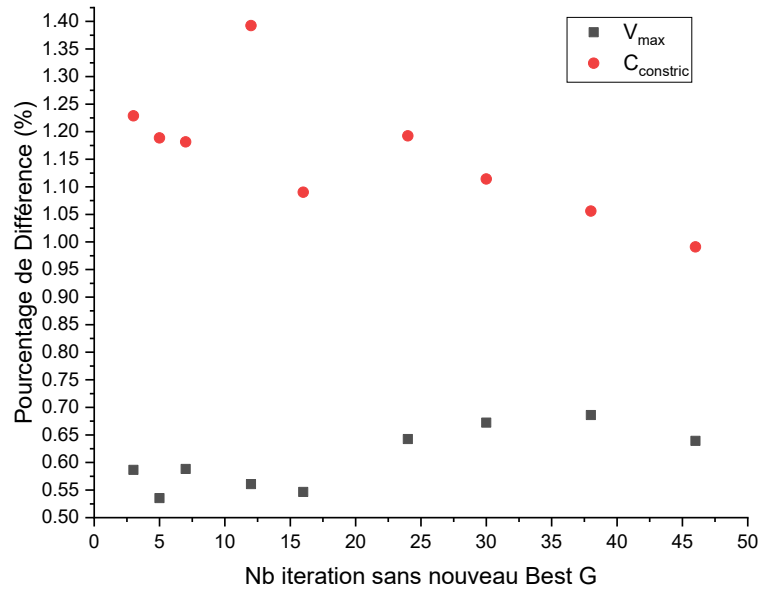


Figure 28 : Pourcentage moyen de différence total entre les variables moyennes obtenues de la corrélation et les valeurs ayant servi à la création des données utilisées dans la corrélation (voir Annexe A.1) selon le type d'essai et en fonction du nombre d'itérations maximal entre chaque découverte de nouveau Best G.

Bien que le fit des deux types d'essais soit similaire (Figure 27), en observant les pourcentages de différence des deux types d'essais, il est possible de constater que dans tous les tests, les essais de type C_{constr} ont de plus grands pourcentages de différence que celle de type V_{max} (Figure 28).

Dans le but de minimiser le pourcentage de différence ainsi que de conserver un système où les mutations ne sont pas influencées négativement par des critères trop demandants, les prochains tests seront réalisés avec maximum de 7 itérations entre chaque découverte de nouveau Best G.

3.5.3 Test : Pourcentage de chance de mutation

Une autre constante dont l'impact serait intéressant d'étudier est le pourcentage de chance de mutation. Dans les algorithmes évolutifs, dont le programme incorpore certains éléments, le pourcentage de chance de mutation se rapproche de 1 à 5%⁸¹. Bien que ces valeurs apportent une piste pour déterminer le pourcentage de change optimal, il fut nécessaire d'explorer une plus grande plage de valeur à cause des différences de fonctionnement des deux types d'optimisation.

Il est nécessaire de comprendre l'impact du pourcentage de chance de mutation. Si celui-ci est trop faible, les essais ne pourront pas muter assez rapidement et atteindre leurs valeurs optimales en un temps raisonnable. Cependant, si le pourcentage est trop élevé, les valeurs des variables, une fois arrivées aux valeurs optimales, ne devraient pas pouvoir se stabiliser, rendant les valeurs plus aléatoires à mesure que le pourcentage de chance de mutation augmente.

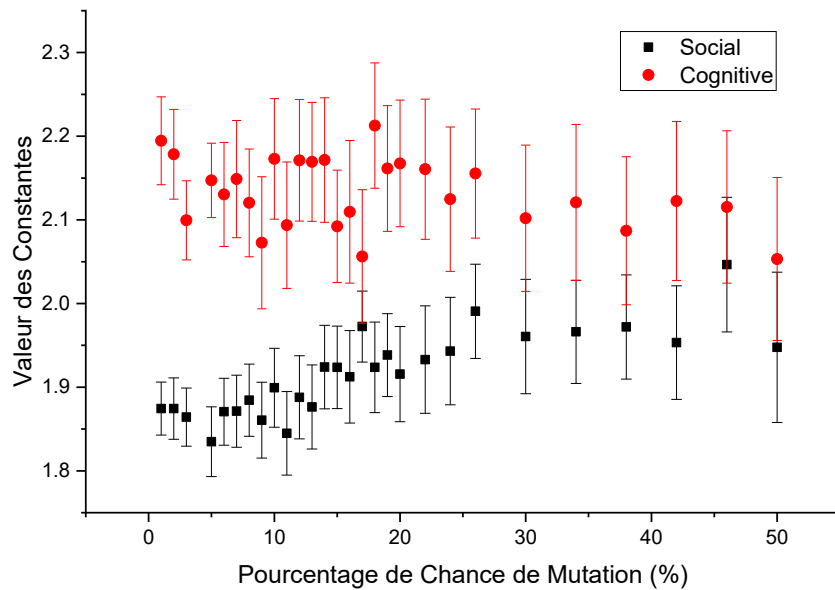


Figure 29 : Valeurs moyennes des constantes sociale et cognitive des meilleurs essais de types V_{max} en fonction du pourcentage de chance de mutation.

En observant la Figure 29, il est possible de confirmer qu'un trop haut pourcentage de mutation ne permet pas aux essais de muter de façon efficace. Puisque les constantes obtenues sont plus près de la valeur initiale et l'intervalle d'erreur augmente à mesure que le pourcentage de chance de mutation augmente.

Si l'on observe la variation de la constante de constriction des essais de type $C_{constri}$ en fonction du pourcentage de mutation (Figure 30), il est possible d'observer que la constante est affectée de manière semblable aux autres constantes des essais de type V_{max} et tendant à atteindre leurs valeurs les plus distantes de leur point initial quand le pourcentage de chance de mutation est entre 5 à 13 %.

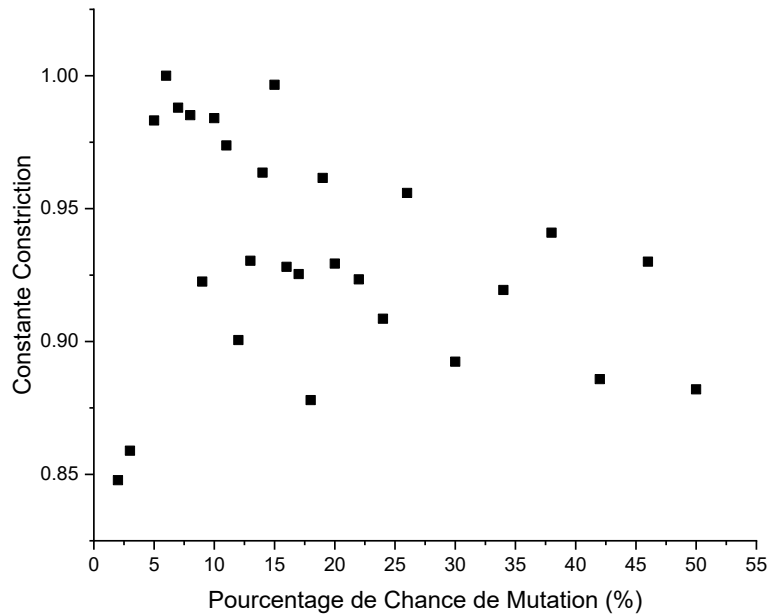


Figure 30 : Valeur moyenne de la constante de constriction en fonction du pourcentage de chance de mutation.

Grâce à ces données, il est aussi possible d'arriver à la conclusion que la réduction des mouvements des essais par la constante de constriction est nuisible à la survie des essais de types $C_{constri}$ pour ce genre d'optimisation. Dans le cas contraire, la constante ne varierait pas jusqu'à atteindre sa valeur maximale.

En observant le pourcentage de différence en fonction du pourcentage de chance de mutation (Annexe C Figure 40 (b)), il est possible de voir une légère diminution de celui-ci quand le pourcentage de chance de mutation est entre 8 et 17%. La légère diminution pourrait être due au manque d'influence des mutations sur la partie exploratoire de l'algorithme. La partie exploratoire, se déroulant la première moitié de l'optimisation, ne permettrait pas aux essais d'accumuler assez de mutations pour les affecter significativement. En considérant que le pourcentage de chance de mutation doit être assez élevé pour permettre aux constantes de s'optimiser, tout en conservant un pourcentage de différence bas, les prochains tests seront réalisés avec un pourcentage de chance de mutation de 10%.

3.5.4 Test : Pourcentage de mutation

Un autre élément relié à la mutation des particules est le pourcentage de mutation, soit le pourcentage de variation maximal des constantes durant la mutation. Il serait attendu que le pourcentage de mutation réagit de la même façon que le pourcentage de chance de mutation. Il serait aussi attendu qu'un plus grand pourcentage de mutation permette une amélioration de la corrélation. Puisqu'un pourcentage de mutation plus grand pourrait permettre de plus grandes variations des constantes plus tôt durant la corrélation.

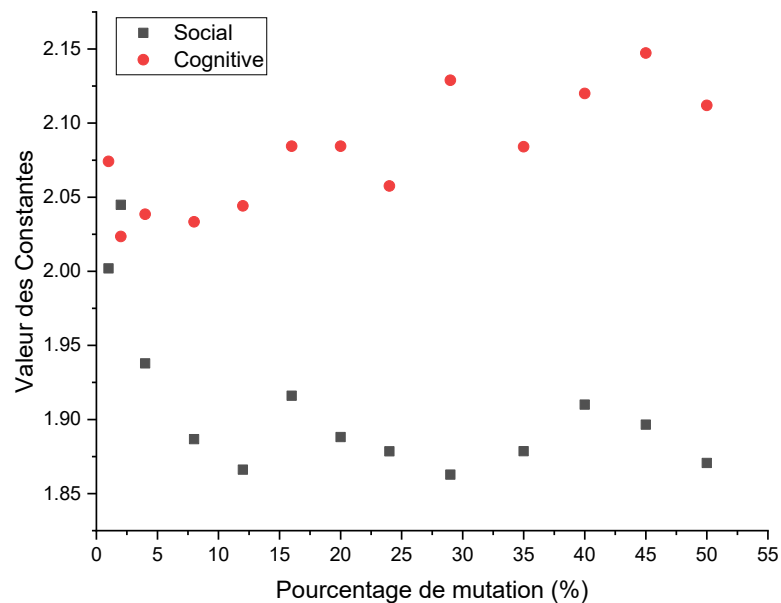


Figure 31 : Valeur moyenne de la constante sociale (a) et de la constante cognitive (b) des essais de types V_{max} en fonction du pourcentage de mutation

En observant les valeurs des constantes des essais de type V_{max} en fonction du pourcentage de mutation (Figure 31), il est possible de voir l'impact direct du pourcentage de mutation sur les constantes. Si le pourcentage de mutation n'est pas assez élevé, celui-ci tend à limiter les valeurs atteintes par les constantes.

Cette observation semble aussi être appuyée par la valeur de la constante de constriction, des essais de type $C_{constri}$, en fonction du pourcentage de mutation (Figure 32). Il est possible de voir une corrélation linéaire entre le pourcentage de mutation et la

valeur de la constante de constriction entre 2 à 20 % de mutation, suivie d'une stagnation de la valeur de la constante au maximum possible une fois 20% atteint.

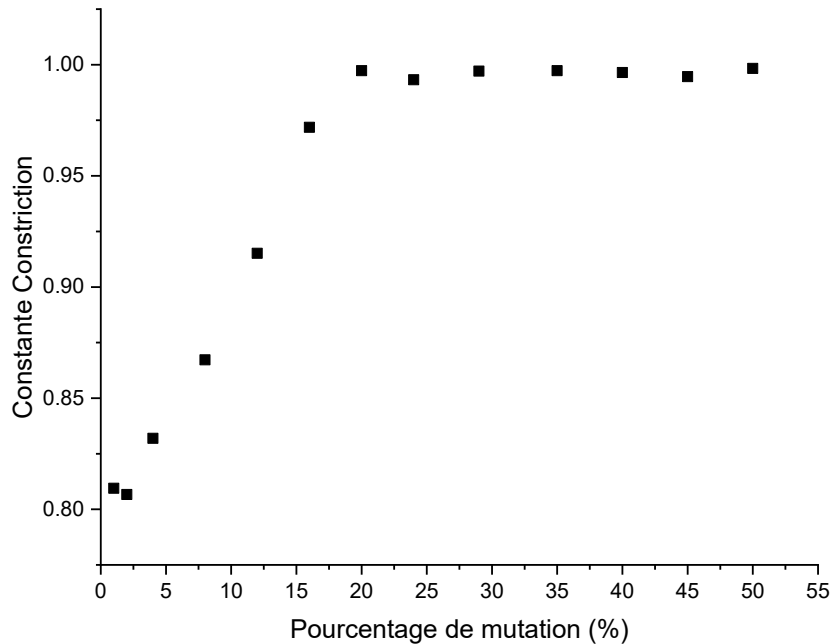


Figure 32 : Valeur moyenne de la constante de constriction des essais de types $C_{constri}$ en fonction du pourcentage de mutation.

Le pourcentage de différence des essais de type V_{max} n'est que très peu affecté par le pourcentage de mutation et reste à $0.65 \pm 0.03\%$ (Figure 33). Comparativement aux essais de type $C_{constri}$ dont le pourcentage de différence diminue de façon continue en fonction du pourcentage de mutation jusqu'à 24%. La diminution du pourcentage de différence pourrait être expliquée par l'augmentation de la constante de constriction pour atteindre une valeur de 1 ce qui se produit à 20% de mutation. Démontrant une fois de plus l'effet néfaste de la constante de constriction sur la corrélation des essais de type $C_{constri}$.

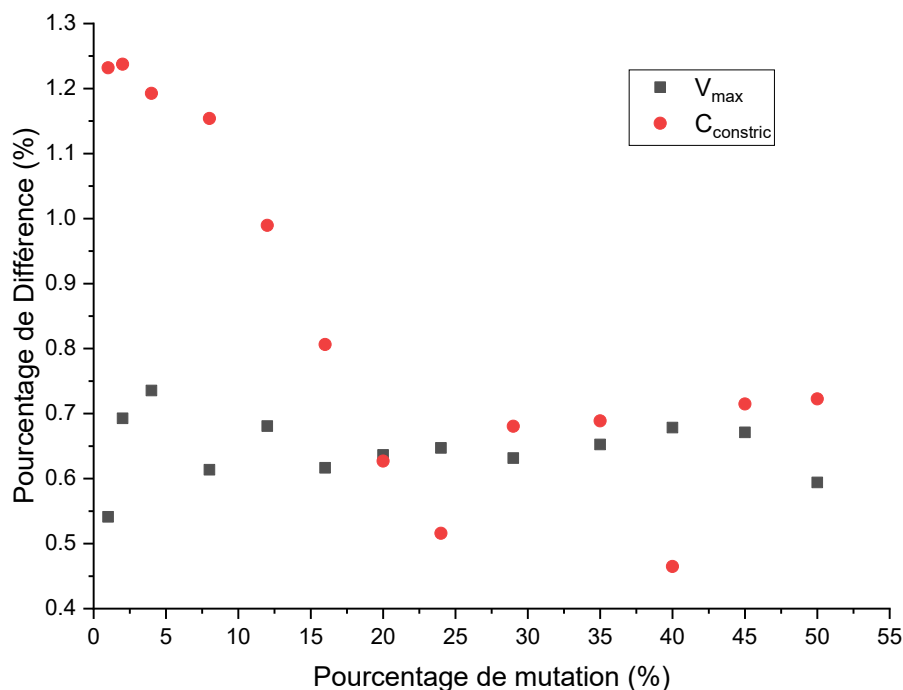


Figure 33 : Pourcentage moyen de différence totale entre les variables moyennes obtenues de la corrélation et les valeurs ayant servi à la création des données utilisées dans la corrélation (voir Annexe A.1) en fonction du pourcentage de mutation pour chaque type d'essai.

Les résultats de ce test impliquent encore une fois que la mutation des essais a un impact bénéfique, mais limité, sur les résultats de la corrélation à la Figure 33. Ceci avait pu être observé de façon moins importante dans les tests précédents.

Tableau 3 : Valeur moyenne de la meilleure corrélation réalisée avec les données de Annexe A.1 obtenue durant le test 5, variation du pourcentage de mutation.

R_{\max} (u)	k_{on} ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	R_{ini} (u)
4.48	52100	0.000156	0.188

Les données au Tableau 3 ont permis d'observer que les résultats de la corrélation après les multiples optimisations déviaient de seulement 0.65% en moyenne des valeurs réelles. Bien qu'étant inexacts, ces résultats seraient utilisables.

3.5.5 Conclusion des tests réalisés avec l'algorithme

En conclusion, les tests réalisés ont permis de découvrir une combinaison de constantes permettant d'améliorer la corrélation du programme, mais pas de façon substantielle. L'écart de différence entre les données obtenues durant le premier test (le nombre d'itérations) et le dernier test étant d'environ 0.01%. Ce qui serait expliqué par le fait que les constantes utilisées pour le premier test sont proches des valeurs utilisées durant les tests subséquemment.

Les tests ont aussi permis une meilleure compréhension de l'impact des constantes sur la corrélation et sur les deux différents types d'essaims. Les tests ayant démontré l'obtention systématique de résultats plus mauvais avec les essaims de type $C_{constri}$, ce type d'essaim pourrait donc être retiré du programme. Il serait aussi intéressant de réaliser une série de tests sur les mêmes données en permettant aux essaims de conserver leurs constantes entre chaque corrélation. Cela permettrait d'observer si les mutations obtenues durant les derniers moments de la convergence seraient nuisibles à la prochaine phase d'exploration des essaims.

Mais puisqu'il ne m'est pas possible pour le moment de visualiser le déplacement des particules et chaque vecteur prenant part au déplacement des essaims, les hypothèses précédemment exposées ne peuvent être confirmées.

Conclusion et Perspective future

Ce mémoire traite de deux domaines particulièrement différents, la chimie de surface ainsi que la création d'un algorithme de corrélation. Le but de ce mémoire était l'avancement d'un projet de couplage d'une SPR de type P4-SPR à un bioréacteur dans le but de suivre l'impact de la glycosylation des Fc d'anticorps sur les interactions avec leur récepteur en utilisant les constantes cinétiques de ces interactions. Un tel type de montage ayant déjà été réalisé en utilisant un appareil SPR commercial de marque Biacore, la P4-SPR aurait comme avantage d'avoir un coût moindre d'opération tout en permettant la réalisation d'analyse en parallèle ³.

La première partie du mémoire impliquant la chimie de surface et s'intéressait au signal et l'adsorption non spécifique de molécules ayant pu être utilisées dans le montage biologique pour réaliser un essai direct de l'anticorps TZM et de son récepteur (FcγRIIIa). Deux montages biologiques furent testés dans le but de maximiser le signal du TZM tout en réduisant l'adsorption non spécifique des molécules biologiques utilisées. Le premier en utilisant une molécule de K5 liée, par un pont disulfure à une molécule de PDEA liée à la monocouche, et un récepteur de la Fc du TZM (FcγRIIIa) marqué par une molécule E5 permettant de former un complexe entre le K5 et E5 pouvant être séparé par l'ajout de chlorure de guanidinium. Pour le second modèle, le PDEA fut remplacé par un complexe formé entre la biotine et la streptavidine, où une partie des molécules composant la monocouche fut marquée par une molécule de biotine et une molécule de streptavidine fut rajouté pour permettre à une deuxième molécule de biotine préalablement liée à une molécule de K5 de se greffer à la monocouche.

Durant ces tests, plusieurs monocouches de compositions différentes ont été testées. Les résultats furent majoritairement inexplicables, alors que le signal obtenu fut plus faible qu'appréhendé. Il serait donc nécessaire de refaire certains des tests. Dans l'éventualité où ces tests ne permettraient pas d'obtenir des résultats concordants, il serait possible de remplacer le montage biologique utilisant le E5/K5, si celui-ci s'avère être la source des problèmes. Il serait possible d'utiliser un récepteur de TZM marqué par une étiquette Histidine complexant avec un ion métallique tel que Co, Ni, Cu qui pourrait être retiré avec une solution d'imidazole³¹. Il serait aussi possible de remplacer celui-ci

par un complexe de biotine et d'avidine ayant subi une nitration au site de la tyrosine⁸². Le complexe de ces deux molécules étant stable à des pH en deçà de 10 et se dissociant une fois passée cette limite. Il serait aussi nécessaire d'évaluer l'impact sur le signal d'utiliser un système en flux continu ainsi que d'utiliser une solution composée de protéines contenant l'anticorps pour représenter plus fidèlement les conditions d'utilisation qui devront être supportée par la monocouche et le montage une fois le projet fini.

La seconde partie s'appliquait à développer un programme de corrélation non linéaire, contenu dans une librairie C++, permettant le traitement de données provenant d'un appareil de type P4-SPR. Celui-ci serait par la suite implémenté dans un futur montage. Ce chapitre explique aussi le cheminement réalisé à travers les différents types d'algorithmes d'optimisation utilisés, comprenant un algorithme heuristique et un métaheuristique. Plus particulièrement, un algorithme Nelder-Mead et un algorithme PSO évolutive ont été utilisés, dans le but de limiter la convergence vers les minimas locaux qui affaibliraient la corrélation réalisée par le programme. L'impact des valeurs des constantes du programme sur la corrélation fut exploré et optimisé en modifiant les constantes de la partie évolutive de l'algorithme. Cette optimisation des paramètres avait aussi pour but de visualiser l'impact de la variation de chaque paramètre sur les essais et leurs caractéristiques. Ces simulation ont permis d'arriver au but désiré. La prochaine étape pour l'algorithme dans le projet d'automatisation du montage serait l'implémentation de celui-ci pour traiter les données cinétiques des tests réaliser avec le bioréacteur ainsi que la modification du programme d'acquisition de données de la P4-SPR pour ajouter la librairie de traitement de données.

Bibliographie

1. Chames, P.; Van Regenmortel, M.; Weiss, E.; Baty, D., Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future. *Br J Pharmacol* **2009**, *157* (2), 220-233.
2. cancer, S. c. d. Vue d'ensemble des statistiques sur le cancer. <https://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/cancer-101/cancer-statistics-at-a-glance/?region=qc> (accessed 23-04-2020).
3. Chavane, N.; Jacquemart, R.; Hoemann, C. D.; Jolicoeur, M.; De Crescenzo, G., At-line quantification of bioactive antibody in bioreactor by surface plasmon resonance using epitope detection. *Analytical Biochemistry* **2008**, *378* (2), 158-165.
4. Murschel, F.; Liberelle, B.; St-Laurent, G.; Jolicoeur, M.; Durocher, Y.; De Crescenzo, G., Coiled-coil-mediated grafting of bioactive vascular endothelial growth factor. *Acta Biomaterialia* **2013**, *9* (6), 6806-6813.
5. Wood, R. W., XLII. On a remarkable case of uneven distribution of light in a diffraction grating spectrum. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science* **1902**, *4* (21), 396-402.
6. Palmer, C. H., Parallel Diffraction Grating Anomalies*. *J. Opt. Soc. Am.* **1952**, *42* (4), 269-276.
7. Pines, D.; Bohm, D., A Collective Description of Electron Interactions: II. Collective vs Individual Particle Aspects of the Interactions. *Physical Review* **1952**, *85* (2), 338-353.
8. Otto, A., Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection. *Zeitschrift für Physik A Hadrons and nuclei* **1968**, *216* (4), 398-410.
9. Kretschmann, E.; Raether, H., Notizen: Radiative Decay of Non Radiative Surface Plasmons Excited by Light. In *Zeitschrift für Naturforschung A*, 1968; Vol. 23, p 2135.
10. Nagata, K. a. H. H., *Rela-Time Analysis of Biomelecular Interactions*. Springer: 2000.
11. Liedberg, B.; Nylander, C.; Lunström, I., Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. *Sensors and Actuators* **1983**, *4*, 299-304.
12. Zayats, A.; Smolyaninov, I.; Maradudin, A., *Nano-Optics of surface plasmon polaritons*. 2005; Vol. 4082011, p 131-314.
13. Homola, J., *Surface Plasmon Resonance Based Sensors*. Springer Berlin Heidelberg: 2006.
14. Homola, J., Surface Plasmon Resonance Sensors for Detection of Chemical and Biological Species. *Chemical Reviews* **2008**, *108* (2), 462-493.
15. Bolduc, O. R.; Live, L. S.; Masson, J.-F., High-resolution surface plasmon resonance sensors based on a dove prism. *Talanta* **2009**, *77* (5), 1680-1687.
16. Dinel, M.-P. Développement de biocapteurs pour le diagnostic portable d'antibiotiques et de HER2. Université de Montréal, Papyrus, 2018.
17. Tabor, D., Babylonian lecanomancy: An ancient text on the spreading of oil on water. *Journal of Colloid and Interface Science* **1980**, *75* (1), 240-245.
18. Bostock, J., *The Natural History, Pliny the Elder*. Londre, 1855.
19. Pockels, E., "Ein gelehrtes Geschwisterpaar - Zur Erinnerung an Agnes Pockels (1862–1935)". *Bericht der Oberhessischen Gesellschaft für Natur- und Heilkunde* **1949**, *24*, 303.
20. Mann, B.; Kuhn, H., Tunneling through Fatty Acid Salt Monolayers. *Journal of Applied Physics* **1971**, *42* (11), 4398-4405.
21. Greene, J. E., Tracing the 4000 year history of organic thin films: From monolayers on liquids to multilayers on solids. *Applied Physics Reviews* **2015**, *2* (1), 011101.
22. Maxi Boeckl, D. G., Self-Assembled Monolayers: Advantage of Pure Alkanethiols. *Material Matters* **2006**, *1* (2), 3.
23. Ulman, A., Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers. *Chemical Reviews* **1996**, *96* (4), 1533-1554.

24. Bain, C. D., Troughton, E.B., Tao, Y.-T., Evall, J., Whitesides, G.M., Nuzzo, R.G., Formation of Monolayer Films by the Spontaneous Assembly of Organic Thiols from Solution onto Gold. *Journal of the American Chemical Society* **1989**, *111* (1), 321-335.
25. Colorado, R.; Lee, T. R., Thiol-based Self-assembled Monolayers: Formation and Organization. 2001; pp 9332-9344.
26. Suo, Z.; Gao, Y. F.; Scoles, G., Nanoscale Domain Stability in Organic Monolayers on Metals. *Journal of Applied Mechanics* **2004**, *71* (1), 24-31.
27. Schönherr, H.; Ringsdorf, H.; Jaschke, M.; Butt, H. J.; Bamberg, E.; Allinson, H.; Evans, S. D., Self-Assembled Monolayers of Symmetrical and Mixed Alkyl Fluoroalkyl Disulfides on Gold. 2. Investigation of Thermal Stability and Phase Separation. *Langmuir* **1996**, *12* (16), 3898-3904.
28. Besharat, Z.; Wakeham, D.; Johnson, C. M.; Luengo, G. S.; Greaves, A.; Odnevall Wallinder, I.; Göthelid, M.; Rutland, M. W., Mixed monolayers of alkane thiols with polar terminal group on gold: Investigation of structure dependent surface properties. *Journal of Colloid and Interface Science* **2016**, *484*, 279-290.
29. Stranick, S. J.; Parikh, A. N.; Tao, Y. T.; Allara, D. L.; Weiss, P. S., Phase Separation of Mixed-Composition Self-Assembled Monolayers into Nanometer Scale Molecular Domains. *The Journal of Physical Chemistry* **1994**, *98* (31), 7636-7646.
30. Mojarradi, H. Coupling of substances containing a primary amine to hyaluronan via carbodiimide-mediated amidation. Student thesis, 2010.
31. Porath, J., Immobilized metal ion affinity chromatography. *Protein Expression and Purification* **1992**, *3* (4), 263-281.
32. Hutsell, S. Q.; Kimple, R. J.; Siderovski, D. P.; Willard, F. S.; Kimple, A. J., High-affinity immobilization of proteins using biotin- and GST-based coupling strategies. *Methods Mol Biol* **2010**, *627*, 75-90.
33. Lichtenberg, J. Y.; Ling, Y.; Kim, S., Non-Specific Adsorption Reduction Methods in Biosensing. *Sensors (Basel)* **2019**, *19* (11), 2488.
34. Ye, H.; Wang, L.; Huang, R.; Su, R.; Liu, B.; Qi, W.; He, Z., Superior Antifouling Performance of a Zwitterionic Peptide Compared to an Amphiphilic, Non-Ionic Peptide. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2015**, *7* (40), 22448-22457.
35. Sigal, G. B.; Mrksich, M.; Whitesides, G. M., Effect of Surface Wettability on the Adsorption of Proteins and Detergents. *Journal of the American Chemical Society* **1998**, *120* (14), 3464-3473.
36. Norde, W., Adsorption of proteins from solution at the solid-liquid interface. *Advances in Colloid and Interface Science* **1986**, *25*, 267-340.
37. Andrade, J. D.; Hlady, V. In *Protein adsorption and materials biocompatibility: A tutorial review and suggested hypotheses*, Biopolymers/Non-Exclusion HPLC, Berlin, Heidelberg, 1986//; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 1986; pp 1-63.
38. Dhruv, H. D. Controlling Nonspecific Adsorption of Proteins at Bio-Interfaces for Biosensor and Biomedical Applications. Utah State University, 2009.
39. Riquelme, M. V.; Zhao, H.; Srinivasaraghavan, V.; Pruden, A.; Vikesland, P.; Agah, M., Optimizing blocking of nonspecific bacterial attachment to impedimetric biosensors. *Sensing and Bio-Sensing Research* **2016**, *8*, 47-54.
40. Janeway, C., *Immunobiology Five*. Garland Pub.: 2001.
41. Lipman, N. S.; Jackson, L. R.; Trudel, L. J.; Weis-Garcia, F., Monoclonal Versus Polyclonal Antibodies: Distinguishing Characteristics, Applications, and Information Resources. *ILAR Journal* **2005**, *46* (3), 258-268.
42. Vidarsson, G.; Dekkers, G.; Rispen, T., IgG Subclasses and Allotypes: From Structure to Effector Functions. *Frontiers in Immunology* **2014**, *5* (520).

43. Takai, T., Roles of Fc receptors in autoimmunity. *Nature Reviews Immunology* **2002**, 2 (8), 580-592.
44. Schasfoort, R. B. M.; Kooyman, R. P. H.; Corn, R. M.; Tudos, A. J., *Handbook of Surface Plasmon Resonance*. Royal Society of Chemistry: 2008.
45. Landry, J. P.; Ke, Y.; Yu, G.-L.; Zhu, X. D., Measuring affinity constants of 1450 monoclonal antibodies to peptide targets with a microarray-based label-free assay platform. *Journal of Immunological Methods* **2015**, 417, 86-96.
46. Vo-Dinh, T.; Cullum, B., Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* **2000**, 366 (6), 540-551.
47. de Mol, N. J.; Plomp, E.; Fischer, M. J. E.; Ruijtenbeek, R., Kinetic Analysis of the Mass Transport Limited Interaction between the Tyrosine Kinase Ick SH2 Domain and a Phosphorylated Peptide Studied by a New Cuvette-Based Surface Plasmon Resonance Instrument. *Analytical Biochemistry* **2000**, 279 (1), 61-70.
48. Myszka, D. G.; Morton, T. A.; Doyle, M. L.; Chaiken, I. M., Kinetic analysis of a protein antigen-antibody interaction limited by mass transport on an optical biosensor. *Biophysical Chemistry* **1997**, 64 (1), 127-137.
49. Christensen, L. L. H., Theoretical Analysis of Protein Concentration Determination Using Biosensor Technology under Conditions of Partial Mass Transport Limitation. *Analytical Biochemistry* **1997**, 249 (2), 153-164.
50. Oshannessy, D. J.; Brighamburke, M.; Soneson, K. K.; Hensley, P.; Brooks, I., Determination of Rate and Equilibrium Binding Constants for Macromolecular Interactions Using Surface Plasmon Resonance: Use of Nonlinear Least Squares Analysis Methods. *Analytical Biochemistry* **1993**, 212 (2), 457-468.
51. Pearl, J., *Heuristics: Intelligent Search Strategies for Computer Problem Solving*. Addison-Wesley: 1984.
52. Bianchi, L.; Dorigo, M.; Gambardella, L. M.; Gutjahr, W. J., A survey on metaheuristics for stochastic combinatorial optimization. *Natural Computing* **2009**, 8 (2), 239-287.
53. Nelder, J. A.; Mead, R., A Simplex Method for Function Minimization. *The Computer Journal* **1965**, 7 (4), 308-313.
54. Zahara, E.; Kao, Y.-T., Hybrid Nelder–Mead simplex search and particle swarm optimization for constrained engineering design problems. *Expert Systems with Applications* **2009**, 36 (2, Part 2), 3880-3886.
55. Ali, A. F., Hybrid simulated annealing and Nelder-Mead algorithm for solving large-scale global optimization problems. *International Journal of Research in Computer Science* **2014**, 4 (3), 1.
56. Kennedy, J.; Eberhart, R. In *Particle swarm optimization*, Proceedings of ICNN'95 - International Conference on Neural Networks, 27 Nov.-1 Dec. 1995; 1995; pp 1942-1948 vol.4.
57. Poli, R.; Kennedy, J.; Blackwell, T., Particle swarm optimization. *Swarm Intelligence* **2007**, 1 (1), 33-57.
58. De Crescenzo, G.; Litowski, J. R.; Hodges, R. S.; O'Connor-McCourt, M. D., Real-Time Monitoring of the Interactions of Two-Stranded de Novo Designed Coiled-Coils: Effect of Chain Length on the Kinetic and Thermodynamic Constants of Binding. *Biochemistry* **2003**, 42 (6), 1754-1763.
59. Castner, D. G.; Ratner, B. D., Chapter 31 - Proteins Controlled With Precision at Organic, Polymeric, and Biopolymer Interfaces for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. In *Principles of Regenerative Medicine (Third Edition)*, Atala, A.; Lanza, R.; Mikos, A. G.; Nerem, R., Eds. Academic Press: Boston, 2019; pp 523-534.
60. Kurzban, G. P.; Bayer, E. A.; Wilchek, M.; Horowitz, P. M., The quaternary structure of streptavidin in urea. *J Biol Chem* **1991**, 266 (22), 14470-7.

61. Ratel, M.; Provencher-Girard, A.; Zhao, S. S.; Breault-Turcot, J.; Labrecque-Carbonneau, J.; Branca, M.; Pelletier, J. N.; Schmitzer, A. R.; Masson, J.-F., Imidazolium-Based Ionic Liquid Surfaces for Biosensing. *Analytical Chemistry* **2013**, *85* (12), 5770-5777.
62. Totaro, K. A.; Liao, X.; Bhattacharya, K.; Finneman, J. I.; Sperry, J. B.; Massa, M. A.; Thorn, J.; Ho, S. V.; Pentelute, B. L., Systematic Investigation of EDC/sNHS-Mediated Bioconjugation Reactions for Carboxylated Peptide Substrates. *Bioconjugate Chemistry* **2016**, *27* (4), 994-1004.
63. Bolduc, O. R.; Lambert-Lanteigne, P.; Colin, D. Y.; Zhao, S. S.; Proulx, C.; Boeglin, D.; Lubell, W. D.; Pelletier, J. N.; Féthière, J.; Ong, H.; Masson, J.-F., Modified peptide monolayer binding His-tagged biomolecules for small ligand screening with SPR biosensors. *Analyst* **2011**, *136* (15), 3142-3148.
64. Yang, D. F.; Wilde, C. P.; Morin, M., Studies of the Electrochemical Removal and Efficient Re-formation of a Monolayer of Hexadecanethiol Self-Assembled at an Au(111) Single Crystal in Aqueous Solutions. *Langmuir* **1997**, *13* (2), 243-249.
65. Canaria, C. A.; So, J.; Maloney, J. R.; Yu, C. J.; Smith, J. O.; Roukes, M. L.; Fraser, S. E.; Lansford, R., Formation and removal of alkylthiolate self-assembled monolayers on gold in aqueous solutions. *Lab on a Chip* **2006**, *6* (2), 289-295.
66. Aubé, A.; Breault-Turcot, J.; Chaurand, P.; Pelletier, J. N.; Masson, J.-F., Non-specific Adsorption of Crude Cell Lysate on Surface Plasmon Resonance Sensors. *Langmuir* **2013**, *29* (32), 10141-10148.
67. Software, T. TIOBE Index for July 2019. <https://www.tiobe.com/tiobe-index/> (accessed 29 Juillet 2019).
68. Organization, I. S., Programming languages — C++. American National Standards Institute: United States of America, 1998.
69. Sörensen, K., Metaheuristics—the metaphor exposed. *International Transactions in Operational Research* **2015**, *22* (1), 3-18.
70. Motulsky, H. J.; Ransnas, L. A., Fitting curves to data using nonlinear regression: a practical and nonmathematical review. *Faseb j* **1987**, *1* (5), 365-74.
71. Jain, S. Floating point representation and IEEE Standards for floating point numbers. <https://www.includehelp.com/cso/floating-point-representation.aspx>.
72. John, D. E. *fminsearchbnd*, 1.4.0.0; MathWorks: 2012.
73. Hassan, R.; Cohanim, B.; de Weck, O.; Venter, G., A comparison of particle swarm optimization and the genetic algorithm. *Proceedings of the 1st AIAA Multidisciplinary Design Optimization Specialist Conference* **2005**, 18-21.
74. WANG, S.; ZHENG, F.; XU, L., COMPARISON BETWEEN PARTICLE SWARM OPTIMIZATION AND GENETIC ALGORITHM IN ARTIFICIAL NEURAL NETWORK FOR LIFE PREDICTION OF NC TOOLS. *Journal of Advanced Manufacturing Systems* **2008**, *07* (01), 1-7.
75. Duan, Y.; Harley, R. G.; Habetler, T. G. In *Comparison of Particle Swarm Optimization and Genetic Algorithm in the design of permanent magnet motors*, 2009 IEEE 6th International Power Electronics and Motion Control Conference, 17-20 May 2009; 2009; pp 822-825.
76. Liang, J. J.; Qin, A. K.; Suganthan, P. N.; Baskar, S., Comprehensive learning particle swarm optimizer for global optimization of multimodal functions. *IEEE Transactions on Evolutionary Computation* **2006**, *10* (3), 281-295.
77. Tillett, J. C.; Rao, T. M.; Sahin, F.; Rao, R. M., Darwinian Particle Swarm Optimization. 2005; pp 1474-1487.
78. Sadeghi, J.; Sadeghi, S.; Niaki, S. T. A., Optimizing a hybrid vendor-managed inventory and transportation problem with fuzzy demand: An improved particle swarm optimization algorithm. *Information Sciences* **2014**, *272*, 126-144.
79. Watson, T.; Messer, P. In *Increasing Diversity in Genetic Algorithms*, Heidelberg, Physica-Verlag HD: Heidelberg, 2001; pp 116-123.

80. Whitley, D., The GENITOR algorithm and selection pressure: why rank-based allocation of reproductive trials is best. In *Proceedings of the third international conference on Genetic algorithms*, Morgan Kaufmann Publishers Inc.: George Mason University, USA, 1989; pp 116-121.
81. Kuehn, M.; Severin, T.; Salzwedel, H., Variable Mutation Rate at Genetic Algorithms: Introduction of Chromosome Fitness in Connection with Multi-Chromosome Representation. *International Journal of Computer Applications* **2013**, *72*, 31-38.
82. Morag, E.; Bayer, E. A.; Wilchek, M., Reversibility of biotin-binding by selective modification of tyrosine in avidin. *Biochem J* **1996**, *316* (Pt 1) (Pt 1), 193-199.

Annexes

Annexe A : Valeur importée dans l'algorithme

Annexe A.1 : Valeur théorique obtenue avec l'équation (26)

Tableau 4 : Valeur des constantes utilisées dans l'équation (26) pour créer les valeurs utilisées dans la corrélation réalisée par l'algorithme PSO évolutif du chapitre 3.5

$R_{\max}(u)$	$k_{on} (M^{-1}s^{-1})$	$k_{off} (s^{-1})$	$R_{ini}(u)$
4.52	50510	0.0025	0.23

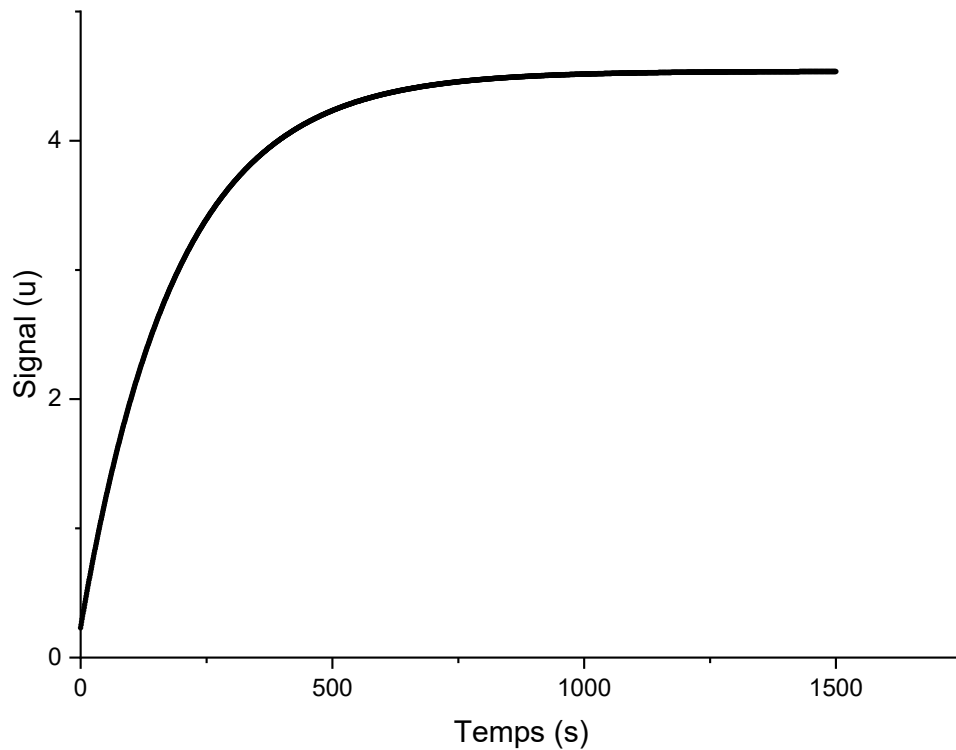


Figure 34 : Mise en graphique des valeurs obtenues via l'équation (26) en utilisant les valeurs du

Tableau 4 transmises à l'algorithme PSO évolutif du chapitre 3.5

Annexe A.2 : Valeur type importée pour réaliser la corrélation des données spécifiées à l'Annexe A.1 avec l'équation (26)

Constante sociale			Constante cognitive		
Max	Min	Initial	Max	Min	Initial
4	0.5	2	4	0.5	2
Constante Constriction			Constante Exploration		
Max	Min	Initial	Max	Min	Initial
1	0.01	0.75	3	0.01	1
Nb particule/ Essaim			Ratio	Nb itération	
Max	Min	Initial	Exploration	inertie	
30	15	20	initial	Exploration	
R_{max}		$k_{on} (M^{-1}s^{-1})$		$k_{off} (s^{-1})$	
Max	Min	Max	Min	Max	Min
4.7	4.3	1×10^5	100	1×10^{-3}	1×10^{-6}
R_{ini}		Inertie		Nb Essaim	
Max	Min	Max	Min	Max	Initial
0.3	1×10^{-4}	0.9	0.4	120	100
% Chance Mutation	% Mutation Particules	% Mutation	Nb d'itération total	Nombre d'itération sans nouveau Best G	
4	7	14	1000	12	

Annexe B : Spectre de Masse du peptide 3-mercaptopropionic-LHD-LHD .

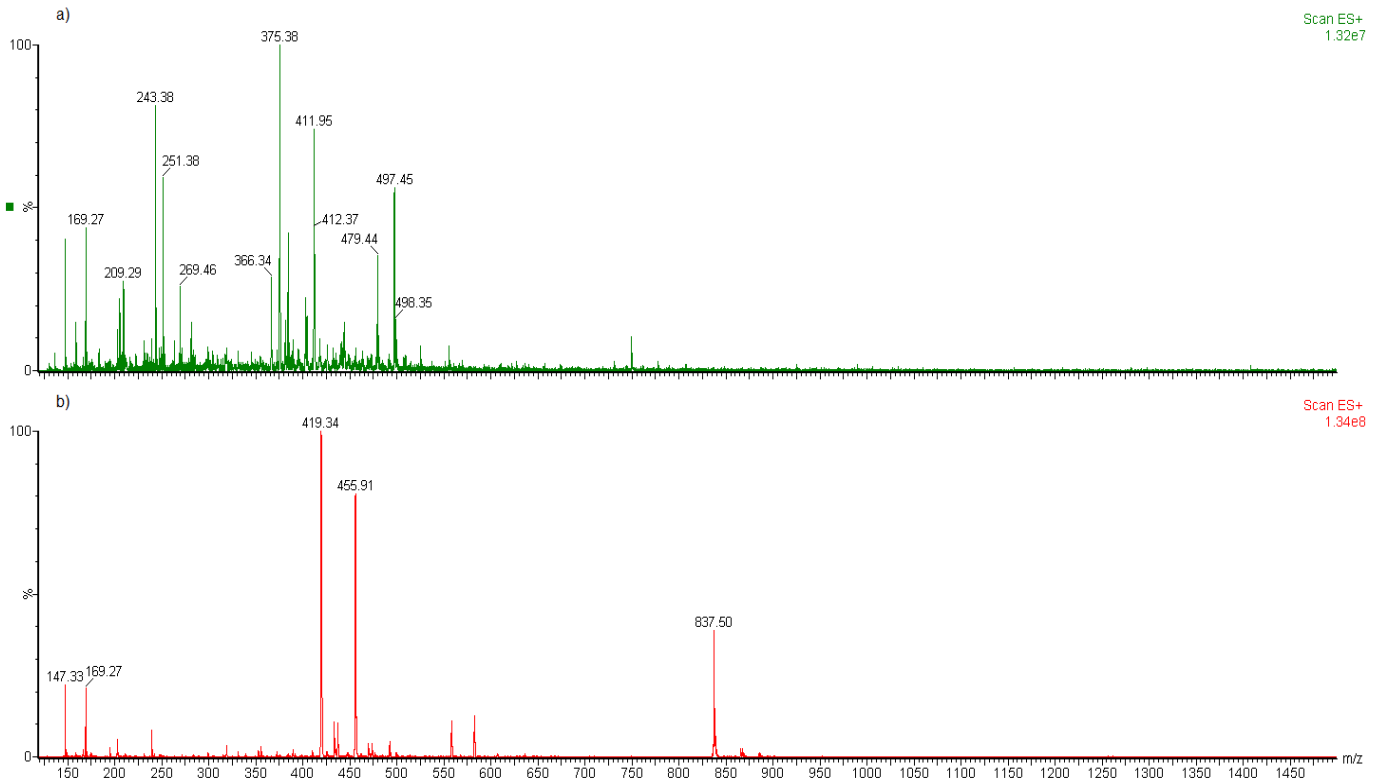


Figure 35 : Spectre de masse du peptide 3-mercaptopropionic-LHD-LHD, dégradé (a) et intact (b) ($[M+H]^+ = 837.50m/z$, $[M+2H]^{2+} = 419.34m/z$)

Annexe C : Signal et Données SPR

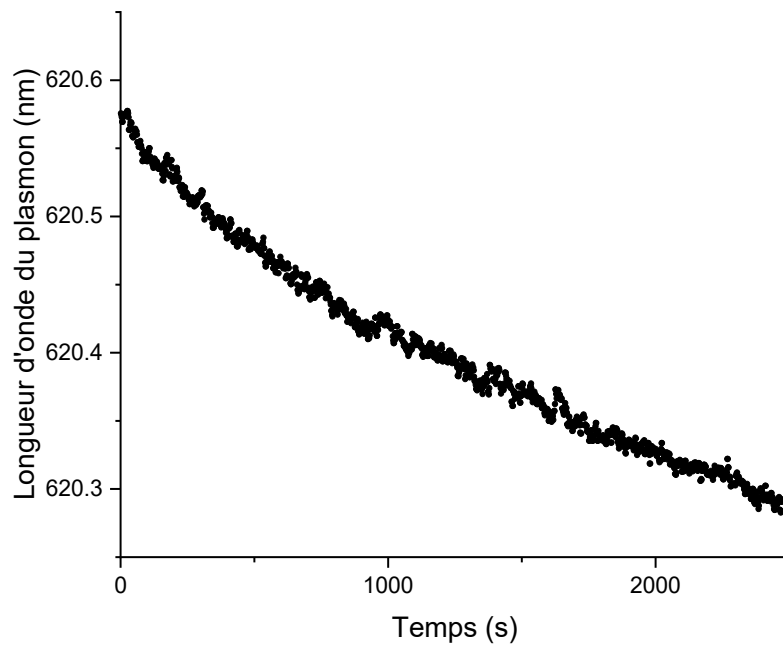


Figure 36 : Signal SPR moyen obtenu à lors de l'hydratation de la surface de PEG par de l'eau désioniser (18,2mMΩ)

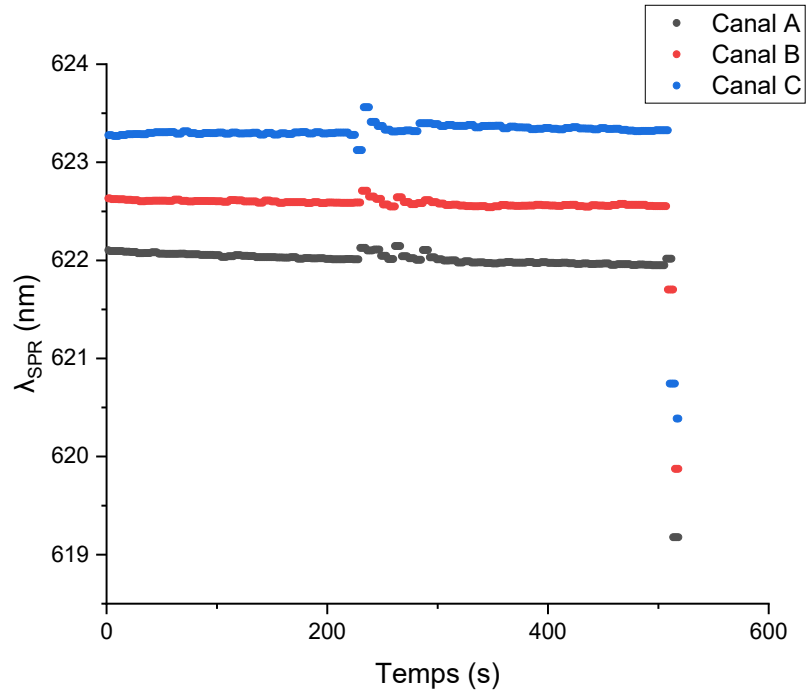


Figure 37 : Signal SPR lié à la stabilisation du signal d'une solution de HSB-EP dans les 3 canaux d'analyse sur une monocouche composée de 25% PEG biotinylé et 75% de PEG.

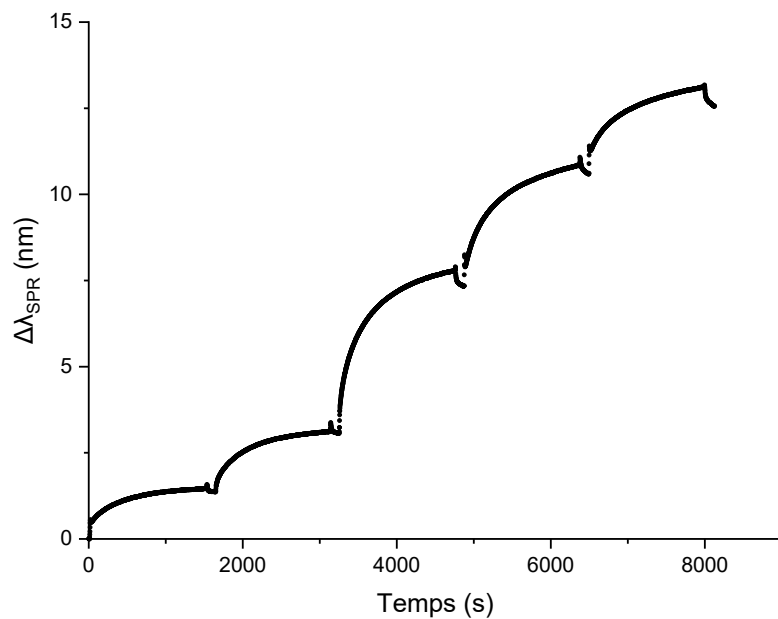


Figure 38 : Variation de signal SPR associée à l'essai direct entre l'anti-IgG lié à une monocouche de 16-mercaptohexadécane et de 1-dodécane-thiol dans un ratio 1 :10 et de l'anti IgG pour des concentrations de 50, 100, 250, 500, et 1000 nM.

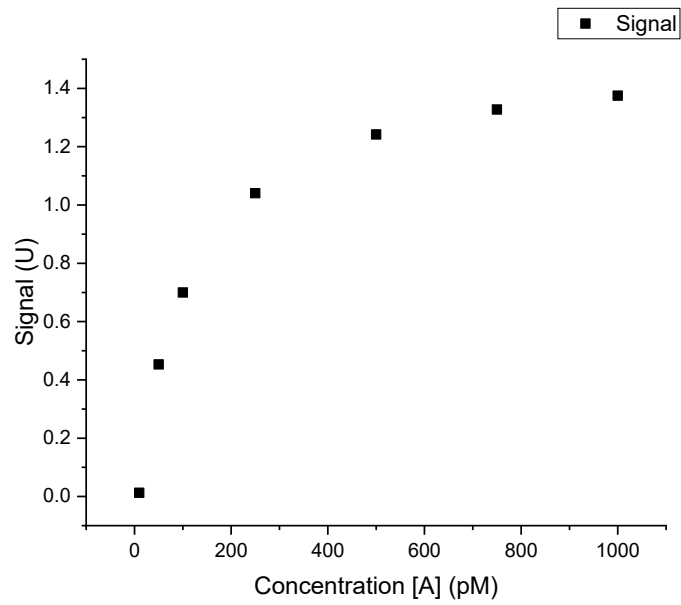


Figure 39 : Données théoriques obtenues à partir de l'équation (26) en utilisant un K_d égal à $1.20 \times 10^{-12} M$, un R_{max} égal à $1.54 u$ et un R_a égal à $0 u$, à plusieurs concentrations (10,50,100,250,500,750, et 1000 pM).

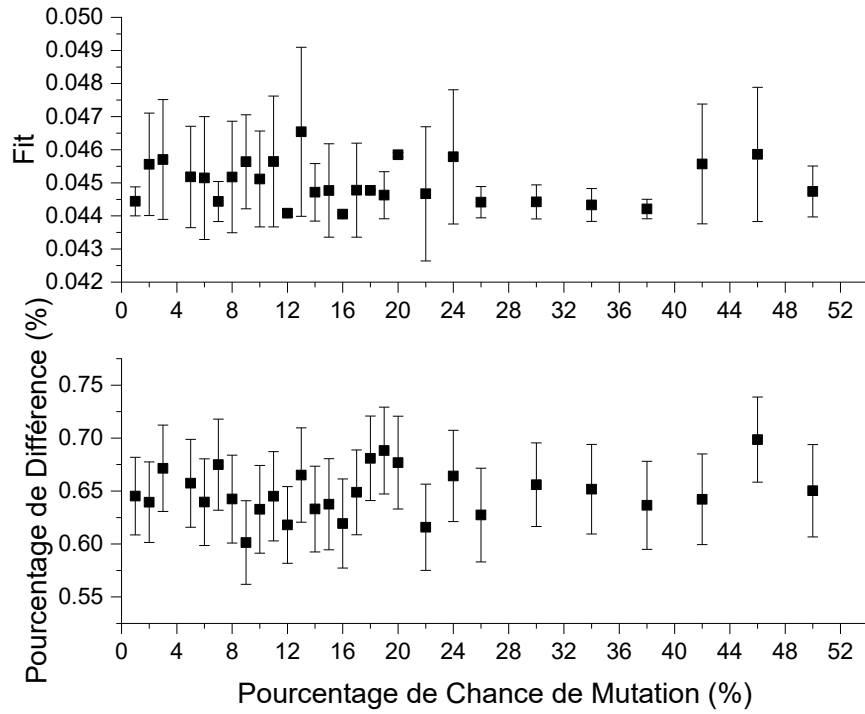


Figure 40 : (a) Fit et (b) Pourcentage moyen de différence totale entre les variables moyennes obtenues de la corrélation et les valeurs ayant servi à la création des données utilisées dans la corrélation (voir Annexe A.1) en fonction du pourcentage de chance de mutation.

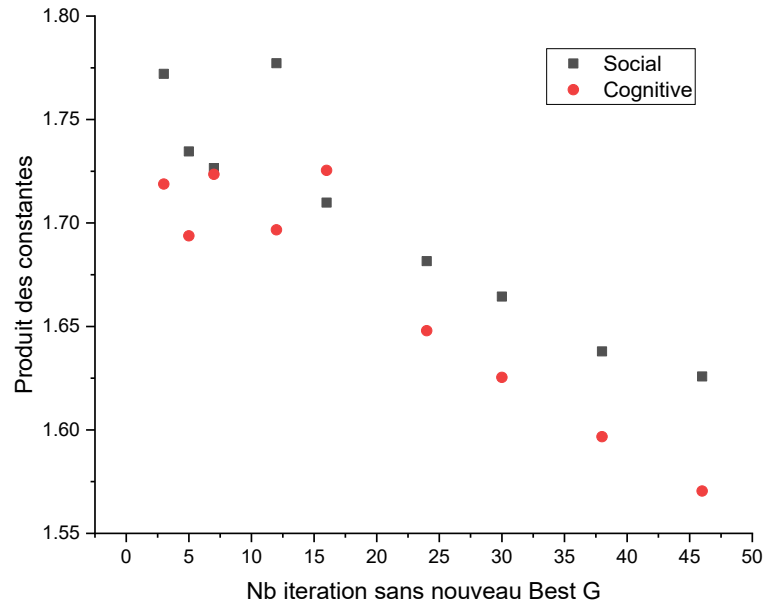


Figure 41 : Constante sociale et cognitive moyenne multipliée à la constante de constriction moyenne des essais de types $C_{constri}$ en fonction du nombre d'itérations maximum entre deux découvertes de nouveau Best G.