

Etude de systèmes optiques pour l'analyse directe, en temps réel et en parallèle, d'interactions biomoléculaires

Philippe Guédon

▶ **To cite this version:**

Philippe Guédon. Etude de systèmes optiques pour l'analyse directe, en temps réel et en parallèle, d'interactions biomoléculaires. Optique [physics.optics]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2000. Français. NNT : 2000PA066514 . pastel-00731820

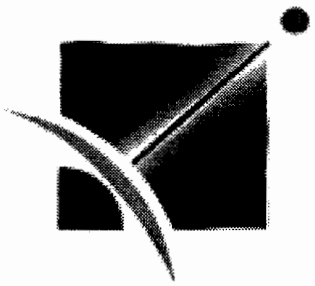
HAL Id: pastel-00731820

https://pastel.hal.science/pastel-00731820

Submitted on 13 Sep 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Institut d'Optique Théorique et Appliquée

CENTRE SCIENTIFIQUE D'ORSAY

THÈSE de DOCTORAT de l'UNIVERSITÉ PARIS VI

Spécialité : Optique

Présentée par
Philippe Guédon

pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PARIS VI

Sujet de la thèse :

Étude de systèmes optiques pour l'analyse directe, en temps réel et en parallèle, d'interactions biomoléculaires.

Soutenue le 11 mai 2000 devant le jury composé de :

Mme J. Rivory	**Présidente**
M. F. Rondelez	**Rapporteur**
M. P. Schaaf	**Rapporteur**
M. J. M. Bidart	
M. J. F. Legrand	
M. Y. Lévy	

Ce travail de thèse a été effectué au Laboratoire Charles Fabry de l'Institut d'Optique Théorique et Appliquée (IOTA), dans le groupe de recherche Optique Non-Linéaire, dans la spécialité Optique Guidée. Toutefois, ce travail n'aurait pu être accompli sans l'aide précieuse d'organismes tels l'Institut Gustave Roussy (IGR, Villejuif) pour la partie biologique, le CEA-Grenoble (DRFMC) associé à l'entreprise Cis Bio International pour leur compétences en électrochimie et le Laboratoire de la Physico-Chimie des Biopolymères (LPCB) de Thiais.

Remerciements

J'exprime tout d'abord ma sincère reconnaissance aux membres du jury qui ont accepté de consacrer du temps à l'examen de ce travail de thèse.

Je remercie Yves LEVY, Directeur de Recherches à l'IOTA, pour m'avoir accueilli dans son service afin d'effectuer ma thèse. Il m'a ainsi permis de faire mes premiers pas dans la recherche, en m'octroyant la possibilité de m'investir dans un sujet pluri-disciplinaire passionnant. Il a fait preuve à la fois, d'une grande patience à mon égard, mais aussi de beaucoup d'enthousiasme chaque fois qu'une étape vers la finalisation du sujet était franchie.

Je tiens également à témoigner ma reconnaissance à Jean-Michel BIDART, chef de l'unité des marqueurs biologiques et moléculaires, à l'IGR, dans le service duquel j'ai été initié aux bases de l'immunologie et qui a toujours su trouver le temps pour répondre à mes questions.

Je tiens à exprimer mon amitié et ma reconnaissance à Thierry LIVACHE, du Département de Recherches Fondamentales sur la Matière Condensée, au CEA-Grenoble pour la disponibilité dont il a fait preuve à mon égard, et pour l'interaction que nous avons eu ensemble. Cette collaboration a fini par porter ses fruits, et surtout, a donné une nouvelle dimension à mon sujet de thèse.

Par ses conseils et sa méthode, Françoise MARTIN, Ingénieur de Recherches à l'IOTA, a contribué à développer mes capacités d'expérimentateur. Elle a également toujours été là pour me rendre des services multiples et variés. Je la remercie donc du fond du coeur.

Enfin, je remercie Frédéric Chaput du PMC (Ecole Polytechnique), pour tous les services qu'il m'a rendu.

A mes collègues de l'IOTA....

A mes ''collègues doctorants'', Christelle, Jorge, Bruno...

A mes parents et à mon frère

Table des matières

Glossaire

Introduction

I-Approche théorique de la transduction optique

Introduction

I-A-État de l'art des biocapteurs

I-A-1-Les tests immunologiques

I-A-1-1-Les tests radio-immunologiques

I-A-1-2-Les tests immuno-enzymatiques

I-A-1-3-Bilan des tests immunologiques

I-A-2-Les capteurs électriques

I-A-2-1-Les trois modes de transductions électriques

I-A-3-Les capteurs acoustiques

I-A-4-Les capteurs optiques

I-A-4-1-Biocapteurs basés sur l'ellipsométrie et la réfractométrie

I-A-4-2-Biocapteurs basés sur l'optique intégrée et l'interférométrie

I-A-4-3-Biocapteurs basés sur les plasmons de surface

I-A-4-4-Biocapteurs basés sur une détection optique indirecte

I-A-5-Conclusion

I-B-Principes du biocapteur optique

I-B-1-Introduction

I-B-2-Les difficultés de mesures

I-B-3-Introduction des ondes de surface

I-B-3-1-Choix de transducteurs pour le biocapteur optique

B-3-1-1-Rappel de la réflexion totale et de l'onde évanescente

B-3-1-2-Ondes électromagnétiques de surface ou plasmons de surface

B-3-1-3-Les ondes guidées

I-B-4-Analyse de la réflectivité et de la sensibilité des deux transducteurs

I-B-4-1-Étude de la sensibilité de la Résonance des Plasmons de Surface (RPS)

B-4-1-1-Introduction

B-4-1-2-Analyse de la réflectivité dans le cadre de la RPS

B-4-1-3-Analyse de la sensibilité de la RPS

B-4-1-3-1-Sensibilité liée à la résonance de RPS

B-4-1-3-2-Détection limite de la variation d'indice extérieur

B-4-1-3-3-Détection limite de la couche adsorbée

B-4-1-4-Conclusion

I-B-4-2-Étude de la sensibilité associée au miroir résonant

B-4-2-1-Principe

B-4-2-1-1-Influence de l'absorption sur la réflectivité

B-4-2-1-2-Influence des paramètres constituant le MR

B-4-2-2-Détermination de l'épaisseur optimale du guide et du milieu espaceur

B-4-2-2-1-Détermination de l'épaisseur optimale du guide

B-4-2-2-2-Détermination de l'épaisseur du milieu espaceur

B-4-2-2-3-Calcul de la sensibilité liée à la résonance

B-4-2-2-4-Calcul de la sensibilité liée à la variation d'indice du milieu couvrant

B-4-2-2-5-Limite de détection de la couche biologique

B-4-2-3-Conclusion

I-B-4-3-Conclusion de l'étude théorique

B-4-3-1-Comparaison des deux transducteurs

B-4-3-1-1-Points communs

B-4-3-1-2-Principales différences

B-4-3-2-Conclusion

I-C-Protocoles expérimentaux et méthodes de quantification

I-C-1- Introduction aux dispositifs expérimentaux

I-C-1-1-Principe du montage

I-C-1-2-Particularités propres aux configurations

I-C-2-Méthodes de quantification

I-C-2-1-Quantification à partir des courbes de réflectivité

C-2-1-1-Détermination des paramètres optiques

C-2-1-1-1-Caractérisation du dispositif optique de la RPS

C-2-1-1-2-Caractérisation du dispositif optique du MR
C-2-1-1-3-Définition du taux de recouvrement
C-2-1-2-Modèles d'ajustement des cinétiques de fixation
C-1-2-1-Modèles théoriques hors équilibre
C-1-2-2-Détermination des constantes d'interactions
C-2-1-3-Estimation de l'incertitude des calculs
I-C-2-2-Quantification à partir d'une succession d'images
C-2-2-1-Réglage de la position angulaire de référence
C-2-2-2-Calcul de l'épaisseur optique moléculaire
C-2-2-3-Estimation de l'incertitude des calculs
I-C-2-3-Conclusion

Références bibliographiques du chapitre I

II-Le matériel biologique

II-A-La reconnaissance antigène-anticorps

II-A-1-Structure de l'anticorps
II-A-2-Structure du paratope
II-A-3-Interactions impliquées dans la reconnaissance antigène-anticorps
II-A-4-Valence et affinité des anticorps
II-A-5-Anticorps monoclonaux
II-A-6-Conclusion

II-B-Les interactions entre acides nucléiques

II-B-1-Structure de l'ADN
B-1-1-La double hélice
B-1-2-L'appariement des bases
B-1-3-Les oligonucléotides

II-B-2-Hybridation et dénaturation
B-2-1-L'hybridation
B-2-2-La dénaturation
B-2-2-1-Dénaturation thermique
B-2-2-2-Dénaturation par variation de pH
II-B-3-Recherche de mutations ponctuelles

B-3-1-Méthodes de discrimination d'une mutation ponctuelle

B-3-1-1-Discrimination par comparaison de la constante d'affinité
B-3-1-2-Discrimination par variation de température
B-3-1-3-Discrimination par variation de pH
B-3-2-Méthode de localisation d'une mutation ponctuelle
II-B-4-Conclusion

II-C-Présentation des biomolécules étudiées

II-C-1-Hormones et protéines
C-1-1-L'hormone chorionique gonadotropine humaine
C-1-2-L'hormone thyroglobuline
C-1-3-L'alpha-foetoprotéine
C-1-4-Le système avidine-biotine
C-1-5-L'albumine sérique bovine
II-C-2-Séquences oligonucléotidiques et leurs caractéristiques

II-D-Les différentes voies d'immobilisation

II-D-1-L'adsorption passive
II-D-2-Immobilisation covalente d'anticorps à l'aide d'un ancrage chimique
II-D-3-Le système avidine-biotine
II-D-4-Immobilisation covalente d'oligonucléotides à l'aide d'un polymère conducteur

II-E-Conclusion

Références bibliographiques du chapitre II

III-Validations expérimentales de l'intérêt des biocapteurs optiques en immunologie et en biologie moléculaire

III-A-Étude expérimentale comparant la sensibilité analytique du MR et de la RPS : Le capteur à un paramètre

III-A-1-Reconnaissance de l'hCG par la méthode de la RPS
III-A-1-1-Expériences menées au laboratoire
A-1-1-1-Protocole des expériences

A-1-1-2-Quantification et interprétation des expériences

III-A-1-2-Expériences menées sur le Biacore

A-1-2-1-Protocole des expériences

A-1-2-2-Quantification et interprétation des résultats

III-A-1-3-Conclusion

III-A-2-Reconnaissance de l'hCG par la méthode du MR

III-A-2-1-Protocole expérimental

III-A-2-2-Quantification et interprétation des résultats

III-A-3-Conclusion

III-B-Vers le capteur multiparamétrique

III-B-1-Immobilisation des anticorps

III-B-1-1-Préparation du capteur

III-B-1-2-Quantification de l'adsorption des anticorps

III-B-2-Reconnaissance spécifique des antigènes

III-B-3-Discussion

III-B-4-Conclusion

III-C-Étude des voies d'immobilisation de brins d'ADN : Vers l'hybridation en parallèle

III-C-1-Immobilisation d'ADN via le système avidine-biotine

III-C-1-1-Préparation du capteur

C-1-1-1-Adsorption passive de l'avidine

C-1-1-2-Fixation covalente de l'avidine

III-C-1-2-Hybridation d'oligonucléotides

C-1-2-1-Cas de l'adsorption passive d'avidine

C-1-2-2-Cas de la fixation covalente de l'avidine

III-C-2-Immobilisation d'ADN à l'aide de polypyrrole

III-C-2-1-Caractérisation optique du polypyrrole

C-2-1-1-Détermination de l'indice de réfraction du polypyrrole

C-2-1-2-Analyse de l'homogénéité du polypyrrole

III-C-2-2-Optimisation de l'immobilisation de brins d'ADN

C-2-2-1-Optimisation de l'épaisseur du copolymère

C-2-2-1-1-Limitation de l'épaisseur des plots due à l'absorption du polypyrrole

C-2-2-1-2-Choix de l'épaisseur optimisant le signal d'hybridation
C-2-2-3-Optimisation de la densité de surface des sondes d'ADN
C-2-2-3-1-Etablissement des facteurs limitants l'hybridation
C-2-2-3-2-Choix du ratio optimisant le signal d'hybridation
C-2-2-4-Conclusion
III-C-2-3-Vers l'hybridation en parallèle
C-2-3-1-La spécificité du capteur
C-2-3-2-Régénération du capteur
C-2-3-3-Sensibilité analytique du capteur
III-C-2-4-Conclusion

III-D-Détection de mutations ponctuelles

III-D-1-Détection de mutations sur des 15-mers synthétiques

III-D-1-1-Préparation des capteurs à plusieurs paramètres
III-D-1-2-Discrimination des mutations par détermination des constantes d'affinité
D-2-1-Détections multiparamétriques d'interactions spécifiques et croisées
III-D-1-3-Conclusion

Références bibliographiques du chapitre III

Conclusion générale et perspectives

ANNEXES

Glossaire

acide aminé : constituant de base des protéines, codé par l'**ADN** par le biais d'un **codon.**
ADN : acide désoxyribonucléique, molécule double-brins (chacun des brins étant liés par des **bases**) portant le patrimoine génétique, c'est à dire les gènes, et constituée de quatre **bases** codantes.
affinité : grandeur prenant en compte la résultante des forces d'interaction entre un **antigène** et son **anticorps** monoclonal associé.
anticorps : entité moléculaire d'un organisme se fixant spécifiquement sur des molécules étrangères à cet organisme (antigène).
antigène : entité moléculaire reconnue par un **anticorps**.
ARN : acide ribonucléique, simple-brin ayant un rôle dans l'expression des gènes.
bases : unités du codage génétique, elles sont au nombre de quatre : guanine (G), thymine (T), cytosine (C) et adénine (A).
clone : type de cellule produisant des **anticorps** spécifiques à un type d'**antigène**.
codon : groupe de trois **bases** codant pour un **acide aminé**.
cytotoxique : relatif à la dégradation d'une cellule.
Dalton : unité utilisée pour quantifier les **masses molaires,** et équivalente à gramme/mole.
dénaturation : -pour les **anticorps** : perte de réactivité.
-pour l'**ADN :** séparation des deux brins constituant la molécule**.**
diagnostic clinique : diagnostic réalisé à partir d'échantillons issus de patients.
duplex : état de complémentarisation parfaite de l'**ADN** quand il est sous sa forme double-brins.
épitope : site de reconnaissance d'un **antigène**.
gène : longue séquence de l'ADN composé d'exons (séquences plus courtes qui codent pour des protéines) et d'introns (séquences non-codantes).
hétéroduplex : état de l'**ADN** double-brins quand certaines des **bases** le constituant ne sont pas complémentaires (**mutation**), on parle aussi de **duplex** instable.
hybridation : interactions entre deux simple-brins d'**ADN** pour former un **duplex**.
hydrophile : relatif à des molécules ou à des matériaux qui cherchent le contact avec l'eau.
hydrophobe : relatif à des molécules ou à des matériaux qui fuient le contact avec l'eau.
immune : relatif à une interaction immunitaire entre un **anticorps** et un **antigène**.
immunoglobuline : type de protéines constituant la plus grande partie des **anticorps** dans un organisme.
lymphocytes (globules blancs) : cellules du système immunitaire, à l'origine de la production d'**immunoglobulines**.
M (molaire) : unité mesurant la concentration de molécules en solution, équivalente à mole/litre.
masse molaire : grandeur rendant compte de la masse d'une mole (6.10^{23}) de molécules.

monoclonal : relatif à un type d'**immunoglobulines** issues d'un seul **clône**.
mutation ponctuelle : substitution d'une **base** par une autre au sein d'une séquence d'**ADN** simple-brin, formant un **hétéroduplex** après **hybridation**.
oligonucléotide : petite séquence de **bases**.
paratope : site de reconnaissance de l'**anticorps**.
pathogène : relatif à une substance ou à un comportement induisant une maladie.
plasmocyte : stade ultime de la différenciation des **lymphocytes** de type B, produisant des **immunoglobulines**.
pI (point isoélectrique) : grandeur déterminant la charge électrique d'une molécule.
pH (potentiel hydrogène) : grandeur déterminant la charge d'une solution; on parlera de pH neutre quand il vaut 7, acide quand il est inférieur à 7, et basique dans le cas contraire.
PCR (polymerase chain reaction) : méthode consistant à répliquer du matériel génétique clinique, afin d'en disposer en grande quantité.
polyclonal : relatif à un ensemble d'**immunoglobulines** issues de **clônes** différents.
tampon biologique : solution d'eau, de différents sels et parfois d'autres produits chimiques, dont le rôle est soit, de maintenir des molécules dans des conditions particulières (pH, pI) dans le but d'optimiser leurs interactions avec d'autres molécules, soit de laver des surfaces, afin d'éliminer, par exemple, des molécules qui n'auraient pas interagies.
valence : grandeur correspondant au nombre d'**épitopes** ou de **paratopes** du même type pour une famille de molécules.

Introduction

En cette fin de vingtième siècle, on assiste à l'émergence, aussi bien dans le domaine de la recherche que celui de l'industrie, d'une discipline pluridisciplinaire connue sous le nom de biotechnologie. Sous cette appellation, on regroupe les secteurs de l'agronomie (modifications génétiques des aliments), des contrôles vétérinaires aux frontières (prévention des épidémies), de la dissuasion militaire en matière d'armes bactériologiques, de la surveillance de l'environnement (contrôles anti-pollution) et bien entendu du secteur medico-pharmaceutique, sous le forme de diagnostics cliniques, de suivis thérapeutiques et de recherches sur de nouveaux médicaments génétiques. Tous ces secteurs sont soumis aux mêmes besoins qui résident principalement dans la détection de la présence de molécules au sein d'un échantillon (sang, noyau cellulaire, air) et dans la compréhension des mécanismes d'interactions moléculaires. Bien qu'il existe dans certains des secteurs précités des dispositifs commercialisés et tout à fait opérationnels, nous allons tenter dans ce rapport de thèse, d'apporter de nouvelles réponses aux utilisateurs de biocapteurs.

Les biocapteurs procèdent la plupart du temps de l'association de deux entités moléculaires biologiques, dont l'une est immobilisée en phase solide, tandis que l'autre provient d'échantillons à tester. Le cahier des charges sur lequel nous allons nous appuyer pour réaliser notre biocapteur optique a pour grandes lignes :

-une grande spécificité

-une sensibilité adaptée à la molécule à détecter

-une réponse en temps réel

-une lecture directe de l'interaction moléculaire sans aide de marqueurs.

-une analyse en parallèle de plusieurs types de molécules

-un faible coût

C'est en 1960 que fut mis au point le premier dosage immunologique basé à la fois sur la spécificité de reconnaissance en utilisant un couple anticorps-antigène et sur la sensibilité, en greffant un marqueur radioactif sur l'anticorps (Berson & Yalov 1960). Le biocapteur était ainsi inventé, mais l'utilisation de radio-marqueurs posait déjà des problèmes de sécurité et de manipulations à résultats différés.

Depuis cette époque, on a vu émerger quantité de nouvelles techniques destinées à optimiser les six critères précités. On substitua, par exemple, des marqueurs enzymatiques ou fluorescents aux anciens marqueurs radioactifs. On développa également l'ingénierie biomoléculaire pour isoler des nouvelles molécules biologiques. Ces techniques, malgré leur fiabilité et leur sensibilité, restaient longues et coûteuses aussi bien en main d'oeuvre qu'en terme de coût.

C'est en partie grâce à la rencontre fortuite des biotechnologies et de certaines disciplines physiques, comme l'optique ou la micro-électronique que de nouvelles méthodes d'analyses en temps réel et sans marqueurs sont apparues. Ces capteurs biologiques sont constitués d'une couche immunosensible ou biorécepteur et d'un dispositif de transduction du signal,

convertissant en temps réel l'interaction biomoléculaire en un signal physique détectable. Cependant l'aspect temps réel n'était pas toujours compatible avec la détection en parallèle de plusieurs interactions, qui elles-mêmes, d'un autre côté, nécessitaient des marqueurs pour avoir accès aux résultats de leurs expériences. L'objet de ce travail de thèse pluridisciplinaire a consisté en la réalisation d'un biocapteur optique procédant de phénomènes connus comme la propagation d'ondes électromagnétiques de surface et d'ondes guidées, et adapté à l'analyse directe de plusieurs espèces à la fois. Pour ce faire, nous avons fait l'image du biorécepteur sur lequel les molécules avaient été immobilisées par un procédé électrochimique. Nous avons principalement axé nos recherches sur trois critères parmi les six présentés plus haut : la spécificité associée à la qualité du biorécepteur, la sensibilité de détection et la détection multiparamétrique. De par la nature pluridisciplinaire du sujet, le manuscrit se découpe en trois parties distinctes. La première partie traitera des aspects physiques et optiques associés à la réalisation du biocapteur. Nous présenterons dans la deuxième partie les différents types de molécules que nous avons étudiées ainsi que leurs modes d'interactions. Enfin, dans la troisième partie, nous nous concentrerons sur la validité expérimentale du biocapteur optique en réalisant des expériences de reconnaissances moléculaires débouchant sur une application : la détection de mutations ponctuelles au sein de fragments d'ADN synthétiques. Nous conclurons en abordant l'aspect du développement à apporter à notre dispositif et les perspectives envisagées.

Après un bref aperçu de l'état de l'art des biocapteurs, nous proposerons deux systèmes de transduction optique (résonance des plasmons de surface et miroir résonant) qui auront pour rôle de convertir la variation d'indice associée à la reconnaissance d'une espèce biologique par une autre, en un signal optique quantifiable. Nous les étudierons tous les deux afin de les comparer et de choisir celui qui possède le plus d'avantages. Nous introduirons à ce stade le dispositif imageur, s'appuyant sur la microscopie par effet plasmon. Nous expliciterons ensuite le mode opératoire de nos systèmes ainsi que les procédés de quantification associés.

Les molécules étudiées seront essentiellement de deux types : les protéines (anticorps et hormones) et les acides nucléiques (oligonucléotides et produits PCR). Nous rappellerons leurs modes d'interaction ainsi que la finalité de l'application médicale qui en découle.

Nous passerons enfin à la validation expérimentale du biocapteur optique, aussi bien en terme de sensibilité, d'études sur les modes d'immobilisations biochimiques de la couche bioréceptrice, que sur le passage vers le multicapteur. Nous réaliserons à ces fins des dosages hormonaux et des expériences de détection d'erreurs d'encodage génétique d'intérêt clinique.

Mais pour commencer, nous allons faire un tour d'horizon non exhaustif des différents biocapteurs existants, et développer le principe de fonctionnement des biocapteurs que nous avons réalisés et utilisés.

Chapitre I :

Approche théorique de la transduction optique

Introduction

Pour un capteur biologique, la transduction est le phénomène physique qui permet de suivre *in vitro* l'évolution d'une réaction biologique et de mesurer le nombre de molécules qui y a pris part. Cette notion détermine toutes les propriétés d'un biocapteur, à savoir la spécificité, la sensibilité de détection, la reproductibilité des résultats, etc... Nous posons alors les bases d'un cahier des charges auxquelles devront se plier les dispositifs de transduction étudiés. Nous consacrons en conséquence une partie importante de ce mémoire de thèse à l'étude particulière des transducteurs optiques utilisés durant nos expériences, en analysant leur fonctionnement propre et les sensibilités relatives à leur mode d'utilisation. Pour l'un des deux transducteurs optiques, nous présentons une méthode pour améliorer la sensibilité de détection en utilisant les résultats de l'étude analytique, alors que pour l'autre, nous développons un système d'imagerie nous donnant la possibilité de traiter les réactions biologiques en parallèle.

Au-delà de l'aspect analytique de la transduction, nous établissons également les modes opératoires pour chaque type de transduction en donnant les contraintes limites et les incertitudes sur les mesures. Nous ferons également apparaître les différents types de revêtements que l'on peut déposer à même le transducteur de façon à optimiser l'immobilisation de molécules biologiques.

Mais pour commencer cette étude, nous faisons un tour d'horizon des différents transducteurs existants, qui font appel à des phénomènes physiques variés et dont nous détaillerons les particularités.

I-A-État de l'art des biocapteurs

Nous allons dresser dans cette partie une liste non-exhaustive des biocapteurs (puisque nous ne nous intéresserons qu'aux capteurs biologiques dont l'une des espèces est immobilisée en phase solide) et de leur principe tout en cernant leurs applications, leur sensibilité analytique, leur fonctionnalisation de surface permettant l'immobilisation de molécules spécifiques à la reconnaissance d'une molécule en particulier, leur régénérabilité et enfin, la possibilité pour chacun de réaliser plusieurs types de reconnaissance à la fois.

Nous passerons en revue les biocapteurs basés sur une révélation enzymatique ou radioactive, ceux qui sont basés sur la détection de signaux électriques, les capteurs acoustiques et enfin les capteurs optiques, que nous aurons l'occasion de développer dans les parties I-B-4-1 et I-B-4-2.

I-A-1-Les tests immunologiques

Par le terme "tests immunologiques", nous désignons les tests radio-immunologiques (RIA pour Radio-Immuno Assay) et les tests immuno-enzymatiques (EIA pour Enzymatic-Immuno Assay) couramment pratiqués dans les laboratoires d'immunologie et quasiment sous la même forme dans les laboratoires axés sur la génétique moléculaire. Ces tests firent leur apparition il y a plusieurs décennies dans le but de doser la concentration en solution d'hormones et d'antigènes. Ils sont tous les deux basés sur une détection indirecte d'un marqueur couplé soit à l'analyte dans le cadre du test en compétition, soit à l'anticorps secondaire dans le cas du test en sandwich. Ces tests peuvent être utilisés suivant deux protocoles (Figure I-1) : tout d'abord, le test en compétition, où le complexe antigène-anticorps est immobilisé en phase solide (avec l'antigène marqué) et un antigène non marqué ayant un site de reconnaissance compatible avec l'anticorps est ensuite mis en présence du complexe, et va prendre petit à petit la place de l'antigène marqué. Dans ce cas, le signal radioactif va décroître avec le temps. Vient ensuite le "test sandwich", qui comme son nom l'indique procède de la reconnaissance du complexe immun (où aucun des protagonistes n'est marqué) par un anticorps secondaire marqué ayant un site de reconnaissance dirigé contre un autre épitope de l'antigène (le premier épitope étant déjà reconnu par l'anticorps primaire), le signal, cette fois-ci est proportionnel à la concentration d'antigène.

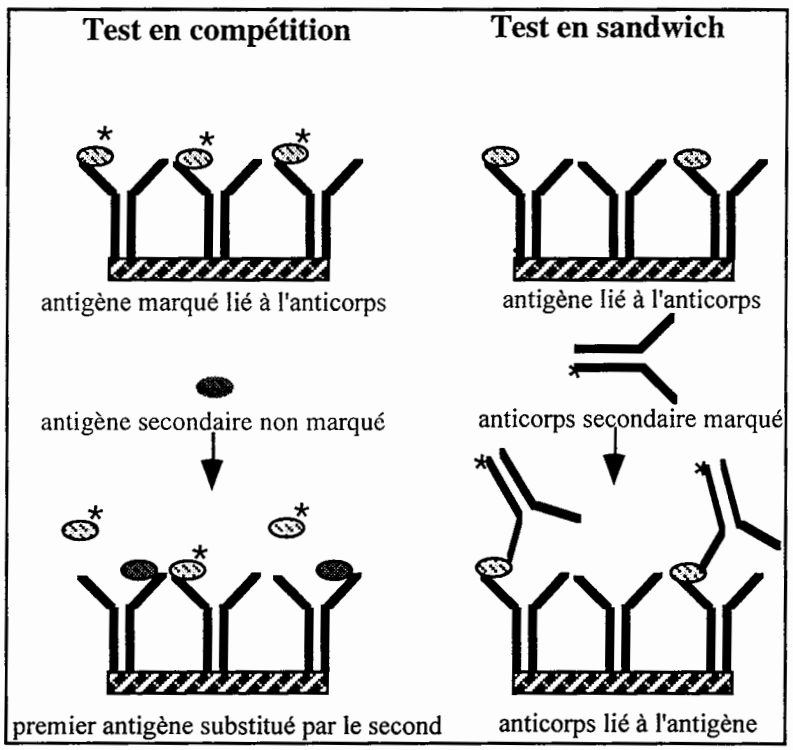


Figure I-1 : Schéma résumant les étapes du test en compétition et des tests en sandwich.

I-A-1-1-Les tests radio-immunologiques (RIA:RadioImmunoAssay)

Ce type de test RIA (pour Radio Immune Assay) a initialement été développé pour doser des hormones en solution à l'aide d'anticorps monoclonaux spécifiques. L'hormone dans ce cas était radio marquée, généralement par un isotope de l'iode. On élargit peu à peu ce test à l'ensemble des protéines, voire aux acides aminés, avec des résultats très fiables et très reproductibles. En outre, la quantification de l'espèce à doser est possible par cette méthode et sa sensibilité analytique est très bonne puisque la RIA assure des reconnaissances à des concentrations de l'ordre du pg/ml. La détection s'effectue à l'aide d'un compteur Geiger, ayant un bruit très faible. La régénération n'est pas possible pour ce test, qui ne possède en général aucune fonctionnalisation de surface et l'analyse en parallèle de plusieurs réactions demeure impossible de par l'isotropie de l'émission radioactive qui parasiterait la détection des espèces voisines.

Cette méthode reste toujours en usage dans les laboratoires, mais principalement pour détecter la présence d'une séquence d'ADN et de moins en moins pour les protéines. En effet, le radio marquage n'est pas possible pour toutes les protéines et représente un coût supplémentaire et bien sûr un risque d'irradiation pour les manipulateurs. C'est pourquoi on s'est dirigé vers une méthode offrant les mêmes avantages pour beaucoup moins d'inconvénients : le test immuno-enzymatique.

I-A-1-2-Les tests immuno-enzymatiques (EIA : Enzymatic Immuno Assay)

Parmi les tests EIA (pour Enzymatic Immune Assay), le plus utilisé demeure le test ELISA (Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent Assay) se présentant sous la forme d'une plaque sur laquelle se trouvent 96 puits. De fait, l'analyse en parallèle se pratique de manière courante et la sensibilité analytique est comparable à celle des tests RIA. La principale différence réside dans le choix du marqueur qui dans ce cas se trouve être une enzyme. Les plus utilisées sont la peroxydase et la phosphatase alcaline, dont l'activité est révélée après la réaction immunologique lors d'une incubation à même le substrat conduisant à une réaction colorée [1]. L'analyse des 96 puits est réalisée par un spectromètre, dont la longueur d'onde choisie ne dépend que du substrat utilisé et qui donne l'absorbance de chacun des 96 puits, remontant à la densité optique par la loi de Beer -Lambert :

$$DO = \varepsilon.l.c \qquad (I\text{-}1)$$

avec : DO pour densité optique
ε pour l'absorbance (m^{-1})
l pour l'épaisseur du milieu coloré (m)
c pour la concentration (%).

La plaque ELISA est réalisée en polymère plastifié dérivé du polystyrène et est utilisée en général sans fonctionnalisation de surface, c'est-à-dire que l'une des deux espèces intervenant dans la réaction est adsorbée passivement à même la plaque. Certains utilisateurs pourtant ont envisagé l'optimisation de ce test en fonctionnalisant les plaques ELISA [2] et ainsi gagner en rendement de signal. L'intérêt des 96 puits est d'étalonner la reconnaissance de plusieurs espèces (en ligne) en divisant la concentration du ligand par 10 pour chaque espèce (en colonne). On peut ainsi mesurer certaines constantes d'interaction comme la constante d'affinité, explicitée dans la partie I-C-2-1-2.

Les biomolécules marquées par une enzyme, dont l'activité est révélée par un chromophore, sont principalement utilisées en immunologie mais également en histochimie et en cytochimie afin de visualiser, à l'aide d'un microscope, la présence d'antigènes sur des tissus cellulaires. Il est à noter que l'on peut remplacer le chromophore par un fluorophore (I-C).

I-A-1-3-Bilan des tests immunologiques

Les deux types de tests immunologiques dont nous venons de faire une brève présentation, offrent des avantages de choix en matière de sensibilité et de fiabilité, mais requièrent l'utilisation de marqueurs et l'analyse en parallèle n'est possible que pour la méthode ELISA. L'aspect temporel pose problème, puisqu'il faut environ une douzaine d'heures pour l'obtention des résultats sur ELISA (encore utilisée pour le dépistage du virus du SIDA), et seulement une à deux heures pour les méthodes RIA. Cet aspect temporel est si important que les biocapteurs ont presque tous évolués dans l'objectif de parvenir à des résultats en temps réel, mais nous allons voir par la suite que ce n'est pas le seul paramètre que l'on a cherché à optimiser.

I-A-2-Les capteurs électriques

Parmi les types de signaux rendant compte d'une interaction biomoléculaire, les signaux électriques jouent un rôle important. On relève principalement trois modes de transduction du signal : le mode potentiométrique, le mode ampérométrique et le mode capacitif. Ces capteurs sont essentiellement destinés à la détection d'électrolytes et de métabolites contenus dans le sang.

I-A-2-1-Les trois modes de transduction électrique

Les capteurs potentiométriques mesurent, à l'équilibre, l'accumulation de charges à la surface d'une électrode recouverte d'une membrane spécifique, principe connu sous le nom ISE pour Ion-Selective Electrode. On peut de cette manière mesurer la concentration d'ions en solution. On a ainsi commencé par mettre au point des capteurs mesurant le pH, puis d'autres ions ont été mesurés comme les ions NH_4^+, K^+ et NA^+. On a ensuite couplé une enzyme à la transduction potentiométrique et des métabolites sanguines comme l'urée, le glucose et le lactate ont pu être dosés. Le système ampérométrique repose quant à lui sur la mesure d'intensité du courant électrique entre deux électrodes, dont l'une est recouverte de peroxyde d'hydrogène, réagissant avec une enzyme. Ces deux modes de transduction électrique ont récemment été associés pour la réalisation d'un multicapteur analysant en même temps des électrolytes et des métabolites [3].

La détection basée sur le mode capacitif, s'appuie sur la mesure de la variation d'impédance d'un condensateur quand des biomolécules sont immobilisées sur sa surface. Cette mesure d'impédance peut être directement liée à la concentration des molécules en phase solide. La limite de sensibilité analytique d'un tel système, pour la détection de bactéries telles les Staphylocoques ou entérotoxine B sur une couche mince de platine est de l'ordre du ng/ml [4]. Ce système n'est pas à proprement parler régénérable dans la mesure où pour réutiliser l'électrode il faut décrocher le complexe formé avec de l'acide, puis ensuite immobiliser de nouveau l'antigène.

Parmi les trois modes électriques de transduction ci-dessus, seule la mesure d'impédance permet de suivre en temps réel l'évolution d'une réaction biomoléculaire. Aucun des trois systèmes n'est régénérable, mais la sensibilité analytique du troisième est tout à fait correcte. Cependant, la spécificité des réponses est souvent limitée par le tampon utilisé, la diffusion ou la migration des charges sur l'électrode.

I-A-3-Les capteurs acoustiques

Ces types de biocapteurs (balance à Quartz) utilisent la propriété du quartz, un matériau piézo-électrique, qui voit sa fréquence de résonance acoustique varier dès que des molécules sont déposées à sa surface. Tout type d'interaction moléculaire peut ainsi être mesuré en induisant une variation de propagation des ondes acoustiques à la surface du quartz [5-6].

Ils ont commencé à être utilisés pour détecter la présence de gaz dans des colonnes chromatographiques puis associés à l'électrochimie, pour la détection de dépôts métalliques, d'enzymes, de protéines et plus récemment, d'oligonucléotides.

Les biocapteurs acoustiques, bien qu'ils offrent une limite de sensibilité analytique de l'ordre du pg/ml, sont limités par les vibrations parasites extérieures au dispositif et par les impuretés contenues dans l'échantillon. Ce système peut-être régénérable mais n'offre pas la possibilité de travailler sur plusieurs canaux de détection à la fois.

I-A-4-Les capteurs optiques

Le développement considérable des fibres optiques dans le secteur des télécommunications a largement profité au domaine des capteurs optiques. Ainsi, l'association de phénomènes optiques bien connus avec des dispositifs optoélectroniques a donné naissance à un très grand nombre de biocapteurs optiques, tous avantageux pour des aspects de coût, miniaturisation et mise en œuvre. Nous distinguerons plusieurs types de capteurs optiques, notamment ceux qui sont basés sur l'ellipsométrie, sur l'interférométrie, sur la propagation des plasmons de surface et enfin sur des systèmes ne reposant que sur une lecture optique, comme la microscopie confocale de fluorescence.

I-A-4-1-Biocapteurs basés sur l'ellipsométrie et la réfractométrie

À l'origine, les méthodes ellipsométriques étaient utilisées pour la caractérisation de couches minces à la surface d'un substrat et permettaient de remonter au profil d'indice [7-8]. Le principe de base de l'ellipsométrie repose sur la variation de polarisation elliptique du faisceau incident après réflexion. Typiquement, le transducteur est placé entre polariseurs linéaires et permet l'extinction du faisceau réfléchi. Une lame quart d'onde, placée avant l'analyseur, rend la polarisation de sortie linéaire. Lors d'une variation d'indice du milieu voisin du substrat, il n'y a plus extinction du faisceau réfléchi. De l'angle dont il faut tourner l'analyseur, on remonte au changement de polarisation, fonction de l'épaisseur optique de la couche néoformée.

La réfractométrie Brewster [9-10] ou SAR (pour Scanning Angle Refractometry) ressemble à l'éllipsométrie en ce qui concerne la détermination de l'épaisseur optique de la couche néoformée, mais son principe est différent. En polarisation TM, la réflectivité s'annule à l'angle de Brewster. Cet angle est directement fonction de l'indice du milieu voisin du substrat en verre. La modification de cet indice entraîne un décalage de l'angle de Brewster déterminé en balayant angulairement l'incidence du faisceau.

Ces deux méthodes sont surtout utilisées pour caractériser le comportement de biomolécules lors de leur adsorption à même le substrat, elles ne présentent pas une grande sensibilité (de l'ordre de 10 nanomolaire, nM) et peuvent être utilisées pour la multidétection d'interactions biomoléculaires (microscopie à angle de Brewster).

I-A-4-2-Biocapteurs basés sur l'optique intégrée et l'interférométrie

Certains types de biocapteurs reposent sur la mesure du déphasage entre les composantes TE et TM du faisceau lumineux dans le cas de l'optique intégrée, ou bien entre une des restant inchangée durant l'expérience de reconnaissance biomoléculaire, car elle n'est pas sensible au phénomène observé (bras de référence) et une composante qui subit une modification associé au phénomène (bras signal), comme dans le cas d'un interféromètred'interféromètre de Mach-Zehnder [11]. Le déphasage mesuré est relié directement à la variation d'indice de réfraction du milieu en contact avec le transducteur optique lors d'une interaction moléculaire.

Nous présentons dans la partie I-B-4-2 le Miroir Résonant (MR) dont nous expliciterons en détail le fonctionnement, mais il existe bien d'autres biocapteurs basés sur l'interférométrie comme le système construit autour d'un interféromètre de Mach-Zehnder, pouvant assurer une sensibilité allant jusqu'à 5.10^{-11}M (mole/litre) [12].

Ces systèmes sont généralement plus sensibles que tous les autres capteurs optiques réunis [13] et leurs applications vont de la reconnaissance antigène-anticorps [14] jusqu'au séquençage d'ADN [15].

La fonctionnalisation de ces transducteurs est obtenue par un traitement chimique approprié de la surface sur laquelle sont fixés soit des groupements de thiols, soit de polymères neutres. La détection en parallèle est possible avec de tels systèmes. De plus, ces capteurs n'utilisent généralement pas de marqueurs pour détecter la présence de molécules particulières dans une solution, un autre point en commun avec les biocapteurs basés sur les plasmons de surface présentés dans la prochaine section.

I-A-4-3-Biocapteurs basés sur les plasmons de surface

Comme les biocapteurs optiques basés sur l'interférométrie et la réfractométrie à l'angle de Brewster, ceux basés sur la propagation des plasmons de surface sont sensibles à la variation d'indice de réfraction induit à la surface du capteur par la formation d'une monocouche diélectrique. Le principe optique de ce système est décrit en détail dans la partie I-B-4-1. La société Biacore [16-18] a développé au début des années 90 un instrument couramment utilisé pour la détection d'interactions protéiques dont la sensibilité donnée est de l'ordre de 10^{-11} M et également pour la détection d'hybridation d'oligonucléotides et la recherche de mutations ponctuelles [19-22]. Le principe général consiste à sonder à l'aide d'une onde évanescente le milieu voisin du transducteur formé d'une couche mince métallique en régime de réflexion totale

atténuée. Cette onde évanescente, confinée près de la surface du capteur, est sensible à toute variation d'indice liée à la présence de molécules. Pour un angle d'incidence donné, on peut suivre cette variation d'indice en temps réel. Les mesures s'effectuent au travers de la variation de réflectivité, proportionnelle à la variation d'indice à la surface du transducteur, donc du nombre de molécules ayant interagi. D'autre part, on peut également accéder à cette mesure en suivant la réflectivité en fonction de l'angle d'incidence et ainsi avoir accès aux paramètres optiques de tous les milieux en présence.

Outre Biacore, leader du marché, d'autres biocapteurs basés sur les plasmons de surface ont vu le jour, comme ceux alliant un guide d'ondes diélectrique au transducteur métallique classique [23-27], ou bien utilisant un réseau de diffraction pour coupler la lumière au transducteur [28-29], ou enfin, les biocapteurs utilisant la microscopie plasmon afin d'imager l'ensemble des surfaces sensibles [30-35].

I-A-4-4-Biocapteurs basés sur une détection optique indirecte

En général, ces biocapteurs fonctionnent sans transducteur et procèdent par test en sandwich. Ils sont principalement destinés à détecter l'hybridation en parallèle de fragments d'ADN. Cette réaction étant révélée indirectement par un marqueur (fluorophore ou chromophore), on image la totalité du capteur sur une caméra CCD, et à l'aide d'un scanner, on analyse séquentiellement chacun des éléments du capteur. On cite à titre d'exemple le GeneChip (Affimetrix) qui peut analyser plusieurs centaines de milliers de séquences en même temps et dont la méthode d'immobilisation est originale puisque les fragments d'ADN sont synthétisés en parallèle *in situ*, base après base [36-39]. Nos collaborateurs du CEA-Grenoble et de Cis Bio International ont réalisé un multicapteur à ADN où les fragments entiers sont mélangés à des monomères de pyrroles, puis immobilisés par un processus électrochimique [40-42].

La détection par fluorescence est bien plus sensible que la Réflexion Totale Atténuée (RTA), puisqu'elle est de l'ordre du pM (10^{-12} mole/litre), mais ne fonctionne pas en temps réel et nécessite un marqueur. Néanmoins, ce type de biocapteur semble avoir un certain avenir dans l'analyse de haute densité, puisque à l'heure actuelle, on atteint la centaine de milliers d'analyses simultanées par capteur (Affymetrix).

I-A-5-Conclusion

Les biocapteurs ont évolué au gré des avancées de la biologie et des technologies mises en œuvre. À l'heure actuelle, les aspects du coût et du rendement sont au centre des préoccupations des utilisateurs, sans négliger évidemment la fiabilité, la spécificité et la sensibilité de ces capteurs. Nous donnons dans le tableau I-a un compte-rendu de la présentation des différents modes de transduction.

Transduction	Tests RIA et EIA	Capteurs électriques	Capteurs optiques directs	Capteurs optiques indirects
multipoints	non	non	oui	oui
marqueurs	oui	non	non	oui
sensibilité	pM	fM	fM	pM

Tableau I-a : récapitulatif des différents modes de transduction.

Il se dégage de la présentation ci-dessus qu'il est impossible de cumuler tous les aspects positifs théoriques sur la conception d'un biocapteur, aussi nous sommes-nous tournés vers le système offrant le plus d'avantages pour une utilisation très souple : le capteur optique. Son inconvénient majeur est sa sensibilité (de l'ordre du fM), mais il analyse et quantifie en temps réel, peut dans certaines conditions fonctionner sans marqueur, et analyser en parallèle plusieurs espèces moléculaires.

Nous allons maintenant rappeler de façon simple, le principe des biocapteurs optiques, pour ensuite nous pencher sur les principes théoriques de leur fonctionnement.

I-B-Principes du biocapteur optique

Un biocapteur optique est un système au sein duquel on détecte des interactions biologiques via un dispositif optique.

I-B-1-Introduction

Le concept du biocapteur optique repose sur la détection de la variation *d'épaisseur optique* engendrée par la fixation successive de molécules biologiques sur un substrat de verre d'indice fixé, éventuellement recouvert d'un film mince à haut pouvoir de réflexion. La figure I-2 schématise le principe de base de la détection optique d'une interaction *biomoléculaire (par exemple lors de la formation d'un complexe anticorps-antigène).* Une lame de verre, préalablement recouverte d'une monocouche (antigène), est éclairée par un faisceau lumineux collimaté. Les caractéristiques optiques de cette couche peuvent être déterminées à partir de la mesure de l'intensité du faisceau réfléchi (ou transmis) qui dépend de la nature de l'interface, c'est-à-dire de l'épaisseur optique de cette monocouche. L'utilisation des coefficients de réflexion de Fresnel permet de calculer sans difficulté, le coefficient de réflexion en amplitude ou en intensité (R_0) du substrat recouvert de son film. Lorsque l'anticorps est mis en contact avec le substrat, on observe au cours du temps la formation d'un complexe anticorps-antigène qui se manifeste par une modification de l'interface due à la fixation d'une couche d'anticorps sur le film d'antigènes. La réflectivité va donc acquérir une nouvelle valeur R_1. Toute l'information concernant cette interaction est contenue dans la grandeur $\Delta R= R_1- R_0$, traduisant la variation de réflectivité. De façon similaire, l'utilisation des coefficients de Fresnel pour calculer R_1 permettra de déterminer les propriétés optiques de ce complexe. De façon générale, avant de procéder à la mise en évidence des interactions biomoléculaires, il est nécessaire de réaliser plusieurs étapes préalables successives. La première est généralement consacrée à la préparation chimique de la surface afin de pouvoir fixer la première couche biologique de façon covalente et faire acquérir au système une bonne régénérabilité. Cette étape concerne par exemple le greffage d'un film polymère fonctionnalisé sur une surface d'or ou d'oxyde de titane dans les systèmes optiques que nous décrirons plus loin. Sur ce polymère, on peut également fixer des sondes oligonucléotidiques pour analyser les réactions d'hybridations. L'ensemble de ces opérations consécutives se traduit par la formation d'une interface constituée d'un empilement de couches moléculaires, plus ou moins compactes. Le facteur de réflexion est modifié au fur et à mesure que les molécules se déposent sur l'interface, provoquant soit un changement local de l'indice de réfraction de la couche soit de son épaisseur ou des deux en même temps. La réflectivité va donc évoluer en fonction du nombre de molécules qui se fixent sur la surface au cours du temps et va donc traduire la cinétique de formation de l'interface couche par couche.

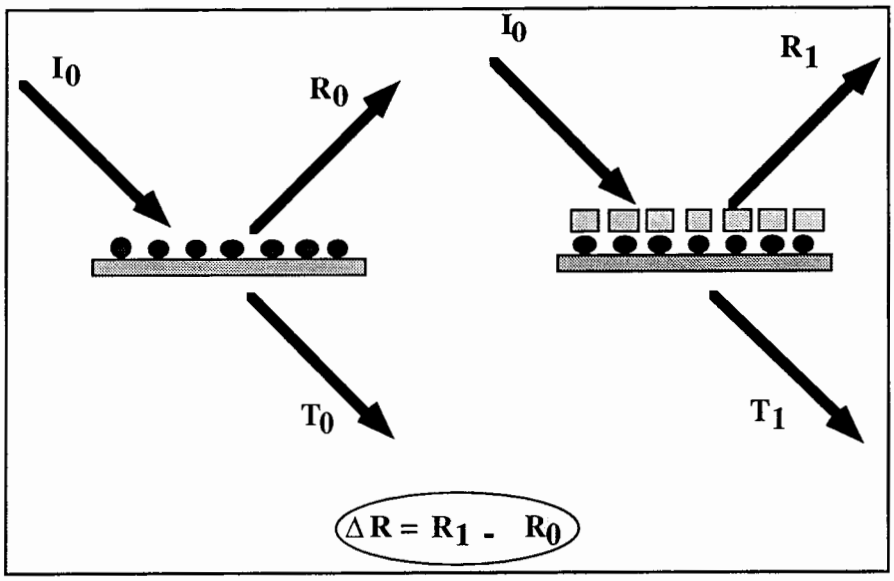


Figure I-2 : Représentation schématique de la détection optique d'une interaction biomoléculaire.

I-B-2-Les difficultés de mesure

À titre d'exemple, considérons la fixation d'une couche biologique (épaisseur d_f=1 nm, d'indice de réfraction n_f = 1,41), en contact avec un milieu couvrant aqueux d'indice 1,333, sur une lame de verre d'indice 1,52. La variation de réflectivité engendrée par cette couche biologique pour un angle d'incidence de 35 degrés par rapport au plan du substrat, est d'environ $\Delta R = 7.10^{-7}$. Cette valeur, extrêmement faible, nécessite de recourir à des techniques de mesure sophistiquées et à des méthodes optiques plus performantes telles que l'ellipsométrie, la résonance des plasmons de surface ou le miroir résonant pour ne citer que les plus connues. À présent, nous allons analyser quelles sont les méthodes optiques fiables, simples d'emploi et suffisamment sensibles pour constituer la base de notre transducteur optique.

Si l'on considère que le pouvoir réflecteur d'une lame de verre est de l'ordre de quelques pour-cent, la variation de réflectivité engendrée par une interaction biomoléculaire est tout à fait indécelable, c'est-à-dire noyée dans le bruit de détection. On peut songer à la méthode classique d'ellipsométrie qui a fait ses preuves dans de très nombreux secteurs de la physique pour mesurer avec précision les modifications interfaciales qui se produisent sur une surface à haut pouvoir réflecteur. L'échantillon à analyser est placé entre polariseur et analyseur croisés. Le principe de cette méthode est basé sur la mesure de l'état de polarisation de la lumière après réflexion sur la surface. La comparaison des résultats expérimentaux avec le modèle théorique permet de déterminer les propriétés optiques de la structure multicouche de l'interface. Dans le domaine qui nous intéresse, toutes les analyses biomoléculaires ont lieu en milieu aqueux, ce

qui impose au faisceau incident de traverser toute la solution aqueuse avant d'atteindre l'interface. Dans ce type d'expériences, les produits biologiques doivent circuler en permanence dans une cuve opaque et pouvoir être échangés facilement. Il est de plus nécessaire de placer un dispositif stabilisateur de température au niveau de l'interface. Le faisceau incident polarisé doit donc traverser un milieu liquide en mouvement risquant de perturber la phase du faisceau qui intervient dans les mesures. On comprend que cette contrainte empêche l'accès direct à l'interface au travers de la solution. On doit noter enfin que la mise en œuvre de l'ellipsométrie nécessite un appareillage très sophistiqué et d'un coût très élevé. Pour ces diverses raisons, l'ellipsométrie n'est pas bien adaptée à ce type d'analyse.

Il nous faut donc nous affranchir de ces difficultés et isoler un principe optique répondant à notre cahier des charges. Nous avons cherché les méthodes optiques capables d'une part d'amplifier le signal ΔR sans que le faisceau lumineux traverse la solution, et d'autre part de générer sur la surface du transducteur une **onde de surface** se propageant le long de l'interface. Cette onde présente, comme nous le verrons plus loin, une amplitude qui décroît exponentiellement en fonction de la distance à l'interface. On peut ainsi définir une profondeur de pénétration comme étant la distance pour laquelle l'amplitude tombe à une valeur 1/e de sa valeur maximale sur l'interface. Cette onde est particulièrement sensible aux interactions biomoléculaires qui se produisent sur l'interface dans une tranche superficielle égale à la profondeur de pénétration de l'onde de surface.

I-B-3-Introduction aux ondes de surface

Nous présentons maintenant les propriétés que doit posséder le système pour détecter une interaction biologique. Tout d'abord, le système doit mesurer une variation de réflectivité $\Delta R/\Delta N$ maximale lors d'une interaction moléculaire. De.plus, le faisceau incident ne doit pas traverser la solution contenant les produits biologiques (milieu couvrant) qui pourraient perturber sa propagation. Enfin, le champ optique doit être confiné sur l'interface, siège des interactions biomoléculaires. Cette propriété de confinement est facile à réaliser car on connaît depuis longtemps, les moyens pour générer :

1) une onde évanescente se propageant sur une surface séparant deux milieux diélectriques transparents.
2) une onde "plasmon de surface" se propageant sur une surface séparant deux milieux de constantes diélectriques de signes opposés. Il s'agit du phénomène de résonance des plasmons de surface sur une interface métal/diélectrique.
3) une onde guidée portée par une structure lamellaire guidante.

La figure I-3 représente schématiquement les 3 ondes présentées ci-dessus.

L'onde évanescente est obtenue lorsque l'onde incidente, issue du milieu le plus réfringent, tombe sur l'interface sous un angle d'incidence supérieur à l'angle limite. Dans le cas des expériences biomoléculaires, on utilise un prisme de verre dont l'indice de réfraction n_p est supérieur à l'indice du milieu couvrant d'indice n_c (solution biologique). Ici, seul le champ dans le milieu couvrant présente un caractère de décroissance exponentielle. Dans le milieu incident, le champ présente un caractère oscillant car il résulte de la superposition des ondes incidente et réfléchie.

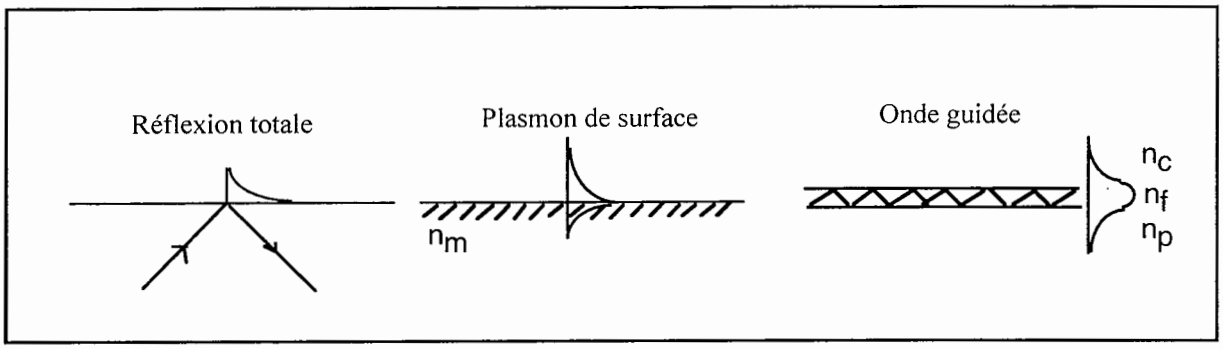


Figure I-3 : Représentations des ondes de surface adaptées à la détection de variation d'indice dans un milieu extérieur aqueux. De gauche à droite, apparaissent la réflexion totale sur un substrat de verre, le plasmon de surface, où l'on distingue la décroissance de l'onde de part et d'autre du substrat d'or, et l'onde guidée dans un film mince de haut indice n_f.

Contrairement à l'onde évanescente, le plasmon de surface est une onde à décroissance exponentielle des deux côtés de l'interface. Elle se propage parallèlement à l'interface séparant un métal (or, argent..) d'un milieu diélectrique sans pertes (milieu couvrant).

L'onde guidée est une onde électromagnétique qui se propage dans un film mince transparent (guide), déposé sur un substrat de verre et mis en contact avec le milieu couvrant. La propagation à l'intérieur du guide s'effectue par réflexions totales successives sur les deux interfaces séparant le guide de son substrat et du milieu couvrant.

Ces trois types d'ondes ont un point commun : le champ électromagnétique dans le milieu couvrant présente un caractère d'onde évanescente c'est-à-dire que l'amplitude décroît exponentiellement avec la distance à l'interface. La fixation de molécules sur l'interface va modifier l'information contenue dans l'onde tant au niveau de sa phase que de son amplitude.

L'onde évanescente joue le rôle de sonde dans le milieu où se situe la réaction biomoléculaire dont l'information pourra être recueillie dans la phase et l'amplitude du faisceau réfléchi. Rappelons que l'obtention d'une onde évanescente dans un milieu diélectrique transparent nécessite que l'onde incidente se propage du milieu d'indice de réfraction le plus élevé vers le milieu d'indice plus faible. De façon pratique, l'onde incidente traverse d'abord un

prisme de verre dont l'indice de réfraction a pour valeur 1.515 ou 1.717, frappe l'interface sous un angle d'incidence supérieur à l'angle critique, défini par rapport au milieu couvrant. Ce prisme constitue le dispositif de couplage de l'onde incidente avec l'onde de surface (onde évanescente, plasmon de surface et onde guidée).

Dans tous les systèmes qui seront décrits plus loin, ce prisme de couplage sera utilisé avec l'indice de réfraction le plus approprié.

Rappelons à présent les bases optiques des systèmes associés à la génération d'ondes évanescentes, qui nous mèneront à établir le choix de deux types de transducteurs.

B-3-1-Choix de transducteurs pour le biocapteur optique

Nous allons étudier le dispositif de Réflexion Totale Atténuée (RTA), basé sur la résonance des plasmons de surface et le dispositif du miroir résonant (MR), utilisant la propagation guidée. Ces deux systèmes optiques vont permettre d'amplifier la variation de signal de réflectivité ΔR liée à la variation d'épaisseur optique en surface, provoquée par une interaction moléculaire. Deux types de matériaux peuvent être choisis pour assurer le rôle de transducteur : soit un film mince métallique pour exciter la résonance des plasmons de surface soit un matériau transparent pour assurer la fonction de guide optique. À ces deux types de transducteurs sont associés des paramètres différents, qui, nous le verrons dans la partie I-B-4, vont permettre de déterminer la sensibilité de chaque dispositif et les limites que l'on peut atteindre. Comme nous l'avons indiqué plus haut, les deux dispositifs travaillent en réflexion totale sur le milieu couvrant et nécessitent donc un prisme de couplage dont le rôle est de transférer l'énergie du faisceau incident à l'onde de surface (cf. fig. I-4).

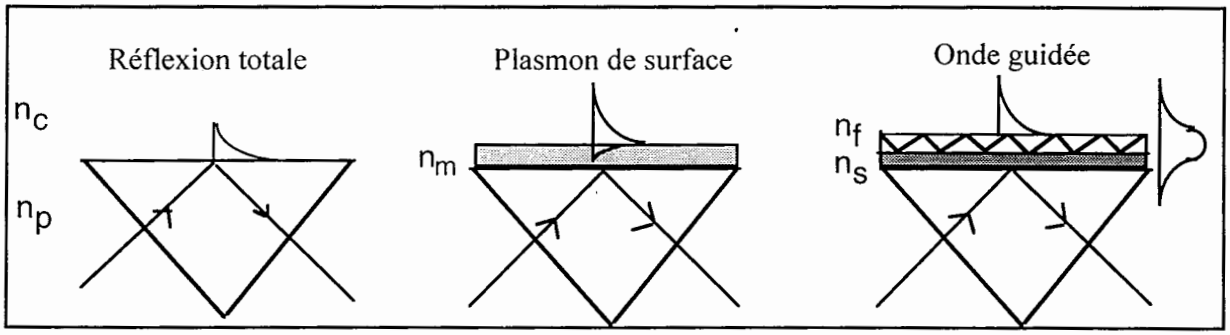


Figure I-4 : Représentation du couplage de la lumière incidente à l'aide d'un prisme en verre : À gauche, l'onde évanescente, au centre, le plasmon de surface, à droite, l'onde guidée.

Nous rappellerons quelques notions de base, communes aux trois systèmes, qui nous permettront de définir les paramètres importants du transducteur. Un bref rappel sera consacré à la réflexion totale, à la résonance des plasmons de surface et à l'équation caractéristique de l'onde guidée.

B-3-1-2-Phénomène de réflexion totale et propagation de l'onde évanescente

Considérons deux milieux transparents séparés par une interface plane et dont les indices de réfraction sont $\mathbf{n_f}$ et $\mathbf{n_c}$, avec $\mathbf{n_f} > \mathbf{n_c}$ (Fig. I-5). Une onde incidente polarisée TE ou TM tombe sur l'interface sous un angle d'incidence α_f. Si cet angle est supérieur à l'angle limite α_c défini par $\alpha_c = \arcsin(n_c/n_f)$, on observe le phénomène de réflexion totale. La réflectivité R de l'interface est égale à 1 de sorte que l'onde incidente est totalement réfléchie. Toute l'énergie du faisceau incident se retrouve sur le faisceau réfléchi après avoir transité dans le milieu couvrant n_c. En deçà de cet angle critique, le faisceau incident est partiellement transmis et réfléchi. Notons que la réflexion totale ou partielle dépend de l'état de polarisation de la lumière.

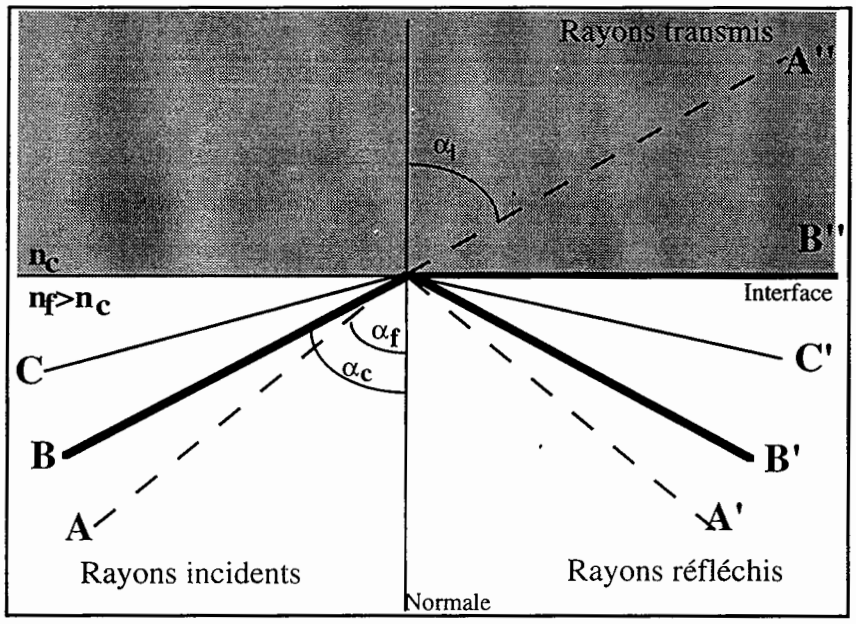


Figure I-5 : Schéma associé à la loi de Descartes et à l'angle limite. Les rayons d'incidence différente A, B et C sont réfléchis partiellement ou totalement, respectivement en A', B' et C'. Seuls les rayons issus de A et B sont partiellement transmis (A'' et B'').

Lors du phénomène de réflexion totale $\alpha_f > \alpha_c$, on observe dans le milieu extérieur la présence d'une onde évanescente dont l'amplitude E décroît exponentiellement suivant l'expression :

$E= E_0 \exp(-z/L_z)$ où z représente la distance à l'interface et $L_{zc} = \frac{\lambda}{2\pi n_f \sqrt{\sin^2 \alpha_f - \sin^2 \alpha_c}}$ la profondeur de pénétration de l'onde évanescente dans le milieu d'indice n_c. E_0 est l'amplitude de l'onde en z=0 et λ est la longueur d'onde dans le vide. L'onde évanescente est donc une onde confinée sur l'interface : elle joue le rôle de sonde dans le second milieu et est sensible à toute modification de l'indice n_c, au voisinage immédiat de l'interface ce qui se traduit par une variation de la phase de l'onde réfléchie.

B-3-1-2-Ondes électromagnétiques de surface : les plasmons de surface

Le plasmon de surface est une onde électromagnétique de surface se propageant le long d'une interface séparant deux milieux de permittivité de signes opposés (métal/diélectrique). Physiquement, un plasmon peut être décrit comme une excitation collective des électrons libres du métal par une onde électromagnétique incidente, le métal pouvant être assimilé à un plasma dans lequel les électrons de conduction se déplacent librement. L'excitation du plasmon ne peut se faire que si le champ optique incident est transverse (TM) c'est-à-dire si son champ électrique est dans le plan d'incidence. La propagation d'une telle onde présente les caractéristiques suivantes (cf. fig. I-6) :

-la polarisation de l'onde est transverse magnétique TM

-l'amplitude A de l'onde décroît exponentiellement de part et d'autre de l'interface

-la composante longitudinale du vecteur d'onde suivant l'interface Ox vérifie :

$$k_{sp} = k_0 \left(\frac{\varepsilon_c \varepsilon_m}{\varepsilon_c + \varepsilon_m} \right)^{\frac{1}{2}} = k_x - j\Gamma^i \qquad \text{(I-2)}$$

avec $\varepsilon_m=\varepsilon_{mr}-j\varepsilon_i$ et $\varepsilon_{mr} > \varepsilon_{mi}$ et avec les conditions nécessaires : $\varepsilon_c\varepsilon_m<0$ et $\varepsilon_c+\varepsilon_m<0$, et où $\varepsilon_m=n_m^2$ est la permittivité du métal, $\varepsilon_c=n_c^2$ celle du milieu extérieur et $k_0=\omega/c$. Dans le domaine du visible avec les métaux tels l'argent ou l'or, la permittivité ε_m est négative. Les milieux extérieurs tels l'air ($\varepsilon_c=1$) ou l'eau ($\varepsilon_c=1,777$) ont une permittivité positive. On définit la profondeur de pénétration de l'onde évanescente dans le milieu extérieur, L_{zc} (Fig. I-6). La longueur $L_x=1/\Gamma^i$ correspond à la distance de propagation le long de l'interface, pour laquelle l'amplitude s'amortit à 1/e de sa valeur initiale. Le développement de la constante K_{sp} (expression I-2) en fonction de ε_{mi} et ε_{mr} permet de calculer Γ^i (cf la relation I-16 plus loin) qui s'écrit alors : $\Gamma^i=k_0 n_c^3 \varepsilon_{mi}/(2\varepsilon_{mr}^2)$.

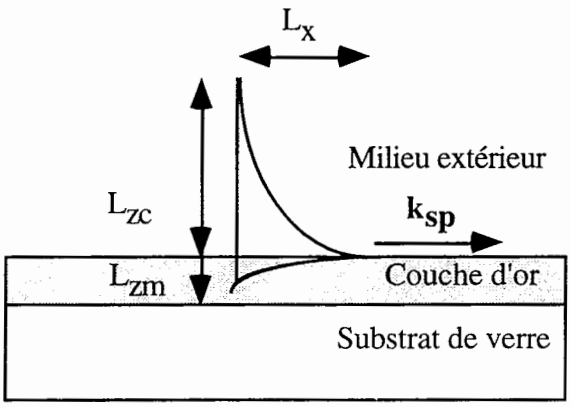


Figure I-6 : Représentation des interfaces or/milieu extérieur et or/verre et des longueurs caractéristiques de propagation et de pénétration.

Avec un métal comme l'or, ε_m=-11,9+j1,3, à longueur d'onde λ=633 nm, la longueur de propagation Lx vaut 9,3 microns. Cette information est très importante puisqu'elle impose la limite de résolution spatiale dans le cas où l'on fait l'image de la surface d'or. La longueur de pénétration L_{zc} de l'onde évanescente dans le milieu extérieur, par exemple en eau, est de l'ordre de 180 nm à λ=633 nm, c'est-à-dire que le système de détection a une sensibilité de plus en plus faible vis-à-vis des variations d'indice qui apparaissent au-delà de cette distance de l'interface. La longueur de pénétration dans le métal n'est que de 30 nm.

La composante longitudinale du vecteur d'onde dans le milieu extérieur vaut au maximum $k_0 n_c$, valeur inférieure à k_x (cf. eq. I-2). Il y a nécessité d'augmenter la composante du vecteur d'onde incident pour assurer le couplage avec celle de l'onde de surface ou de l'onde guidée. Deux modes de couplage sont utilisés couramment : le couplage par réseau ou bien par prisme. Il a été démontré par Homola et al. [43] que le couplage par prisme offrait une meilleure sensibilité que le couplage par réseau. Le transducteur constitué par un film d'or, déposé sur un substrat de verre ayant le même indice de réfraction que le prisme, est mis en contact avec ce dernier à l'aide d'une huile d'adaptation d'indice. Nous présentons le biocapteur dans son ensemble dans la figure I-7. On voit que l'angle d'incidence peut être repéré soit à l'extérieur du prisme (θ, angle externe), soit à l'intérieur (α, angle interne) avec $\theta=\pi/2-A_p+\text{Arcsin}[n_p\sin(A_p-\alpha)]$ où n_p est l'indice de réfraction du prisme et A_p est l'angle définissant l'arête du prisme et vaut 60° (cf. Fig. I-7). A_p, θ et α sont exprimés en radian.

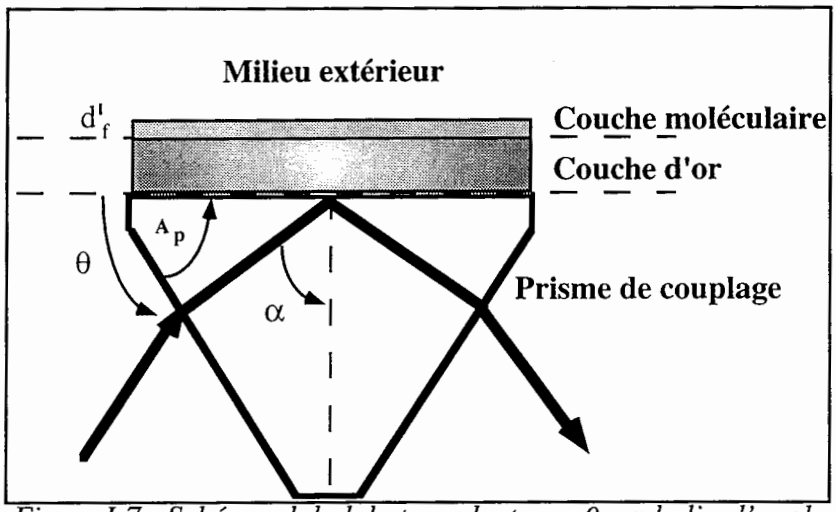


Figure I-7 : Schéma global du transducteur . θ symbolise l'angle externe et α l'angle interne au prisme. d_f' est l'épaisseur de la couche moléculaire à détecter.

En relevant la réflectivité du système décrit précédemment en fonction de l'angle d'incidence interne, on obtient une courbe accusant un minimum proche de 0 à l'angle réalisant l'accord de phase $k_x=k_0 n_p \sin\alpha$ qui permet d'exciter un plasmon de surface. La figure I-8 donne la réflectivité en fonction de l'angle interne enregistré dans une solution de PBS (tampon biologique) à partir d'un échantillon de 45 nm d'or de permittivité -11,9 + j1,3, déposé sur du verre d'indice 1,717.

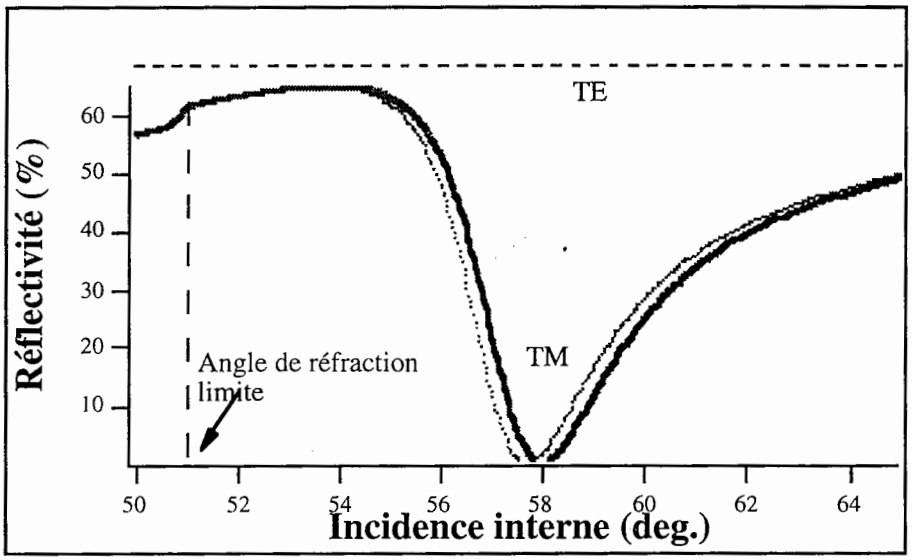


Figure I-8: Extinction du faisceau réfléchi lors du phénomène de Résonance du Plasmon de Surface en fonction de l'angle interne (courbe en pointillés). On distingue l'angle de réfraction limite en deçà duquel le faisceau incident n'est plus totalement réfléchi. Lors de la formation d'une couche diélectrique d'épaisseur d_f de 1 nm à la surface du transducteur, le pic de réflectivité en polarisation TM subit un décalage (courbe en trait plein). On représente également la réflectivité TE, qui est constante pour toute la course angulaire. L'indice du milieu couvrant vaut 1,333.

L'autre système optique générant une onde évanescente s'appuie sur la propagation d'une onde guidée dans un matériau diélectrique, nous rappelons cette théorie dans la section suivante.

B-3-1-3-Les ondes guidées

Considérons une couche mince diélectrique transparente séparant l'espace en trois milieux (fig. I-9) définis par les indices de réfraction n_s, n_f, n_c, avec $n_f > n_s > n_c$. En pratique le film d'indice n_f, jouant le rôle de guide est déposé sur un substrat semi-infini d'indice n_s et mis en contact avec le milieu extérieur couvrant n_c. La propagation est guidée lorsque l'onde qui se propage dans le film subit la réflexion totale sur les deux interfaces guide/milieu extérieur et guide /substrat. La trajectoire de propagation est une trajectoire en zigzag et l'onde guidée se propage indéfiniment si les milieux en présence ne présentent aucune perte. La réflexion totale sur les surfaces limitant le guide provoque la présence d'ondes évanescentes qui vont sonder les deux milieux extérieurs au guide, comme le montre la figure I-9.

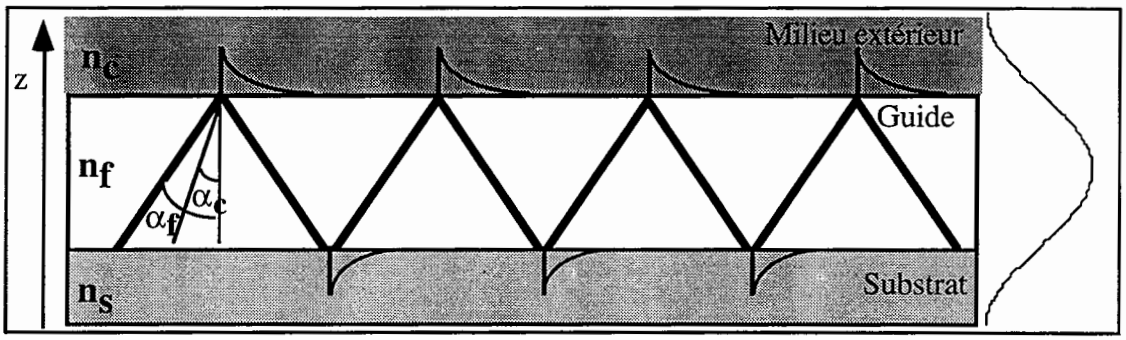


Figure I-9 : Trajectoire caractéristique d'une onde lumineuse au sein d'un guide d'ondes planaire. Le profil de l'onde est indiqué à droite du schéma.

Pour que l'onde lumineuse subisse la réflexion totale sur les deux milieux avoisinants, il faut que l'angle de propagation α_f dans le guide, soit supérieur à l'angle critique α_c défini par rapport à l'interface substrat/guide. Lorsque le guide est mince, seules quelques directions de propagation sont possibles. Chacune d'entre elles est associée à un mode de propagation. L'application des équations de Maxwell et des conditions de passage sur les interfaces conduit à l'équation caractéristique des modes de propagation suivante (eq. I-3) :

$$\Psi(k_z) = 2k_z d_f + 2\Phi_{f,s} + 2\Phi_{f,c} = 2m\pi \qquad \text{(I-3)}$$

où k_z est la composante transversale du vecteur d'onde, d_f l'épaisseur du guide, $\Phi_{f,s}$ et $\Phi_{f,c}$, les demi-déphasages à la réflexion totale, respectivement entre le guide et le substrat et entre le guide et le milieu extérieur. En polarisation TE $\phi_{f,s} = \text{arctg}\left(\left(N^2 - n_s^2\right)/\left(n_f^2 - N^2\right)\right)^{1/2}$ et $\phi_{f,c} = \text{arctg}\left(\left(N^2 - n_c^2\right)/\left(n_f^2 - N^2\right)\right)^{1/2}$, m est l'ordre du mode et $N = n_f \sin\alpha_f$, l'indice effectif du mode avec n_f l'indice du guide et α_f l'angle de propagation dans le guide. On réécrit alors l'équation I-3 comme :

$$\Psi(N) = \frac{4\pi}{\lambda} d_f \sqrt{n_f^2 - N^2} + 2\Phi_{f,s} + 2\Phi_{f,c} = 2m\pi \qquad \text{(I-4)}$$

Les conditions de propagation sont différentes selon la polarisation TE ou TM et l'ordre du mode m. Le nombre de modes pouvant se propager dans un guide dépend de son épaisseur d_f. La figure I-9 représente l'épaisseur du guide normalisé (d_f/λ) en fonction de l'indice effectif N, pour les quatre premiers modes TE et TM. À chaque valeur de m correspond une courbe de la figure I-10 pour chacune des polarisations. Nous verrons dans la partie I-B-4-2-3 comment utiliser ces courbes pour optimiser les propriétés du guide d'ondes résonant.

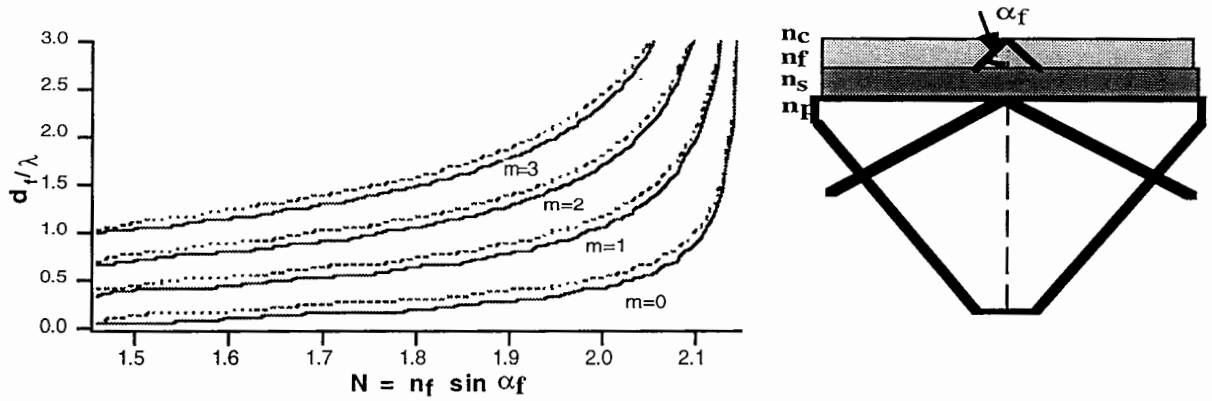


*Figure I-10: **À gauche**: Epaisseur du guide normalisé d_f/λ en fonction de l'indice effectif de réfraction pour les quatre premiers modes. Les modes TE sont en trait plein, les modes TM en pointillés. On a choisi n_c=1,333, n_f=2,15-j2,2.10^{-4}, n_s=1,46. **À droite**: Configuration d'utilisation du guide d'onde dans le cadre du miroir résonant.*

Dans les expériences que nous décrirons plus loin, l'excitation d'un mode guidé est obtenue par l'intermédiaire d'un prisme de couplage (Fig. I-10 droite). Le dispositif est exactement le même que dans le cas de la RPS. La couche d'or est remplacée par une structure bicouche déposée sur la base du prisme. Cette structure est composée d'une couche mince de silice, d'indice n_s=1,46 et d'une couche guidante d'oxyde de titane, d'indice n_f=2,15. L'onde incidente TE ou TM traverse le prisme et se réfléchit totalement sur la structure bicouche. En raison de la présence du prisme, l'onde guidée dans la couche d'oxyde de titane subit des pertes radiatives et s'amortit le long de l'interface sur une distance L_x. Dans le milieu extérieur d'indice n_c, une onde évanescente se propage sur l'interface et sonde le milieu extérieur sur une distance L_z.Les dimensions caractéristiques des longueurs de pénétration de l'onde évanescente dans le milieu extérieur et de propagation dans le guide sont respectivement $L_z=(\lambda/2n_f\pi)(N^2-n_c^2)^{-1/2}$ qui vaut 68,5 nm pour N=1.498 et $L_x=d_f.\tan(\alpha_f).\exp(2p_sd_s)/[\sin 2\phi_{f,s}.\sin 2\Phi_{f,c}]$ [43bis] qui vaut 15,4 microns. Les grandeurs d_s =700 nm et d_f =42 nm correspondent aux épaisseurs du milieu espaceur et du guide, p_s s'écrit $k_0 (N^2-n_s^2)^{1/2}$ et $\phi_{f,c}$ et $\phi_{f,s}$ aux demi déphasages entre le guide et le milieu extérieur et le guide et le milieu espaceur. Après avoir posé les bases du biocapteur et rappelé les principes optiques s'y attachant nous allons à présent détailler analytiquement la réflectivité des deux configurations optiques présentées, ainsi que leur sensibilité propre.

I-B-4-Analyse de la réflectivité et de la sensibilité des deux transducteurs

Nous allons nous livrer dans cette partie à l'étude analytique de la réponse des deux systèmes de transduction précédemment présentés en déterminant analytiquement les lois qui régissent leur réflectivité et en définissant leurs sensibilités propres. L'objectif de cette partie est de comparer les différentes sensibilités entre transducteurs métallique et diélectrique que nous avons développées.

I-B-4-1-Etude de la sensibilité de la Résonance des Plasmons de Surface (RPS)

B-4-1-1-Introduction

Le phénomène du plasmon de surface a été observé par Otto, puis Kretschmann, à l'aide des deux dispositifs légèrement différents, utilisant chacun un prisme de couplage. Nous avons choisi pour des raisons de commodité, d'utiliser la configuration de Kretschmann, où l'on dépose une couche mince métallique à même le prisme de couplage [44-45]. Ce phénomène avait une application en physique des surfaces afin de mesurer l'indice et l'épaisseur de couches d'or, d'argent ou de cuivre [46-47]. De par sa simple mise en œuvre et sa sensibilité, le phénomène des plasmons de surface a été appliqué à la détection de gaz, et dès le début des années quatre-vingt, à la reconnaissance d'interactions biologiques [48]. En 1991, le couplage de la lumière incidente par des réseaux est expérimenté comme alternative au couplage par prisme [49]; cette méthode consiste à exciter le plasmon à l'aide d'un réseau en mettant en œuvre une technologie d'optique intégrée. Ce système toutefois n'est pas plus sensible. D'autres méthodologies ont été utilisées telle l'interférométrie des polarisations TE et TM par réflexion, en apportant une amélioration de la sensibilité du dispositif en tant que réfractomètre, mais pas en termes de détection de la présence d'une monocouche biologique [50]. Toutefois, la plupart des travaux se sont concentrés sur l'utilisation de la configuration de Kretschmann beaucoup plus simple à utiliser. On a vu naître un grand nombre de capteurs biochimiques alliant la résonance des plasmons de surface à une chimie préparant la couche réceptrice biosensible [29, 51-52], dont certains plus spécifiques se sont restreints à la reconnaissance de macromolécules comme les protéines, pour déboucher sur une instrumentation commercialisée notamment par Pharmacia sous le nom de BIAcore et BIAcore 2000. Plusieurs auteurs se sont attachés à modéliser la RPS et à donner des lois décrivant avec succès sa sensibilité de détection vis-à-vis d'analytes adsorbés ou fixés sur le métal [53-56], nous allons reprendre en substance dans la section suivante la modélisation analytique de la résonance des plasmons de surface, en étudiant sa sensibilité en tant que biocapteur optique.

B-4-1-2-Analyse de la réflectivité dans le cadre de la RPS

Nous allons nous attacher dans cette section à établir la formule analytique de la réflectivité en utilisant l'expression de la constante de propagation k_{sp}. Nous étudierons ensuite la sensibilité de détection du dispositif en fonction de la grandeur à mesurer, c'est-à-dire, soit la variation d'indice dans le milieu extérieur, soit la fixation d'une couche biologique sur la surface.

Sachant que la permittivité ε_m est complexe on peut écrire I-2 en séparant la partie réelle de la partie imaginaire :

$$k_{sp} = k_x + j\Gamma^i \qquad \text{(I-5)}$$

avec k_x le vecteur d'onde à la résonance et Γ^i le terme de pertes intrinsèques dues à l'absorption de la lumière.

Afin de réaliser l'accord de phase entre le vecteur d'onde du faisceau incident polarisé TM et le vecteur d'onde associé à la propagation du plasmon de surface (cf. Fig. I-5), on utilise un prisme de couplage qui introduit un terme perturbatif à l'expression (I-5) que l'on peut exprimer :

$$k'_{x,sp} = \left(k_{x,sp} + \Delta k_{x,sp}\right) + j\left(\Gamma^i + \Gamma^r\right) \qquad \text{(I-6)}$$

où $k'_{x,sp}$ est le nouveau vecteur d'onde du plasmon en présence du prisme, $\Delta k_{x,sp}$ le terme perturbatif induit par le prisme et Γ^r le terme de pertes radiatives dues au couplage dans le prisme.

Au voisinage du minimum de réflectivité, on peut exprimer la réflectivité sous la forme [47] :

$$R = 1 - \frac{4\Gamma^i\Gamma^r}{\left(k_x - k'_{x,sp}\right)^2 + \left(\Gamma^i + \Gamma^r\right)^2} \qquad \text{(I-7)}$$

avec $k'_{x,sp} = k_{x,sp} + \Delta k_{x,sp}$ et k_x la composante longitudinale du vecteur d'onde incident. On peut encore exprimer R en fonction de l'indice effectif, $N=k_x/k_0=n_p\sin\alpha$ où n_p est l'indice du prisme et α est l'angle d'incidence interne. De la même façon en désignant $N_0= k'_{x,sp}/k_0$, l'expression I-7 devient :

$$R = 1 - \frac{4\Gamma^i\Gamma^r}{k_0^2\left(N - N_0\right)^2 + \left(\Gamma^i + \Gamma^r\right)^2} \qquad \text{(I-8)}$$

On vient ainsi de relier analytiquement la réflectivité du système avec l'indice effectif. On observe que, lorsque l'angle d'incidence est ajusté à l'angle de résonance, $N=N_0$, la réflectivité est minimale et sa valeur vaut $R_{min}=1-4\Gamma^i\Gamma^r/(\Gamma^i+\Gamma^r)^2$, laquelle vaut 0 quand $\Gamma^i=\Gamma^r$.

B-4-1-3-Analyse de la sensibilité de la RPS

Nous allons à présent déterminer la limite de sensibilité du dispositif au travers du calcul de la valeur limite des deux grandeurs mesurées simultanément, à savoir la variation limite d'indice de réfraction n_c et l'épaisseur d_f associées à la couche biologique. Nous allons utiliser la forme analytique de la réflectivité (I-8) ainsi que les paramètres du transducteur.

La seule grandeur physique mesurée par le capteur, à savoir l'intensité réfléchie, est reliée à la variation d'indice effectif par l'équation :

$$\Delta R = \left(\frac{dR}{dN}\right)\Delta N \qquad \text{(I-9)}$$

ΔN dépend des paramètres du système (indice et épaisseur). ΔR représente la variation de réflectivité du système (grandeur mesurée) et doit être maximisée.

On peut écrire (I-9) sous la forme :

$$\Delta R = \frac{dR}{dk_x} \times \frac{dk_x}{dN}\Delta N \qquad \text{(I-10)}$$

avec l'indice effectif $N = \frac{k_x}{k_0}$, et $\Delta N = \left(\frac{dN}{dd_f}\right)\Delta d_f + \left(\frac{dN}{dn_c}\right)\Delta n_c$, où n_c est l'indice du milieu extérieur et d_f l'épaisseur de la couche de molécules, on arrive à :

$$\Delta R = \frac{dR}{dk_x}\left[\left(\frac{dN}{dd_f}\right)\Delta d_f + \left(\frac{dN}{dn_c}\right)\Delta n_c\right].k_0 \qquad \text{(I-11)}$$

Cette dernière relation nous permet bien de convertir soit une variation d'indice du milieu extérieur, soit une variation d'épaisseur au voisinage de l'interface du transducteur en une grandeur mesurable.

Nous venons de voir que ΔN suit les variations de deux paramètres Δn_c et Δ_f, il en résulte, en termes de réflectivité, un décalage angulaire de l'ensemble du pic de réflectivité.

Expérimentalement, la mesure de ΔR ne permet pas de séparer les contributions en Δn_c et Δ_f, pondérées par les dérivées partielles dN/dn_c et dN/d_f respectivement. Ces deux derniers termes caractérisent la sensibilité liée à la variation d'indice effectif du transducteur d'une part envers la variation de l'épaisseur moléculaire et d'autre part envers la variation d'indice du

milieu extérieur. La dérivée partielle dR/dk_x de l'expression I-11 correspond à la sensibilité liée à la résonance qui sera développée dans les sections suivantes.

Nous allons traiter indépendamment les trois termes associés à la sensibilité de la RPS, puis nous dresserons un bilan dans la dernière partie de ce chapitre.

B-4-1-3-1-Sensibilité liée à la résonance de la RPS

Pour pouvoir suivre une cinétique de fixation de protéines dans les meilleures conditions et obtenir une valeur de ΔR la plus grande possible, il est nécessaire de se placer à angle fixe sur le flanc du pic de réflectivité, là où précisément la valeur $\partial R/\partial k_x$ est maximale. Sachant que $k_x=k_0 n_p \sin\alpha$, on a ici $\partial R/\partial k_x = \partial R/\partial\alpha \times \partial\alpha/\partial k_x = \partial R/\partial\alpha . k_0 n_p \cos\alpha$. La sensibilité liée à la résonance du système correspond à la dérivée de la réflectivité par rapport à l'angle d'incidence interne de la lumière. Nous donnons un exemple de sensibilité liée à la résonance (Fig. I-11), qui atteste de la possibilité de calculer la valeur maximisant cette sensibilité.

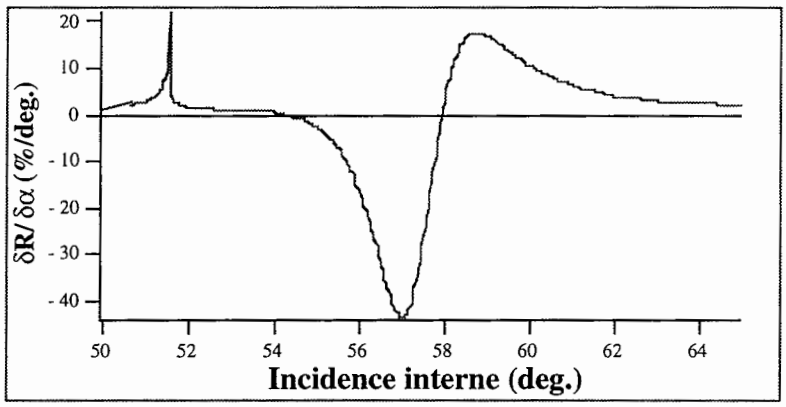


Figure I-11 : Dérivée de la réflectivité en fonction de l'angle interne à partir des courbes de la figure I-8 pour les paramètres suivants : n_c=1,333 , pour une couche d'or de 45nm, une permittivité -11,9 +j 1,3. On voit se dégager un optimum autour de 57° dont le calcul apparaît dans le paragraphe suivant.

Nous exprimons donc la variation de réflectivité ΔR en fonction de la composante longitudinale du vecteur d'onde incident comme : $\frac{dR}{dk_x}\Delta k_x$ où k_x est proportionnel à $\sin\alpha$ et non plus à α (angle interne). Afin de trouver le maximum de $\frac{dR}{dk_x}$ nous annulons la dérivée seconde $\frac{d^2R}{dk_x^2}$ à partir de l'expression I-7 pour trouver :

$$\left(\frac{dR}{dk_x}\right)_{MAX} = \frac{3\sqrt{3}}{2}\frac{\Gamma^i\Gamma^r}{\left(\Gamma^i+\Gamma^r\right)^3} \qquad \text{(I-12)}$$

pour

$$k_x - k'_{x,sp} = \pm \frac{\left(\Gamma^i + \Gamma^r\right)}{\sqrt{3}} \qquad \text{(I-13)}$$

L'étude de I-12 en Γ^r nous donne un optimum valant :

$$\Gamma^r = \frac{\Gamma^i}{2} \qquad \text{(I-14)}$$

La sensibilité liée à la résonance est maximale quand les pertes radiatives valent la moitié des pertes intrinsèques.

B-4-1-3-2-Détection limite de la variation d'indice d'une couche semi-infinie

En reportant I-14 dans I-12, on arrive à :

$$\left(\frac{dR}{dk_x}\right)_{MAX} = \frac{2\sqrt{3}}{9\Gamma^i} \qquad \text{(I-15)}$$

Sachant que la permittivité de l'or est complexe $\varepsilon_m = -\varepsilon_{mr} + j\varepsilon_{mi}$ avec $-\varepsilon_{mr} >> \varepsilon_{mi}$ et $-\varepsilon_{mr} >> \varepsilon_c$ nous allons rechercher une approximation de k_x et Γ^i en fonction des paramètres optiques. A partir de I-2 avec la notation I-5, il vient :

$$k_{sp} = k_0 n_c \left(1 + \frac{n_c^2}{-2\varepsilon_{mr}} - \frac{n_c^4}{2\varepsilon_{mr}^2} + i\frac{n_c^2 \varepsilon_{mi}}{2\varepsilon_{mr}^2}\right) \qquad \text{(I-16)}$$

Ce qui donne en égalisant les parties imaginaires des deux membres :

$$\Gamma^i = \frac{n_c^3 k_0 \varepsilon_{mi}}{2\varepsilon_{mr}^2} \qquad \text{(I-17)}$$

Si nous voulons déterminer précisément la limite de sensibilité de détection, il faut définir la précision sur la mesure effectuée. Introduisons alors un terme de bruit B correspondant à la réflectivité minimale détectable sous la forme B=puissance équivalente au bruit de détection/puissance optique du faisceau incident.

En substituant I-17 dans I-15 et en remarquant que la variation de réflectivité est la même pour une petite variation Δk_x ou $\Delta k'_{sp}$ à la résonance, il vient :

$$\lim\left\{\Delta k'_{x,sp}\right\} = \frac{9B}{4\sqrt{3}} \frac{n_c^3 k_0 \varepsilon_{mi}}{\varepsilon_{mr}^2} \qquad \text{(I-18)}$$

De l'expression I-16, on déduit qu'au premier ordre, $\frac{dk'_{sp}}{dn_c} = k_0$, donc le changement minimum d'indice détectable est donné par [14] :

$$\lim\{\Delta n_c\} = \frac{1,3Bn_c^3\varepsilon_{mi}}{\varepsilon_{mr}^2} \qquad \text{(I-19)}$$

Si par exemple on examine la variation d'indice à l'interface Or/milieu aqueux, en prenant une valeur de 0.001 pour B, de 1,333 pour n_c, et ε_m=-11,9+j1,3, on obtient une détection limite pour une variation d'indice de $2,8.10^{-5}$.

B-4-1-3-3-Détection limite de la couche adsorbée

Dans le cas beaucoup plus complexe où une couche diélectrique vient s'interposer entre le film métallique et le milieu extérieur, la sensibilité de détection de l'épaisseur $d_{f'}$ de la couche n'est accessible qu'en trouvant les solutions de propagation d'un mode TM dans un système à trois couches comme le montre la figure I-12 :

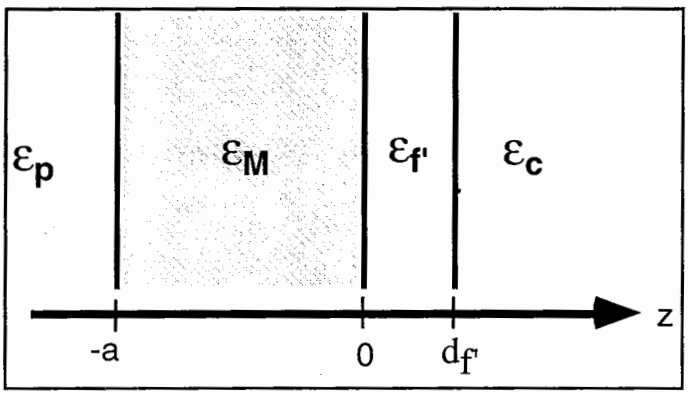


Figure I-12 : Configuration du système à trois couches. Les constantes diélectriques sont indexées de la façon suivante : p pour le prisme coupleur, m pour l'or, f' pour la couche moléculaire et c pour le milieu couvrant. a est l'épaisseur du métal et d_f celle de la couche biologique.

Les composantes du champ magnétique ont alors la forme suivante :

$$\begin{aligned} H_y= \quad & A\exp(ik_{zm}z) && z\leq 0 \\ H_y= \quad & B\exp(ik_{zf'}z)+C\exp(-ik_{zf'}z) && 0<z<d_{f'} \\ H_y= \quad & D\exp(ik_{zc}z) && z\geq d_{f'} \end{aligned} \qquad \text{(I-20)}$$

Avec les relations suivantes:

$$k_{zi}^2 + k_{xi}^2 = k_0^2\varepsilon_i \qquad \text{(I-21)}$$

avec i= m, f'

Ces expressions ont été simplifiées par $\exp(ik_x x-i\omega t)$, et leur résolution s'appuie sur la continuité aux interfaces des composantes du champ magnétique transverses H_y, et des composantes longitudinales du champ électrique E_x (proportionnel à $\partial H_y/\partial z$ par l'équation de Maxwell : $\overrightarrow{\mathrm{Rot}}\vec{H} = \mu_0 \vec{D}$) que l'on écrit :

$$\begin{aligned} E_x= \quad & \mu_0\varepsilon_m ik_{zm}A\exp(ik_{zm}z) && z\leq 0 \\ E_x= \quad & \mu_0\varepsilon_{f'} ik_{zf'}(B\exp(ik_{zf'}z)-C\exp(-ik_{zf'}z)) && 0<z<d_{f'} \\ E_x= \quad & \mu_0\varepsilon_c ik_{zc}D\exp(ik_{zc}z) && z\geq d_{f'} \end{aligned} \qquad \text{(I-22)}$$

En utilisant les conditions aux limites en $z=d_{f'}$ et $z=0$, on obtient quatre équations en A, B, C et D, que l'on peut simplifier si l'épaisseur de la couche superficielle est très petite vis-à-vis de la longueur d'onde. On peut ainsi écrire $\exp(ik_{zf'}d_{f'})=1+ik_{zf'}d_{f'}$. Après quelques manipulations, il vient :

$$\frac{k_{zm}\varepsilon_c}{k_{zc}\varepsilon_m} - 1 = id_{f'}k_{zf'}\left(\frac{k_{zm}\varepsilon_{f'}}{k_{zf'}\varepsilon_m} - \frac{k_{zf'}\varepsilon_c}{k_{zc}\varepsilon_{f'}}\right) = p \qquad \text{(I-23)}$$

Le deuxième membre p correspond à la perturbation provoquée par la présence de la couche superficielle sur un système à deux milieux. Si l'on fait tendre $d_{f'}$ vers 0, on retrouve l'expression I-2 relative à la constante de propagation du plasmon. En combinant (I-23) avec (I-18), on détermine la limite $d_{f'}$ de l'épaisseur détectable :

$$\lim\left\{d_{f'}\right\} = \frac{\lim\left\{dk'_{x,sp}\right\}}{\left(dk'_{x,sp}/dp\right)\left(dp/dd_{f'}\right)} \tag{I-24}$$

$\left(dk_{xr}^{m} / dp\right)$ se calcule à partir de (I-23) appliqué à k_x^m en utilisant (I-21). On arrive ainsi à :

$$\frac{dk'_{x,sp}}{dp} = \frac{\left(k'_{x,sp}/k_0\right)^3}{\varepsilon_{mr} - \varepsilon_c} k_0 = \frac{n_c^3 k_0}{\varepsilon_{mr}} \tag{I-25}$$

quand on utilise le premier terme de l'équation (I-16) et le fait que $|\varepsilon_{mr}| >> \varepsilon_c$. Calculons à présent la dérivée $dp / dd_{f'}$ en utilisant l'équation (I-22) :

$$\frac{dp}{dd_{f'}} = -2k_0\sqrt{|\varepsilon_{mr}|}\frac{\left(n_{f'} - n_c\right)}{n_c} \tag{I-26}$$

En combinant (I-18) avec (I-21 et 23), on arrive à l'expression rendant compte de la plus petite épaisseur moléculaire détectable :

$$\lim\left\{d_{f'}\right\} = 0{,}1\frac{\varepsilon_{mi}}{|\varepsilon_{mr}|^{3/2}}\frac{n_c}{n_{f'} - n_c}\lambda B \tag{I-27}$$

Prenons l'exemple d'une lame d'or de permittivité complexe ε_m=-11,9+j1,3, avec une différence d'indice entre la couche moléculaire et le milieu couvrant de 1,410-1,333=0,07, avec un changement limite de réflectivité B valant 0,001. On obtient alors une épaisseur détectable limite de 0,04 nm.

B-4-1-4-Conclusion

Nous venons d'analyser le comportement et la sensibilité de la résonance des plasmons de surface appliqués à la détection de l'adsorption d'une couche diélectrique ou de la variation d'indice du milieu extérieur. Les limites de détection ont été estimées à 0,04 nm et $2{,}8.10^{-5}$ respectivement. Outre la sensibilité, nous avons également posé les contraintes de l'utilisation de ce transducteur optique comme biocapteur. En effet, la méthode RPS se distingue par la polarisation TM de l'onde incidente, par le couplage du transducteur à un prisme et par une résolution latérale de 9 microns (distance nécessaire L_x pour que l'onde électromagnétique de surface puisse se propager). Ces caractéristiques profilent déjà la réalisation du biocapteur basé sur la RPS dont le détecteur sera une matrice CCD restituant l'image de la surface avec une

résolution précise. Cette méthode sera appelée Microscopie par Résonance des Plasmons de Surface (MRPS).

La section suivante traite du système de transduction optique alternatif lié au miroir résonant. Nous allons tirer de cette étude des valeurs qui nous permettront plus tard de comparer les deux transducteurs en termes d'utilisation et de sensibilité.

I-B-4-2-Étude de la sensibilité associée au miroir résonant

B-4-2-1-Principe

Le MR est un système résonant aussi bien pour la polarisation TE que TM et les angles de résonance ne sont pas les mêmes pour ces deux états de polarisations.

Ce dispositif comporte un prisme en verre d'indice élevé sur la base duquel est déposé un empilement de deux couches minces diélectriques. L'ensemble est mis en contact avec le milieu couvrant (solution biologique). Les indices de réfraction présentent la distribution suivante : $n_f > n_p > n_s > n_c$. Au-delà de l'angle d'incidence critique défini entre n_p et n_s, la réflectivité de ce système vaut 1, dans le cas de milieux sans pertes. Comme cela a été décrit dans la section I-B-3-2, l'onde transmise dans la couche guidante d'indice n_f se propage suivant une trajectoire en zigzag, subissant la réflexion totale sur le milieu couvrant et une réflexion totale frustrée (retour de la lumière vers le prisme) sur l'interface n_f/n_s, en raison de la présence du prisme. La couche d'indice élevé n_f joue le rôle de guide d'onde pouvant supporter un certain nombre de modes qui obéissent à l'équation caractéristique (expression I-28) :

$$\Psi(k_z) = 2k_z d_f + 2\Phi_{f,s,p} + 2\Phi_{f,c} = 2m\pi \qquad \text{(I-28)}$$

où $\phi_{f,s,p}$ est le demi-déphasage sur la couche $n_f/n_s/n_p$, tenant compte de la présence du prisme, $\phi_{f,c}$ est le demi-déphasage sur l'interface n_f/n_c et m est l'ordre du mode. Ce mode de propagation est excité pour un angle d'incidence déterminé à l'intérieur du prisme. Il est différent pour les polarisations TE et TM. L'apparition d'une couche superficielle ($n_{f'}$, $d_{f'}$) sur l'interface guide/milieu couvrant, va modifier le terme de phase $\phi_{f,c}$ en $\phi_{f,f',c}$. Le dernier terme sera développé plus loin. Comme nous l'avons déjà vu plus haut, l'expression I-28 dépend de l'état de polarisation TE ou TM. Dans le cas de films totalement transparents, le facteur de réflexion est égal à 1 quelle que soit la polarisation de l'onde incidente. Seule la phase est susceptible d'évoluer. C'est justement autour de l'angle d'incidence donnant lieu à la propagation guidée, que l'on observe une variation de phase de 2π (cf. Annexe I). Ainsi, le principe du miroir résonant consiste à réaliser l'interférence des ondes TE et TM détectée à l'aide d'un analyseur.

La réflexion totale à l'interface guide-milieu extérieur, donne naissance à une onde évanescente pouvant sonder le milieu couvrant et détecter la variation d'indice de réfraction au voisinage de l'interface (Fig I-13).

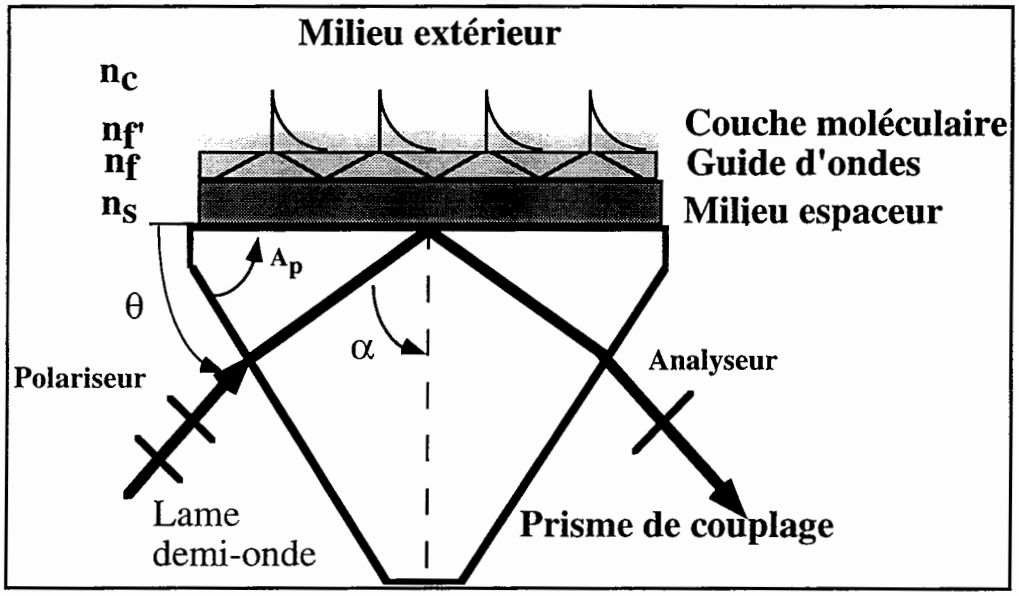


Figure I-13 : Schéma du miroir résonant. θ représente l'angle d'incidence externe, α l'angle interne et A_p, l'angle entre la face d'entrée du prisme et la base. La lumière issue d'un laser polarisé traverse le prisme avant de se réfléchir sur la structure multicouche. La lame demi-onde permet de fixer la polarisation de l'onde incidente et l'analyseur réalise l'interférence des composantes TE et TM réfléchies.

B-4-2-1-1-Influence de l'absorption sur la réflectivité

La présence de pertes même faibles à l'intérieur du guide induit des modifications sensibles au niveau de la réflectivité.

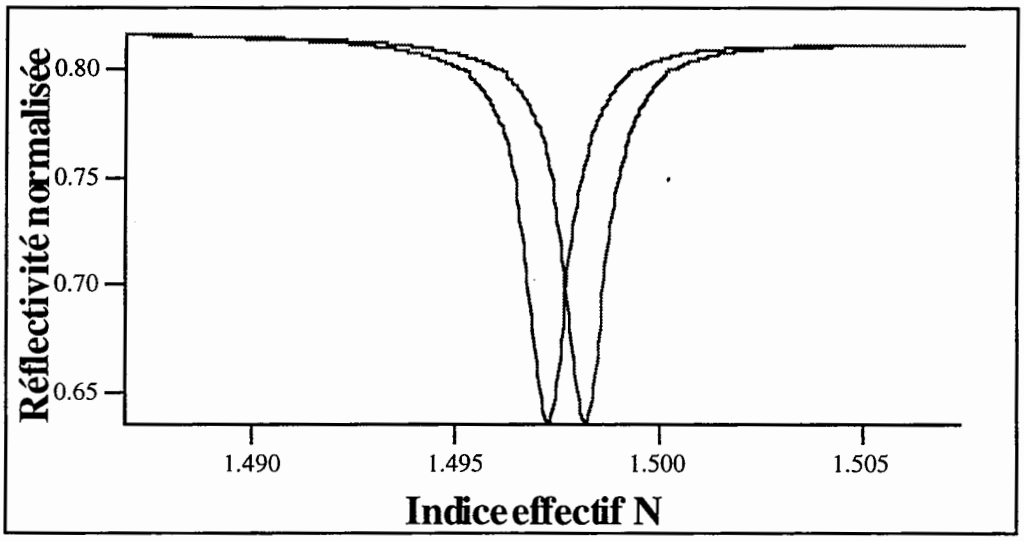


Figure I-14 : Réflectivité du MR liée au mode TE_0 en fonction de l'indice effectif pour un transducteur bicouche de 700 nm de silice SiO_2 d'indice 1,46 et d'une couche d'oxyde de titane de 42 nm d'indice 2,15-j2,2.10^{-4} couplé à un prisme d'indice 1,717 et un indice du milieu couvrant de 1,333. La courbe de droite correspond à la réponse sur TiO2 nu et celle de gauche, à la réponse après adsorption de 5 nm de protéines d'indice 1,41.

La figure I-14 montre la réflectivité en polarisation TE, mesurée sur un miroir résonant dont le film guidant présente des pertes. En l'absence de pertes, la réflectivité vaut 1. Les pertes ont été simulées d'un point de vue théorique par une valeur de l'indice imaginaire du guide d'onde de $2{,}2.10^{-4}$ afin d'ajuster le modèle théorique à la courbe expérimentale. On note sur la figure I-14 une chute de **20 %** de la réflectivité à l'angle de résonance. Il existe un phénomène analogue en polarisation TM, mais pour un angle de résonance différent. En présence de pertes, on exprime le facteur de réflexion en polarisation TE de la façon suivante (cf. Annexe I pour le détail du calcul) :

$$\left|r_{pc}\right|^2 = 1 - c\frac{1}{\left(\frac{(N - N_0)}{\delta N}\right)^2 + 1} \qquad \text{(I-29)}$$

Avec, c le facteur de couplage de la lumière dans le guide, δN, demi-largeur à mi-hauteur, N l'indice effectif et N_0, l'indice effectif à la résonance.

À ce stade de la présentation du principe du MR, il est intéressant de faire l'analogie avec la RPS (en polarisation TM), dont l'amplitude de la résonance est contrôlée uniquement par l'absorption importante du métal, tandis que pour le MR, en polarisation TE, l'absorption du guide est beaucoup plus faible. Il en résulte une dynamique de variation de réflectivité (liée à la variation d'indice effectif à la surface du transducteur) bien meilleure pour la RPS que pour le MR, quand celui-ci est utilisé en réflexion TE ou TM. Une autre voie d'utilisation du MR consiste à réaliser un interféromètre des composantes TE et TM autour de la position de résonance en polarisation TE. Il suffit de placer un analyseur réglé à 45° par rapport au plan d'incidence pour enregistrer le signal d'interférence après la traversée de l'analyseur (Fig. I-15).

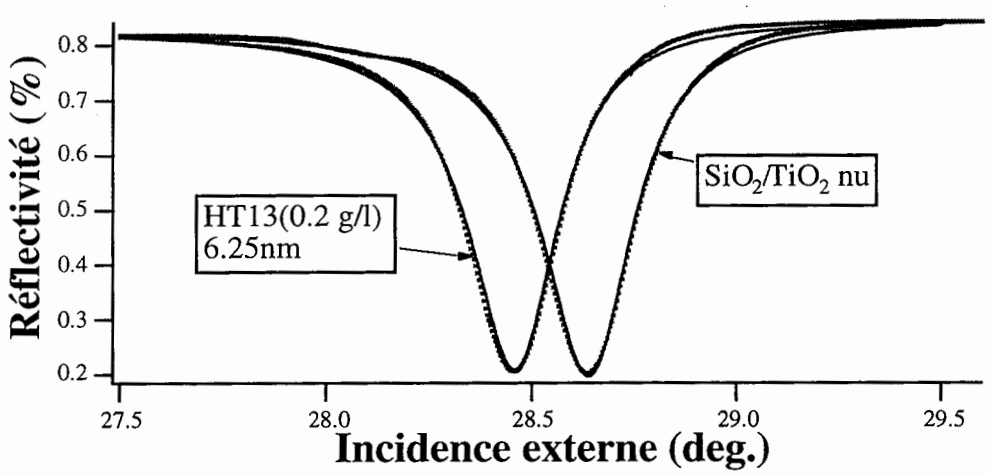


Figure I-15 Courbes de réflectivité associées à l'interférence TE/TM mesurées pour un indice n_c de 1,333 en fonction de l'angle externe. On représente les courbes expérimentales (en pointillés) et leur ajustement (en trait plein) avec (gauche) et sans (droite) couche moléculaire, d'épaisseur d_f (6,25 nm) et d'indice 1,41 modifiant les conditions de propagation de l'onde. Les paramètres du MR sont ceux de la figure I-14.

B-4-2-1-2-Influence du milieu espaceur

Nous allons à présent décrire l'influence des paramètres du MR sur la sensibilité du dispositif. Pour le milieu espaceur, on choisit un matériau transparent par exemple pour notre système, le SiO_2. Mais c'est l'épaisseur d_s de cette couche qui est vraiment importante car elle influe sur la largeur à mi-hauteur de la résonance et sur sa position comme le montre la figure I-16.

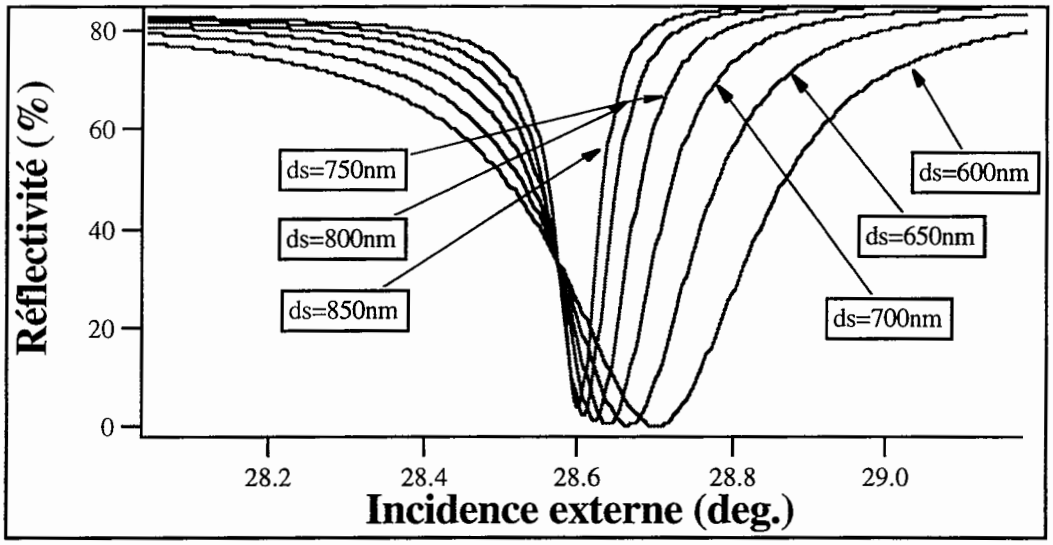


Figure I-16 : Réflectivité interférentielle pour différentes épaisseurs d_s du milieu espaceur. L'épaisseur de la couche guidante en TiO_2 de 42 nm. L'indice du prisme de couplage vaut 1,717.

On observe sur la figure I-16, que la largeur à mi-hauteur diminue lorsque l'épaisseur de SiO_2 augmente. De plus, l'épaisseur d_s modifie très sensiblement la pente du pic d'interférence en réduisant la largeur à mi-hauteur.

Pour la couche guidante, on choisit un matériau d'indice de réfraction élevé afin que le champ électrique à l'interface guide-milieu extérieur soit maximal, résultant d'un fort confinement. Nous avons choisi une couche guidante en TiO_2 d'indice réel 2,15 (à λ=633 nm) et d'indice imaginaire $-2{,}2.10^{-4}$ réalisant ainsi le compromis entre fort indice et faible absorption. L'épaisseur du guide quant à elle, détermine le nombre de modes pouvant se propager dans le guide. Afin de minimiser les pertes lors de la traversée du guide par l'onde lumineuse, on a tout intérêt à utiliser un guide possédant l'épaisseur la plus mince possible. Pour déterminer cette épaisseur, tout en optimisant la sensibilité du système, nous allons analyser plus loin les différents paramètres qui peuvent agir sur le MR.

B-4-2-2-Équation modale modifiée en présence d'une couche superficielle

Pour déterminer l'épaisseur optimale du guide, nous allons utiliser les courbes modales (cf. Fig. I-10). La sensibilité du MR n'est pas une grandeur simple à définir. En réalité, plusieurs paramètres interviennent dans la sensibilité du transducteur, comme d'ailleurs pour la méthode RPS. Ces différents termes apparaissent plus haut, dans l'expression I-11 :

Tout d'abord, dR/dk_x, la sensibilité liée à la résonance, puis la sensibilité liée à la variation de l'indice effectif dépendant des constituants du transducteur, relevant principalement de la variation d'indice du milieu extérieur dN/dn_c, et de l'apparition d'une couche superficielle dN/dd_f. Dans le cas où une couche moléculaire ($n_{f'}, d_{f'}$), est adsorbée ou fixée sur le capteur, le terme $\phi_{f,c}$ de l'équation (I-4) est remplacé par $\phi_{f,f',c}$. L'expression I-4 s'écrit maintenant sous la forme:

$$\Psi'(N) = \frac{4\pi}{\lambda} d_f \sqrt{n_f^2 - N^2} + 2\Phi_{f,s,p} + 2\Phi_{f,f',c} = 2m\pi \qquad \text{(I-30)}$$

où $\Phi_{f,f',c}$ caractérise le demi-déphasage à l'interface guide-couche moléculaire-milieu extérieur. Dans l'hypothèse où la couche moléculaire est très largement inférieure à la longueur d'onde, c'est-à-dire $d_{f'} << \lambda$ (condition toujours vérifiée avec les molécules que nous utilisons) on peut faire un développement limité de $\Phi_{f,f',c}$ et obtenir :

$$\Phi_{f,f',c} = \Phi_{f,c} + 2k\sqrt{n_f^2 - N^2}\left(\frac{n_{f'}^2 - n_c^2}{n_f^2 - n_c^2}\right)\left(\frac{(N/n_c)^2 + (N/n_{f'}) - 1}{(N/n_c)^2 + (N/n_f) - 1}\right)^{\rho} .d_{f'} \qquad \text{(I-31)}$$

où le paramètre ρ vaut 1 pour la polarisation TM et 0 pour la polarisation TE.

B-4-2-2-1-Détermination de l'épaisseur optimale du guide

Nous allons déterminer l'épaisseur optimale à partir de la réponse du MR vis-à-vis d'une variation Δn_c du milieu extérieur. En utilisant l'équation I-30 pour extraire N en fonction des différents paramètres et en dérivant par rapport à l'indice du milieu couvrant n_c, on obtient :

$$\left(\frac{\partial N}{\partial n_c}\right) = \frac{n_f^2 - N^2}{k_0 d_{eff}(n_f^2 - n_c^2)\sqrt{N^2 - n_c^2}}\left(\frac{(N/n_c)^2 + (N/n_{f'}) - 1}{(N/n_c)^2 + (N/n_f) - 1}\right)^{\rho} \qquad \text{(I-32)}$$

où ρ vaut 1 pour les modes TM et 0 pour les modes TE et $d_{eff} = d_f + \frac{1}{k_0 b_s} + \frac{1}{k_0 b_c}$ l'épaisseur effective du guide. À partir de I-30, le calcul de la dérivée de l'indice effectif N en fonction de l'épaisseur d_f conduit à :

$$\left(\frac{dN}{dd_f}\right) = \frac{\left(n_f^2 - N^2\right)\left(n_f^2 - n_c^2\right)}{n_c d_{eff}\left(n_f^2 - n_c^2\right)}\left(\frac{\left(N/n_c\right)^2 + \left(N/n_f\right) - 1}{\left(N/n_c\right)^2 + \left(N/n_f\right) - 1}\right)^{\rho} \qquad \text{(I-33)}$$

où ρ vaut 1 pour les modes TM et 0 pour les modes TE.

Les expressions I-32 et I-33 vont nous permettre de calculer l'épaisseur du guide maximisant les coefficients associés aux sensibilités par rapport à n_c et à d_f en traçant dN/dn_c et dN/dd_f en fonction de l'épaisseur du guide d_f. Une fois cette valeur connue, nous pourrons déterminer, grâce aux courbes de la figure I-10, la valeur de l'indice effectif (donc, l'angle d'incidence où la sensibilité est la meilleure) pour cette épaisseur optimale.

À partir de I-32, on trace les courbes de sensibilité en fonction de l'indice du milieu couvrant pour les quatre premiers modes TE et TM (Fig. I-17).

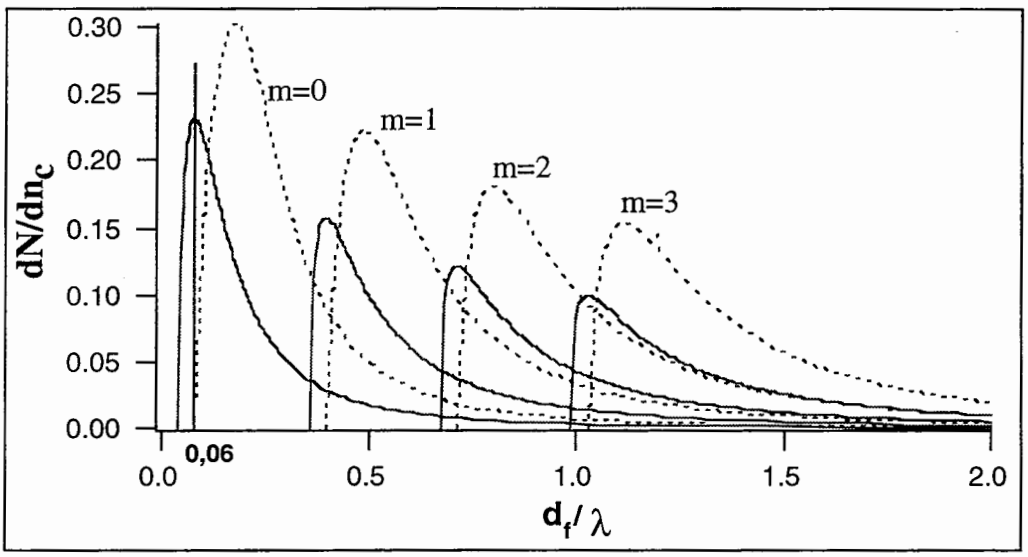


Figure I-17 : Dérivée de l'indice effectif N vis-à-vis de l'indice du milieu extérieur en fonction de l'épaisseur normalisée du guide pour les quatre premiers modes TE et TM. Les modes TE sont en traits pleins, les modes TM en pointillés. Les paramètres utilisés sont ceux de la figure I-14.

Le maximum de la dérivée partielle dN/dn_c optimisant la sensibilité envers la variation d'indice du milieu extérieur diminue avec l'ordre du mode. Pour un ordre donné m, le maximum en polarisation TM est toujours supérieur au mode TE. On relève la valeur de l'épaisseur normalisée correspondant au maximum de la dérivée partielle pour le mode TE_0, ce qui nous donne une épaisseur pour le guide de 42 nm pour une longueur d'onde dans le vide de 633 nm. À partir de l'expression I-33, on trace la fonction $\lambda dN/dd_f$ (Fig. I-18) en fonction de l'épaisseur du guide normalisée d_f/λ pour les quatre premiers modes TE et TM en choisissant un indice de réfraction $n_f = 1{,}41$ pour les protéines qui seront utilisées dans nos expériences.

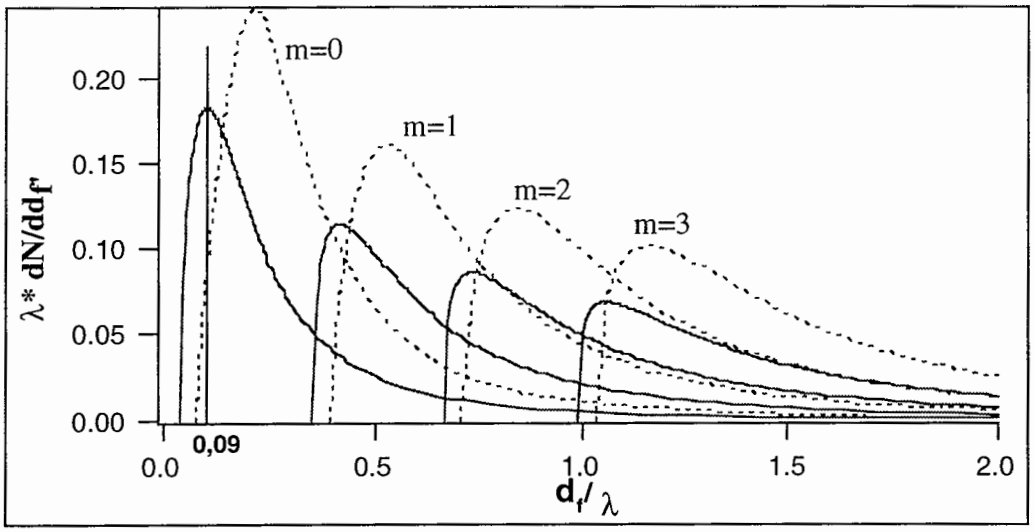


Figure I-18 : Représentation de la sensibilité pour la couche biologique multipliée par la longueur d'onde en fonction de l'épaisseur du guide normalisée, pour les quatre premiers modes TE et TM (respectivement : trait plein et pointillés).

On voit nettement sur la figure I-18 que la réponse du MR vis-à-vis de l'épaisseur de la couche n_f est maximale pour les modes TE_0 et TM_0. Ceci démontre comme précédemment qu'il faut choisir un guide monomode pour atteindre une sensibilité optimale et déterminer l'épaisseur correspondant au maximum de la fonction $\lambda dN/dd_f$. Pour déterminer l'épaisseur maximisant la sensibilité envers la couche moléculaire, nous relevons l'abscisse du maximum de dN/dd_f pour le mode TE_0, ce qui après multiplication par la longueur d'onde, donne directement l'épaisseur optimale du guide et qui correspond dans ce cas à 63 nm.

Les deux termes liés aux sensibilités du MR nous conduisent à deux valeurs assez proches pour l'épaisseur optimale. Nous allons choisir la plus faible des deux valeurs car, d'une part un guide plus mince limite les pertes lumineuses à sa traversée, et d'autre part, l'indice effectif correspondant à l'épaisseur de 42 nm (cf. Fig. I-10) vaut 1,498 est plus faible

que dans l'autre cas et assurera ainsi un plus grand confort d'utilisation du miroir résonant. En outre, la valeur de dN/dd_f pour N=1,498 représente plus de 90 % du maximum lorsque d_f passe de 63 à 42 nm. On reste donc très proche de l'optimum.

B-4-2-2-2-Détermination de l'épaisseur du milieu espaceur

Il est clair d'après la section précédente que, d'une part, l'optimisation de la sensibilité liée à la variation d'indice effectif repose principalement sur le choix des matériaux à utiliser pour réaliser le guide d'ondes résonant, notamment en termes d'indice de réfraction, et que d'autre part, l'optimisation de la sensibilité liée à la résonance s'appuie sur les épaisseurs des milieux espaceur et guidant, une fois choisis les matériaux les constituant.

La détermination de l'épaisseur optimale du guide en TiO_2 s'est faite à partir de la figure I-17, où nous avons relevé l'abscisse du maximum de la sensibilité du mode TE_0, nous donnant la valeur de 42 nm pour une longueur d'onde de 633 nm. Pour cette épaisseur seul le mode résonant TE_0 peut se propager. La deuxième étape consiste à déterminer l'épaisseur de SiO_2. Pour ce faire, nous traçons les simulations numériques associées au miroir résonant pour plusieurs épaisseurs du milieu espaceur (fig. I-19).

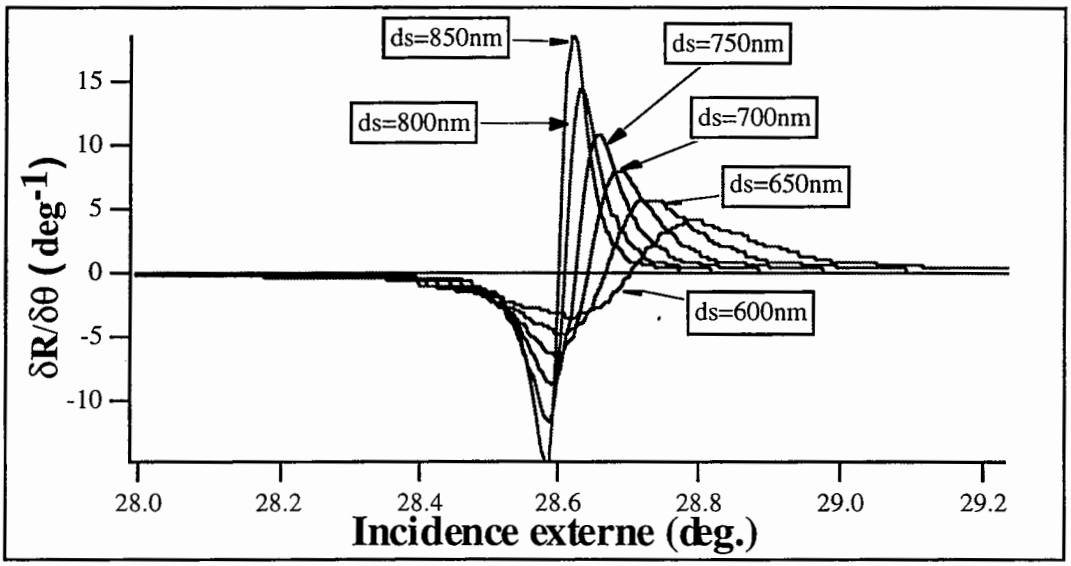


Figure I-19 : Représentation de la réflectivité différentielle en fonction de l'incidence externe pour différentes épaisseurs du milieu espaceur d_s en fixant l'épaisseur du guide à 42 nm, et l'indice n_c à 1,333.

La figure I-19 nous apporte deux renseignements d'importance : le maximum de la réflectivité différentielle (liée à la sensibilité liée à la résonance) croît avec l'épaisseur du milieu espaceur tandis que la position de la résonance se déplace vers des angles plus bas. En fait, comme le montre la figure I-19, la dynamique de la résonance du MR n'a pas encore atteint son

maximum quand d_s vaut 850 nm. La figure I-19 fait également le lien entre l'épaisseur du milieu espaceur et la largeur à mi-hauteur de la réflectivité qui doit être supérieure à la divergence du faisceau laser qui vaut 2 mrad (6 minutes d'arc). Cette limite est déjà atteinte quand d_s vaut 750 nm (cf. fig.I-16). Aussi avons-nous opté pour une épaisseur du milieu espaceur de 700 nm, nous assurant ainsi une marge de manœuvre pour que la divergence du faisceau laser n'affecte pas nos mesures.

B-4-2-2-3-Calcul de la sensibilité liée à la résonance

À l'instar de la méthode RPS, la sensibilité liée à la résonance du MR peut être définie comme le rapport dR/dk_x (ou comme dR/dN). La position angulaire du minimum de réflectivité dépend principalement de l'épaisseur du milieu espaceur. Une fois l'épaisseur fixée, on peut évaluer l'amplitude de la variation de réflectivité engendrée par une couche superficielle en formation sur la surface du transducteur. Or, l'amplitude de la variation de réflectivité, ne dépend que de la largeur à mi-hauteur (une fois les autres paramètres fixés) comme le montrent les exemples de la figure I-20.

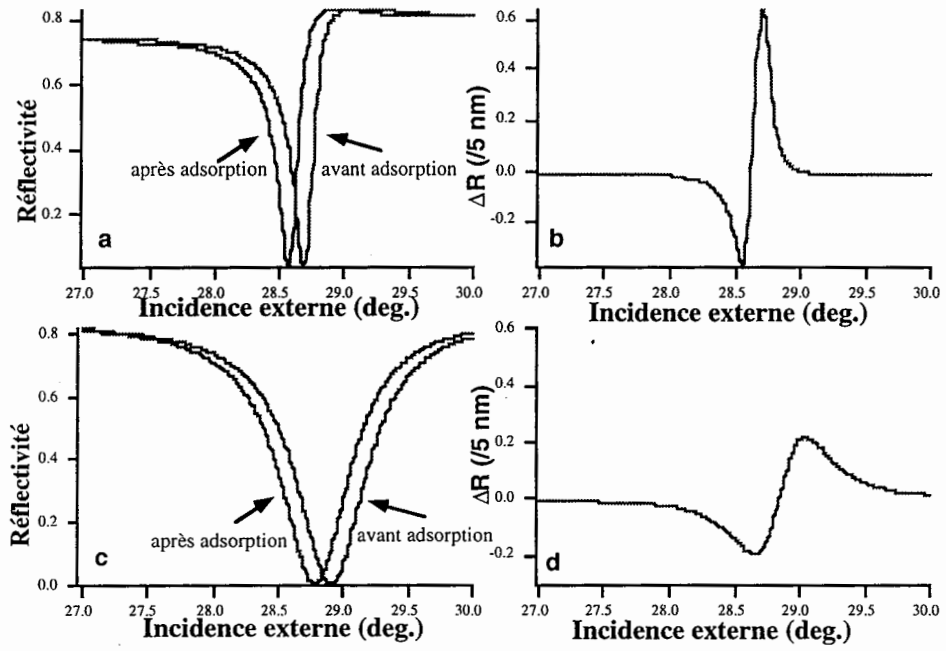


Figure I-20 : Simulations numériques associées à la fixation d'une épaisseur moléculaire de 5 nm d'indice 1,41 apparaissant à la surface du transducteur (a et c) pour deux épaisseurs du milieu espaceur différentes (700 nm pour a et 500 nm pour c). En vis-à-vis, représentation de la variation de réflectivité ΔR; elle atteint 60 % dans le cas a (b) et seulement 20 % dans le cas c (d). Les paramètres optiques choisis sont ceux de la fig. I-19.

En relevant la valeur maximisant dR/dθ dans le figure I-19 pour une épaisseur du milieu espaceur de 700 nm, on trouve un maximum de 7,85, or dR/dN= dR/dθ x dθ/dα x dα/dN, on obtient alors :

$$\left(\frac{dR}{dN}\right)_{MAX} = 960 \text{ pour } N=1,498. \qquad \text{(I-34)}$$

On a calculé dθ/dα à partir de l'expression convertissant les angles internes en angles externes de la page 23, et dα/dN en utilisant le fait que $N=n_p \sin\alpha$.
On remarque que la valeur N de l'indice effectif optimisant dR/dN est la même que celle maximisant la sensibilité liée à la variation d'indice du milieu couvrant. On est donc dans une configuration où la grandeur ΔR mesurée est maximale.

Considérons à présent la limite de résolution B de la réflectivité. On impose ainsi la limite de variation du vecteur d'onde dN que l'on écrit :

$$\lim\{dN\} = \frac{B}{960} \qquad \text{(I-35)}$$

B-4-2-2-4-Calcul de la sensibilité liée à la variation d'indice du milieu couvrant

On peut désormais déterminer la limite de détection de variation d'indice du milieu couvrant en polarisation TE, en reliant I-32 à I-35 :

$$\lim\{\partial n_c\} = \frac{B}{960} \frac{k_0 d_{eff}(n_f^2 - n_c^2)\sqrt{N^2 - n_c^2}}{n_f^2 - N^2} \qquad \text{(I-36)}$$

B-4-2-2-5-Limite de détection de la couche biologique

En reliant I-33 à I-35, on obtient une expression pour l'épaisseur moléculaire limite détectable lors d'une polarisation TE :

$$\lim\{d_{f'}\} = \frac{B}{960} \frac{n_c d_{eff}\left(n_f^2 - n_c^2\right)}{\left(n_f^2 - N^2\right)\left(n_{f'}^2 - n_c^2\right)} \qquad \text{(I-37)}$$

En faisant l'application numérique avec les paramètres de la figure I-14, nous arrivons à une valeur détectable limite de la variation d'indice du milieu couvrant de $1,9.10^{-6}$ et une épaisseur limite détectable de 0,002 nm pour des épaisseurs de 700 nm pour le milieu espaceur et 42 nm pour le guide, avec des indices respectifs de 1,46 - $j10^{-6}$ et 2,15 - $j2,2.10^{-4}$ et une limite de détection B de 0,001. Nous nous sommes limités à l'étude d'un guide monomode, c'est-à-dire en imposant m=0 dans l'équation I-30.

B-4-2-3-Conclusion

Nous venons de voir que la configuration du miroir résonant possède plusieurs paramètres ajustables suivant le cahier des charges établi. Parmi ces paramètres, le déphasage total du champ électromagnétique à la résonance nous conduit à utiliser le MR dans un montage interférométrique. Les autres paramètres nous ont permis de dégager et de quantifier les sensibilités spécifiques de ce transducteur. Nous allons à présent nous livrer à une étude comparative de la cavité résonante vis-à-vis de la méthode de la Résonance des Plasmons de Surface en termes de sensibilité liée à la résonance et à la variation d'indice effectif afin de sélectionner le meilleur candidat à la transduction optique menant à la reconnaissance moléculaire.

I-B-4-3-Conclusion de l'étude théorique

De par l'étude théorique réalisée sur les transducteurs métalliques (RPS) et diélectriques (MR), on peut mettre en exergue un certain nombre de points communs et de différences. Nous allons résumer les points communs des deux techniques et préciser numériquement leurs différences. Nous aurons alors une vue d'ensemble nous permettant d'établir quel système est le plus sensible.

B-4-3-1-Comparaison des deux transducteurs

Suite à l'étude des sensibilités des deux systèmes de transduction de la partie I-B, nous sommes en mesure de les comparer suivant leur mode d'utilisation. La grande différence existant entre la méthode RPS et le MR est relative au fait que la sensibilité liée à la résonance du MR est optimisable contrairement à celle des plasmons de surface.

B-4-3-1-1-Points communs

Les deux systèmes de transduction abordés dans ce chapitre procèdent tous les deux de l'analyse en réflexion de la variation d'indice à la surface du transducteur. L'étude théorique a montré que leur réponse est représentable par une lorentzienne dont nous avons identifié tous les paramètres et à partir desquels il a été possible de définir pour chacun des transducteurs deux types de sensibilité [65-66]. Ces deux systèmes ont aussi en commun leur propre utilisation qui consiste à mesurer le déplacement du pic relatif à leur réponse lors d'une variation d'indice du milieu extérieur ou lors de la formation d'une couche moléculaire. On peut en conséquence les utiliser soit, pour mesurer un décalage angulaire lié au changement de conditions de la propagation optique ou bien à angle fixe, pour suivre en temps réel l'évolution de la réflectivité lors de l'adsorption d'une couche mince à la surface du transducteur.

B-4-3-1-2-Principales différences

Le fait que la sensibilité liée à la résonance soit ajustable et optimisable dans le cas du MR sous-entend que pour une configuration donnée, on peut s'attendre à rendre le MR plus sensible que le système utilisant les plasmons de surface. Nous rendons compte dans cette section des valeurs qu'atteignent d'une part les sensibilités liées à la résonance des deux transducteurs, et d'autre part les valeurs des sensibilités liées à la variation d'indice effectif. Nous conclurons sur la sensibilité, en introduisant la notion de plus faible variation d'indice effectif détectable, qui nous donnera une indication sur les propriétés de détection des deux systèmes.

Pour les deux transducteurs, la sensibilité liée à la résonance s'exprime sous la forme dR/dN qui traduit la variation de réflectivité engendrée, soit par une variation de l'indice du milieu extérieur, soit par la formation d'une couche moléculaire sur l'interface. Pour les deux systèmes, toute modification interfaciale induit un déplacement angulaire du pic de réflectivité aussi bien pour la RPS que pour le MR. Ce décalage angulaire induit est d'autant plus fort que le mode se propageant est bien confiné à l'interface métal-milieu extérieur. C'est la raison pour laquelle le décalage angulaire est plus fort d'un facteur cinq pour le plasmon (or) que pour le MR (TiO_2) pour un même effet [66]. On arrive alors à un décalage de 0,1 degrés par nanomètre de molécules fixées pour la RPS, avec un prisme d'indice 1,717 et 0,02 degrés par nanomètre, pour le MR.

La variation de réflectivité, quant à elle, est une constante pour la RPS et vaut 2 %/nm (en réflectivité normalisée). Dans le cas du MR et en utilisant les résultats précédents optimisant sa sensibilité globale, nous arrivons à une variation de réflectivité de 16 %/nm. Cette dernière valeur pourrait être bien supérieure si nous pouvions diminuer encore la largeur à mi-hauteur de la résonance, mais la condition que cette dernière soit supérieure à la divergence du faisceau laser nous l'interdit.

B-4-3-2-Conclusion

La première remarque que l'on peut faire est la suivante : la résonance des plasmons de surface est l'un des systèmes les plus sensibles utilisés pour la transduction optique adaptée à la reconnaissance moléculaire. La configuration alternative du miroir résonant, pour être compétitive doit présenter des avantages en matière de sensibilité. La distinction faite dans ce chapitre entre les différentes sensibilités avait pour but de mettre en avant les propriétés du MR par rapport à la RPS. Le tableau I-b résume l'étude qui a été faite en rappelant les valeurs limites de la détection de la variation d'indice du milieu couvrant (pour un dispositif utilisé comme réfractomètre), la détection limite de l'épaisseur de la couche biologique à analyser et les valeurs comparatives entre le MR et la RPS suivant le mode d'interrogation effectué (interrogation en réflectivité ou angulaire).

Transducteur	interrogation en réflectivitié (%/nm)	Interrogation angulaire (deg/nm)	limite de variation d'indice du milieu couvrant	limite de détection de l'épaisseur biologique(nm)
RPS	2	0,1	$2{,}8.10^{-5}$	0,04
MR	16	0,02	$1{,}9.10^{-6}$	0,002

Tableau I-b : Bilan numérique des sensibilités du MR et de la RPS.

On voit que théoriquement le MR possède une meilleure sensibilité que la RPS, s'il est utilisé en interrogation en réflectivité (cinétique) pour des couches biologiques. Dans l'autre cas d'utilisation (interrogation angulaire), la résonance des plasmons de surface est plus sensible. Toutefois, la limite de détection pour la RPS est inférieure d'un facteur quatre à celle du miroir résonant, ce qui signifie que le miroir résonant est capable de détecter de plus faibles quantités de matière à sa surface, et qu'à quantité de matière égale au voisinage des deux types de transducteurs, le MR donnera un signal plus important. En somme, le MR est un dispositif plus sensible que la RPS.

Nous allons maintenant nous tourner vers la mise en œuvre expérimentale du biocapteur optique en décrivant le mode opératoire pour les différents transducteurs, aussi bien en termes d'interrogation angulaire (courbes de réflectivité en fonction de l'angle d'incidence, qu'en termes d'interrogation en réflectivité (cinétique d'interaction). Nous ferons alors entrer en compte les incertitudes sur les mesures et nous rappellerons les modèles nous y faisant parvenir.

I-C-Modes opératoires expérimentaux et méthodes de quantification

Après avoir analysé précédemment les deux transducteurs développés du point de vue théorique, nous allons aborder dans cette partie, d'une part le mode opératoire relatif aux expériences menées avec les différents biocapteurs étudiés à savoir : la résonance des plasmons de surface (RPS), la microscopie par résonance des plasmons de surface (MRPS), et le miroir résonant (MR) et d'autre part, les procédés de quantification utilisés à partir des cinétiques de fixation ou des courbes de réflectivité. Nous traiterons également de la quantification d'interactions moléculaires à partir d'une succession d'images dans le cas de la MRPS. Nous en tirerons la précision de nos mesures.

I-C-1- Introduction aux dispositifs expérimentaux

Nous décrivons dans cette section le mode opératoire suivi dans le réglage et la mise au point de biocapteurs optiques, c'est-à-dire, la Résonance des Plasmons de Surface, la Microscopie par Résonance des Plasmons de Surface et le Miroir Résonant. Les configurations MR et RPS permettent de mesurer soit la variation angulaire du minimum de réflectivité $\Delta\theta$, ou bien la variation de réflectivité ΔR, tandis que la MRPS ne donne accès qu'à cette deuxième grandeur. Il s'agira pour ces trois configurations d'établir un protocole strict afin de réaliser toutes les expériences dans les mêmes conditions opératoires. Nous disposons de deux bancs expérimentaux sur lesquels sont disposés les différents éléments du biocapteur. Le premier banc est utilisé pour les expériences de reconnaissance biologique basées sur les méthodes de la RPS et du MR. Le deuxième banc sert à la microscopie par résonance des plasmons de surface, montage qui ne diffère du précédent que dans le système de détection et la source utilisée. En effet, dans le deuxième cas, on substitue à la photodiode un système imageur constitué d'une lentille convergente faisant l'image de la surface du capteur sur une caméra CCD (cf. Fig. I-21) et le laser hélium-néon est remplacé par une diode électroluminescente, évitant les problèmes de speckle et d'interférences liés à la cohérence du laser.

Nous détaillons dans un premier temps les réglages communs à toutes les configurations, pour expliciter dans un second temps leurs différences propres.

I-C-1-1-Principe du montage

Les éléments sensibles du capteur, les transducteurs, se présentent tous sous la forme d'un substrat en verre d'indice 1,717 de 2,5 X 2,5 cm^2 sur lequel ont été déposées soit des couches minces chrome-or pour la RPS et la microscopie à effet plasmon, soit des couches minces SiO_2-TiO_2 pour le MR. La première opération consiste à placer cette lame au contact de la surface d'un prisme de verre à section équilatérale via une huile à adaptation d'indice, formant ainsi un bloc uniforme en termes d'indice.

Le prisme est placé sur une platine rotative munie de trois mouvements lents en X, en Y et en Z et un mouvement permettant d'ajuster le plan sur lequel est placé le prisme (cf. Fig.I-21).

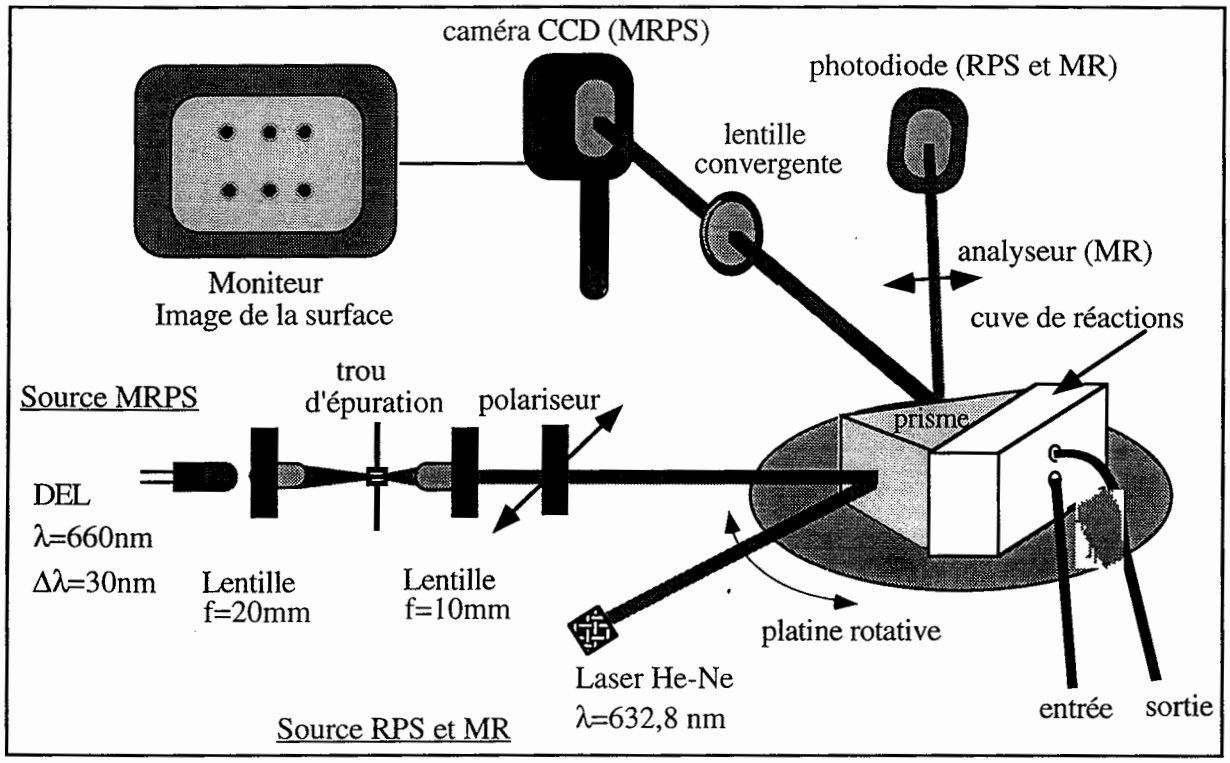


Figure I-21 : Schéma du montage expérimental. Il est à noter que le montage présenté est valable pour tous les transducteurs. Si l'on veut l'utiliser comme simple montage RPS, on substitue la DEL par un laser hélium-néon, le détecteur par une photodiode, et on retire la lentille convergente. Pour l'utiliser avec la méthode du MR, on lui ajoute un analyseur devant la photodiode afin de collecter le signal d'interférence.

L'étape suivante consiste à régler la planéité de la platine et à déterminer au centième de degré la position angulaire de référence de la platine. Avant de commencer une expérience, on place le détecteur devant le faisceau incident, afin d'enregistrer la valeur de son intensité. Cette valeur constituera la référence en intensité tout au long de l'expérience, c'est-à-dire que chaque

valeur issue de la photodiode sera divisée par cette référence pour normaliser la réflectivité de chaque capteur en fonction du temps ou de l'incidence externe au prisme. Dans le cas de la MRPS, la valeur de référence de l'intensité incidente est mesurée sur la caméra CCD.

La toute dernière étape de réglage pour le MR et la RPS, et certainement la plus fine, consiste à superposer l'impact du faisceau incident sur le transducteur avec le centre de rotation de la platine. Pour ce faire, on règle sur les mouvements lents en X et en Y, pour que le point d'impact, c'est-à-dire le spot d'analyse (diamètre d'environ 200 microns) bouge le moins possible durant la course angulaire imposée (la tolérance est de quelques dizaines de microns).

Dans le cas de la MRPS, nous ne faisons pas d'analyse en fonction de l'angle d'incidence, mais en fonction du temps (cinétique). Toute la surface du transducteur est imagée sur une caméra CCD, on suit alors l'évolution du contraste des capteurs en fonction du temps via l'enregistrement d'une succession d'images. Ce contraste est proportionnel à la variation de réflectivité, elle-même liée au nombre de molécules ayant interagi par unité de surface. Le réglage de la zone à analyser s'effectue directement sur le moniteur relié à la caméra CCD.

I-C-1-2-Particularités propres aux configurations

La nature même des différentes configurations leur impose des particularités dans leur protocole d'utilisation, notamment en ce qui concerne la source, la polarisation ou bien le mode de détection du signal. Nous donnons dans cette partie le mode opératoire propre à chaque système optique, indispensable à la bonne marche des expériences. La particularité de la résonance des plasmons de surface est d'avoir lieu uniquement en polarisation Transverse Magnétique (TM). Nous réglerons donc le polariseur de façon à sélectionner cette composante. La diode électroluminescente (luminance= 600 mCa, Ca pour Candéla) employée comme source dans le montage imageur possède un spectre d'émission centré à 660 nm avec une largeur spectrale de 40 nm. Comme cette source n'est pas collimatée, nous épurons le faisceau à l'aide d'un montage optique permettant d'une part de collimater la source et d'autre part de sélectionner une partie homogène de la lumière incidente. Cette lumière est ensuite réfléchie par le prisme puis traverse une lentille convergente de 40 mm de focale dont le rôle est de former sur la caméra CCD l'image de la surface du prisme. À l'aide des molettes et des mouvements lents de la platine, on choisit la zone à observer durant l'expérience.

À la différence de la RPS, la configuration MR procède de l'interférence des deux composantes de polarisation de la lumière. Le polariseur sera réglé à 45 degrés du plan d'incidence pour pouvoir disposer des composantes TE et TM d'égales amplitudes. Afin de collecter l'interférence des deux composantes, on place un analyseur devant la photodiode, réglé pour être parallèle au polariseur d'entrée. Nous dressons un bilan récapitulatif du mode opératoire des différentes configurations dans le tableau I-c.

méthode	polarisation	phénomène détecté	transducteur	détecteur	grandeur mesurée	source lumineuse
RPS	TM	résonance des plasmons de surface	Film d'or	photo-diode	$\Delta\theta$ ΔR	laser He-Ne 633 nm
MRPS	TM	idem	Film d'or	caméra CCD	ΔR en tout point	LED 660nm
MR	TE+TM	inter-férences TE/TM	bicouche SiO2-TiO2	photo-diode	$\Delta\theta$ ΔR	laser He-Ne 633 nm

Tableau I-c : Bilan des différents modes opératoires liés aux transducteurs.

I-C-2-Méthodes d'analyses quantitatives

La quantification des énergies d'interactions moléculaires consiste à modéliser les molécules fixées sur la surface comme l'équivalent d'une couche compacte homogène représentée par son indice n_f et son épaisseur d_f. Ce modèle, même s'il ne correspond pas à la réalité, donne des valeurs très précises compte tenu de l'aspect statistique de la mesure, puisque le nombre de molécules interagissant lors de nos expériences est de l'ordre de 10^9-10^{11}/mm^2, soit de l'ordre de la picomole/mm^2 (de 0,15 à 15 pmole/mm^2). Les méthodes utilisées ne peuvent mesurer simultanément n_f et d_f. Nous avons choisi une valeur de n_f dans la littérature (1,41) pour mesurer l'épaisseur de la couche biologique.

Les courbes enregistrées durant nos expériences sont de deux types : nous enregistrons d'abord la réflectivité de l'interface en fonction de l'angle d'incidence externe, afin de mesurer précisément la position angulaire de résonance (RPS et MR), puis nous enregistrons les courbes de réflectivité en fonction du temps en nous plaçant à angle fixe sur le flanc droit du pic plasmon (position où $dR/d\theta$ est maximale). Ces courbes rendent compte des cinétiques d'interactions moléculaires en temps réel. Nous allons développer les méthodes de quantification qui, appliquées à ces courbes, nous donnent accès dans un premier temps à l'épaisseur optique de la couche compacte équivalente de biomolécules à la surface du capteur, et dans un deuxième temps, aux constantes d'association et de dissociation caractéristiques d'un type d'interaction. Enfin, nous prendrons un soin particulier à détailler le protocole de quantification lié à la microscopie à effet plasmon.

I-C-2-1-Quantification à partir des courbes de réflectivité

Les courbes mesurant directement la réflectivité en fonction de l'angle externe ou du temps sont toutes obtenues à l'aide d'un logiciel d'automatisation et d'instrumentation (Labview, National Instruments). Il permet de suivre à l'écran l'évolution d'un signal tout en pilotant les moteurs de rotation de la platine et de la photodiode. L'analyse de ces courbes est justifiée par la recherche des propriétés physiques de nos transducteurs, afin de connaître précisément l'état initial du biocapteur. Les méthodes d'ajustement que nous utilisons s'appuient sur un support théorique que nous allons expliciter notamment dans le cadre des cinétiques d'interactions.

C-2-1-1-Détermination des paramètres optiques

Comme nous l'avons vu dans l'approche théorique de la transduction optique (cf. I-B-4-1 et 2), les résonances, qu'elles soient liées à la RPS ou au MR ont un profil de type lorentzien, caractérisé par sa position de résonance, sa largeur à mi-hauteur, ainsi que par son amplitude. Toutes ces grandeurs sont intimement liées aux paramètres physiques et optiques des films minces constituant l'interface (indices et épaisseur) de Cr et d'Au pour la RPS, ou bien de SiO_2 et de TiO_2 pour le MR. Les valeurs de ces paramètres nous amènent directement à la connaissance de l'état initial du biocapteur. Nous nous intéressons à présent à l'influence de ces divers paramètres sur les courbes de réflectivité en fonction de l'angle externe.

C-2-1-1-1-Caractérisation du dispositif optique de la RPS

Les paramètres optiques sont obtenus par l'ajustement de courbes expérimentales de réflectivité avec le modèle théorique qui fait appel aux coefficients de réflexion de Fresnel. Nous présentons dans le tableau I-d les coefficients ajustés des indices réel et imaginaire des différents milieux à caractériser ainsi que leur épaisseur, en reprenant l'exemple de la figure I-22.

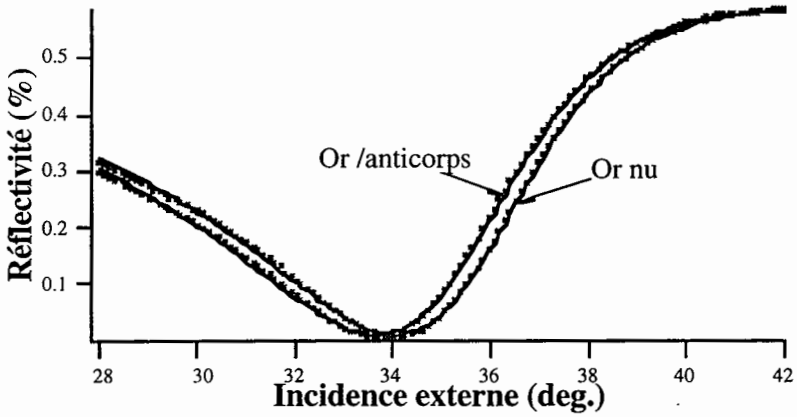


Figure I-22 : Courbes expérimentales (pointillés) et ajustées (traits pleins) du capteur RPS avant et après adsorption d'une couche d'anticorps.

milieu	indice réel	indice imaginaire	épaisseur (nm)
chrome	3,28	-2,6	4,43
or	0,16	-3,52	43,1
protéines	1,41	0	2,39

Tableau I-d : Coefficients d'ajustement pour des courbes de la fig. I-24. On ajuste d'abord la courbe de réflectivité du capteur nu, puis ensuite seuls les paramètres de la couche adsorbée restent à déterminer.

Les valeurs des indices du chrome, du prisme utilisé (n=1.717, angle au sommet=60° et du milieu extérieur (1,333 pour le tampon PBS) seront fixes au départ. Nos calculs porteront dans un premier temps sur l'indice de l'or et les épaisseurs de chrome et d'or afin de déterminer l'état initial du capteur puis, dans un deuxième temps de la couche moléculaire. L'indice complexe de l'or va jouer un rôle sur le profil du pic de réflectivité, car sa partie réelle va influer sur sa largeur à mi-hauteur. Suivant les dépôts sous vide, l'indice de l'or est compris entre 0,18 et 0,21. L'indice imaginaire impose la position angulaire de la résonance, et est donc soumis à l'état de surface du transducteur (cf. Annexe III). L'apparition d'une couche diélectrique au voisinage du substrat d'or entraîne un déplacement latéral de l'ensemble du pic et l'ajustement ne portera que sur son épaisseur, pour un indice préalablement fixé.

C-2-1-1-2- Caractérisation du dispositif optique du MR

Le programme d'ajustement du MR reprend celui de la RPS, mais fait interférer les composantes TE et TM, sachant qu'il y a un déphasage de 2π autour de la résonance sur l'une des composantes. L'interférence est matérialisée par un signal de réflectivité de type lorentzien dont la largeur à mi-hauteur est entièrement contrôlée par l'épaisseur du SiO_2 (nous avons vérifié à partir de nos enregistrements, que les valeurs d'indice réel indiquées par le constructeur correspondaient à l'ajustement optimal). Il est à noter que des variations de l'épaisseur de la silice (SiO2) entraînent également un déplacement angulaire de la résonance. Mais ce déplacement est toujours faible vis-à-vis de celui lié à l'épaisseur du guide, qui, d'une part, impose le nombre de modes pouvant se propager et, d'autre part, marque de façon prépondérante la position angulaire de résonance.

Nous présentons dans la figure I-23 un exemple de courbes expérimentales ainsi que leur ajustement avant et après l'adsorption d'anticorps. La structure du tableau I-e est similaire à celle du tableau I-d, mais le rôle des paramètres est différent. L'indice du prisme est le même que précédemment et vaut 1,717.

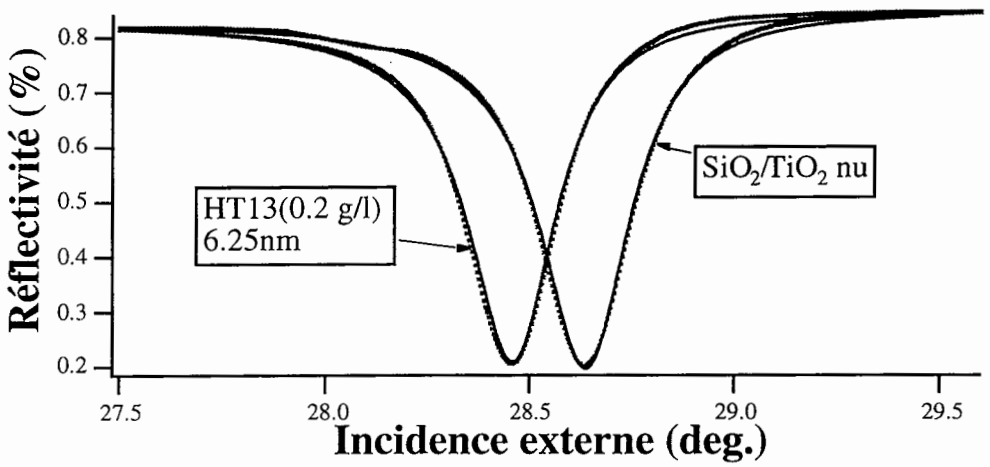


Figure I-23: Courbes expérimentales (pointillés) et ajustée d'un capteur basé sur le dispositif du miroir résonant avant et après l'adsorption d'un anticorps (noté HT13) : concentration de 0,2 g/l.

milieu	indice réel	indice imaginaire	épaisseur (nm)
oxyde de silice	1,46	10^{-6}	701,9
oxyde de titane	2,15	$2,2.10^{-4}$	41,6
protéines	1,41	0	6,25

Tableau I-e : Coefficients d'ajustement pour le MR.

Afin de caractériser optiquement le système à deux couches diélectriques de ce type de transducteur, nous avons constaté que les épaisseurs déterminées à partir de l'ajustement, étaient très proches de celles qui sont demandées au constructeur. Puis, de la même manière que pour la RPS, nous avons ajusté seulement l'épaisseur $d_{f'}$ en fixant l'indice de la protéine à 1,41.

La détermination de l'épaisseur de la couche nous ne permet pas de calculer le taux de recouvrement. Nous donnerons dans la section suivante une relation entre l'épaisseur optique et la masse de molécules adsorbées par unité de surface, également appelé taux de recouvrement.

C-2-1-1-3-Définition du taux de recouvrement

Lors de la fixation de biomolécules sur l'interface transducteur/milieu couvrant, il s'établit un gradient d'indice c(z) à la surface. De Feijter [67] a énoncé une méthode donnant le taux de recouvrement surfacique Γ (unité de masse/unité de surface) en fonction de l'épaisseur effective moléculaire à partir de paramètres connus et des paramètres ajustés. La méthode consiste à modéliser l'interface par une couche mince d'indice moyen $\overline{n}_{f'}$ et d'épaisseur moyenne $\overline{d}_{f'}$. Ces deux paramètres, auxquels nous avons accès par l'ajustement des courbes de réflectivité, sont définis de la manière suivante :

$$\bar{n}_f = \int_0^\infty n_f (n_f - n_c) dz / \int_0^\infty (n_f - n_c) dz \tag{I-38}$$

$$\bar{d}_f = \int_0^\infty (n_f - n_c) dz / (\bar{n}_f - n_c) \tag{I-39}$$

C'est à partir de ces relations que nous pouvons ensuite calculer le taux de recouvrement Γ :

$$\Gamma = \int_0^\infty \Delta c_f(z) dz \tag{I-40}$$

où $\Delta c_f = c_f(z) - n_c$ est l'excès de concentration du soluté dans la couche adsorbée. En postulant que l'indice de réfraction est une fonction linéaire de la concentration du soluté, on pose :

$$n_f = n_c + \frac{\partial n}{\partial c} \Delta c_f \tag{I-41}$$

où $\frac{\partial n}{\partial c}$ est l'incrément d'indice de réfraction du soluté. En substituant l'équation I-41 dans I-38 et I-39, on obtient :

$$\bar{n}_f = \frac{\int_0^\infty \frac{\partial n}{\partial c} \Delta c_f \left(n_c + \frac{\partial n}{\partial c} \Delta c_f \right) dz}{\int_0^\infty \frac{\partial n}{\partial c} \Delta c_f dz} = n_c + \frac{\partial n}{\partial c} \frac{\int_0^\infty \Delta c^2{}_f dz}{\int_0^\infty \Delta c_f dz} \tag{I-42}$$

$$\bar{d}_f = \frac{\int_0^\infty \frac{\partial n}{\partial c} \Delta c_f dz}{\bar{n}_f - n_c} = \frac{\left[\int_0^\infty \Delta c_f dz \right]^2}{\int_0^\infty \Delta c^2{}_f dz} \tag{I-43}$$

En combinant l'équation I-40 avec I-42 et I-43, on arrive à l'expression :

$$\Gamma = \frac{\int_0^\infty \frac{\partial n}{\partial c} \Delta c_f dz}{\frac{\partial n}{\partial c}} = \frac{\bar{d}_f (\bar{n}_f - n_c)}{\frac{\partial n}{\partial c}} \tag{I-44}$$

avec n_f l'indice de la couche adsorbée, n_c celui du milieu extérieur, $\partial n / \partial c$ le facteur proportionnel liant la variation d'indice à la variation de concentration et valant pour toutes les protéines 0,18 ml/g et 0,15 ml/g pour les acides nucléiques, et enfin d_f l'épaisseur de la couche adsorbée. La dimension de Γ s'exprime en g/cm^2. Dès lors, on pourra parler de la RPS ou du MR comme un dispositif sensible à la masse par unité de surface. En supposant la distribution moléculaire uniforme, on peut aisément tirer de cette grandeur des informations sur la distribution surfacique des molécules, comme leur nombre, leur surface moyenne, en connaissant les dimensions caractéristiques pour chaque molécule. Par exemple, pour connaître le nombre de moles de molécules à la surface d'un biocapteur d'après son taux de recouvrement, on calcule (eq. I-45) :

$$m = \frac{\Gamma}{M} \qquad \text{(I-45)}$$

Avec m, le nombre de moles par millimètre carré et M la masse molaire de l'espèce en question exprimée en Daltons (grammes/mole). Nous travaillons habituellement dans la gamme de la picomole à la femtomole par millimètre carré. En prenant un exemple d'adsorption passive d'immunoglobulines G, où l'on relève typiquement une épaisseur de la couche protéique de 5 nm, on calcule le taux de recouvrement qui s'élève à 2 ng/mm^2 ce qui correspond à la présence de 13,5 fmole/mm^2 (la masse molaire des IgG est de 150 kg/mole).

C-2-1-2-modèles d'ajustement des cinétiques de fixation

Pendant les cinétiques de fixation, nous enregistrons à intervalles fixes la réflectivité provenant du transducteur. Nous suivons donc en temps réel la variation d'épaisseur optique (le produit de $\bar{n}_f$ par $\bar{d}_f$). Ces courbes une fois ajustées, permettent d'extraire les constantes d'association et de dissociation notamment, mais également concernant la valeur du facteur de diffusion, ou bien encore le mode d'association moléculaire, en fonction du profil de la cinétique. Nous allons revenir sur deux des principaux modèles d'ajustement d'interactions biomoléculaires, puis nous donnerons le protocole suivi pour accéder aux valeurs des constantes d'interactions mises en jeu.

C-2-1-2-1-Modèles théoriques hors équilibre

Les cinétiques d'interactions moléculaires suivent des modèles où apparaissent les notions d'attraction et de répulsion [68-69] entre le ligand et l'analyte ou entre le ligand et la surface du capteur. Ces notions s'appuient sur un modèle décrivant l'association et la dissociation ayant lieu lors des interactions moléculaires (cf. II-A-4), pouvant s'appliquer quelle

que soit la grandeur physique mesurée. Nos systèmes de détection sont basés sur le suivi en temps réel de la réflectivité, nous donnons dans l'équation I-46 la variation de réflectivité R en fonction du temps qui dépend de deux contributions, d'une part, l'association k_{ass} de l'analyte avec le ligand pondéré par la concentration de l'analyte C et d'autre part, la dissociation K_{diss} du complexe indépendante de la concentration de l'analyte:

$$\frac{dR}{dt} = (K_{ass}C - K_{diss})R \qquad \text{(I-46)}$$

Le signal de réflectivité évolue suivant l'accroissement lié aux liaisons analyte/ligand et la désorption de l'analyte. En intégrant les deux termes en fonction du temps et en posant $R(t=0)=0$, on exprime la réflectivité à tout temps t suivant l'équation I-47 :

$$R(t) = R_1\left[1 - \exp(-K_{obs}t)\right] \qquad \text{(I-47)}$$

avec $K_{obs} = -K_{ass}C + K_{diss}$, $R(t \to \infty) = R_1$.

L'équation I-47 modélise un profil d'interaction contrôlé par une seule constante de temps, $\frac{1}{K_{obs}}$, dépendant des constantes d'association et de dissociation. Dans le cas d'interactions biomoléculaires limités par le transport de masse, le signal de réflectivité est contrôlé par deux constantes de temps, l'une symbolisant des interactions directes (les liaisons entre molécules se font dès leur mise en contact), et l'autre des interactions indirectes qui s'expliquent soit par la diffusion des analytes le long de la couche sensible, soit par le réagencement du complexe après la reconnaissance. Dans cette configuration, la réflectivité s'exprime suivant l'équation I-48 :

$$R(t) = R_1\left[1 - \exp(-K_{obs1}t)\right] + R_2\left[1 - \exp(-K_{obs2}t)\right] \qquad \text{(I-48)}$$

avec K_{obs1} et K_{obs2}, les inverses des première et deuxième constantes de temps.

C-2-1-2-2-Détermination des constantes d'interaction

Après chaque cinétique réalisée avec la MRPS, nous disposons d'une succession d'images capturées à intervalles de temps réguliers. La première étape d'analyse consiste à choisir une zone d'intérêt et à calculer la moyenne de niveaux de gris. Chacune des images sera ainsi analysée, puis les valeurs obtenues seront affichées sur un graphe en fonction du temps en secondes. Les trois modes de transduction présentent alors les mêmes caractéristiques

d'analyse. Les cinétiques ainsi présentées seront ajustées suivant la méthode des moindres carrés. Pour déterminer les constantes d'association, nous porterons sur un graphe les valeurs ajustées de K_{obs} en fonction de la concentration injectée pour chaque cinétique (en mole/l). Un simple ajustement linéaire nous permettra de connaître la pente de la droite correspondant à la constante d'association alors que l'ordonnée à l'origine nous donnera la valeur de la constante de dissociation. Dans le cas de cinétiques présentant un profil à deux constantes de temps, on traitera indépendamment K_{obs1} et K_{obs2} . Les valeurs de la constante d'affinité que l'on en tire sont du même ordre.

C-2-1-3-Estimation de l'incertitude des calculs

Pour prendre en compte toutes les sources de bruit entraînant une augmentation de l'erreur commise sur une mesure, il faut additionner le bruit instrumental à celui engendré par la limite de sensibilité de chacun des transducteurs. Nous distinguerons bien les limitations propres à la RPS puis au MR.

Quel que soit l'indice du prisme utilisé (1,515 ou 1,717) la limite de détection du système RPS est de 0,04 nm pour un indice de 1,41. Ceci correspond à un décalage angulaire de 2 centièmes de degré, et à une variation de réflectivité de 0,1 %. Sachant que l'erreur commise sur l'indication de la position angulaire de la platine est aussi de 2 centièmes de degré, nous estimerons nos mesures à 0,1 nm (épaisseur de la couche adsorbée) près tout au long du manuscrit afin de conserver une marge de sécurité. Cette erreur entraîne une incertitude de 40 pg/mm^2 sur le calcul de Γ, soit un dénombrement du nombre de mole/mm^2 à 9 fmole/mm^2 pour les acides nucléiques ou 270 amole/mm^2 pour les protéines.

L'erreur commise à partir des courbes associées au MR est d'un autre ordre, car son pic étant très fin (de l'ordre du dixième de degré), l'erreur de 2 centièmes de degré va jouer un rôle plus important. En effet, la limite de détection du MR est de 0,01 nm, pour une variation angulaire de 1 centième de degré et une variation de réflectivité de 0,2 %. En additionnant les deux contributions, on arrive à une erreur de 2 centièmes de degré, engendrant une incertitude de 40 pg/mm^2 pour le taux de recouvrement et une erreur sur la densité surfacique de 100 amole/mm^2 pour les protéines.

I-C-2-2-Quantification à partir d'une succession d'images

Dans le cas de la microscopie par résonance des plasmons de surfa ce, nous ne relevons pas la réflectivité en fonction de l'angle d'incidence, car la platine n'est pas pilotée par un moteur. En conséquence, seules les cinétiques de fixation font l'objet de séquences automatisées. Nous donnons ici la méthode utilisée pour, d'une part, repérer la position la plus

sensible sur le flanc du plasmon, et, d'autre part, nous donnons le protocole de quantification à partir d'images.

C-2-2-1-Réglage de la position angulaire de référence

Les variations de réflectivité sont interprétées par la caméra CCD comme des variations de contrastes. Ainsi on peut déterminer un zéro correspondant au noir le plus sombre et une valeur unité pour les niveaux de gris les plus clairs. On détermine ainsi la position de résonance du capteur chrome-or en identifiant la position angulaire correspondant au niveau de gris le plus bas. En général on procède au préalable à une étude de l'échantillon avec la méthode RPS classique afin d'avoir accès aux paramètres constituant le transducteur. Puis nous opérons une conversion de ces paramètres à la longueur d'onde de la DEL. Enfin, nous nous plaçons à l'angle où la pente du flanc de la réflectivité est la meilleure. L'aspect du capteur à l'écran est d'un gris moyen, dont l'analogie en termes de réflectivité se situe en milieu de la dynamique. Toute erreur (tant qu'elle est faible) sur la position angulaire de référence pour suivre les cinétiques d'interaction n'entraînera aucune erreur sur la sensibilité du système, car la zone correspondant au flanc droit du pic de réflectivité est linéaire sur plusieurs degrés. La sensibilité est donc partout la même dans la zone angulaire d'intérêt.

C-2-2-2-Calcul de l'épaisseur optique moléculaire

Le protocole de quantification est détaillé dans l'annexe II, nous ne reviendrons pas sur la conversion niveaux de gris/réflectivité normalisée. Après avoir enregistré la succession d'images capturées à intervalles de temps réguliers, nous les stockons dans un répertoire, puis nous sélectionnons à l'aide du curseur, une zone d'intérêt où nous réaliserons les mesures de moyenne image après image. Cette partie automatisée et rapide nous donne accès à la réflectivité moyenne du capteur en fonction du temps, ainsi qu'à la déviation standard sur chaque mesure. Comme nous connaissons la valeur de la pente dans la zone angulaire où ont eu lieu les acquisitions d'images, il suffit de mesurer la variation de réflectivité par la valeur de cette pente (en nm/%) pour avoir directement l'épaisseur effective des molécules impliquées dans l'interaction.

C-2-2-3-Estimation de l'incertitude des calculs

Outre la limite de détection liée à la résonance des plasmons de surface, la seule source importante de bruit du microscope à effet plasmon provient du bruit électronique, ou bruit de numérisation de la caméra CCD. Pour mesurer ce bruit, nous faisons l'acquisition successive de la même image deux fois de suite, nous les soustrayons ensuite l'une par l'autre. La moyenne

mesurée sur le résultat de cette soustraction correspond au bruit de numérisation. Ce bruit quand il est converti en variation de réflectivité correspond à 0,1 %, soit la même incertitude qu'avec la RPS classique. L'incertitude sur les mesures et les calculs qui en suivent est donc la même qu'au paragraphe C-2-1-3.

I-C-2-3-Conclusion

Nous venons de présenter les différents protocoles expérimentaux et les réglages s'y référant pour tous les dispositifs optiques utilisés durant ce travail de thèse. Une part importante de cette partie concernait l'analyse quantitative de l'interaction des biomolécules au voisinage de la surface des transducteurs, et l'on a vu que ces mesures ne sont pas (ou peu) limitées par l'instrumentation (bruit instrumental de l'ordre de 0.001 %). Tous les résultats présentés dans les chapitres suivants seront calculés d'après les modèles présentés. Nous n'indiquerons pas les incertitudes dans les résultats expérimentaux, qui sont de l'ordre de 40 pg/mm^2 pour la RPS et 10 pg/mm^2 pour le MR, pour les mesures de taux de recouvrement. Nous venons également de voir comment tirer les informations concernant les interactions biologiques à partir des signaux physiques mesurés. Nous pouvons alors presque assimiler nos biocapteurs optiques à des microbalances, puisque le taux de recouvrement s'exprime en unité de masse par unité de surface. Toujours à partir de courbes expérimentales (cinétiques d'interaction), nous avons la possibilité de mesurer les constantes d'affinité entre deux espèces biologiques. En conséquence, les capteurs biologiques basés sur la RPS et sur le MR vont nous permettre d'étudier les formes d'interaction entre des molécules et un substrat, en quantifiant leur fixation, puis d'analyser la présence ou non d'analyte dans une solution en injectant celle-ci sur le substrat fonctionnalisé. Après cette étape, nous pourrons interpréter numériquement le rendement d'interaction, avoir une information qualitative sur la présence ou non de l'espèce recherchée, et des informations quantitatives sur la nature de l'interaction.

Après l'étude de la sensibilité des transducteurs optiques, de leur mode opératoire et des modes de quantification associés, nous passons à la partie expérimentale avec comme premier exemple d'application, la reconnaissance d'une hormone humaine par son anticorps spécifique et ceci à l'aide des deux biocapteurs. Nous pourrons ainsi comparer leur sensibilité expérimentale et déduire des résultats obtenus les différentes constantes d'interaction, basées sur l'ajustement des cinétiques. Pour commencer, nous allons décrire les types de molécules que nous utilisons pour nos expériences ainsi que leurs modes d'interactions. Nous en arriverons à l'examen attentif de la constitution de la couche biosensible du transducteur, faisant appel notamment aux techniques de chimie de surface.

Références bibliographiques du Chapitre I

[1] T. TERNYNCK et S. AVRAMEAS (1987).*Techniques en immunologie.* ed.INSERM (Société Française d'Immunologie).

[2] F. BOUDET, J. THÈZE & M. ZOUALI. UV-treated polystyrene microtitre plates for use in an ELISA to measure antibodies against synthetic peptides. *J.of Immunol.Methods*,**142** (1991), 73-82.

[3] A. SILBER, M. BISENBERGER, C. BRÄUCHLE & N. HAMPP.Thick-film multichannelbiosensor for simultaneous amperometric and potentiometric measurements. *Sensors & Actuators B*, **30** (1996), 127-132.

[4] M. DeSILVA, Y. ZHANG, P. HESKETH, G. J. MACLAY, S. GENDEL & J. STETTER. Impedance based sensing of the specifice binding reaction between staphylococcus b and its antibody on an ultra-thin platinum film. *Biosensors &bioelectronics*, **10** (1995), 675-682.

[5] H. MARAMATSU, J. DICKS, E. TAMYA & I. KARUBE. Piezoelectric crystal biosensor modified with protein A for determination of immunoglobulins. *Anal.Chem.*, **59** (1987), 2760-2763.

[6] D. OGLESBY, B. UPCHURCH, B. LEIGHTY, J. COLLMAN, X. ZHANG & P. HERRMANN. Surface acoustic wave oxygen sensor. *Anal.Chem.*, **66** (1994), 2745-2751.

[7] J. CHARMET & P.G.DE GENNES. Ellipsometric formulae for an inhomogenous layer with arbitrary refractive index profile. *J.Opt.Soc.Am.*, **73** (1983), 1777-1784.

[8] K. SPAETH, A. BRECHT & G. GAUGLITZ. Studies on biotin-avidin multilayer adsorption by spectrometric ellipsometry. *J.of Colloid and Interface Sci.*, **196** (1997), 128-135.

[9] P. SCHAAF & P. DEJARDIN. Structural changes within an adsorbed fibrinogen layer during the adsorption process : a study by scanning angle reflectometry. *Colloids and Surfaces*, **31** (1988), 89-103.

[10] E. K. MANN, L. HEINRICH, J. C. VOEGEL & P. SCHAAF. Optical characterization of thin films : Beyond the uniform layer model. *J.Chem.Phys.*, **105** (1996), 6082-6085.

[11] R. G. HEIDEMAN, R. P. H. KOOYMAN & J. GREVE. Performance of a highly sensitive optical waveguide Mach-Zehnder interferometer immunosensor. *Sensors & actuators B*, **10** (1993), 209-217.

[12] R. CUSH, J. M. CRONIN, W. J. STEWART, C. H. MAULE, J. MOLLOY & N. J. GODDARD. The resonant mirror : a novel optical biosensor for direct sensing of biomolecular interactions/Part 1 : principle of operation and associated instrumentation. *Biosensors & Bioelectronics*, **8** (1993), 347-353.

[13] P. E. BUCKLE, R. J. DAVIES, T. KINNING, D. YEUNG, P. R. EDWARDS & D. POLLARD-KNIGHT. The resonant mirror : a novel optical sensor for direct sensing of biomolecular interactions/Part 2 : Applications. *Biosensors & Bioelectronics*, 8 (1993), 355-363

[14] W. LUKOSZ. Integrated optical chemical and direct biochemical sensors. *Sensors & Actuators B*, **29** (1995), 37-50.

[15] F. BIER, F. KLEINJUNG & F. SCHELLER. Real-time measurement of nucleic-acid hybridization using evanescent-wave sensors : steps towards the genosensor. *Sensors & Actuators B*, **38-39** (1997), 78-82.

[16] S. LÖFAS, M. MALMQVIST, I. RÖNNBERG & E. STENBERG. Bioanalysis with surface plasmon resonance. *Sensors & Actuators B*, **5** (1991), 79-84.

[17] LIEDBERG B. , LUNDSTRÖM I. & STENBERG E. Principles of biosensing with an extended coupling matrix and surface plasmon resonance. *Sensors & Actuators B*, **11** (1993), 63-72.

[18] R. KARLSSON & R. STÅHLBERG. Surface plasmon resonance detection and multispot sensing for direct monitoring of interactions involving low-molecular-weight analytes and for determination of low affinities. *Anal.Biochem*, **228** (1995), 274-280.

[19] P. NILSSON, B. PERSSON, M. UHLEN & P. NYGREN. Real-time monitoring of DNA manipulations using biosensor technology. *Anal. Biochem.*, **224** (1995),

[20] B. PERSSON, K. STENHAG, P. NILSSON, A. LARSSON, M. UHLEN & P. NYGREN. Analysis of oligonucleotide probe affinities using surface plasmon resonance : A means for mutational scanning. *Anal.Biochem.*, **246** (1997), 34-44.

[21] P. NILSSON, B. PERSSON, A. LARSSON, M. UHLEN & P. NYGREN. Detection of mutations in PCR products from clinical samples by surface plasmon resonance. *J.of molecular recognition*, **10** (1997), 7-17.

[22] P. NILSSON, A. LARSSON, J. LUNDENBERG, M. UHLEN & P. NYGREN. Mutational scanning of PCR products by substractive oligonucleotides hybridization analysis. *BioTechniques*, **26** (1999), 308-316.

[23] O. HUGON, P. BENECH & H. GAGNAIRE. Surface plasmon chemical/biological sensor in integrated optics. *Sensors & Actuators B*, **51** (1998), 316-320.

[24] J. HOMOLA & S. YEE. Surface plasmon resonance sensor based on planar light pipe : theorical optimization analysis. *Sensors & Acutators B*, **37** (1996), 145-150.

[25] M. WEISS & R. SRIVASTAVA. Theorical and experimental investigations of surface plasmon waveguide structures for sensing applications. *SPIE*, **2695** (1996), 195-201.

[26] C. R. LAVERS, J. S. WILKINSON. A waveguide-coupled surface-plasmon sensor for an aqueous environment. *Sensors & Actuators B*, **22** (1994), 75-81.

[27] C. MOUVET, R. HARRIS, C. MACIAG, B. LUFF, J. WILKINSON, J. PIEHLER, A. BRECHT, G. GAUGLITZ, R. ABUKNESHA & G. ISMAIL. Determination of simazine in water samples by waveguide surface plasmon resonance. *Analytica Chimica Acta*, **338** (1997), 109-117.

[28] C. R. LAWRENCE, N. J. GEDDES & D. N. FURLONG. Surface plasmon resonance studies of immunoreactions utilizing disposable diffraction gratings. *Biosensors & Bioelectronics*, **11** (1996), 389-400.

[29] D. CULLEN, R. BROWN & C. LOWE. Detection of immuno-complex formation via surface plasmon resonance on gold-coated diffraction grating. *Biosensors*, **3** (1998), 211-225.

[30] C. JORDAN, A. FRUTOS, A. THIEL & R. CORN. Surface plasmon resonance imaging measurements of DNA hybridization adsorption and streptavidin. DNA multilayer formation at chemically modified gold surfaces. *Anal. Chem.*, **69** (1997), 4939-4947.

[31] M. ZIZLSPERGER & W. KNOLL. Multispot parallel on-line monitoring of interfacial binding reactions by surface plasmon microscopy. *Prog.Colloid Polym.Sci*, **109** (1998), 244-253.

[32] S. HERMINGHAUS, C. BECHINGER, W. PETERSEN & P. LEIDERER. Phase contrast surface mode microscopy. *Optics Commun.*, **112** (1994), 16-20.

[33] A. J. THIEL, A. G. FRUTOS, C. JORDAN, R. CORN & LLOYD SMITH. In situ surface plasmon resonance imaging detection of DNA hybridization to oligonucleotide arrays on gold surfaces. *Anal.Chem.*, **69** (1997), 4948-4956.

[34] C. JORDAN & R. CORN. Surface plasmon resonance imaging measurements of electrostatic biopolymer adsorption onto chemically modified gold surfaces. *Anal.Chem.*, **69** (1997), 1449-1456.

[35] C. BERGER, R. KOOYMAN & J. GREVE. Resolution in surface plasmon microscopy. *Rev. Sci.Instrum.*, **65** (1994), 2829-2836.

[36] M. GOZLAN. Les biopuces à la conquête du marché. *La recherche*, **318** (1999), 60-64.

[37] E. SOUTHERN, K. MIR & M. SCHEPINOV. Molecular interactions on microarrays. *Nature genetics supplement*, **21** (1999), 5-9.

[38] V. CHEUNG, M. MORLEY, F. AGUILAR, A. MASSIMI, R. KUCHERLAPATI & G. CHILDS. Making and reading microarrays. *Nature genetics supplement,* **21** (1999), 15-19.

[39] R. LIPSCHUTZ, S. FODOR, T. GINGERAS & D. LOCKHART. High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nature genetics supplement*, **21** (1999), 20-24.

[40] H. VAN CUYCK-GANDRE, T. LIVACHE, J. RINGEAUD & J. M. CRANCE. Development of an RNA/RNA hybridization assay for the detection of the HAV CF53 strain. *Res.Virol.*, **145** (1994), 37-43.

[41] T. LIVACHE, A. ROGET, E. DEJEAN, C. BARTHET, G. BIDAN & R. TEOULE. Preparation of a DNA matrix via an electrochemically directed copolymerization of pyrrole and oligonucleotides bearing a pyrrole group. *Nucleic Acids Research*, **22** (1994), 2915-2921.

[42] T. LIVACHE, B. FOUQUE, A. ROGET, J. MARCHAND, G. BIDAN, G. BIDAN, R. TEOULE & G. MATHIS. polypyrrole DNA chip on a silicon device : Example of Hepatitis C virus genotyping. *Anal. Biochem.*, **255** (1998), 188-194.

[43] J. HOMOLA, I. KOUDELA & S. YEE. Surface plasmon resonance sensors based on diffraction gratings and prism couplers : sensitivity comparison. *Sensors & Actuators B*, **54** (1999), 16-24.

[43bis] P. TIEN, R. ULRICH & R. MARTIN. Modes of propagating light waves in thin deposited semiconductor films. *Appl. Phys. Lett.* , **14** (1969), 291-294.

[44] E. KRETSCHMANN & H. RAETHER. Plasma resonance emission in solids. *Z.Natürforrsch A.*, **23** (1968), 615-617.

[45] A. OTTO & W. SOHLER. Modification of the total reflection modes in a dielectric film by one metal boundary. *Optics Commun.*, **3** (1971), 254-258.

[46] R. GORDON & J. SWALEN. The effect of thin organic films on the surface plasma resonance on gold. *Optics Commun.*, **22** (1977), 374-376.

[47] W. P. CHEN & J. M. CHEN. Use of surface plasma waves for determination of the thickness and optical constants of thin metallic films. *J.Opt.Soc.Am*, **71** (1981), 189-191.

[48] B. LIEDBERG, C. NYLANDER & I. LUNDSTRÖM. Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. *Sensors & Actuators*, **4** (1983), 299-304.

[49] W. LUKOSZ, D. CLERC, P. M. NELLEN, C. STAMM & P. WEISS. Output couplers on planar optical waveguides as direct immunosensors. *Biosensors & Bioelectronics*, **6** (1991), 227-232.

[50] R. G. HEIDEMANN, R. P. H. KOOYMAN, J. GREVE & B. S. F. ALTENBURG. Simple interferometer for evanescent field refractive index sensing as a feasability study for an immunosensor. *Appl.Opt.*, **30** (1991) 1474-1479.

[51] P. B. DANIELS, J. K. DEACON, M. L. EDDOWES & D. PEDLEY. Surface plasmon resonance applied to immunosensing. *Sensors & Actuators, 15* (1988), 11-18.

[52] S. LÖFAS & B. JOHNSSON. A novel hydrogel matrix on gold surfaces in surface plasmon resonance sensors for fast and efficient covalent immobilization of ligands. *J.Chem.Soc.*, **75** (1990), 1526-1528.

[53] J. VAN GENT, P. V. LAMBECK, H. J. M. KREUWEL, G. J. GERRITSMA, E. J. R. SUDHÖLTER & T. J. A. POPMA. Optimization of a chemooptical surface plasmon resonance based sensor. *Opt.Soc.Am*, **29** (1990), 2843-2849.

[54] M. N. WEISS, R. SRIVASTAVA & H. GROGER. Theoritical and experimental investigations of surface plasmon waveguide structures for sensing applications. *SPIE* , **2695** (1996), 195-201.

[55] E. YEATMAN. Resolution and sensitivity in surface plasmon microscopy and sensing. *Biosensors and Bioelectronics*, **6-7** (1996), 635-649.

[56] O. PARRIAUX & G. VOIRIN. Plasmon wave versus dielectric waveguiding for surface wave sensing. *Sensors & Actuators A*, **21-23** (1990), 1137-1141.

[57] D. R. HALL & D. J. WINZOR. Use of a resonant mirror to characterize the interaction of carboxypeptidase A with an elicited monoclonal antibody. *Analytical Biochemistry*, **244** (1997), 152-160.

[58] C. STAMM & W. LUKOSZ. Integrated optical difference interferometer as immunosensor. *Sensors & Actuators B*, **31** (1996), 203-207.

[59] G. LABEYRIE, A. LANDRAGIN, J. VON ZANTHIER, R. KAISER, N. VANSTEENKISTE, C. WESTBROOK & A. ASPECT. Detailed study of a high finesse planar waveguide for evanescent wave atomic mirrors. *J.Euro.Opt.Soc.*

[60] R. CUSH, J. M. CRONIN, W. J. STEWART, C. H. MAULE, J. MOLLOY & N. J. GODDARD. The resonant mirror : a novel optical biosensor for direct sensing of biomolecular interactions/Part 1 : principle of operation and associated instrumentation. *Biosensors & Bioelectronics*, **8** (1993), 347-353.

[61] N. J. GODDARD, D. POLLARD-KNIGHT & C. H. MAULE. Real time biomolecular interaction analysis using the resonant mirror sensor. *Analyst,* **119** (1994), 583-588.

[62] A. BRECHT, G. GAUGLITZ & W. NAHM. Interferometric measurements used in chemical and biochemical sensors. *Analysis*, **20** (1992), 135-140.

[63] B. DRAPP, J. PIEHLER, A. BRECHT, G. GAUGLITZ, B. LUFF, J. WILKINSON & J. INGENHOFF. Integrated optical Mach-Zehnder interferometers as simazine immunoprobes. *Sensors & Actuators B*, **38-39** (1997), 277-282.

[64] S. HIRMO, E. ARTURSSON, G. PUU, T. WADSTRÖM & B. NILSSON. characterization of Helicobacter Pylori interactions with Sialylglycoconjugates using a resonant mirror biosensor. *Anal. Biochem.*, **257** (1998), 63-66.

[65] B. SCHNEIDER, J. EDWARDS & N. HARTMAN. Hartman interferometer : versatile integrated optic sensor for label-free, real-time quantification of nucleic acids, proteins, and pathogens. *Clin.Cham.*, **43** (1997), 1757-1763.

[66] W. LUKOSZ. Principles and sensitivities of integrated optical and surface plasmon sensors for direct affinity sensing and immunosensing. *Biosens. & Bioelectronnics*, **6** (1991), 215-225.

[67] J. A. DE FEIJTER, J. BENJAMINS & F. A. VEER. Ellipsometry as a tool to study the adsorption behavior of synthetic and biopolymers at the air-water interface. *Biopolymers*, **17** (1978), 1759-1772.

[68] A. BERNARD & R. BOSSHARD. Real-time monitoring of antigen-antibody recognition on a metal oxide surface by an optical grating coupler sensor. *Eur. J. Biochem.* , **230** (1995), 416-423.

[69] J. PIEHLER, A. BRECHT, T. GIERSCH, B. HOCK & G. GAUGLITZ. Assessment of affinity constants by rapid solid phase detection of equilibrium binding in a flow system. *J. of Immuno. methods*, **201** (1997), 189-206.

Chapitre II :
Le matériel biologique et ses voies d'immobilisation

Les interactions biomoléculaires que nous nous proposons d'analyser sont essentiellement de deux types, les interactions antigènes-anticorps ou anticorps-hormones et les interactions entre acides nucléiques. Pour ces deux sortes d'interactions, nous allons détailler la structure des molécules impliquées dans ces interactions, leur fonction biologique, ainsi que leur intérêt en biologie médicale. Nous présentons, par ailleurs, les différentes molécules que nous avons étudiées, ainsi que leur impact sur les diagnostics cliniques. Nous passerons ensuite à l'élaboration de la couche biosensible, en décrivant différentes voies d'immobilisation.

II-A-La reconnaissance antigène-anticorps

Le système immunitaire joue un rôle essentiel dans la protection de l'organisme animal contre les agents pathogènes extérieurs. Cette fonction repose sur sa capacité à discriminer les constituants de l'organisme dont il fait partie, le « soi », des agents extérieurs ou antigènes, le « non-soi ». Le lymphocyte, cellule-clé du système immunitaire, possède cette capacité et est l'effecteur de la réponse immune. Pour cela, il reconnaît l'antigène de façon spécifique grâce à un récepteur membranaire, le récepteur T (TCR) dans le cas des lymphocytes T ou le récepteur B (BCR) - encore appelé immunoglobuline de surface - sur les lymphocytes B. Au contact de l'antigène, ces derniers se différencient en plasmocytes, stade ultime de la différençiation des B, sécréteurs d'immunoglobulines ou anticorps. Ces effecteurs constituent la réponse humorale du système immunitaire qui, conjointement à la réponse cellulaire médiée par les lymphocytes T cytotoxiques, contribue à l'élimination de l'antigène. Dans ce travail, nous nous limiterons à l'étude des interactions antigènes-anticorps, mettant en jeu des immunoglobulines de type G (IgG) qui représentent 80% des anticorps chez l'homme[1]. Il existe en effet quatre autres classes d'immunoglobulines (IgA, IgD, IgE et IgM).

II-A-1-Structure de l'anticorps

Les anticorps (IgG) possèdent tous la même structure de base, dite en Y(cf. Fig. II-1). Cette structure se divise en deux domaines : le domaine F_c , qui n'a aucun rôle dans la reconnaissance immunologique mais possède une activité biologique importante, et deux domaines appelés F_{ab}, (ab pour antibody) qui portent chacun un paratope, site de fixation sur l'antigène. Il y a donc deux sites de reconnaissance par IgG.

En étudiant plus finement la structure de l'IgG, on remarque une symétrie parfaite composée de deux chaînes lourdes (indexées par un H) et deux chaînes légères s'y attelant (indexées par un L). Chacune de ces quatre chaînes se compose elle-même de parties variables (V) et constantes (C). Ce sont les parties variables des chaînes légères et lourdes situées sur les

fragments F_{ab} , au niveau des sites de fixation de l'anticorps appelés également paratopes, qui confèrent à l'IgG sa spécificité[2], c'est à dire le type d'antigène qu'elle viendra fixer.

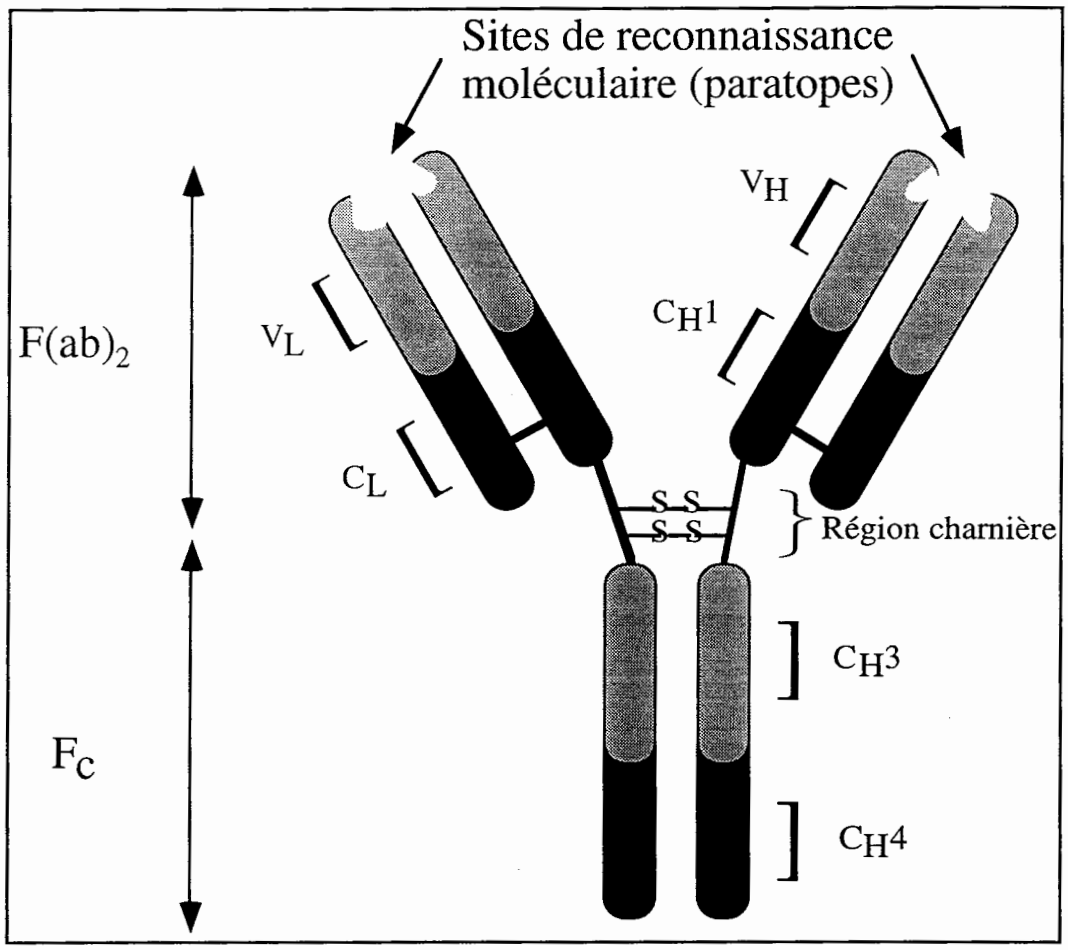


Figure II-1 : Structure générale de l'IgG.

Il existe une zone appelée région charnière, située entre les fragments F_{ab} et F_c, constituée de résidus de cystéines (acide aminé) impliqués dans la formation de ponts disulfures reliant les chaînes lourdes. Cette région donne une certaine flexibilité à l'IgG, amenant celle-ci à subir des changements de configuration en fonction du pH et ainsi modifier ses dimensions. En règle générale, l'IgG possède une masse molaire de 150 Kda (kg/mole) [3] et les données critallographiques montrent qu'elle occupe un volume de 15x5x5 nm^3.

Lorsque l'anticorps se lie avec l'antigène, il se formera un complexe immun, complexe macromoléculaire spécifique.

II-A-2-Structure du paratope

Le site de fixation de l'anticorps ou paratope, situé en bout des chaînes V_L et V_H correspond à des petits segments de peptides (chaînes d'acides aminés) hypervariables[4]. Ce sont ces acides aminés qui se lient à l'antigène, alors que les autres segments peptidiques des parties variables ne jouent qu'un rôle de charpente. Le paratope est ainsi constitué d'environ quinze acides aminés formant une structure à trois dimensions (Fig. II-2) conférant, suivant les séquences peptidiques, toute sa spécificité à l'IgG.

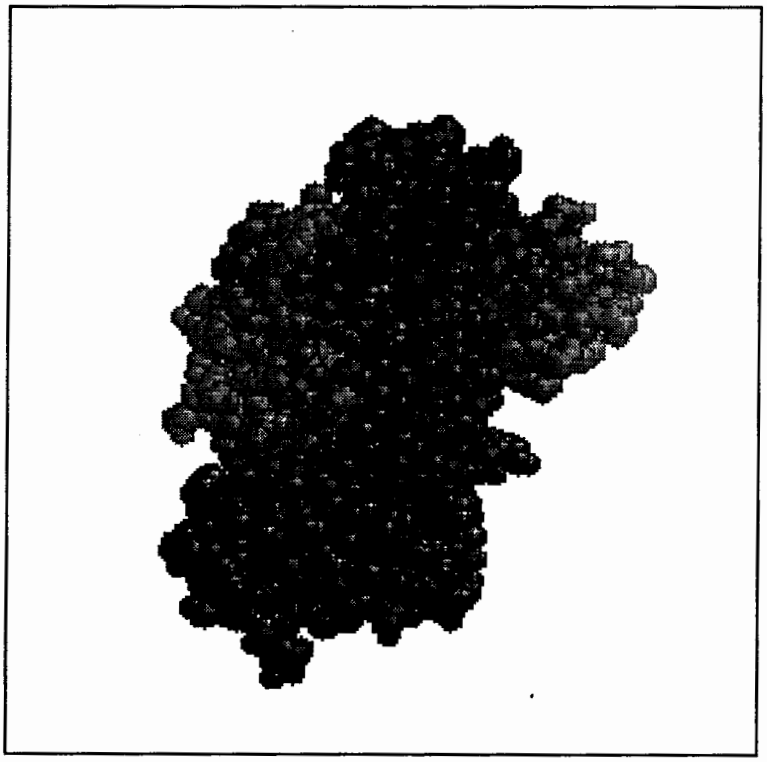


Figure II-2 : Structure du paratope.

II-A-3-Interactions impliquées dans la reconnaissance antigène-anticorps

Les différentes interactions unissant les antigènes aux anticorps sont, par essence, non-covalentes. Ce sont en fait des forces faibles mais leur résultante accuse une énergie de liaison élevée.

Le site de reconnaissance de l'antigène (ou épitope) se fixe au plus près possible de la structure du paratope de l'anticorps, car les contacts entre les deux espèces doivent être maximum afin de favoriser les interactions non-covalentes. Ces forces sont de quatre types[5], avec des distances d'interactions différentes (Fig. II-3).

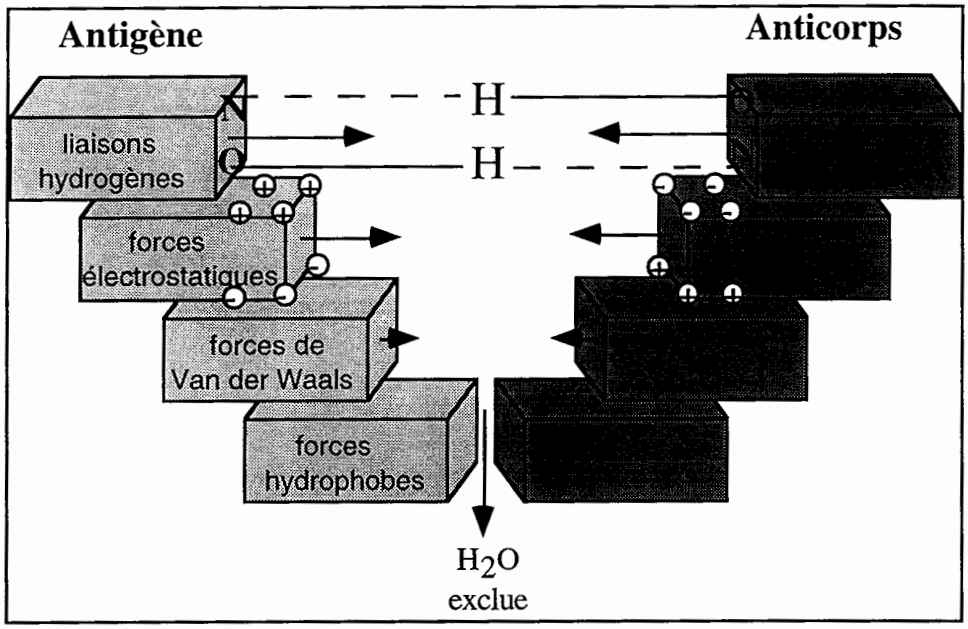


Figure II-3 : Forces attractives impliquées dans la reconnaissance antigènes-anticorps.

Les forces de Van der Waals sont les interactions les plus faibles impliquées dans la reconnaissance antigènes-anticorps. Elles sont crées par les interactions entre nuages électroniques moléculaires. Elles ne jouent un rôle significatif que dans le cas où la complémentarité du complexe immun est étroite.

Les forces électrostatiques s'exercent au niveau des chaînes protéiques, et se matérialisent sous forme d'attraction de groupements ioniques de charges opposées.

Les liaisons hydrogène sont des liaisons faibles s'exerçant entre atomes électropositifs (hydrogène) et électronégatifs (N pour azote ou O pour oxygène). Ce type d'interaction peut inclure des molécules d'eau et se renforce quand la température baisse.

A l'inverse des ponts hydrogène, la stabilité des liaisons hydrophobes augmente avec la température. Ce type d'interaction est produit par l'association de groupements peptidiques d'où sont exclues les molécules d'eau.

De plus, la réaction antigènes-anticorps est fortement influencée par les conditions de pH et de force ionique (présence de sel) dans laquelle elle se déroule.

II-A-4-Valence et affinité des anticorps

La grandeur qui résulte de la somme des forces attractives et répulsives entre l'antigène et l'anticorps et qui résume le comportement de l'un par rapport à l'autre s'appelle l'affinité[6-10]. Dans le cas général, l'analyte interagit via son site antigénique (épitope) sur le paratope de l'anticorps. À concentration fixée en anticorps, la concentration d'antigène augmente jusqu'à saturation des sites de l'anticorps. On considère qu'à ce stade, le nombre de molécules de l'analyte est égal à celui du ligand. On définit la valence comme étant le nombre de sites de reconnaissance par molécule d'anticorps.

En postulant que tous ces sites sont indépendants et identiques, on écrit la réaction immunogénique de la façon suivante (eq. II-1) :

$$A_C + A_g \underset{k_{diss}}{\overset{k_{ass}}{\rightleftharpoons}} A_C A_g \qquad \text{(II-1)}$$

où A_c symbolise un paratope de l'anticorps, A_g l'épitope de l'antigène, k_{ass} et k_{diss} sont respectivement les constantes d'association et de dissociation du complexe A_cA_g. Cette équation résume les interactions ayant lieu en permanence lorsqu'un anticorps est en présence d'antigènes. À tout instant t, les antigènes se lient et se dissocient suivant l'équation (eq. II-2) :

$$\frac{d[A_cA_g]}{dt} = k_{ass}[A_c][A_g] - k_{diss}[A_cA_g] \qquad \text{(II-2)}$$

Quand l'équilibre est atteint, le premier terme s'annule et on peut écrire :

$$k_{ass}[A_c][A_g] = k_{diss}[A_cA_g] \qquad \text{(II-3)}$$

d'où on arrive à :

$$K = \frac{k_{ass}}{k_{diss}} = \frac{[A_c A_g]}{[A_c][A_g]} \qquad \text{(II-4)}$$

avec K la constante d'affinité exprimée en litre par mole ou en molaire^{-1} (M^{-1}).

Il faut préciser que cette constante d'affinité est calculée uniquement pour la reconnaissance d'un type d'épitope par un type de paratope, c'est à dire dans le cas d'un anticorps monoclonal (cf. prochaine section). Si, au sein même du mélange antigènes-anticorps on a affaire à différents types de paratopes et d'épitopes, comme des antiserums ou des anticorps polyclonaux, on ne parle plus d'affinité mais d'avidité. Dans le cadre de cette thèse, nous n'envisagerons pas ce dernier cas et n'utiliserons que des anticorps monoclonaux.

II-A-5-Anticorps monoclonaux

Dès l'apparition d'un corps étranger dans l'organisme, le système immunitaire est sollicité par l'intervention des lymphocytes B producteurs d'immunoglobulines. Pour chaque épitope de l'antigène détecté, un clone (population cellulaire dérivant d'une cellule unique et produisant des anticorps identiques monoclonaux) particulier de lymphocyte B sera stimulé. En somme, pour chaque épitope reconnu par les lymphocytes B, il y aura production d'immunoglobulines spécifiques de cet épitope (Fig. II-4). En isolant un clone spécifique d'un épitope, on peut obtenir un anticorps monoclonal spécifique de l'épitope antigénique.

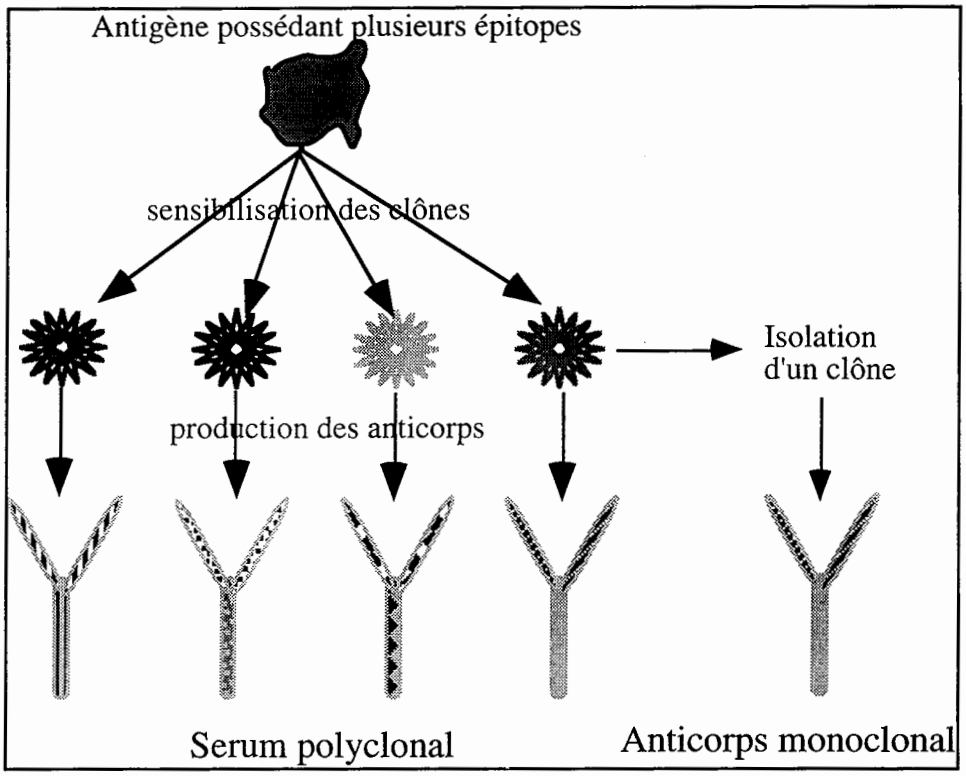


Figure II-4 : Production des immunoglobulines et sélection d'anticorps monoclonaux.

À présent, plaçons-nous dans le cas où deux antigènes A et B présents dans la même solution, possèdent un épitope se ressemblant beaucoup. Si l'on met en contact ces antigènes avec un anticorps spécifique de A, il y aura probablement une réaction avec B du fait de l'homologie partielle des épitopes. On appelle ce type de réaction une réaction croisée (Fig. II-5).

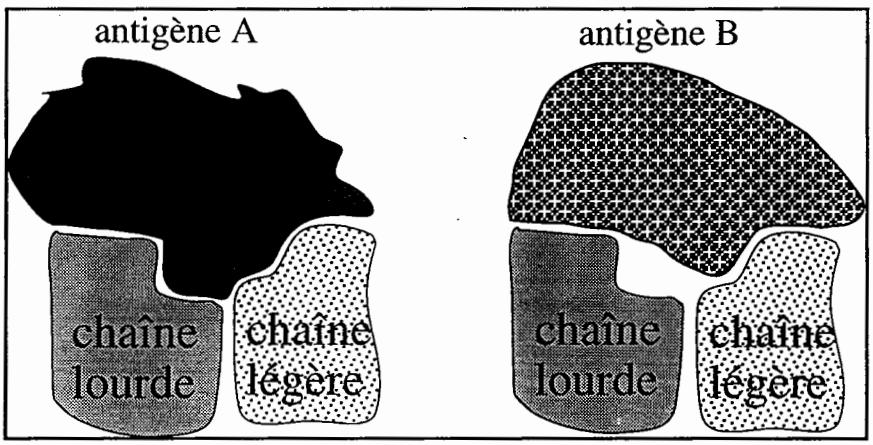


Figure II-5 : Schéma représentant une réaction croisée.

Afin d'éviter les problèmes d'interprétation, nous travaillerons uniquement avec des couples ne présentant aucune homologie et nous prendrons bien soin également d'éviter les interactions non-spécifiques.

II-A-6-Conclusion.

Nous venons de poser les bases de la structure et des interactions immunologiques entre les anticorps et les antigènes, phénomènes physiologiques que les biocapteurs tentent d'observer *in vitro*. Nous avons également détaillé la notion de constante d'affinité qui, au-delà des réactions antigènes-anticorps, joue un rôle important pour la description des interactions entre acides nucléiques, comme nous allons le voir dans la partie suivante.

II-B-Les interactions entre acides nucléiques

Depuis les débuts de la biologie moléculaire, les scientifiques n'ont cessé d'explorer et de comprendre les implications du patrimoine génétique, d'une part dans le cadre de la recherche fondamentale afin de séquencer le génome humain, c'est à dire connaître précisément la totalité du code de l'ADN, d'autre part dans le cadre de la recherche clinique, où la connaissance du rôle d'un gène (ou bien d'une séquence au sein d'un gène) dans la constitution de notre organisme peut déboucher sur des diagnostics pathologiques, voire sur les thérapies géniques.

Notre étude portera sur une application visant à détecter la présence d'un certain type de séquences d'ADN au sein d'une solution, en utilisant la méthode d'hybridation entre acides nucléiques. Par la suite, nous tenterons d'appliquer cette méthode à la détection de mutations dans une séquence, c'est à dire la mise en évidence de changements fins altérant cette séquence. Nous présenterons dans un premier temps la structure de l'ADN ainsi que le mode d'interaction entre acides nucléiques, puis dans un deuxième temps, nous discuterons, dans un deuxième temps, de la reconnaissance d'erreurs dans le codage de l'ADN par la même méthode optique.

II-B-1-Structure de l'ADN

Les acides nucléiques sont les constituants principaux du noyau de la cellule. Ce sont des molécules codantes, à la source d'un système de communication intermoléculaire très complexe. On distingue principalement deux types d'acides nucléiques, les acides ribonucléiques (ARN) et les acides désoxyribonucléiques (ADN). Ces derniers composent les gènes, qui à leur tour constituent les 23 paires de chromosomes présentes dans le noyau de nos cellules.

B-1-1-La double hélice

A regarder de plus près la molécule d'ADN, on reconnaît une structure plus fine dite en ''double hélice'' composée de deux brins joints, à la manière d'une fermeture éclair, par une myriade de petites molécules appelées des bases (Fig. II-6). Il existe quatre types de bases pour l'ADN, l'Adénine (A), la Thymine (T), la Guanine (G) et la Cytosine (C). La succession de ces quatre bases dans l'ADN forme des séquences à l'origine même du codage génétique. En ce qui concerne l'ARN, la base T est remplacée par la base U (pour Uracile) et sa structure est un simple brin.

Pour l'ADN, chaque brin est construit autour d'une structure solide mais flexible de sucre phosphaté sur laquelle sont fixées chimiquement les bases (Fig. II-6). La molécule d'ADN humain est constituée de plusieurs millions de paires de bases, et mesure près de 7 mètres, on considère que sur un même brin, la distance entre les centres de deux bases consécutives est de 0,34 nm, et que le poids moléculaire moyen d'une base est de 300 Daltons.

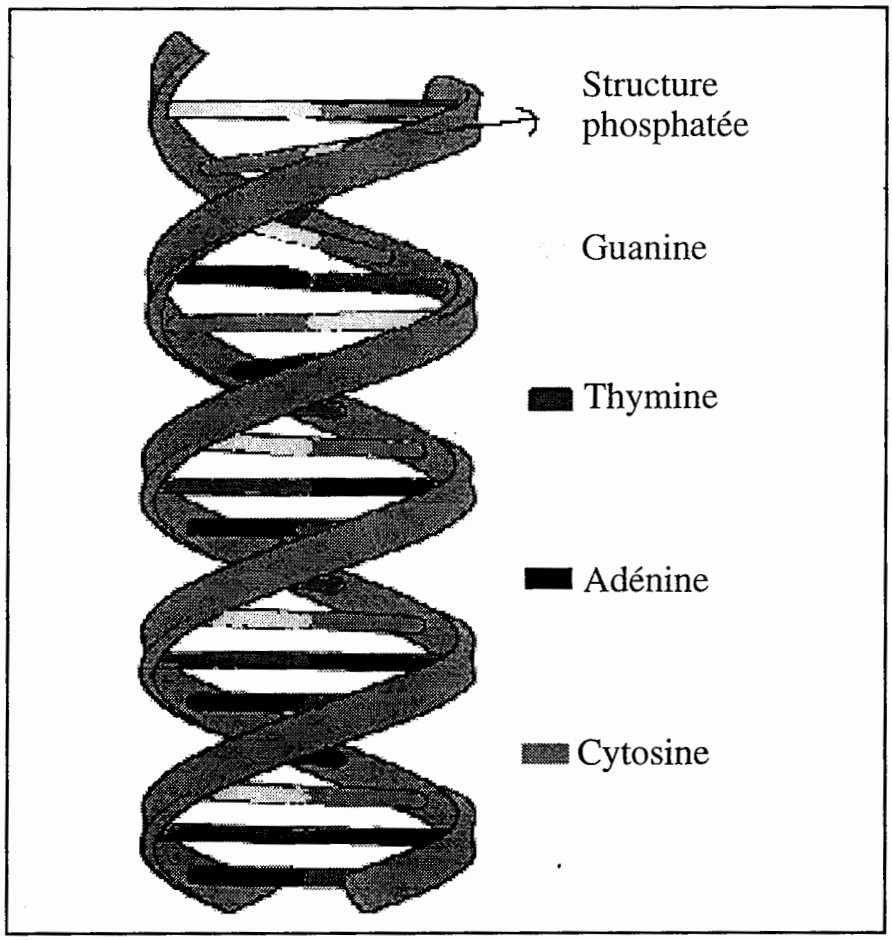


Figure II-6 : Représentation d'un fragment d'ADN en configuration double hélice.

La lecture du code génétique s'opère par reconnaissance base à base des deux brins lors de la phase d'hybridation, mais cette reconnaissance obéit à des lois que nous allons voir plus loin.

B-1-2-L'appariement des bases.

Les interactions entre acides nucléiques que nous allons étudier se bornent à l'association et à la dissociation de l'ensemble des paires de bases d'un fragment d'ADN. On appelle ces deux phases, hybridation et dénaturation. Le principe de la réplication de l'ADN,

donc du patrimoine génétique, de l'hybridation et d'autres fonctions complexes liées à l'ADN, repose sur l'appariement d'une part, des bases A et T et, d'autre part, des bases G et C (Fig. II-7). Dans cette figure, représentant la structure des quatre bases, on peut noter qu'à la différence de la paire A-T, la paire G-C interagit via trois liaisons hydrogène au lieu de deux. Cela signifie que l'appariement G-C est plus fort que celui liant les bases A et T.

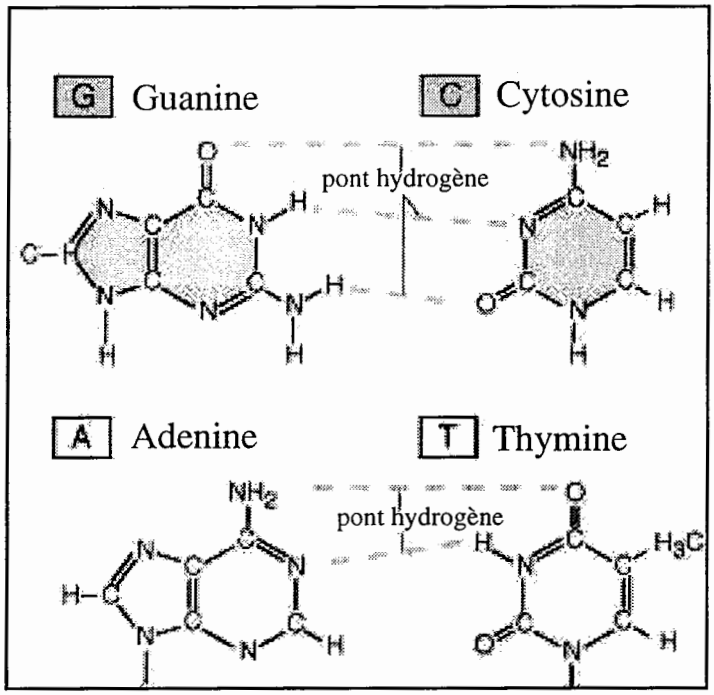


Figure II-7 : Représentation en symboles chimiques des quatre bases constituant l'ADN ainsi que leur mode d'appariement.

Toutefois, dans certains cas que nous développerons plus loin, il peut y avoir d'autres types d'appariements, mais qui demeureront instables sous certaines conditions de pH ou de température. Les liaisons entre bases appariées sont uniquement des liaisons hydrogène (beaucoup plus faibles que les liaisons antigènes-anticorps) soumises à des conditions draconiennes de pH et de température. Par exemple, une hybridation à température ambiante (20±2 °C) et à pH 7,4 (le pH physiologique du sang), requiert une concentration de 137 mM en NaCl et de 50 mM en ions phosphates. Il est impossible de réaliser une hybridation dans l'eau désionisée, les interactions entre bases ne pouvant avoir lieu.

Nous parlerons d'hybridation entre oligonucléotides plutôt qu'entre fragments d'ADN, ce dernier terme correspondant en effet à des séquences beaucoup plus longues que celles sur lesquelles nous avons travaillé. La section suivante définit le nucléotide ainsi que ses interactions avec ses voisins au sein d'une séquence.

B-1-3-Les oligonucléotides

Un nucléotide est une base munie d'un élément structurel de sucre (désoxyribose) phosphaté, se comportant comme un squelette rigide pour les bases, comme le montre en partie la figure II-8. Par extension, un oligonucléotide correspondra à un petit ensemble de nucléotides sous la forme d'ADN simple-brin. Il existe également une convention pour parler, par exemple, d'un fragment simple-brin d'ADN de seulement 15 bases : on dira 15-mers, ou plus généralement n-mers pour un brin muni de n bases.

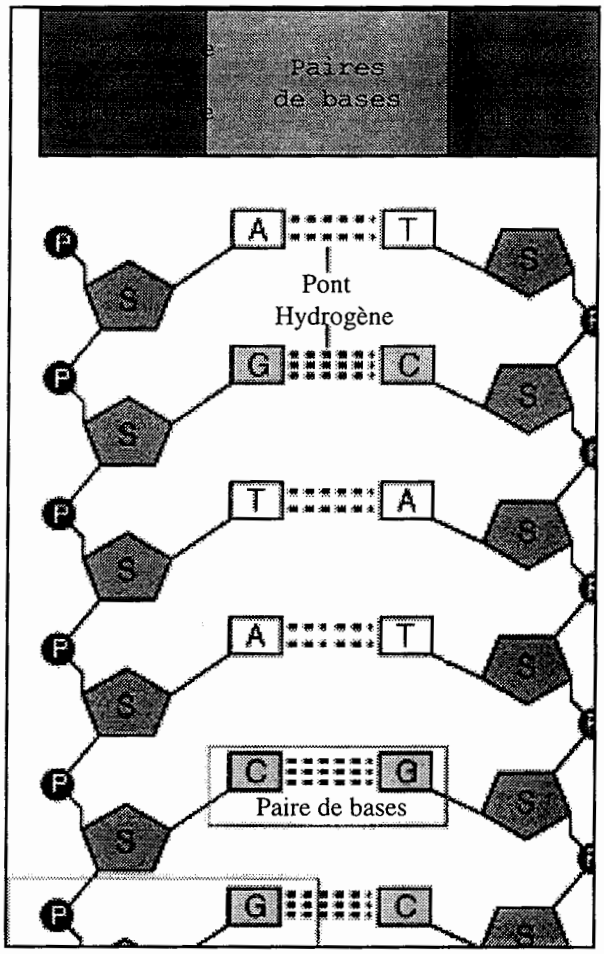


Figure II-8 : Représentation schématique de la liaison entre deux oligonucléotides.

Outre les liaisons hydrogènes entre deux bases appariées, rappelant le fait que les bases G et C ont trois liaisons hydrogènes contre deux pour les bases A et T, on note sur la figure II-8, que les paires de bases une fois appariées tissent entre elles d'autres liaisons (ponts hydrogène) pour renforcer la stabilité du duplex formé entre deux oligonucléotides complémentaires. Regardons maintenant de plus près les conditions d'association et de dissociation de deux oligonucléotides complémentaires.

II-B-2-Hybridation et dénaturation

L'hybridation réside dans la reconnaissance d'un simple-brin d'ADN fixé sur un substrat, par sa séquence complémentaire, c'est à dire dont les bases s'apparient parfaitement avec celles du premier brin (Fig. II-8). Dans le cas où une base de la séquence complémentaire ne correspond pas à celle de la séquence conjuguée, l'appariement des deux brins d'ADN n'est plus parfait et l'intérêt de l'expérience réside alors dans la détection de ce désappariement, que l'on appelle mutation ponctuelle. Par opposition à l'hybridation, la dénaturation est le phénomène biochimique lié à la séparation des deux brins d'ADN. Les interactions entre oligonucléotides étant réversibles, la méthode d'ancrage des simples brins sur la surface est, comme nous le verrons dans le chapitre suivant, d'une réelle importance. Nous parlerons par la suite, de séquence sonde (ou oligonucléotide sonde) pour la séquence connue, qui souvent est la séquence immobilisée, et de séquence cible (ou oligonucléotide cible) pour la séquence inconnue.

B-2-1-L'hybridation

Les hybridations que nous avons réalisées se sont toutes déroulées à température ambiante soit 20±2 °C. A cette température, tous les indices de réfraction des milieux impliqués dans la transduction optique sont connus à 4 décimales près. Le tampon d'hybridation utilisé est constitué de 137 mM de NaCl et de 50 mM d'ions phosphate et appelé tampon PBS (Phosphate Buffer Saline). Les oligonucléotides complémentaires sont directement dilués dans ce tampon puis injectés dans la cellule d'hybridation. La solution d'hybridation est injectée dans la cellule pendant 20 minutes à un débit de 10 µl/min. Puis, l'ensemble des capteurs est rincé abondamment en PBS pur afin d'éliminer les oligonucléotides non hybridés. Il est à signaler que lors de l'hybridation, la séquence complémentaire vient s'accoler à la sonde immobilisée en inversant son sens de lecture qui va normalement de 5' à 3' (cf. II-C-2), la partie 5' de la sonde se trouvera donc en vis à vis avec la partie 3' de la séquence complémentaire.

B-2-2-La dénaturation

Il existe deux méthodes pour séparer un duplex d'ADN. En effet, la stabilité d'un duplex parfait, c'est à dire un duplex dont toutes les bases sont appariées, dépend des conditions de pH et de température de la solution dans laquelle baignent les duplex. Nous détaillons ces deux méthodes qui s'attachent toutes les deux à briser les liaisons hydrogène entre bases.

B-2-2-1-Dénaturation thermique

Un oligonucléotide se caractérise par sa température de fusion. Cette température est fonction de la constitution de la séquence du double-brin après hybridation. Elle définit le seuil thermique à partir duquel la double hélice s'ouvre (rupture des ponts hydrogènes) pour 50% des duplex. On peut donc dénaturer un duplex en portant la température du tampon, dans lequel il baigne, jusqu'à la température de fusion. Toutefois, ne négligeons pas le fait que notre biocapteur est un dispositif optique et que les indices de réfraction dépendent de la température. Aussi, la dénaturation thermique n'est pas indiquée dans notre cas, à moins de contrôler la cellule d'hybridation en température et de corriger la valeur des indices en temps réel en connaissant précisément la dispersion de tous les indices intervenant dans le biocapteur, ce qui n'est pas très adapté à des dispositifs optiques. Nous procéderons plutôt à la dénaturation par la variation de pH (ou de force ionique) au sein de la cellule d'hybridation.

B-2-2-2-Dénaturation par variation de pH

Cette méthode de dénaturation repose sur le fait que seules les forces ioniques unissent le duplex formé par l'hybridation. En brisant ces forces, la double hélice va s'ouvrir (à plus de 50%) et l'oligonucléotide complémentaire va se dissocier et va être éliminé de la cellule d'hybridation. Pour parachever la dénaturation, on injecte dans la cellule pendant une durée très brève (2 à 5 secondes) de la soude (NaOH) à une concentration de 50 mM ce qui a pour effet de modifier sensiblement le pH du milieu aqueux dans lequel baignent les éléments du capteur. Ce choc ionique finit de séparer tous les duplex. Un rinçage à fort débit en eau s'ensuit afin de limiter les dommages potentiels liés au passage de la soude à proximité de la surface du capteur.

II-B-3-Recherche de mutations ponctuelles

Les mutations ponctuelles font à ce jour l'objet de recherches accrues, notamment en cancérologie, en infectiologie et dans le domaine des thérapies géniques. En effet, une erreur dans la retranscription d'une séquence lors de la réplication de l'ADN peut engendrer un grand nombre de pathologies, aussi, rechercher des mutations ponctuelles devient un instrument de diagnostic essentiel dans ces domaines. À la différence de la technique de séquençage par hybridation, qui a pour but le décryptage d'une séquence inconnue, la recherche de mutations ponctuelles s'appuie sur la connaissance *a priori* d'une séquence complémentaire dont une des bases aurait été substituée. Typiquement, la procédure est la suivante : on dispose d'autant de plots d'oligonucléotides qu'il y a de mutations connues pour la séquence en question. On injecte ensuite dans la cellule d'hybridation la séquence cible, d'origine clinique en général, afin de réaliser des hybridations sur chacun des spots. À partir de ce stade, différentes voies s'ouvrent

à la discrimination de mutations ponctuelles, nous donnons dans cette partie quelques méthodes employées notamment avec des dispositifs optiques.

B-3-1-Méthodes de discrimination d'une mutation ponctuelle

Nous ne présenterons que trois méthodes de discrimination de mutations ponctuelles. Ces trois méthodes sont directement applicables à des capteurs optiques et reposent pour la première, sur la valeur de la constante d'affinité mesurée sur une cinétique d'hybridation et pour les deux autres, sur la stabilité du duplex face à une variation de température, et face à une légère variation de pH.

B-3-1-1-Discrimination par comparaison de la constante d'affinité

Dans la section A-4 de ce chapitre nous avons introduit la notion de constante d'affinité lors d'une reconnaissance antigènes-anticorps, cette notion est tout à fait adaptable à l'hybridation de deux simple-brins d'ADN. Mais contrairement aux applications immunologiques de la constante d'affinité, où cette dernière permet de comparer le comportement d'un anticorps par rapport à un autre vis à vis du même antigène, dans le cas des oligonucléotides, K rend compte de la complémentarité entre deux oligonucléotides. En effet, la constante d'affinité tient compte de la vitesse de la réaction et de la stabilité du duplex, deux paramètres liés à la force unissant les deux oligonucléotides. Or, cette force est la résultante de celles unissant chacune des paires de bases. Bien que des liaisons autres que A-T et G-C (appariements classiques) soient possibles, leur stabilité dépend des bases en contact. Ainsi, les liaisons G-A et G-T sont bien plus stables que les liaisons A-A, T-T, C-T ou C-A[11]. En déterminant la valeur de la constante d'affinité lors d'une hybridation entre oligonucléotides totalement complémentaires, on dispose alors d'une valeur de référence fixant un maximum pour K. Lors d'une expérience où la séquence complémentaire est d'origine biologique, on saura si la séquence inconnue est mutée pour tout K inférieur à la constante d'affinité de référence.

B-3-1-2-Discrimination par variation de température

Comme nous l'avons vu dans la section B-2-2-1, la température de fusion dépend de la constitution de la séquence du duplex. En fait, cette dépendance s'explique par la force des liaisons hydrogène unissant les paires de bases. Outre les appariements classiques A-T et G-C, qui sont des liaisons relativement fortes, d'autres types d'appariements peuvent exister lors de mutations ponctuelles. Ces liaisons étant plus faibles que les liaisons classiques, la température de fusion d'un duplex de ce type se trouve être plus basse qu'un duplex parfaitement complémentaire. Il y a donc possibilité de discriminer une séquence mutée en comparant les températures de fusion.

B-3-1-3-Discrimination par variation de pH

Par analogie avec la section B-2-2-2, où nous montrions la dépendance de la stabilité d'un duplex envers le pH du milieu en contact avec le capteur, nous présentons une méthode alternative de discrimination de mutations ponctuelles s'appuyant sur l'adjonction de soude à une concentration inférieure à 10 mM dans le tampon PBS classique. Feriotto et al. [12] ont remarqué que dans un tel tampon, la cinétique d'hybridation (réalisée avec le Biacore), pour un duplex parfaitement complémentaire, ne subissait qu'une petite perte de signal après rinçage, alors que pour un duplex présentant une mutation ponctuelle, la dénaturation était presque totale. Cette méthode de discrimination offre donc un intérêt non négligeable puisque qu'elle revient à un système ''tout-ou-rien''. Toutefois, le diagnostic, pour être pris en compte, doit tenir compte de la localisation de la mutation, symptômatique de la pathologie contractée. Nous donnons, dans la section suivante, une méthode de localisation d'une mutation par hybridations successives de petites séquences.

B-3-2-Méthode de localisation d'une mutation dans une séquence

Détecter la présence d'une mutation ponctuelle sur une séquence d'ADN pourrait suffir à établir un diagnostic, uniquement si la séquence en question ne présente toujours que la même mutation (hot spot), ce qui est loin d'être une généralité. Dans la plupart des cas, les séquences étudiées présentent plusieurs types de mutations possibles ; il faut donc dans un premier temps localiser la base incriminée, puis l'identifier et ainsi pouvoir établir un diagnostic précis et fiable.

C'est encore une fois avec l'aide de la constante d'affinité que nous allons pouvoir localiser la base désappariée au sein d'une séquence. En effet, les valeurs de K seront d'autant plus basses que la base mutée sera proche du centre de la séquence injectée dans la cellule[13]. Une fois la présence d'une mutation mise en évidence par une première hybridation, on localise cette mutation en réalisant successivement des hybridations sur des séquences adaptées, immobilisées à la surface du capteur dont on fera varier une base à chaque fois. La séquence pour laquelle la constante d'affinité sera la plus forte (appariement parfait) déterminera le type de mutation grâce à la connaissance de la séquence-sonde immobilisée.

II-B-4-Conclusion

Nous avons présenté brièvement la structure des acides nucléiques et les modes d'interactions auxquels ils sont soumis pour réaliser *in vitro* des hybridations menant à la reconnaissance d'une séquence d'ADN ou bien à la présence d'une mutation ponctuelle sur un oligonucléotide. Outre le problème de la détection du signal physique rendant compte d'une

hybridation, la difficulté pouvant limiter les performances d'un capteur biomoléculaire consiste dans la préparation des capteurs, à savoir le mode d'immobilisation des molécules biologiques sur la surface du transducteur. Nous proposons, après une présentation succincte des biomolécules retenues dans notre étude, de décrire quelques modes d'immobilisation pour les anticorps d'une part, et pour les oligonucléotides d'autre part.

II-C-Présentation des biomolécules étudiées

Nous ne reviendrons pas dans cette section sur la présentation des IgG, mais plutôt sur l'intérêt physiopathologique des protéines dont nous avons étudié les interactions, avec des immunoglobulines monoclonales. Nous nous intéresserons également au système avidine-biotine et à la molécule d'albumine sérique bovine ou BSA (Bovin Serum Albumin), espèce s'adsorbant facilement sur l'or et permettant la réduction de réactions non-spécifiques. Nous présenterons dans un second temps, les séquences d'oligonucléotides utilisées durant les expériences d'hybridation.

II-C-1-Hormones et protéines

Durant ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à trois couples antigènes-anticorps, dont deux couples hormones-anticorps, et un couple protéines-anticorps. Dans les trois cas, les anticorps sont monoclonaux. Comme nous le verrons dans la partie III-D, le système avidine-biotine a également fait l'objet d'une étude, mais celle-ci n'était pas destinée à doser la biotine en solution contrairement aux couples précédents.

C-1-1-L'hormone chorionique gonadotropine humaine

L'hormone chorionique gonadotropine humaine (hCG), est une hormone produite chez la femme uniquement pendant sa grossesse. Lorsque elle est présente chez un homme, elle constitue un diagnostic d'un cancer des testicules. Cette hormone est formée d'un dimère composé d'une sous-unité α et une sous-unité β formant un enchevêtrement simple (Fig. II-9). Sa masse moléculaire est voisine de 40 Kda et ses dimensions de 7,5 X 3,5 X 3,5 nm^3.

Chacune des deux sous-unités possèdent un épitope spécifique reconnu par un anticorps monoclonal[14-18]. La sous-unité α est reconnue par l'anticorps HT13 et la sous-unité β par l'anticorps FBT10, deux anticorps monoclonaux produits à l'Institut Gustave Roussy (IGR), Villejuif. Quand les serums humains contiennent des concentrations ne permettant pas de

détecter l'hCG avec un dispositif RPS, on peut alors procéder à un test sandwich (cf. I-A) afin de révéler la présence de l'hormone avec le FBT10.

Nous avons choisi ce couple pour comparer la sensibilité analytique du système RPS et du MR (cf. chapitre III) et nous en avons déterminé la constante d'affinité dont la valeur était en accord avec les autres techniques de mesures utilisées en routine.

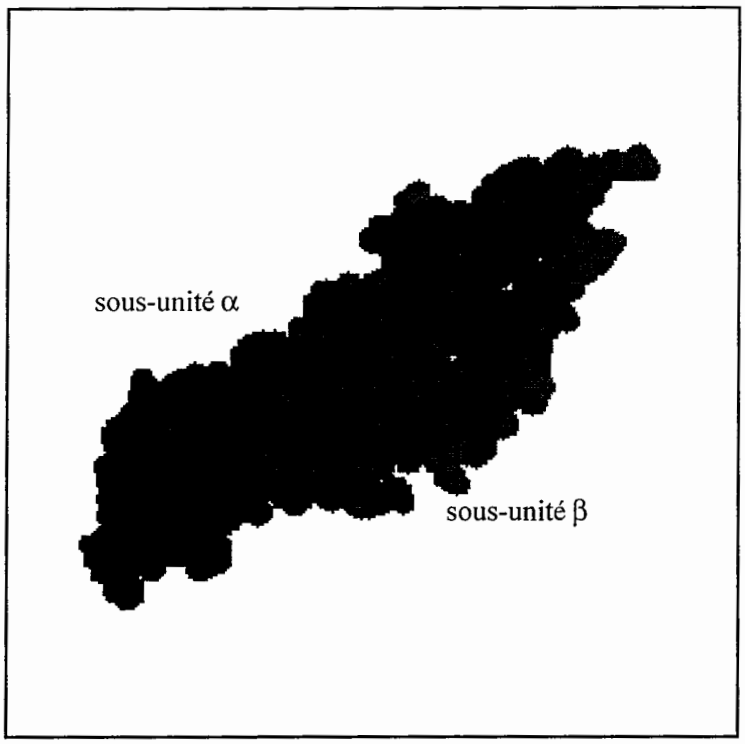


Figure II-9 : Représentation moléculaire de l'hCG.

C-1-2--L'hormone Thyroglobuline

La thyroglobuline (TG) est une protéine de masse moléculaire élevée (330kDa), sécrétée par les cellules de la membrane interne des follicules thyroïdiens. Son rôle essentiel est de fixer l'iode de l'organisme pour doser deux hormones thyroïdiennes. C'est un marqueur biologique d'une tumeur thyroïdienne. Elle peut être détectée par des anticorps monoclonaux. Dans ce travail, nous avons utilisé l'anticorps monoclonal anti-TG [19] produit à l'IGR.

C-1-3-L'alpha-foetoprotéine

L'alpha-foetoprotéine (AFP) est une protéine oncofoetale de masse moléculaire voisine de 60Kda, sécrétée par le foie et qui joue le rôle de l'albumine chez le foetus humain. Sa présence chez l'adulte est symptômatique en général d'une cirrhose hépatique pour les

pathologies bénignes, ou d'un cancer du foie dans les cas malins, voire des testicules dans le cas d'une tumeur germinale. La production et les caractéristiques de l'anticorps monoclonal anti-AFP ont été décrites[20].

C-1-4-Le système avidine-biotine

L'avidine est une protéine formée par deux chaînes croisées possédant chacune deux sites de reconnaissance pour la biotine (Fig. II-10). Ce système est surtout utilisé comme voie d'immobilisation pour d'autres biomolécules (cf. chapitre II-D). La molécule d'avidine a une masse moléculaire de 60 kDa pour un volume de 5,4 X 5,8 X 4,8 nm^3, tandis que la biotine n'a qu'une masse moléculaire d'environ 240 Da.

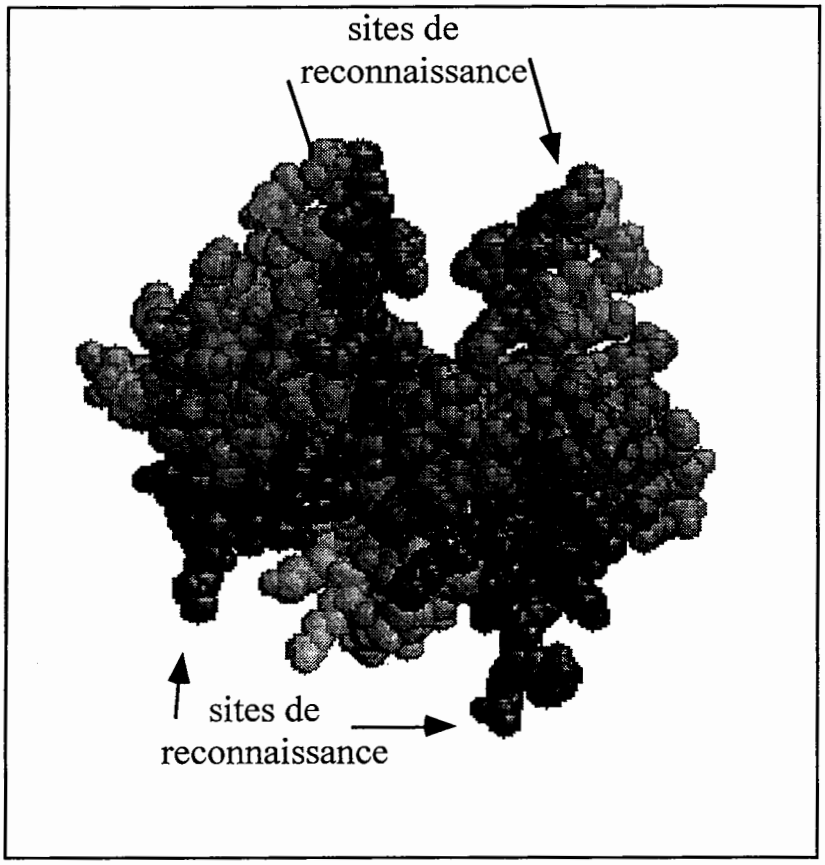


Figure II-10 : Représentation moléculaire de l'avidine.

L'indice optique de la molécule d'avidine est estimé dans la littérature entre 1,45[21] et 1,50[22]. Nous avons fait appel à la méthode des moindres carrés pour ajuster au mieux les courbes de réflectivité RPS rendant compte de l'épaisseur optique engendrée lors de l'adsorption passive de l'avidine pour trouver finalement un indice optique de 1,47 pour l'avidine.

C-1-5-L'albumine sérique bovine (BSA)

Nous n'avons pas utilisé l'albumine sérique bovine (BSA, pour Bovin Sérum Albumin) pour ses propriétés immunogéniques, mais pour ses propriétés de blocage biologique. En effet, cette protéine animale de 68 kDa est utilisée en grande partie pour saturer les sites libres à la surface du biocapteur après l'immobilisation d'une espèce biologique. Son hydrophobicité l'amène à couvrir toutes les surfaces accessibles sur lesquelles elle se dénature (dépliement). On peut ainsi prévenir l'adsorption non spécifique de l'espèce dirigée spécifiquement contre celle immobilisée.On peut la représenter sous la forme de la figure II-11.

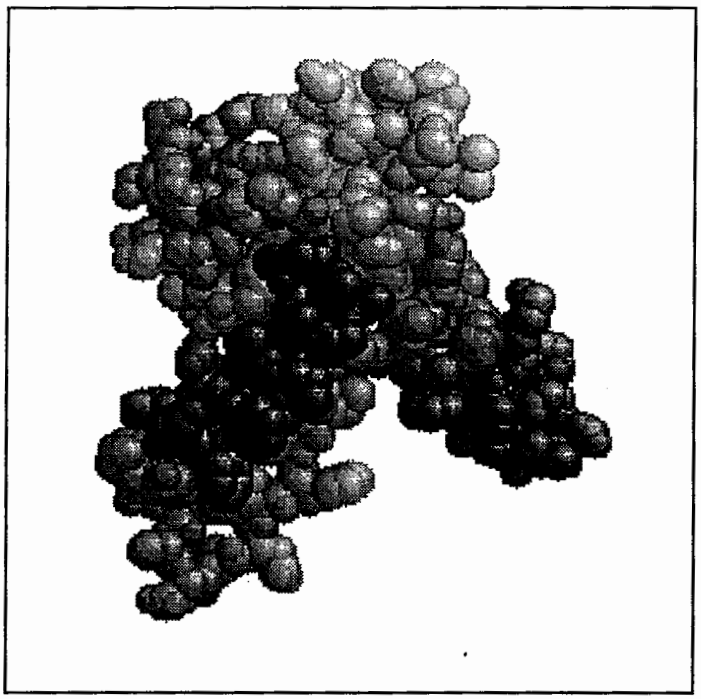


Figure II-11 : Représentation moléculaire de la BSA.

II-C-2-Séquences oligonucléotidiques et leurs caractéristiques

Tous les oligonucléotides que nous avons utilisés ont été synthétisés par la société GENSET (Paris, France) avec une pureté de 90%. Nous avons choisi comme convention de nommer les séquences des oligonucléotides-sondes (immobilisés en surface) par des abréviations définissant leur action. Par exemple, M5 pour mutation numéro 5, WT pour séquence normale (séquence native ou wild-type) et CP pour contrôle positif (qui ne réagit qu'avec sa séquence complémentaire, elle-même ne présentant aucune homologie avec les séquences pré-citées). Par contre le nom des séquences d'oligonucléotides-cibles (que l'on injecte) sera suivi d'un astérisque (*) symbolisant les séquences complémentaires.

Nous n'avons utilisé que des oligonucléotides 15-mers, dont nous présentons les noms et séquences d'une part pour les sondes qui sont immobilisées à la surface du capteur dans le tableau II-a, et d'autre part, pour les séquences cibles biotinylées dans le tableau II-b.

nom	séquence
M5	5'-TGG.AGC.TG**C**.TGG.CGT-3'
M4	5'-TGG.AGC.TG**A**.TGG.CGT-3'
WT	5'-TGG.AGC.TG**G**.TGG.CGT-3'
CP	5'- CCT.TGA.CGA.TAC.CGT-3'

Tableau II-a : Noms et séquences des oligonucléotides-sondes immobilisés à la surface du capteur. Les lettres en gras symbolisent les bases où se situe la mutation.

nom	séquence
M5*	5'-Biotine.ACG.CCA.**G**CA.GCT.CCA-3'
M4*	5'-Biotine.ACG.CCA.**T**CA.GCT.CCA-3'
WT*	5'-Biotine.ACG.CCA.**C**CA.GCT.CCA-3'
CP*	5'-Biotine.GCT.GTA.TCG.TCA.AGG-3'

Tableau II-b : Noms et séquences des oligonucléotides-cibles biotinylés (ou séquences complémentaires). Les lettres en gras symbolisent les bases où se situe la mutation.

Ces séquences appartiennent à l'oncogène K-ras, et les mutations ponctuelles qui peuvent y apparaitre sont connues pour entraîner des adénocarcinomes (cancer affectant les tissus glandulaires) du pancréas, du colon et des poumons et également dans certains types de tumeurs sanguines malignes.

Nous distinguerons les mutations ponctuelles en gras pour chacune des deux séquences M4 et M5, alors que la séquence CP est totalement non-complémentaire puisqu'elle jouera le rôle de contrôle positif dans nos expériences. On estime la distance entre deux bases à 0,34 nm, nos séquences ont donc une taille de 5,1 nm. Afin de remonter au nombre de molécules impliquées dans les différentes hybridations que nous avons effectuées, nous avons besoin de connaître le poids moléculaire de chaque oligonucléotide, donné par GENSET. Nous récapitulons ces valeurs dans le tableau II-c.

séquence	M4*	M5*	WT*	CP*
Poids moléculaire(Da)	4625	4480	4465	4606

Tableau II-c : Masse molaire des séquences d'oligonucléotides.

Ces valeurs nous permettrons plus loin (cf. III-C) de quantifier le nombre d'oligonucléotides impliqués dans les réactions d'hybridation.

La connaissance des modes d'interactions moléculaires décrits précédemment nous amène naturellement vers la description et la constitution de la couche biosensible, dernier élément du biocapteur optique à mettre en place avant de mener des expériences de reconnaissance moléculaire. Nous donnons dans la section suivante, quelques modes d'immobilisation aussi bien pour les protéines que pour les acides nucléiques. Nous détaillerons les avantages et les inconvénients des uns par rapport aux autres.

II-D-Les différentes voies d'immobilisation

Les techniques d'immobilisation de biomolécules à la surface d'un capteur présentent deux aspects principaux. Tout d'abord, dans le cas de l'adsorption passive, les molécules interagissent avec le substrat en se fixant aléatoirement, au risque de perdre leur réactivité. Le deuxième aspect de l'immobilisation consiste à fixer les molécules de façon covalente en préservant leur réactivité. Dans ce cas, on a la possibilité de répéter la même expérience plusieurs fois de suite sur le même capteur, ce qui permet la comparaison de résultats obtenus dans les mêmes conditions opératoires. Le second intérêt dérive du premier, puisqu'il s'agit du coût d'un capteur, étant divisé par le nombre d'utilisations qu'on peut en faire. Mais l'origine des procédés de chimie de surface reliant le substrat (or ou SiO_2) aux molécules biologiques est due aux premières études immunologiques requérant une immobilisation des anticorps par leur fragment F_c, de façon à assurer la disponibilité des deux paratopes de l'IgG et ainsi optimiser le signal de complexation avec l'antigène. Nous allons décrire les différentes voies d'immobilisation utilisées dans le cadre de ce travail de thèse en commençant par le phénomène d'adsorption passive à même le transducteur, puis une méthode s'appuyant sur l'utilisation d'une couche chimique destinée à la fixation des anticorps. Viendra ensuite la description d'une méthode jouant sur l'association avidine-biotine, pouvant être utilisée aussi bien en immunologie qu'en biologie moléculaire, et enfin, une technique électrochimique basée sur l'utilisation d'un polymère associé à des oligonucléotides.

II-D-1-L'adsorption passive

Cette méthode d'immobilisation ne requiert aucune chimie de surface, mais ses résultats dépendent fortement de l'état de surface du substrat (cf. Annexe III). L'adsorption passive consiste en l'immobilisation de biomolécules de façon non-covalente à même le substrat. De par

la structure filiforme d'un oligonucléotide, cette méthode est tout à fait inadaptée aux réactions d'hybridation et n'a été utilisée que pour la reconnaissance antigènes-anticorps. Les interactions entre la biomolécule et le substrat sont mal connues mais relèvent à divers degrés de liaisons hydrogènes et du phénomène de nucléation ''emprisonnant'' les molécules adsorbées sur la surface du transducteur, présentant un profil très rugueux à l'échelle du nanomètre. L'IgG est loin d'être isotrope fonctionnellement, ce qui signifie que son adsorption peut s'effectuer par une partie immunologiquement active ou non (Fig. II-12). Il s'ensuit qu'en moyenne, seuls 60 à 70% des molécules seront adsorbées par le fragment non fonctionnel de l'IgG[23]. Cette voie d'immobilisation n'est donc pas optimale pour le signal de reconnaissance biomoléculaire qu'on s'attend à suivre en injectant l'antigène dans la cellule de réaction. De plus, la régénération du capteur, c'est à dire la réversibilité du processus de complexation, n'est pas possible avec ce type d'immobilisation. Toutefois, elle offre une simplicité de mise en oeuvre certaine, et les résultats obtenus ne sont pas si éloignés, en terme de sensibilité analytique, de ceux obtenus avec une immobilisation covalente réalisée avec le dextran, le polymère utilisé notamment dans le Biacore (cf. chapitre III-A).



Figure II-12 : Schéma représentant des immunoglobulines adsorbées passivement sur de l'or. Les sites de reconnaissance sont symbolisés par des points.

II-D-2-Immobilisation covalente d'anticorps à l'aide d'un ancrage chimique

Parmi les voies alternatives d'immobilisation de molécules biologiques, il existe différents procédés issus du génie chimique. Ces procédés consistent soit en l'utilisation d'un revêtement homogène, comme les sol-gels ou les polymères, soit de molécules organiques bifonctionnelles qui, d'une part, s'ancrent à la surface du transducteur, et, d'autre part, réagissent avec un radical de la molécule à immobiliser.

Nous avons pris le parti de fonctionnaliser certains de nos capteurs avec des molécules de cystéamine, dont la formule chimique est la suivante : $SH\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}NH_2$. La fonction thiol (SH) est connu pour s'adsorber très bien sur l'or, tandis que la fonction amine NH_2 est susceptible de réagir avec un groupement NHS (N-hydroxy-succinimide), porté par exemple par une biotine. Nous donnons dans la figure II-13 la représentation d'une surface d'or

recouverte de molécules de cystéamine prêtes à réagir avec n'importe quelle molécule possédant un radical NHS.

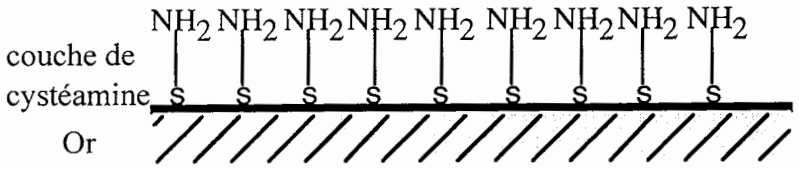


Figure I-13 : Représentation d'une couche bi-fonctionnelle de cystéamine, ancrée par son thiol sur l'or.

La couche d'ancrage chimique, outre le fait de lier de façon covalente les ligands, permet l'utilisation du capteur sur toute sa surface, puisque les radicaux qui interagissent se trouvent répartis de façon homogène.

II-D-3-Le système avidine-biotine

L'avidine et la biotine sont deux molécules animales formant un complexe avec une constante d'affinité de 10^{15} M^{-1}, qui est une valeur extrêmement forte. En générale, pour immobiliser une protéine quelconque avec cette méthode, on pré-immobilise une monocouche d'avidine sur le substrat (par adsorption passive, ou par liaison covalente) puis on injecte la protéine à immobiliser, préalablement couplée à une molécule de biotine. La forte affinité entre l'avidine et la biotine, permet d'immobiliser la protéine biotinylée de façon quasi-covalente. Bier et al. a démontré que le mode de fixation (par adsorption passive ou de façon covalente) de la monocouche d'avidine importe peu et que les résultats en terme d'immobilisation de protéines sont quasiment les mêmes quelle que soit la méthode choisie[24]. Ce système est très largement utilisé pour les expériences immunologiques, mais sa principale utilisation demeure l'immobilisation d'oligonucléotides biotinylés sur les molécules d'avidine[25]. On peut également rencontrer une autre voie suivie par Fysons, basée sur l'utilisation du miroir résonant (cf. I-B-4-2) dont les capteurs sont recouverts d'une monocouche de biotine, prête à fixer une couche d'avidine, elle-même prête à fixer une protéine ou un oligonucléotide biotinylé. La démarche de Biacore est légèrement différente puisqu'ils immobilisent l'avidine de façon covalente via le carboxyméthyl-dextran[26].

Pour notre part, nous avons utilisé ce mode d'immobilisation biologique aussi bien dans le cadre de l'adsorption passive d'avidine que dans celui de l'immobilisation covalente. L'étude en résultant est décrite dans la partie III-C. Toutefois, nous décrivons ici les systèmes multi-couches ainsi formés. Ainsi, la figure II-14 représente la structure biologique nécessaire pour

immobiliser des oligonucléotides via un couplage avidine-biotine par adsorption passive de l'avidine.

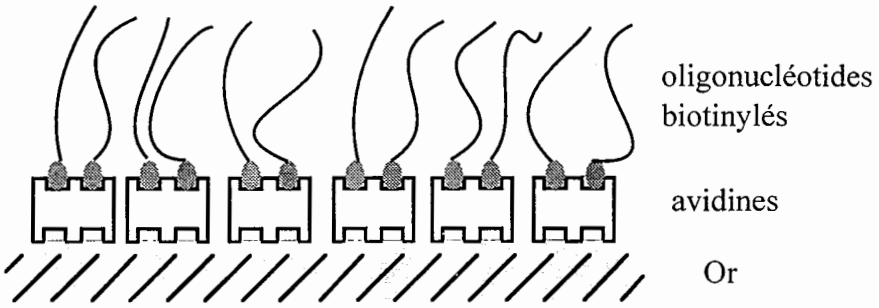


Figure II-14: Schéma lié à l'adsorption passive de l'avidine conduisant, par un couplage avidine-biotine, à immobiliser des oligonucléotides.

L'avidine, en effet, est très bien adsorbée sur le substrat d'or, et les oligonucléotides biotinylés disposent environ de la moitié des sites de reconnaissance des molécules d'avidine pour être immobilisés de façon quasi-covalente. *A contrario*, on peut fixer l'avidine de façon quasi-covalente en utilisant une couche de cystéamines fixé sur l'or (Fig. II-15) et munie de radicaux COOH dirigés vers le milieu extérieur. On pré-immobilise ainsi des molécules de sulfo-NHS-biotines se liant de façon covalente aux radicaux COOH de l'hydrogel par leur fonction NHS. On dispose ainsi d'une couche de surface préparée à l'immobilisation quasi-covalente de molécules d'avidine. A ce stade, on procède comme dans le cas précédent pour obtenir une surface fonctionnalisée par la présence d'oligonucléotides.

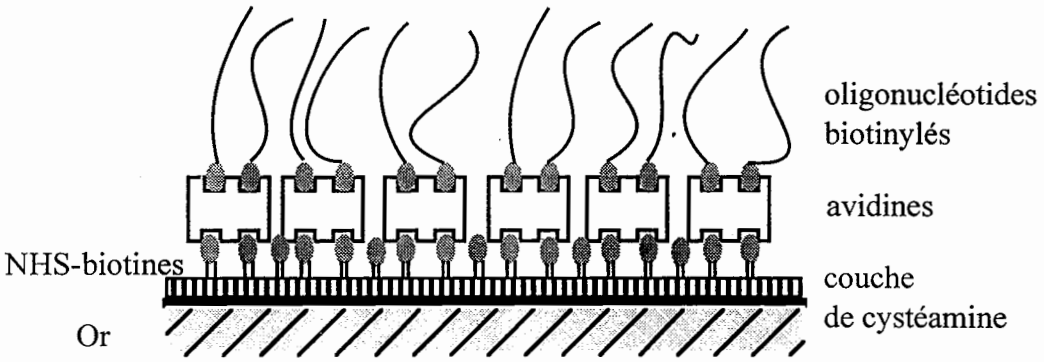


Figure II-15 : Schéma lié à la fixation covalente de NHS-biotines sur une couche de cystéamines conduisant par un couplage avidine-biotine à immobiliser des oligonucléotides.

II-D-4-Immobilisation covalente d'oligonucléotides à l'aide d'un polymère conducteur

Les méthodes décrites précédemment sont en général utilisées pour des capteurs à un élément. Si à présent l'on s'intéresse aux multicapteurs, destinés à reconnaître des réactions d'hybridations en parallèle, il faut se tourner vers un système sélectif de façon à immobiliser différentes espèces en différents endroits du substrat, et très reproductible afin que tous les éléments du capteur soient comparables. Livache et al.[27-28] ont développé un processus électrochimique qui répond à ces attentes. Le principe d'immobilisation repose sur l'électropolymérisation à la surface d'un matériau conducteur, d'une solution de pyrroles simples mélangés à des oligonucléotides couplés à un pyrrole. Lors de la réaction de polymérisation, tous les pyrroles se lient pour former un maillage compact, et les séquences d'ADN sont immobilisées de façon covalente (Fig. II-16). On peut, à l'aide d'une micropipette, déposer autant de gouttes de solution mixte que l'on veut (chacune avec une séquence différente par exemple) en les copolymérisant indépendamment pour ainsi disposer d'un multicapteur prêt à l'emploi.

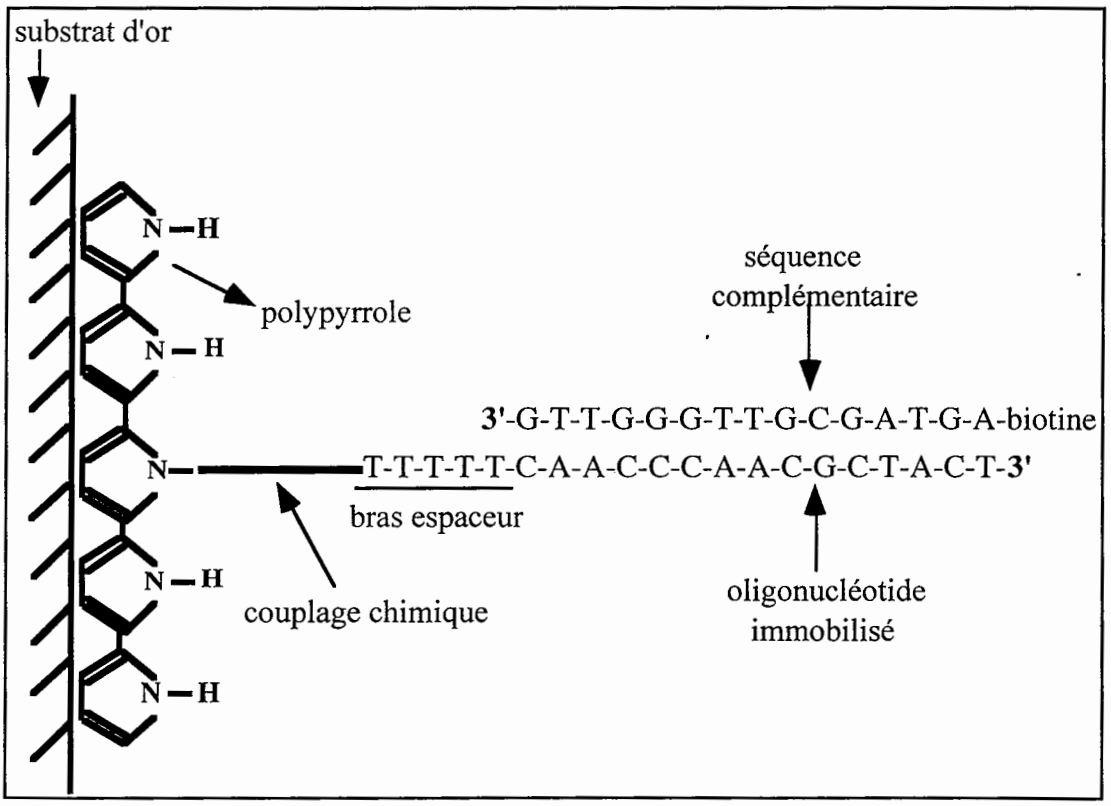


Figure II-16 : Représentation schématique de la chimie de surface permettant la fixation covalente d'oligonucléotides par copolymérisation sur un métal de molécules de pyrrole et d'une séquence d'ADN.

La liaison entre le simple-brin d'ADN et la molécule de pyrrole est assuré lors de la synthèse des oligonucléotides , en considérant le pyrrole comme une cinquième base. Sur la figure II-16, on voit apparaître également un bras espaceur constitué de bases T. Ce bras donne une plus grande accessibilité à la séquence complémentaire et limite donc l'encombrement stérique, mais son rôle ne se cantonne pas là uniquement. En effet, dans le cas où la sonde envoyée sur le capteur est un fragment de plusieurs dizaines de paires de bases de long, et que la séquence à reconnaître ne se situe pas à une extrémité de ce fragment, le bras espaceur autorise alors ce fragment une meilleure mobilité jusqu'à la mise en contact des deux parties complémentaires.

La notion d'éfficacité avec laquelle on immobilise les molécules à la surface du transducteur vient d'être présentée, suggérant un nouveau critère lié à la détection d'interactions biologiques : l'optimisation des voies d'immobilisation qui requiert l'intervention du génie chimique dans la plupart des cas envisagés, mais également l'utilisation de certaines molécules, comme le système avidine-biotine, dans le but à la fois d'optimiser le rendement d'interaction mais aussi de permettre dans certaines conditions de régénérer la surface sensible du biocapteur optique.

II-E-Conclusion

Nous n'avons décrit dans ce chapitre que les interactions biomoléculaires sur lesquelles nous avons mené des expériences, ce chapitre est donc loin d'être exhaustif. Toutefois, les propriétés essentielles des anticorps, des acides nucléiques, leurs voies de fixation et les informations scientifiques que l'on peut tirer des reconnaissances antigéniques ou bien des hybridations ont été détaillées.

Après avoir succinctement décrit le principe du biocapteur optique, détaillé le fonctionnement des transducteurs et puis décrit le matériel biologique et ses modes d'interactions, nous allons quitter la partie théorique de ce mémoire de thèse pour entrer dans la partie expérimentale, mettant en avant l'illustration des parties précédentes par des expériences conduites avec un protocole strict, nous faisant passer du capteur simple au capteur multiparamétrique, aussi bien pour les tests à plusieurs espèces d'anticorps que pour les hybridations d'oligonucléotides en parallèle.

Références bibliographiques du chapitre II

[1] P. LETONTURIER. Structure et propriété des IgG. Abrégé d'immunologie générale, (1978), Ed.Masson.

[2] C. FELDKAMP & J. CAREY. Immune function and antibody structure. Immunoassay, (1996), Ed. academic Press.

[3] P. BAGCHI & S. M. BIRNBAUM. Effect of pH on the adsorption of immunoglobulin G on anionic poly(vinyltoluene) model latex particles. *J.of Colloid and Interface Science*, **83** (1981), 460-478.

[4] E. SILVERTON, M. NAVIA & D. R. DAVIES. Three-dimensional structure of an intact human immunoglobulin. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, **74** (1977), 5140-5144.

[5] C. VAN OSS & R. GOOD. Surface enthalpy and entropy and the physico-chemical nature of hydrophobic and hydrophylic interactions. *J.Dispersion Sci. & Technol.*, **12** (1991), 273-287.

[6] A. BERNARD & H. R. BOSSHARD. Real-time monitoring of antigen-antibody recognition on a metal oxide surface by an optical grating coupler sensor. *Eur.J.Biochem.*, **230** (1995), 416-423.

[7] R. W. GLASER. Antigen-antibody binding and mass transport by convection and diffusion to a surface : a two-dimensional computer model of binding and dissociation kinetics. *Anal.Biochem.*, **213** (1993), 152-161.

[8] P. SCHUCK. Kinetics of ligand binding to receptor immobilized in a polymer matrix, as detected with an evanescent wave biosensor. I.A computer simulation of the influence of mass transport. *Biophys.J.*, **70** (1996), 1230-1249.

[9] A. SADANA, J. P. ALARIE, T. VO-DINH. Antigen-antibody diffusion-limited binding kinetics for biosensors : a fractal analysis. *Sensors & Actuators B*, **32** (1996), 195-201.

[10] J. PIEHLER, A. BRECHT, T. GIERSCH, B. HOCK & G. GAUGLITZ. Assessment of affinity constants by rapid solid phase detection of equilibrium binding in a flow system. *J. of Immunol.Methods*, **201** (1997), 189-206.

[11] S. IKUTA, K. TAKAGI, R. BRUCE WALLACE & K. ITAKURA. Dissociation kinetics of 19 base paired oligonucleotide-DNA duplexes containing different single mismatched base pairs. *Nucleic acids research*, **15** (1987), 797-811.

[12] G. FERIOTTO, M. LUCCI, N. BIANCHI, C. MISCHIATI & R. GAMBARI. Detection of the ΔF508 (F508del) mutation of the cystic fibrosis gene by surface plasmon resonance and biosensor technology. *Human mutation*, **13** (1999), 390-400.

[13] P. NILSSON, B. PERSSON, A. LARSSON, M. UHLEN & P. NYGREN. Detection of mutations in PCR products from clinical samples by surface plasmon resonance. *J.of molecular recognition*, **10** (1997), 7-17.

[14] J. M. BIDART, S. BIRKEN, P. BERGER & A. KRICHEVSKI. Immunochemical mapping of hCG and hCG-related molecules. *Scand J Clin Lab Invest* , **216** (1993), 118-136.

[15] J. M. BIDART, F. TROALEN, C. J. BOHUON, G. HENNEN & D. H. BELLET. Immunochemical mapping of a specific domain on human choriogonadotropin using anti-protein and anti-peptide monoclonal antibodies. *J Biol Chem* , 262 (1987), 15483- 15489.

[16] M. OZTURK, D. BELLET, L. MANIL, G. HENNEN, R. FRYDMAN & J. WANDS. Physiological studies of human chorionic gonadotropin (hCG), alpha hCG, and beta hCG as measured by specific monoclonal immunoradiometric assays. *Endocrinology* , **120** (1987), 549-558.

[17] R. G. HEIDEMAN, R. P. H. KOOYMAN & J. GREVE. Performance of a highly sensitive optical waveguide Mach-Zehnder interferometer immunosensor. *Sensors & actuators B*, **10** (1993), 209-217.

[18] D. H. BELLET, M. OZTURK, J. M. BIDART, C. J. BOHUON & J. WANDS. Sensitive and specific assay for human chorionic gonadotropin (hCG) based on anti-peptide and anti-hCG monoclonal antibodies: construction and clinical implications. *J .Clin Endocrinol Metab,* **63** (1986), 1319-1327.

[19] D. H. BELLET, M. SCHLUMBERGER, J. M. BIDART, M. ASSICOT, B.CAILLOU, P. MOTTE, A. VIGNAL & C. J. BOHUON. Production and in vitro utilization of monoclonal antibodies to human thyroglobulin. *J Clin Endocrinol Metab* , **56** (1983), 530-533.

[20] D. H. BELLET, J. WANDS, K. J. ISSELBACHER & C. J. BOHUON. Serum alpha-fetoprotein levels in human disease: perspective from a highly specific monoclonal radioimmunoassay. *Proc Natl Acad Sci USA* , **81** (1984), 3869-3873.

[21] JORDAN C. , FRUTOS A. , THIEL A. & CORN R. Surface plasmon resonance imaging measurements of DNA hybridization adsorption and streptavidin. DNA multilayer formation at chemically modified gold surfaces. *Anal. Chem.*, **69** (1997), 4939-4947

[22] HÄUSSLING L. , RINGSDORF H. , SCHMITT F. & KNOLL W. Biotin-functionalized self-assembled monolayers on gold : surface plasmon optical studies of specific recognition reactions. *Langmuir,* **7** (1991), 1837-1840.

[23] L. HEINRICH, E. K. MANN, J. C. VOEGEL & P. SCHAAF. *Langmuir*, **13** (1997), 3177.

[24] F. BIER, F. KLEINJUNG & F. SCHELLER. Real-time measurement of nucleic-acid hybridization using evanescent-wave sensors : steps towards the genosensor. *Sensors & Actuators B*, **38-39** (1997), 78-82.

[25] K. SPAETH, A. BRECHT & G. GAUGLITZ. Studies on the biotin-avidin multilayer adsorption by spectroscopic ellipsometry. *J. of Colloid and Interface Sci.* , **196** (1997), 128-135.

[26] LIEDBERG B. , LUNDSTRÖM I. & STENBERG E. Principles of biosensing with an extended coupling matrix and surface plasmon resonance. *Sensors & Actuators B*, **11** (1993), 63-72.

[27] T. LIVACHE, A. ROGET, E. DEJEAN, C. BARTHET, G. BIDAN & R. TEOULE. Preparation of a DNA matrix via an electrochemically directed copolymerization of pyrrole and oligonucleotides bearing a pyrrole group. *Nucleic Acids Research*, **22** (1994), 2915-2921.

[28] T. LIVACHE, B. FOUQUE, A. ROGET, J. MARCHAND, G. BIDAN, R. TEOULE & G. MATHIS. Polypyrrole DNA chip on a silicon device : Example of Hepatitis C virus genotyping. *Anal. Biochem.*, **255** (1998), 188-194.

Chapitre III :

Validations expérimentales de l'intérêt des biocapteurs optiques en immunologie et en biologie moléculaire

III-A-Étude expérimentale comparant la sensibilité analytique du MR et de la RPS : Le capteur à un paramètre

Parmi les différents aspects que peut revêtir l'étude des biocapteurs, trois ont spécialement retenus notre attention : la sensibilité de détection, l'analyse en parallèle de plusieurs interactions moléculaires et l'optimisation de l'immobilisation des ligands à même le transducteur. Nous nous intéressons dans ce chapitre à la sensibilité analytique, c'est à dire la concentration limite détectable, de deux transducteurs optiques au travers d'expériences de reconnaissance de l'hormone hCG par l'anticorps HT13 (cf. I-C-1). Ces expériences ont été menées sur des transducteurs relevant de la RPS aussi bien avec notre dispositif, que sur un appareil commercialisé : le Biacore. L'autre type de transducteur dont nous discuterons la sensibilité dans ce chapitre est le MR dont le guide d'ondes est en oxyde de titane. Outre la limite de sensibilité analytique, nous nous intéresserons au comportement des anticorps suivant leur mode d'immobilisation ainsi qu'aux interactions consécutives avec l'hCG.

Toutes les expériences qui sont décrites ont été réalisées en temps réel, sans marqueur, à température ambiante (20±2°C) et seul le dispositif commercialisé posséde une surface fonctionnalisée pour immobiliser l'anticorps, ce qui permet de régénérer le capteur plusieurs fois de suite. Nous présentons les protocoles choisis pour chaque type de transducteur ainsi qu'une analyse complète des sensorgrammes (ensemble des cinétiques lié à une expériences) obtenus. Nous tirerons un bilan de ces expériences afin de dégager le transducteur possédant la plus grande sensibilité analytique.

III-A-1-Reconnaissance d'hCG par la méthode de la RPS

Nous allons pouvoir, au travers de la comparaison de la sensibilité de divers transducteurs, nous pencher sur les résultats obtenus sur deux transducteurs basés sur la résonance des plasmons de surface. En effet, nous allons expliciter dans cette section les principales différences établies entre la reconnaissance d'hCG par adsorption passive de l'anticorps et la reconnaissance de cette même hormone par l'anticorps monoclonal lié de façon covalente au substrat.

III-A-1-1-Expériences menées au laboratoire

Pour toute série d'expériences conduite au laboratoire nous avons établi un protocole strict afin de valider les résultats obtenus. Une fois ce protocole déterminé, nous avons pu suivre les cinétiques de fixation pour toutes les biomolécules en présence et tirer de ces courbes

des informations telles que la constante d'affinité (cf. II-A-4), le taux de recouvrement ou bien encore le rendement des interactions molécules à molécules.

A-1-1-1-Protocole des expériences

Nous avons utilisé comme substrat des lames chrome-or obtenues par évaporation sous vide, que nous avons ensuite insolées sous UV (cf. Annexe III) pendant trois heures avant le début des expériences pour éliminer les résidus carbonés de la surface. Pour avoir accès à des résultats fiables concernant l'interaction HT13-hCG, il est essentiel que le taux de recouvrement de l'adsorption passive du ligand soit le même à chaque expérience. Nous avons par conséquent utilisé des lames de 2,5 X 2,5 mm^2 de surface totale, mais dont la zone utile est de 4 mm de diamètre (dimension de la cuve de réaction). Avant chaque immobilisation passive de l'HT13, le capteur a été longuement rincé à l'eau pour éliminer certaines impuretés de la surface sensible.

Le protocole biologique que nous avons suivi est résumé sous forme d'une expérience complète dans la figure III-1. Il s'agit dans un premier temps d'injecter dans la cuve de réaction une solution tampon de PBS à pH 7,4 et de relever la courbe de réflectivité au voisinage de la résonance, nous donnant de cette façon une référence dont on déterminera les paramètres en différé. On injecte ensuite en continu une solution d'anticorps (dilué dans le tampon courant à 0,2 g/l pendant 20 minutes). On rince ensuite pendant 5 minutes avec le tampon courant (PBS) pour éliminer les anticorps non fixés, puis on enregistre la courbe de réflectivité correspondante, afin de mesurer la position de résonance par rapport à la référence initiale. Afin de bloquer les sites où l'HT13 n'a pas été adsorbé, on sature la surface du capteur avec la BSA pendant 7 minutes, diluée dans le PBS à 0,2 g/l, puis on à nouveau la courbe de réflectivité après avoir rincé la cuve en PBS. Tous les sites du capteur étant bloqués soit par l'HT13, soit par la BSA, toute interaction stable mesurée à la suite d'une injection d'hCG pendant 20 minutes sera donc spécifique. Nous avons utilisé des concentrations pour l'hCG allant de 25 µg/ml (625 nM) à 25 ng/ml (625 pM).

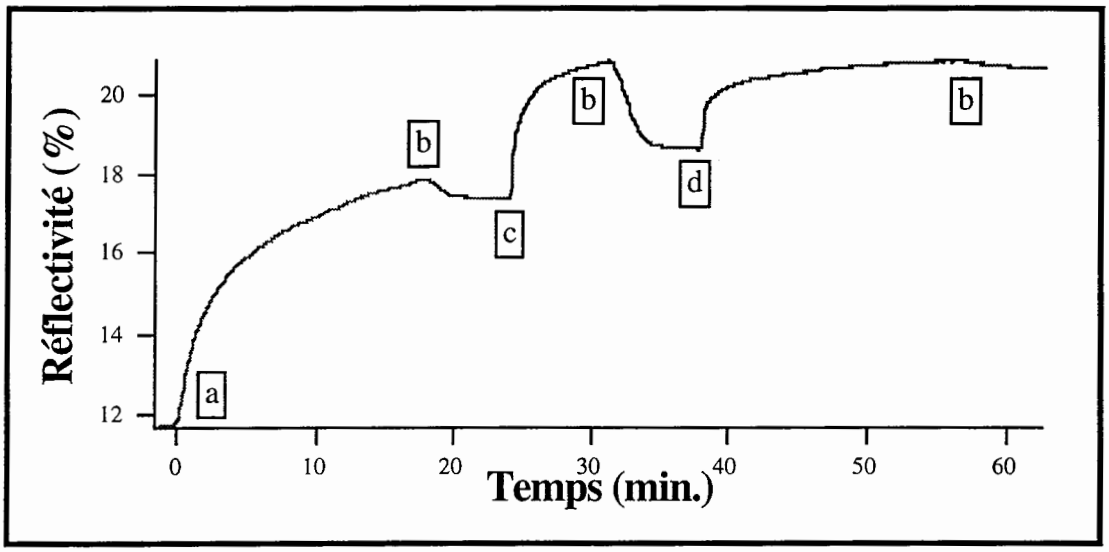


Figure III-1 : Sensorgramme d'une expérience de reconnaissance de l'hCG avec (a) la cinétique d'adsorption passive de l'HT13 à 0.2 g/l, (b) le rinçage en PBS (c)la saturation à la BSA à 0,2 g/l et enfin (d) la cinétique de fixation de l'hCG 250 ng/ml.

Les courbes de réflectivité sont ensuite ajustées (cf. Fig. III-2) par une méthode basée sur les lois de Fresnel.

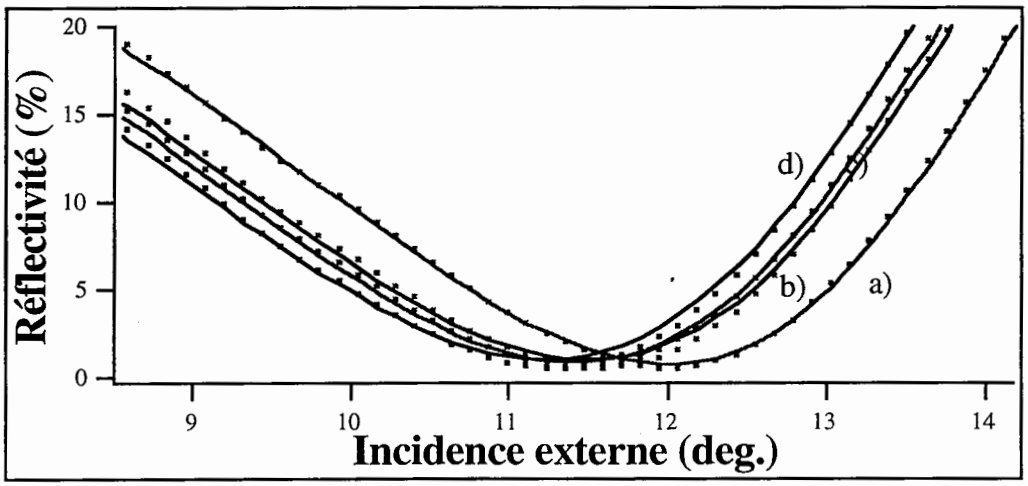


Figure III-2 : Courbes de réflectivité sur or nu relatives à l'expérience de la figure III-1 (en pointillés) ainsi que leur ajustement (trait plein), a) or nu, b) HT13 (0,2 g/l), c) BSA (0,2 g/l) et d) hCG (250 ng/ml).

A-1-1-2-Quantification et interprétation des expériences

Les ajustements des courbes de réflectivité permettent d'accéder à l'épaisseur optique rendant compte de l'adsorption de l'HT13 et de la BSA ou de la réaction immunogène de l'hCG, nous utilisons directement la loi de De Feijter (cf. eq. I-44), donnant le taux de recouvrement pour chaque couche moléculaire. Nous donnons dans le tableau III-a les taux de recouvrement moyens et le nombre de molécules pour l'adsorption passive de l'HT13 et de la BSA.

Type de Biomolécules	Taux de recouvrement moyen	Nombre moyen de molécules/mm^2
HT13	1,6 ± 0,004 ng/mm^2	6,42.10^9
BSA	0,201 ± 0,004 ng/mm^2	1,78.10^9

Tableau III-a : Taux de recouvrement moyen et de nombre de molécules calculés pour l'adsorption passive d'HT13 et de BSA.

Il est à noter que l'HT13 a une affinité avec l'or plutôt faible par rapport à l'adsorption passive avec d'autres types d'IgG qui provient probablement d'une faible interaction électrostatique due à la charge de l'anticorps, celle-ci dépendant fortement des acides aminés le constituant. De plus, la cinétique d'adsorption passive de la BSA (cf. Fig. III-1) montre clairement que peu de molécules sont adsorbées (forte désorption après rinçage en PBS). Les résultats obtenus pour l'immobilisation de l'anticorps et la saturation du capteur étant toujours du même ordre on peut en tirer des informations fiables concernant l'interaction HT13-hCG, nous présentons dans la figure III-3 les cinétiques d'adsorption spécifique de l'hCG pour 4 concentrations différents : 25000, 2500, 250 et 25 ng/ml (équivalent à 625 nM, 62,5 nM, 6,25 nM et 625 pM) et dans le tableau III-b les valeurs du taux de recouvrement, le nombre de molécules impliquées et le rendement hCG/HT13.

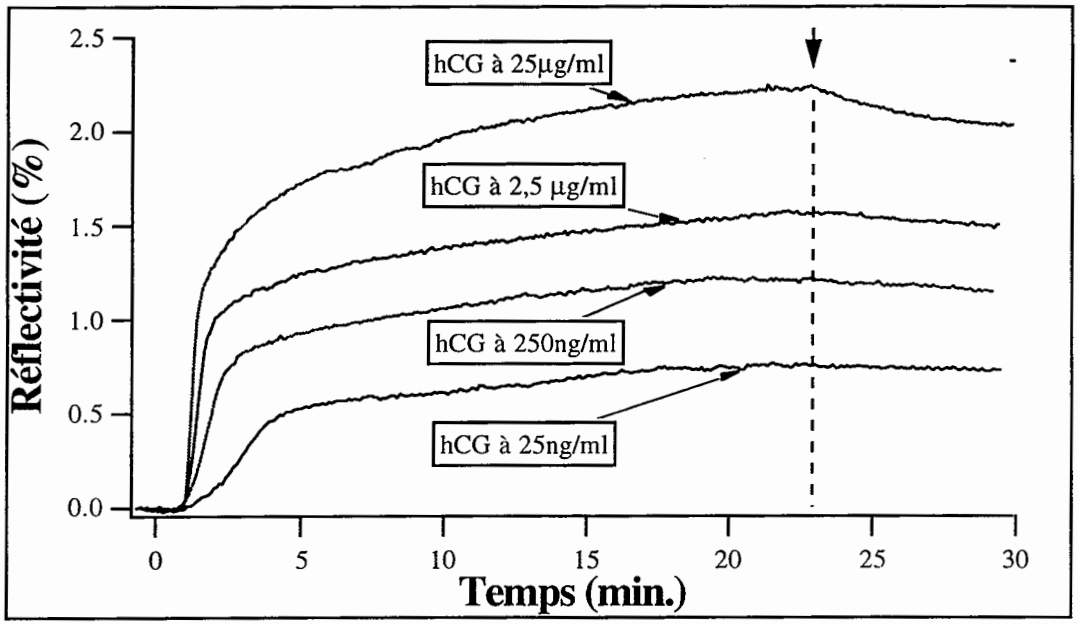


Figure III-3: Cinétiques normalisées de fixation de l'hCG à l'HT13 sur or nu pour des concentrations décroissantes en hCG. La flèche indique le début du rinçage en tampon.

Les cinétiques d'interactions HT13/hCG ont toutes le même profil, suivant une loi en double exponentielle, caractéristique des cinétiques limitées par le transport de masse, avec deux constantes de temps correspondant d'une part à la reconnaissance des molécules d'hCG se fixant rapidement avec l'anticorps et d'autre part à celle des molécules ayant à chercher un paratope disponible, ceux des molécules d'HT13 les plus accessibles étant déjà occupés. Ces cinétiques donnent également une information sur l'excès de molécules contenues dans la solution concentrée à 25 µg/ml, de par la désorption importante lors du rinçage en tampon, alors que l'on observe une désorption faible, voire nulle pour les concentrations inférieures.

Concentration en hCG(ng/ml)	Taux de recouvrement (pg/mm^2)	Nombre de molécules (mm^{-2})	Rendement hCG/HT13 (%)
25000(625 nM)	310	$4,66.10^9$	72
2500(62,5 nM)	234	$3,52.10^9$	55
250(6,25 nM)	185	$2,78.10^9$	43
25(625 pM)	141	$2,12.10^9$	33

Tableau III-b : Taux de recouvrement, nombre de molécules impliquées et rendement de la réaction HT13-hCG pour 4 concentrations d'hCG.

Si l'on considère alors qu'une concentration de 25 µg/ml est à même de saturer les sites de fixation des anticorps monoclonaux (désorption importante), nous pouvons affirmer que le rendement de 72% (cf. Tableau III-b) est le rendement maximal compte tenu du fait que les anticorps sont adsorbés passivement, et ne présentent probablement pas tous leurs paratopes aux molécules d'hCG.

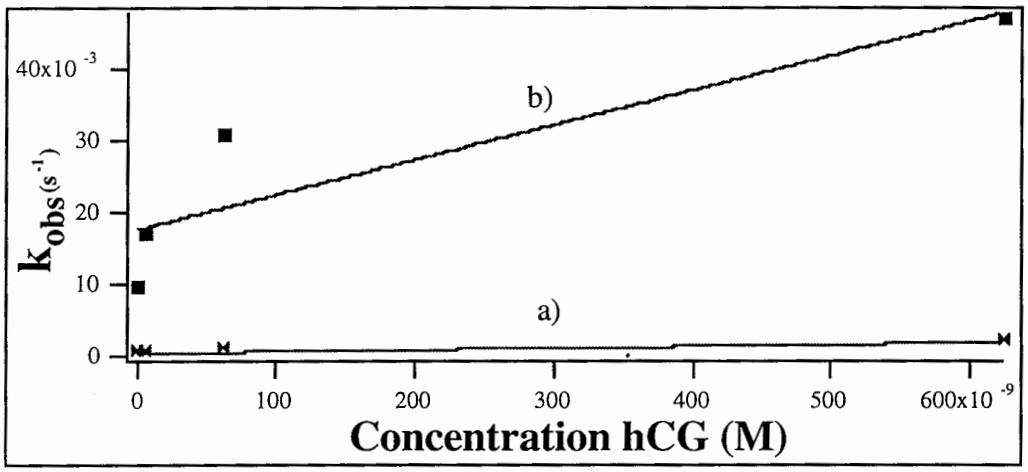


Figure III-4 : Détermination de la constante d'affinité de la réaction hCG-HT13 à l'aide des coefficients d'ajustement des cinétiques de la figure III-3. a) représentation des valeurs de K_{obs} pour la première constante de temps, et b) celles de la seconde.

La gamme des concentrations choisie convient donc tout à fait pour déterminer la constante d'affinité de l'interaction HT13/hCG. Pour ce faire, nous avons ajusté les cinétiques de fixation de la figure III-3, nous donnant accès à les valeur de k_{obs} pour chaque concentration, que l'on représente en fonction de la concentration en mole/litre (M) dans la figure III-4. On ajuste ensuite les courbes obtenues par des droites, nous donnant les valeurs de K_{ass} et K_{diss} (cf. chapitre I) pour chacune des constantes de temps. Nous sommes arrivés à une valeur pour la

constante d'affinité K de $2,8.10^9$ M^{-1} pour la première constante de temps, et $2,7.10^9$ M^{-1} pour la deuxième. Comme nous nous y attendions, ces valeurs sont identiques à l'incertitude près, indiquant que les signaux mesurés et les ajustements réalisés sont suffisamment précis pour établir la constante d'affinité de systèmes antigène-anticorps.

III-A-1-2-Expériences menées sur le Biacore

Nous avons pu réaliser des expériences de reconnaissance HT13-hCG sur le Biacore, appareil développé par la société Pharmacia (nouvellement Biacore), installé à l'Institut Gustave Roussy, qui fonctionne de façon automatique sur le modèle de la RPS, mais dont le protocole d'utilisation diffère de celui décrit dans la section précédente.

Le but des expériences décrites dans cette section est de comparer la sensibilité analytique entre l'adsorption passive réalisée sur des lames d'or (section précédente) avec un dispositif commercialisé permettant l'adsorption covalente des anticorps et également de comparer le volume des interactions HT13-hCG.

A-1-2-1-Protocole des expériences

Les capteurs utilisés dans ces expériences sont des lames d'or de 45 nm d'épaisseur, d'une surface de $1cm^2$, préalablement fonctionnalisé par une couche de dextran référencée sous le nom de CMD5 (CarboxyMéthyle-Dextran numéro 5) d'une épaisseur de 100 nm. Cette chimie de surface couplée à l'or permet une liaison covalente entre ses radicaux carboxyméthyles (COOH) et les radicaux NH_2 des protéines à immobiliser. Il faut toutefois activer ces radicaux COOH en radicaux COO^-, cette étape est réalisée par un passage d'une solution à 50% de N-HydroSuccinimide (NHS) et à 50% de N-éthyle-N'-(3-diméthylaminopropyle) carbodiimide hydrochloride (EDC). Le fait que désormais cet hydrogel soit chargé négativement ne va pas favoriser les interactions électrostatiques à pH 7,4 entre le capteur et la protéine, ayant un point isoélectrique (pI) de 7. La différence pI-pH étant négative, il y aura répulsion entre le ligand et la surface pour un tampon de pH supérieur à 7. On prendra soin de diluer l'anticorps à fixer sur le dextran dans un tampon d'acétate de sodium (NaAc) de pH 5, qui permettra cette fois-ci une attraction électrostatique favorisant l'adsorption covalente de l'HT13. Une fois réalisée l'immobilisation de l'HT13, on bloque les sites COO^- encore actifs par le passage d'éthanolamine venant inhiber les radicaux carboxyles (cf. Fig. III-5). Ainsi, il n'est plus nécessaire d'utiliser la BSA comme cela a été fait dans le cadre de l'adsorption passive. Après cette première étape, on utilise de nouveau un tampon PBS de pH 7,4. On peut dès à présent injecter des solutions d'hormones à la surface du capteur, en régénérant celui-ci après chaque cinétique d'hCG. La régénération consiste en quelques passages rapides d'acides chlorhydrique pendant quelques secondes sur le capteur, qui provoque une variation brutale de

pH et entraîne le décrochage des hCG fixés sur la couche d'anticorps. Ceci permet de revenir à la situation de départ et de réutiliser le même capteur pour l'expérience suivante. Pour s'en assurer, on veillera à retrouver après chaque cycle un même niveau de ligne de base, c'est à dire de vérifier que le niveau de réflectivité sans injection est d'une part stable et d'autre part qu'il ait la même valeur avant et après le cycle.

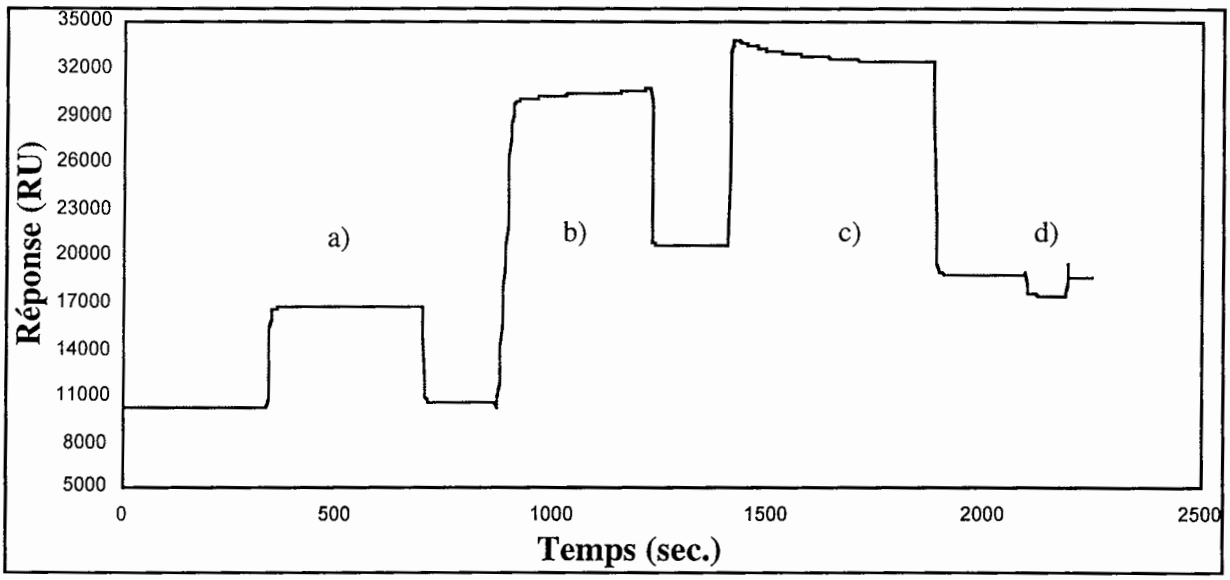


Figure III-5 : Sensorgramme sur Biacore de l'immobilisation covalente d'HT13 sur la matrice de dextran. Les différentes étapes sont indexées de la façon suivante : a) activation du dextran à l'aide d'un mélange à 50% de NHS et de EDC, b) cinétique de fixation des HT13 sur les radicaux COO^- sur l'hydrogel, c) blocage des sites libres par de l'éthanolamine et d) passage d'acide chlorhydrique pour éliminer les molécules fixées passivement.

Passons à présent à l'analyse des cinétiques de fixation de l'hCG par les paratopes de l'HT13 et aux différentes informations que l'on peut en tirer.

A-1-2-2-Quantification et interprétation des expériences

Lors de l'enregistrement d'une cinétique, le Biacore enregistre le signal de réflectivité donné en Reflectivity Units (RU) en fonction du temps. Cette unité n'a pas été choisie au hasard puisqu'un signal de 1000 RU correspond à un taux de recouvrement de 1 ng/mm^2 [1]. La quantification des sensorgrammes enregistrés avec cet appareil est donc immédiate. C'est la raison pour laquelle il n'y a pas de mesures du déplacement angulaire associé à la fixation de molécules sur le Biacore. En effet, seule la variation de réflectivité qui est calibrée pour tous les capteurs, sert à la quantification.

Nous avons réalisé des expériences avec des concentrations d'HT13 qui varient de 0,1 g/l à 0,05 g/l. En conséquence, nous présentons deux lots d'expériences réalisées à chaque fois sur le même capteur dans les figures III-6 et III-7.

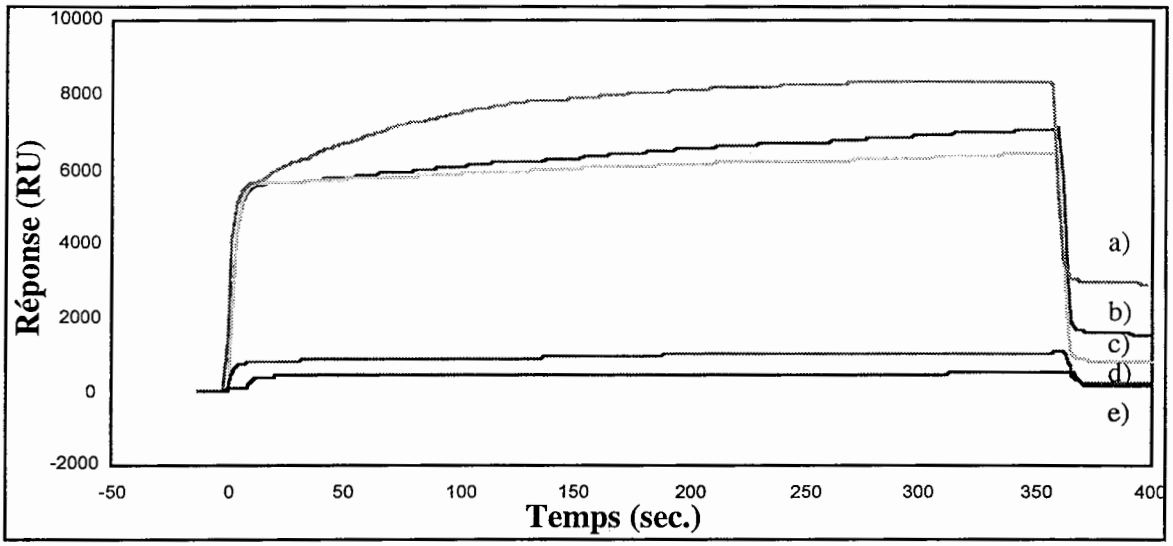


Figure III-6 : Cinétiques de reconnaissance de l'hCG sur une surface sensible préparée par l'immobilisation covalente d'HT13 concentrés à 0,1 g/l avec a) hCG concentré à 20 µg/ml, b) 10 µg/ml, c) 5 µg/ml, d) 1 µg/ml, et e) 500 ng/ml soit (500, 250, 125, 25 et 12,5 nM).

Les injections d'hCG ont toutes duré environ 6 minutes pour un volume de 30 µl. Le rinçage en tampon courant ne dure que peu de temps dans la mesure ou le système microfluidique du Biacore permet de changer de solution en moins d'une seconde par l'intermédiaire de valves automatiques. Nous avons veillé scrupuleusement à ce que la ligne de base après régénération de la surface soit quasiment au même niveau qu'au début du cycle. Cette condition est très importante puisqu'elle implique un état initial identique du nombre d'anticorps présent avant l'injection d'hCG. Quand cette condition n'était pas remplie, la totalité de l'expérience était refaite.

Nous reportons les valeurs des réponses en RU pour les figures III-6 et III-7 dans le tableau III-c. Dans les expériences conduites avec une immobilisation des HT13 concentrés à 0,05 g/l, nous n'avons effectué que quatre cycles de reconnaissance car le signal était presque dans la zone de bruit dès la concentration de 1 µg/ml.

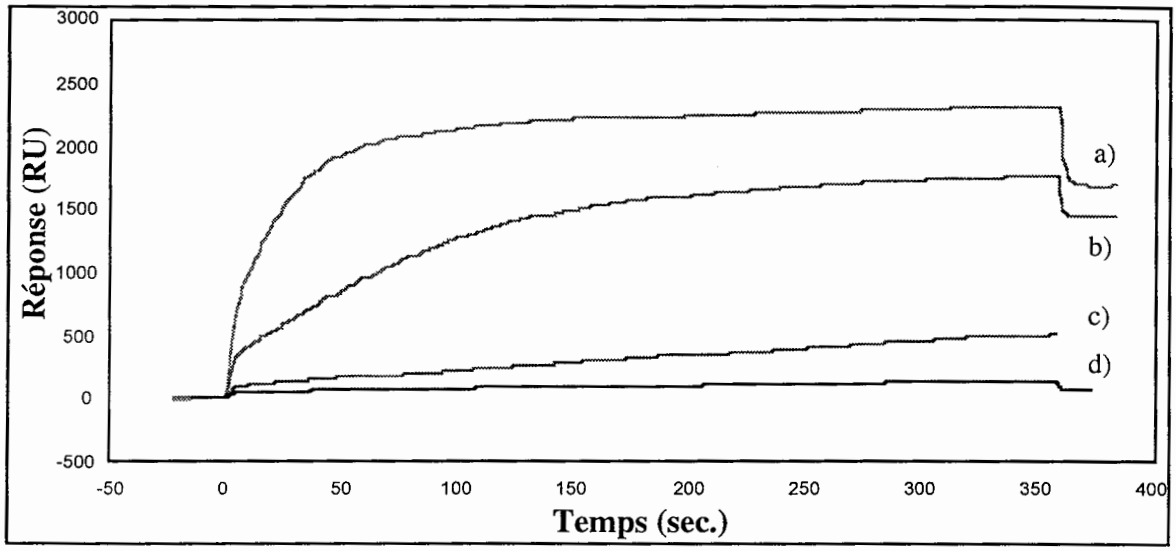


Figure III-7 : Cinétiques de reconnaissance de l'hCG sur une surface sensible préparée par l'immobilisation covalente d'HT13 concentrés à 0,05 g/l avec a) hCG concentré à 20 µg/ml, b) à 10 µg/ml, c) 5 µg/ml, et d) 1 µg/ml (soit respectivement 500, 250, 125, et 25 nM).

Concentration	20 µg/ml	10 µg/ml	5 µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml
0,1 g/l d'HT13	2900 pg/mm^2	1640 pg/mm^2	730 pg/mm^2	155 pg/mm^2	80 pg/mm^2
0,05 g/l d'HT13	1680 pg/mm^2	1450 pg/mm^2	560 pg/mm^2	85 pg/mm^2	non réalisée

Tableau III-c : Taux de recouvrement de l'hCG en fonction de sa concentration pour deux lots d'expériences dont seule la concentration en HT13 a changé.

Il apparaît nettement au travers des figures III-6 et III-7 et des valeurs du tableau III-c que la capacité du biocapteur à détecter de faibles concentrations dépend fortement de la concentration surfacique des anticorps monoclonaux sur le transducteur. Pour être tout à fait exact, il vaudrait mieux parler de concentration volumique pour les anticorps. En effet, le dextran se trouve être un hydrogel filamenteux se comportant comme un treillis au sein duquel sont adsorbés de façon covalente les HT13. On comprend aisément pourquoi la concentration saturante est de 0,1 g/l sur dextran, alors qu'elle est de 0,2 g/l pour de l'or nu : une adsorption en trois dimensions est plus importante qu'en deux dimensions. Cette constatation explique également pourquoi les cinétiques d'hCG ont un profil qui suit une loi à deux constantes de temps, où apparaît d'une part un certain nombre de liaison immédiates et d'autre part des liaisons HT13-hCG liés au transport de masse afin de se frayer un chemin dans le treillis de dextran.

III-A-1-3-Conclusion

Bien que le système Biacore utilise une chimie de surface permettant la régénération des transducteurs et donc la possibilité de réaliser plusieurs cycles avec un état initial identique, il semble que la sensibilité analytique de la méthode RPS par adsorption passive soit meilleure d'un facteur 20 par rapport à celle du Biacore. Toutefois, les interactions biomoléculaires ont lieu en volume pour ce dernier et les taux de recouvrement mesurés sont alors très nettement supérieurs à ceux mesurés à la surface d'une lame d'or. De plus la chimie de surface fixe les anticorps par leur fragment F_c et autorise alors une reconnaissance de l'hCG par les deux paratopes de l'anticorps, tandis qu'avec la méthode RPS, on ne sait pas exactement de quelle façon est adsorbé l'anticorps et par conséquent combien de sites de reconnaissance sont disponibles. Une explication possible de la différence de sensibilité analytique entre les deux systèmes basés sur la résonance des plasmons de surface, consiste à prendre en compte l'épaisseur du polymère utilisé dans le Biacore. En effet, la position de résonance est intimement liée à l'épaisseur optique déposée sur le substrat d'or. C'est sur ce principe que fonctionne notre biocapteur (cf. Fig. III-2). La couche de dextran de 100 nm fixée sur l'or engendre donc un déplacement important de l'ensemble du pic relatif au plasmon. Il s'ensuit une diminution sensible de la pente droite de ce pic (maximum de $dR/d\theta$). La sensibilité associée à la dynamique du pic décroît alors dans le cas du Biacore, contrairemant au taux de recouvrement (pour une même fixation de molécules).

Passons à présent au deuxième type de transducteur que nous avons étudié et qui nous permettra de trancher définitivement pour choisir le système le plus sensible expérimentalement.

III-A-2-Reconnaissance d'hCG par la méthode du MR

Suite à l'étude théorique et à l'optimisation du transducteur basé sur le miroir résonant, nous avons fait réaliser des transducteurs SiO_2-TiO_2 dont les paramètres physiques ont été déterminés dans la section I-C. Les expériences menées avec ce transducteur suivent exactement le même protocole que celles réalisées dans la section I-C et sont analysées à l'identique.

III-A-2-1-Protocole expérimental

Nous disposons de lames de 2,5 X 2,5 cm^2 revêtues d'une couche de 700 nm de SiO_2 et d'une couche de 42 nm de TiO_2. Avant chaque utilisation, ces lames sont recuites à 300 °C afin de volatiliser une grande partie des molécules adsorbées lors de l'expérience précédente puis insolées pendant trois heures par une source UV. Les expériences réalisées sur ce type de transducteur le sont par adsorption passive sur le TiO_2. Chaque capteur est soigneusement rincé

avec de l'eau désionisée avant d'être mis en contact avec le tampon courant (PBS, pH 7,4). Les immunoglobulines HT13 sont injectées pendant 20 minutes à une concentration de 0,2 g/l, puis le capteur est rincé en tampon PBS pendant 10 minutes afin d'éliminer les anticorps non adsorbés. Le capteur est ensuite bloqué avec de la BSA à 0,2 g/l. Puis l'hCG est injectée à pendant 13 minutes et le capteur est rincé pendant 7 minutes. Le capteur n'étant pas régénérable, il faut après chaque cinétique d'hCG, recourir au protocole de nettoyage cité plus haut.

A chaque étape, on enregistre la réflectivité du capteur en fonction de l'angle externe afin de connaître au centième de degrés près, la position de résonance nous permettant de calculer le taux de recouvrement pour chacune des espèces biologiques. Nous donnons un exemple dans la figure III-8, où apparaissent les réflectivités et leurs ajustements, pour le TIO_2 nu, puis après immobilisation des HT13, ensuite, après saturation à la BSA et enfin la réflectivité après reconnaissance par les HT13 de molécules d'hCG à 25 mg/l (625 nM).

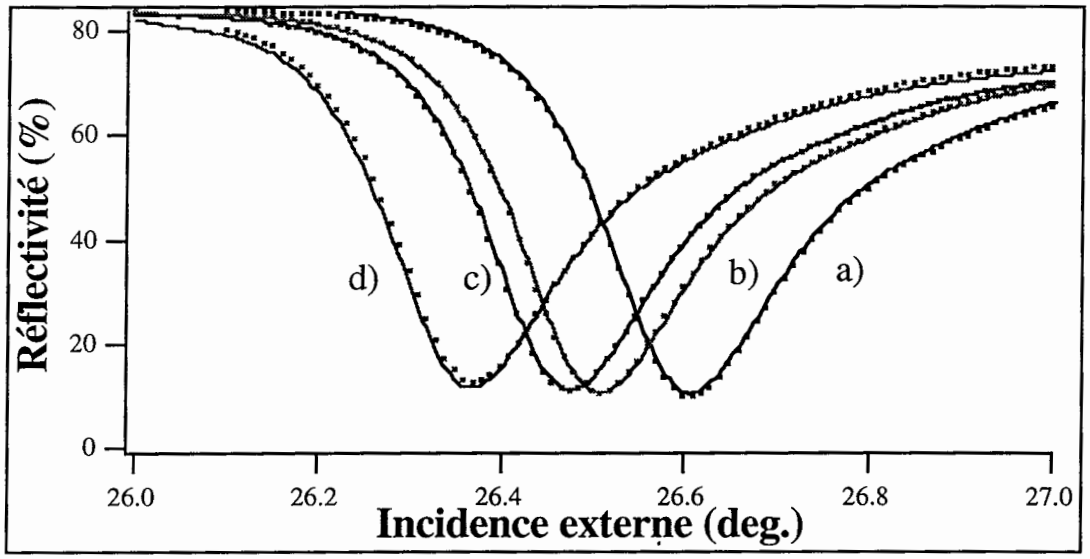


Figure III-8 : Réflectivité (interférentielle) pour une expérience consistant en l'adsorption passive de l'HT13, de la saturation en BSA et de la reconnaissance d'hCG à 25 mg/l. Les ajustements sont en trait plein et a) MR nu, b) HT13 (0,2 g/l), c) BSA (0,2 g/l) et d) hCG (25 mg/l).

On remarque, sur la figure III-8, le faible décalage angulaire de ces courbes par rapport à la RPS (cf. Fig. III-2), pour les mêmes effets.

III-A-2-2-Quantification et interprétation des résultats

Afin de valider les mesures effectuées après chaque cinétique d'hCG, il faut s'assurer que l'immobilisation passive des anticorps est toujours du même ordre en terme de taux de

recouvrement. Le tableau III-d présente les résultats obtenus pour quatre immobilisations d'HT13 et la saturation du capteur en BSA, sur des lames SiO_2-TiO_2. Les incertitudes sont suffisamment faibles pour garantir la reproductibilité nécessaire de l'état de surface du capteur avant l'injection d'hCG.

Type de Biomolécules	Taux de recouvrement moyen(mm^{-2})	Nombre moyen de molécules(mm^{-2})
HT13	1,3 ng/mm^2	$5,2.10^9$
BSA	350 pg/mm^2	$3,5.10^9$

Tableau III-d : Taux de recouvrement moyen et nombre de molécules calculés pour l'adsorption passive d'HT13 et de BSA.

On remarque au passage que le taux de recouvrement mesuré sur le TiO_2 est légèrement plus faible que celui relevé sur des lames d'or. Le mode d'adsorption étant différent suivant la surface utilisée pour les deux transducteurs, on observe que le nombre de complexes HT13-hCG est plus faible pour le miroir résonant à concentration égale. Cela semble signifier que l'affinité des anticorps n'est pas la même pour les deux types de substrat.

Les lames sont ensuite bloquées en BSA, afin d'optimiser la spécificité de l'interaction entre l'HT13 et l'hCG. Nous avons enregistré les cinétiques de fixation spécifiques de l'hCG sur l'HT13 pour 4 concentrations allant de 0,33 µg/ml à 50 µg/ml. Les résultats sont présentés dans la figure III-9.

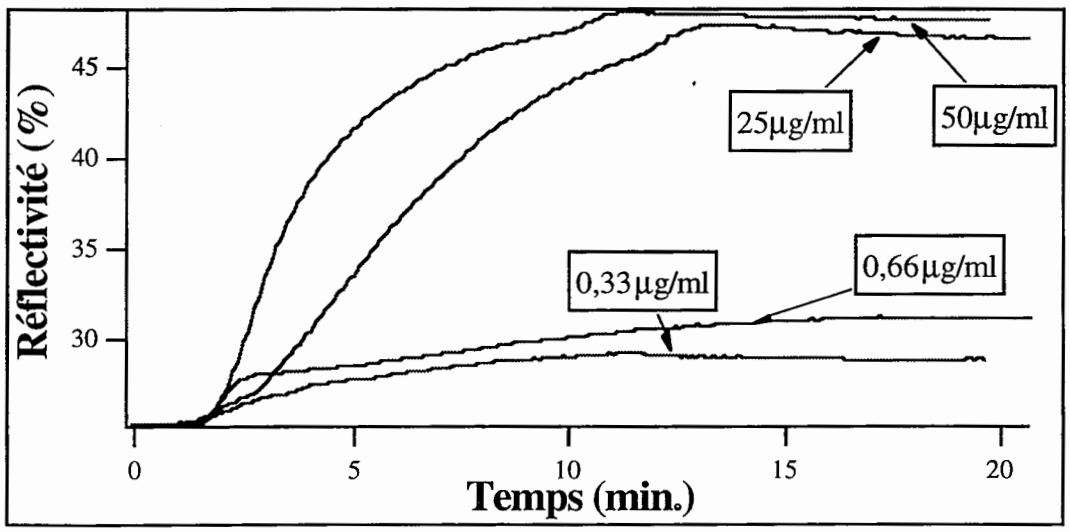


Figure III-9 : Cinétiques normalisées de fixation de l'hCG à l'HT13 sur SiO_2-TiO_2 pour des concentrations décroissantes en hCG.

Les concentrations utilisées pour la dilution de l'hCG sont 50 mg/ml, 25 mg/ml, 660 ng/ml et 330 ng/ml (respectivement : 1,25 µM, 625 nM, 16 nM et 8 nM). A partir de l'ajustement des courbes de réflectivité relatives à ces cinétiques, nous avons déterminé l'épaisseur effective de l'hCG, proportionnelle au taux de recouvrement. Ces calculs apparaissent dans le tableau III-e, ainsi que le nombre de molécules par mm^2 et le rendement HT13/hCG.

Concentration en hCG(ng/ml)	Taux de recouvrement (pg/mm^2)	Nombre de molécules (mm^{-2})	Rendement hCG/HT13 (%)
50000(1,25 µM)	484	$7,26.10^9$	139
25000(625 nM)	440	$6,6.10^9$	126
660(16 nM)	129	$1,93.10^9$	37
330(8 nM)	72	$1,1.10^9$	21

Tableau III-e Taux de recouvrement, nombre de molécules impliquées et rendement de la réaction HT13-hCG pour 4 concentrations d'hCG.

Il apparaît que le rendement antigène-anticorps est largement supérieur à celui de la RPS pour les concentrations fortes alors qu'il lui est inférieur dès la concentration de 660 ng/ml à tel point que nous ne sommes pas descendus en deçà d'une concentration d'hCG de 330 ng/ml au lieu de 25 ng/ml pour la RPS. Quand, sur le tableau III-e on lit un rendement de 139%, il faut se rappeler que l'HT13 possède deux paratopes, ce qui alors donne un rendement molaire proche de 70% pour passer à 10% à 330 ng/ml. Nous pouvons interpréter ces résultats de deux manières : soit les HT13 ne se sont pas adsorbés de la même façon pour les quatre expériences, expliquant ainsi la diminution des interactions pour de faibles concentrations d'analytes, soit les concentrations de 25 et 50 µg/ml sont saturantes pour les HT13 en surface et seules les faibles concentrations donneraient alors des résultats linéaires ainsi que la limite de la sensibilité analytique du MR en adsorption passive.

A partir de l'ajustement des cinétiques de fixation de l'hCG de la figure III-9, on tire les valeurs de K_{obs} que l'on représentent en fonction de la concentration en hCG dans la figure III-10. Un simple ajustement par une droite donne les valeurs de K_{ass} et K_{diss} , dont le rapport K vaut $2\ 10^{-9}\ M^{-1}$.

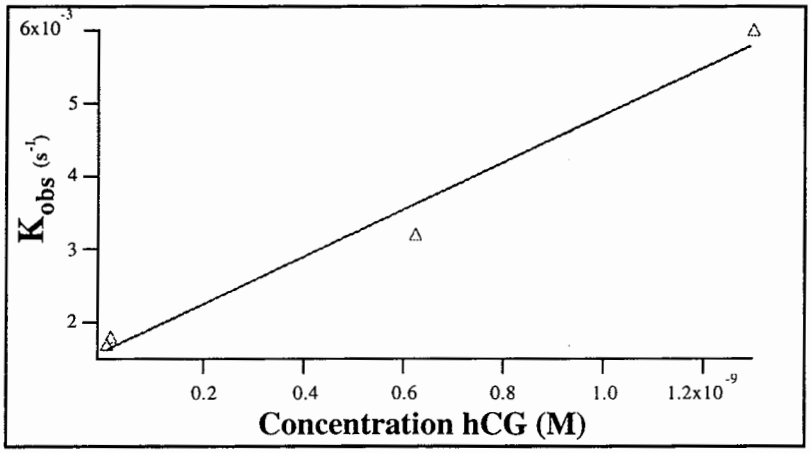


Figure III-10 : Détermination de la constante d'affinité hCG-HT13 à l'aide des coefficients d'ajustement des cinétiques de la figure III-9.

III-A-3-Conclusion

À la vue des résultats présentés tout au long de ce chapitre, la RPS possède la plus grande sensibilité analytique des trois systèmes étudiés. Le fait d'adjoindre au plasmon de surface une chimie liant le ligand de façon covalente améliore le taux de recouvrement et donc le rendement antigène-anticorps (Fig. III-10bis). Aucun autre paramètre ne voit sa valeur augmenter.

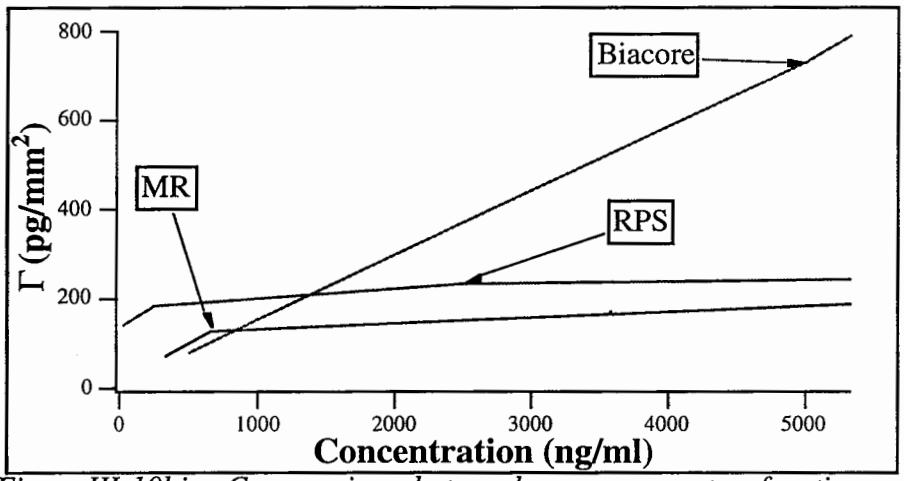


Figure III-10bis : Comparaison du taux de recouvrement en fonction de la concentration en hCG pour les trois types de biocapteur utilisés.

La figure III-10bis illustre le fait que la chimie de surface associée au Biacore assure un taux de recouvrement linéaire en fonction de la concentration, ce qui n'est pas le cas pour les deux autres systèmes. On voit nettement que pour le système RPS développé à IOTA, nous aurions pu abaisser la concentration d'hCG puisque pour la plus faible concentration testée sur ce système, on obtient un signal supérieur aux deux autres systèmes. Nous choisirons en conséquence d'utiliser le système RPS, qui assure la meilleure sensibilité analytique dans expériences suivantes. Passons à présent au dévelloppement du capteur multiparamétrique, nous conduisant à l'élaboration de la MRPS.

III-B-Vers le capteur multiparamétrique

L'immunoanalyse simultanée requiert la possibilité de suivre en temps réel l'évolution de plusieurs éléments du capteur fonctionnalisés par des espèces biologiques différentes, lors de la mise en contact du capteur avec un analyte propre à l'une des espèces immobilisées.

Le seul principe qui donne la possibilité à l'analyse d'interactions moléculaires d'être sélective spatiallement sur la surface d'un capteur est d'imager cette dernière à l'aide d'une caméra. Ce principe associé à une méthode de transduction optique telle la RPS, nous a conduit à développer un microscope à effet plasmon, réunissant toutes les propriétés nécessaires à l'élaboration d'un capteur optique multiparamétrique.

Nous présentons dans ce chapitre des expériences de reconnaissance anticorps-antigènes sur des capteurs munis de trois types de plots différents (trois plots par espèce). Notre but est de démontrer la faisabilité d'un tel dispositif tout en conservant les propriétés liées à la RPS (sensibilité, temps réel, absence de marqueurs moléculaires). En associant différentes espèces à même le capteur, nous devrons faire face à de nouveaux phénomènes, tels que la spécificité de la reconnaissance (éviter les réactions croisées) et la reproductibilité des résultats sur des plots d'une même espèce. Nous allons débuter par l'immobilisation des trois anticorps monoclonaux jouant le rôle de ligand, puis nous décrirons le protocole suivi pour enfin analyser les résultats et les comparer avec ceux obtenus avec la RPS classique.

III-B-1-Immobilisation des anticorps

Dans les expériences de reconnaissance à une seule espèce, l'immobilisation de l'anticorps se fait dans la cuve de réaction par l'intermédiaire d'un tube de sortie et une tube d'entrée dans lesquels circule la solution d'anticorps diluée dans le tampon courant. Le capteur présente alors sur toute sa surface la même quantité d'anticorps. Nous ne pouvons pas recourir à cette méthode dans le cas du multicapteur, car chaque espèce doit être cantonnée géographiquement et isolée des autres pour faciliter d'une part la mesure de l'immobilisation et d'autre part l'interprétation des résultats. Ceci implique une immobilisation indépendante de chaque espèce sur le capteur. Nous avons décidé d'utiliser une micro-pipette (Gilson) pour délivrer sur le capteur des gouttes de solution d'anticorps d'un volume de l'ordre de 300 nl pour un diamètre compris entre 0,5 et 1 mm. Les anticorps contenus dans ces gouttes sont adsorbés passivement par la surface d'or à flux nul. Nous allons à présent donner des arguments nous permettant de comparer pour chaque espèce biologique ce mode d'adsorption par rapport à l'immobilisation *in situ* dans la cuve de réaction au travers d'un exemple qui nous donnera l'occasion de revenir sur la quantification par imagerie.

III-B-1-1-Préparation du capteur

Les expériences traitées dans ce chapitre concernent la reconnaissance de l'hCG, de l'AFP et de la TG (cf. III-C) par leur anticorps monoclonal respectif. Nous disposons donc 9 gouttes de solution d'anticorps (trois par espèce) suivant le modèle d'une matrice 3X3, de telle façon qu'il y ait un représentant de chaque anticorps sur chaque ligne et chaque colonne du motif (Fig. III-11). La lame d'or et ses 9 gouttes sont maintenues pendant 20 minutes dans un environnement clos à forte hygrométrie (pour éviter que les gouttes sèchent) puis les gouttes sont drainées à l'aide d'un papier absorbant puis rincées à l'eau distillée pendant au moins 5 minutes et enfin séchées à l'air comprimé. Le fait de drainer les gouttes évite de déposer des anticorps hors de la zone initiale au moment du rinçage. En effet, lors de la phase d'adsorption, tous les anticorps ne sont pas adsorbés sur l'or, mais demeurent en suspension dans la goutte.

Dans une adsorption à flux non nul, on injecte en continu un certain nombre de molécules dans la cuve de réaction, il y a donc en permanence beaucoup plus de molécules en solution qu'adsorbées en surface. Si il y avait déplétion des molécules, alors un équilibre en solution limiterait l'accès de la surface aux anticorps. Dans le cadre du multicapteur, le faible volume de la goutte à la même concentration qu'en flux non nul peut conduire à cet équilibre limitant l'immobilisation des anticorps. En conséquence, les anticorps utilisés dans les expériences multiparamétriques sont concentrés au moins à 0,5 g/l au lieu de 0,2 g/l.

Une fois la lame sèche, on la couple au prisme puis on l'hydrate avec de l'eau désionisée.

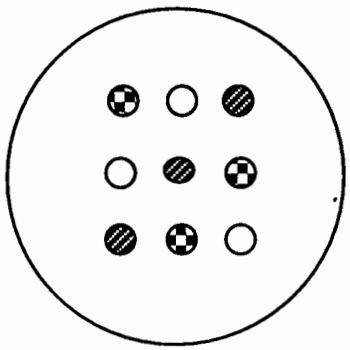


Figure III-10 : Schéma du dépôt des anticorps. Chaque anticorps apparaît une fois par ligne et par colonne.

III-B-1-2-Quantification de l'adsorption des anticorps

La première étape de la quantification a lieu avant le dépôt des gouttes d'anticorps sur la lame. Il s'agit de prendre une référence de la lame d'or nu, c'est à dire connaître son profil et sa position de résonance. On utilise pour cela le banc RPS classique (λ=632,8 nm) qui permet de scanner angulairement l'échantillon. Une fois les paramètres connus pour cette longueur

d'onde, on simule la courbe de réflectivité à 660 ± 40 nm. On replace ensuite l'échantillon sur le banc imageur et l'on relève alors la position où le niveau de gris est le plus bas. Il y a alors accord entre la référence en imagerie et la connaissance des paramètres de la lame d'or ajustés à 632,8 nm.

Après l'immobilisation des anticorps, mais avant l'hydratation du capteur, on relève la position de résonance pour chaque plot. Ceci nous permettra ultérieurement de mesurer le taux de recouvrement de l'adsorption passive pour chaque espèce. Nous donnons un exemple d'immobilisation dans la figure III-12 où apparaissent 9 plots fonctionnels. Il est à souligner que l'on peut toujours mesurer le décalage angulaire et la variation de réflectivité une fois les anticorps déposés, puisqu'il subsiste encore des zones d'or nu sur le multicapteur.

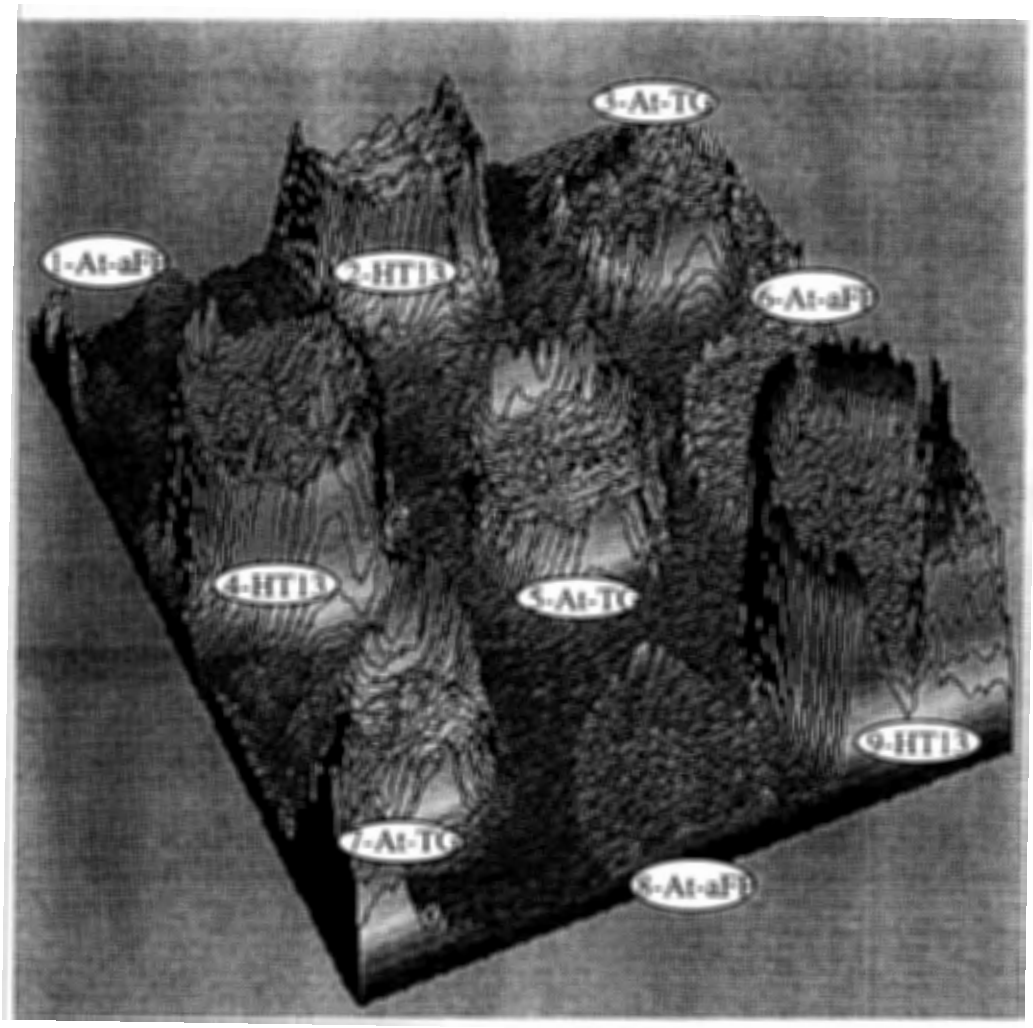


Figure III-12 : Projection 3-D de l'image des neuf plots après adsorption passive des anticorps à partir d'une image du capteur.

Il nous faut à présent comparer les valeurs mesurées pour chaque anticorps avec celles obtenues en flux non nul avec le capteur à un paramètre. Pour ce faire nous donnons dans la figure III-13 les cinétiques d'adsorption à un paramètre, d'hCG, d'AFP et de TG, toutes diluées à 0,2 g/l ainsi que le décalage angulaire engendré pour chaque espèce. Le tableau III-f résume les valeurs obtenues dans les deux cas. Pour l'imagerie, l'épaisseur protéique adsorbée pour chaque plot est calculée à partir du décalage angulaire et appliqué à la simulation numérique à la longueur d'onde de la diode électroluminescente.

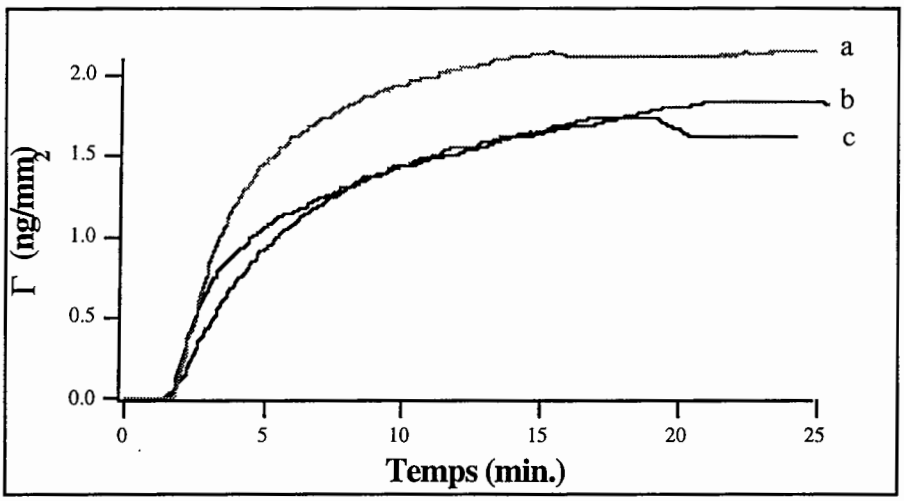


Figure III-13 : Cinétiques d'adsorption des trois anticorps monoclonaux concentrés à 0,2 g/l, avec la RPS classique a) HT13 (3 ng/mm^2), b) anti-TG (2 ng/mm^2) et c) anti-AFP (1,6 ng/mm^2).

Comme le montre l'image de la figure III-12, en accord d'ailleurs avec les courbes de la figure III-13, le nombre d'anticorps adsorbés n'est pas le même pour toutes les espèces. On peut expliquer ce phénomène de la façon suivante : l'affinité des anticorps avec l'or, qui ont tous la même masse molaire, dépend de leur structure en acides aminés, pouvant rendre l'immunoglobuline un peu plus hydrophobe (augmentant les interactions avec l'or), ou pouvant la rendre hydrophile, limitant alors l'adsorption de son espèce. Il s'en suit qu'en terme d'imagerie, les plots ne peuvent avoir la même épaisseur.

Pour adresser différentes zones d'un même capteur, nous avons immobilisé les anticorps en les faisant s'adsorber à flux nul pendant 1 heure. Les taux de recouvrement obtenus avec cette technique sont résumés dans le tableau III-f.

Espèces d'anticorps	Γ obtenu avec la RPS classique (ng/mm^2)	Γ estimé par la MRPS (ng/mm^2)
anti-TG	2	1,8
HT13	1,6	2,4
anti-aFP	1,5	1

Tableau IIII-f : Taux de recouvrement moyens obtenus avec les deux modes d'adsorption passive pour les trois anticorps monoclonaux dans deux séries d'expériences indépendantes.

Il semble donc qu'en plus des différents affinités qu'ont les anticorps pour l'or il faille également prendre en compte le mode d'adsorption passive dans nos expériences. Quoiqu'il en soit, notre méthode de quantification angulaire réalisée avec la MRPS nous permet de connaître l'état de surface des plots d'anticorps avant l'injection des antigènes.

Après l'immobilisation des anticorps et leur hydratation, on injecte le tampon courant de PBS à pH 7,4 puis on bloque le multicapteur à l'aide de BSA. A ce stade, toute interaction antigénique observée sera nécessairement spécifique. On remarque au passage que la BSA va préférentiellement s'adsorber sur l'or nu plutôt que sur un plot d'anticorps (Fig. III-14).

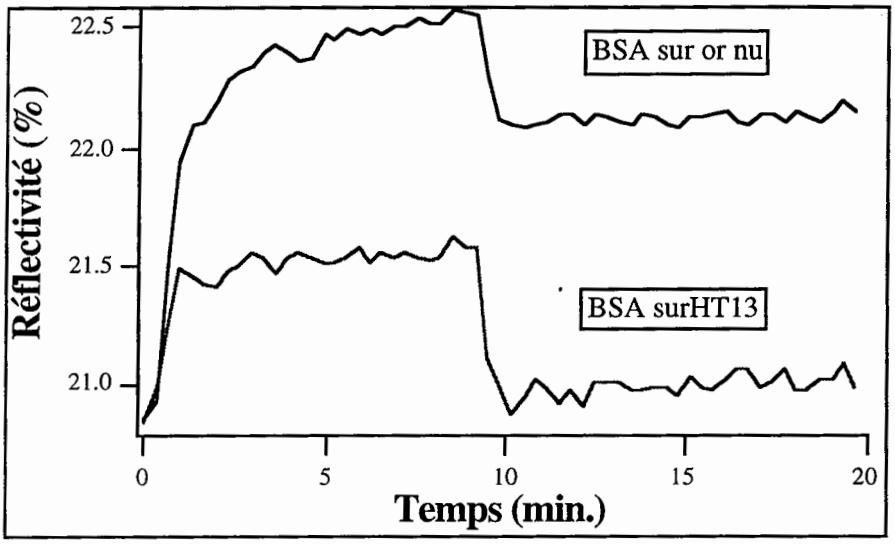


Figure III-14 : Cinétiques d'adsorption de la BSA enregistrées sur un plot d'HT13 (80 pg/mm^2) et sur le fond d'or nu (400 pg/mm^2).

Cette section est le préalable obligatoire avant de pouvoir procéder à l'injection d'antigènes, d'une part pour connaître le nombre de récepteurs sur le transducteur et, d'autre part, pour s'affranchir du mieux possible des signaux parasites engendrés par les interactions non spécifiques.

III-B-2-Reconnaissance spécifique des antigènes

Le fait que les différents anticorps ne soient pas adsorbés en quantité égale pose un problème en terme d'homogénéité des niveaux de gris des plots du capteur. En effet, le niveau de gris d'un plot est directement proportionnel à son épaisseur. Aussi, il faut veiller à changer l'angle suivant lequel on capture les images en fonction de la série de plots à analyser. En effet, les minima de réflectivité ne sont pas à la même position angulaire pour les trois espèces, et il en va de même pour l'angle qui optimise la sensibilité de la détection.

Les injections des différents antigènes ont lieu successivement pendant 30 minutes à une concentration de 0,02 g/l. Nous rappelons que les antigènes, à savoir l'AFP, la TG et l'hCG ont respectivement une masse molaire de 60, 330 et 40 KDa.

Nous présentons dans la figure III-15 les cinétiques d'interactions de l'AFP avec d'une part les trois plots sur lesquels avaient été immobilisés les anticorps anti-AFP et d'autre part sur un plot d'HT13.

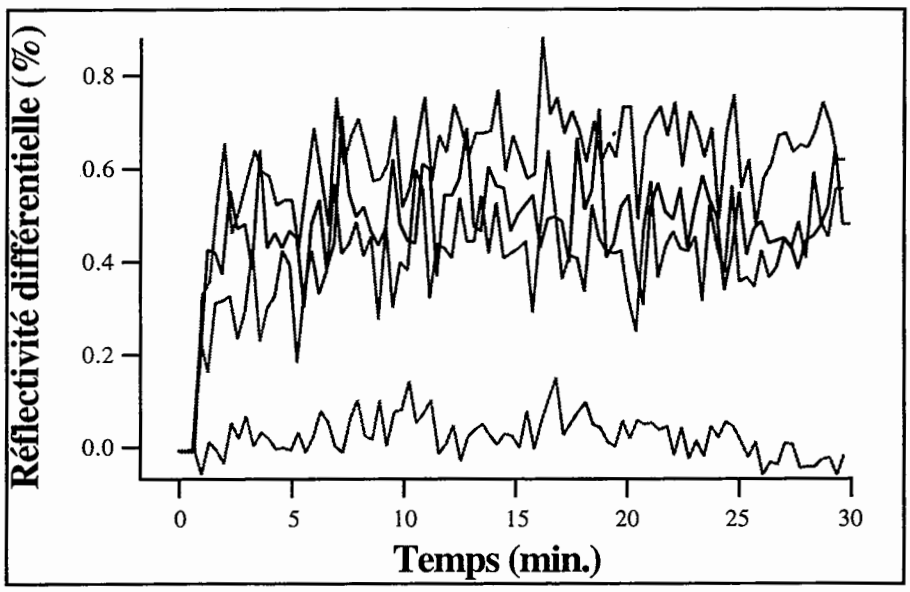


Figure IIII-15 : Cinétiques de reconnaissance de l'AFP par son anticorps sur les trois plots fonctionnalisés avec l'anti-AFP. La quatrième courbe correspond à l'adsorption non-spécifique sur un plot d'HT13.

Les variations de réflectivité obtenues sur les plots d'anti-AFP sont significatives d'une reconnaissance spécifique des molécules d'AFP puisque sur un plot d'HT13 on ne relève pas de signal. D'autre part, on remarque que les signaux sont du même ordre de grandeur pour les trois plots.

Afin de quantifier ces résultats, nous avions préalablement enregistré la réflectivité en fonction de l'angle d'incidence de la zone du capteur portant les plots. Nous avons ainsi pu établir qu'une variation de réflectivité de 1% correspondait à une épaisseur de 0,66 nm pour un indice de 1,41. Nous donnons un bilan général des résultats issus de ces expériences dans le tableau III-g. De même que pour l'AFP, nous avons injecté dans le cuve de réaction successivement la TG et l'hCG, dont les cinétiques sont respectivement présentées dans les figures III-16 et III-17.

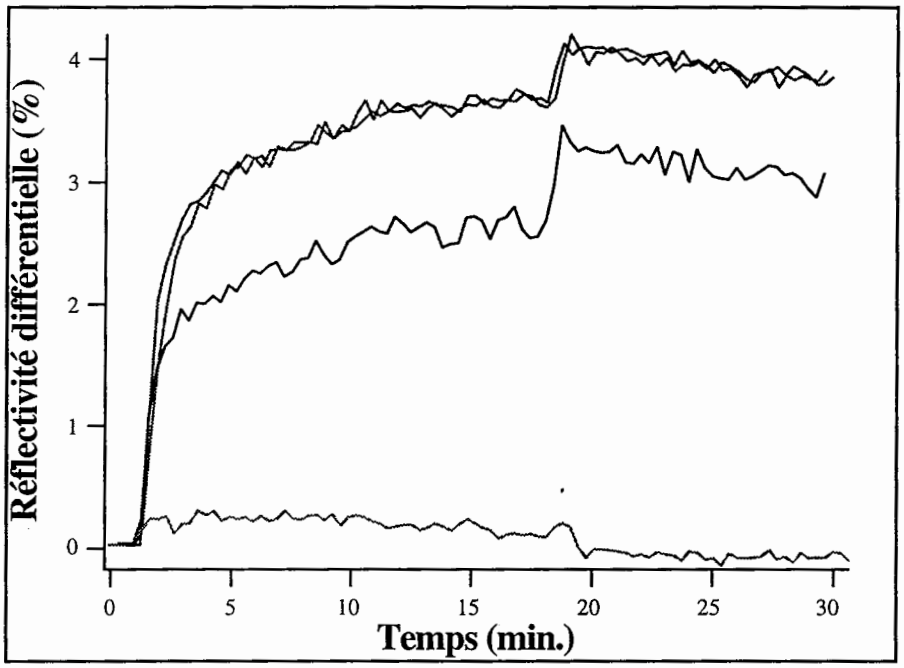


Figure III-16 : Cinétiques de reconnaissance de l'hCG par son anticorps sur les trois plots fonctionnalisés avec l'HT13 et contrôle de la spécificité sur un plot d'anti-TG.

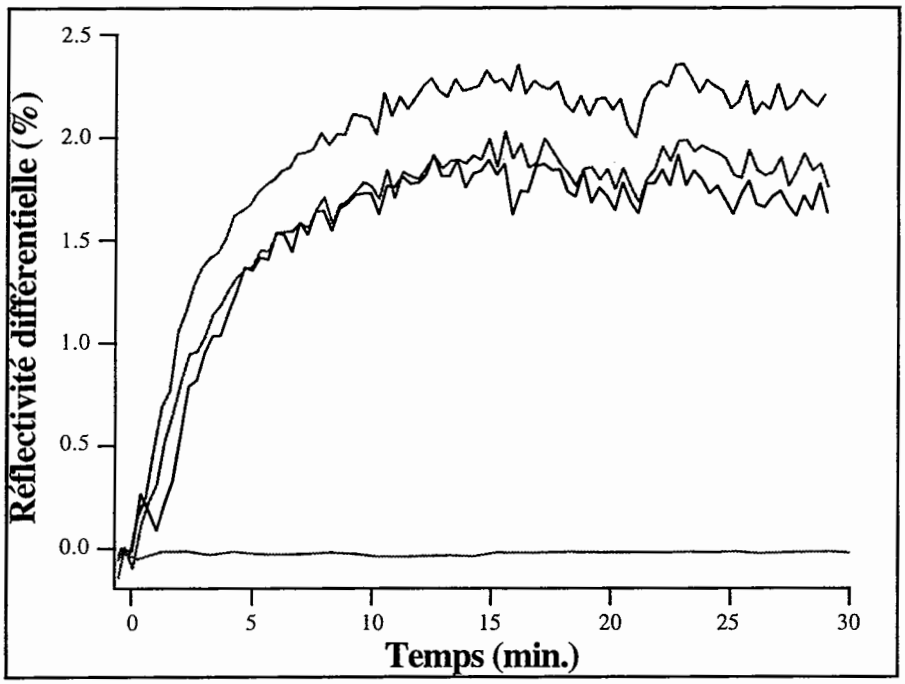


Figure III-17 : Cinétiques de reconnaissance de la TG par son anticorps sur les trois plots fonctionnalisés avec l'anti-TG et contrôle de la spécificité sur un plot d'anti-AFP.

Espèces adsorbées	épaisseur mesurée(nm)	taux de recouvrement pg/mm^2	nombre de moles fM/mm^2	rendement antigène/anticorps (%)
AFP	0,4	160	2,7	41
TG	1,3	530	1,6	13
hCG	2,4	960	24	78

Tableau III-g : Bilan des expériences de multicapteur réalisées avec les antigènes AFP, TG et hCG.

L'expérience montre que la reconnaissance spécifique de trois antigènes sur un transducteur optique basé sur la MRPS est possible. Toutefois, au vu des chiffres du tableau III-g, il apparaît que les résultats diffèrent d'un couple anticorps-antigène à l'autre. Nous allons tenter de dresser dans la prochaine section la liste non-exhaustive des raisons expliquant un tel comportement.

III-B-3-Discussion

Tout d'abord nous allons traiter de l'immobilisation des anticorps, adsorbés passivement, qui ne donne pas les mêmes résultats suivant l'anticorps. En effet, l'adsorption passive sur l'or relève de phénomènes aléatoires qui sont liés à l'affinité de l'anticorps monoclonal pour le substrat (cf. tableau III-f), à la façon dont celui-ci sera adsorbé (combien de sites de reconnaissance sont disponibles après l'adsorption ?) et enfin, la méthode utilisée pour effectuer cette adsorption passive (flux continu ou nul). Ces trois paramètres contribuent dès le début à créer la grande variation des valeurs présentées dans le tableau III-g. Il s'ensuit qu'après la phase d'immobilisation, les plots ne possèdent pas le même nombre de sites de reconnaissance, ce qui se traduit par une inhomogénéité des plots. Cette inhomogénéité implique une détection à différents angles suivant les plots observés afin de travailler à sensibilité égale pour chaque interaction.

Lors des processus de reconnaissance, les antigènes sont reconnus avec une certaine constante d'association, propre au couple anticorps-antigène considéré. On pourrait alors attribuer une partie des écarts de rendement à ce phénomène, mais surement pas la totalité. Regardons alors de plus près les caractéristiques des antigènes étudiés. On remarque tout d'abord que les antigènes les mieux reconnus sont les plus petits (hCG, 40 kDa) et les moins reconnus, les molécules de TG (330 kDa). Comme les IgG ont une masse molaire de 150 kDa, soit plus de deux fois moins que les molécules de TG, on peut expliquer le faible rendement de ce couple en invocant les phénomènes d'encombrements stériques, c'est à dire que la densité de surface des anti-TG limiterait leur accéssibilité vis à vis des TG. Mais pour des molécules de trois à quatre fois plus petites que leur anticorps (AFP ou hCG), la densité d'anticorps immobilisés serait optimale. Il apparaît donc que la détection en parallèle d'interactions de type immunologique avec la méthode de la MRPS doit subvenir à plusieurs critères :

-une adsorption des anticorps conduisant à des plots homogènes
-l'utilisation d'analytes de masse molaire équivalente
-des constantes d'association du même ordre pour tous les couples

III-B-4-Conclusion

Nous sommes donc parvenus à mettre au point un biocapteur multiparamètrique donnant accès à des valeurs en temps réel et sans marqueur. Cependant, les résultats obtenus présentent une grande variation liée au mode d'immobilisation choisie des anticorps. De plus, l'adsorption passive ne permet pas la réutilisation du capteur. Toutefois, la spécificité des interactions est sans ambiguïté et la méthode de quantification basée sur la variation de niveau de gris permet d'accéder aux grandeurs qui rendent compte de l'association antigènes-anticorps avec la même précision que la méthode RPS classique.

Une façon d'optimiser ce multicapteur consiste à lier les anticorps à la surface de façon covalente, d'une part pour pratiquer successivement des interactions à concentration dégressive en régénérant la surface sensible afin d'avoir accès aux constantes d'associations et d'autre part pour garantir le même nombre de sites de reconnaissance pour tous les plots. La méthode d'adressage à l'aide d'une micro-pipette sur une surface sêche présente elle aussi des inconvénients puisqu'il existe un risque de dénaturer les anticorps présents et ainsi compromettre la reconnaissance des antigènes.

Mais la MRPS appliquée à d'autres types de molécules biologiques, moins dépendantes de l'affinité avec le substrat et présentant des affinité plus grandes (comme les fragments d'ADN) peut être envisagée. Aussi allons-nous passer à l'étude de l'immobilisation covalente de brins d'ADN, conduisant à la visualisation en temps réel de la création de duplex.

III-C-Étude des voies d'immobilisation de brins d'ADN : Vers l'hybridation en parallèle

Nous venons de valider le caractère multiparamètrique de la détection d'interactions moléculaires dans la partie III-B en immobilisant des anticorps par adsorption passive. Outre le fait que ces expériences ne sont pas très reproductibles, les surfaces ainsi fonctionnalisées ne pouvaient être utilisées qu'une seule fois. En associant le multicapteur optique à certains traitements de surface (cf. I-D), nous allons décrire dans un premier temps la réalisation de surfaces sensibles à l'hybridation d'oligonucléotides pouvant être réutilisées plusieurs fois, puis dans un deuxième temps, nous essaierons d'adresser ces surfaces biologiquement actives de façon à travailler en détection parallèle d'hybridations successives.

Nous analyserons trois types d'immobilisation de brins d'ADN, qui serviront exclusivement à fonctionnaliser des transducteurs basés sur la RPS et destinés à être adaptés à la MRPS. L'un des traitements de surface étudiés s'appuie sur l'utilisation du couple avidine-biotine en immobilisant l'avidine de façon passive ou covalente, c'est à dire à même l'or ou bien à l'aide d'une couche chimique fonctionnalisé par des biotines (cf. Fig. I-28 et I-29). L'autre traitement de surface reprend en substance la méthode de copolymérisation du polypyrrole décrite et schématisée plus loin.

III-C-1-Immobilisation d'ADN via le système avidine-biotine

Le couple avidine-biotine est très souvent utilisé dans le cadre de l'immobilisation de molécules biologiques, soit en biotinylant la molécule en question, puis en la mettant en contact avec une molécule d'avidine, soit en marquant la molécule par une avidine. De par la faible masse molaire des oligonucléotides utilisés, nous nous sommes orientés vers la première méthode. Il s'agit alors d'optimiser toutes les étapes amenant à une surface sensible stable et régénérable notamment en assurant une bonne fixation de la monocouche d'avidine, préalable à l'injection d'oligonucléotides biotinylés. Nous présentons dans cette section deux formes d'immobilisation via le système avidine-biotine. Nous déterminerons ainsi si ce mode de fonctionnalisation est adapté à l'hybridation et dans quelles conditions il peut satisfaire les critères du capteur optique multiparamétrique.

III-C-1-1-Préparation du capteur

L'immobilisation de surface de brins d'ADN à l'aide du système avidine-biotine présente plusieurs variantes dans son utilisation. En effet, fixer la couche sensible d'avidine peut s'effectuer par adsorption passive ou bien par liaison covalente avec par exemple une couche de biotine pré-immobilisée. Ces deux méthodes présentent chacune des avantages et des inconvénients : l'adsorption passive (à même l'or) risque de dénaturer l'avidine mais sa fixation se fait en une seule étape, tandis que la fixation quasi-covalente avec une biotine consiste en plusieurs étapes, mais garantit l'intégrité biologique des molécules fixées.

Nous allons étudier dans cette section les deux types d'immobilisation de l'avidine au travers d'expériences visant à assurer la meilleure fixation possible pour les oligonucléotides.

C-1-1-1-Adsorption passive de l'avidine

Les molécules d'avidine, qui possèdent quatre sites de reconnaissance (cf. II-C-1-4), doivent après l'adsorption disposer d'au moins encore un de ces sites (voire deux) pour espérer fixer en nombre suffisant les oligonucléotides biotinylés. En réalisant l'expérience d'adsorption passive de l'avidine sur l'or et en la quantifiant par l'entremise de la RPS, nous pourrons alors estimer le nombre de molécules présentes à la surface.

La figure I-17 montre la cinétique de fixation de molécules d'avidine sur l'or à une concentration de 0,2 g/l.

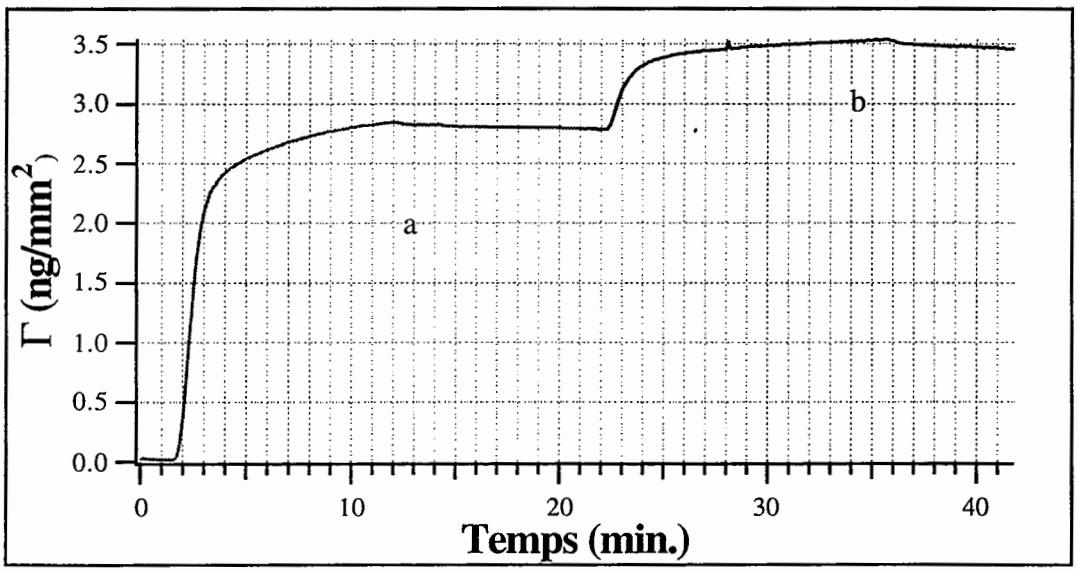


Figure III-17 : Cinétique d'adsorption passive sur or nu d'avidine à 0,2 g/l, suivie de la cinétique d'oligonucléotides M5 à 0,1 g/l.

En fixant l'indice optique d'une monocouche compacte d'avidines à 1,466, nous avons mesuré une épaisseur moyenne de 3,95 nm. Le taux de recouvrement qu'on tire à partir de la loi de De Feijter indique une masse par unité de surface de 2,77 ng/mm^2, correspondant à 46 fmole/mm^2. En fonction de la géométrie de l'avidine (parallélépipèdique) et de l'épaisseur mesurée, nous aimerions déduire de quelle façon elle s'adsorbe. Nous rappelons que l'avidine peut être comparée à un rectangle de 5,4 X 5,8 nm^2 ayant une épaisseur de 4,8 nm. Dans le cas où une molécule occupe une surface de 5,4 X 5,8 nm^2, la surface totale occupée par 46 fmole est de 0,87 nm^2, lorsque la surface occupée par une molécule est de 4,8 X 5,4 nm^2, la surface totale occupée vaut 0,72 nm^2, et 0,77 nm^2 dans le dernier cas. Or, le pourcentage entre l'épaisseur mesurée et chacune des dimensions de l'avidine correspond à 82,3% dans le premier cas, 73% dans le deuxième et 68% dans le troisième. En conséquence, les molécules d'avidine sont adsorbées par leur plus grande surface avec une épaisseur pour une monocouche compacte homogène correspondant à 4,8 nm. Après la cinétique de fixation de l'oligonucléotide biotinylé M5 à 0,1 g/l, on mesure un taux de recouvrement de 560 pg/mm2, correspondant à 93 fmole, ce qui donne un rendement de fixation de l'oligonucléotide (par sa biotine) de 2 oligonucléotides biotinylés par molécule d'avidine. Ainsi, l'adsorption passive permet une bonne immobilisation de brins d'ADN pour suivre une hybridation. Nous allons maintenant étudier le cas de la fixation covalente de molécules d'avidine à l'aide d'une couche chimique fonctionnalisée avec des biotines.

C-1-1-2-Fixation covalente de l'avidine

La voie d'immobilisation quasi-covalente des molécules d'avidine que nous avons choisie, consiste à fixer de façon covalente une couche de biotines par l'intermédiaire de molécules de cystéamine (SH_2-CH_2-CH_2-NH_2). Celles-ci possèdent un radical soufré se liant facilement à l'or et un radical NH_2 chimiquement actif pouvant être considéré comme l'équivalent des radicaux COOH du dextran (cf. III-A-2). En effet, nous avons employé un composé biochimique de Sulfo-NHS-biotine dont le radical NHS réagit de façon covalente avec le radical NH_2 de la cystéamine. Pour ne pas se trouver en situation d'encombrement stérique à la suite de l'adsorption covalente des molécules de Sulfo-NHS-biotine (situation où tous les sites de reconnaissance de l'avidine se seraient liés à une biotine), nous fonctionnalisons la lame d'or avec un mélange de cystéamines et des molécules de mercaptoéthanol (SH_2-CH_2-CH_2-OH) ne réagissant pas avec la Sulfo-NHS-biotine et dont le rôle est de servir d'espaceur chimique entre les cystéamines. Le mélange donnant le meilleur rendement a consisté à mélanger les deux liens chimiques à des concentrations de 0,01 M et 0,05 M pour la cystéamine et le mercaptoéthanol respectivement.

III-C-1-2-Hybridation d'oligonucléotides

À présent que l'immobilisation de surface des oligonucléotides-sondes a été optimiseée pour nos systèmes de détection, nous allons réaliser des cycles d'hybridation/dénaturation en comparant pour les deux modes de fixation de l'avidine à la fois la qualité du signal mesuré et la reproductibilité de ce signal cycle après cycle.

C-1-2-1-Cas de l'adsorption passive d'avidine

Nous avons réalisé quatre cycles d'hybridations entrecoupés de cycles de régénération (eau pure) (cf. Fig. III-19) tout en vérifiant en premier lieu la spécificité du système en injectant l'oligonucléotide CP* à 0,1 g/l. Les oligonucléotides complémentaire M5* de la sonde immobilisée ont été injectés à 0,05 g/l pendant 20 minutes à chaque fois.

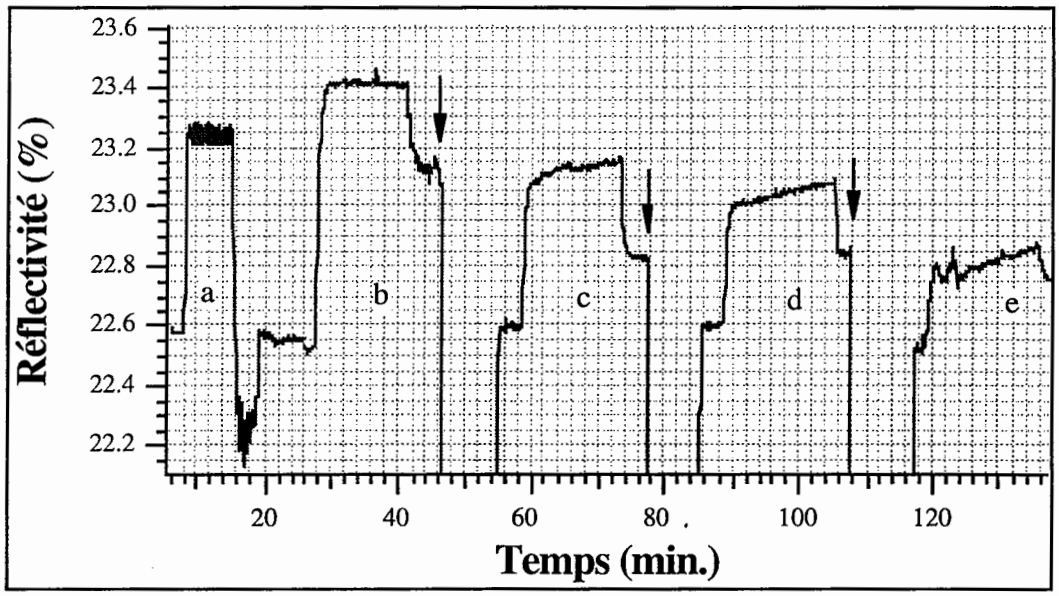


Figure III-19 : Cinétiques rendant compte de la spécificité du système de détection oligonucléotidique, et quatre cycles d'hybridation/dénaturation de la cible M5. Les flèches indiquent le début des cycles de régénération. a) passage de l'oligonucléotide CP* (non relevant pour la sonde M5) (o pg/mm^2), b) hybridation M5* (160 pg/mm^2),c)hybridation 2 (80 pg/mm^2), d) hybridation 3 (80 pg/mm^2) et e) hybridation(80 pg/mm^2).*

La spécificité de l'interaction ne fait aucun doute puisque le CP* n'a fait que passer au voisinage de la surface sans être reconnu par la sonde M5. Par contre, on détecte bien l'hybridation au passage de l'oligonucléotide M5*, bien que le rendement d'hybridation soit relativement faible (25%). On voit que l'on peut utiliser plusieurs fois le capteur, mais dès le deuxième cycle on perd 50% du signal d'hybridation. Ceci est probablement dû au fait que les

molécules d'avidine sont adsorbées passivement, et par conséquent ne sont pas liées solidement au substrat d'or. Ainsi, la dénaturation en eau distillée pourrait être à l'origine d'une désorption de ces dernières, emportant ainsi les oligonucléotides-sondes biotinylés qui y était fixées.

Le fait que l'avidine soit adsorbée passivement semble poser un problème de stabilité du capteur au fil des cycles, sa fixation covalente devrait limiter ce problème.

C-1-2-2-Cas de la fixation covalente de l'avidine

Pour pallier les difficultés liées à l'adsorption passive, nous fixons l'avidine de façon quasi-covalente sur des molécules de cystéamine via des molécules de sulfo-NHS-biotine. Nous injectons cette fois-ci des molécules d'avidine portant deux oligonucléotides sondes (via des biotines), car si nous injectons directement l'avidine nue sur les biotines attachées à la cystéamines (occasionnant une variation de réflectivité de 15%, soit une monocouche d'avidine complète), tous les sites de reconnaissance sont bloqués et nous ne pouvons plus fixer de sondes biotinylées (expérience non présentée). Nous présentons dans le figure III-20 une expérience d'hybridations successives sur un substrat d'or fonctionnalisé avec une couche d'avidine portant deux sondes oligonucléotidiques, les avidines étant liées par des biotines, elles-mêmes fixées aux cystéamines via une fonction NHS.

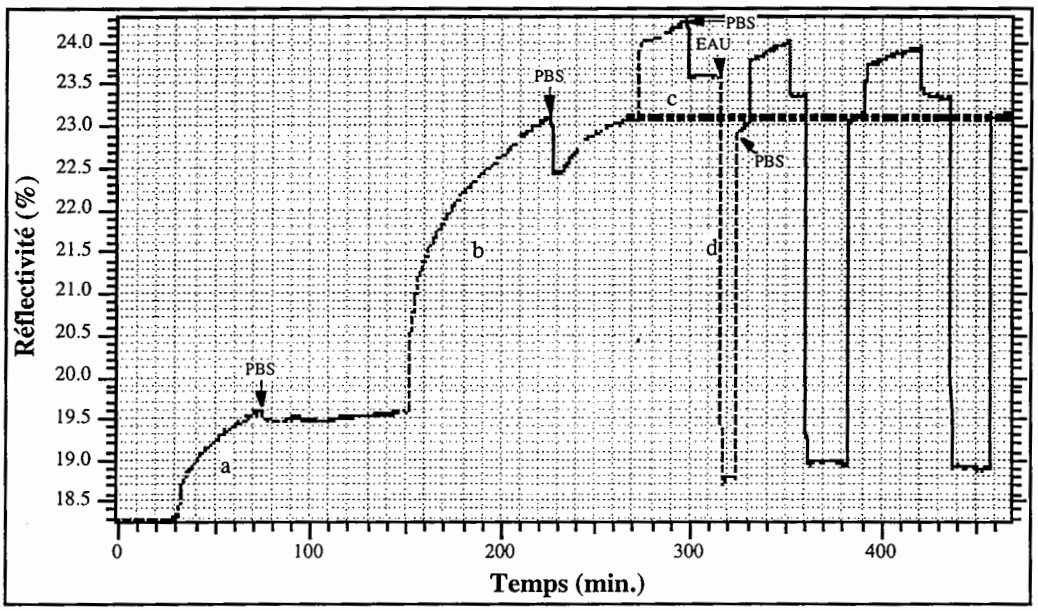


Figure III-20 : Cinétiques rendant compte de l'immobilisation et de l'hybridation des séquences M5 (biotinylées) et M5 à l'aide d'avidines fixées de façon covalente à des cystéamines via des biotines. Trois cycles d'hybridation sont présentés avec pour le premier une variation de réflectivité de 0,6% puis 0,3% pour les deux autres. On suit sur le graphe : a) sulfo-NHS-biotine envoyées sur la cystéamine à 0,25 g/l, b) avidine portant deux sondes biotinylées (0,2 g/l), c) hybridation de la séquence M5* complémentaire (70 mg/l) et d) cycle de régénération dans l'eau pure.*

L'immobilisation covalente de molécules d'avidine portant deux oligonucléotides avait pour but d'améliorer la régénérabilité du capteur. Or, on voit sur la figure III-20, que le signal d'hybridation n'est que de 0,55% en terme de variation de réflectivité. Cette valeur est exactement la même que celle obtenue quand les molécules d'avidine sont adsorbées passivement sur le substrat d'or. Mais dès la seconde hybridation, le signal ne vaut plus que 0,35% dans les deux cas. La seule différence notable entre l'immobilisation passive et covalente des molécules d'avidine réside dans le signal résultant de l'adsorption de l'avidine. En effet, l'adsorption passive de l'avidine occasionne une variation de réflectivité de l'ordre de 8%, tandis que la liaison quasi-covalente entre des biotines fixées sur des cystéamines, et des molécules d'avidine portant deux sondes, n'atteint que 4% (cf. fig. III-20). Cela signifie d'une part que des molécules d'avidine portant deux sondes se fixent moins bien sur les biotines que des molécules d'avidine nues, et d'autre part, que l'immobilisation des oligonucléotides est plus efficace dans l'expérience de la figure III-20 que dans celle de la figure III-19, car pour deux fois moins d'avidines adsorbées, on obtient la même quantité d'hybridations. Nous n'avons donc pas encore résolu le problème de régénérabilité du capteur en utilisant ces voies d'immobilisation pour les oligonucléotides. Nous présentons dans la prochaine section, une voie alternative basée sur l'utilisation d'un copolymère.

III-C-2-Immobilisation d'ADN à l'aide de polypyrrole

Nous décrivions dans la partie II-D-4, une voie d'immobilisation possible pour des fragments d'ADN, basée sur la copolymérisation d'oligonucléotides greffés à un pyrrole avec d'autres monomères de pyrroles simples. Outre les avantages liés à cette méthode, un des objectifs de ce travail de thèse est de réaliser un capteur à ADN n'utilisant pas de marqueurs. Nous nous tournons à présent vers la caractérisation optique de ce polymère en utilisant la méthode RPS, d'abord conçue pour la caractérisation de films minces par effet de plasmon de surface. Une fois les paramètres optiques déterminés, nous pourrons nous pencher sur une optimisation de l'immobilisation d'oligonucléotides, à la fois en terme de densité de surface de simple-brins d'ADN et également, en terme d'épaisseur du copolymère, ce qui nous permettra de suivre des signaux d'hybridation sans marquer la séquence complémentaire. De plus, nous mettrons en avant la détection en parallèle de signaux d'hybridation en utilisant la MRPS.

III-C-2-1-Caractérisation optique du polypyrrole

Les biocapteurs basés sur la RPS ou sur le MR nous donnent accès à la mesure de l'épaisseur optique de couches minces à la surface du substrat, soit le produit de l'incrément d'indice de la couche par l'incrément d'épaisseur physique de la couche. Aucun de ces deux types de transducteur ne permet l'obtention des deux grandeurs indépendamment. Il s'agit donc de postuler de la connaissance, soit de l'indice, soit de la taille de la couche pour procéder à une mesure dynamique, liée par exemple à l'hybridation d'ADN, où nous fixons l'indice d'une monocouche compacte d'oligonucléotides de 15 bases à 1,41, ce qui nous permet de suivre un signal nous donnant directement la variation d'épaisseur de la couche. La caractérisation optique du polypyrrole va donc reposer d'une part sur la détermination de son indice de réfraction, qui nous donnera la possibilité d'estimer son épaisseur avec une précision de l'ordre du dixième de nanomètre et d'autre part sur son état de surface que nous analyserons par la méthode RPS pour s'assurer de l'homogénéité du copolymère.

C-2-1-1-Détermination de l'indice de réfraction du polypyrrole

Le polypyrrole se présente comme un polymère opaque, ce qui signifie qu'il est absorbant. Nous avons donc à déterminer à la fois son indice réel et son indice imaginaire, rendant compte de son absorption. Comme nous le signalions plus haut, la connaissance *a priori* de l'épaisseur d'un échantillon nous amènerait immanquablement à mesurer précisément ses paramètres optiques. Aussi, avons-nous mesuré la réponse en réflectivité de différentes couches de polypyrrole afin d'avoir accès, de proche en proche, à la valeur de l'indice de

réfraction complexe de ce polymère. Nous avons fourni à nos collaborateurs du CEA-Grenoble (DRFMC) plusieurs lames de microscopes sur lesquelles nous avions déposé sous vide secondaire une couche de chrome (1,5 nm) et une couche d'or (45 nm), le chrome assurant l'adhésion de l'or sur le verre, afin que soit déposée par électrochimie une certaine quantité de polypyrrole. La première étape de détermination des constantes optiques du polypyrrole a été de mesurer la réponse en réflectivité de chacune des lames Cr-Au qui nous ont servies de référence. Nous avons ainsi pu mesurer la déformation et le déplacement du pic plasmon pour chacun des échantillons relativement au pic de référence, en utilisant un programme d'ajustement des courbes enregistrées, issu des lois de Fresnel.

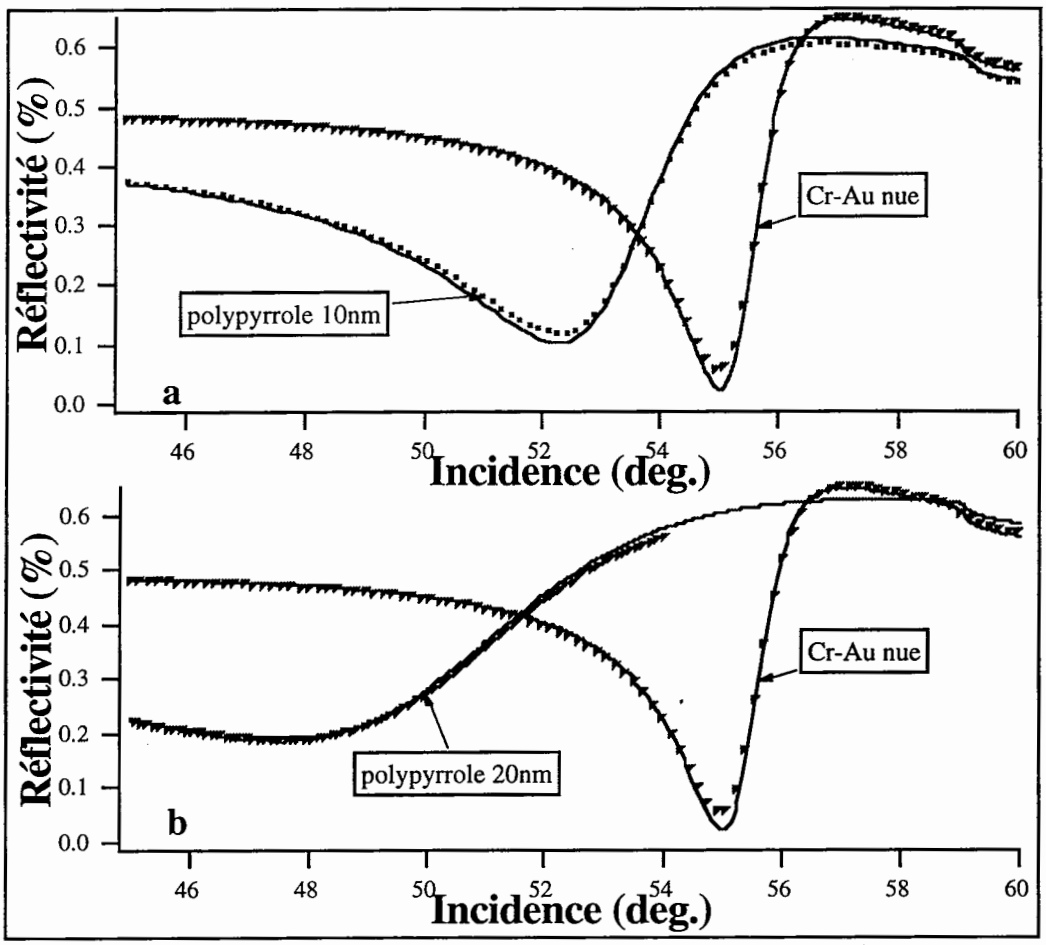


Figure III-21 : Courbes de réflectivité dans l'air en fonction de l'angle d'incidence pour deux échantillons de polypyrrole, ainsi que la référence en or, pour une épaisseur de 10 nm (a) et 20 nm (b). Les courbes ajustées sont en trait plein.

Nous présentons dans la figure III-21 et les courbes de réflectivité pour deux échantillons de polypyrrole ainsi que les courbes de réflectivité donnant la position de résonance, tenant lieu de référence, en fonction de l'incidence externe au prisme. Chacune des courbes a été ajustée, et la courbe théorique calculée a été superposée aux courbes expérimentales. De ces deux échantillons, dont l'épaisseur estimée à Grenoble est de 10 nm et 20 nm, nous avons tiré une valeur de l'indice réel de 1,7 et une valeur de l'indice imaginaire de -0,3 pour le polypyrrole, ce qui est tout à fait en accord avec la littérature [2]. Deux constatations retiennent particulièrement l'attention, d'une part le minimum de réflectivité des échantillons remonte par rapport à celui de l'or nu et d'autre part, à cause du décalage angulaire dû à la présence de polypyrrole, la pente droite du pic plasmon diminue avec l'épaisseur de polypyrrole. Ces deux remarques tendent vers la même conclusion : la sensibilité de détection liée à la dynamique du flanc droit du plasmon ($dR/d\theta$) ainsi qu'à la valeur de sa pente est inversement proportionnelle à l'épaisseur du polypyrrole.

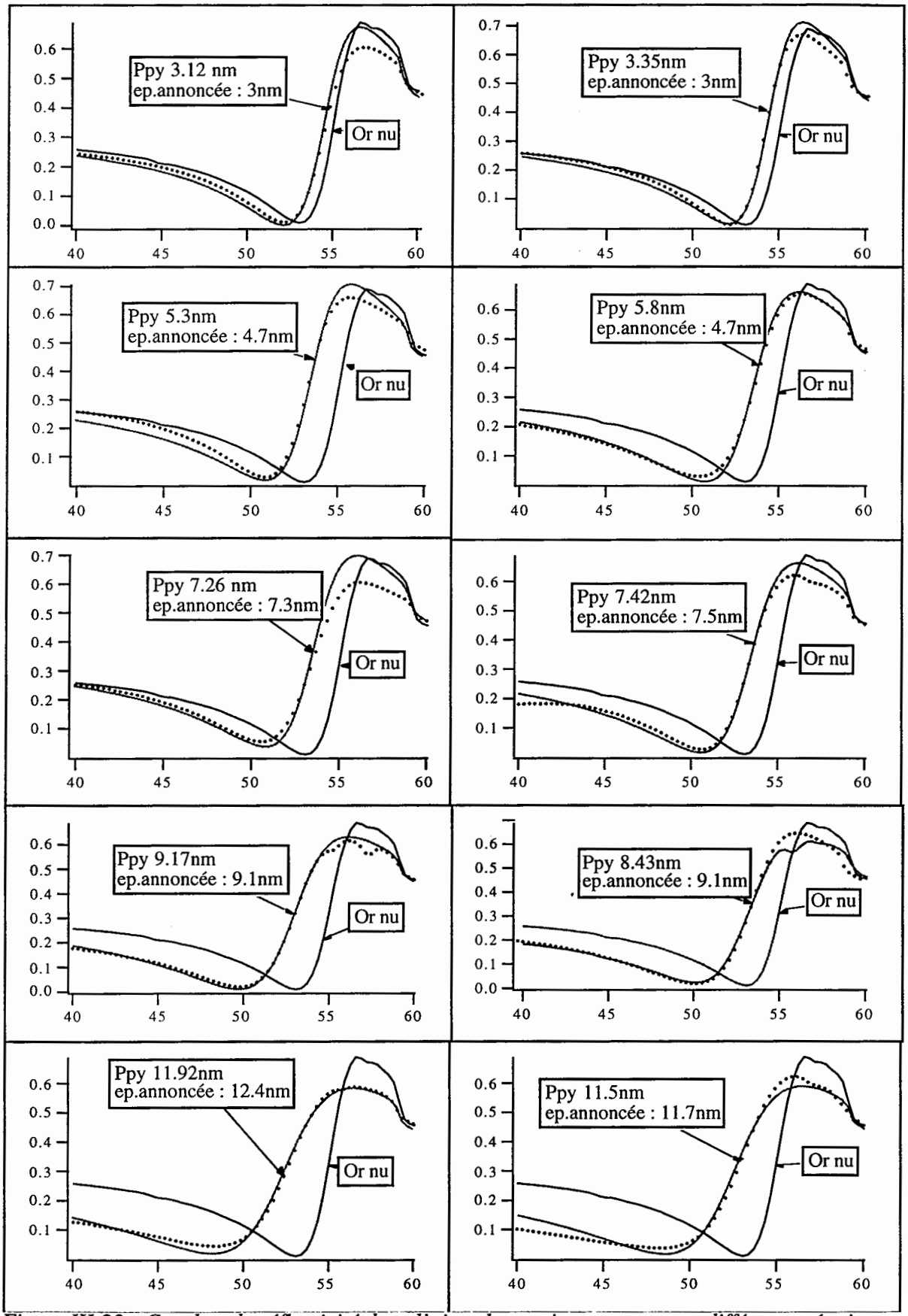


Figure III-22: Courbes de réflectivité dans l'air et leurs ajustements pour différentes épaisseurs de polypyrrole avec la référence sur or nu.

Afin de vérifier la validité de ces valeurs, nous avons fait réaliser sur une même lame d'or plusieurs spots de polypyrrole avec des épaisseurs différentes. Nous avons alors enregistré leur courbe de réflectivité en fonction de l'angle d'incidence, que nous avons ajusté en fixant l'indice réel à 1,7 et l'indice imaginaire à -0,3. L'épaisseur de chacun des spots ayant été préalablement estimée par le DRFMC, nous avons pu comparer nos valeurs aux leurs. Nous donnons les résultats de ces mesures effectuées d'après les ajustements de la figure III-22 dans le tableau III-h, nous amenant à un taux de corrélation de 89% (fig. III-23), ce qui signifie que nos mesures d'épaisseurs sont précises à ±0,1 nm.

Epaisseur estimée (nm)	3	3	4,7	4,7	7,3	7,5	9,1	9,1	11,7	12,4
Epaisseur mesurée (nm)	3,12	3,35	6,3	6,8	7,26	7,42	8,43	9,17	11,5	11,9

Tableau III-h : Comparaison entre les valeurs estimées par le DRFMC et celles mesurées par la méthode RPS.

La connaissance *a priori* de l'indice de réfraction du polypyrrole avec une précision telle que le taux de corrélation entre les épaisseurs estimées au CEA-Grenoble et celles mesurées par la méthode RPS est proche de 90%, nous assure pour toutes les expériences à venir, une précision très bonne sur la mesure absolue de l'état de surface du capteur avant hybridation. En effet, la quantification des interactions biomoléculaires que nous nous proposons de suivre repose sur une mesure relative à l'état de surface initial.

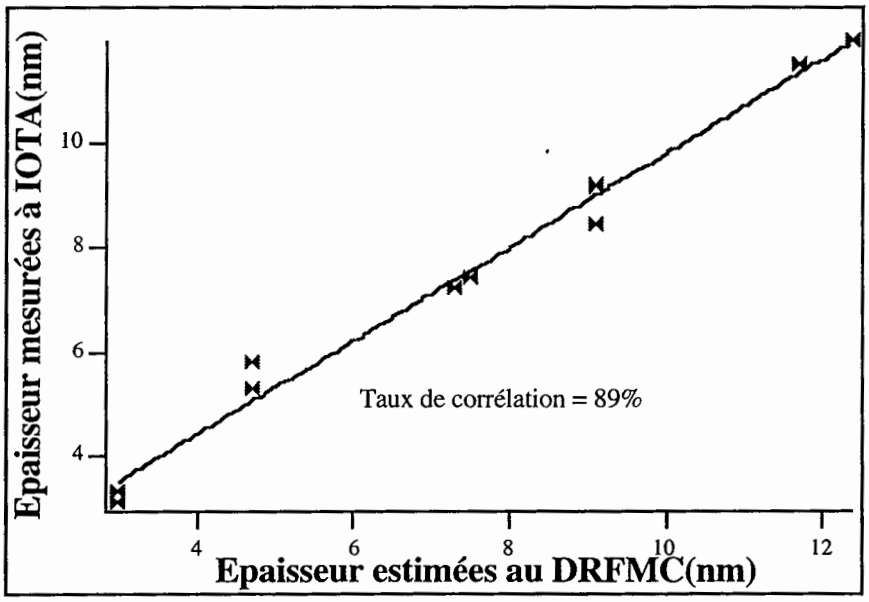


Figure III-23: Calcul du taux de corrélation entre les épaisseurs estimées par le DRFMC et celles mesurées à IOTA. Les marqueurs représentent Les points expérimentaux, et la droite, le meilleur ajustement ayant une pente de 89%.

Un autre facteur peut intervenir dans l'incertitude liée à l'état de surface initial : l'inhomogénéité des plots de polypyrrole. Si le gradient d'épaisseur est trop important sur un plot, la réponse en réflectivité sera différente en chaque point, et seul une moyenne sur l'ensemble du plot permettra de faire une mesure qui ne rendra compte que d'une valeur globale avec une marge d'erreur importante. Nous allons, dans la prochaine section, contrôler l'homogénéité de plots de différentes épaisseurs et en tirer un compromis entre épaisseur et sensibilité, dans l'objectif, repris en III-C-2, d'optimiser une voie d'immobilisation pour les oligonucléotides.

C-2-1-2-Analyse de l'homogénéité du polypyrrole

Comme nous le précisions dans la section précédente, l'homogénéité en épaisseur des plots de polypyrrole est nécessaire à l'obtention de résultats fiables, d'une part pour garantir la mesure de l'épaisseur absolue en tout point du plot, d'autre part pour déterminer avec une grande précision (0,01 nm) les épaisseurs relatives dues aux interactions biomoléculaires ayant lieu à sa surface.

Pour estimer l'homogénéité de surface, nous avons caractérisé sur toute leur largeur, trois plots d'épaisseurs différentes, respectivement de 7,5, 9,5 et 20 nm (cf. Fig. III-24, 25 et 26) en relevant pour chacun, trois courbes de réflectivité sur substrat de verre n_p=1,515, visant le centre, l'extrémité droite et l'extrémité gauche des plots. De cette façon, nous pouvons apprécier la planéité des plots en fonction de leur épaisseur.

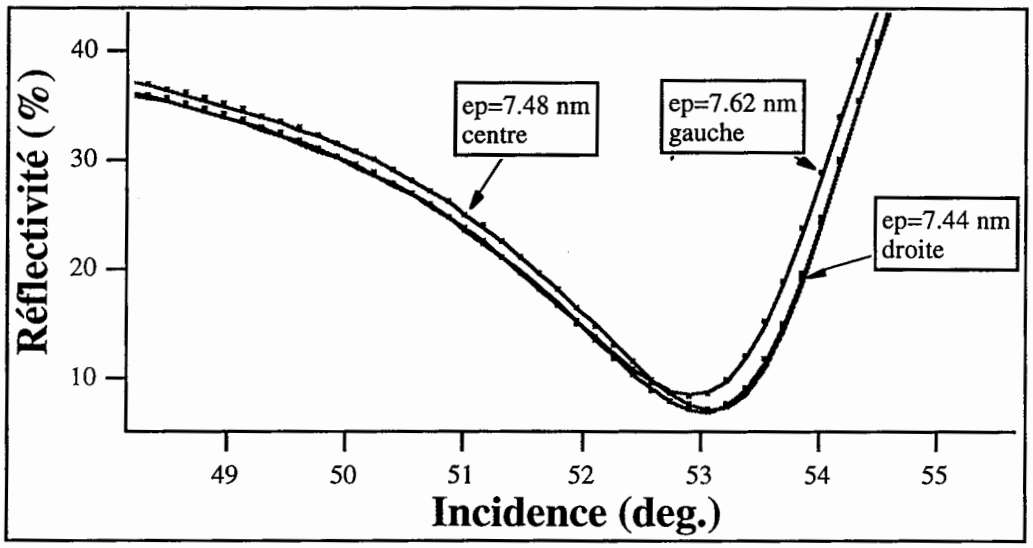


Figure III-24 : Contrôle de l'homogénéité de la surface d'un plot de polypyrrole d'une épaisseur annoncée de 7,5 nm sur une ligne de 9 mm de long. Les points expérimentaux sont en pointillés, les meilleurs ajustements de ces courbes sont en trait plein.

En tout point de mesure, nous avons ajusté les courbes de réflectivité rendant compte de l'épaisseur. Au vu des courbes de la figure III-24, le plot mesurant 7,5 nm d'épaisseur montre une très bonne homogénéité sur toute sa surface et peut donc être retenu pour son épaisseur, du moins pour son état de surface. Le plot donné à 9,5 nm d'épaisseur (cf. Fig. III-25) présente lui aussi une assez bonne homogénéité, toutefois inférieure au plot de 7,5 nm. Le troisième plot testé (cf. Fig. III-26) donné à 20 nm d'épaisseur a, quant à lui, des réponses très différentes suivant le point visé, ce qui signifie que le gradient d'épaisseur est très important. Nous ne retiendrons pas les plots aussi épais pour nos expériences d'hybridation d'oligonucléotides. Nous verrons par la suite, que pour d'autres critères optiques, de telles épaisseurs sont de toute façon rédhibitoires pour les biocapteurs optiques.

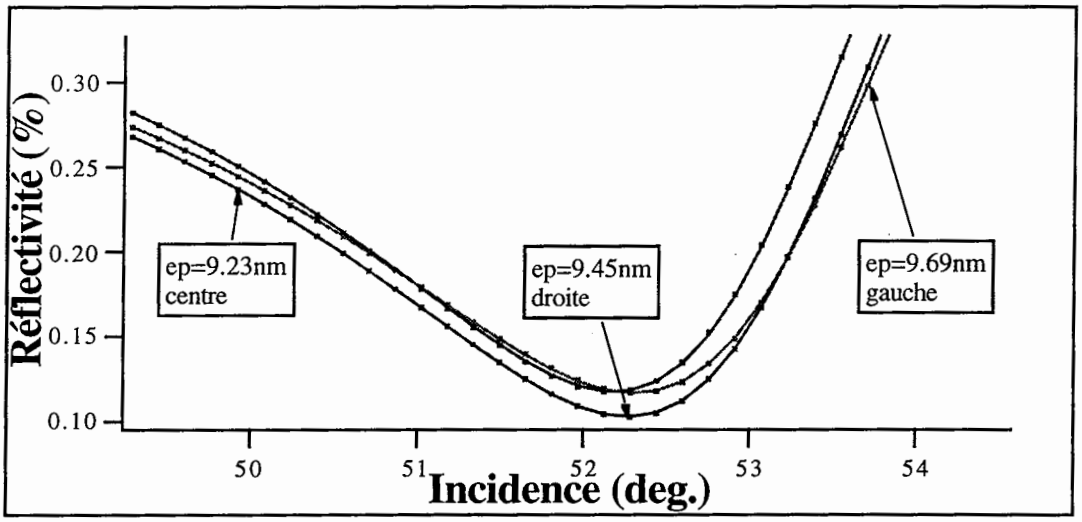


Figure III-25: Contrôle de l'homogénéité de la surface d'un plot de polypyrrole d'une épaisseur annoncée de 9,5 nm, sur une ligne de 9 mm de long. Les points expérimentaux sont en pointillés, les meilleurs ajustements de ces courbes sont en trait plein.

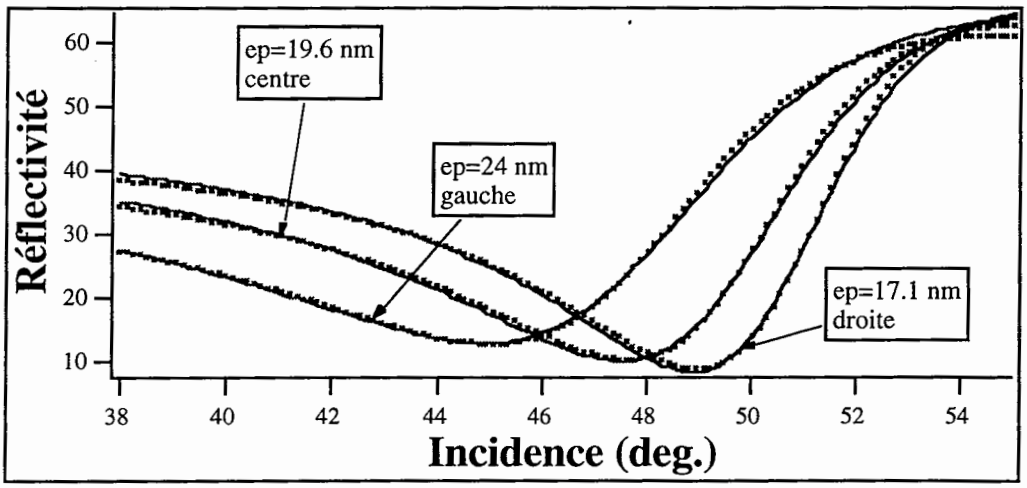


Figure III-26 : Contrôle de l'homogénéité de la surface d'un plot de polypyrrole d'une épaisseur annoncée de 20 nm, sur une ligne de 9 mm de long. Les points expérimentaux sont en pointillés, les meilleurs ajustements de ces courbes sont en trait plein plein.

Après avoir déterminé l'indice de réfraction complexe du polypyrrole et caractérisé son homogénéité pour différentes épaisseurs, nous allons l'utiliser comme voie d'immobilisation pour les oligonucléotides. Nous allons dans la partie suivante discuter de la caractérisation optique en termes d'épaisseur et de densité de surface de sondes d'ADN simple-brins, permettant d'optimiser le signal d'hybridation.

III-C-2-2-Optimisation de l'immobilisation de brins d'ADN

Le polypyrrole a été principalement utilisé comme voie chimique de fonctionnalisation de surface pour son caractère électroconducteur, que ce soit de façon passive[3], ou en immobilisant de façon covalente le ligand biologique[4]. Dans notre cheminement vers le multicapteur optique, nous avons besoin d'utiliser un processus chimique nous permettant d'immobiliser différents fragments d'ADN indépendamment, et de pouvoir également réutiliser un certain nombre de fois les éléments du capteur. Aussi avons-nous opté pour une utilisation du polypyrrole telle que l'ont conçue Livache et al. au DRFMC. Le principe d'immobilisation réside dans l'électrocopolymérisation de monomères de pyrroles simples avec des monomères couplés à un oligonucléotide, comme le montre la figure II-16. La détection d'hybridation, dans ce cas, se fait de manière indirecte par fluorescence. Des fluorophores (R-phycoerythrine) sont couplés à des molécules de streptavidine qui viennent se lier à la biotine couplée chimiquement en 5' sur l'oligonucléotide complémentaire. L'adaptation de cette méthode à la technique MRPS a permis de suivre en temps réel, et de quantifier des hybridations spécifiques sans marquer l'oligonucléotide-cible. Nous présentons dans cette partie les étapes d'optimisation d'un multicapteur basé sur l'utilisation du polypyrrole, relatives à l'épaisseur des plots et de la densité d'oligonucléotide-cibles en surface.

C-2-2-1-Optimisation de l'épaisseur du copolymère

Nos collaborateurs du DRFMC ont spécialement développé à notre intention une technique pour déposer les plots de polypyrrole à même le substrat d'or. Cette technique repose sur l'utilisation d'une micropipette qui délivre la solution pyrrole/pyrrole-ADN. La micropipette possède une électrode à son extrémité qui fait contact avec l'or et permet ainsi la circulation de la charge électrique, polymérisant la solution. C'est le temps de passage de la charge qui détermine l'épaisseur du plot. Les paramètres couramment utilisés pour les plots déposés puis analysés par fluorescence ont une épaisseur de 20 nm pour un rapport solution pyrrole-ADN/pyrroles simples de 1 pour 29000 (1:29000). Nous étudierons l'influence de ce rapport dans la section C-2-2-3.

C-2-2-1-1-Limitation de l'épaisseur des plots due à l'absorption du polypyrrole

La détection par fluorescence est sensible uniquement aux interactions de surface, l'état de surface des plots alors utilisés doit être le plus homogène possible. Il a été déterminé qu'une épaisseur de 20 nm optimisait le signal de fluorescence[4]. Mais, sachant que le pyrrole est très absorbant (-0,3), une telle épaisseur nuirait à la sensibilité de la MRPS. L'idéal serait de pouvoir travailler avec des plots très fins afin de rester proche de la sensibilité de la MRPS sur or nu. Malheureusement, le copolymère déposé accuse des lacunes de surface lorsque son épaisseur est trop faible. Cette étape d'optimisation consiste donc dans le choix d'une épaisseur réalisant le compromis entre sensibilité et homogénéité de surface.

Nous présentons dans la figure III-27 les courbes de réflectivité pour des plots de différentes épaisseurs, nous donnons par ailleurs la valeur de la pente du flanc droit de chacune de ces réponses en réflectivité. En plus de la baisse de sensibilité liée à la diminution de la pente, l'accroissement de l'épaisseur de polypyrrole entraîne un rehaussement du minimum de réflectivité, diminuant d'autant la dynamique de détection de la MRPS (Tableau III-i).

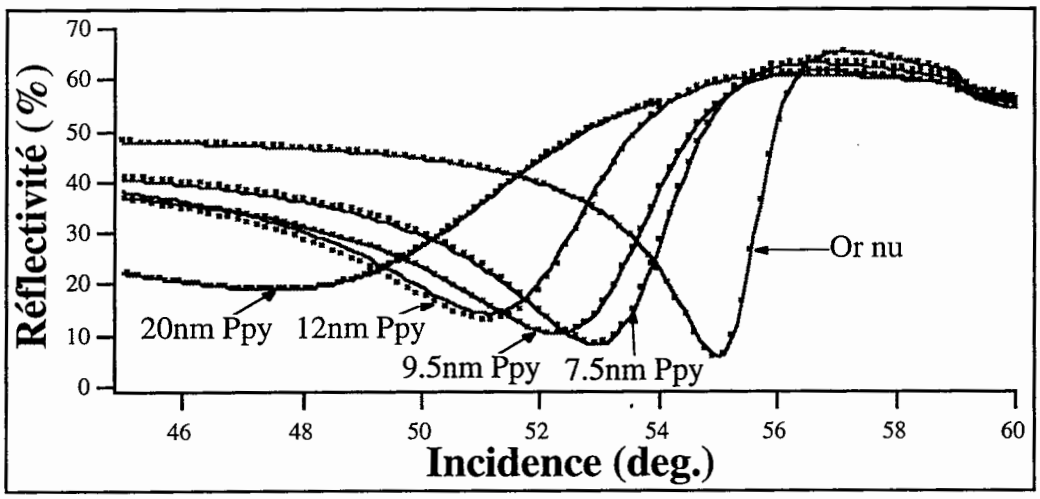


Figure III-27 : Courbes de réflectivité (en pointillés) pour différentes épaisseurs de polypyrrole. Les ajustements sont en trait plein.

Epaisseur de polypyrrole	0 nm (or nu)	7,5 nm	9,5 nm	12 nm	20 nm
pente droite du plasmon (%/deg.)	0,62	0,32	0,24	0,2	0,08

Tableau III-i : Valeurs de la pente droite des courbes de réflectivité représentées dans la figure III-27, rendant compte de l'influence de l'épaisseur de polypyrrole sur la dynamique et la sensibilité de la MRPS.

L'établissement de la valeur de l'épaisseur de polypyrrole donnant le meilleur signal d'hybridation devra tenir compte à la fois, de la baisse de sensibilité proportionnelle à l'épaisseur et, de l'inhomogénéité qu'elle engendre. Nous allons à présent nous tourner vers l'hybridation d'oligonucléotides réalisée sur le copolymère oligo/pyrroles, qui outre les aspects abordés précédemment, va présenter une dépendance pour le signal d'hybridation liée à la distribution des sondes en fonction de l'épaisseur.

C-2-2-1-2-Choix de l'épaisseur optimisant le signal d'hybridation

Nous disposons de capteurs réalisés à Grenoble comprenant d'une part 4 plots d'épaisseurs très différentes avec le même ratio d'oligonucléotides gréffés à un pyrrole/pyrroles simples de 1:29000 et d'autre part 6 plots d'épaisseurs peu différentes avec un ratio de 1:300, tous ces capteurs étant fonctionnalisés avec l'oligonucléotide M5 (choisi arbitrairement). La première partie de cette caractérisation/optimisation a consisté à réaliser l'hybridation de la séquence complémentaire M5* sur des plots d'une épaisseur respective 2, 4, 6 et 8,5 nm (cf. Fig. III-28) et de relever ainsi le niveau du signal d'hybridation. Signalons que cette expérience a été réalisée avec le dispositif RPS classique (étude spot à spot) et que plusieurs expériences consécutives ont été réalisées sur chacun des plots (cf. Figure III-29). Le ratio de ce capteur était de 1:29000 (ratio utilisé pour la détection en fluorescence par nos collaborateurs).

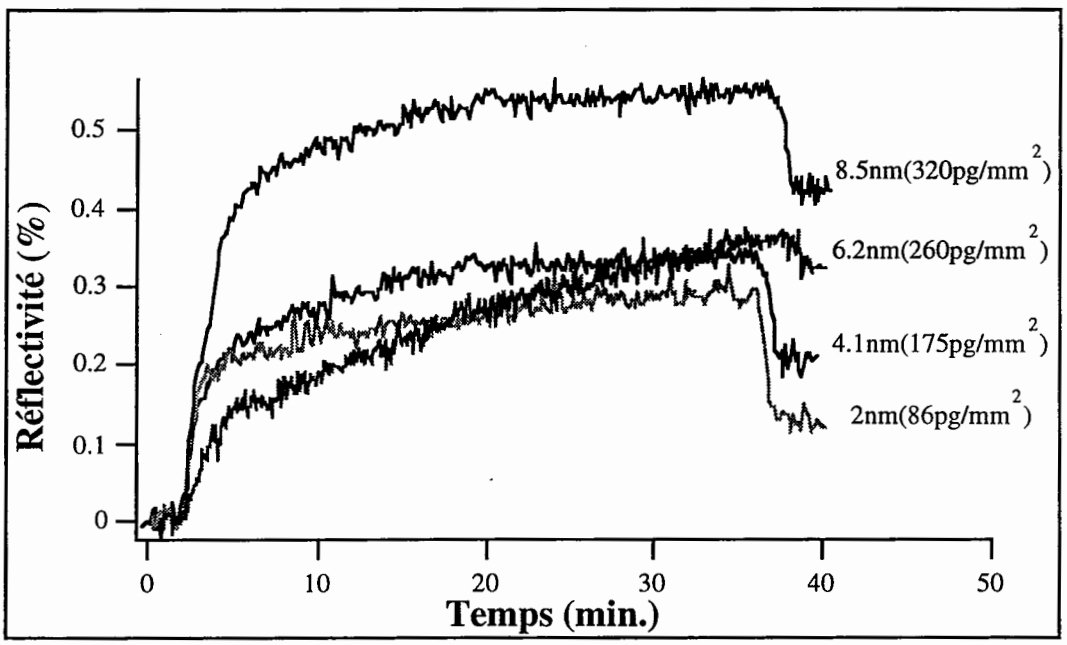


Figure III-28 : Cinétiques d'hybridations réalisées sur des plots d'épaisseur différentes (2, 4, 6 et 8,5 nm) pour un ratio de 1:29000 ainsi que le taux de recouvrement respectif.

Le taux de recouvrement Γ apparaissant dans la figure III-28, calculé pour chaque plot varie linéairement avec l'épaisseur des plots. Bien que les signaux relevés soient très faibles, ils se situent hors de la zone de bruit. Une étape consécutive à l'hybridation (révélation par l'avidine) a été réalisée confirmant la dépendance linéaire du signal avec l'épaisseur du plot (courbes non présentées). Toutefois, cette expérience indique sans ambiguïté que le signal d'hybridation augmente avec l'épaisseur du plot. L'explication réside dans le fait que les plots minces ne sont pas homogènes (lacunes dans le copolymère). Nous sommes alors dans une configuration où il faut augmenter la densité de surface des sondes pour avoir un rapport signal à bruit plus important. L'épaisseur des plots doit donc être choisie de telle façon que le signal soit maximisé, mais que cette épaisseur ne soit limitante, ni pour la sensibilité MRPS, ni pour l'homogénéité de surface.

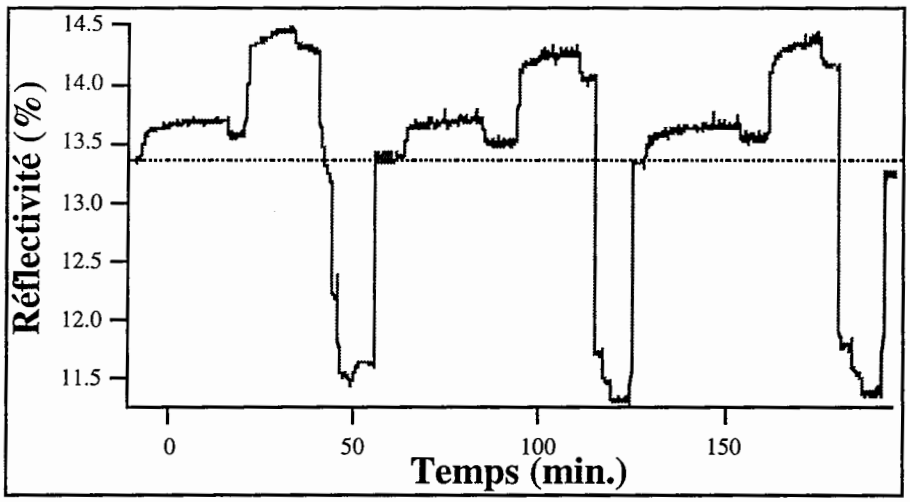


Figure III-29 : Trois cycles d'hybridation/régénération sur le plot d'épaisseur 2nm. La ligne horizontale représente la ligne de base, c'est à dire la valeur de réflectivité initiale. On voit qu'après la troisième régénération l'état de surface a été modifié, puisque le signal n'atteint pas son niveau initial.

La figure III-27 nous montre qu'une épaisseur de l'ordre de 20 nm est rédhibitoire en terme de sensibilité pour nos expériences, la figure III-28, quant à elle, exprime que le faible signal d'hybridation pour les faibles épaisseurs de plots est probablement dû à une répartition lacunaire des sondes à la surface du capteur. Nous avons donc fait réaliser un capteur muni de 6 plots dont les épaisseurs se situent entre 9 et 14 nm avec un ratio de 1:300. Avec un tel ratio, nous comptons sur des valeurs de taux de recouvrement beaucoup plus importantes que dans l'expérience précédente. La figure III-30 rend compte des taux de recouvrement obtenus avec un tel ratio.

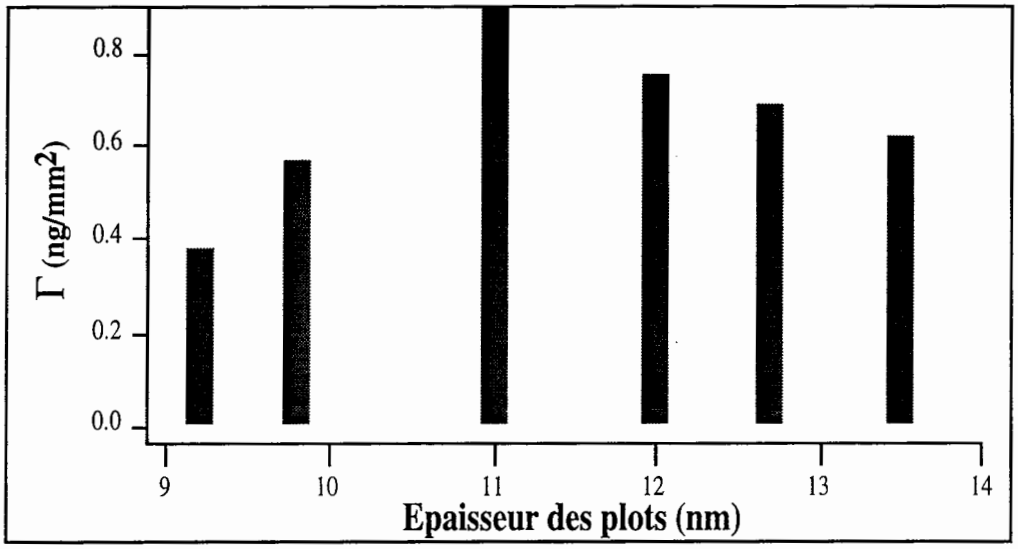


Figure III-30 : Taux de recouvrement calculé à partir des signaux d'hybridations en fonction de l'épaisseur des plots, pour une gamme allant de 9 à 14 nm.

Il existe donc une épaisseur optimale, réalisant le compromis entre sensibilité de détection et homogénéité de la surface, qui est estimée à 11 nm. Pour cette épaisseur, le plot est homogène et le signal n'est pas encore limité par l'absorption du polypyrrole.

C-2-2-3-Optimisation de la densité de surface des sondes d'ADN

Nous venons de voir dans les expériences d'optimisation de l'épaisseur des plots de copolymère, que le ratio d'oligonucléotides greffés à un pyrrole par rapport au nombre de pyrroles simples est déterminant quant à la valeur du signal d'hybridation. Ce ratio est directement proportionnel à la densité de surface des sondes d'oligonucléotides. Le ratio correspondce au rapport en solution des espèces en présence, avant copolymérisation. Il définit ainsi un rapport volumique, la densité de surface en dépend donc, mais pas d'une façon linéaire, puisque dans ce cas, le volume du plot, dépendant uniquement de son épaisseur, est à prendre en compte. On comprendra donc que les valeurs du taux de recouvrement ne dépendent pas linéairement du ratio indiqué.

Afin d'établir la gamme de ratios que nous allons explorer, nous présenterons brièvement les paramètres limitant la gamme de ratios puis nous donnerons les résultats obtenus sur des capteurs à quatre éléments constitués de ratios différents.

C-2-2-3-1-Etablissement des facteurs limitants l'hybridation

Une fois de plus, nous allons devoir réaliser un compromis entre deux facteurs relatifs à la densité de surface limitant le signal d'hybridation : une densité de surface trop faible et un ratio tel que la copolymérisation devienne instable. En effet, le système MRPS ne peut rivaliser

avec la sensibilité de la microscopie par fluorescence, qui travaille avec un ratio de 1:29000. Cette sensibilité explique en partie le choix de ce ratio, l'autre raison qui cette fois concerne la stoechiométrie de surface, s'explique par la taille du marqueur fluorophore (R-phycoerythrine couplée à une avidine : 240 kDa + 60 kDa = 300 kDa), qui est telle qu'elle entraînerait un encombrement stérique si la densité de surface était plus importante.

L'autre facteur est relatif à la composition même du copolymère qui consiste en l'électropolymérisation de pyrroles libres à des pyrroles greffés à un oligonucléotide. Le pyrrole à un poids moléculaire de 60 Da à comparer avec 4600 Da pour un oligonucléotide 15-mer. Connaissant ce rapport de poids moléculaire, proportionnel à la taille des molécules, on comprend aisément qu'un homopolymère de pyrroles tous greffés à un 15-mers, n'est pas réalisable. Ce ratio 1:1 n'aurait d'ailleurs aucun intérêt car la surface du capteur serait alors complètement saturée et le système se trouverait alors en situation d'encombrement stérique car les séquences complémentaires ne pourraient atteindre les sondes en nombre suffisant pour donner un signal nettement hors de la zone de bruit[5]. Il doit exister un seuil pour lequel le copolymère est réalisable mais, probablement instable et où évidemment, toutes les sondes seraient accessibles pour leur complémentaire. Pour ces raisons, nous avons établi heuristiquement la gamme de ratios entre 1:3000 et 1:300 dans les expériences ci-dessous.

C-2-2-3-2-Choix du ratio optimisant le signal d'hybridation

Nous avons réalisé des hybridations en parallèle avec le microscope à effet plasmon sur un capteur à quatre éléments, avec un ratio respectivement de 1:3000, 1:1500, 1:700 et 1:300 (cf. Fig. III-31).

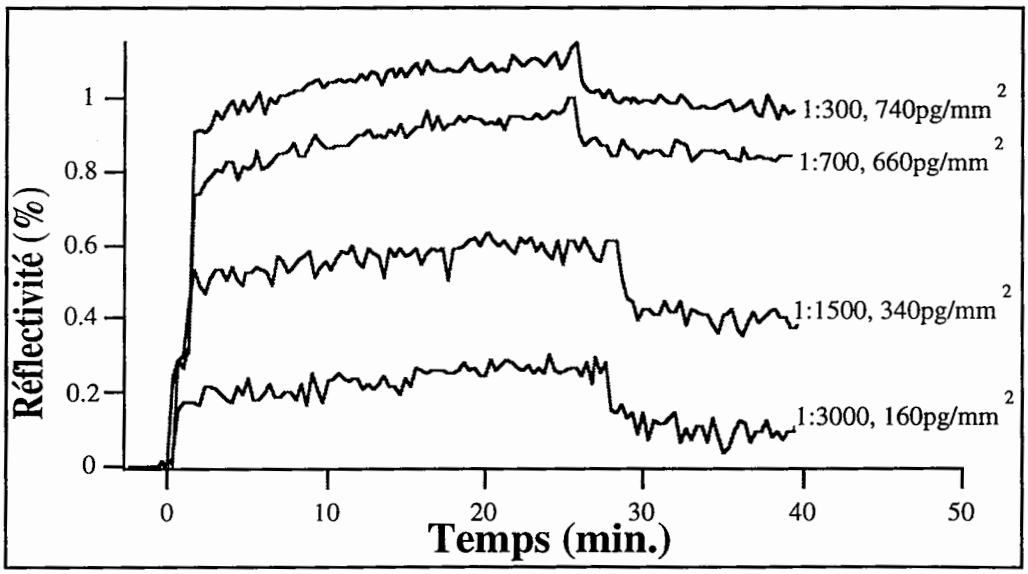


Figure III-31 : Cinétiques normalisées d'hybridation de l'oligonucléotide M5 sur des plots ayant des densités de surface différentes. Est indiqué en plus du ratio, le taux de recouvrement pour chaque cinétique.

On remarque que le signal croît linéairement avec le ratio jusqu'à sa valeur de 1:700, puis qu'il commence à s'amortir pour le ratio 1:300. Il apparaît que le ratio de 1:300, même s'il n'optimise pas le signal d'hybridation, est un ratio à retenir pour nos expériences dans la mesure où un ratio supérieur, dans le cas où il ne générerait pas d'encombrement stérique, n'augmenterait que peu ce signal. Cette remarque est confirmé par les cinétiques de révélation à l'avidine (cf. Fig. III-32).

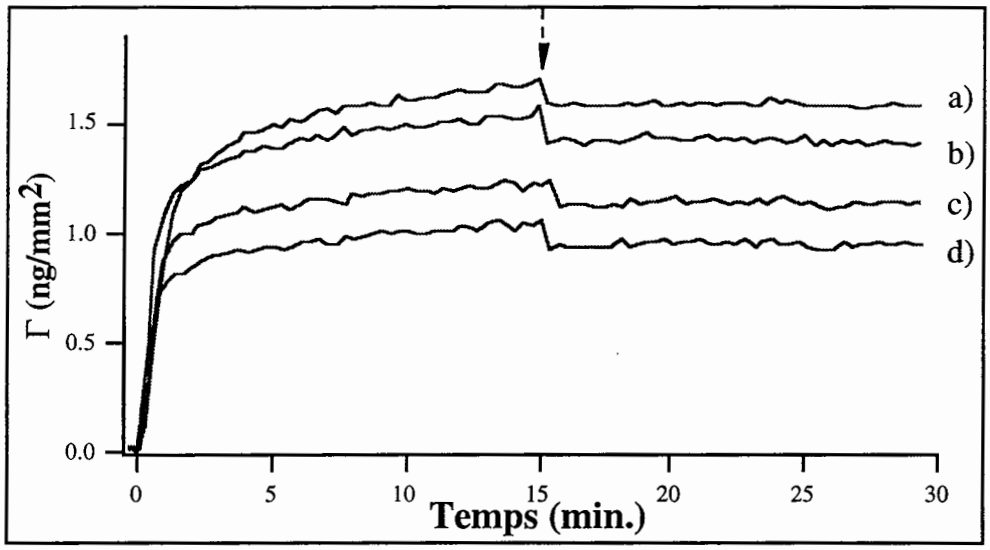


Figure III-32 : Cinétiques d'avidine consécutive aux hybridations de la figure III-31, sur l'oligonucléotide complémentaire biotinylé, nous permettant de tirer des conclusions sur la stoechiométrie de la surface du capteur. Les taux de recouvrement sont donnés en fonction des ratio : a) 1,56 ng/mm² (1:300), b) 1,42 ng/mm² (1:700), c) 1,1 ng/mm²(1:1500), et d) 0,97 ng/mm² (1:3000).

En effet, même si l'avidine dans ce cas n'est pas utilisée pour amplifier le signal d'hybridation, elle nous permet d'accéder à la stoechiométrie de l'interaction avidine/biotine de l'oligonucléotide. Le tableau III-j présente les valeurs du rapport entre les taux de recouvrement calculés pour l'hybridation du complémentaire et la reconnaissance par sa biotine de l'avidine, pondéré par leur poids moléculaire respectif.

Ratio du spot	1:3000	1:1500	1:700	1:300
Stoechiométrie en surface	2,48	4,57	6,87	7

Tableau III-j : Rapport stoechiométrique entre le nombre d'oligonucléotides impliqués dans l'hybridation et le nombre de molécules d'avidine ayant reconnu la biotine de l'ADN simple-brin.

Dès le ratio de 1:700, il y a quasiment 7 biotines (soit 7 ADN double-brin pour une molécule d'avidine) alors que ce rapport n'est que de 2,48 pour le ratio de 1:3000. Ce rapport qui croît très rapidement en fonction du ratio, voit sa valeur atteindre un plateau pour les faibles densités de surface, rendant compte d'une saturation des sites disponibles pour l'avidine. Quand le ratio atteint 1:700, la surface du capteur est déjà saturée par l'avidine. Cette explication confirme le fait qu'un ratio de 1:700 suffit pour saturer le signal d'avidine, c'est à dire qu'un ratio de 1:300 offre un bon compromis entre un signal d'hybridation fort et l'encombrement stérique qui adviendrait pour un ratio supérieur.

C-2-2-4-Conclusion

Au travers des deux étapes d'optimisation en vue d'utiliser le copolymère à base de pyrroles comme voie d'immobilisation pour des sondes d'oligonucléotides, nous avons montré qu'une épaisseur du plot de l'ordre de 9 à 10 nm et un ratio de 1:300 (soit une densité de surface de $1{,}25.10^{11}/mm^2$) nous autorise à utiliser en routine cette chimie de surface pour mesurer l'hybridation d'oligonucléotides en temps réel et sans marqueur avec notre système imageur basé sur la résonance des plasmons de surface.

III-C-2-3-Vers l'hybridation en parallèle

Nous nous sommes attelés jusqu'à présent dans ce chapitre à montrer que le copolymère basé sur l'utilisation de polypyrrole était un bon candidat comme voie d'immobilisation de fragments d'ADN, car l'optimisation de son épaisseur et de son ratio a pour but de réaliser un multicapteur à ADN, spécifique, régénérable, sensible, en temps réel et sans marqueur. Nous avons pour l'instant mis à l'écart les notions de spécificité et de régénérabilité du capteur, aussi allons-nous les aborder après avoir présenté le protocole que nous suivrons pour toutes les expériences d'hybridation et de dénaturation de fragments d'ADN, maintenant que les autres aspects ont déjà été discutés.

C-2-3-1-La spécificité du capteur

La notion de spécificité est essentielle pour un biocapteur et elle revêt deux aspects complémentaires : minimiser l'adsorption non-spécifique et s'assurer de la spécificité des interactions biomoléculaires. Le premier aspect permet, après l'immobilisation des sondes, de bloquer avec de la BSA les sites inoccupés de la surface du capteur, afin que des molécules du type avidine ne soient pas adsorbées passivement (dans le cas d'une révélation à l'aide d'un marqueur).

Dans nos expériences d'hybridation en parallèle de différents oligonucléotides (cf. chapitre III-D), nous prendrons soin d'avoir à notre disposition un plot fonctionnalisé avec une séquence dite contrôle positif, n'ayant aucun rapport avec les autres séquences du capteur, ce qui nous permettra à chaque fois de vérifier la spécificité des hybridations. Mais pour commencer, nous allons valider cette spécificité pour un capteur muni de quatre plots de la même espèce. Il s'agira d'une part de vérifier que le blocage en BSA réalisé en tout début de protocole reste actif durant plusieurs cycles d'hybridation/dénaturation et d'autre part, que la mise en contact d'un oligonucléotide ayant la même séquence que la sonde (M5), interaction totalement anti-complémentaire, n'engendre qu'un signal excessivement faible par rapport à une hybridation totalement complémentaire sur un plot d'une épaisseur de 9 nm pour un ratio de 1:700 (cf. Fig. III-33). Il apparaît que les signaux de BSA et du contrôle négatif (séquence anti-complémentaire) sont du même ordre (quelques pg/mm^2), c'est à dire dans la limite de détection du système RPS. Cela signifie non pas que seul le bruit instrumental génère ces signaux, car il y a toujours un tout petit peu d'adsorption non-spécifique dans toutes les interactions biomoléculaires, mais qu'en deçà de tels niveaux, il n'y a plus d'interprétation possible. L'exemple retenu dans cette partie rend compte d'un rapport des Γ entre M5* et M5 (non-relevant) de 50, ce qui est suffisamment élevé pour affirmer que la spécificité des interactions entre acides nucléiques est validée. Il est à signaler que le taux de recouvrement lié au contrôle négatif est toujours de l'ordre de la dizaine de picogrammes par millimètre carré (cf. section suivante).

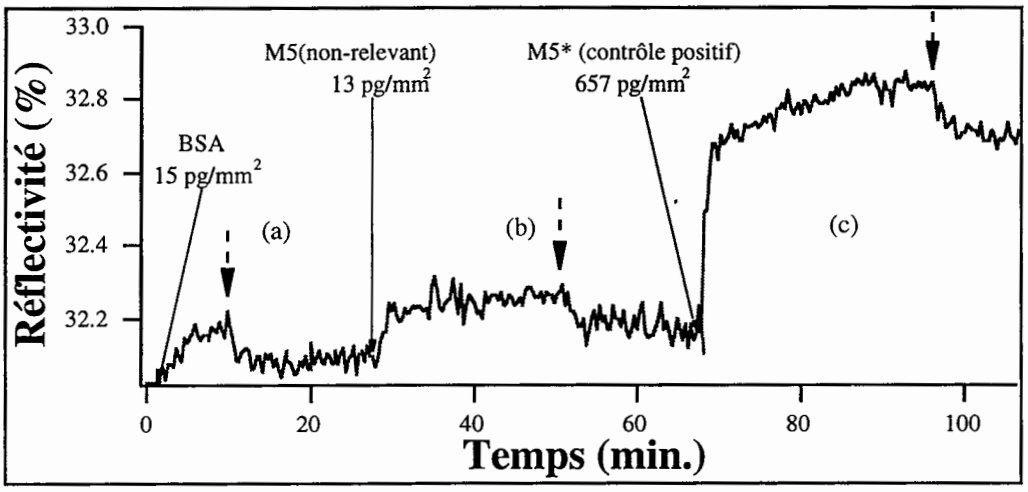


Figure III-33 : Démonstration de la spécificité de l'hybridation réalisée sur un copolymère de polypyrrole et d'oligonucléotide avec (a) l'adsorption passive de BSA montrant que la surface du capteur était déjà saturée, (b) le contrôle négatif assurant la reconnaissance spécifique d'une séquence, et enfin le contrôle positif avec la séquence complémentaire du M5. Les flèches en pointillés indiquent le début du rinçage en tampon.

Cette notion de spécificité des plots de polypyrrole fonctionnalisés ne peut prêter à confusion dans la mesure où s'il s'agissait d'adsorption passive des complémentaires sur le polypyrrole, les signaux des contrôles négatif et positif seraient du même ordre. Pour aller plus loin, nous allons voir dans la prochaine section que les hybridations sont totalement réversibles, et régénérables, ce qui serait tout à fait impossible si celles-ci relevaient de l'adsorption non-spécifique.

C-2-3-2-Régénération du capteur

L'immobilisation covalente des sondes à la surface du capteur offre un intérêt non négligeable : il permet la réversibilité des interactions entre acides nucléiques, dans la mesure où le protocole de dénaturation du duplex n'entraîne peu ou pas de modification de l'état de surface initial. Cette réversibilité implique alors une réduction des coûts liés à la réalisation du capteur puisque l'on peut l'utiliser plusieurs fois de suite. Nous allons étudier les modifications engendrées pendant plusieurs cycles d'hybridation/dénaturation sur le capteur et leurs effets sur les signaux d'hybridation. Nous disposons de capteurs constitués de quatre plots fonctionnalisés avec la séquence M5, mais élaborés avec différents ratios (cf. III-31). Nous nous proposons de réaliser et d'analyser avec le microscope à effet plasmon, quatre cycles d'hybridation /dénaturation avec un contrôle de la saturation par la BSA et un test négatif pour chaque spot (cf. Fig. III-34).

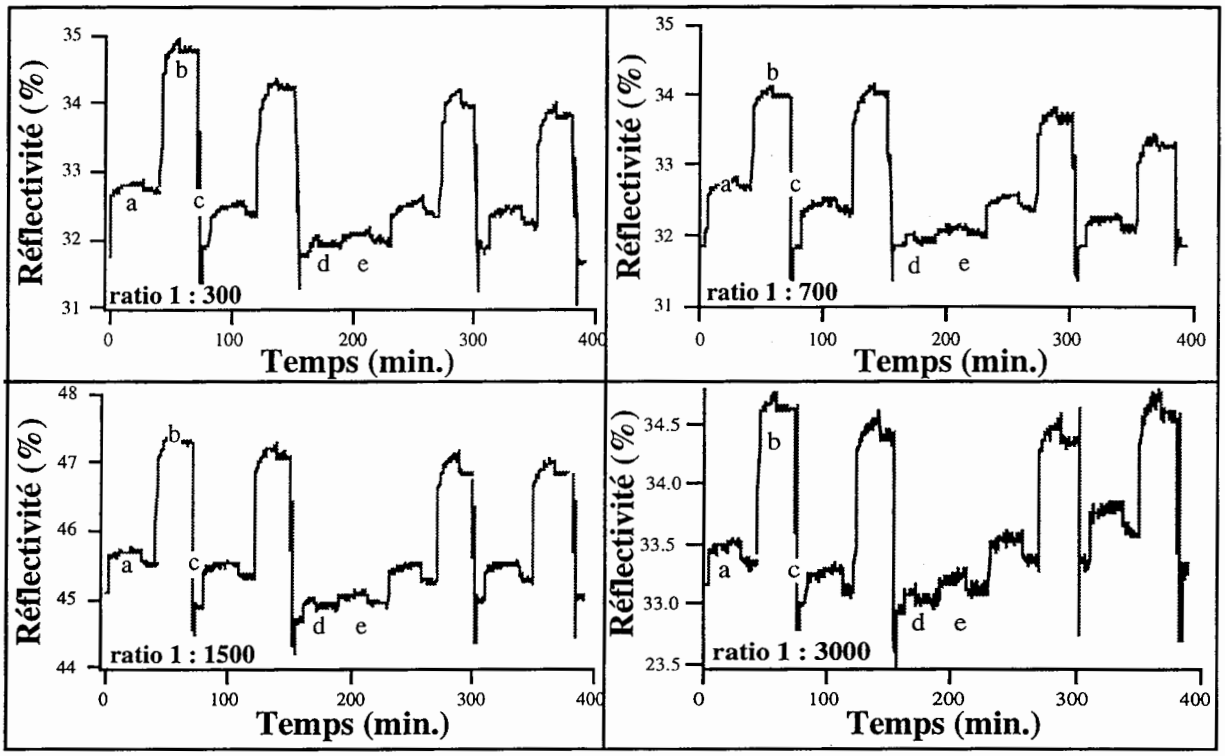


Figure III-34 : Démonstration de la spécificité, de la reproductibilité et de la régénérabilité des interactions entre acides nucléiques grâce à cette voie d'immobilisation qu'est le polypyrrole, en réalisant quatre cycles sur quatre plots en même temps, plus un passage en BSA et un contrôle négatif pour chacun des plots. (a) cinétique d'hybridation de la séquence complémentaire M5, (b) révélation avec l'avidine, (c) dénaturation du duplex, (e) contrôle de la saturation à la BSA et (d) contrôle négatif.*

Nous remarquons que tous les spots se comportent de la même façon, à ceci près que les variations de réflectivité pour l'hybridation et la révélation à l'avidine dépendent de la densité de surface des sondes. Par contre les signaux relevés sur chacun des spots en ce qui concerne les passages de BSA et du contrôle négatif, sont très faibles et ne dépendent pas du ratio. Un autre phénomène attire également notre attention à la vue des sensorgrammes, il s'agit de la dérive de la ligne de base. Cette ligne de base représente la valeur de la réflectivité au début de chaque cycle, qui forme généralement un plateau stable. Dans un cas de dénaturation idéal, le signal optique devrait retrouver le niveau initial de la ligne de base et cela pour chaque cycle. Or, cette ligne de base baisse parfois imperceptiblement cycle après cycle. Ce phénomène est propre à chaque type d'immobilisation de surface permettant une régénération et s'explique par une forme d'érosion de la couche biosensible dans la mesure où les traitements chimiques (soude ou acide) utilisés pour le retour du capteur à son état initial sont souvent très agressifs et peuvent abîmer sa surface. Nous donnons dans le tableau III-k la perte de réflectivité observée avec une incertitude de 0,2% après chaque cycle pour chaque plot.

	1:300	1:700	1:1500	1:3000
Cycle 1	-0,3%	-0,4%	-0,7%	-0,3%
Cycle 2	-0,2%	0%	-0,7%	-0,6%
Cycle 3	-O,5%	-0,4%	-0,3%	-O,3%
Cycle 4	0%	0%	0%	0%

Tableau III-k : Pertes observées sur la ligne de base cycle après cycle pour les quatre plots.

La dérive de la ligne de base est certes, quasi-systématique mais peu importante en moyenne. Il s'agit maintenant de voir l'influence de cette dérive sur le signal d'hybridation. Le tableau III-l donne les taux de recouvrement calculés à 10 pg/mm^2 près pour chaque cinétique de la figure III-34, et permet ainsi de suivre la décroissance en fonction du nombre de cycles, à la fois des signaux d'hybridation, des signaux d'avidine, du contrôle de la saturation en BSA et enfin du contrôle négatif.

	1:300 Γ(pg/ mm²)	1:700 Γ(pg/ mm²)	1:1500 Γ(pg/ mm²)	1:3000 Γ(pg/ mm²)
hybridation 1	743	657	344	157
révélation 1	1564	1426	1092	985
hybridation 2	648	586	341	132
révélation 2	1524	1512	1076	977
BSA	13.3	15	13.2	31.3
contrôle négatif	11.7	13	20	25
hybridation 3	290	258	227	125
révélation 3	1251	1205	1051	805
hybridation 4	266	209	204	94
révélation 4	1240	1187	1059	758

Tableau III-l : Taux de recouvrement calculés pour chaque étape des cycles hybridation-dénaturation pour les quatre plots.

Plusieurs constatations émergent des résultats obtenus, notamment la préservation, au fil des cycles, de la hiérarchie entre les différents ratios en termes de taux de recouvrement. Toutefois, les plots ayant un ratio de 1:300 et 1:700 voient leur Γ diminuer brutalement au troisième cycle d'hybridation, et l'écart relatif entre les différentes densités de surface des signaux d'hybridation tend à diminuer. En associant ces remarques à celles du tableau III-d, on voit qu'il n'y a pas de rapport direct entre la dérive de la ligne de base sur un plot et son taux de recouvrement. Néanmoins, il semble bien y avoir un rapport indirect liant les deux phénomènes, puisque l'émoussage de la couche biosensible lors de la régénération du capteur pourrait avoir pour conséquence la diminution sensible de la capacité d'hybrider du capteur, ceci étant vrai principalement pour les plots à forte densité de surface.

Ce caractère de conservation de l'écart relatif des signaux est très important car il permet de valider la fiabilité du capteur après plusieurs utilisations. Nous venons de poser les bases nécessaires, mais pas suffisantes, du biocapteur optique basé sur l'imagerie en plasmons de surface, aussi, après avoir étudié la chimie de surface, puis l'aspect multiparamétrique, il nous reste à présent à étudier la sensibilité analytique liée à cette voie d'immobilisation.

C-2-3-3-Sensibilité analytique du capteur

La sensibilité analytique du multicapteur n'a pas encore été abordée, mais à ce stade de notre étude, où la plupart des concepts du capteur multiparamétrique optique ont été validés, la notion de limite de sensibilité demeure un critère important à la fois en terme d'économie des réactifs mais également en terme d'éfficacité. Notre système est d'ores et déjà capable de reconnaître spécifiquement la présence ou non d'une séquence particulière dans un échantillon et il faut désormais avoir une idée précise de la concentration à utiliser en routine pour obtenir des résultats sans ambiguïté. De plus, nous verrons au prochain chapitre une application directe du multicapteur dans la recherche de la présence d'une mutation ponctuelle au sein d'une séquence, en mesurant la constante d'affinité pour des concentrations de séquences complémentaires dégressives. Nous donnons dans la figure III-35 des cinétiques d'hybridations entre deux séquences complémentaires M5*/M5 pour quatre concentrations différents. Nous n'avons pas cherché la concentration limite de détection, mais une concentration basse qui engendre des résultats fiables. Nous sommes descendus en concentration jusqu'à 70 ng/mL (15 nM), nous donnant une variation de réflectivité de l'ordre de 0,2%, valeur qui reste au-delà du bruit issu de la digitalisation des images.

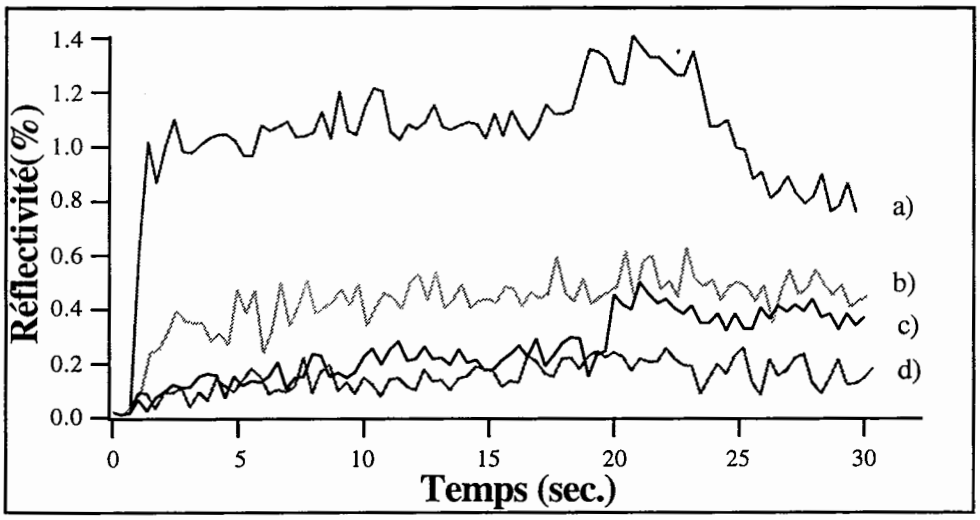


Figure III-35 : Cinétiques d'hybridation entre les séquences totalement complémentaires, M5/M5 réalisées en imagerie RPS pour des concentrations : a) 70 µg/ml, b) 7 µg/ml, c) 700 ng/ml et d) 70 ng/ml.*

III-C-2-4-Conclusion

L'étude des voies d'immobilisation de brins d'ADN que nous venons de faire n'est pas exhaustive, mais donne une vue d'ensemble de la diversité des techniques actuelles utilisées dans le cadre des capteurs à ADN. Nous avons principalement axé notre étude sur le copolymère polypyrrole/oligonucléotides qui permet de réaliser et stocker des capteurs d'une grande stabilité prêts à l'emploi. L'utilisation du couple avidine-biotine présente lui aussi un grand interêt pour la préparation des capteurs à ADN, mais requiert plusieurs étapes (notamment dans le cas de liaisons covalentes de l'avidine) avant de pouvoir être utilisé. De plus, la régénérabilité des capteurs basés sur le couple avidine/oligonucléotide biotinylé pose des problèmes liés à la désorption partielle de la couche biosensible. Dans le cas du polypyrrole, on peut réaliser jusqu'à 16 cycles, bien que ce système d'immobilisation présente lui-aussi un amortissement après chaque régénération du capteur.

L'application directe des résultats de cette partie tient dans la détection de mutations ponctuelles, à savoir la substitution d'une base par une autre au sein d'une séquence à hybrider. Pour cette application il faut impérativement travailler sur une couche réceptrice stable, régénérable et reproductible. C'est la raison pour laquelle cette application du biocapteur à la détection d'erreur dans le codage génétique est réalisée sur des substrats fonctionnalisés avec le copolymère Ppy/ODN.

III-D-Détection de mutations ponctuelles

Nous venons de démontrer la faisabilité d'un multicapteur optique à la fois en termes de détection en parallèle sans marqueur, de temps réel et de régénérabilité. Comme dans la partie précédente nous avons établi la sensibilité analytique de la détection d'interactions entre 15-mers, l'analyse des résultats pour différentes séquences cibles nous conduira à déterminer les constantes d'affinité de toutes les interactions ayant eu lieu au même moment sur le biocapteur, nous pourrons donc en déduire la constitution propre à chaque séquence et si elles sont bien choisies, c'est à dire en ne modifiant qu'une base par séquence, nous pourrons alors discriminer les hybridations parfaites (totalement complémentaires) à celles présentant une mutation ponctuelle. Puis, dans un deuxième temps, après avoir pris connaissance de la limite analytique de détection, nous étudierons un autre moyen de discrimination de mutation ponctuelle basé sur une variation de pH fragilisant les duplex non totalement complémentaires.

Les mutations ponctuelles que nous nous proposons de diagnostiquer correspondent au gène K-ras (cf. II-C-2) et appartiennent à des oligonucléotides 15-mers synthétiques. Ce chapitre, en plus de clore ce travail de thèse, propose une application intéressante du biocapteur optique multiparamétrique dans la mesure où nous opérons dans des conditions de travail difficiles, à savoir détecter des mutations sur des 15-mers synthétiques. Si notre système discrimine sans ambiguïté une mutation pour un 15-mers, nous pouvons nous attendre alors à détecter avec un plus grand confort un fragment d'ADN 10 fois plus lourd, comme un produit PCR par exemple.

III-D-1-Détection de mutations sur des 15-mers synthétiques

La finalité de ce type de capteur est de discriminer la présence d'une mutation ponctuelle au sein d'un gène de patient dont on connaît les facteurs pathogènes. La validation de la sensibilité et de la spécificité des hybridations que nous voulons observer passe par la détection d'hybridations impliquant des acides nucléiques de faible masse molaire (entre 4500 et 6000 Da). Mais avant de réaliser de telles expériences, il faut assurer la fonctionnalisation de la surface pour plusieurs séquences à la fois. Nous expliquons le principe de cette préparation du capteur dans la prochaine section, avant de discriminer la substitution d'une base par une autre dans un exemple de détection de mutation ponctuelle basée sur la variation des constantes d'affinité en fonction des bases en présence.

III-D-1-1-Préparation des capteurs à plusieurs paramètres

La méthode de préparation des capteurs à plusieurs éléments fonctionnalisés repose sur l'adaptation d'un procédé chimique utilisé pour les puces à ADN sur lesquelles on détecte les hybridations par microscopie à epifluorescence (CEA-Grenoble/DRFMC). Cette technique donne la possibilité d'adresser individuellement tous les plots du capteur. La méthode que nous avons utilisée découle de la technique pré-citée mais s'applique aux dépôts sur des substrats d'or, peut fonctionnaliser les capteurs utilisés dans le cadre de la MRPS. Elle est basée sur l'électrocopolymérisation de solutions contenant des monomères de pyrrole additionnés d'un certain pourcentage de pyrroles gréffés à un oligonucléotide 15-mers de séquence connue, menant à la constitution d'un copolymère solide à la surface duquel apparaissent des oligonucléotides dits ''sondes'' prêts à s'hybrider avec leur séquence complémentaire . Le principe est illustré dans la figure III-36 pour la préparation d'un capteur à quatre paramètres (quatre séquences distinctes) : une pipette délivre un certain volume de solution tout en contenant une électrode de platine au bout du cône de telle manière à réaliser un contact électrique avec le substrat métallique. Un potentiostat contrôle ainsi la charge électrique qui déterminera l'épaisseur du film. Un platine X-Y assure la précision du centrage du dépôt qui n'excède pas 600 microns de diamètre. On peut ainsi indépendamment fonctionnaliser plusieurs zones du substrat d'or avec des oligonucléotides de séquence distincte. Un contrôle systématique de la qualité des dépôts a été réalisé par épifluorescence à Grenoble pour nous permettre d'avoir une référence sur la qualité du signal obtenu lors d'hybridations observées avec la MRPS.

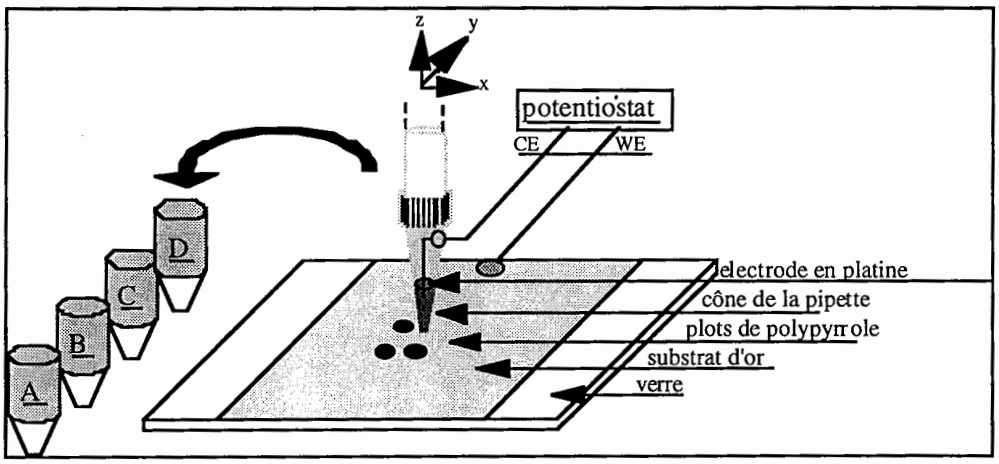


Figure III-36 : Schéma général de la technique d'électrodéposition du polypyrrole. Les différents tubes indéxés de A à D contiennent les solutions des monomères de pyrroles mélangés avec les pyrroles gréffés à un oligonucléotide. Dans l'exemple, on prépare une lame portant quatre plots de séquences différentes. Le dépôt des plot est réalisé à partir du cône de pipette en plastique délivrant les solutions à copolymériser.

Une fois le capteur muni de ses ligands, choisis de telle sorte qu'un plot serve de référence (CP), qu'un autre porte le gène naturel et que les deux autres soient deux mutations conuus du gène K-ras, nous allons observer les interactions ayant lieu entre chaque séquence dans la section qui vient.

III-D-1-2-Discrimination des mutations par détermination des constantes d'affinité

De la même façon qu'au chapitre III-B, nous allons déterminer les constantes d'affinité à partir des cinétiques d'interactions à différentes concentrations, qui ont lieu cette fois-ci entre acides nucléiques. Nous utiliserons de surcroît le dispositif d'analyse de succession d'images, comme au chapitre III-C, ce qui nous permettra de tracer l'évolution du signal en temps réel en fonction du temps de passage de l'analyte.

Nous présentons dans un premier temps les résultats des hybridations successives entre l'analyte et les ligands pour des concentrations s'étalant de 15 µM à 15 nM (70 µg/ml à 70 ng/ml), puis nous reviendrons sur la méthode d'extractions des constantes d'interaction à partir des cinétiques d'hybridation. Dans un second temps, nous discuterons des résultats tirés de la constante d'affinité entre des hybridations totalement complémentaires et des interactions impliquant une mutation ponctuelle.

D-2-1-Détections multiparamétriques d'interactions spécifiques et croisées

Les expériences décrites et présentées dans cette section ont pour but de discriminer les interactions entre séquences complémentaires (II-C-2) et séquences présentant une mutation ponctuelle. Parmi les quatre séquences immobilisées sur le multicapteur, seule CP ne peut conduire à la formation d'un duplex stable, on appellera alors la cible CP*, séquence non-relevante. Par conséquent les trois autres séquences WT, M4 et M5 ont toutes des interactions croisées. Notre méthode d'analyse consiste à injecter successivement les quatre cibles à quatre concentrations dégressives sur les quatre plots fonctionnalisés du capteur. De cette série d'hybridations/dénaturation (16 cycles sur un même capteur) on souhaite extraire les constantes d'affinité spécifiques et croisées entre les différents oligonucléotides et ainsi discriminer leur type d'interaction. De plus, à partir des interactions croisées on souhaite examiner plus finement la composition des séquences mutées pour identifier le type de mutation, fortement lié aux forces d'interaction en présence. Nous donnons à titre d'exemple, les cinétiques obtenues après l'injection de M5* à 70 mg/ml sur l'ensemble du multicapteur (Fig. III-37). On observe comme prévu un signal de l'ordre du bruit sur le plot CP alors que les trois autres plots réagissent positivement à l'injection de M5*. Les signal le plus important est observé sur le plot présentant la sonde M5 (appariement total) alors que le signal d'hybridation diminue avec le plot WT, puis

le plot M4. cette expérience est réalisée à trois autres concentrations (7000, 700 et 70 ng/ml) ce qui permettra d'extraire les constantes d'interaction croisées et spécifiques du M5* avec les autres séquences.

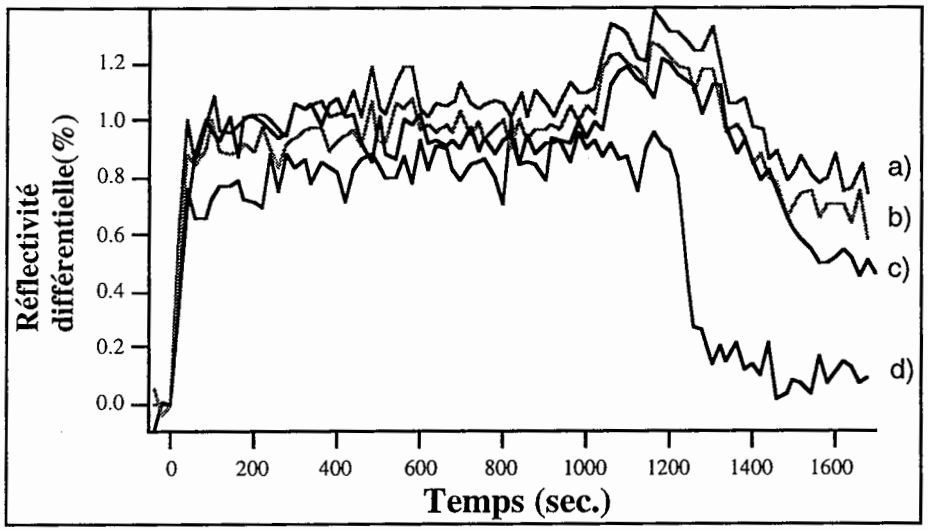


Figure III-37 : Cinétiques d'interaction de la séquence M5 suivies sur le multicapteur comportant quatre séquences sondes . L'analyte est injecté à 70 µg/ml sur M5 (a), WT(b), M4 (c) et CP (d).*

Si l'on reporte sur un même graphique les quatre hybridations spécifiques M5*/M5, on obtient une série de cinétiques (Fig.III-38) gouvernées par deux constantes de temps et dont le signal final s'étage en fonction de la concentration. Le bruit de numérisation n'est pas un obstacle pour ajuster de près les cinétiques et l'on s'attend à une bonne précision sur les constantes d'interaction.

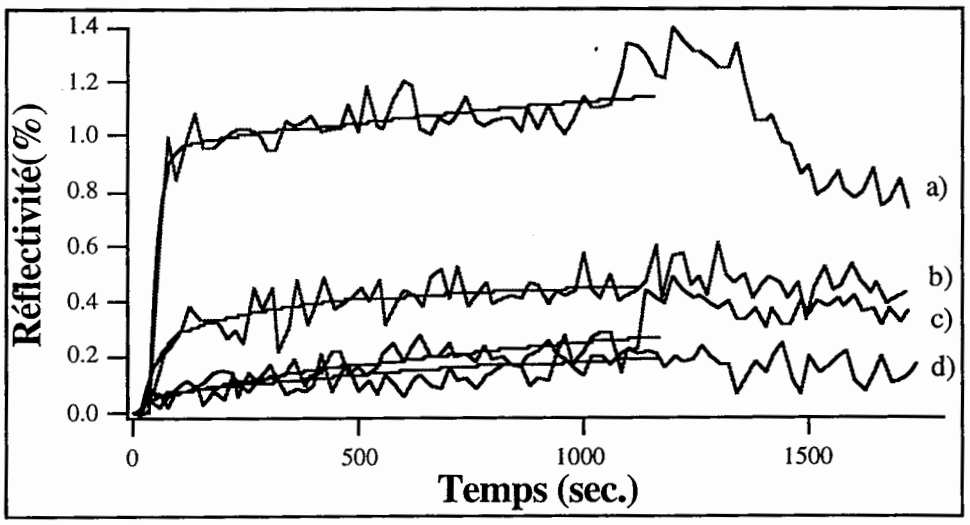


Figure III-38 : Cinétiques d'hybridations entre les séquences M5 et M5 pour quatre concentrations différentes: a) 70 µg/ml, b) 7 µg/ml, c) 700 ng/ml et 70 ng/ml.*

En effet, les valeurs de K_{obs} issues des ajustements des cinétiques de la figure III-38 sont précises à ±10%, ce qui nous autorise à les reporter en fonction de la concentration comme le montre la figure III-39.

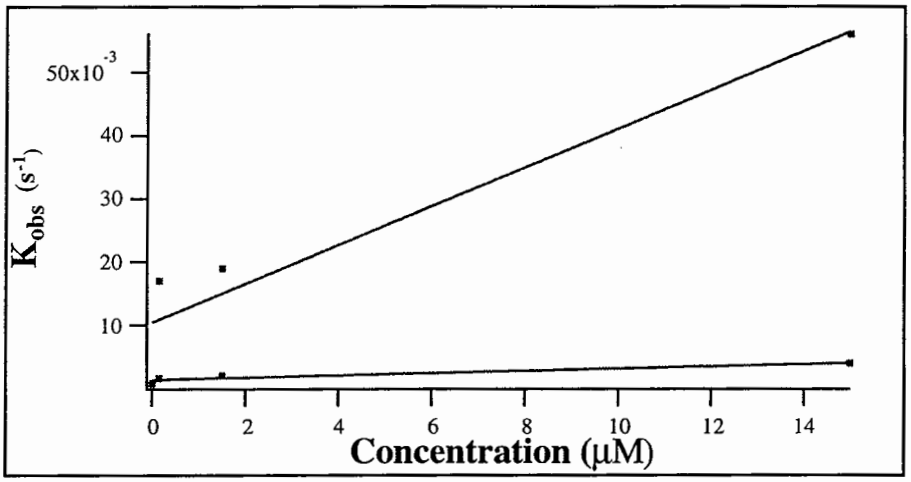


Figure III-39 : Valeurs de K_{obs} tirées des cinétiques de la figure III-38 en fonction de la concentration (en mole/l) pour les deux constantes de temps, ainsi que leur ajustement dont on tire la constante d'affinité.

Ces opérations sont reproduites pour les séquences WT et M4, pour enfin obtenir les résultats du tableau III-m.

Constantes d'affinité(M^{-1})	WT*	M5*	M4*
WT	**$2{,}8.10^5$** i=2à5	3.10^4 i=7à10	$4{,}7.\ 10^4$ i=12à15
M5	$2{,}8.10^4$ i=2à5	**$2{,}2.10^5$** i=7à10	$5{,}3.10^4$ i=12à15
M4	$3{,}5.10^4$ i=2à5	$2{,}6.10^4$ i=7à10	**$5{,}8.10^4$** i=12à15

Tableau III-m : Valeurs des constantes d'affinité croisées entre les différents oligonucléotides. Les indexes allant de 1 à 16 correspondent au nombre de cycles réalisés, sachant que les injections des séquences non-relevantes (CP) ont été réalisées lors des cycles 1, 6, 11 et 16, afin de s'assurer de la spécificité des interactions au fil des cycles.*

Dans chacune des colonnes du tableau III-m, on voit que la plus grande constante d'affinité est mesurée pour le couple totalement complémentaire. Toutefois, on remarque l'amortissement du signal pour la réaction M4*/M4. Ceci est dû probablement à la dégradation de la couche biosensible au fil des cycles de régénération. Cette diminution du signal ne remet pas la validité de ces expériences en cause, car nous disposons des signaux mesurés sur les autres plots.

Les constantes d'affinité du tableau III-m caractérisent l'attraction mutuelle des simple-brins et la stabilité des duplex formés. On peut faire le lien entre la valeur de la constante

d'affinité et l'interaction de la base mutée avec celle correspondant à sa position sur la séquence sonde. On dresse alors le tableau III-n basé sur le même modèle que le tableau III-m, mais où l'on note le type d'appariement des bases situées au centre des séquences (position des substitutions pour les séquences mutées).

Type d'association	WT*	M5*	M4*
WT	**G-C**	C-C	A-C
M5	G-G	**C-G**	A-G
M4	G-T	C-T	**A-T**

Tableau III-n : Bases mises en présence au niveau du centre des séquences. Les appariements totalement complémentaires sont en gras.

Ikuta et al. ont réalisé une étude portant sur la stabilité des duplex en fonction de l'appariement des bases associées à la mutation ponctuelle[6]. Il en tire un classement des types d'appariement en fonction des bases mises en présence, se présentant dans l'ordre de stabilité décroissant suivant :

T-A, A-T > G-T, G-A > A-A, T-T, C-T, C-A

Si l'on compare à présent les valeurs des constantes d'affinité du tableau III-m avec l'ordre de stabilité ci-dessus, on remarque que la hierarchie est respectée en faisant l'analogie entre la liaison A-T et la liaison G-C (qui sont du même ordre de grandeur). Dans la colonne du M4* du tableau III-m, les constantes d'affinité donne l'ordre suivant pour le tableau III-n : A-T>A-G>A-C, pour la colonne WT*, G-C>G-T>G-G et pour la colonne M5*, C-G>C-T>C-C.

Il semble donc que les constantes d'affinité mesurées conservent la hierarchie des forces d'interactions entre bases.

III-D-1-3-Conclusion

Nous venons de voir différents types d'immobilisation visant à obtenir une couche biosensible reproductible et régénérable. L'application de ces méthodes pose des difficultés de mise en oeuvre dans le cas des anticorps. C'est la raison pour laquelle nous nous sommes restreint, dans ce cas, à l'adsorption passive. Par contre, dans le cas des oligonucléotides, plusieurs modes d'immobilisations ont été testés, avec plus ou moins de réussite en ce qui concerne la régénérabilité du capteur. L'utilisation du polypyrrole sous la forme d'un copolymère associant des molécules de pyrrole greffées sur des acides nucléiques, à des

molécules de pyrrole simple a donné les meilleures résultats en termes de densité de surface (de l'ordre de 200 fmole/mm^2), de rendement d'hybridation (près de 80%), et de régénérabilité du capteur (16 cycles). Cette méthode a trouvé une application médicale directe : la détection de mutations ponctuelles.

Toutefois, nous développons en collaboration, d'autres modes d'immobilisation alternatifs, qui associent une chimie de surface (agents bofonctionnels) à des molécules biologiques (anticorps, oligonucléotides, peptides, etc...) dans le but d'appliquer le capteur multiparamétrique à d'autres domaines. En effet, la biocapteur basé sur la MRPS est capable de détecter des interactions aussi faibles que l'hybridation de 15-mers en discriminant la substitution d'une seule base. La diversification de l'utilisation d'un tel système est donc envisageable. Notre prochaine étape consistera à mesurer des interactions ADN double-brin/protéines et protéines/protéines.

Références bibliographiques du chapitre III

[1] E. STENBERG, B. PERSSON, H. ROOS & C. URBANICZKY. Quantitative determination of surface concentration of protein with surface plasmon resonance using radiolabeled proteins. *J. Colloid and interf. Sci.* , **143** (1991), 513-526.

[2] Y. T. KIM, R. W. COLLINS, K. VEDOM & D. L. ALLARA. Real time spectroscopic ellipsometry : in situ characterization of pyrrole electropolymerization. *J. Electrochem. Soc.*, **138** (1991), 3266-3275.

[3] D. MINEHAN, K. MARX & S. TRIPATHY. Kinetics of DNA binding to electrically conducting polypyrrole films. *Macromolecules*, **27** (1994), 777-783.

[4] T. LIVACHE, A. ROGET, E. DEJEAN, C. BARTHET, G. BIDAN & R. TEOULE. Preparation of a DNA matrix via an electrochemically directed copolymerization of pyrrole and oligonucleotides bearing a pyrrole group. *Nucleic Acids Research*, **22** (1994), 2915-2921.

[5] Zizlsperger M. & Knoll W. Multispot parallel on-line monitoring of interfacial binding reactions by surface plasmon microscopy. *Prog. Colloid Polym. Sci.*, **109** (1998), 244-253.

[6] S. IKUTA, K. TAKAGI, R. BRUCE WALLACE & K. ITAKURA. Dissociation kinetics of 19 base paired oligonucleotide-DNA duplexes containing different single mismatched base pairs. Nucleic Acids reasearch, **15** (1987), 797-811.

Conclusion générale et perspectives

Le but de ce travail de thèse était l'étude de microsystèmes optiques adaptés à la détection en parallèle d'interactions biologiques. Après avoir évincé l'ellipsométrie, nous nous sommes concentrés sur l'étude de la **sensibilité** et de la mise en oeuvre de deux configurations optiques : la Résonance des Plasmons de Surface et le Miroir Résonant. Du fait du meilleur confinement du champs électromagnétique dans le cas de la RPS, le MR est moins sensible en terme d'interrogation angulaire. Par contre, l'analyse en interrogation par variation de réflectivité donnait une sensibilité plus forte pour le MR, pour une limite de détection de l'épaisseur moléculaire du même ordre pour les deux systèmes.

Nous avons finalement retenu la candidature de la RPS pour réalisé un **biocapteur multiparamétrique** par imagerie, suite aux expériences à un paramètre, liées à la détection quantifiée d'hormones (hCG) associées au développement de tumeurs cancéreuses, par des anticorps monoclonaux (immobilisés passivement sur le transducteur). De plus, la RPS autorise une résolution spatiale de 5 microns (20 pour le MR), alors que nous ne pouvions résoudre par imagerie le pic d'interférences associé au MR.

La validation des expériences d'immuno-analyses simultanées fut réalisée à même le transducteur d'or en limitant la contribution des interactions non spécifiques en respectant un protocole biologiques strict. Bien que ce type d'expériences donnât satisfaction du point de vue de la détection, puisque nous pouvions remonter aux constantes d'interactions biologiques à partir des cinétiques en temps réel, il n'en était pas de même pour leur intérêt médical. En effet, sans chimie de surface adaptée à la réalisation d'une **couche bio-réceptrice**, les expériences demeuraient difficilement reproductibles et totalement irréversibles. Il faut également rappeler le protocole d'utilisation des protéines qui n'est pas compatible avec certaines techniques d'immobilisation à la surface des capteurs (risque de dénaturation des protéines).

Nous nous sommes alors tournés vers le domaine de la biologie moléculaire, et plus spécifiquement vers la reconnaissance d'ADN. Nous avions la possibilité d'utiliser le polypyrrole, un copolymère ayant déjà fait ses preuves (en utilisant un traceur fluorescent) avec une autre instrumentation plus sensible, ainsi que d'autres voies d'immobilisation de simple-brins d'ADN. L'enjeu consistait à détecter l'hybridation d'oligonucléotides synthétiques d'une longueur de 15 paires de bases, soit des molécules **30 fois plus petites** que des anticorps. Il nous a donc fallu caractériser les différentes techniques chimiques ou biologiques à notre disposition afin de générer des signaux bien supérieurs au bruit. Nous sommes donc arrivés à mesurer des interactions entre acides nucléiques **sans marqueurs**, en utilisant le polypyrrole, la cystéamine et le couple avidine-biotine.

La voie d'immobilisation qui donnait les meilleurs résultats en terme de signal, de reproductibilité et de régénérabilité fut sans conteste le polypyrrole, qui permettait d'une part d'optimiser le nombre de sondes de la couche biosensible et d'autre part, un **adressage** des différents capteurs sur le transducteur.

La difficulté de mise en oeuvre d'un tel système optique et biologique résidait à égal mesure dans le dispositif de détection et dans la qualité de la couche biosensible. Une fois ces deux critères mis au point, nous avons pu appliquer notre système de détection à la recherche de mutations ponctuelles au sein d'un gène. Nous avons alors réalisé la recherche de substitution de base, erreur de codage génétique, annonciatrice d'un risque de cancer héréditaire. Nous avons montré que la microscopie par effet plasmon permettait de discriminer les interactions dites ''normales'' de celles présentant une mutation.

Il apparaît alors que le phénomène de la Résonance des Plasmons de Surface associé à l'imagerie et à une couche biosensible stable permet la réalisation d'un biocapteur parallèle possédant beaucoup d'avantages. En effet, d'un point de vue sensibilité, notre système détecte des concentrations de l'ordre du picomolaire pour les protéines et de l'ordre du nanomolaire pour les acides nucléiques. De plus, nous suivons les interactions en temps réel et sans marqueur physique ou biologique et une détection d'hybridation prend en moyenne 20 minutes.

A la suite de ce travail de thèse, nous envisageons de réaliser des puces possédant plus de cent capteurs différents et pouvant répondre aux besoins des médecins pour des applications très précises, comme la détection de gênes impliqués dans mucoviscidose ou dans d'autres maladies génétiques. Cette fois-ci l'adressage ne pourra plus être manuel et il nous faudra utilisé un ''arrayer'' délivrant précisément et automatiquement des plots biosensibles sur le transducteur. Ceci implique également un traitement des données très performant pour pouvoir lire à chaque instant l'état de chacun des plots. Toute cette partie de développement est en cours et devrait conduire à la réalisation d'un prototype dans quelques mois.

Le deuxième enjeu consiste en la détection de séquences d'origines cliniques et non plus de séquences d'oligonucléotides synthétiques. Le passage à la détection de fragments de gènes de patients répliqués artificiellement par les techniques PCR (Polymerase Chain reaction) pose certains problèmes matériels que nous sommes en train de résoudre. Le principal problème est d'ordre technique, et consiste à obtenir des séquences d'ADN génomique simple-brin, pour réaliser l'hybridation sur les mêmes sondes oligonucléotidiques que précédemment. Un fois ce problème résolu, on s'attend à des résultats du même ordre qu'avec les oligonucléotides, voire meilleurs, dans la mesure où les produits PCR sont constitués de plusieurs centaines de paires de bases (à comparer avec les 15-mers) et ont donc une masse molaire beaucoup plus importante, ce qui implique un plus grand confort dans la détection d'interactions spécifiques.

Enfin, le dernier enjeu consécutif aux résultats obtenus lors de ce travail de thèse, est d'étendre les applications du biocapteur basé sur la MRPS d'une part, à d'autres types d'interactions à usage médicale (ADN/protéines, protéines/protéines) et d'autre part, à d'autres domaines où la détection de la présence de certaines espèces biologiques est requise (environnement, douanes, défense).

ANNEXES

Annexe I

Détail du calcul de la réflectivité dans le cas du miroir résonant

Nous allons, dans cette annexe, établir l'expression analytique de la réflectivité en polarisation TE dans le cadre du miroir résonant. Ce système se compose de quatre milieux distincts, le prisme (M_p), le milieu espaceur (M_s), le guide d'ondes (M_f) et le milieu extérieur (M_c). Nous nous intéressons dans cette section à l'expression de la réflectivité en polarisation TE de cette structure à quatre milieux (prisme, oxyde de silice, oxyde de titane et milieu extérieur semi-infini. Ce facteur de proportionnalité, r_{pc}, est le coefficient de réflexion en amplitude lié aux couches comprises entre le prisme et le milieu couvrant, et s'écrit :

$$r_{pc} = \frac{r_{ps} + r_{sfc} e^{-2k_0 b_s d_s}}{1 + r_{ps} r_{sfc} e^{-2k_0 b_s d_s}} \tag{A-1}$$

avec : $b_s = \sqrt{N^2 - n_s^2}$ et $N = n_p \sin\alpha = n_f \sin\alpha_f$ (A-2)

Dans l'équation A-1 apparaît le terme r_{sfc} facteur de réflexion sur la structure $M_s/M_f/M_c$ qui s'exprime de façon analogue à r_{pc}.

$$r_{sfc} = \frac{r_{sf} + r_{fc} e^{2ik_0 p_f d_f}}{1 + r_{sf} r_{fc} e^{2ik_0 p_f d_f}} \tag{A-3}$$

avec $p_f = \sqrt{n_f^2 - N^2}$

On substitue l'expression de r_{sfc} dans A-1 pour obtenir :

$$r_{pc} = \frac{r_{ps} + \dfrac{r_{sf} + r_{fc} e^{2ikp_f d_f}}{1 + r_{sf} r_{fc} e^{2ikp_f d_f}} e^{-2kb_s d_s}}{1 + r_{ps} \dfrac{r_{sf} + r_{fc} e^{2ikp_f d_f}}{1 + r_{sf} r_{fc} e^{2ikp_f d_f}} e^{-2kb_s d_s}} \tag{A-4}$$

On développe alors l'expression A-4 :

$$r_{pc} = \frac{r_{ps}(r_{fs} + r_{sf} r_{fs} r_{fc} e^{2ikp_f d_f}) + (r_{fs} r_{sf} + r_{fs} r_{fc} e^{2ikp_f d_f}) e^{2ikb_s d_s}}{(r_{fs} + r_{sf} r_{fs} r_{fc} e^{2ikp_f d_f}) + r_{ps}(r_{fs} r_{sf} + r_{fs} r_{fc} e^{2ikp_f d_f}) e^{2ikb_s d_s}} \tag{A-5}$$

Introduisons à présent le terme de couplage h symbolisant le taux d'amplitude lumineuse couplée du prisme au milieu espaceur.

$$h = e^{-kb_s d_s} \tag{A-6}$$

qui se transforme en,

$$r_{pc} = \frac{r_{ps}(r_{fs} + r_{sf}e^{i\Psi}) + (r_{fs}r_{sf} + e^{i\Psi})h^2}{(r_{fs} + r_{sf}e^{i\Psi}) + r_{ps}(r_{fs}r_{sf} + e^{i\Psi})h^2} \tag{A-7}$$

avec $$\Psi(N) = 2kp_f(N)d_f - 2\Phi_{fs}(N) - 2\Phi_{fc}(N) \tag{A-8}$$

le déphasage total de l'onde électromagnétique lors d'un aller-retour dans le guide d'ondes en l'absence de prisme.

Pour l'instant, nous décrivons l'amplitude réfléchie d'une onde traversant quatre milieux diélectriques transparents. En réalité, la couche guidante du milieu M_f est très légèrement absorbante. Aussi dorénavant nous en tiendrons compte en définissant les facteurs de réflexion sur les interfaces M_f/M_j comme suit :

$$r_{fj}^{'} = \rho_{fj}e^{i\phi fj} \text{ , pour j=s,c} \tag{A-9}$$

On peut écrire l'indice de réfraction de la couche guidante désormais complexe,

$$n_f = n_f^{'} + in_f^{''} \tag{A-10}$$

L'introduction de l'absorption dans la couche guidante a pour effet d'ajouter un terme de perte global, p, au cours d'un aller-retour de l'onde dans la cavité. Ce terme est issu des trois contributions liées à l'atténuation de l'onde au cours d'un aller-retour de la façon suivante : un terme d'atténuation au cours de la traversée du guide, et deux termes de pertes aux interfaces guide-milieu espaceur et guide-milieu extérieur.

En utilisant la loi de Snell-Descartes, on peut exprimer la partie réelle $p_f^{'}$ et imaginaire $p_f^{''}$ de $p_f = n_f\cos\alpha_f = p_f^{'} + jp_f^{''}$ à l'aide de l'indice effectif de réfraction N.

$$p_f^{'} = \sqrt{\frac{1}{2}\left\{u + \sqrt{u^2 + 4n_f^{'2}n_f^{''2}}\right\}} \tag{A-11}$$

$$p_f'' = \sqrt{\frac{1}{2}\left\{-u + \sqrt{u^2 + 4n_f'^2 n_f''^2}\right\}}$$

avec $u = n_f'^2 - n_f''^2 - N^2$

Le module ρ_{fj} et la phase ϕ_{fj} s'expriment alors,

$$\rho_{fj} = \sqrt{\frac{p_f'^2 + (p_f'' - bj)^2}{p_f'^2 + (p_f'' + b_j)^2}} \quad , \quad \phi_{fj} = -\arctan\left(\frac{2b_j p_f'}{p_f'^2 + p_f''^2 - b_j^2}\right) \tag{A-12}$$

En faisant un développement limité d'ordre un en p_f'' on simplifie ρ_{fj},

$$\rho_{fj} \approx 1 - \frac{2b_j}{p_f'^2 + b_j^2} p_f'' \tag{A-13}$$

En sommant les trois contributions p_{f1}, p_{f2}, p_{f3}, on écrit p comme,

$$p = \left(\frac{2b_s}{p_f'^2 + b_s^2} + \frac{2b_c}{p_f'^2 + b_c^2} + 2kd_f\right) p_f'' \tag{A-14}$$

avec $b_c = n_c \cos\alpha_c = \sqrt{N^2 - n_c^2}$

A-7 se transforme alors en,

$$r_{pc} = \frac{r_{ps}(r_{fs}' + r_{sf}' e^{-p} e^{i\Psi}) + (r_{fs}' r_{sf}' + e^{-p} e^{i\Psi})h^2}{(r_{fs}' + r_{sf}' e^{-p} e^{i\Psi}) + r_{ps}(r_{fs}' r_{sf}' + e^{-p} e^{i\Psi})h^2} \tag{A-15}$$

Si on développe d'une part Ψ au voisinage de la résonance $N = N_0$, et d'autre part $e^{i\Psi}$, en négligeant les termes d'ordre supérieurs à un en h et en p_f'', on réécrit les deux termes entre parenthèses de l'expression I-31 comme suit,

$$\begin{aligned} r_{fs}' + r_{sf}' e^{-p} e^{i\Psi} &= r_{fs}'(p + i\chi(N - N_0)) \\ (r_{fs}' r_{sf}' + e^{-p} e^{i\Psi})h^2 &= 2ih^2 r_{fs}' \sin 2\Phi_{fs} \end{aligned} \tag{A-16}$$

avec $$\chi = -\frac{\partial \Psi}{\partial N} = 2\frac{N}{p_f}\left(kd_3 + \frac{1}{b_s} + \frac{1}{b_c}\right) \quad \text{(A-17)}$$

En reportant les deux expressions de A-13 dans A-12, on arrive à,

$$r_{pc} = r_{ps}\left(\frac{\left(N - N_0^p\right) + i\partial N\left(1 - 2\frac{p}{\chi\delta N}\right)}{\left(N - N_0^p\right) - i\delta N}\right) \quad \text{(A-18)}$$

où,

$$\delta N = 2\frac{h^2}{\chi}\sin\Phi_{ps}\sin\Phi_{fs} = \frac{h^2}{\chi}f \quad \text{(A-19)}$$

N_0^p désignant la position de la résonance en présence du prisme. L'équation A-18 devient :

$$r_{pc} = r_{ps}e^{2i\phi p}\left(1 - 2i\frac{p}{\chi}\frac{1}{\left(N - N_0^p\right) + i\delta N}\right) \quad \text{(A-20)}$$

Faisons l'approximation que les pertes symbolisées par p sont plus faibles que le couplage h^2f, alors on définit c comme le terme d'adaptation de couplage.

$$\frac{h^2f - p}{h^2f + p} = \sqrt{\frac{\left(h^2f - p\right)^2}{\left(h^2f + p\right)^2}} = \sqrt{1 - c} \quad \text{(A-21)}$$

avec $$c = \frac{4ph^2f}{\left(h^2f + p\right)^2} \quad \text{(A-22)}$$

Nous ne donnons dans cette section que le résultat de l'étude de la réflectivité en polarisation TE. Tous les détails de ce calcul apparaissent dans l'annexe I.

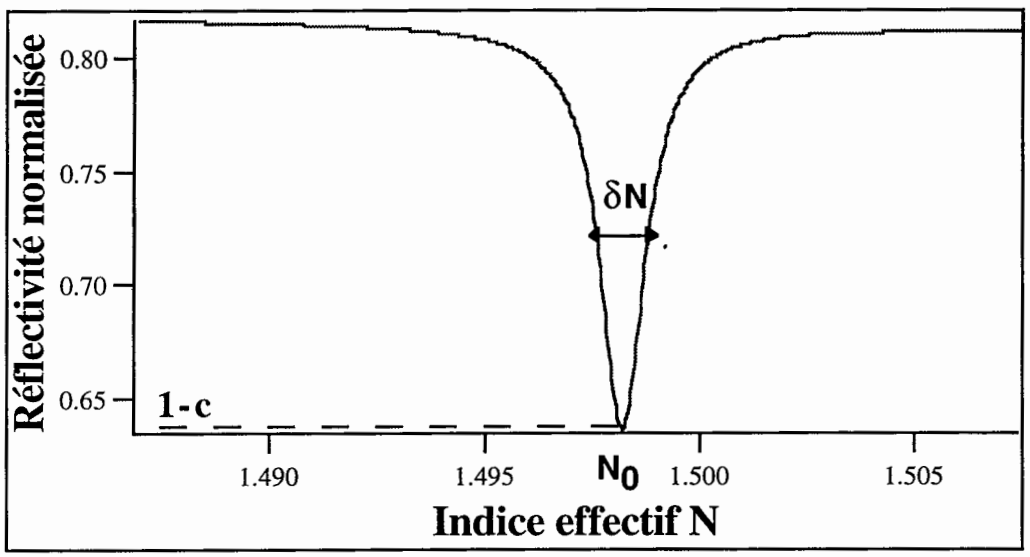
Le coefficient de réflexion en amplitude entre le prisme et le milieu couvrant r_{pc} est donné suivant l'expression I-33 :

$$r_{pc} = e^{2i\left(\Phi_p + \Phi_p' + \Phi_{ps}\right)}\left(1 - c\frac{\delta N^2}{\left(N - N_0\right)^2 + \delta N^2}\right)^{\frac{1}{2}} \quad \text{(A-23)}$$

où $\Phi_p(N) = \arctan\left(\frac{\delta N}{N - N_0}\right)$, $\Phi'_p(N) = \arctan\left(\sqrt{1-c}\frac{\delta N}{N - N_0}\right)$, c le terme de couplage de l'onde incidente dans le guide, δN la demi-largeur à mi-hauteur du pic en polarisation TE et Φ_{ps} le demi-déphasage à l'interface prisme-milieu espaceur. Notre système nous permet de détecter le module au carré de l'amplitude réfléchie, c'est à dire :

$$\left|r_{pc}\right|^2 = 1 - c\frac{1}{\left(\frac{(N - N_0)}{\delta N}\right)^2 + 1} \qquad \text{(A-24)}$$

Il apparaît que comme dans le cas de la RPS, la réflectivité du miroir résonant s'apparente à une Lorentzienne, caractérisée par son minimum 1-c et sa demi-largeur à mi-hauteur δN. La Lorentzienne est centrée en $N = N_0$, c'est à dire centrée sur la position de résonance du guide en présence du prisme de couplage. Le paramètre δN correspond à la largeur à mi-hauteur de la résonance, 1-c est la valeur du minimum de réflectivité qui a lieu à la résonance et bien sur, N_0 est l'indice effectif pour la position angulaire du minimum de réflectivité.



Figue A-1 : Module au carré de l'amplitude réfléchie TE du MR en fonction de l'indice effectif. La couche guidante est en TiO_2 d'indice 2,15 -j2,2.10^{-4} et d'épaisseur 42 nm, le milieu espaceur est en SiO_2 d'indice 1,46 et d'épaisseur 700 nm.

La phase de l'amplitude réfléchie provient de trois contributions d'origines différentes (cf. A-23), premièrement le terme correspondant au déphasage du champ électrique réfléchi dans le cas du prisme recouvert du milieu M_s seul, $r_{ps} = e^{-2i\Phi_{ps}}$, régissant la phase de r_{pc} hors résonance. Vient ensuite le terme $\Phi_p(N)$ variant de π au voisinage de N_0 avec une pente fixée par la largeur à mi-hauteur δN et vaut 0 ou π loin de la résonance. La troisième contribution à la phase totale de r_{pc}, $\Phi_p'(N)$, possède les mêmes propriétés que $\Phi_p(N)$ à ceci près qu'elle voit sa pente augmentée du facteur $\sqrt{1-c}$, alors la pente de $\Phi_p'(N)$ peut être plus importante que celle de $\Phi_p(N)$. En général cette dernière assertion n'est jamais validée, en conséquence, la phase totale du champ réfléchi varie d'un facteur 2π autour de la résonance par rapport à la phase $-2i\Phi_{ps}$. L'expression A-24 décrit explicitement le comportement de la réflectivité en fonction de l'indice effectif bien que l'on ne le mesure pas directement.

La méthode consiste à polariser le faisceau incident à 45 degrés des deux axes des polarisations TE et TM afin d'équilibrer l'amplitude des composantes de la polarisation avant couplage avec le prisme, puis à les faire interférer à l'aide d'un polariseur après réflexion.

Choisissons arbitrairement la résonance sur la composante TE de la polarisation. On considère que la phase du coefficient de réflexion de la composante TM est quasiment constant au voisinage de la résonance de la polarisation TE. On peut écrire la réflectivité en intensité R après interférences comme étant,

$$R = \frac{1}{4}\left|r_{pc}^{TE} - r_{pc}^{TM}\right|^2 \tag{A-25}$$

avec

$$r_{pc}^{TM} = e^{i\Phi_{pc}^{TM}} \text{ et } r_{pc}^{TE} = \sqrt{1 - c\frac{1}{\left(\frac{(N-N_0)}{\delta N}\right)^2 + 1}}\, e^{i\Phi_{ps}^{TE}} e^{i\left(\Phi_p + \Phi_p'\right)} \tag{A-26}$$

On obtient après quelques manipulations, l'expression de la réflectivité prenant en compte l'interférence des plarisations TE et TM :

$$R = 1 + r^2 - 2r\cos\left(\Phi_{ps}^{TE} - \Phi_{ps}^{TM} + \Phi_p(N) + \Phi_p'(N)\right) \tag{A-27}$$

où $r = \left|r_{pc}^{TE}\right|$.

Annexe II

Étude de la carte d'acquisition de données SCION LG-3 et de la linéarité de la caméra

La carte SCION LG-3 convertit le signal analogique provenant de la caméra COHU en un signal numérique étalé sur une dynamique de 256 niveaux de gris. On peut la contrôler grâce à un logiciel de traitement d'images par le biais de deux paramètres : le gain et l'offset qui correspondent respectivement au contraste et à la brillance lus sur le moniteur.

On se propose de comprendre l'action de ces deux paramètres afin de pouvoir par la suite quantifier de manière non subjective les images du type plasmons de surface sur lesquelles nous aurons à définir précisément les niveaux de gris la constituant.

A-Etude de la carte d'acquisition LG-3

A-I-Etablissement d'une loi analytique décrivant l'effet du gain et de l'offset pour un signal constant.

Dans un premier temps on enregistre des images d'une source stable et constante sur lesquelles on mesure la moyenne tout en faisant varier le gain jusqu'à saturation de la caméra. On commence en imposant un offset de 0. Puis on recommence cette fois-ci en augmentant l'offset petit à petit. On obtient ainsi des courbes donnant la réponse numérique de la carte en fonction du gain (Fig. A-2).

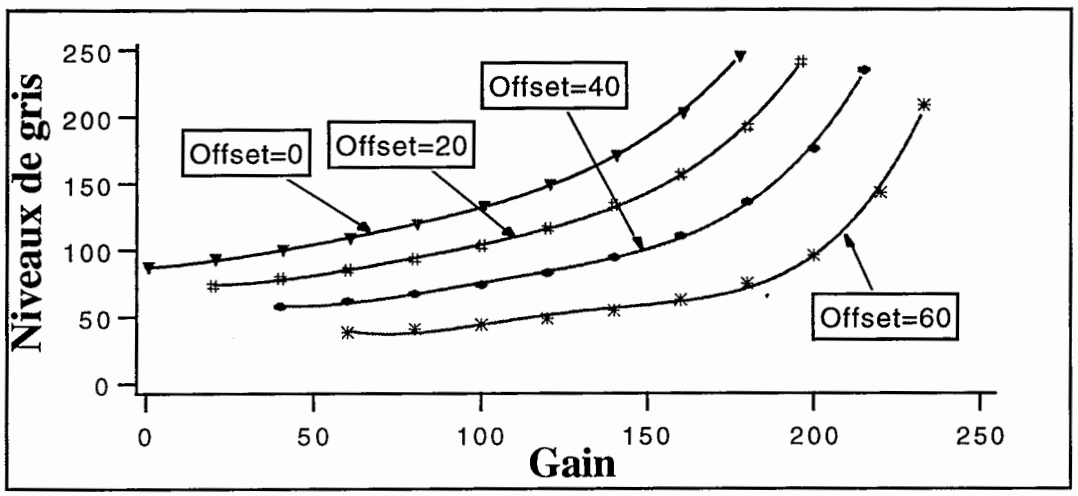


Figure A-2 : Réponse numérique en fonction du gain pour différents offsets. Les courbes pleines correspondent aux ajustements effectués à partir des points expérimentaux.

La courbe avec un offset nulle va nous permettre d'accéder à la loi analytique régissant le gain seul. Ensuite, on essaiera de valider un modèle incluant l'offset.

Pour obtenir la première loi on divise la courbe avec un offset nul par la valeur de la réponse à gain nul (Fig. A-3). On ajuste ensuite avec une double exponentielle dont la forme analytique est :

K0 + K1*EXP (K2*x) + K3*EXP (K4*x)

On donne après ajustement : K0=0,289
K1=0,0053
K2=0,0288
K3=0,701
K4=0,00479

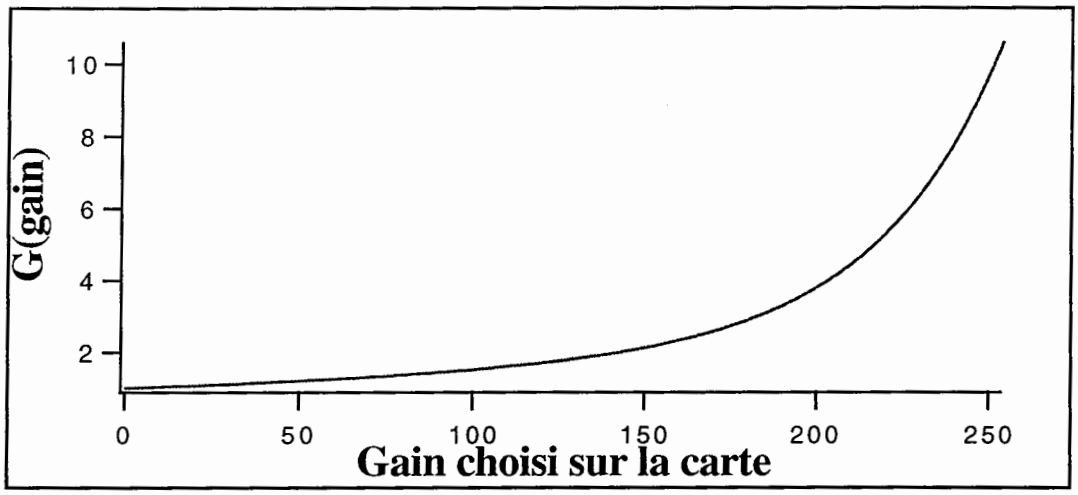


Figure A-3 : Fonction Gain et sa courbe d'ajustement.

Si rep0 est la réponse numérisée pour un offset nul et g le paramètre de gain , on écrit alors : $rep_0(g) = G(g) * rep_0(g = 0)$ avec G la fonction tracée ci-dessus. On introduit l'offset Δ par le modèle suivant :

$$\boxed{rep_i(g) = G(g) * \left[rep_0(g = 0) - \Delta_i \right]} \qquad \text{(A-22)}$$

Connaissant point par point la fonction G(g), on peut déduire alors Δ :

$$\boxed{\Delta_i = rep_0(g = 0) - \frac{rep_i(g)}{G(g)}} \qquad \text{(A-23)}$$

A présent nous allons essayer de valider ce modèle avec les courbes où l'offset est respectivement de 20, 40 et 60. On utilise l'équation 2 pour tracer les figures A-4, A-5 et A-6 correspondant aux offsets 20, 40 et 60. Les résultats sont répertoriés dans le tableau 1.

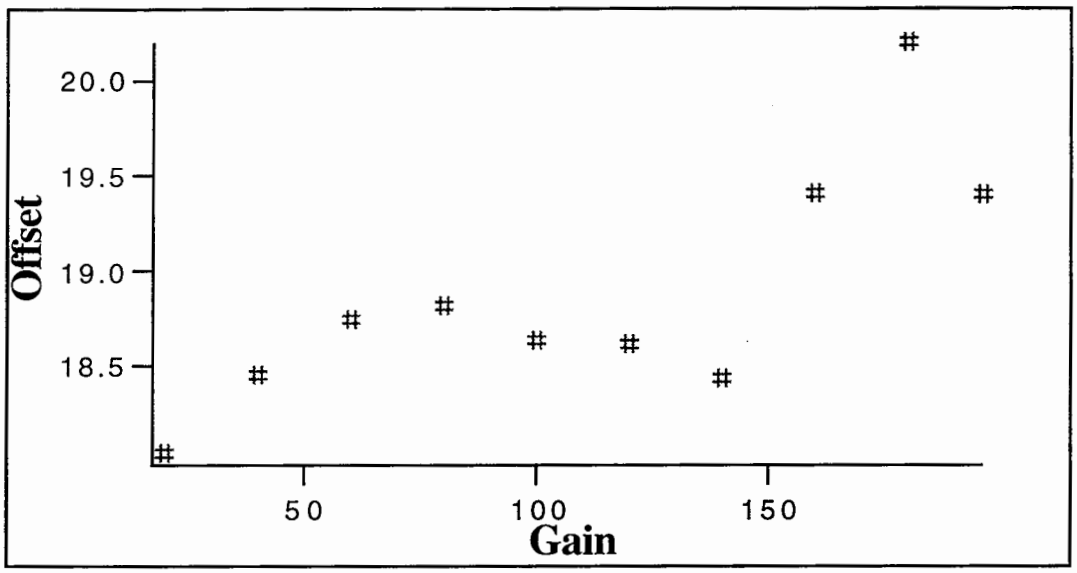


Figure A-4 : Distribution de l'offset en fonction du gain pour un offset théorique de 20.

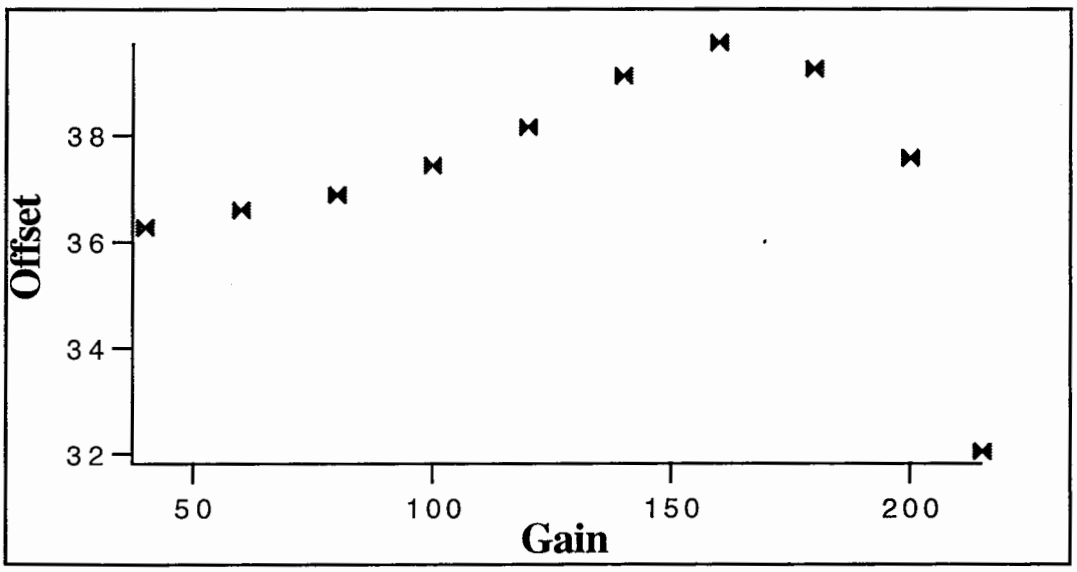


Figure A-5 : Distribution de l'offset en fonction du gain pour un offset théorique de 40.

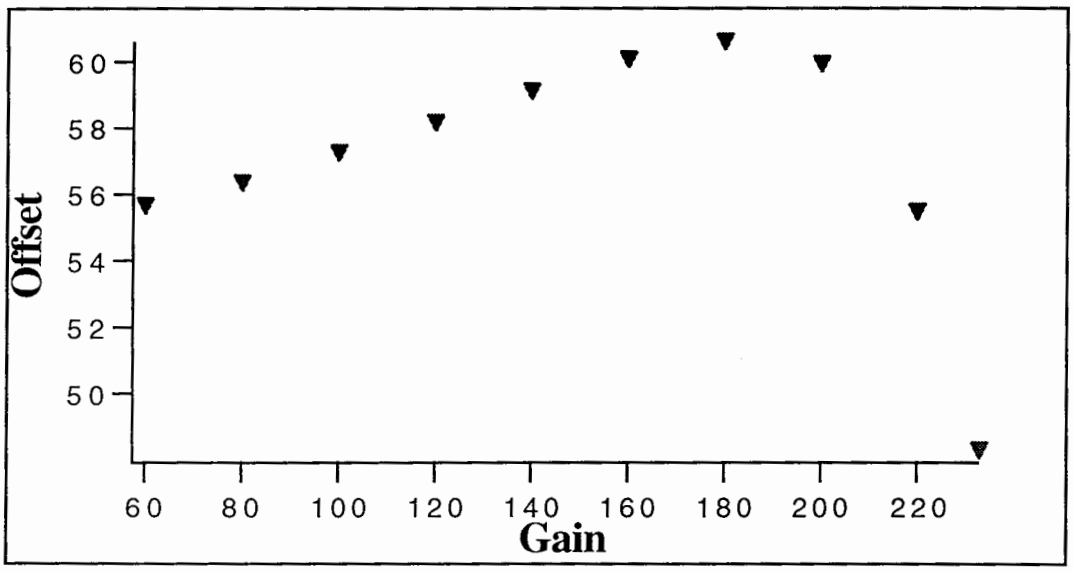


Figure A-6 : Distribution de l'offset en fonction du gain pour un offset théorique de 60.

Offset appliqué	Offset réel	Ecart au modèle
20	18,87 ± 0,62	1,13 ± 0,62
40	37,3 ± 2,19	2,7 ± 2,19
60	57,09 ± 3,61	2,91 ± 3,61

Tableau A-a : Validation du modèle théorique

A-II-Extrapolation pour un signal variable.

La question épineuse est de retrouver une loi analytique de la forme de l'équation 1 pour un signal non constant que l'on fait varier au travers du flux incident entre polariseur et analyseur croisés. Pour ce faire nous avons de nouveau relevé la réponse issue dans un premier temps de la caméra puis digitalisée par la LG-3. Nous donnons dans la figure A-7 différentes courbes représentant la réponse en sortie de carte en fonction du flux relatif afin de déceler une quelconque corrélation entre des courbes prises avec des gains et des offsets différents. Nous avons délibérément ajouté à cette figure la réponse provenant de la conversion réalisée à partir de la carte intégrée au Macintosh.

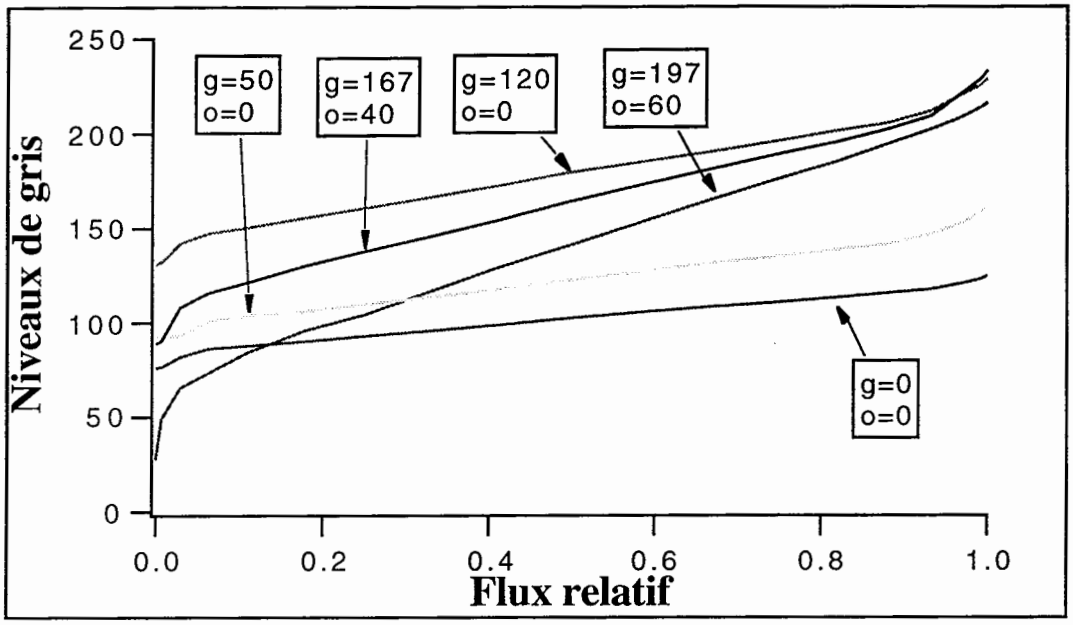


Figure A-7 : représentations de réponses issues de la LG-3 pour des gains et des offsets différent en fonction du flux. On remarque nettement sur la figure A-7 que la courbe tracée avec la carte du Mac a exactement la même forme que celles issues de la LG-3.

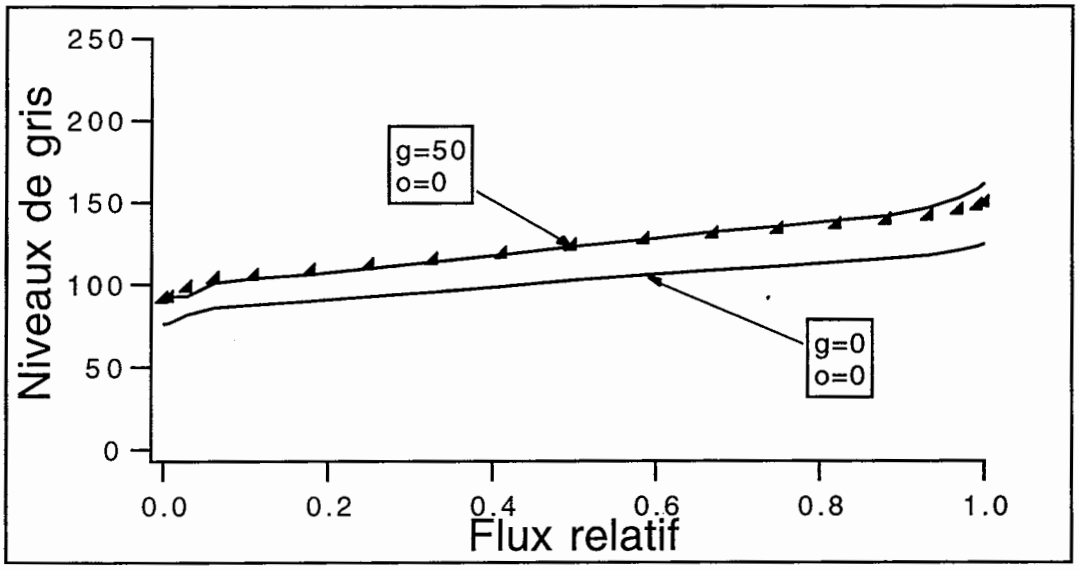


Figure A-8 : Validation du modèle. On représente en trait plein les courbes avec un offset nul et un gain respectivement de 0 et 50. Les points tracés représentent la courbe g=0, o=0 sur laquelle on a effectué la multiplication par G(50).

En appliquant l'équation 1 avec un gain de 50 à la courbe ayant un gain et un offset nuls on obtient précisément la courbe avec un offset nul et un gain de 50. On a donc bien modélisé l'effet du gain sur un signal variable. Il nous faut à présent valider le modèle avec un offset non nul (Fig.A-9).

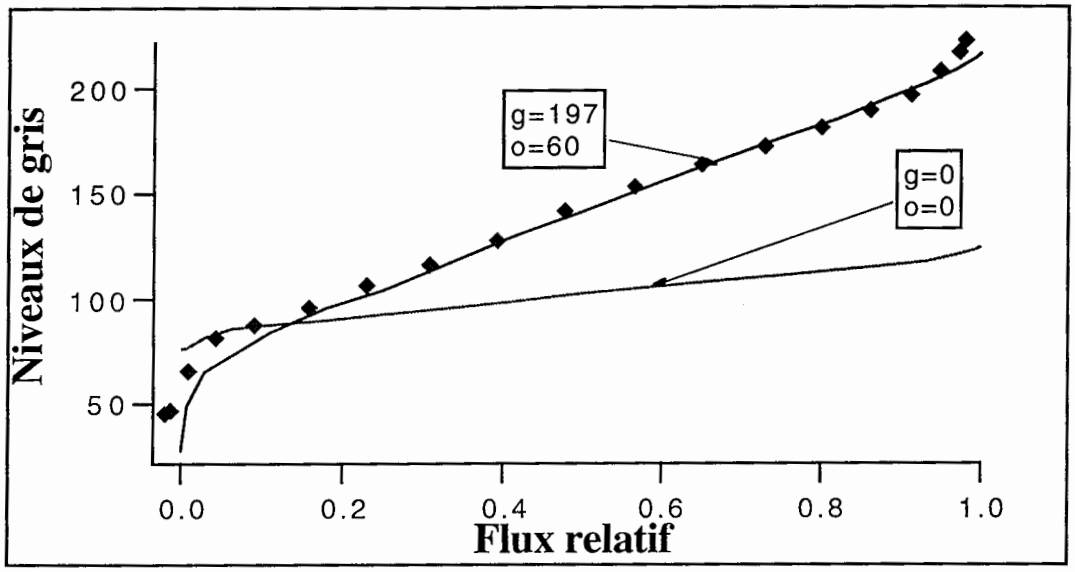


Figure A-9 : Validation du modèle avec un offset non nul. On a représenté les courbes g=197, o=60 et g=0, o=0 en fonction du flux en trait plein. Les points représentent la courbe g=0, o=0 sur laquelle on applique l'équation 1 avec g=197 et Δ=60.

Cette fois-ci les deux courbes ne se superposent pas complétement, c'est très probablement dû au bruit de photon qui est très important en haute dynamique. En conclusion, connaissant la forme de G(g) et a fortiori sa valeur en tout point, on est capable de remonter à la valeur vraie de n'importe quelle réponse en ayant jouer sur le gain et l'offset.

A-III-Protocole à suivre pour de futures études quantitatives.

L'application principale liée à l'utilisation de la caméra et de la carte SCION LG-3 réside dans l'étude quantitative d'images de surfaces sous incidence plasmon. Nous présentons un protocole permettent d'utiliser pleinement nos instruments de mesures afin de détecter le plus finement possible un faible contraste (pour la reconnaissance de réseaux inscrits par exemple).

Le plasmon de surface se manifestant comme un minimum de réflectivité, nos études seront faites la plupart du temps en faible dynamique. Pour suivre une dynamique de fixation de protéines par exemple, on se place sur le flanc de ce plasmon. Il s'agit alors de mesurer la moyenne sur l'image avec un gain et un offset nuls; on mesure ainsi rep0(0). Puis on impose un offset équivalent à ce niveau de gris, c'est à dire qu'on ne tiendra plus compte des niveaux de gris inférieurs au minimum du flanc. On augmente ensuite le gain de telle façon que la zone la plus claire sur l'image (ou bien le niveau de gris supérieur attendu) corresponde au niveau 254. On aura ainsi une image numérisée sur la totalité de la dynamique de la carte d'acquisition, ce qui visuellement est très intéressant. En outre, connaissant la loi régissant le gain et l'offset,

nous pourrons quantifier avec une bonne incertitude la valeur des niveaux de gris sur toute l'image. L'utilisation de la fonction donnant l'histogrammme permet de s'assurer que la dynamique d'une image couvre bien les 8 bits de la dynamique de la caméra.

B-Etude de la linéarité de la caméra COHU

La caméra COHU que nous utilisons possède un GAMMA réglable, nous allons calibrer ce GAMMA dans cette section afin de déterminer la position sur la caméra correspondant à un GAMMA réel de 1. La figure A-10 représente les réponses numériques pour des GAMMA affichés différents, on y a ajouté leur courbe d'ajustement qui garantissent leur GAMMA réel. Quant à la figure A-11, elle représente la déviation standard de la différence de deux images consécutives de la réponse numérique en fonction du flux relatif. Cette déviation standard vaut deux fois le bruit de numérisation.

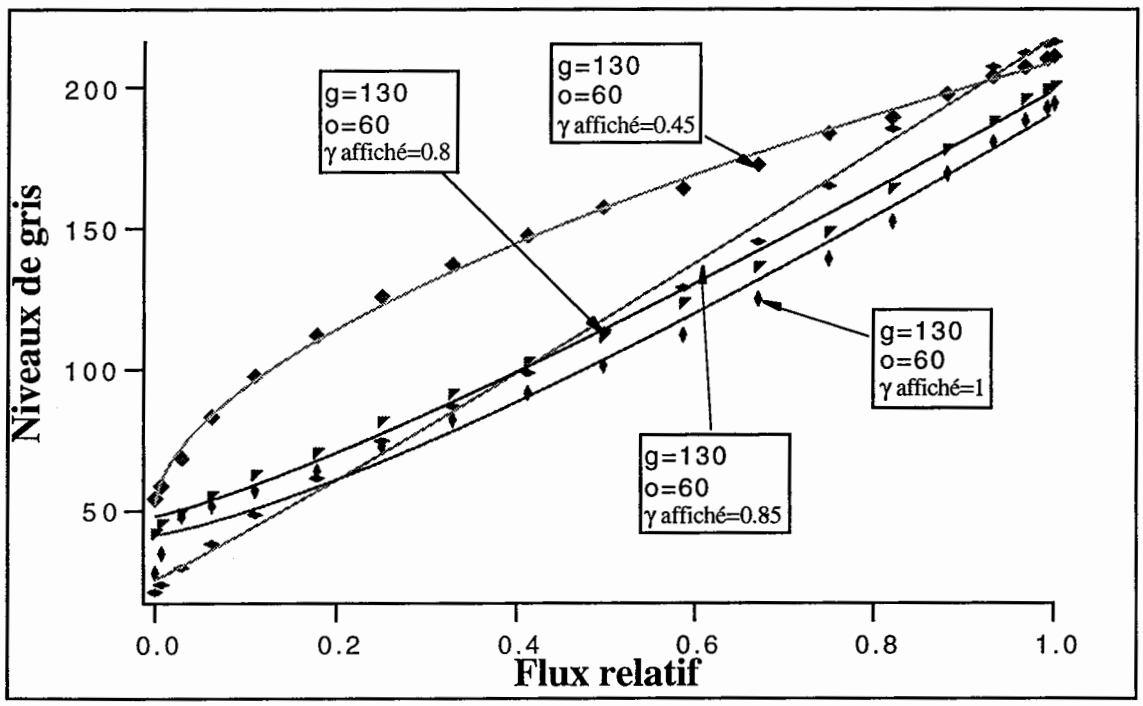


Figure A-10 : Réponses numériques en fonction du flux relatif pour différents γ avec leur courbe d'ajustement.

On voit bien que la position $\gamma = 0.85$ donne la réponse la plus linéaire. Nous utiliserons la caméra dans cette position dorénavant.

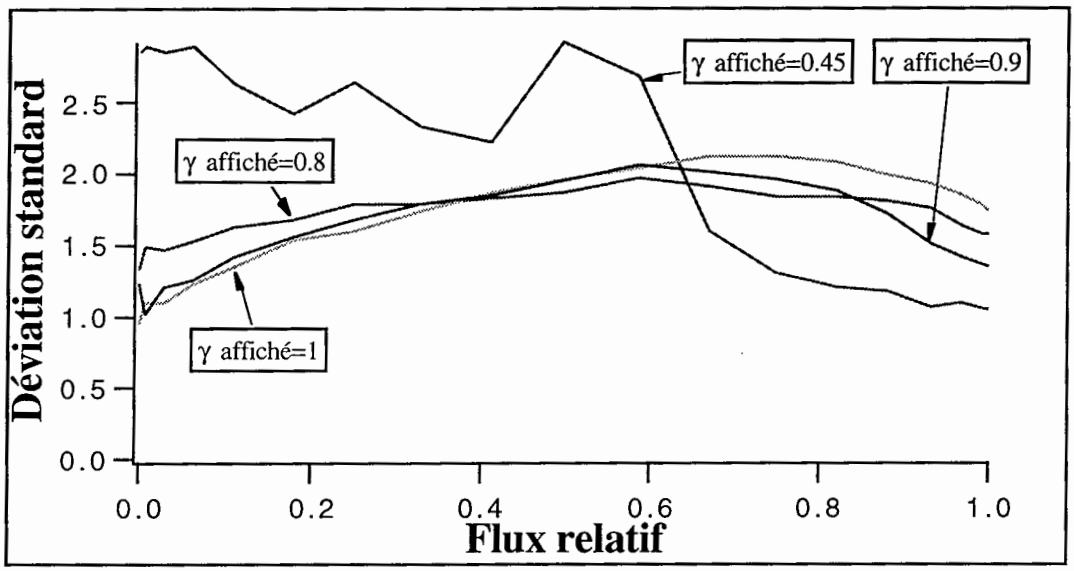


Figure A-11 : Déviation standard de la différence de deux images consécutives en fonction du flux relatif.

On voit l'intérêt d'utiliser la caméra de manière linéaire sur la figure A-11. En effet, la déviation standard, qui correspond au bruit de numérisation est très faible (de l'ordre de un niveau de gris).

Annexe III

Nettoyage des substrats d'or par insolation UV

Avant d'utiliser les lames d'or obtenues par évaporation sous vide, nous les nettoyons soigneusement en suivant un protocole pré-établi. Ce protocole s'appuie notamment sur un rinçage des lames avec de l'éthanol et de l'eau, après une insolation de plusieurs heures sous des lampes ultra-violettes (UV). L'utilisation de source UV permet la création de radicaux libres sous forme d'ozone, qui viennent oxyder les impuretés microscopiques déposées sur l'or.

Dès la sortie de la cloche à vide, les lames d'or subissent les effets de la pollution sous la forme de petites molécules organiques. Afin de mettre cette pollution en évidence, ainsi que l'effet des UV, nous montrons dans la figure A-12 l'état de surface (sous la forme de courbes de réflectivité) une semaine après la sortie de l'enceinte à vide, et après un passage de deux heures sous les UV.

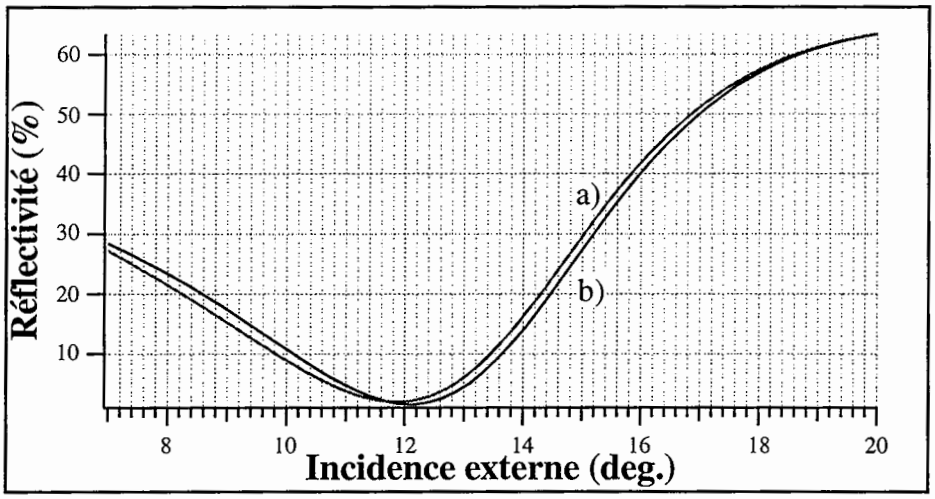


Figure A-12 : Courbes de réflectivité en fonction de l'angle externe relevées sur le même substrat d'or avant (a) et après (b) l'insolation UV.

Si l'on imagine que cette couche de pollution a un indice de réfraction de 1,41 (comme la plupart des molécules biologiques que nous avons étudiées), on obtient alors une épaisseur de la couche compacte équivalente à la pollution de 0,3 nm. La présence de telles molécules sur le transducteur avant le début d'une expériences peut suffire à expliquer le manque de reproductibilité des résultats notamment dans le cas de l'adsorption passive. En effet, la pollution occupe alors des sites potentiellment accessibles aux protéines. De façon plus générale, on veillera à nettoyer et préparer le plus proprement possible tous nos échantillons, en respectant le protocoles d'insolation UV.