



HAL
open science

Biopuce à aptamères : application à la détection de petites molécules par imagerie de résonance plasmonique de surface

Feriel Melaine

► **To cite this version:**

Feriel Melaine. Biopuce à aptamères : application à la détection de petites molécules par imagerie de résonance plasmonique de surface. Physique [physics]. Université de Grenoble, 2014. Français. NNT : 2014GRENY054 . tel-01369036

HAL Id: tel-01369036

<https://theses.hal.science/tel-01369036>

Submitted on 20 Sep 2016

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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Physique pour les Sciences du Vivant**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Feriel MELAINE

Thèse dirigée par **Arnaud BUHOT**
Co-dirigée par **Yoann ROUPIOZ**

Préparée au sein du **CEA Grenoble**
Institut Nanosciences et Cryogénie (INAC)
Service : **Structures et Propriétés d'Architectures Moléculaires (SPRAM)**
Groupe : **Chimie pour la Reconnaissance et l'Etude des Assemblages Biologiques (CREAB)**
Dans l'**École Doctorale de Physique**

Biopuce à aptamères : application à la détection de petites molécules par imagerie de résonance plasmonique de surface

Thèse soutenue publiquement le **23 octobre 2014**
devant le jury composé de :

M. Eric PEYRIN

Professeur à l'Université Joseph Fourier (Grenoble), Président

M. Jean-Jacques TOULMÉ

Directeur de recherche à l'IECB (Bordeaux), Rapporteur

Mme. Carole CHAIX

Directeur de recherche CNRS (Lyon), Rapporteur

M. Benoît LIMOGES

Directeur de recherche CNRS (Paris), Examineur

M. Arnaud BUHOT

Directeur de recherche au CEA Grenoble, Directeur de thèse

M. Yoann ROUPIOZ

Chargé de recherche au CEA Grenoble, Co-Directeur de thèse



~ REMERCIEMENTS ~

Au terme de cette aventure doctorale, c'est avec émotion que je tiens à remercier toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce projet.

Mes premiers remerciements s'adressent aux Pr. Jean-Jacques Toulmé et Dr. Carole Chaix qui m'ont fait l'honneur d'être rapporteurs de cette thèse. Je vous remercie pour votre intérêt, pour le temps consacré à la lecture de ce travail et pour vos remarques et commentaires pertinents. J'associe à ces remerciements le Dr. Benoit Limoges ainsi que le Pr. Eric Peyrin pour avoir accepté, respectivement, d'examiner mon manuscrit et de présider le jury.

J'adresse par la suite mes plus sincères remerciements à mes directeurs de thèse, Arnaud Buhot et Yoann Roupioz. Merci de m'avoir donné l'opportunité de découvrir l'univers de la recherche à travers un sujet des plus intéressants ! Je vous suis reconnaissante pour votre confiance, vos conseils avisés et votre écoute qui ont été d'une importance inestimable pour la réussite de ce projet. Merci pour votre énergie, vos qualités pédagogiques et scientifiques, votre franchise et votre sympathie. Vous avez su encadrer mon travail de façon subtile et complémentaire en m'accompagnant tout au long de ces années. Je n'oublie pas non plus votre soutien et vos encouragements pendant les moments difficiles. Je m'estime très chanceuse d'avoir eu des encadrants tels que vous !

J'ai également eu la chance de faire partie de l'équipe CREAB qui est devenue l'équivalent d'une seconde famille au fil des années. Merci à Thierry Livache de m'avoir acceptée au sein de cette belle équipe. Yanxia Hou-Broutin, Loïc Leroy, André Roger, Pascal Mailley (grâce à qui j'ai connu le CREAB!), Martial Billon, Aurélie Bouchet-Spinelli et Roberto Calemczuk, vous répondiez présents à la moindre de mes sollicitations. Un grand merci pour nos discussions et vos précieux conseils.

Je remercie tous les CREABiens non-permanents (ou presque) que j'ai eu l'occasion de connaître au cours de ces presque quatre années. Pour votre aide, votre gentillesse et tous ces instants précieux que vous m'avez fait vivre (parfois pour la toute première fois de ma vie), pour les cinés, les soirées, les balades en vélo, le rituel footing à midi pour préparer l'Ekiden (pour lequel j'ai fini par lâchement vous abandonner, entorse à la cheville oblige !), les séances de squash (à haut risque), les co-voiturages, les sorties Ski ET Snow (véritable découverte pour moi !) et j'en passe... Merci donc à : Camille (qui m'a mis le pied à l'étrier^^), Maria (pour son éternel optimisme et sa bonne humeur), Radek et Sihem (mes tous premiers "co-bureau"), Laurent, Florian, Loïc (camarade !), Laurie, Cyril, Laure, Sami, Sandrine, Benjamin, Raphaël, Emilie, Nora, Vanessa, Sébastien et José. Meilleures pensées aux "nouveaux arrivants" à qui je souhaite le meilleur : Yulia, Vincent et Karim. Merci Clothilde, stagiaire exemplaire, pour ta contribution à ce travail, ce fut très agréable de partager ce projet avec toi.

Un merci tout spécial à mes "co-bureau", Elodie et Radé, pour m'avoir supportée pendant ces années. Je vous remercie pour la richesse de nos conversations, votre aide et vos encouragements durant les périodes de doutes. J'ai appris énormément grâce à vous, notamment à apprécier la danse (pas tout à fait classique).

Je tiens également à remercier le personnel administratif du SPrAM, Catherine Pascal, Céline Deleval et surtout Charles Picot pour leur gentillesse et patience.

Durant ma thèse, j'ai eu l'occasion de faire des enseignements à la faculté de Pharmacie de Grenoble. A ce titre, j'adresse mes sincères remerciements à Cécile Batandier pour avoir admirablement endossé le rôle (officieux) de tutrice et Walid Rachidi pour sa disponibilité.

Je remercie également Samia pour son amitié et sa continuelle présence, notamment à 3h du matin, la veille de remise du manuscrit, lorsque WORD a disjoncté pour la énième fois...

Enfin, je ne saurai exprimer ici toute ma gratitude envers mes parents et ma sœur Imène. Merci pour vos nombreux sacrifices (qui m'ont permis d'être là aujourd'hui), votre soutien et votre amour.

Encore un grand MERCI à tous pour m'avoir conduit à ce jour mémorable.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	3
TABLE DES ABRÉVIATIONS	5
1. INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	6
<i>Avant-propos</i>	7
1.1 Les aptamères comme éléments de reconnaissance	10
1.1.1 Caractéristiques structurales et propriétés	10
1.1.2 Sélection des aptamères	12
1.1.3 Applications	14
1.2 Application à la détection de petites molécules : l'adénosine comme modèle	18
1.2.1 Notions de <i>petites molécules</i>	18
1.2.2 L'adénosine et son aptamère	21
1.2.3 La détection de l'adénosine au moyen d' <i>aptasensors</i>	23
1.3 Objectifs de la thèse.....	25
BIBLIOGRAPHIE	27
2. ÉLABORATION DE LA BIOPUCE ET DÉTECTION PAR SPRi.....	31
2.1 L'imagerie par résonance des plasmons de surface (SPRi).....	32
2.1.1 Le phénomène de résonance plasmonique	32
2.1.2 L'imagerie SPR	34
2.1.3 Dispositif expérimental utilisé	36
2.2 Conception de la biopuce	39
2.2.1 Séquences des aptamères utilisés	39
2.2.2 Immobilisation des aptamères sur la surface.....	41
2.3 Optimisation de la chimie de surface	44
2.3.1 La thrombine et ses aptamères	45
2.3.2 Traitements de surface	47
2.4 Application au modèle <i>adénosine</i>	61
2.5 Conclusion.....	63
BIBLIOGRAPHIE	65
3. DÉTECTION DE L'ADÉNOSINE PAR AMPLIFICATION DU SIGNAL SPRi	68
3.1 Amplification du signal SPR	69
3.1.1 Introduction	69
3.1.2 Les nanoparticules comme agents d'amplification	71
3.1.3 Stratégie de détection développée	80

3.2	Caractéristiques et fonctionnalisation des nanoparticules d'or	83
3.2.1	Choix des nanoparticules d'or	83
3.2.2	Couplage aptamères-nanoparticules d'or	85
3.2.3	Stratégies de blocage des surfaces pour la réduction du signal non spécifique ..	94
3.2.4	Caractéristiques de la cinétique d'amplification par SPRi.....	99
3.3	Application à la détection d'adénosine.....	105
3.3.1	Détection via l'interaction des conjugués AuNPs-SplitAPT avec les sondes SplitAPT8.....	105
3.3.2	Détection au moyen des séquences sondes SplitAPT4.....	108
3.4	Conclusion	113
	BIBLIOGRAPHIE	116
4.	DÉTECTION DE L'ADÉNOSINE PAR UTILISATION DES RAMPES DE TEMPERATURE	121
4.1	Introduction	122
4.2	Stratégies de détection de l'adénosine à partir des profils de dénaturation.....	125
4.2.1	Dispositif expérimental	126
4.2.2	Protocole de détection	128
4.3	Caractéristiques des profils de dénaturation.....	131
4.3.1	Cas des séquences SplitAPT8	131
4.3.2	Application à la détection d'adénosine à partir des séquences SplitAPT8	134
4.3.3	Gamme de détection.....	136
4.3.4	Influence du nombre de bases complémentaires.....	139
4.4	Considérations thermodynamiques.....	143
4.4.1	Généralités sur le modèle de Langmuir.....	143
4.4.2	Adaptation au modèle d'étude.....	147
4.5	Conclusion	153
	BIBLIOGRAPHIE	155
5.	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	158
	ANNEXE A. Matériel expérimental	162
	ANNEXE B. Protocoles expérimentaux	164
	ANNEXE C. Estimation de la taille et de la concentration des nanoparticules	168

TABLE DES ABBRÉVIATIONS

A	Adénine, base d'ADN
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
APT	Aptamère
ARN	Acide RiboNucléique
Au	Or
AuNP	Nanoparticule d'or
BSA	Albumine sérique bovine / Bovine Serum Albumin (En.)
C	Cytosine, base d'ADN
CEA	Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives
CNRS	Centre National de la Recherche Scientifique
CREAB	Chimie pour la Reconnaissance et l'Etudes des Assemblages Biologiques
cyt c	Cytochrome c
Da	Dalton
DDT	1-Dodécanthiol
FRET	Transfert d'Energie par Résonance de type Förster
G	Guanine, base d'ADN
K_A	Constante d'affinité
K_D	Constante de dissociation à l'équilibre
kDa	Unité de mesure kiloDalton
LED	Diode électroluminescente / Light-Emitting Diode (En.)
MCH	6-Mercaptohexanol
NHS	NHydroxysuccinimide
PCR	Réaction en chaîne par polymérase / Polymerase Chain Reaction (En.)
PEEK	Plastique polyétheréthercétone
PEG	Polyéthylène glycol
Ppy	Polypyrrole
SAM	Monocouche auto-assemblée / Self-Assembled Monolayer (En.)
SELEX	Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment (En.)
SPR	Résonance plasmonique de surface / <i>Surface Plasmon Resonance (En.)</i>
SPrAM	Structure et Propriétés d'Architectures Moléculaires
SPRi	Imagerie de résonance plasmonique de surface
T	Thymine, base d'ADN
T_d	Température de dissociation
TE	Polarisation Transverse Electrique
THR	Thrombine
TM	Polarisation Transverse Magnétique
T_m	Température de fusion / <i>Melting Temperature (En.)</i>
ΔR	Variation de réflectivité

CHAPITRE 1

INTRODUCTION GÉNÉRALE

<i>Avant-propos</i>	7
1.1 Les aptamères comme éléments de reconnaissance	10
1.1.1 Caractéristiques structurales et propriétés	10
1.1.2 Sélection des aptamères	12
1.1.3 Applications	14
1.2 Application à la détection de petites molécules : l'adénosine comme modèle	18
1.2.1 Notions de <i>petites molécules</i>	18
1.2.2 L'adénosine et son aptamère	21
1.2.3 La détection de l'adénosine au moyen d' <i>aptasensors</i>	23
1.3 Objectifs de la thèse	25
BIBLIOGRAPHIE	27

Avant-propos

Les acides nucléiques, de la fonction génomique à la reconnaissance moléculaire

Des plus grands aux plus petits, des plus anciens aux plus récents, les *êtres vivants* regroupent l'ensemble des organismes peuplant la terre. La biodiversité, contraction de « diversité biologique », est l'expression désignant l'extraordinaire variété de ces organismes. Dans son sens le plus large, ce terme prend également en compte les relations et interactions qui unissent les êtres vivants entre eux et à leurs milieux. L'ensemble de ces composantes (diversité et interactions) forment ainsi un véritable *tissu vivant* dont chaque maillon a un rôle à jouer dans l'équilibre de la Nature. Pour autant, la biodiversité ne se limite pas à la simple liste des êtres vivants de la Terre. A la multitude des espèces dénombrées s'ajoute en effet une caractéristique plus importante encore : leur complexité ! D'un point de vue structurel et fonctionnel, la bactérie unicellulaire est à titre d'exemple moins complexe que la cellule eucaryote avec son noyau et ses multiples organites. De même, un être pluricellulaire, composé par des milliards de cellules différenciées, a un niveau de complexité supérieur à celui de l'eucaryote unicellulaire. Derrière ces niveaux de complexité se distinguent en réalité des niveaux de hiérarchie. Ainsi, le monde vivant peut être considéré comme une suite de niveaux d'organisation de complexité croissante. Le premier niveau, le plus bas, est représenté par les molécules essentielles à la vie : les acides nucléiques.

Les acides nucléiques - acide désoxyribonucléique (ADN) et acide ribonucléique (ARN) – sont des macromolécules synthétisées au sein des cellules vivantes. Ils sont formés par des unités de bases, ou monomères, de type nucléotides [1]. Supports de l'information génétique, ces molécules interagissent entre elles et, à travers plusieurs étapes, conduisent à la formation de protéines, lesquelles sont associées à des fonctions spécifiques dans les cellules.

Les nucléotides sont composés d'un groupe phosphate, un sucre (le 2-désoxyribose dans le cas de l'ADN ou le ribose dans le cas de l'ARN) et d'une base azotée (**Figure 1.1**). Au nombre de cinq, ce sont les bases azotées qui déterminent la nature du nucléotide. La séquence d'un brin d'ADN ou d'ARN peut donc se résumer à la succession des bases azotées qui la compose.

Dans le cas de l'ADN, on retrouve l'adénine (A), la cytosine (C), la guanine (G) et la thymine (T). Pour l'ARN, la thymine est remplacée par l'uracile (U). Les nucléotides sont reliés entre eux par des liaisons covalentes entre le sucre et le groupe phosphate, appelées liaisons 5'-3'phosphodiester.

Le squelette phosphodiester et bases azotées forment ainsi un brin. L'ADN est constitué, sous sa forme la plus stable, de deux brins complémentaires prenant la forme de double hélice. Ils sont maintenus solidaires grâce à la formation de paires de bases : en établissant des liaisons de faible intensité (liaisons hydrogène) l'adénine se lie exclusivement avec la thymine, tandis que la cytosine se lie avec la guanine (**Figure 1.1**).

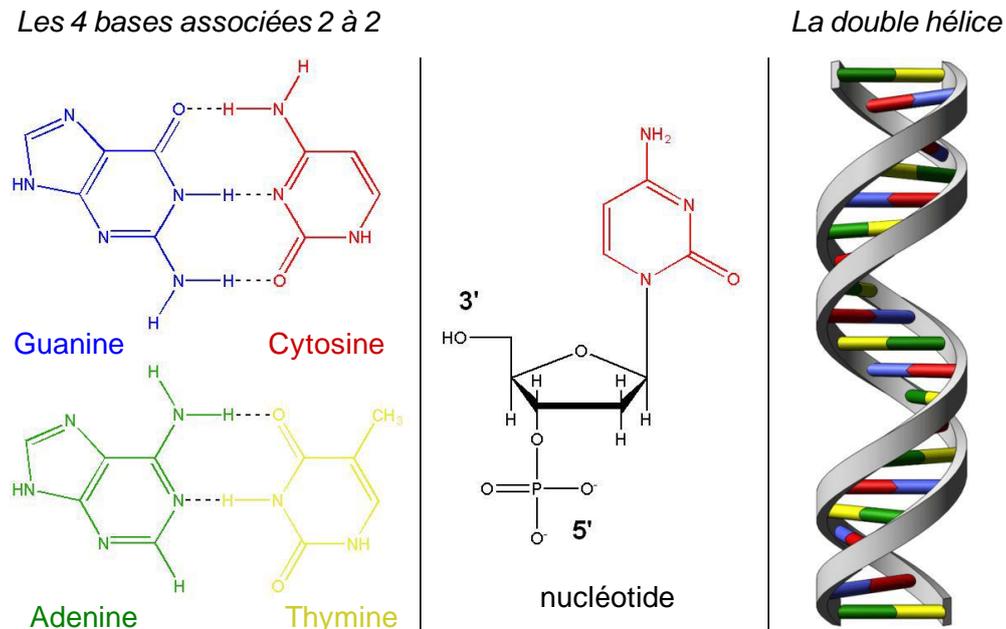


Figure 1.1 Structure de l'ADN, d'après Maillard et *al.*[2] A gauche : les bases puriques (guanine et adénine) associées aux bases pyrimidiques (respectivement cytosine et thymine) *via* des liaisons hydrogène représentées en pointillés. Au centre : exemple de nucléotide composé d'un groupement phosphate, d'un sucre désoxyribose et d'une base (ici la cytosine en rouge). A droite : Structure classique double brin en double hélice de l'ADN.

L'ARN est quant à lui considéré comme étant chimiquement moins stable que l'ADN, il est présent dans la cellule sous forme de simple brin. Cette propriété lui confère une flexibilité structurale remarquable, lui permettant d'adopter des conformations secondaires et tertiaires d'autant plus complexes, formées de zones appariées, de boucles terminales ou internes, d'hernies, etc. On lui reconnaît ainsi une très forte activité et capacité d'interaction avec les autres éléments de la cellule. Cependant, l'ADN, sous sa forme simple brin peut également adopter un repliement complexe, lui attribuant d'autres propriétés tout aussi intéressantes. Dans ce contexte, les acides nucléiques ne peuvent plus être considérés comme des agents passifs de l'information génétique, ils agissent également en tant que partenaires hautement spécifiques dans les interactions moléculaires.

Sous leur forme simple brin, ils présentent en effet une activité catalytique ou des propriétés de reconnaissance vis-à-vis d'autres classes de molécules par l'intermédiaire d'interactions électrostatiques, hydrophobes ou encore de liaisons hydrogènes [3]. Le vivant fournit déjà de nombreux exemples de structures fonctionnelles d'ARN sélectionnées par l'évolution naturelle. Cette fraction ne représente pourtant qu'une infime partie de l'ensemble des séquences possibles [4]. Si la Nature n'a pas encore exploré toute la diversité combinatoire, la biologie moléculaire permet aujourd'hui de synthétiser et sélectionner des acides nucléiques fonctionnels, possédant notamment des propriétés de reconnaissance [4, 5]. Cette nouvelle classe de molécules, appelées *aptamères*, a vu le jour dans les années 1990 [6-12] et désigne littéralement de courtes séquences oligonucléotidiques présentant une affinité spécifique pour des cibles variées.

Les aptamères possèdent des propriétés de reconnaissance moléculaires semblables à celles des anticorps. Ils présentent de plus de nombreux avantages par rapport à ces derniers ; telle qu'une stabilité thermique élevée, une tolérance à de larges gammes de pH alcalin et de concentration saline, un faible coût et une simplicité de synthèse et de marquage. A ce titre, ils sont employés dans diverses applications impliquant un phénomène de reconnaissance moléculaire, notamment comme agents thérapeutiques ou diagnostiques [13-15]. Ils sont également utilisés comme alternative aux anticorps dans de nombreuses applications analytiques [16-18], plus particulièrement dans la catégorie dans laquelle s'inscrit ce projet de thèse : celle relativement récente des biocapteurs à aptamères, ou « *aptasensors* » [19-24].

Ce chapitre présente les différents éléments conduisant aux objectifs de cette thèse. La première partie décrit la structure et les propriétés des aptamères ainsi que leur utilisation dans les dispositifs de détection de type biocapteur. La seconde partie porte sur les petites molécules, plus particulièrement la molécule modèle que nous nous proposons d'étudier : l'adénosine, et des différentes façons de la détecter au moyen de biocapteurs à aptamères. Le chapitre se conclut sur les objectifs de la thèse, dont les résultats feront l'objet des chapitres suivants.

1.1 Les aptamères comme éléments de reconnaissance

1.1.1 Caractéristiques structurales et propriétés

Définition et structure

Le mot *aptamère* est un néologisme employé pour la première fois par Ellington et Szostak en 1990 [6]. Il est formé à partir du mot latin *aptus* (apte, approprié à, ou qui se lie à, qui joint) et le suffixe *mère* (unité de base composant un polymère). Un aptamère désigne une structure d'acide nucléique monobrin relativement courte (15 à 60 bases) possédant une excellente affinité et spécificité pour des cibles variées : peptides, protéines, voire même cellules entières, bactéries ou virus [6]. Cette propriété est principalement due à leurs caractéristiques structurales particulières, impliquant des phénomènes de repliements dans l'espace. Ce repliement peut entraîner la formation de doubles hélices (ou tiges) de longueur variables via l'appariement de régions complémentaires. L'interaction par liaison hydrogène stabilise alors les deux hélices, menant à la formation d'une conformation tridimensionnelle compacte. Les déformations locales de l'hélice, en exposant certains de ces groupements, permettent de générer une plateforme d'interaction spécifique avec la cible.

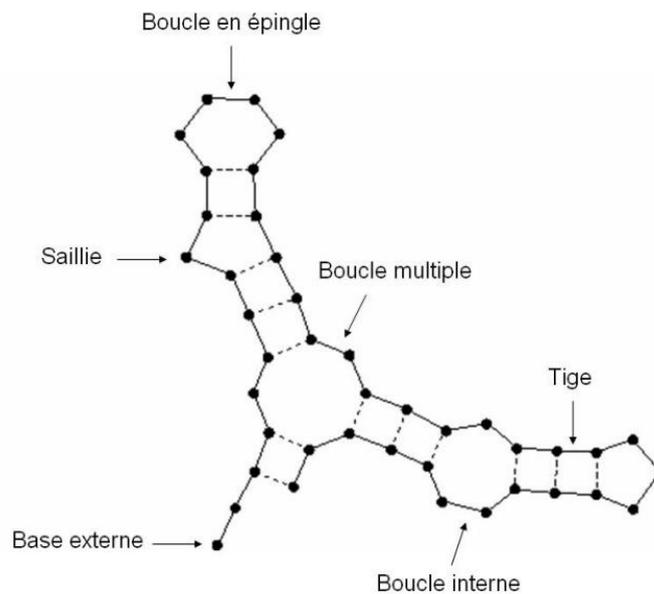


Figure 1.2 Caractéristiques structurales des acides nucléiques, adapté de Hermann et *al.* [25].

Les régions de bases non appariées donnent naissance à différents types de conformations : saillies, jonctions, boucles, pseudo-noeuds et quadruplexes appariés (**Figure 1.2**) [25].

Le repliement d'un brin sur lui-même donne lieu à une structure en épingle à cheveu, ou « tige-boucle ». Des structures compactes de type « pseudo-noeud » peuvent également se former par interaction complémentaire entre une tige-boucle et une partie de la structure simple brin. L'empilement d'hélices et le compactage de l'ensemble sont la conséquence d'interactions entre boucles.

L'interaction entre un aptamère et sa cible implique généralement un réarrangement conformationnel de la structure préexistante, voire l'adoption d'une nouvelle structure intégrant la cible [26, 27]. Les structures des complexes aptamère-cible élucidées par diffraction des rayons X ou résonance magnétique nucléaire (RMN) montrent ainsi une intégration importante de la molécule cible au sein de l'architecture oligonucléotidique, devenant alors un élément intrinsèque de la structure globale du complexe [27].

Propriétés

Du fait de leur capacité de reconnaissance moléculaire, les aptamères sont considérés comme une alternative prometteuse aux anticorps [28]. Comparés à ces derniers, ils présentent une meilleure stabilité chimique et peuvent être régénérés facilement après dénaturation. Ils sont également produits par synthèse chimique et, contrairement aux anticorps, peuvent être sélectionnés pour leur affinité contre des toxines ou des molécules non immunogènes (pas de production d'anticorps). Facilement modifiables via l'addition de groupements fonctionnels, ils reconnaissent une variété plus large de molécules cibles avec une affinité et une spécificité équivalente ou supérieure que les anticorps.

En effet, leur sélection *in vitro* permet l'obtention de molécules présentant une affinité très élevée pour la cible. Les aptamères anti-protéine sont les plus majoritairement sélectionnés à ce jour. Ils représentent près de 71 % du nombre total d'aptamères sélectionnés [29]. La constante de dissociation (K_d) du complexe aptamère-protéine se trouve généralement dans une gamme allant du nanomolaire au sub-nanomolaire (10^{-9} à 10^{-11} M).

Pour des cibles de poids moléculaire moins élevé (antibiotiques, toxines, etc.), le K_d est de l'ordre du micromolaire (10^{-6} à 10^{-7} M) [30]. Cette moindre affinité peut s'expliquer par la diminution de la surface de contact entre la cible et l'aptamère, réduisant le nombre de groupements fonctionnels disponibles pour l'interaction [26].

Enfin, les aptamères sont également connus pour leur remarquable spécificité. Ils peuvent discriminer des cibles à partir de différences structurales subtiles, comme la présence ou non de méthyle, de groupement hydroxyle ou encore la forme $-L$ ou $-D$ d'un énantiomère de la cible [26]. Cette spécificité est par ailleurs étroitement liée à l'affinité. L'obtention d'un ligand présentant une affinité suffisamment élevée garantit sa spécificité vis-à-vis de la cible [26]. Ainsi, les ligands présentant la plus grande affinité sont ceux possédant la surface de contact avec la cible la plus élevée. Par conséquent, une modification minimale de la surface de la cible peut entraîner une diminution significative de l'interaction avec l'aptamère.

1.1.2 Sélection des aptamères

L'identification et la sélection de molécules d'aptamères fait appel à un procédé d'évolution moléculaire dirigée ou SELEX (pour Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment). Développée simultanément par deux équipes en 1990 [6, 12], le principe de cette technique repose sur l'extraction de ligands potentiels à partir d'une banque d'oligonucléotides composée initialement de séquences générées aléatoirement. La coexistence, dans une même entité moléculaire, de la structure et de la séquence permet alors, par alternance d'étapes de sélection (basées sur la structure) et d'amplification (basées sur la séquence), d'isoler le composé possédant les propriétés recherchées (**Figure 1.3**). Ainsi, il s'agit d'une méthode combinatoire faisant intervenir trois étapes principales : la synthèse de banques de séquences suffisamment riches, le criblage de candidats potentiels et enfin, l'identification et purification des séquences retenues.

La première étape, cruciale, nécessite la constitution de banques d'oligonucléotides présentant une diversité moléculaire suffisante. Sachant que les séquences sont constituées d'une région aléatoire de n nucléotides (en général de 20 à 100), la diversité de la banque dépendra de la taille de cette région. La limite expérimentale de la richesse de la banque est généralement de l'ordre de 10^{13} à 10^{15} séquences différentes [31].

Cette population est ensuite soumise à une étape de criblage via une sélection basée sur l'existence d'une activité catalytique, ou le plus souvent, l'affinité pour une cible choisie. La sélection s'opère par séparation physique et peut faire intervenir diverses méthodes telles que la chromatographie, la rétention sur filtre ou encore l'électrophorèse. Les séquences sélectionnées sont alors amplifiées par PCR grâce à des amorces qui s'hybrident aux régions fixes. Une banque enrichie en candidats potentiels est donc obtenue, à partir de laquelle un nouveau cycle de sélection/amplification peut être effectué. Le taux d'enrichissement dépend des conditions de sélection, qui jouent un rôle déterminant pour l'évolution de la population. Cette succession d'étapes de sélection et d'amplification est répétée sur 10 à 15 cycles, permettant ainsi l'enrichissement progressif de la population en séquences présentant les meilleures qualités pour la fonction recherchée.

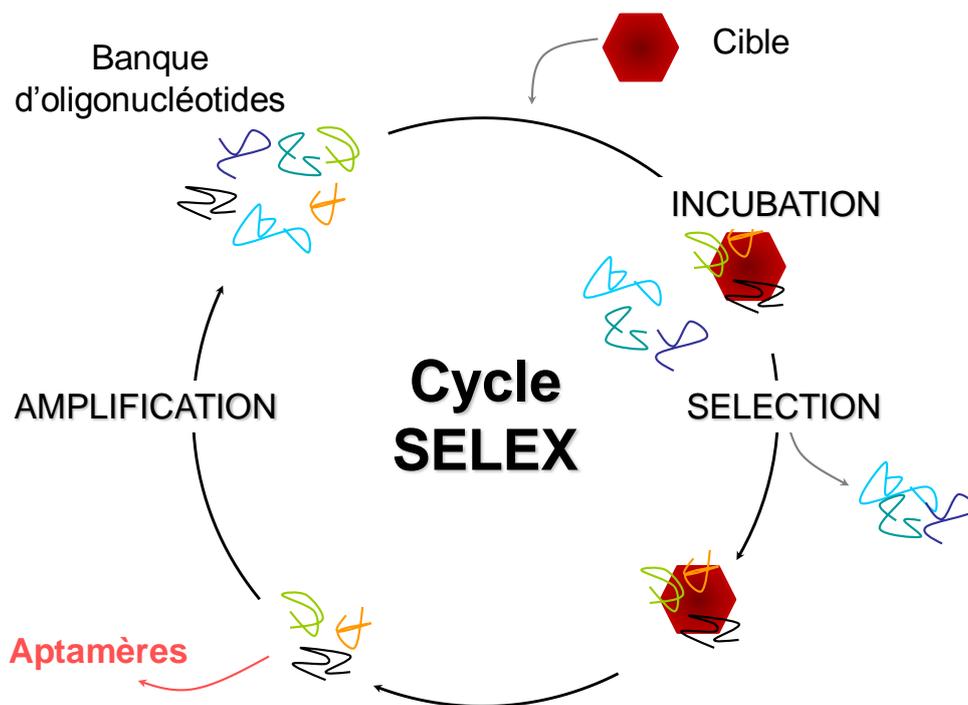


Figure 1.3 Principe de la méthode SELEX. Chaque cycle de sélection est composé d'une étape d'incubation entre la cible et la banque d'oligonucléotides, une étape de sélection des séquences ayant présenté une affinité pour la cible et une étape d'amplification des séquences sélectionnées.

Parallèlement, la diversité de la population se réduit et seules quelques dizaines ou centaines de séquences, les plus aptes à la reconnaissance, sont retenues. Les techniques classiques du génie génétique (clonage, séquençage, expression) permettent alors d'identifier et cloner ces aptamères, après une éventuelle troncation des régions fixes. L'analyse comparative de ces séquences permet enfin d'en déduire des motifs structuraux critiques pour la propriété recherchée. A noter toutefois que le résultat de cette méthode dépend fortement des paramètres de sélection, telle que la température, le temps d'incubation ou encore la concentration des séquences et de la cible. L'affinité des aptamères sélectionnés peut donc varier dans le cas de leur utilisation ultérieure dans d'autres conditions expérimentales.

1.1.3 Applications

La découverte des aptamères et de leurs propriétés a ouvert la voie à de multiples applications (**Figure 1.4**). Leur potentiel en tant que nouvel outil pour l'analyse médicale ou la thérapeutique, rivalisant ou complétant celui apporté par les anticorps, est en constante évolution. Les revues de Luzi et *al.*, [32] ainsi que Tombelli et *al.* [33] en résument les principales avancées.

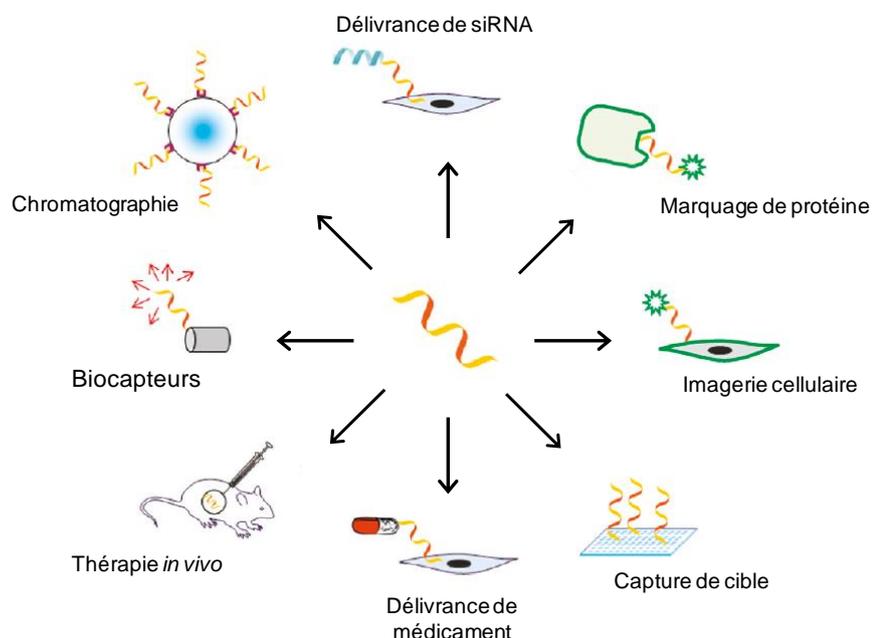


Figure 1.4 Schéma illustrant les différentes applications impliquant l'utilisation d'aptamères. D'après Iliuk et *al.* [34].

Nous nous focaliserons ici sur les applications impliquant la mise en œuvre de biocapteurs, ou *aptasensors*. Tirant profit des nombreux avantages des aptamères, ces applications utilisent ces molécules comme sondes afin de détecter des cibles spécifiques [34].

Les domaines d'applications peuvent ainsi être aussi variés que l'analyse de l'environnement, la détection d'agents pathogènes dans le cadre d'attaques bioterroristes ou encore le diagnostic médical [18, 33, 34].

Pour rappel, un biocapteur peut être défini comme un dispositif permettant la détection d'un analyte d'intérêt (cible) via une réaction d'interaction avec un élément de reconnaissance (sonde) [32]. La sonde est associée à un transducteur : l'élément de reconnaissance moléculaire réagit spécifiquement avec l'analyte, tandis que le transducteur (optique, électrochimique, acoustique) convertit le phénomène de reconnaissance moléculaire en un signal (lumineux, électrique, fréquence) permettant une mesure quantitative ou semi-quantitative (**Figure 1.5**).

Ces deux éléments sont généralement intégrés dans un dispositif, petit et portable, permettant de doser l'analyte d'intérêt sans ajout d'autres réactifs ni prétraitement de l'échantillon.

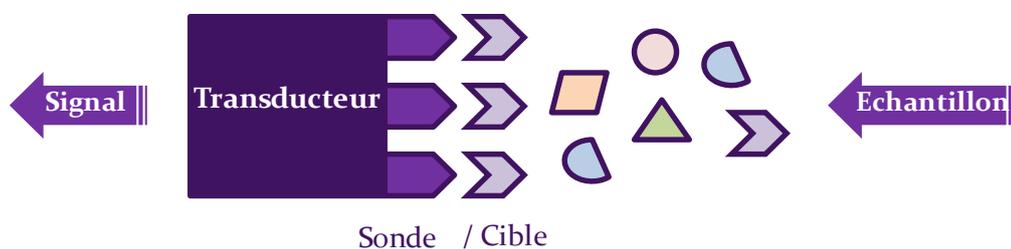


Figure 1.5 Schéma de principe d'un biocapteur.

Diverses molécules biologiques ont été utilisées comme élément de reconnaissance : enzymes, antigènes, anticorps, cellules [32]. Du fait de leurs propriétés d'affinité et de spécificité, les aptamères peuvent également être employés comme éléments de reconnaissance moléculaire pour l'élaboration de biocapteurs (*aptasensors*). Par rapport aux biocapteurs utilisant des anticorps (immunocapteurs), les *aptasensors* présentent de nombreux avantages : leur petite taille permet une immobilisation efficace et la formation de monocouches de densité élevée, paramètres d'importance non négligeable lors de l'élaboration de biocapteurs [24, 35].

De plus, ils peuvent être facilement marqués sans modification de leurs propriétés [35]. Enfin, les aptamères peuvent être soumis à de nombreux cycles de dénaturation et de régénération sans perte d'efficacité [35], permettant d'obtenir des biocapteurs réutilisables.

Parmi les variétés de biocapteurs, il convient de distinguer le cas particulier du format des biopuces. Une biopuce correspond à l'assemblage de plusieurs éléments de reconnaissance différents, organisés sur une même surface microstructurée. Ceci permet de paralléliser, automatiser et miniaturiser la détection des réactions d'intérêt.

La classification des *aptasensors* peut prendre en compte différents paramètres. Nous choisissons une classification basée sur les implications du changement conformationnel des aptamères lors de l'interaction avec leur cible (**Figure 1.6**). A ce jour, il est possible de dénombrer plus de mille publications sur le sujet. Les revues de Zhou et *al.* [20] ; Tombelli et *al.* [33] ; Willner et *al.* [36] ainsi que Iliuk et *al.* [34] présentent le détail de ces études. Nous nous restreindrons ici aux catégories suivantes :

- **Détection par interaction directe**

Dans ce cas, l'interaction de la cible avec l'aptamère immobilisé provoque une augmentation de la masse ou de l'indice de réfraction au niveau de l'interface. Cette variation est mesurable par des techniques de transduction spécifiques [37, 38]. Cette catégorie implique également l'utilisation de nanoparticules d'or conjugués à des séquences d'aptamères. La présence de la cible dans la solution induit la précipitation des nanoparticules, provoquant alors un changement de coloration de la solution [39].

- **Détection par effet de repliement**

Le changement conformationnel des aptamères peut être ici exploité pour perturber l'environnement local d'un fluorophore initialement couplé à l'aptamère. Dans cette stratégie, les extrémités de l'aptamères sont marquées par un fluorophore et un inhibiteur de fluorescence (*quencher*). L'émission du fluorophore est alors dépendante de la distance inter-extrémités, celle-ci étant à son tour influencée par la présence de la cible et de son interaction avec l'aptamère. Cette méthode a par exemple servi à la détection d'adénosine [40] et de protéines [41].

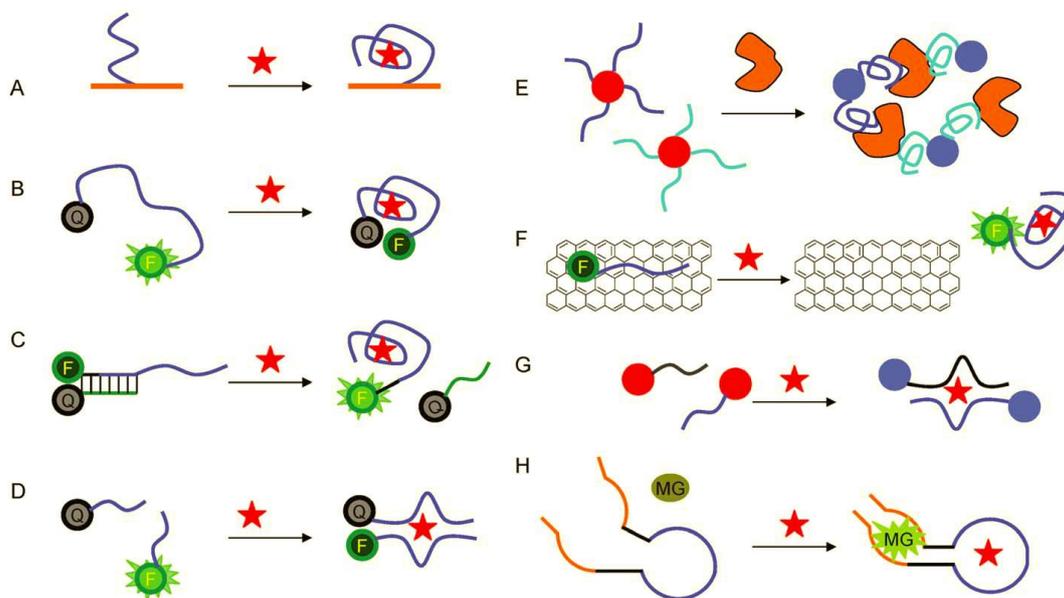


Figure 1.6 Différentes stratégies utilisées pour la détection de l'interaction aptamère-cible au moyen d'*aptasensors*, d'après Zhou et al. [20]. **(A)** Détection directe basée sur la variation de masse ou d'indice de réfraction à l'interface du biocapteur suite à la liaison de la cible avec l'aptamère immobilisé. **(B)** Détection par effet de repliement impliquant le principe FRET. **(C)** Détection basée sur le principe des balises moléculaires. **(D)** Assemblage de séquences d'aptamères clivées ou *split aptamers*, induit par la présence de la cible en solution. **(E)** Détection par agrégation des nanoparticules d'or et changement de coloration. **(F)** L'utilisation du graphène oxide (GO) pour une détection basée sur la désorption de l'aptamère en présence de la cible. **(G)** Assemblage de nanoparticules d'or suite à l'interaction des séquences *Split aptamers* en présence de la cible. **(H)** Séquences *Fused aptamers* utilisées pour une détection de cible basée sur la génération d'un signal induit par la fixation d'un composé, ici Makachite Green (MG).

Une stratégie similaire repose sur le concept de balise moléculaire (*molecular beacon*) [40]. Les balises moléculaires sont des sondes oligonucléotidiques permettant de détecter la présence d'acides nucléiques spécifiques en solution via un changement conformationnel qui se traduit par une modification de leurs propriétés de fluorescence. Ces oligonucléotides sont constitués d'une séquence complémentaire de la cible (sonde) encadrée par deux séquences complémentaires entre elles ainsi que d'un fluorophore et d'un *quencher* attachés de façon covalente à chaque extrémité. En l'absence de la cible, la balise adopte une structure spécifique du fait de l'hybridation de ses extrémités complémentaires ; le fluorophore et le *quencher* sont alors à proximité, ce qui empêche l'émission de fluorescence par transfert d'énergie vers l'inhibiteur (Principe du FRET pour Fluorescence Resonance Energy Transfer).

En présence de la cible, la sonde interagit avec celle-ci pour former un complexe plus stable que la structure initiale. Le changement de conformation résultant éloigne le fluorophore et le *quencher*, permettant l'émission de fluorescence par le fluorophore.

▪ Détection par modification de la séquence

Cette stratégie implique une modification de la séquence de l'aptamère, soit par clivage (*Split aptamer*), soit par addition d'une séquence complémentaire (*Fused aptamer*). Dans le cas des *Split aptamers*, les séquences ainsi clivées ne peuvent interagir qu'en présence de la cible et reprendre une structure proche de leur conformation originelle. Si les séquences sont conjuguées à des nanoparticules d'or, leur interaction en présence de la cible provoquera l'agrégation des nanoparticules et un changement visible de la coloration de la solution [41]. A l'opposé, les *Fused aptamer* impliquent la fusion d'un aptamère (pour la reconnaissance) avec un module aptamère différent (pour la génération du signal) [42].

1.2 Application à la détection de petites molécules : L'adénosine comme modèle

1.2.1 Notion de petites molécules

Le terme *petite molécule*, dans son sens le plus large, fait référence à des composés de faible poids moléculaire, défini par opposition aux macromolécules (acides nucléiques, protéines, polysaccharides) dont la taille est en général 200 à 300 fois plus élevée. Cette notion demeure néanmoins ambiguë car la détermination de la limite supérieure, en termes de poids moléculaire, ne fait toujours pas consensus dans la littérature. Nous retrouvons ainsi des études évoquant des limites allant de 0,5 à 2 kDa [18, 29, 41, 43-53]. En pharmacologie, ce terme est restreint aux molécules possédant une forte affinité et capacité d'interaction avec les macromolécules. Leur poids moléculaire est alors limité à 0,5 kDa [54, 55]. Il correspond à la borne en dessous de laquelle les molécules peuvent diffuser à travers la membrane cellulaire [53-55]. Parmi les grandes catégories auxquelles appartiennent les petites molécules, il est possible de citer : les acides aminés, les carbohydrates, les ions inorganiques, les nucléotides et dérivés, les stéroïdes, les cofacteurs, les toxines, etc.

Du fait de leur propriété de diffusion à travers les membranes biologiques [53], les petites molécules se retrouvent impliquées dans diverses fonctions physiologiques.

Leur rôle peut donc s'avérer nocif comme dans le cas des toxines et des cancérigènes, ou bénéfique comme dans le cas des médicaments et des nutriments. Au sein des cellules, les petites molécules organiques servent en tant qu'agent de signalisation, de défense immunitaire ou encore de pigments [53, 56, 57]. En biologie moléculaire et en thérapeutique, elles sont utilisées sous forme d'antibiotiques ou médicaments. Il peut s'agir de composés naturels, tels que les métabolites secondaires, ou de composés synthétiques, tels que les molécules antivirales [53]. Leur application s'étend également au domaine environnemental, notamment en agriculture où elles sont utilisées comme pesticides [58].

La majorité des analyses dans le domaine biomédical, alimentaire, environnemental ou encore sécuritaire (défense nationale) impliquent la détection de molécules au poids moléculaire inférieur à 1 kDa [51]. Le développement de techniques de détection de petites molécules, on peut aisément le deviner, est donc d'un intérêt certain. Les autorités gouvernementales et réglementaires exigent par ailleurs l'utilisation de méthodes de détection simples, sensibles et intégrées dans des dispositifs portatifs dans le but de réaliser des analyses sur le terrain. Les méthodes de détection traditionnelles (chromatographies et spectroscopies de masse) s'avèrent peu adaptés pour ce type d'application [59]. Elles nécessitent en effet des temps de préparation d'échantillons relativement longs, une importante mobilisation de personnel - de préférence hautement qualifié - ainsi qu'une détection post-analyse et non en temps-réel.

Le format biocapteur, avec sa taille réduite et sa facilité de mise en œuvre offre une solution prometteuse pour ce type d'application. Historiquement, ce sont les enzymes et les anticorps qui ont été utilisés en premier en tant qu'éléments de reconnaissance pour la détection de petites molécules via un dispositif biocapteur [51, 60]. Pourtant, les aptamères se sont vite imposés comme une alternative sérieuse.

Les petites molécules et les aptamères

Bien qu'ils ne représentent que 17 % [29] de l'ensemble des aptamères sélectionnés à ce jour, les aptamères ciblant les petites molécules sont parmi les plus étudiés dans la littérature [29]. A titre d'exemple, en termes de nombre de publications produites sur les *aptasensors*, l'aptamère anti-ATP est classé second derrière celui de l'aptamère ciblant la protéine thrombine. Les aptamères anti-cocaïne et théophylline sont quant à eux classés cinquième et septième, respectivement.

Du fait de leur haute affinité et sélectivité, ils sont même considérés comme des éléments de reconnaissance *idéaux* pour la détection de petites molécules [28, 61]. La plus petite molécule organique cible utilisée pour la sélection d'aptamères est l'éthanolamine, une molécule formée de deux atomes de carbone liant deux groupements fonctionnels, hydroxyl et amine [62]. Cet aptamère a pu être sélectionné à partir d'une méthode dite FluMag-SELEX, basée sur marquage fluorescent de l'ADN et l'immobilisation de la molécule cible sur des billes magnétiques. L'interaction de cet aptamère avec sa cible implique par ailleurs une affinité importante, les K_d variant de 6 à 19 nM.

Si de nombreux exemples d'aptamères sélectionnés contre les petites molécules existent dans la littérature, nous nous contenterons de citer les catégories suivantes :

- **Les aptamères sélectionnés contre les colorants organiques**

Dans le but de démontrer la validité du principe SELEX, Ellington et Szostak [6] ont choisi d'utiliser différents colorants organiques (Bleu Cibacron, Réactif Bleu, Réactif vert, etc.) comme molécules cibles, du fait de leur capacité à mimer les cofacteurs métaboliques. Ils ont ainsi décrit la sélection d'aptamères en série ARN et ADN spécifiques de 6 colorants différents. Les auteurs ont également montré que la fixation était spécifique du type de séquence utilisée, la version ARN de l'aptamère ADN sélectionné ne parvenant pas à fixer la molécule cible.

- **Les aptamères sélectionnés contre les ions inorganiques**

Ciesiolka et *al.* ainsi que Hofmann et *al.* ont décrit la sélection d'aptamères, en série ARN, possédant une bonne affinité pour le Zn^{2+} [63, 64] et pour le Ni^{2+} [65] respectivement. Sélectionnés par la méthode SELEX, ces aptamères présentent des constantes de dissociation comprises entre 1 μ M et 1 mM.

- **Les aptamères sélectionnés contre des nucléotides et dérivés**

Nous retrouvons également des exemples d'aptamères sélectionnés contre des nucléotides, nucléosides et dérivés. A titre d'exemple, le premier aptamère spécifique de l'ATP a été sélectionné par Sassanfar et Szostak en 1993 [66].

Un aptamère ARN tronqué de 40 nucléotides fixant l'ATP avec un K_d de $0,7 \mu\text{M}$ a ainsi été sélectionné. Huizenga et Szostak [67] ont par la suite pu obtenir un aptamère en série ADN fixant également l'ATP.

▪ Les aptamères sélectionnés contre des cofacteurs

Lauhon et Szostak [68] ont, par exemple, décrit la sélection d'aptamères ARN fixant les cofacteurs flavine et nicotinamide. Il a ainsi pu être démontré, pour la première fois, que des aptamères ADN et ARN de séquences identiques possédaient la capacité de fixer la même molécule cible (ici la flavine), avec néanmoins une affinité plus faible pour la série ADN. Concernant la sélection pour les nicotinamides, les résultats obtenus ont révélé que les aptamères ARN sélectionnés étaient capables de discriminer entre les deux états de réduction de la molécule nicotinamide adénine dinucléotide (NAD).

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés à une petite molécule en particulier, l'adénosine.

1.2.2 L'adénosine et son aptamère

L'adénosine (9- β -D-ribofuranosyl-6-aminopurine) est un nucléoside purique formé d'une base adénine attachée à un noyau ribose via une liaison β -glycosidique (**Figure 1.7**). Présente dans toutes les cellules de l'organisme, elle est synthétisée de façon continue aussi bien dans le milieu intracellulaire qu'extracellulaire.

La production et le relargage de l'adénosine sont habituellement augmentés lorsque les conditions environnementales deviennent hostiles. En effet, si l'on considère des conditions physiologiques normales, la concentration intracellulaire en adénosine est sous contrôle enzymatique et reste faible ($\sim 200 \text{ nM}$) [69, 70]. En cas de stress cellulaire, la synthèse se fait essentiellement par dégradation de l'adénosine tri-phosphate (ATP) et la concentration en adénosine extracellulaire augmente, pouvant atteindre jusqu'à 100 fois les valeurs initiales [69, 70]. De plus, quand la concentration intracellulaire en ATP s'effondre, suite à l'utilisation excessive d'énergie, celle en adénosine croît considérablement. Cette adénosine est ensuite transportée dans l'espace extracellulaire via divers transporteurs [69].

Ainsi, en cas de stress métabolique, il existe une augmentation des concentrations en adénosine extracellulaire, constituant ainsi un marqueur sensible d'un état physiopathologique spécifique [71].

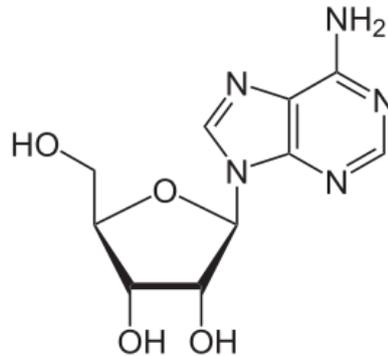


Figure 1.7 Structure chimique d'une molécule d'adénosine

L'adénosine est impliquée dans une multitude de systèmes physiologiques incluant les systèmes nerveux, cardiovasculaire, gastro-intestinal, urogénital, respiratoire et lymphatique. Ses effets biologiques affectent donc plusieurs organes vitaux. Au niveau du système respiratoire, l'adénosine régule la contraction du muscle lisse bronchique, augmente la sécrétion de mucus et module l'activité d'un grand nombre de cellules immuno-inflammatoires associées avec certaines maladies pulmonaires inflammatoires [70, 72, 73]. D'autres effets biologiques importants se manifestent au niveau des vaisseaux (vasodilatation et vasoconstriction), des plaquettes (effet antiagrégant), du rein (inhibition de la libération de rénine), du cœur et du système nerveux autonome (réduction de l'activité des neurones sympathiques et parasympathiques). Dans le système nerveux central, l'adénosine induit un effet analgésique, anti-convulsant, neuroprotecteur, anxiolytique et inhibe l'activité motrice [70, 72, 73].

A ce titre, le développement de systèmes de détection de l'adénosine pourrait donc être utile au domaine biomédical, notamment à travers un dispositif de type *aptasensor*. L'adénosine constitue par ailleurs la molécule modèle par excellence dans le cadre de développement d'*aptasensors* ou l'étude fondamentale de l'interaction petite molécule/cible, faisant ainsi l'objet d'un très grand nombre de publications [29].

L'aptamère anti-adénosine a été sélectionné par Huizenga et Szostak [67] à partir d'une banque oligonucléotidique contenant 2×10^{14} molécules d'ADN simples brins.

La structure minimale fonctionnelle de cet aptamère est composée de 27 nucléotides. D'un point de vue structural, il est formé par deux tiges séparées par deux plateaux de guanine (*quartet*), constituant ainsi une poche pour l'interaction avec l'adénosine (**Figure 1.8**). La liaison de l'aptamère fait intervenir aussi bien la base que le sucre composant l'adénosine, au moyen notamment d'interactions électrostatiques [67]. La constante de dissociation du complexe a été estimée à $6 \pm 3 \mu\text{M}$ [67, 74]. Par ailleurs, tel que mentionné précédemment, un premier aptamère de série ARN, sélectionné pour l'ATP, s'est également révélé en mesure d'interagir, avec une moindre affinité et spécificité, avec l'adénosine.

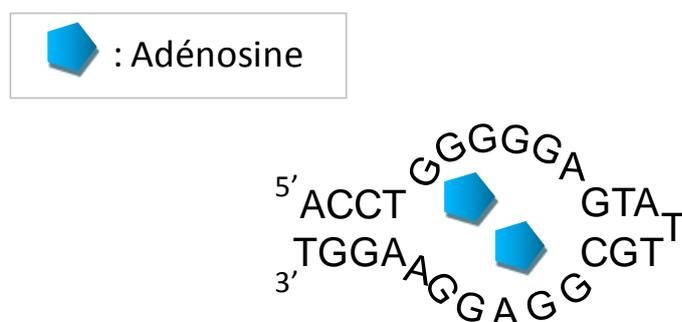


Figure 1.8 Représentation schématique de la séquence originelle de l'aptamère anti-adénosine tel que sélectionné par Huizenga et Szostak [67]. Constitué de 27 nucléotides, l'aptamère adopte un repliement en épingle à cheveux et interagit avec l'adénosine au niveau d'une zone riche en *quartet* de G.

1.2.3 La détection d'adénosine au moyen d'*aptasensors*

De nombreuses stratégies ont été développées pour détecter la présence d'adénosine au moyen d'un biocapteur impliquant l'utilisation d'aptamères. A titre d'exemple, on peut citer celles basées sur la fluorescence [75], l'électrochimie [76] ou encore la colorimétrie [77]. Ces stratégies ont en commun l'exploitation du changement conformationnel de l'aptamère ainsi que l'utilisation d'un marqueur ou de nanoparticules d'or. Les limites de détection atteintes sont généralement dans la gamme micro et nanomolaire [29].

Un autre exemple qui mérite d'être développé est celui représentant l'une des premières applications pratiques pour la détection d'adénosine. Il fait intervenir un dispositif de type bandelette-test [78] (**Figure 1.9**).

Des agrégats de nanoparticules biotinyllées et fonctionnalisées par des aptamères sont déposés sur une bandelette qui est ensuite séchée. L'immersion de l'extrémité de la bandelette dans une solution échantillon entraîne alors la réhydratation des agrégats. En l'absence de la cible, les agrégats ne peuvent migrer du fait de leur trop grande taille. En revanche, l'ajout de la cible entraîne la redispersion des nanoparticules, qui peuvent alors migrer à travers une membrane puis être capturées sur une fine ligne de streptavidine, entraînant l'apparition d'une coloration rouge.

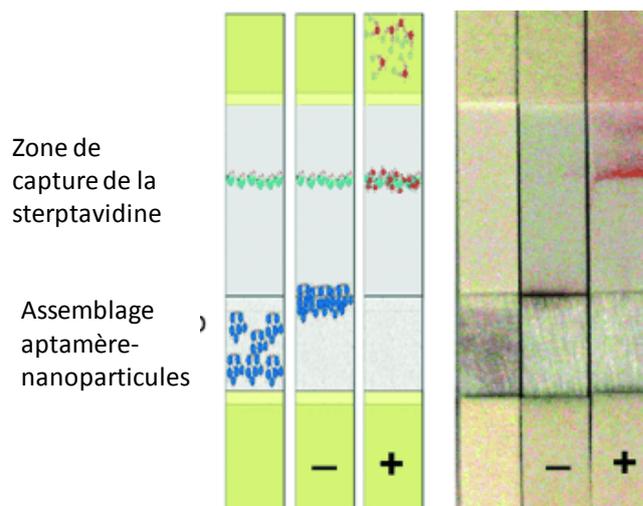


Figure 1.9 Détection d'adénosine à partir d'un test de type bandelette, d'après Liu et *al.* [78].

Parmi les autres stratégies développées, la détection optique de type résonance de plasmon de surface (SPR) a gagné une attention croissante ces dernières années [47, 79]. Elle est basée sur un principe de variation de l'indice de réfraction d'une surface sélective lors de l'interaction sonde/cible (Voir Chapitre 2). La SPR est pourtant connue comme étant limitée à la détection de molécules d'un poids moléculaire supérieur à 2 kDa [52, 80] (hors gamme petites molécules). La fixation des petites molécules, du fait de leur faible poids moléculaire, n'est pas en mesure d'entraîner une variation d'indice de réfraction significative.

Dans ce contexte, l'utilisation de la SPR comme technique de détection de petites molécules constitue un défi en soi.

Motivés par les avantages uniques qu'offre cette technique (fonctionnement en temps réel, absence de marquage, bonne sensibilité, mode d'opération non destructif, multiplexage), les scientifiques ont rivalisé d'imagination pour élaborer des stratégies visant à améliorer ses performances de détection pour les petites molécules (Voir Chapitre 3). Dans le cas de l'adénosine, la plus faible limite atteinte aujourd'hui est de l'ordre du picomolaire [81], valeur d'autant plus remarquable si l'on tient compte de son K_d (6 μM). Souhaitant participer à cette émulation scientifique, nous avons choisi de relever le défi en choisissant d'utiliser la SPR comme technique de détection de petites molécules au moyen d'un *aptasensor*.

1.3 Objectifs de la thèse

Nous nous proposons de développer un dispositif de type biocapteur à aptamères en vue d'une détection de petites molécules au moyen de la technique de résonance des plasmons de surface (SPR). Pour cela, notre modèle d'étude est l'adénosine, molécule de signalisation par excellence pour laquelle un intérêt existe dans le domaine biomédical. Les variations de ses concentrations physiologiques représentent en effet un marqueur d'états physiopathologiques spécifiques. Un aptamère anti-adénosine a par ailleurs été sélectionné dans les années 1996 et a fait l'objet de nombreuses applications de détection, notamment via des dispositifs de type biocapteurs (*aptasensors*).

Dans un premier temps, l'élaboration de la biopuce a exigé le recours à l'utilisation d'autres types d'aptamères, sélectionnés cette fois-ci contre la protéine thrombine pour laquelle une détection directe par SPR est possible. Notre attention sera focalisée sur l'utilisation de différents traitements de surface dans le but de réduire le taux de signal non spécifique et d'augmenter le rendement d'interaction sonde/cible. Une fois le protocole validé, la biopuce pourra alors être utilisée comme plateforme d'étude pour la détection d'adénosine.

Une première stratégie mettant en œuvre l'utilisation de nanoparticules d'or (AuNPs) et de séquences d'aptamères clivées (*Split aptamers*) a été imaginée en vue d'augmenter les performances de détection de petites molécules par SPR, reconnues dans la littérature comme étant limitées.

Une attention particulière sera préalablement apportée au protocole de fonctionnalisation des AuNPs en vue de concilier l'obtention d'un grand facteur d'amplification avec la réduction du signal non spécifique suite au phénomène d'interaction. En utilisant des séquences *Split aptamers* comportant un nombre de bases complémentaires différent (4 et 8), il sera possible d'étudier l'influence de ce paramètre sur la qualité de l'interaction de l'adénosine avec les sondes, notamment en termes de limite de détection et de stabilité thermodynamique.

En nous basant justement sur la stabilité thermodynamique mise en jeu lors de l'interaction des *Split aptamers* avec l'adénosine, une nouvelle stratégie de détection sera utilisée. Dans ce cas, le dispositif SPR est couplé à un système de régulation de température, permettant ainsi d'assurer la dissociation des complexes et d'établir des profils de dénaturation caractéristiques. Cela devrait permettre de différencier les profils impliquant ou non la présence de la cible dans la solution. Il sera par ailleurs possible d'envisager une caractérisation quantitative du phénomène d'interaction, notamment à travers l'extraction des paramètres thermodynamiques.

Ces différents aspects du projet permettront d'explorer les potentialités d'une plateforme de détection composée d'aptamères couplée à une détection SPRi pour la caractérisation multiplexée des interactions impliquant les petites molécules.

BIBLIOGRAPHIE

1. Lewin, B., *Genes IV*. 1990: USA, Oxford University Press.
2. Maillart, E., Développement d'un système optique d'imagerie en résonance de plasmons de surface pour l'analyse simultanée de multiples interactions biomoléculaires en temps réel. Paris, Paris-Sud XI Orsay, 2004. **288**.
3. Chauveau, F., C. Pestourie, and B. Tavitian, Les aptamères ou l'évolution moléculaire dirigée : sélection et applications. *Pathologie Biologie*, 2006. **54**(4): p. 251-258.
4. Toulmé, J.-J. and R. Giegé, Les aptamères : des ligands et des catalyseurs oligonucléotidiques obtenus par sélection in vitro. *Médecine/sciences (Paris)*, 1998. **14**(2): p. 155-66.
5. Taouji, S., et al., Advances in binder identification and characterisation: the case of oligonucleotide aptamers. *New Biotechnology*, 2012. **29**(5): p. 550-554.
6. Ellington, A.D. and J.W. Szostak, In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, 1990. **346**(6287): p. 818-822.
7. Robertson, D.L. and G.F. Joyce, Selection in vitro of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA. *Nature*, 1990. **344**(6265): p. 467-468.
8. Blackwell, T.K., et al., Sequence-specific DNA binding by the c-Myc protein. *Science*, 1990. **250**(4984): p. 1149-1151.
9. Thiesen, H.-j.r. and C. Bach, Target Detection Assay (TDA): a versatile procedure to determine DNA binding sites as demonstrated on SP1 protein. *Nucleic Acids Research*, 1990. **18**(11): p. 3203-3209.
10. Laibinis, P.E., et al., Comparison of the structures and wetting properties of self-assembled monolayers of n-alkanethiols on the coinage metal surfaces, copper, silver, and gold. *Journal of the American Chemical Society*, 1991. **113**(19): p. 7152-7167.
11. Irvine, D., C. Tuerk, and L. Gold, Systematic evolution of ligands by exponential enrichment with integrated optimization by non-linear analysis. *Journal of Molecular Biology*, 1991. **222**(3): p. 739-761.
12. Tuerk, C. and L. Gold, Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, 1990. **249**(4968): p. 505-510.
13. Mosing, R.K. and M.T. Bowser, Microfluidic selection and applications of aptamers. *Journal of Separation Science*, 2007. **30**(10): p. 1420-1426.
14. Famulok, M., J.S. Hartig, and G. Mayer, Functional Aptamers and Aptazymes in Biotechnology, Diagnostics, and Therapy. *Chemical Reviews*, 2007. **107**(9): p. 3715-3743.
15. Ravelet, C., C. Grosset, and E. Peyrin, Liquid chromatography, electrochromatography and capillary electrophoresis applications of DNA and RNA aptamers. *Journal of Chromatography A*, 2006. **1117**(1): p. 1-10.
16. Drolet, D.W., L. Moon-McDermott, and T.S. Romig, An enzyme-linked oligonucleotide assay. *Nat Biotech*, 1996. **14**(8): p. 1021-1025.
17. Baldrich, E., et al., Displacement Enzyme Linked Aptamer Assay. *Analytical Chemistry*, 2005. **77**(15): p. 4774-4784.
18. Tombelli, S., M. Minunni, and M. Mascini, Aptamers-based assays for diagnostics, environmental and food analysis. *Biomolecular Engineering*, 2007. **24**(2): p. 191-200.
19. Shiping, S., et al., Aptamer-based biosensors. *Trends in Analytical Chemistry*, 2008. **27**(2): p. 108-117.
20. Zhou, W., et al., Aptamer-based biosensors for biomedical diagnostics. *Analyst*, 2014. **139**(11): p. 2627-2640.

21. Potyrailo, R.A., et al., Adapting Selected Nucleic Acid Ligands (Aptamers) to Biosensors. *Analytical Chemistry*, 1998. **70**(16): p. 3419-3425.
22. McCauley, T.G., N. Hamaguchi, and M. Stanton, Aptamer-based biosensor arrays for detection and quantification of biological macromolecules. *Analytical Biochemistry*, 2003. **319**(2): p. 244-250.
23. Cheng, A.K.H., B. Ge, and H.-Z. Yu, Aptamer-Based Biosensors for Label-Free Voltammetric Detection of Lysozyme. *Analytical Chemistry*, 2007. **79**(14): p. 5158-5164.
24. O'Sullivan, C., Aptasensors - the future of biosensing? *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2002. **372**(1): p. 44-48.
25. Hermann, T. and D.J. Patel, Stitching together RNA tertiary architectures. *Journal of Molecular Biology*, 1999. **294**(4): p. 829-849.
26. Eaton, B.E., L. Gold, and D.A. Zichi, Let's get specific: the relationship between specificity and affinity. *Chemistry & Biology*, 1995. **2**(10): p. 633-638.
27. Patel, D.J., et al., Structure, recognition and adaptive binding in RNA aptamer complexes. *Journal of Molecular Biology*, 1997. **272**(5): p. 645-664.
28. Jayasena, S.D., Aptamers: An Emerging Class of Molecules That Rival Antibodies in Diagnostics. *Clinical Chemistry*, 1999. **45**(9): p. 1628-1650.
29. McKeague, M. and M.C. DeRosa, Challenges and Opportunities for Small Molecule Aptamer Development. *Journal of Nucleic Acids*, 2012. **2012**: p. 20.
30. Gold, L., et al., Diversity of Oligonucleotide Functions. *Annual Review of Biochemistry*, 1995. **64**(1): p. 763-797.
31. Toulmé, J.-J., et al., Les aptamères : du concept à l'outil. *Médecine Nucléaire*, 2007. **31**(9): p. 478-484.
32. Luzi, E., et al., New trends in affinity sensing: aptamers for ligand binding. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2003. **22**(11): p. 810-818.
33. Tombelli, S., M. Minunni, and M. Mascini, Analytical applications of aptamers. *Biosensors and Bioelectronics*, 2005. **20**(12): p. 2424-2434.
34. Iliuk, A.B., L. Hu, and W.A. Tao, Aptamer in Bioanalytical Applications. *Analytical Chemistry*, 2011. **83**(12): p. 4440-4452.
35. Mairal, T., et al., Aptamers: molecular tools for analytical applications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2008. **390**(4): p. 989-1007.
36. Willner, I. and M. Zayats, Electronic Aptamer-Based Sensors. *Angewandte Chemie International Edition*, 2007. **46**(34): p. 6408-6418.
37. Li, Y., H.J. Lee, and R.M. Corn, Detection of Protein Biomarkers Using RNA Aptamer Microarrays and Enzymatically Amplified Surface Plasmon Resonance Imaging. *Analytical Chemistry*, 2007. **79**(3): p. 1082-1088.
38. Savran, C.A., et al., Micromechanical Detection of Proteins Using Aptamer-Based Receptor Molecules. *Analytical Chemistry*, 2004. **76**(11): p. 3194-3198.
39. Pavlov, V., et al., Aptamer-Functionalized Au Nanoparticles for the Amplified Optical Detection of Thrombin. *Journal of the American Chemical Society*, 2004. **126**(38): p. 11768-11769.
40. Xiao, Y., et al., A Reagentless Signal-On Architecture for Electronic, Aptamer-Based Sensors via Target-Induced Strand Displacement. *Journal of the American Chemical Society*, 2005. **127**(51): p. 17990-17991.
41. Li, F., et al., Adenosine detection by using gold nanoparticles and designed aptamer sequences. *Analyst*, 2009. **134**(7): p. 1355-1360.
42. Stojanovic, M.N. and D.M. Kolpashchikov, Modular Aptameric Sensors. *Journal of the American Chemical Society*, 2004. **126**(30): p. 9266-9270.

43. Guieu, V., et al., Aptamer enzymatic cleavage protection assay for the gold nanoparticle-based colorimetric sensing of small molecules. *Analytica Chimica Acta*, 2011. **706**(2): p. 349-353.
44. Wang, J. and H.S. Zhou, Aptamer-Based Au Nanoparticles-Enhanced Surface Plasmon Resonance Detection of Small Molecules. *Analytical Chemistry*, 2008. **80**(18): p. 7174-7178.
45. Wang, J., A. Munir, and H.S. Zhou, Au NPs-aptamer conjugates as a powerful competitive reagent for ultrasensitive detection of small molecules by surface plasmon resonance spectroscopy. *Talanta*, 2009. **79**(1): p. 72-76.
46. Chang, A.L., et al., Kinetic and Equilibrium Binding Characterization of Aptamers to Small Molecules using a Label-Free, Sensitive, and Scalable Platform. *Analytical Chemistry*, 2014. **86**(7): p. 3273-3278.
47. Feng, C., S. Dai, and L. Wang, Optical aptasensors for quantitative detection of small biomolecules: A review. *Biosensors and Bioelectronics*, 2014. **59**(0): p. 64-74.
48. Shankaran, D.R., K.V. Gobi, and N. Miura, Recent advancements in surface plasmon resonance immunosensors for detection of small molecules of biomedical, food and environmental interest. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2007. **121**(1): p. 158-177.
49. Shen, J., et al., Recent Development of Sandwich Assay Based on the Nanobiotechnologies for Proteins, Nucleic Acids, Small Molecules, and Ions. *Chemical Reviews*, 2014.
50. Wu, Z.-S., et al., Reusable Electrochemical Sensing Platform for Highly Sensitive Detection of Small Molecules Based on Structure-Switching Signaling Aptamers. *Analytical Chemistry*, 2007. **79**(7): p. 2933-2939.
51. Mitchell, J., Small Molecule Immunosensing Using Surface Plasmon Resonance. *Sensors*, 2010. **10**(8): p. 7323-7346.
52. John, S.M. and W. Yinqui, Surface Plasmon Resonance Biosensors for Highly Sensitive Detection of Small Biomolecules. *Biosensors*. 2010.
53. Cho, M.J. and R. Juliano, Macromolecular versus smallmolecule therapeutics: drug discovery, development and clinical considerations. *Trends in Biotechnology*, 1996. **14**(5): p. 153-158.
54. Leeson, P.D. and B. Springthorpe, The influence of drug-like concepts on decision-making in medicinal chemistry. *Nat Rev Drug Discov*, 2007. **6**(11): p. 881-890.
55. Lipinski, C.A., Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discovery Today: Technologies*, 2004. **1**(4): p. 337-341.
56. Ashour, M.L. and M. Wink, Genus *Bupleurum*: a review of its phytochemistry, pharmacology and modes of action. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2011. **63**(3): p. 305-321.
57. Roemer, T., et al., Bugs, drugs and chemical genomics. *Nat Chem Biol*, 2012. **8**(1): p. 46-56.
58. Walsh, T.A., The emerging field of chemical genetics: potential applications for pesticide discovery. *Pest Management Science*, 2007. **63**(12): p. 1165-1171.
59. Smyth, W.F. and P. Brooks, A critical evaluation of high performance liquid chromatography-electrospray ionisation-mass spectrometry and capillary electrophoresis- electrospray-mass spectrometry for the detection and determination of small molecules of significance in clinical and forensic science. *ELECTROPHORESIS*, 2004. **25**(10-11): p. 1413-1446.
60. Killard, A.J., et al., Antibodies: production, functions and applications in biosensors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 1995. **14**(6): p. 257-266.
61. Famulok, M., Oligonucleotide aptamers that recognize small molecules. *Current Opinion in Structural Biology*, 1999. **9**(3): p. 324-329.

62. Mann, D., et al., In vitro selection of DNA aptamers binding ethanolamine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005. **338**(4): p. 1928-1934.
63. Ciesiolka, J., J. Gorski, and M. Yarus, Selection of an RNA domain that binds Zn²⁺. *RNA* (New York, N.Y.), 1995. **1**(5): p. 538-550.
64. Ciesiolka, J. and M. Yarus, Small RNA-divalent domains. *RNA*, 1996. **2**(8): p. 785-793.
65. Hofmann, H.P., et al., Ni²⁺-binding RNA motifs with an asymmetric purine-rich internal loop and a G-A base pair. *RNA*, 1997. **3**(11): p. 1289-1300.
66. Sassanfar, M. and J.W. Szostak, An RNA motif that binds ATP. *Nature*, 1993. **364**(6437): p. 550-553.
67. Huizenga, D.E. and J.W. Szostak, A DNA Aptamer That Binds Adenosine and ATP. *Biochemistry*, 1995. **34**(2): p. 656-665.
68. Lauhon, C.T. and J.W. Szostak, RNA aptamers that bind flavin and nicotinamide redox cofactors. *Journal of the American Chemical Society*, 1995. **117**(4): p. 1246-1257.
69. Fredholm, B.B., et al., Comparison of the potency of adenosine as an agonist at human adenosine receptors expressed in Chinese hamster ovary cells. *Biochemical Pharmacology*, 2001. **61**(4): p. 443-448.
70. Ralevic, V. and G. Burnstock, Receptors for Purines and Pyrimidines. *Pharmacological Reviews*, 1998. **50**(3): p. 413-492.
71. Sollevi, A., Cardiovascular effects of adenosine in man; possible clinical implications. *Progress in Neurobiology*, 1986. **27**(4): p. 319-349.
72. Yaar, R., et al., Animal models for the study of adenosine receptor function. *Journal of Cellular Physiology*, 2005. **202**(1): p. 9-20.
73. Holgate, S., Airway inflammation and remodeling in asthma: Current concepts. *Molecular Biotechnology*, 2002. **22**(2): p. 179-189.
74. André, C., A. Xicluna, and Y.-C. Guillaume, Aptamer–oligonucleotide binding studied by capillary electrophoresis: Cation effect and separation efficiency. *ELECTROPHORESIS*, 2005. **26**(17): p. 3247-3255.
75. Huang, D.-W., et al., Time-resolved fluorescence biosensor for adenosine detection based on home-made europium complexes. *Biosensors and Bioelectronics*, 2011. **29**(1): p. 178-183.
76. Kim, J., et al., Label-free electrochemical detection of adenosine based on electron transfer from guanine bases in an adenosine-sensitive aptamer. *Chemical Communications*, 2009(31): p. 4747-4749.
77. Chen, S.-J., et al., Colorimetric determination of urinary adenosine using aptamer-modified gold nanoparticles. *Biosensors and Bioelectronics*, 2008. **23**(11): p. 1749-1753.
78. Liu, J., D. Mazumdar, and Y. Lu, A Simple and Sensitive “Dipstick” Test in Serum Based on Lateral Flow Separation of Aptamer-Linked Nanostructures. *Angewandte Chemie International Edition*, 2006. **45**(47): p. 7955-7959.
79. Tawa, K. and W. Knoll, Mismatching base-pair dependence of the kinetics of DNA–DNA hybridization studied by surface plasmon fluorescence spectroscopy. *Nucleic Acids Research*, 2004. **32**(8): p. 2372-2377.
80. Sassolas, A., L. Blum, and B.D. Leca-Bouvier, Optical detection systems using immobilized aptamers. *Biosensors and Bioelectronics*, 2011. **26**(9): p. 3725-3736.
81. Wang, Q., et al., Surface plasmon resonance detection of small molecule using split aptamer fragments. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2011. **156**(2): p. 893-898.

CHAPITRE 2

ÉLABORATION DE LA BIOPUCE ET DÉTECTION PAR SPRi

2.1 L'imagerie par résonance des plasmons de surface (SPRi)	32
2.1.1 Le phénomène de résonance plasmonique	32
2.1.2 L'imagerie SPR	34
2.1.3 Dispositif expérimental utilisé	36
2.2 Conception de la biopuce	39
2.2.1 Séquences des aptamères utilisés	39
2.2.2 Immobilisation des aptamères sur la surface.....	41
2.3 Optimisation de la chimie de surface	44
2.3.1 La thrombine et ses aptamères	45
2.3.2 Traitements de surface	47
2.4 Application au modèle <i>adénosine</i>	61
2.5 Conclusion	63
BIBLIOGRAPHIE	65

2.1 L'imagerie par résonance des plasmons de surface (SPRi)

2.1.1 Le phénomène de résonance plasmonique de surface

Le plasmon de surface correspond à l'oscillation collective d'électrons libres à l'interface entre deux milieux : un métal (Al, Ag, Au, Cu, ...) et un diélectrique. La résultante de ces oscillations est une onde électromagnétique évanescente, appelée onde plasmon, se propageant à cette même interface sur une épaisseur spécifique (**Figure 2.1**). La fréquence de cette onde est dépendante de l'indice optique local du milieu diélectrique, c'est-à-dire de la quantité de matière présente à l'interface.

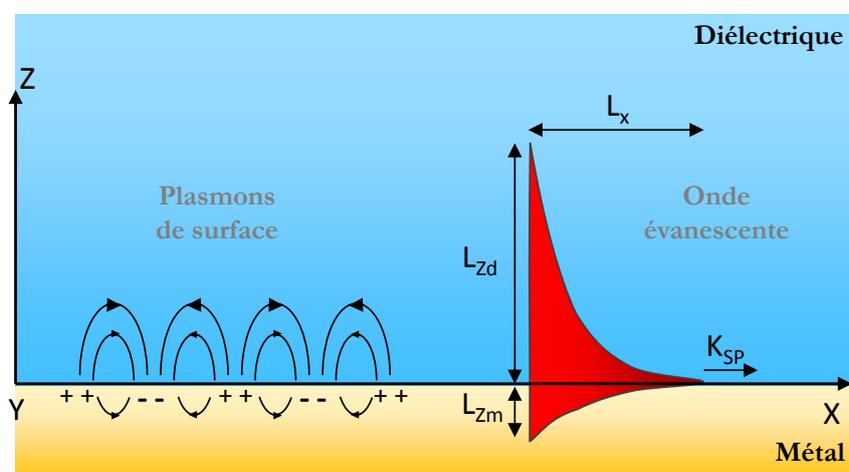


Figure 2.1 Profil de l'amplitude de l'onde plasmon se propageant à l'interface entre un métal et un diélectrique. L'onde se propage sur une distance limitée suivant l'axe des X et l'axe des Z. Elle est caractérisée par sa longueur L_x de propagation sur l'interface et par ses profondeurs L_{Zm} et L_{Zd} de pénétration de part et d'autre de l'interface. Au-delà de ces valeurs, l'onde devient insensible aux perturbations du milieu. Les grandeurs caractéristiques L_x , L_{Zm} et L_{Zd} de l'onde plasmon peuvent être calculées à partir de la composante longitudinale $(K_{SP})_x$ du vecteur d'onde [1].

L'intérêt pour les plasmons de surface prit toute son importance à partir de 1968 suite aux travaux d'Otto [2] ainsi que ceux de Kretschmann et Reather [3] qui développèrent différentes configurations expérimentales pour exploiter ce phénomène. Les travaux de Nylander et Liedberg [4] marquent quant à eux un tournant majeur dans l'application des plasmons de surface. Pour la première fois, ils réussirent à exploiter la configuration de Kretschmann pour détecter des molécules gazeuses ainsi que l'interaction anticorps (IgG)/ antigène (a-IgG) [4].

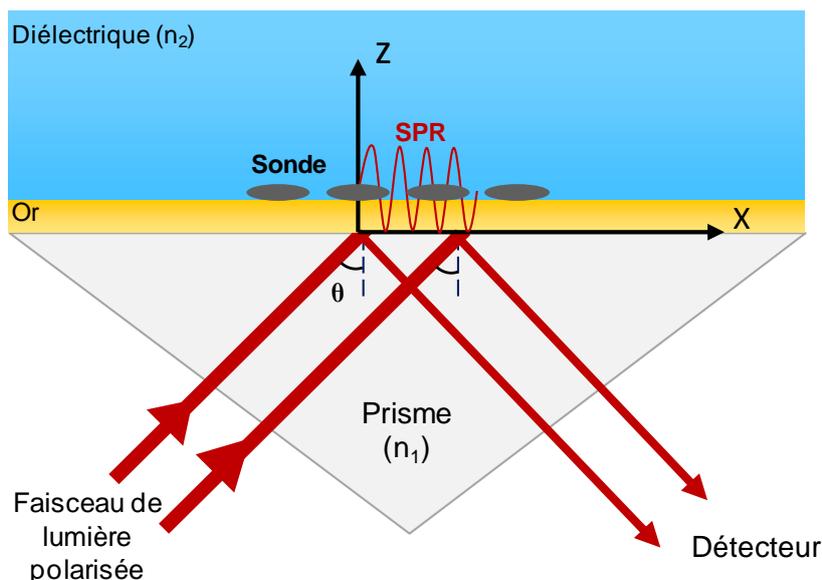


Figure 2.2 Résonance plasmonique de surface selon la configuration de *Kretschmann*. Une fine couche d'or de quelques dizaines de nanomètres d'épaisseur est directement en contact avec la base d'un prisme d'indice n . Un faisceau de lumière polarisée est alors dirigé, au travers de ce prisme, vers l'interface métal/diélectrique avec un angle d'incidence interne θ . Le champ évanescent s'étend dans le métal et se couple avec le plasmon de surface à l'interface entre le métal et l'air. Les changements de l'indice de réfraction dans le milieu diélectrique sont détectés jusqu'à 100-200 nm à partir de l'interface, en fonction de la qualité du revêtement d'or et la longueur d'onde de la lumière.

Afin de mieux comprendre le phénomène dont il est question, nous pouvons considérer en premier lieu un système composé d'une simple interface séparant deux milieux d'indice de réfraction (n_1, n_2), de sorte que $n_1 > n_2$. Il existera alors un angle d'incidence, noté θ_c , au-delà duquel l'intensité lumineuse envoyée sur l'interface sera totalement réfléchi : on parle alors de phénomène de réflexion totale. Ce phénomène s'accompagne de la formation d'une onde évanescente dans le milieu d'indice n_2 , qui s'atténue en s'éloignant de la surface. Considérons à présent un système optique, tel que proposé par Kretschmann [3], où les deux milieux sont séparés par une couche métallique de quelques dizaines de nanomètres (**Figure 2.2**). Dans ce cas, pour les angles d'incidence θ inférieurs à θ_c , l'intensité du faisceau lumineux réfléchi sera très importante, les métaux réfléchissant la lumière pour les longueurs d'onde appartenant au spectre visible. À l'inverse, pour $\theta > \theta_c$, du fait de l'excitation des plasmons, une forte atténuation de l'intensité réfléchi est observée. L'intensité passe par un minimum pour un angle caractéristique θ_r , l'angle de résonance. Cette excitation résulte d'un couplage entre la lumière incidente (photons) et les électrons de conduction du métal (**Figure 2.1**).

L'énergie lumineuse est alors absorbée par le métal, provoquant cette diminution caractéristique de l'intensité réfléchi. Au niveau de l'interface, comme précisé plus haut, le plasmon correspond à une oscillation de la densité de charges se propageant le long de l'interface [5]. Un champ électromagnétique est créé dans le milieu d'indice n_2 (diélectrique), et présente les caractéristiques d'une onde évanescente, son amplitude décroissant exponentiellement avec la distance par rapport à la surface (**Figure 2.1**). Cette propriété fait du plasmon une sonde locale, sensible aux modifications des propriétés de l'interface métal/diélectrique, notamment les variations d'indice de réfraction. Plusieurs techniques ont ainsi tiré profit des propriétés des ondes évanescentes, parmi lesquelles la *résonance des plasmons de surface* (SPR).

En résumé, le plasmon de surface est une onde de densité de charges se propageant à l'interface séparant un métal et un diélectrique. Il peut être excité par une onde lumineuse, induisant une forte diminution de l'intensité réfléchi. Cette atténuation résulte du couplage entre la lumière incidente et les électrons de conduction du métal. Cette propriété étant sensible à l'indice du milieu diélectrique au niveau de l'interface, elle est à l'origine de l'utilisation de la SPR pour la détection des interactions moléculaires. Ainsi, lorsqu'une molécule s'adsorbe sur la couche d'or, elle modifie les propriétés des plasmons de surface, notamment la valeur de l'angle de résonance. Ceci implique une variation de l'indice du milieu qui sera d'autant plus importante que le nombre ou la taille des molécules seront grands. Il est ainsi possible de : 1) Quantifier la quantité de molécules adsorbées sur la surface, tel que démontré par Stenberg et *al.* [6] ; 2) Suivre en temps réel les cinétiques d'interactions.

2.1.2 Imagerie SPR

En général, les cinétiques d'interactions sont suivies en mesurant la variation de réflectivité en temps réel. A titre d'exemple, l'une des premières mesures de l'hybridation de l'ADN par SPR remonte aux années 1990 [7]. La SPR a alors été utilisée pour mesurer l'intensité réfléchi par la surface d'or fonctionnalisée par une seule séquence (format monocapteur). Parmi les SPR monocapteurs commercialisés, le Biacore[®] est le plus fréquemment utilisé. Très vite cependant, l'idée d'un SPR multicapteur, de type imagerie SPR, permettant des mesures en parallèle a été proposée par l'équipe de Knoll [8]. Ainsi, de nombreuses équipes utilisant la SPR se sont équipées d'imageurs pour l'étude des interactions moléculaires sur puce, dont les plus emblématiques sont celles de Corn [9] et Lévy [10].

Les systèmes d'imagerie SPR sont basés sur un mode de suivi de l'interaction à angle de mesure et longueur d'onde fixes. Dans ce cas, une caméra CCD va permettre l'enregistrement des variations d'intensité du faisceau réfléchi exprimé sous forme de pourcentage de réflectivité. La réflectivité traduit ici le rapport entre l'intensité du faisceau réfléchi et celle du faisceau incident (**Figure 2.3**).

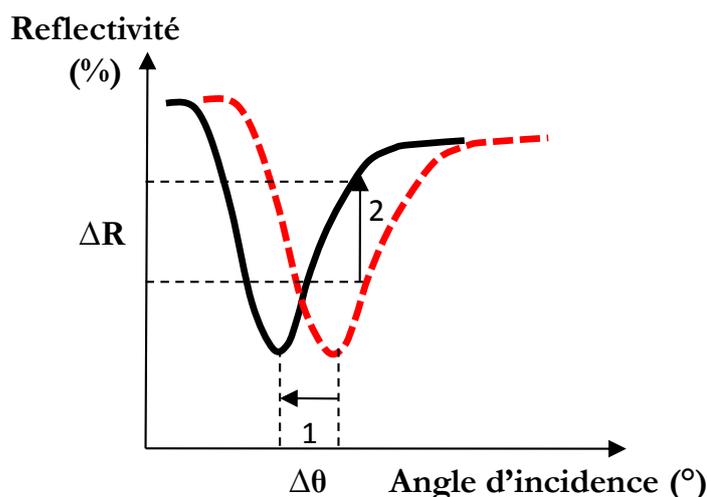


Figure 2.3 Les différents modes de suivi de l'évolution des courbes plasmons lors d'une détection SPR (1 : lecture type Biacore® basée sur la variation de l'angle de résonance $\Delta\theta$, 2 : lecture par imagerie SPR basée sur la variation de réflectivité ΔR).

L'imagerie SPR offre ainsi la possibilité de mener une détection multiparamétrique, sans marquage et permet par ailleurs une quantification des cinétiques observées. De plus, la visualisation de la surface de la biopuce en temps-réel permet d'identifier et limiter les phénomènes d'interaction non-spécifique [11]. Ces avantages en font alors incontestablement un outil de choix pour l'étude des interactions moléculaires.

2.1.3 Dispositif expérimental utilisé

Dans le cadre de ce projet de thèse, l'appareil de détection employé est constitué tel que présenté sur la **Figure 2.4**. Il est composé d'une partie fluïdique assurant la circulation des différentes solutions durant l'expérience et une partie optique de type SPRi dans la configuration de Kretschmann. Développé par Horiba (France), ce système est composé de plusieurs éléments optiques (**Figure 2.4**). Une source monochromatique de lumière de type LED ($\lambda = 635 \text{ nm}$) génère un faisceau lumineux dont l'angle d'incidence peut être ajusté par un miroir pivotant. Un polarisateur va alors permettre une polarisation de la lumière incidente en mode Transverse Magnétique (TM) pour la mesure SPR ou Transverse Electrique (TE) pour la réflectivité totale de référence. Le faisceau réfléchi est capté par une caméra CCD (16-bit) reliée à un ordinateur.

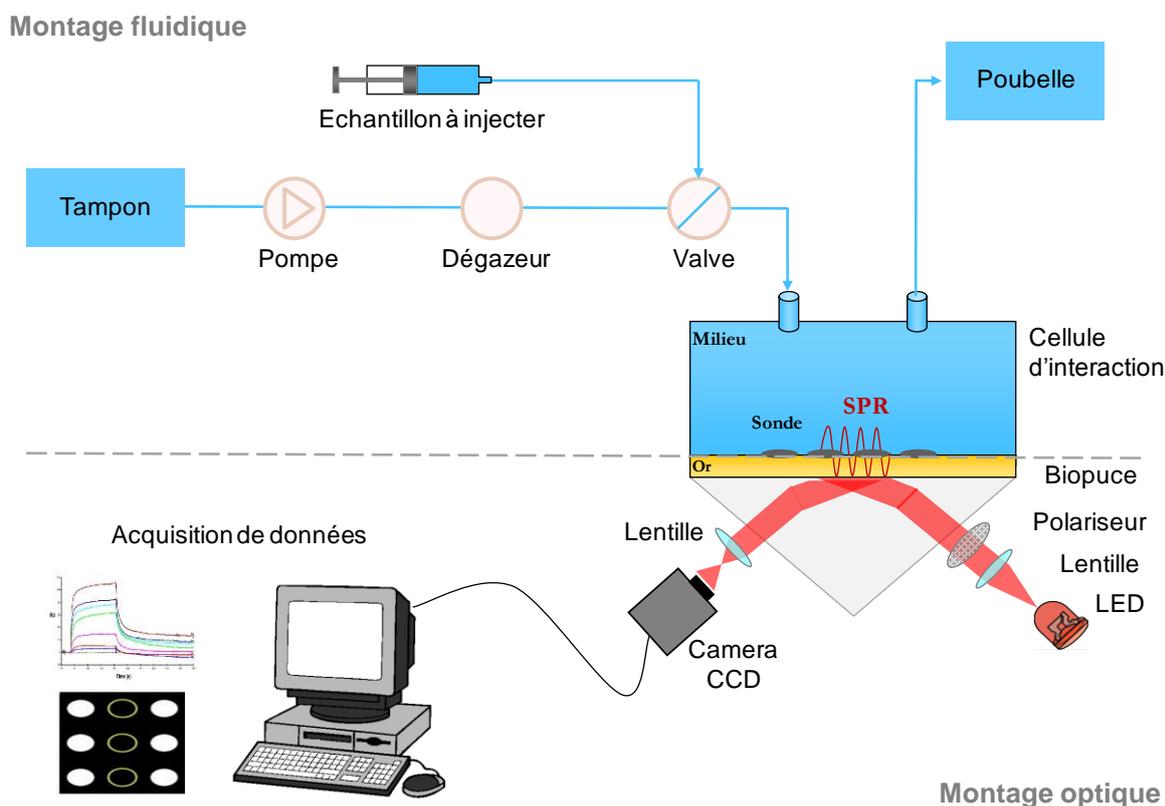


Figure 2.4 Montage expérimental de détection par SPRi. L'injection des échantillons est réalisée via un système fluïdique composé d'une pompe et d'une vanne reliée à une cellule d'interaction surplombant la biopuce. La partie optique est équipée d'une LED qui illumine le prisme en verre sous un angle fixe pour lequel se produit la résonance de plasmons de surface (SPR). Le rayon réfléchi est alors détecté par une caméra CCD elle-même reliée à une interface logicielle permettant l'acquisition de données en temps-réel.

Le système est confiné dans une enceinte thermo-régulée afin de limiter l'effet des fluctuations de température sur les événements de reconnaissance et le phénomène de plasmons de surface (**Figure 2.5**).

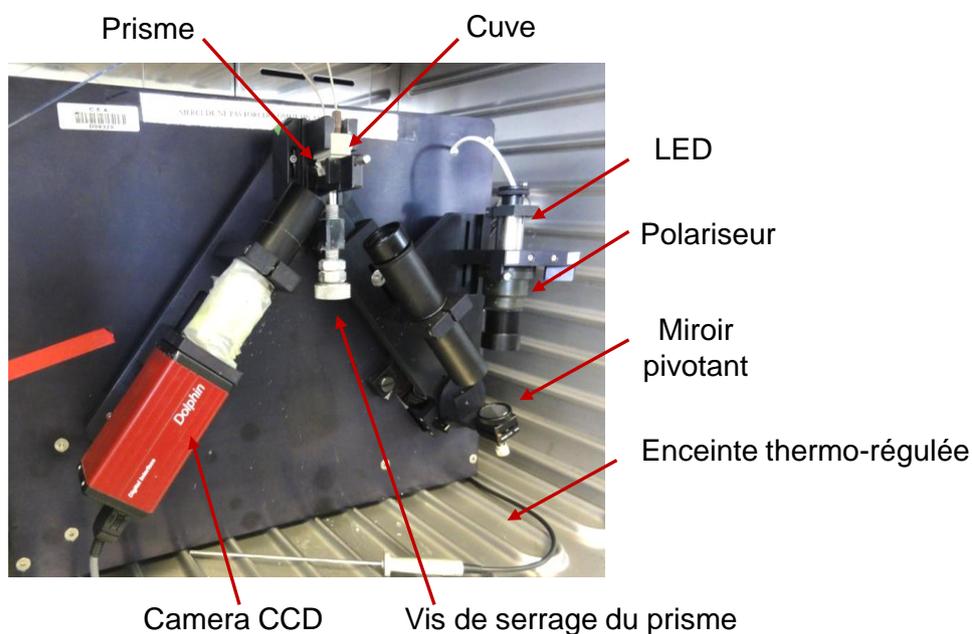


Figure 2.5 Photo du montage expérimental de l'imageur SPR utilisé.

Au dessus de la biopuce se trouve une cellule, ou chambre, d'interaction hexagonale en PEEK constituée d'une voie d'entrée et de sortie (**Figure 2.6**). Le volume de réaction au sein de la cellule est estimé à 15 μL . En amont de cette cellule se trouve un système à boucle d'injection qui permet d'intégrer, si nécessaire, le volume d'échantillon à injecter au circuit principal dans lequel circule un tampon en continu. Le volume de l'échantillon injecté est donc défini par le volume de la boucle utilisée. Celui-ci est classiquement de 500 μL . Encore plus en amont se trouve un système de dégazage qui permet de prévenir l'apparition de bulles d'air dans l'ensemble du circuit fluide. Le débit de circulation du tampon de course est ajusté grâce à une Pompe-seringue Cavro. Pour un mode en continu, ce débit est fixé à 50 $\mu\text{L}/\text{min}$. Un mode va-et-vient est également possible si l'on souhaite réaliser des injections plus longues. Dans ce cas, le débit instantané est fixé à 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ tandis que les volumes poussé et aspiré sont respectivement de 15 μL et 10 μL .

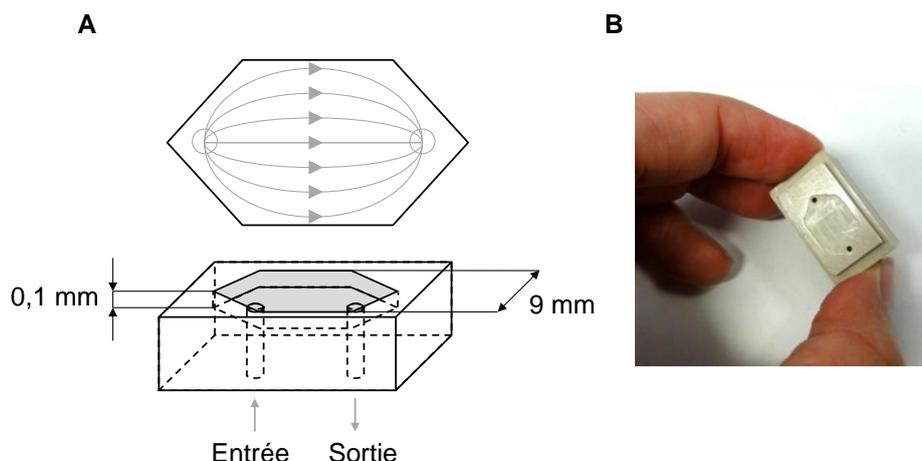


Figure 2.6 Schéma (A) et photo (B) de la cuve hexagonale utilisée.

Les données récoltées pendant l'expérience correspondent à des images différentielles issues de la soustraction d'une image de référence (définie avant l'injection) à l'image en cours d'acquisition, mais également à des variations de réflectivité en fonction du temps. Ceci permet le tracé de courbes cinétiques dites « sensogrammes » caractérisées par une augmentation de la réflectivité au cours de la phase d'interaction sonde/cible suivie d'une baisse de réflectivité durant la phase de dissociation (**Figure 2.7**). L'injection d'une solution de régénération (NaOH à 50 mM) peut contribuer à ramener les signaux SPR à leur niveau de base, optimisant ainsi les conditions de reproductibilité en cas d'injections successives.

Le traitement des données cinétiques diffère selon les besoins. Afin de représenter clairement et uniformément les effets d'une injection sur les signaux SPR, une étape de base consiste à soustraire pour tous les plots la valeur initiale de réflectivité définie à un temps précédant l'injection. Il est également utile de limiter quelquefois l'effet du saut d'indice d'un échantillon injecté sur le signal SPR. Pour cela, il suffit de soustraire pour tous les plots, un signal référence issu d'un plot contrôle (mentionné en légendes des figures le cas échéant).

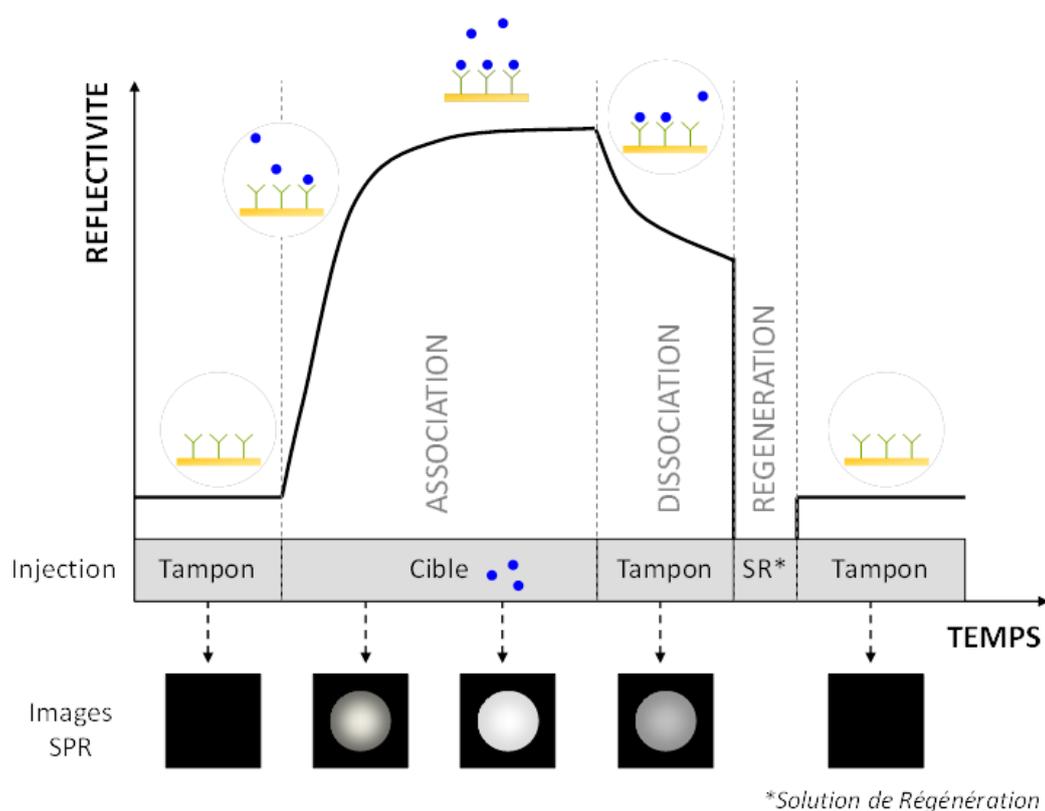


Figure 2.7 Suivi de la cinétique d'association et dissociation du complexe sonde/cible au niveau de la surface de la biopuce sous forme de sensogrammes et d'images SPR. Le signal SPR représente la variation de réflectivité en fonction du temps. L'interaction de la cible avec la sonde se traduit par une augmentation de la réflectivité tandis que la dissociation du complexe formé se caractérise par une diminution du signal. La réflectivité revient à son niveau de base après l'injection d'une solution de régénération. La détection du faisceau de lumière réfléchi sur une caméra CCD permet de suivre et de récolter des images de la surface. Au niveau de chaque zone d'interaction localisée (plot), le changement de réflectivité se traduit en images par des niveaux de gris variables.

2.2 Conception de la biopuce

2.2.1 Séquences des aptamères utilisés

La conception d'une biopuce à aptamères implique la fonctionnalisation de sa surface en différentes zones d'interaction localisées (plots). Dans le cadre de la détection d'adénosine, les séquences sondes employées pour cette étude préliminaire sont des aptamères anti-adénosine présentés dans le **Tableau 2.1**. Leurs séquences diffèrent en fonction du nombre de bases complémentaires qu'elles possèdent, permettant ainsi de tester l'influence de ce nombre sur l'interaction avec l'adénosine.

Séquences sondes	Séquence 5' -> 3'
APT8	HS- TTTT TAGAGAACCT GGGGGAGTATTGCGGAGGA AGGTTCTC
APT4	HS- TTTT AGAGAACCT GGGGGAGTATTGCGGAGGA AGGT AGAG

Tableau 2.1 Séquences des aptamères anti-adénosine APT8 et APT4 utilisés en tant que sondes à la surface de la biopuce. Les bases en rouge représentent les bases complémentaires au niveau de chaque séquence.

Nous retrouvons alors deux séquences distinctes APT4 et APT8, pouvant s'hybrider sur 4 et 8 bases, respectivement (**Figure 2.8**). Une autre modification de ces séquences d'aptamères a consisté en l'addition d'une queue poly-thymidine de cinq unités (T₅) au niveau de l'extrémité 5'. Ceci contribue d'une part, à favoriser l'accessibilité de l'aptamère pour l'adénosine en solution après son greffage, et d'autre part, à limiter l'effet d'adsorption non spécifique [12].

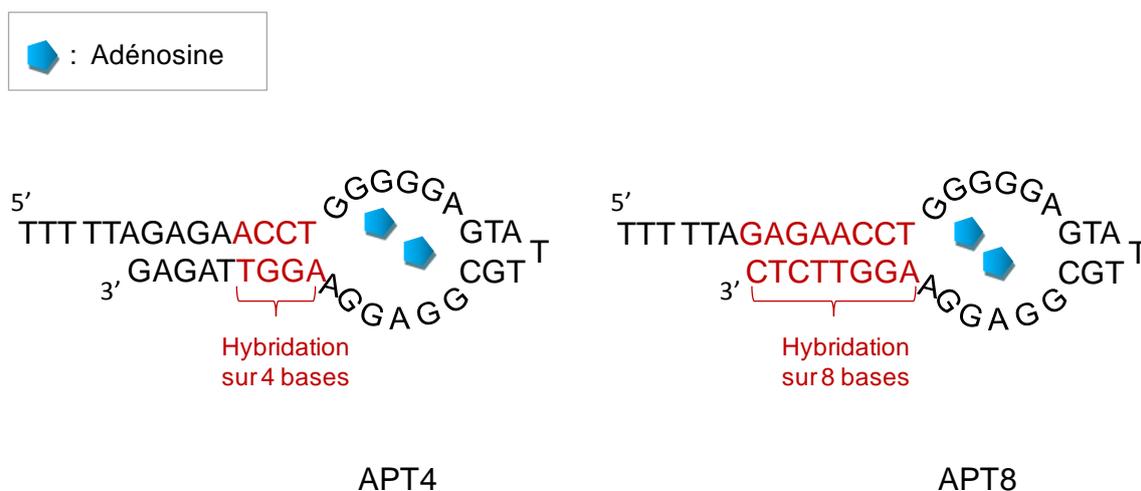


Figure 2.8 Représentation schématique des aptamères anti-adénosine utilisés. A gauche, APT4 pouvant s'hybrider sur 4 bases et à droite, APT8 pouvant s'hybrider sur 8 bases.

D'autres séquences oligonucléotides sont utilisées en tant que contrôles négatifs (CN) pour évaluer la spécificité de l'interaction aptamère-adénosine mais aussi, en cas de besoin, en tant que contrôles positifs d'hybridation avec leurs séquences complémentaires. Ces séquences, notées CN8 et CN4 sont caractérisées par une composition nucléotidique, en nombre et en nature, identique à celle des APT4 et APT8 respectivement, mais dont l'ordre a été déterminé aléatoirement.

D'autres séquences disponibles au laboratoire appelées Zip9 (Voir Annexe) présentent une longueur comparable à celles des aptamères et ont de fait également servi en tant que contrôles négatifs pour certaines expériences (Chapitre 4). L'ensemble des séquences oligonucléotidiques utilisées sont représentées en **Annexe A**.

2.2.2 Immobilisation des aptamères sur la surface

Les sondes sont immobilisées sur la surface de la biopuce sous forme de plots distincts. En général, trois réplicats sont réalisés pour chaque type de sonde afin de contrôler la reproductibilité des signaux SPR. Les courbes cinétiques présentées dans ce manuscrit correspondent pour la plupart à la moyenne des signaux obtenus pour chaque réplikat.

Une étape clé dans la fabrication d'un outil de détection de type biopuce à aptamères concerne l'immobilisation des acides nucléiques à la surface du transducteur. En effet, la sonde doit être immobilisée à la surface sans altération de ses propriétés chimiques ou biologiques. De plus, il est nécessaire de maintenir sa stabilité et sa réactivité durant le temps d'analyse. Si une grande variété de substrats peut être utilisée pour l'immobilisation des aptamères tel que le carbone, le cuivre ou même le silicium [13-15], le choix de la SPR comme élément transducteur implique l'utilisation d'un support spécifique. Celui-ci doit impérativement être recouvert d'une couche métallique favorisant l'apparition de l'effet plasmon. De fait, la biopuce utilisée dans le cadre de ce projet correspond à un prisme de verre haut indice de réfraction ($n = 1,776$) recouvert d'une première couche de Nickel (2 nm d'épaisseur) puis d'or (50 nm) sur une surface d'environ 2 cm².

La fonctionnalisation de surfaces d'or par des acides nucléiques est un vaste domaine d'investigation. Les méthodes les plus adaptées et plus communément utilisées pour une détection en SPR concernent généralement trois grandes familles de modification de surface. La première correspond à la formation de couches monoassemblées de type SAMs (Self Assembled Monolayers) via l'adsorption spontanée de molécules aux extrémités thiolées présentant une grande affinité pour l'or [16]. La seconde est l'ancrage de la sonde par électropolymérisation de pyrrole à la surface d'une électrode [17, 18].

La troisième concerne l'enchevêtrement des sondes dans une matrice organique (type Dextran). C'est d'ailleurs cette dernière chimie de surface qui est employée dans les biocapteurs de type Biacore® dont la surface est recouverte d'un gel réticulé de dextran carboxyméthylé.

Traditionnellement, c'est l'électropolymérisation de poly-pyrrole (Ppy) qui est utilisée dans notre laboratoire. Différentes applications ont pu ainsi être mises point dans le domaine de la reconnaissance moléculaire impliquant par exemple des glycosaminoglycanes, des bactéries ou encore des lymphocytes [19-22]. Dans ce cas, les molécules sondes sont conjuguées à un monomère de pyrrole dont l'électropolymérisation, sous l'action d'une différence de potentiel, va assurer le greffage (non covalent) à la surface d'or. Si cette technique permet un ancrage très stable des sondes, leur organisation au niveau de la surface est toutefois aléatoire. De plus, il s'avère difficile de contrôler la taille du polymère formé dont la rugosité de surface peut atteindre au final une épaisseur de 8 nm [10, 20, 22]. Néanmoins, les travaux de thèse de J-B. Fiche [23, 24], relatifs au développement de puces à ADN, ont permis de mettre en évidence l'apparition fréquente d'artefacts sur les plots dans ce type de configuration.

Afin de contourner les problèmes liés à la topologie imposée par la formation du polymère et aboutir à une couche organique de faible épaisseur, dans l'idéal une monocouche, le recours à l'utilisation de SAMs semble être une solution adaptée. Une comparaison entre ces deux méthodes pour le greffage d'ADN et une détection en SPRi a déjà été initiée dans notre laboratoire par J. Fuchs dans le cadre de sa thèse [25, 26]. Il a de fait été montré que les signaux d'hybridation SPR obtenus par des sondes greffées via une chimie thiol sur or étaient en moyenne deux fois plus importants que ceux obtenus via l'électropolymérisation de pyrrole et présentaient également une meilleure reproductibilité. En effet, l'accessibilité des sondes immobilisées peut avoir une influence importante sur la sélectivité de la biopuce [27]. Dès lors, il est préférable de garantir une bonne organisation des molécules à la surface. Cette approche permet de maintenir une bonne flexibilité des sondes lors du processus de reconnaissance, mais présente néanmoins une moindre stabilité en comparaison avec la chimie poly-pyrrole.

La formation de SAMs portant des groupements thiolés sur des surface d'or est une chimie développée pour la première fois par Nazzo et Allara il y a près de trente ans lorsqu'ils réussirent à caractériser l'adsorption d'alcanethiols sur or [28, 29]. Depuis, les monocouches auto-assemblées de thiols sur or représentent les systèmes les mieux étudiés [30].

Ainsi, ces molécules ont la capacité de former spontanément sur une surface un alignement de molécules organiques principalement composées de chaînes alkyles ou de cycles aromatiques (**Figure 2.9**). Le groupement thiol (SH) situé à l'une des extrémités se lie alors à un atome d'or via la formation d'une liaison non covalente (S-Au) par chimisorption. L'organisation de la couche s'établit ensuite par la création de forces d'attraction de type Van der Waals entre les différentes chaînes.

R: extrémité affine avec la surface
 R': extrémité chimique spécifique à la fonctionnalisation

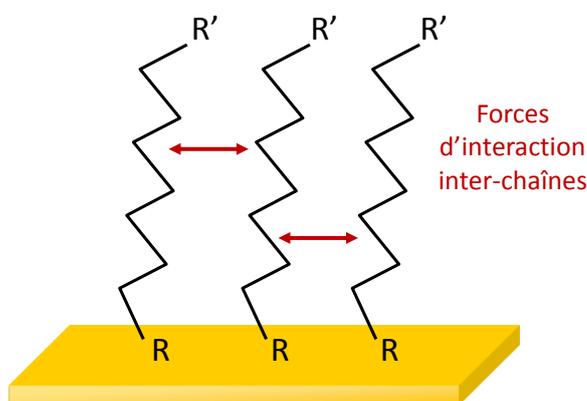


Figure 2.9 Représentation idéale de la formation de mono-couche organique par auto-assemblage de SAMs.

La stabilité de ces couches auto-assemblées dépend fortement des conditions expérimentales telles que le pH [31] ou la température [32]. De plus, en dépit de leur facilité de mise en œuvre, les SAMs demeurent peu stables dans le temps et en milieux oxydants. Néanmoins, l'immobilisation d'acides nucléiques thiolés sur une surface en couche auto-assemblées pour des applications en biorecognition a fait l'objet de nombreuses études [33-36]. L'abondance des publications dans ce domaine trahit le besoin crucial d'optimisation des protocoles développés. L'objectif principal consiste à atteindre une haute sensibilité et sélectivité de détection via notamment l'augmentation du rendement d'interaction spécifique et la neutralisation des adsorptions non spécifiques, aussi bien des sondes que des cibles, pour le substrat.

Dans le cadre de ce projet de thèse, nous nous sommes exclusivement intéressés à l'utilisation d'une chimie basée sur l'auto-assemblage d'aptamères thiolés à la surface de la biopuce. Le recours à la chimie thiol pour l'immobilisation d'aptamères étant une expérience inédite au laboratoire, il semblait nécessaire d'y consacrer une étude approfondie. En effet, ces molécules représentent bien plus que de simples acides nucléiques. Leur structure, caractérisée par leur conformation tridimensionnelle, est un facteur déterminant pour la préservation de leur fonctionnalité. L'établissement d'un protocole adapté a donc nécessité la prise en considération de nombreux paramètres tels que le temps d'incubation, la densité de greffage ou encore la présence d'agents de passivation au niveau de la surface. Les résultats de cette étude seront développés dans la section suivante.

2.3 Optimisation de la chimie de surface

Le contrôle de la chimie de surface est ainsi essentiel pour assurer le développement d'une biopuce à aptamères sensible et sélective. Si le but ultime concerne la détection d'adénosine, les travaux présentés ci-après ont d'abord porté sur un autre modèle d'étude, celui de la reconnaissance aptamère (APT) - thrombine (THR). En effet, dans un premier temps, une étude préalable du problème a nécessité une validation grâce à une molécule dont l'interaction avec les aptamères est connue et facilement caractérisable au laboratoire. Or, contrairement à l'adénosine, la thrombine, en tant que protéine, présente l'avantage d'avoir un poids moléculaire de 36,7 kDa, parfaitement compatible avec une détection SPRi. Néanmoins, ceci peut également contribuer à favoriser l'apparition de signal non-spécifique, paramètre clé, qui servira de base pour l'ajustement de protocole final de traitement de surface. Ainsi, une fois les conditions expérimentales optimisées pour le modèle THR, celles-ci seront appliquées à notre modèle d'étude principal, l'adénosine.

2.3.1 La thrombine et ses aptamères

La thrombine (THR), désignée aussi par l'appellation facteur IIa, est une enzyme de la coagulation sanguine appartenant à la famille des Sérines-protéases. D'un poids moléculaire de 36,7 kDa, elle est formée de deux chaînes reliées par un pont disulfure, une chaîne légère de 6 kDa (36 acides aminés) et une chaîne lourde de 31 kDa (258 acides aminés).

Dans l'organisme, la THR est caractérisée par sa multifonctionnalité. Elle agit à la fois comme une protéase, en clivant plusieurs facteurs de la coagulation sanguine, et comme un messenger capable d'interagir avec différents récepteurs cellulaires.

Son rôle majeur dans la cascade de coagulation sanguine consiste à transformer le fibrinogène plasmatique (soluble) en filaments de fibrine insolubles qui contribuent à former le caillot sanguin. A cet effet pro-coagulant s'ajoute un effet anticoagulant indirect, par interaction avec un récepteur des cellules endothéliales menant à l'inactivation des facteurs Va et VIIIa. Un dérèglement de son activité peut donc conduire à des troubles de la coagulation et engendrer des cas d'hémophilie ou de thrombose. Elle représente de ce fait une cible importante pour le développement de traitements anti-coagulants et des maladies cardiovasculaires [37]. De plus, sa détection et quantification dans des échantillons biologiques complexes peut se révéler cliniquement pertinente. Il a en effet été montré que sa concentration dans le sang peut atteindre la gamme micromolaire durant le processus de coagulation ainsi que des niveaux plus faibles au début du phénomène d'hémostase [37]. Par ailleurs, une présence persistante de la thrombine dans la circulation sanguine peut générer un infarctus du myocarde [38]. Le développement de dispositifs de détection sensibles et spécifiques a donc très vite fait l'objet d'un grand intérêt.

Les différentes recherches menées dans ce sens ont notamment fini par aboutir à la découverte d'aptamères anti-thrombine durant les années 90. Le premier (APT1) correspond à une séquence ADN optimale de 15 bases dont la composition riche en Guanosine lui confère une structure tridimensionnelle en quadruplexe [39]. Celle-ci consiste en deux tétrades de G connectées par deux boucles T-T et une boucle T-G-T (**Figure 2.10**). Cet aptamère est connu pour interagir préférentiellement avec la THR au niveau du site de fixation du fibrinogène, appelé exosite 1 [39].

Le second aptamère (APT2) a été identifié en 1997 par l'équipe de Tasset et *al.* [40]. Il est composé d'une séquence de 29 nucléotides, dont un motif de 15 nucléotides très semblable à APT1 et responsable du repliement en G-quadruplex. Les nucléotides situés aux deux extrémités peuvent s'apparier conférant à APT2 une structure en quadruplexe-duplexe (**Figure 2.11**). Cet aptamère interagit avec la THR au niveau du site de fixation de l'héparine : l'exosite 2. Les séquences développées de APT1 et APT2 sont présentées en **Annexe A**.

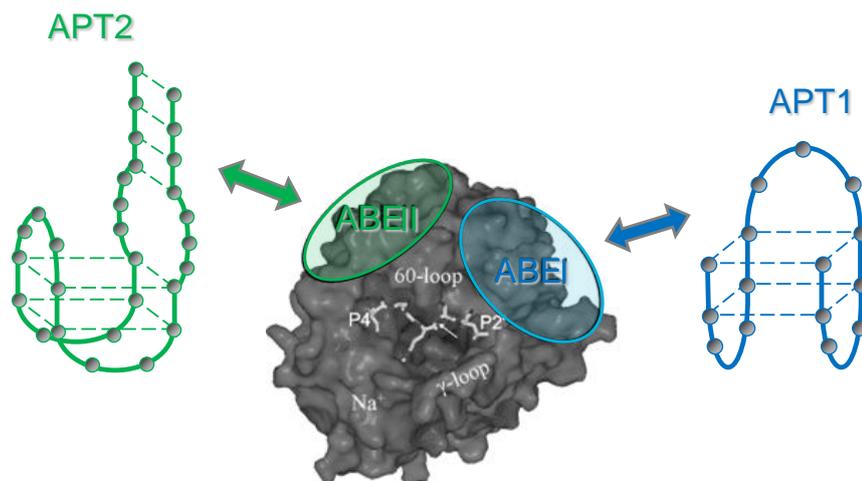


Figure 2.10 Représentation schématique d'APT1 et APT2 et de leur interaction avec la thrombine (THR). Au niveau des séquences d'aptamères, les tétrades de G et le duplexe formé par l'appariement des bases complémentaires sont symbolisés en pointillés. La structure de la THR est adaptée des travaux de Huntington et *al.* [41]. L'interaction APT-THR a lieu au niveau de deux exosites désignés par les sigles ABEI et ABEII sur la figure pour *Anion-Binding Exosite I et II*.

Ces aptamères sont aujourd'hui considérés comme les molécules modèles les plus utilisées pour développer des systèmes de détection de type *aptasensor*. Pour ce faire, différentes stratégies ont été développées, parmi lesquelles la détection basée sur la résonance plasmonique de surface [14].

Nous allons donc utiliser dans cette section le modèle d'interaction des aptamères APT1 et APT2 avec la THR pour une caractérisation en SPRi. Comme précisé plus haut, l'objectif principal ne consistera pas à évaluer la faisabilité et les performances d'un tel système, mais plutôt à l'utiliser comme plateforme référence pour optimiser les procédures de traitement de surface et les transposer au modèle adénosine. Les différentes stratégies employées pour élaborer ce protocole optimisé sont décrites dans la prochaine section.

2.3.2 Traitements de surface

i) Préparation par traitement plasma

Préalablement à la fonctionnalisation, une étape importante consiste à nettoyer la surface des biopuces par un traitement plasma afin d'éliminer d'éventuelles contaminations organiques de surface, susceptibles de perturber l'adsorption des monocouches. Ce traitement est réalisé dans un générateur Plasma avec un mélange gazeux d'oxygène (O₂) et d'argon (Ar) sous pression réduite. Quand l'action de l'argon est ici purement mécanique (érosion ionique du substrat), l'oxygène lui, va permettre d'éliminer les résidus hydrocarbonés et générer un oxyde superficiel, favorisant la mouillabilité et l'adhésion au niveau de la surface. Ceci a pour effet de la rendre hyper-réactive tout en augmentant sa rugosité. Des tests mettant en œuvre l'utilisation d'un microscope à force atomique (AFM) nous ont permis d'estimer cette rugosité en fonction du temps d'incubation des surfaces, préalablement à leur fonctionnalisation par les sondes. Il s'agissait de mettre en évidence l'effet d'un nettoyage plasma sur l'état de la surface afin de définir un temps d'incubation optimal pour la reproductibilité des expériences.

La rugosité est estimée à partir des valeurs RMS (Root Mean Square) des irrégularités de la surface, calculées à partir de la variance des mesures. Deux différents prismes (P1 et P2) traités simultanément au plasma ont été soumis à des mesures AFM après des temps d'incubation de 4 et 24 heures, respectivement. Un troisième prisme (P0), n'ayant subi aucun nettoyage plasma a également été testé. Les images obtenues sont reportées sur la **Figure 2.11**.

Les mesures AFM ont permis de mettre en évidence l'évolution de l'état des surfaces après un nettoyage plasma. En effet, la rugosité d'un prisme non traité (RMS=1,35) se trouve être plus faible que celle des prismes nettoyés au plasma. Celle-ci a néanmoins tendance à diminuer au cours de temps en se rapprochant de la valeur de référence (P0) après 24 heures d'incubation (RMS= 1,46). Si la rugosité de la surface après un traitement plasma traduit la réactivité de celle-ci, il est de fait nécessaire de définir un temps d'incubation suffisant pour la neutraliser.

La favorisation des conditions de mouillabilité et d'adhésion peut mener à une contamination très rapide des surfaces dès leur exposition, ceci ne peut que se répercuter négativement sur la reproductibilité des expériences de même que sur les performances des biopuces. A partir de ces résultats, le temps d'incubation optimal a donc été fixé à 24 h.

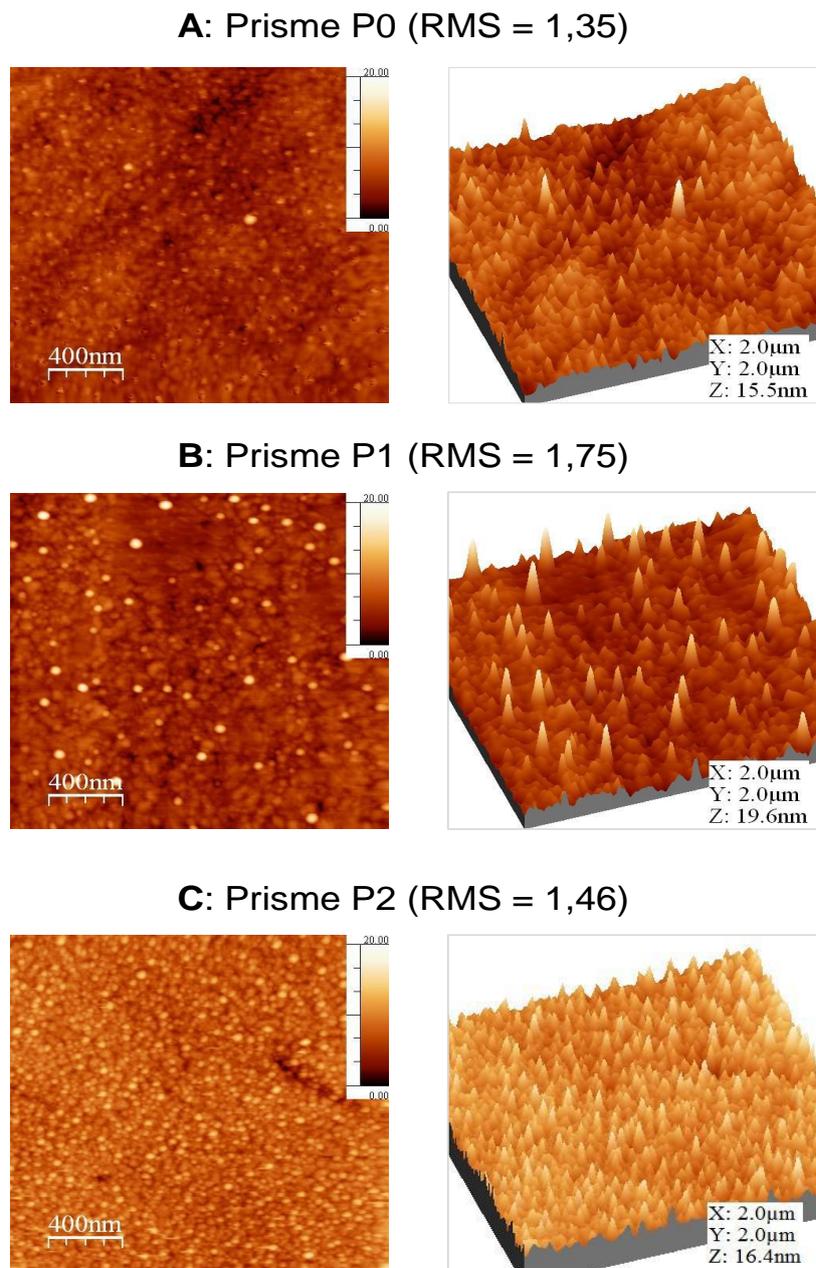


Figure 2.11 Images AFM de la surface de trois différents prismes représentées en vision planaire (à gauche) et en 3D (à droite). La surface explorée est de $4\mu\text{m}^2$. Les images ont été traitées avec logiciel WSxM et la rugosité est estimée à partir des valeurs RMS (*Root Mean Square*) des irrégularités de la surface. (A) Prisme P0 non traité au plasma. (B) et (C) Prismes P1 et P2, traités au plasma et incubés, respectivement, pendant 4 et 24 heures avant les mesures AFM.

ii) Passivation avec les thiols

La technique d'immobilisation choisie étant l'auto-assemblage de SAMs par chimisorption, les séquences d'aptamères sont de ce fait thiolées au niveau de leur extrémité 5'. Ces séquences présentent néanmoins la particularité de posséder initialement à cette extrémité un groupement amine. Suivant un protocole inspiré de Grosjean et *al.* [42], la conjugaison est réalisée via une réaction de couplage entre une molécule de 11-Mercapto-Undecane-1 N-Hydroxysuccinimide et le groupement amine terminal présent à l'extrémité 5' des aptamères (APT1 et APT2) (**Figure 2.12**).

L'immobilisation directe de sondes d'acides nucléiques ainsi thiolées sur une surface d'or a été initialement développée par Perterlinz et *al.* [35]. Le but de l'étude consistait alors à mettre en évidence les phénomènes d'hybridation et déshybridation de séquences d'ADN thiolés par SPR. Depuis, cette méthode de greffage a été précisément caractérisée par le groupe de M.J. Tarlov à travers les travaux de Herne, Steel et Levicky [33, 34, 36] portant notamment sur l'influence de la densité de surface et la longueur de la séquence sur le phénomène d'hybridation.

Il ressort notamment de ces études que la fonction thiol en 5' de l'ADN n'est pas le seul point d'attache des molécules sur l'or. Les bases azotées qui composent la séquence présentent également une affinité non négligeable pour la surface. Cette adsorption non spécifique semble avoir des conséquences négatives sur le rendement d'hybridation qui ne dépasserait pas les 5-10%. Une façon de remédier à ce problème consiste à traiter la surface, préalablement fonctionnalisée avec de l'ADN thiolé, par un agent bloquant pouvant également s'organiser en monocouche sur la surface d'or par auto-assemblage. C'est le 6-mercaptohexanol (OH-(CH₂)₆-SH), ou MCH, qui permis d'obtenir les meilleurs résultats.

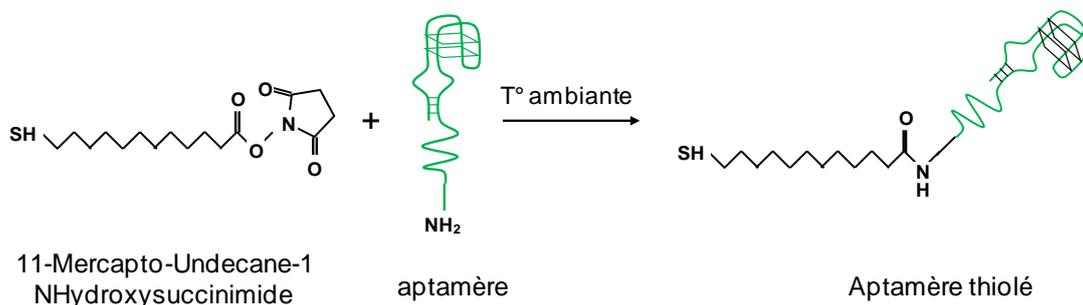
Des mesures de réflectivité [36] ont montré que ce post-traitement au MCH avait contribué à redresser les molécules d'ADN adsorbées non-spécifiquement. Favorisant ainsi leur accessibilité pour le brin complémentaire, les rendements d'hybridation obtenus avec cette méthode avoisinaient les 100%.

Partant de ce constat, il était légitime de s'interroger sur l'efficacité d'un tel traitement de surface sur les aptamères. En effet, si l'obtention de monocouches parfaitement organisées à la surface favorise le phénomène d'interaction ADN-ADN, quand est-il de l'interaction aptamère-cible qui nécessite, elle, une préservation de l'intégrité structurale des sondes ? Or, la formation de monocouches plus denses et plus compactes pourrait engendrer des phénomènes d'encombrement stérique et empêcher ainsi le repliement de l'aptamère, condition indispensable à son interaction avec la cible.

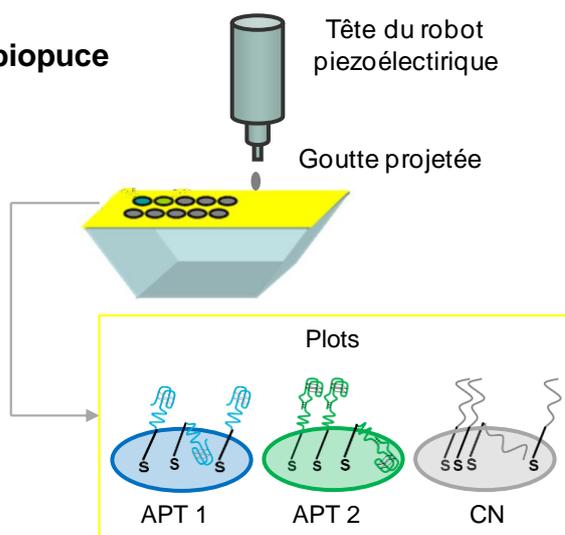
Afin de vérifier ce paramètre, une première série d'expériences a été réalisée. Deux différentes approches ont alors été testées : La première consistait à greffer les aptamères sur la surface de la biopuce sans effectuer par la suite un traitement de passivation de la surface. Pour la seconde, l'efficacité de deux agents de passivation a été évaluée selon une procédure en deux étapes. Cela consiste dans un premier temps à greffer localement les sondes d'aptamères puis, à la suite d'un temps d'incubation, passiver la surface avec un agent de nature hydrophile, le MCH ou 6-Mercaptohexanol ($\text{OH}-(\text{CH}_2)_6\text{-SH}$) ou un autre de nature hydrophobe et de longueur plus importante, le DDT ou 1-Dodécane-thiol ($\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{11}\text{-SH}$) (**Figure 2.12**). La base de ce protocole a été adaptée des travaux de Peterlinz et *al.* [35] pour l'auto-assemblage de monocouches d'ADN sur l'or. Le greffage localisé des aptamères sur la surface de la biopuce a été réalisé au moyen d'un robot de dépôt piézoélectrique. Cela permet de former des couches de molécules auto-assemblées par dépôt sans contact de la solution d'aptamères avec la surface et ce, via l'éjection de gouttes d'un faible volume (4 nL) (**Figure 2.12**).

La fonctionnalisation des puces avec les sondes n'a lieu donc qu'au lendemain du traitement plasma. Deux concentrations de sondes (APT1, APT2, CN) ont été utilisées pour le dépôt : 10 μM et 20 μM , soit des densités de greffage finales de l'ordre de ~ 5 et 8 pmol/cm^2 [43]. Ce dépôt est réalisé sous atmosphère humide (80% d'humidité) afin de limiter les phénomènes d'évaporation et les puces sont par la suite incubées, toujours sous humidité, durant un temps défini afin de permettre l'organisation des mono-couches sur la surface (**Figure 2.12**). Les prismes sont ensuite placés sous sorbonne à température ambiante puis rincés à l'eau déionisée et séchés sous flux d'argon le lendemain.

A: Couplage aptamères / thiol-NHS



B: Fonctionnalisation de la biopuce



C: Traitement de passivation au MCH ou DDT

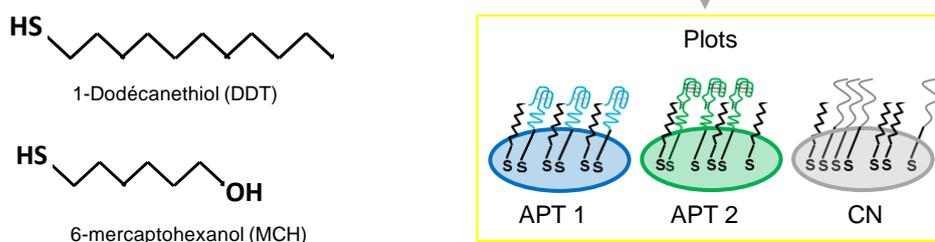


Figure 2.12 Représentation des étapes de fabrication de la biopuce à aptamères. (A) Couplage entre les séquences sondes au niveau de leur extrémité 5' avec un 11-Mercapto-Undecane-1 N-Hydroxysuccinimide. (B) Fonctionnalisation de la surface de la biopuce par une méthode de dépôt sans contact à l'aide du robot piézoélectrique. Le greffage des sondes thiolées à la surface se fait par chimisorption. Les molécules s'organisent spontanément en une mono-couche autoassemblée sur des zones localisées (plots). (C) Un traitement de passivation est réalisé suite à une étape d'incubation des biopuces. Les agents de passivation utilisés sont soit le 6-Mercaptohexanol (MCH) ou le 1-Dodécane-thiol (DDT).

Pour les puces soumises à un traitement de passivation, celui-ci est réalisé par immersion directe dans une solution de MCH ou en phase vapeur dans un cristalliseur pour le DDT. Enfin, pour toutes les puces, la dernière étape précédant la détection en SPRi a impliqué un blocage de la surface qui déjà fait ses preuves au laboratoire. Il fait intervenir une solution protéique à base de BSA (Serum Albumine Bovine) et de Cytochrome C dans laquelle les prismes sont immergés. Ce blocage, classique, permet d'éviter l'adsorption non spécifique de la THR sur l'intégralité de la surface d'or disponible lors de l'étape de détection [44].

Les puces ainsi préparées, et une fois rincées et séchées, sont placées dans le dispositif SPR. Elles présentent des plots localisés au centre de la surface d'or, au niveau duquel sera disposé la cellule de réaction hexagonale. L'allure générale de la puce ainsi que le plan de dépôt des sondes sont illustrés dans la **Figure 2.13**.

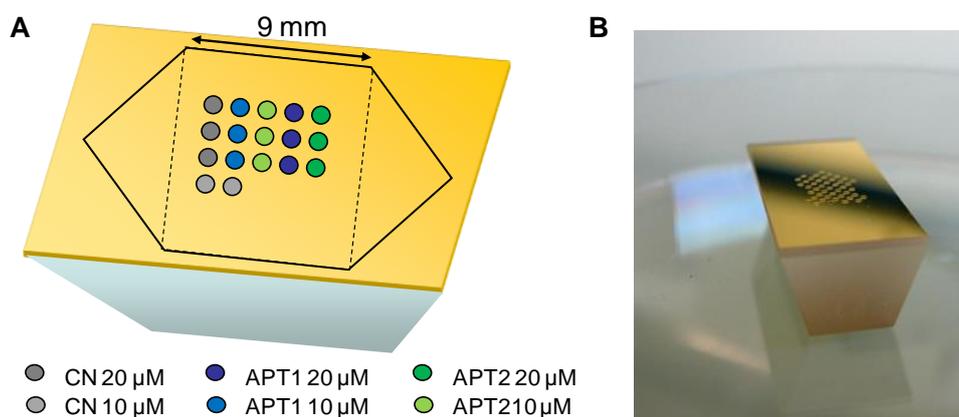


Figure 2.13 Biopuce SPRi fonctionnalisée par auto-assemblage d'aptamères thiolés. (A) Représentation du plan de dépôt utilisé pour le greffage localisé des sondes (APT1, APT2 et CN) à des concentrations de 20 et 10 µM. (B) Photo illustrant la biopuce après l'étape de dépôt sans contact.

Influence du traitement de passivation de surface sur l'interaction APT-THR

Les résultats des expériences de traitement de surface sont présentés dans la **Figure 2.14**. Les sondes sont greffées à la surface à partir de deux différentes concentrations de départ en solution : 10 et 20 μM . La concentration de THR injectée était de 50 nM, avec un temps et un débit d'injection de 8 minutes et 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ respectivement. Le tampon de course utilisé pour ces expériences SPRi a été adapté des travaux de Bock *et al.* [39] et Tasset *et al.* [40] relatifs à la sélection d'APT1 et APT2 (Voir **Annexe A**).

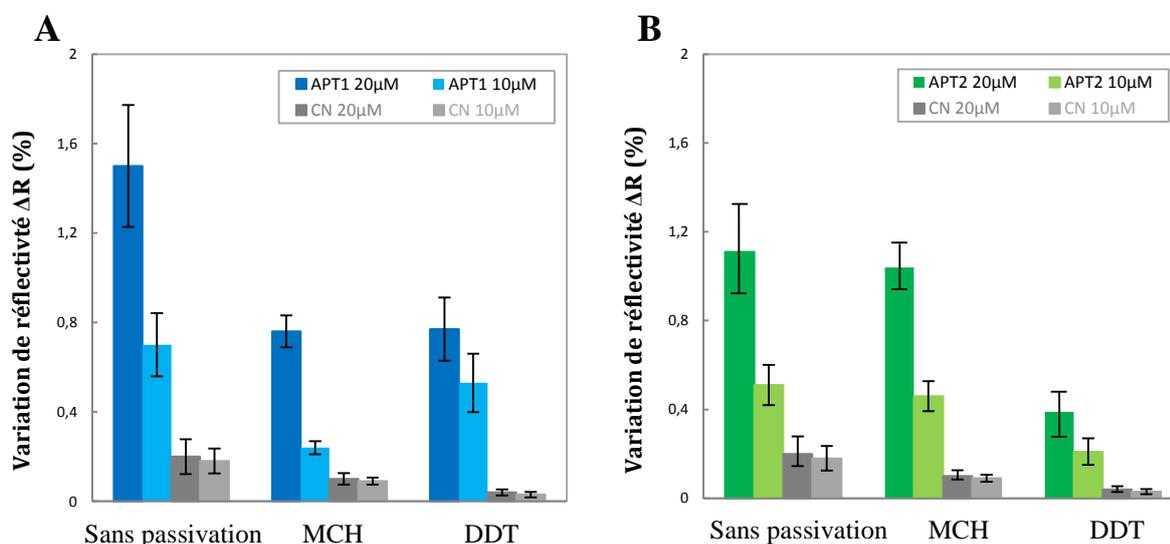


Figure 2.14 Influence du mode de passivation de surface sur l'interaction de la Thrombine avec APT1 (A) et APT 2 (B) caractérisée par SPRi. Les valeurs de variation en réflectivité illustrées correspondent aux valeurs maximales obtenues à la dernière minute d'injection de THR. La barre d'erreur correspond à l'écart type des valeurs de réflectivité maximales obtenues à partir de trois différentes expériences. Pour chaque expérience, ces valeurs sont moyennées entre les répliquats spécifiques des sondes pour lesquelles deux concentrations de dépôt (10 et 20 μM) ont été testées.

A partir de ces résultats, il est possible de constater que la tendance la plus marquée concerne l'effet de la concentration de dépôt des aptamères sur l'efficacité de leur interaction avec la thrombine. En effet, la concentration la plus élevée (20 μM) a permis l'obtention de meilleures variations de réflectivité SPR en comparaison avec celles obtenues pour une concentration de 10 μM .

La densité de greffage, que l'on peut corrélérer ici à la concentration de dépôt, a une influence majeure sur le rendement de l'interaction sondes-cibles. Si à faible concentration, cette densité risque d'être insuffisante pour générer un signal de reconnaissance en détection SPR, à trop forte concentration, elle peut atteindre rapidement un niveau de saturation, non favorable au repliement et à l'accessibilité des aptamères pour leur cible [45, 46]. Dans notre cas, sur les deux concentrations de dépôt testées, c'est celle de 20 μM qui semble néanmoins la plus adaptée, soit une densité de greffage de l'ordre de 8 pmol/cm^2 [43]. Il a en effet été démontré par Daniel et *al.* [43] que les conditions de saturation étaient atteintes à des densités de greffages supérieures à 8 pmol/cm^2 , soit une concentration de solution de dépôt de l'ordre de 30 μM .

En ce qui concerne l'interaction d'APT1 avec la thrombine (**Figure 2.14 A**), nous observons que ce sont les expériences pour lesquelles aucun traitement de surface n'a été réalisé qui présentent les variations de réflectivité les plus importantes. A titre d'exemple, le signal SPR mesuré pour les sondes APT1 (greffées à partir d'une concentration de dépôt de 20 μM) n'ayant subi aucune passivation ($\Delta R + 1,5\%$) est en moyenne deux fois plus élevé que celui obtenu pour les sondes APT1 issues des prismes bloquées avec du MCH ($\Delta R + 0,76\%$) et du DDT ($\Delta R + 0,77\%$). L'effet positif d'un agent de passivation sur l'interaction aptamère-cible, sur lequel la littérature est catégorique, n'est donc pas observé ici. Ainsi, en absence de passivation, l'accessibilité des sondes semble plus élevée. Ceci se traduit clairement par le rendement d'interaction avec la thrombine, caractérisé par la variation de réflectivité observée. L'hypothèse relative à l'adsorption non spécifique de ces mêmes sondes à la surface pourrait expliquer cela. En effet, l'adsorption d'une proportion d'aptamères via les groupements autres que les thiols pourrait contribuer à espacer significativement les sondes dont l'accrochage à la surface se fait exclusivement par le groupement thiol. La dilution de ces sondes « fonctionnelles » au niveau des plots est donc susceptible de préserver leur intégrité structurale et favoriser ainsi leur interaction avec la thrombine. Pourtant, si cette explication est acceptable, il n'est pas possible de tirer une conclusion catégorique sur l'effet positif d'une fonctionnalisation de surface sans post-passivation.

A y regarder de plus près, nous pouvons en effet remarquer que pour les expériences sans passivation, le taux de signal non spécifique lié à l'interaction de la thrombine avec la surface de l'or est plus élevé : $\Delta R + 0,2\%$ contre $\Delta R + 0,09\%$.

Par ailleurs, les variations standards des valeurs de réflectivité observées sont également beaucoup plus importantes, traduisant la difficulté de garantir une bonne reproductibilité des expériences sans post-traitement de surface. Le greffage des sondes ayant alors lieu de façon aléatoire et non homogène, notamment en fonction de la répartition des sondes fonctionnelles (adsorption à la surface par le groupement thiol uniquement), il n'est pas évident de retrouver les mêmes tendances pour chaque expérience.

Ce constat est d'autant plus flagrant si l'on confronte ces résultats avec ceux de la **Figure 2.14 B**, relatifs à l'interaction d'ATP2 avec la thrombine. Cette fois-ci, l'absence de passivation ne permet pas d'obtenir des variations de réflectivité plus importantes que celles observées pour le traitement avec le MCH.

En résumé, dans le cas de l'interaction des aptamères avec leur cible, différents paramètres entrent en jeu et influent sur le processus de reconnaissance. Il nous apparaît à présent évident que le facteur clé réside avant tout dans l'espacement des sondes au niveau de la surface afin de préserver leur faculté de repliement. Vient ensuite l'organisation de ces sondes sur la biopuce, obtenues par l'addition d'un agent de passivation.

Passivation directe par des SAMs mixtes

La prise en compte de ces critères nous amène à envisager une nouvelle voie d'exploration concernant l'optimisation de la chimie de surface. Celle-ci met en œuvre l'utilisation d'un co-adsorbant lors du greffage des aptamères sur l'or. Celui-ci sera donc préalablement présent au niveau de la solution de dépôt avec les aptamères. Il jouera ainsi le rôle de diluant mais également d'agent de passivation en permettant de redresser les sondes et corriger leur orientation. Il s'agit donc de former des SAMs mixtes (aptamères/co-adsorbant) sur les plots de la biopuce en une seule étape lors du greffage des sondes (**Figure 2.15**).

Notre choix s'est porté sur le polyéthylène glycol (PEG) thiolé de 2 kDa : $\text{CH}_3\text{O}-\text{O}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2)_{44}-\text{SH}$. De façon générale, l'utilisation de molécules de PEG en tant que diluants dans les couches auto-assemblées a déjà montré ses preuves dans la réduction des interactions non spécifiques et l'espacement des sondes à la surface [30].

De plus, ces molécules ont également la capacité de stabiliser la structure de l'ADN sur la surface [47]. C'est donc cette dernière stratégie de fonctionnalisation de la biopuce par des SAMs mixtes en une seule étape qui a été utilisée.

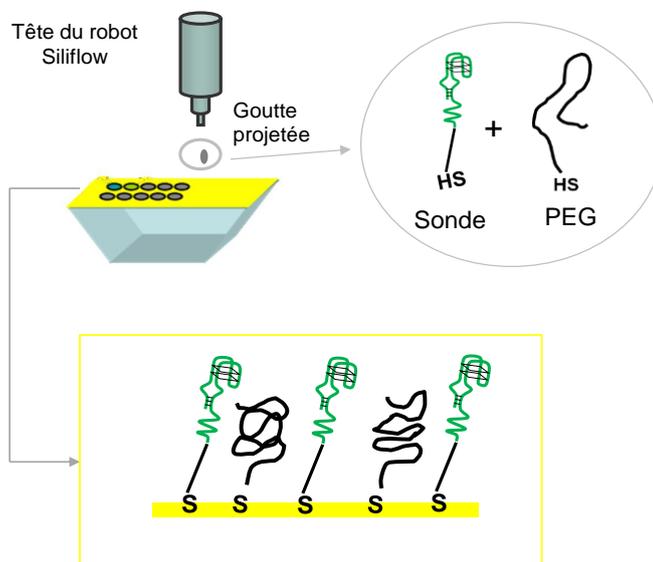


Figure 2.15 Fonctionnalisation de la biopuce en une seule étape par greffage de SAMs mixtes (sondes/PEG) via la méthode de dépôt sans contact.

Lors du dépôt, les concentrations des aptamères utilisées étaient toujours de 20 μM et 10 μM pour une concentration de PEG de 10 μM , soit un ratio APT/PEG de 2 : 1 et 1 : 1, respectivement. Le temps d'incubation sous atmosphère humide a été fixé à 30 minutes. Les expériences SPRi ont été réalisées selon les mêmes conditions que celles décrites précédemment. **La Figure 2.16 A** illustre les signaux SPR obtenus pour une injection de THR à 50 nM dans le tampon de course, tandis que la **Figure 2.16 B** présente une synthèse des signaux obtenus sur trois différentes expériences utilisant cette nouvelle stratégie de fonctionnalisation de surface.

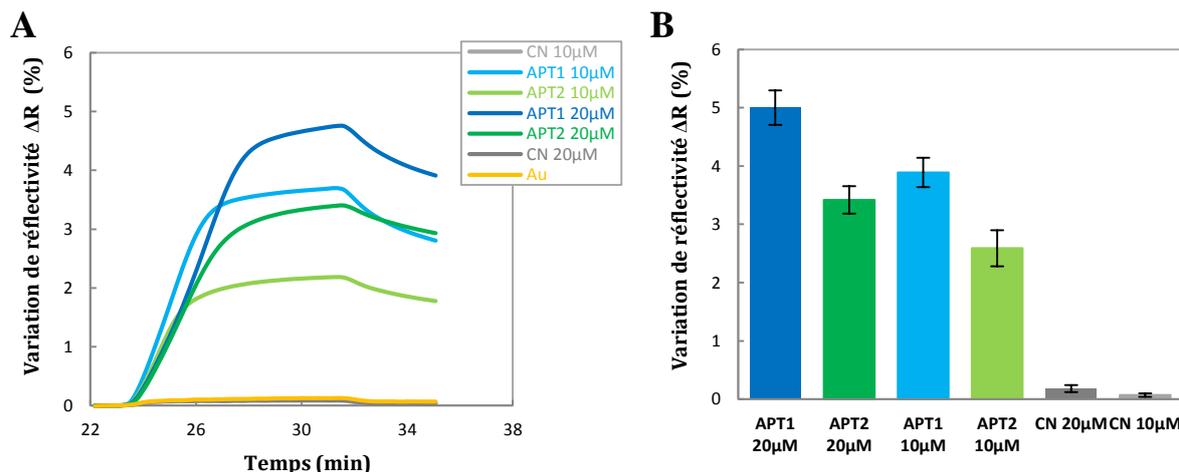


Figure 2.16 Variations de réflectivités mesurées par SPRi après injection de thrombine (50 nM). **(A)** Signaux SPR obtenus au cours d'une expérience et moyennés entre 3 réplicats pour chaque type de sonde. **(B)** La barre d'erreur correspond à l'écart type des valeurs de réflectivité maximales obtenues à partir de trois différentes expériences.

Nous observons en premier lieu que le signal SPR obtenu est plus élevé ($\Delta R + 5\%$) pour les plots APT1, ce qui concorde avec les résultats précédents (**Figure 2.14**) de même qu'avec la plupart des données de la littérature concernant l'interaction de la THR avec ces deux aptamères. Aussi, cette fois-ci encore, les plots présentant les densités de greffage les plus importantes (concentration des sondes dans la solution de dépôt: $20\ \mu\text{M}$ + PEG $10\ \mu\text{M}$) présentent de meilleurs signaux d'interaction avec la THR. Le résultat le plus remarquable concerne par ailleurs l'amplitude globale des signaux spécifiques mesurés. Ceux-ci sont en moyenne deux fois plus élevés que ceux obtenus pour les expériences sans passivation ou avec l'utilisation de MCH. Ainsi, pour les plots APT1 de forte densité ($8\ \text{pmol}/\text{cm}^2$), la variation de réflectivité atteint ici les 5% contre $1,4\%$ pour l'expérience sans passivation présentées sur la **Figure 2.14**. Nul doute que l'ajout de PEG dans la solution de dépôt contribue fortement à ce résultat. Cela permet d'assurer une meilleure accessibilité et flexibilité des aptamères pour reconnaître la thrombine, ce qui rejoint les résultats présentés dans la littérature [46]. De plus, le traitement PEG remplit parfaitement son rôle pour la réduction du signal non spécifique. En effet, les signaux détectés pour les plots contrôles (CN) sont très faibles ($\Delta R + 0,03\%$) et le rapport signal/bruit de détection de la thrombine très élevé (~ 160).

A partir de ces résultats, il a été observé qu'une détection spécifique était possible (rapport signal/bruit significatif) jusqu'à une concentration de thrombine de 5 nM. A de plus faibles concentrations, il semble évident que l'interaction des aptamères avec la thrombine est limitée par la diffusion de cette dernière dans le milieu. L'optimisation du temps et du débit d'injection porte à croire qu'une amélioration des limites de détection est tout à fait possible. Ceci a effectivement été réalisé par C. Daniel dans le cadre de ses travaux de thèse au laboratoire [43, 48]. En utilisant le protocole de fonctionnalisation de surface développé ici, il a été possible d'atteindre une limite de détection de 100 pM associée à une gamme linéaire de quantification de 2 ordres de grandeurs sans aucun système d'amplification mais par simple ajustement des paramètres de détection.

Influence des temps d'incubation des biopuces sur la stabilité de la chimie de surface

Si l'ensemble des résultats décrits précédemment permet déjà de rendre compte de l'efficacité du protocole développé, il apparaît légitime de s'interroger sur la stabilité d'une telle chimie de surface au cours du temps. Les outils de détection, notamment les biopuces, doivent en effet satisfaire aux conditions de sensibilité, spécificité mais également de stabilité. A terme, ces caractéristiques pourraient alors rendre possible une utilisation analytique dans divers domaines d'application.

Si les SAMs sont connues pour être stables au contact de l'éthanol, elles peuvent néanmoins désorber très rapidement lorsqu'elles sont soumises à des températures élevées (supérieures à 70°C) ou exposées à une source de lumière en présence d'oxygène. Il est ainsi important de minimiser l'exposition du substrat à l'oxygène durant le processus d'assemblage afin de limiter l'oxydation des thiols en sulfides [28, 49], mais aussi d'améliorer la reproductibilité des propriétés chimiques de la biopuce [50]. Le temps d'incubation des puces sous atmosphère humide après l'étape de dépôt, et avant le séchage sous sorbonne, est donc un paramètre déterminant, aussi bien pour l'organisation et l'orientation des molécules à la surface que pour leur stabilité dans le temps.

Si dans les dernières expériences (SAMs mixtes), ce temps d'incubation après l'étape de dépôt a été fixé à 30 min, une autre détection SPR a été réalisée sur un prisme pour lequel ce temps d'incubation était trois fois plus long, soit 90 min.

La **Figure 2.17** propose de comparer les signaux SPR obtenus lors de ces deux expériences (temps d'incubation de 30 et de 90 min).

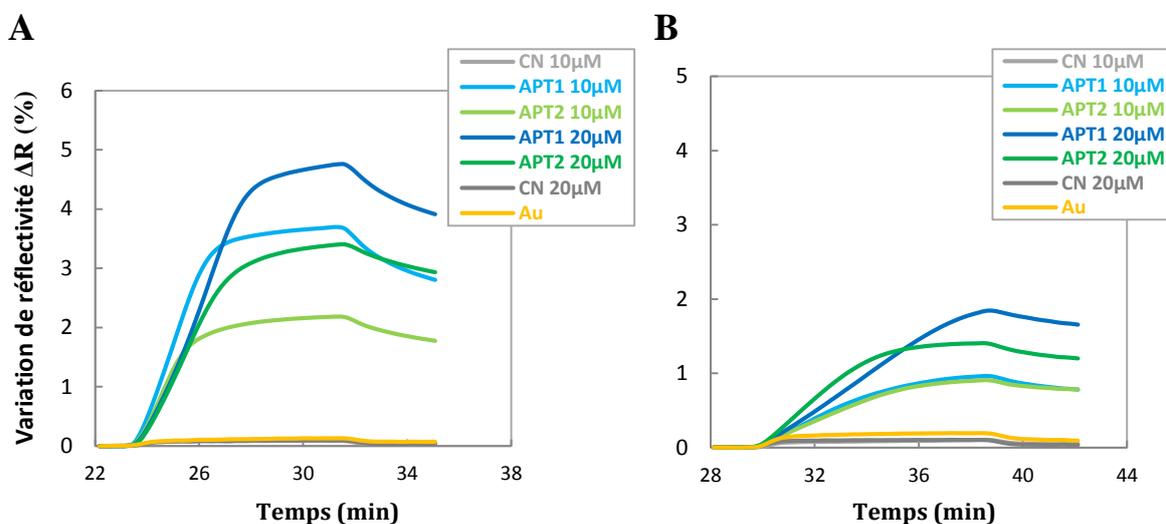


Figure 2.17 Influence du temps d'incubation des biopuces sur l'interaction aptamère-thrombine caractérisée par SPRi. Des temps d'incubation de 30 minutes (**A**) et 90 minutes (**B**) ont été testés. Chaque courbe correspond à la moyenne des signaux SPR obtenus sur 3 réplicats. Les injections de thrombine ont été réalisées à une concentration de 50 nM.

Nous pouvons remarquer que l'augmentation du temps d'incubation à 90 minutes (**Figure 2.17 B**) a eu pour conséquence la diminution globale des signaux SPR mesurés. A titre d'exemple, la variation de réflectivité maximale (ΔR) observée pour les plots APT1 (20 μ M) est passée de 4,8 % pour un temps d'incubation de 30 min à 1,8 %, soit une perte de réactivité d'environ 60 %. Nul doute que l'augmentation de la durée d'incubation favorise la formation de monocouches, certes, parfaitement organisées, mais également très compactes avec des densités de greffage plus importantes [51], pouvant limiter l'accessibilité des sondes pour l'interaction avec la cible.

Afin de déterminer un temps d'incubation optimal, ce paramètre a été corrélé à la reproductibilité des signaux SPR mesurés après une période de 12 jours. En d'autres termes, cela revient à évaluer la stabilité de la chimie de surface en fonction du temps d'incubation lors de l'étape de greffage des sondes.

La Figure 2.18 présente la variation de réflectivité maximale mesurée pour les plots APT1 (20 μ M) lors d'une détection de thrombine par SPRi.

Quatre puces ont été fonctionnalisées suivant le protocole habituel mais pour lequel différents temps d'incubation ont été définis : 0, 30, 60 et 90 min. Ces puces ont été conservées dans un tampon PBS (pH 7,4) durant 12 jours, période au bout de laquelle elles ont été soumises une nouvelle fois à des mesures SPR.

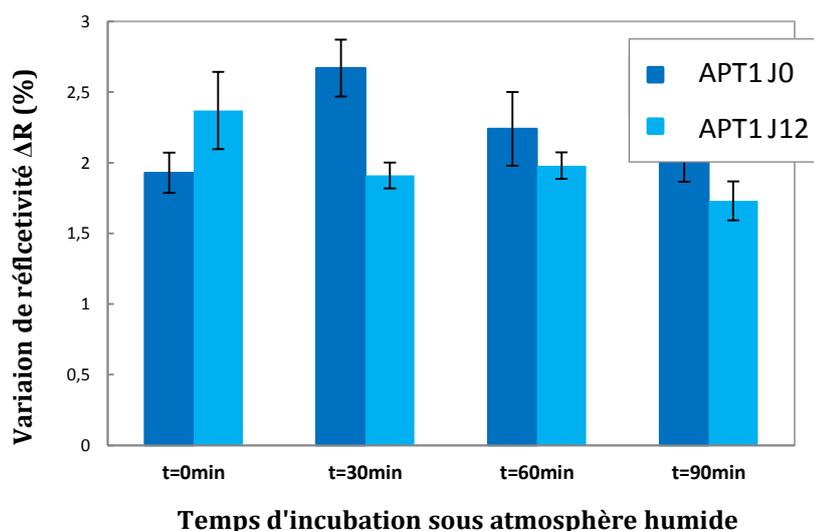


Figure 2.18 Influence du temps d'incubation après l'étape de dépôt sur l'interaction APT1-THR. Quatre temps d'incubation ont été testés sur quatre différentes puces : 0, 30, 60 et 90 minutes. Les premières mesures de réflectivités par SPRi, à J0, sont représentées en bleu foncé. Les secondes mesures, à J12, sont représentées en bleu clair. Les valeurs de réflectivité maximale sont mesurées à la dernière minute d'injection de thrombine (50 nM). La barre d'erreur correspond à l'écart type des valeurs de réflectivité maximale obtenues sur trois réplicats.

Ces résultats démontrent qu'au cours d'une première mesure SPRi, une meilleure sensibilité de la puce est effectivement observée pour un temps d'incubation fixé à 30 minutes. Toutefois, les mesures effectuées 12 jours plus tard révèlent que cette tendance évolue négativement, nous contraignant à relativiser notre conclusion. En effet, la perte de sensibilité la plus drastique est observée pour $t = 30$ min tandis que la variation de signal (entre la première et la deuxième mesure) la moins élevée concerne le prisme pour lequel le temps d'incubation a été fixé à 60 minutes. Ainsi, pour une densité de greffage optimale et une meilleure stabilité de la chimie de surface, il est préférable de choisir un temps d'incubation de 60 minutes au lieu de 30 minutes. La reproductibilité de nos expériences de détection n'en sera que favorisée.

Ce paramètre était le dernier à être optimisé pour la validation de notre protocole de fonctionnalisation de surface en vue d'une détection en SPRi. La transposition de cette stratégie au modèle *adénosine* est présentée dans la section suivante.

2.4 Application au modèle *adénosine*

Une détection directe de l'adénosine par imagerie de résonance des plasmons de surface (SPRi), couplée de plus à l'utilisation de la chimie thiol n'a encore jamais pu être réalisée sans l'emploi des diverses stratégies d'amplification explicitées dans le Chapitre 1. Ainsi, comme nous l'avons déjà mentionné, l'objectif de ces travaux de thèse consiste à explorer des stratégies indirectes permettant de détecter l'adénosine par SPRi au moyen d'une biopuce à aptamères. Ces stratégies étant développées dans les chapitres 3 et 4, il apparaît peu pertinent de les présenter dans cette section afin de valider le protocole de fonctionnalisation établi. La validation de la chimie de surface par greffage de SAMs mixtes n'a donc préalablement concerné que des tests d'hybridation des aptamères anti-adénosine (APT4, APT8) tels que présentés dans la section 2.1. Les sondes ont été greffées à une concentration de 20 μM pour un ratio de SAMs mixtes sondes/PEG de 2 : 1.

Préalablement à la détection en SPRi, le blocage BSA/Cytochrome C a été remplacé par un blocage avec le PEG 2kDa utilisé pour la co-adsorption. Ne s'agissant plus d'une interaction avec une protéine, et compte-tenu des performances remarquables des PEG pour neutraliser le signal non spécifique sur la surface, le recours à la stratégie de blocage initiale n'avait plus de réel intérêt.

Le tampon de course est cette fois-ci composé de : HEPES 10 mM, MgCl_2 5 mM, NaCl 150 mM et 0,005 % Tween20, ajusté à pH 7,4, préparé et filtré au laboratoire.

Les mesures d'hybridation SPRi relatives à l'interaction entre APT4 et APT8 immobilisés à la surface de la biopuce et une séquence complémentaire sont représentées dans la **Figure 2.19**

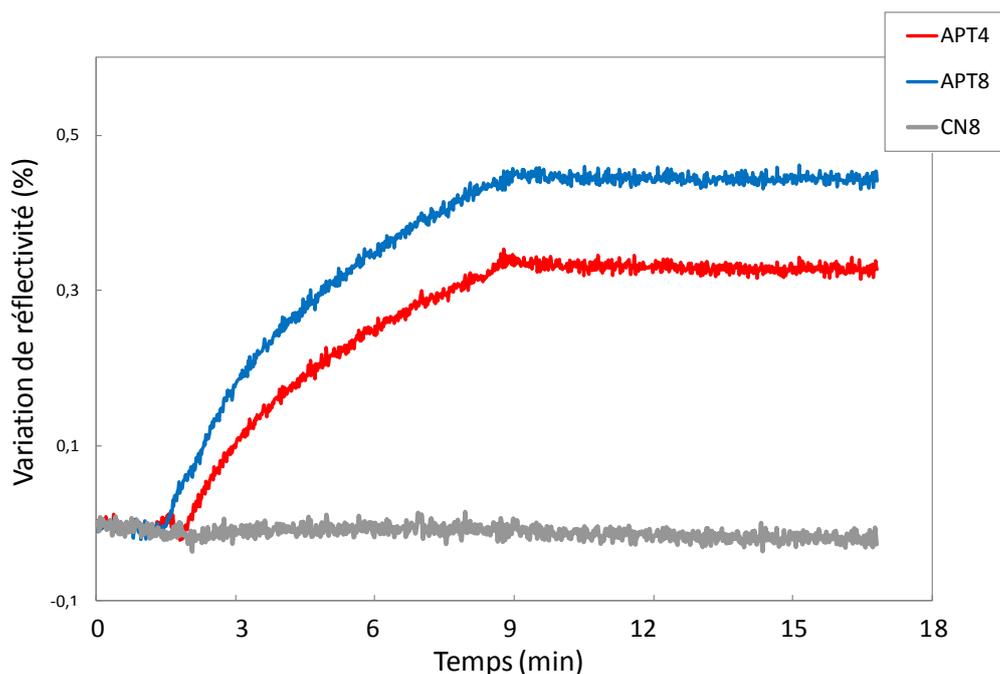


Figure 2.19 Suivi de l'hybridation des sondes d'aptamères (APT4, APT8) avec leur séquence complémentaire. La variation de réflectivité a été mesurée après injection d'un aptamère complémentaire à $1 \mu\text{M}$. Les courbes représentent les signaux moyennés entre 3 réplicats pour chaque type de sonde.

L'hybridation des séquences APT4 et APT8 avec leur complémentaire a pu être détectée par suivi du signal SPR. Nous remarquons qu'il n'y a pas de différence significative entre les signaux SPR spécifiques mesurés pour APT4 et APT8. Notre attention se porte toutefois principalement sur le taux de signal non-spécifique caractérisé par l'interaction de la séquence complémentaire avec les plots contrôles (CN8). Celui-ci étant nul, il est possible d'en déduire que la stratégie de fonctionnalisation développée ici semble adaptée pour l'étude de l'interaction des aptamères immobilisés avec leur cible, qu'il s'agisse d'une molécule d'ADN complémentaire ou d'adénosine, comme nous le verrons dans le chapitre suivant.

2.5 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons présenté les stratégies d'immobilisation des sondes d'aptamères développées dans le but d'optimiser la reconnaissance moléculaire avec leur cible. La validation du protocole de fonctionnalisation de surface a nécessité le recours au modèle *thrombine* (THR), plus adapté à une détection directe par imagerie de résonance des plasmons de surface (SPRi). C'est la technique d'adsorption de monocouches auto-assemblées (SAMs) qui a été retenue pour le greffage des sondes à la surface. La chimisorption d'aptamères thiolés présente l'avantage de permettre la formation d'une monocouche de faible épaisseur, favorable à une répartition homogène des molécules à la surface. Afin de garantir une bonne accessibilité des aptamères, l'optimisation du protocole a impliqué en premier lieu la passivation de la surface par deux composants: le 6-Mercaptohexanol (MCH) et le 1-Dodécane-thiol (DDT), selon une procédure en deux étapes. Cette procédure consiste dans un premier temps à immobiliser les aptamères puis à passiver la surface d'or avec l'un de ces composés thiolés. Contrairement à la plupart des données de la littérature, nos résultats ont montré que le traitement de surface par un de ces agents de passivation n'améliorait pas spécifiquement l'interaction des aptamères avec la THR. Un meilleur rapport signal/bruit a été obtenu lorsqu'aucun de ces agents n'était présent. Toutefois, dans ce cas, la reproductibilité des expériences était moins évidente. Cette première stratégie de traitement de surface ne permettait donc pas de satisfaire les caractéristiques voulues.

En plus de l'accessibilité des sondes, un paramètre tout aussi critique semblait influencer sur le rendement d'interaction spécifique : la densité de greffage. Nous nous sommes donc orientés vers l'utilisation d'un co-adsorbant lors de l'étape de dépôt afin de former, en une seule étape, des SAMs mixtes sur les plots de détection. Ce co-adsorbant, un polyéthylène glycol de 2 kDa (PEG), permettait en effet de diluer les sondes à la surface, éliminant ainsi efficacement les interactions non spécifiques et espaçant correctement les molécules afin d'assurer leur repliement. Au final, c'est cette dernière stratégie qui a permis l'amélioration considérable de la sensibilité de détection des biopuces. Les signaux d'interaction spécifique mesurés étaient en moyenne deux fois plus importants que ceux retrouvés pour la première stratégie employée.

Le dernier ajustement du protocole de fonctionnalisation a concerné l'optimisation du temps d'incubation des puces suite à l'étape de greffage des sondes. Corrélé au critère de stabilité dans le temps, celui-ci a finalement été fixé à 60 minutes.

Les optimisations apportées dans le cadre de ces expériences ont permis la mise au point d'une biopuce dont les performances de détection sont jugées très satisfaisantes. Cet outil peut donc déjà servir de base pour étudier l'interaction des aptamères avec leur cible à partir d'un modèle différent de la thrombine. Ainsi, le protocole de fabrication de la biopuce établi ici a pu être pré-validé pour le modèle qui nous intéresse, celui de l'*adénosine*, via des tests d'hybridation des séquences d'aptamères avec leur complémentaire. Il a ensuite été utilisé pour caractériser l'interaction de l'adénosine avec ses aptamères, comme nous le verrons dans les chapitres suivants.

BIBLIOGRAPHIE

1. Maillart, E., Développement d'un système optique d'imagerie en résonance de plasmons de surface pour l'analyse simultanée de multiples interactions biomoléculaires en temps réel. Paris, Paris-Sud XI Orsay, 2004. **288**.
2. Otto, A., Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection. *Zeitschrift Fur Physik*, 1968. **216**(4): p. 398-410.
3. Kretschmann, E. and H. Raether, Radiative decay of nonradiative surface plasmons excited by light. *Zeitschrift Fur Naturforschung Part a-Astrophysik Physik Und Physikalische Chemie*, 1968. **23**(12).
4. Liedberg, B., C. Nylander, and I. Lunström, Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. *Sensors and Actuators*, 1983. **4**(0): p. 299-304.
5. Ritchie, R.H., Surface plasmons in solids. *Surface Science*, 1973. **34**(1): p. 1-19.
6. Stenberg, E., et al., Quantitative determination of surface concentration of protein with surface plasmon resonance using radiolabeled proteins. *Journal of Colloid and Interface Science*, 1991. **143**(2): p. 513-526.
7. Pollard-Knight, D., et al., Immunoassays and nucleic acid detection with a biosensor based on surface plasmon resonance. *Annales de biologie clinique*, 1990. **48**(9): p. 642-646.
8. Piscevic, D., et al., Oligonucleotide hybridization observed by surface plasmon optical techniques. *Applied Surface Science*, 1995. **90**(4): p. 425-436.
9. Thiel, A.J., et al., In Situ Surface Plasmon Resonance Imaging Detection of DNA Hybridization to Oligonucleotide Arrays on Gold Surfaces. *Analytical Chemistry*, 1997. **69**(24): p. 4948-4956.
10. Guedon, P., et al., Characterization and Optimization of a Real-Time, Parallel, Label-Free, Polypyrrole-Based DNA Sensor by Surface Plasmon Resonance Imaging. *Analytical Chemistry*, 2000. **72**(24): p. 6003-6009.
11. Scarano, S., et al., Surface plasmon resonance imaging for affinity-based biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*. **25**(5): p. 957-966.
12. Opdahl, A., et al., Independent control of grafting density and conformation of single-stranded DNA brushes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007. **104**(1): p. 9-14.
13. Sassolas, A., B.a.D. Leca-Bouvier, and L.c.J. Blum, DNA Biosensors and Microarrays. *Chemical Reviews*, 2007. **108**(1): p. 109-139.
14. Sassolas, A., L. Blum, and B.D. Leca-Bouvier, Optical detection systems using immobilized aptamers. *Biosensors and Bioelectronics*, 2011. **26**(9): p. 3725-3736.
15. Shiping, S., et al., Aptamer-based biosensors. *Trends in Analytical Chemistry*, 2008. **27**(2): p. 108-117.
16. Vericat, C., et al., Self-assembled monolayers of thiols and dithiols on gold: new challenges for a well-known system. *Chemical Society Reviews*, 2010. **39**(5): p. 1805-1834.
17. Piyushs, S., et al., Electrochemically synthesized polymers in molecular imprinting for chemical sensing. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **402**(10): p. 3177-3204.
18. Serge, C. and A. Lepellec, Poly(pyrrole-biotin): a new polymer for biomolecule grafting on electrode surfaces. *Electrochimica Acta*, 1999. **44**(11): p. 1833-1836.
19. Da Silva, S., et al., Biotinylated polypyrrole films: an easy electrochemical approach for the reagentless immobilization of bacteria on electrode surfaces. *Bioelectrochemistry*, 2004. **63**(1-2): p. 297-301.

20. Livache, T., et al., Polypyrrole electrospotting for the construction of oligonucleotide arrays compatible with a surface plasmon resonance hybridization detection. *Synthetic metals*, 2001. **121**(1-3): p. 1443-1444.
21. Mercey, E., et al., Polypyrrole Oligosaccharide Array and Surface Plasmon Resonance Imaging for the Measurement of Glycosaminoglycan Binding Interactions. *Analytical Chemistry*, 2008. **80**(9): p. 3476-3482.
22. Suraniti, E., et al., Real-time detection of lymphocytes binding on an antibody chip using SPR imaging. *Lab on a Chip*, 2007. **7**(9): p. 1206-1208.
23. Fiche, J.B., et al., Point Mutation Detection by Surface Plasmon Resonance Imaging Coupled with a Temperature Scan Method in a Model System. *Analytical Chemistry*, 2008. **80**(4): p. 1049-1057.
24. Fiche, J.B., et al., Temperature Effects on DNA Chip Experiments from Surface Plasmon Resonance Imaging: Isotherms and Melting Curves. *Biophysical Journal*, 2007. **92**(3): p. 935-946.
25. Fuchs, J., et al., Effects of formamide on the thermal stability of DNA duplexes on biochips. *Analytical Biochemistry*, 2010. **397**(1): p. 132-134.
26. Fuchs, J., et al., Salt Concentration Effects on Equilibrium Melting Curves from DNA Microarrays. *Biophysical Journal*, 2010. **99**(6): p. 1886-1895.
27. Watterson, J.H., et al., Effects of Oligonucleotide Immobilization Density on Selectivity of Quantitative Transduction of Hybridization of Immobilized DNA. *Langmuir*, 2000. **16**(11): p. 4984-4992.
28. Bain, C.D., H.A. Biebuyck, and G.M. Whitesides, Comparison of self-assembled monolayers on gold: coadsorption of thiols and disulfides. *Langmuir*, 1989. **5**(3): p. 723-727.
29. Nuzzo, R.G. and D.L. Allara, Adsorption of bifunctional organic disulfides on gold surfaces. *Journal of the American Chemical Society*, 1983. **105**(13): p. 4481-4483.
30. Love, J.C., et al., Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology. *Chemical Reviews*, 2005. **105**(4): p. 1103-1170.
31. Kong, B., Y. Kim, and I.S. Choi, pH-Dependent Stability of Self-Assembled Monolayers on Gold. *Bull. Korean Chem. Soc.* 2008, Vol. 29, No. 9 1843. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 1995. **29**(9): p. 1843.
32. Büttner, M., T. Belser, and P. Oelhafen, Stability of Thiol-Passivated Gold Particles at Elevated Temperatures Studied by X-ray Photoelectron Spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2005. **109**(12): p. 5464-5467.
33. Herne, T.M. and M.J. Tarlov, Characterization of DNA Probes Immobilized on Gold Surfaces. *Journal of the American Chemical Society*, 1997. **119**(38): p. 8916-8920.
34. Steel, A.B., et al., Immobilization of Nucleic Acids at Solid Surfaces: Effect of Oligonucleotide Length on Layer Assembly. *Biophysical Journal*, 2000. **79**(2): p. 975-981.
35. Peterlinz, K.A., et al., Observation of Hybridization and Dehybridization of Thiol-Tethered DNA Using Two-Color Surface Plasmon Resonance Spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*, 1997. **119**(14): p. 3401-3402.
36. Levicky, R., et al., Using Self-Assembly To Control the Structure of DNA Monolayers on Gold: A Neutron Reflectivity Study. *Journal of the American Chemical Society*, 1998. **120**(38): p. 9787-9792.
37. Lee, C.J. and J.E. Ansell, Direct thrombin inhibitors. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 2011. **72**(4): p. 581-592.
38. Shuman, M.A. and P.W. Majerus, The measurement of thrombin in clotting blood by radioimmunoassay. *The Journal of Clinical Investigation*, 1976. **58**(5): p. 1249-1258.

39. Bock, L.C., et al., Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin. *Nature*, 1992. **355**(6360): p. 564-566.
40. Tasset, D.M., M.F. Kubik, and W. Steiner, Oligonucleotide inhibitors of human thrombin that bind distinct epitopes. *Journal of Molecular Biology*, 1997. **272**(5): p. 688-698.
41. Huntington, J.A., Molecular recognition mechanisms of thrombin. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2005. **3**(8): p. 1861-1872.
42. Grosjean, L., et al., A polypyrrole protein microarray for antibody-antigen interaction studies using a label-free detection process. *Analytical Biochemistry*, 2005. **347**(2): p. 193-200.
43. Daniel, C., et al., Solution-Phase vs Surface-Phase Aptamer-Protein Affinity from a Label-Free Kinetic Biosensor. *PLoS ONE*, 2013. **8**(9): p. e75419.
44. Rabe, M., et al., Surface Organization and Cooperativity during Nonspecific Protein Adsorption Events. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2008. **112**(44): p. 13971-13980.
45. Balamurugan, S., et al., Designing Highly Specific Biosensing Surfaces Using Aptamer Monolayers on Gold. *Langmuir*, 2006. **22**(14): p. 6446-6453.
46. Zhang, X. and V.K. Yadavalli, Surface immobilization of DNA aptamers for biosensing and protein interaction analysis. *Biosensors and Bioelectronics*, 2011. **26**(7): p. 3142-3147.
47. Boozer, C., S. Chen, and S. Jiang, Controlling DNA Orientation on Mixed ssDNA/OEG SAMs. *Langmuir*, 2006. **22**(10): p. 4694-4698.
48. Daniel, C., et al., Real time monitoring of thrombin interactions with its aptamers: Insights into the sandwich complex formation. *Biosensors and Bioelectronics*, 2013. **40**(1): p. 186-192.
49. Bain, C.D., et al., Formation of monolayer films by the spontaneous assembly of organic thiols from solution onto gold. *Journal of the American Chemical Society*, 1989. **111**(1): p. 321-335.
50. Laibinis, P.E., et al., Comparison of the structures and wetting properties of self-assembled monolayers of n-alkanethiols on the coinage metal surfaces, copper, silver, and gold. *Journal of the American Chemical Society*, 1991. **113**(19): p. 7152-7167.
51. Peterson, A.W., R.J. Heaton, and R.M. Georgiadis, The effect of surface probe density on DNA hybridization. *Nucleic Acids Research*, 2001. **29**(24): p. 5163-5168.

CHAPITRE 3

DÉTECTION DE L'ADÉNOSINE PAR AMPLIFICATION DU SIGNAL SPRi

3.1 Amplification du signal SPR	69
3.1.1 Introduction	69
3.1.2 Les nanoparticules comme agents d'amplification	71
3.1.3 Stratégie de détection développée	80
3.2 Caractéristiques et fonctionnalisation des nanoparticules d'or	83
3.2.1 Choix des nanoparticules d'or	83
3.2.2 Couplage aptamères-nanoparticules d'or	85
3.2.3 Stratégies de blocage des surfaces pour la réduction du signal non spécifique ..	94
3.2.4 Caractéristiques de la cinétique d'amplification par SPRi.....	99
3.3 Application à la détection d'adénosine	105
3.3.1 Détection via l'interaction des conjugués AuNPs-SplitAPT avec les sondes SplitAPT8.....	105
3.3.2 Détection au moyen des séquences sondes SplitAPT4	108
3.4 Conclusion	113
BIBLIOGRAPHIE	116

3.1 Amplification du signal SPR

3.1.1 Introduction

Dans le cadre d'une mesure SPR, la résolution du capteur peut être définie comme la plus petite variation d'indice de réfraction mesurable par le système. Le changement local d'indice de réfraction étant proportionnel aux variations de masse, la résolution permet donc de renseigner sur la limite de détection des dispositifs. Si ce paramètre peut varier en fonction de l'appareil de mesure et des performances de chacun de ses composants, il est néanmoins admis que les capteurs SPRi présentent une limite de détection de l'ordre de 1 pg/mm² [1]. Cette sensibilité peut aussi être exprimée sous forme de concentration minimale détectable. Elle a été évaluée à 10 nM dans le cas de l'hybridation d'oligonucléotides de 18 bases [2] et de 15 bases [3]. Par ailleurs, pour une molécule de masse molaire avoisinant les 1000 g/mol (1 kDa), une détection directe se trouvera limitée à une concentration de 100 nM [4]. L'amélioration de la sensibilité de la SPR présente alors un intérêt non négligeable car elle devrait permettre d'élargir significativement la gamme de molécules détectées, indépendamment de leur taille et de leur concentration.

Différentes méthodes ont été développées pour augmenter les performances de la SPR. Certaines se focalisent sur l'aspect purement technique du système en proposant d'exploiter d'autres propriétés de la résonance des plasmons du surface, tel que le suivi de la phase de l'onde réfléchie [5]. Néanmoins, cette méthode impose des contraintes drastiques en termes de stabilité de mesure, et paraît donc peu adaptée à l'étude des interactions biomoléculaires. Une autre stratégie consiste à coupler la mesure quantitative de la SPR avec une mesure qualitative telle que la spectroscopie de masse. Le plus souvent, le spectromètre de masse utilisé est de type MALDI-TOF, couplant une source d'ionisation laser assistée par une matrice (MALDI, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation) et un analyseur de temps de vol des particules ionisées (TOF, Time Of Flight mass spectroscopy). Ceci a notamment permis de différencier les liaisons non-spécifiques et de détecter des molécules cibles jusqu'à des concentrations atteignant le picomolaire [6]. Enfin, une toute autre méthode d'amélioration des performances SPR, moins contraignante en termes d'appareillage, est cette fois-ci basée sur l'exaltation physique du signal SPR plutôt que sur l'augmentation de la sensibilité intrinsèque du système.

L'application d'une telle stratégie pour la détection de petites molécules implique donc l'utilisation d'un agent amplificateur du signal qui interagirait directement ou indirectement avec les molécules d'intérêts (sondes et cibles). Les principaux développements réalisés dans ce sens ont concerné :

- L'utilisation d'anticorps selon un principe de détection par inhibition indirecte ou par compétition (**Figure 3.1**). Dans ce dernier cas, la petite molécule est liée à un marqueur, limitant ainsi sa capacité d'interaction spécifique. L'emploi d'une telle stratégie nécessite également qu'un anticorps spécifique ait été préalablement sélectionné pour reconnaître la cible [7]. Le cas échéant, certaines petites molécules ont pu être détectées par cette méthode telles que la méthamphetamine [8], l'acide domoïque [9] ou encore le 2,4,6-trinitrotoluène (TNT) [10].
- Des configurations de type *sandwich* [11]. Cette méthode permet d'amplifier le signal de l'interaction biomoléculaire d'intérêt entre les sondes et la cible, appelée interaction primaire, par une autre interaction, dite secondaire, entre une biomolécule (un anticorps par exemple) et la cible. Il s'agit donc de passer d'un signal correspondant à la fixation de la cible à celui correspondant à la fixation de la cible et de la molécule secondaire. Ce gain sera donc d'autant plus important que la masse de la molécule secondaire sera élevée. Ainsi, il n'est pas étonnant que celle-ci soit également couplée à une autre molécule ou à une nanoparticule d'or (AuNP) afin d'amplifier significativement le signal [12] (**Figure 3.1**). Toutefois, la mise en œuvre d'un protocole expérimental pour ce type de détection nécessite généralement un nombre conséquent d'étapes. Le gain de sensibilité obtenu s'accompagne par ailleurs d'une perte d'information car le besoin d'attendre l'interaction secondaire pour détecter le signal se fait au détriment du suivi en temps réel de la cinétique de l'interaction. Enfin, en plus des encombrements stériques susceptibles d'être générés par ce type de configuration, une dernière limitation concerne la structure même de l'analyte qui devra présenter non plus un, mais deux sites de liaisons.
- L'utilisation de nanomatériaux, dont la revue de Zeng et *al.* [13] présente les principales caractéristiques et applications. Ceux-ci peuvent servir à amplifier le signal par modification du substrat (recouvrement par une couche de graphène, réseaux de nanoparticules, couche de silice) ou par marquage des molécules d'intérêt (nanoparticules à base d'or, d'argent, de latex ou magnétiques). Néanmoins, du fait de leurs propriétés optiques particulières explicitées dans la prochaine section, ce sont les nanoparticules d'or qui ont la faveur des stratégies d'amplification du signal SPR, notamment pour l'application qui nous intéresse, à savoir, la détection de petites molécules.

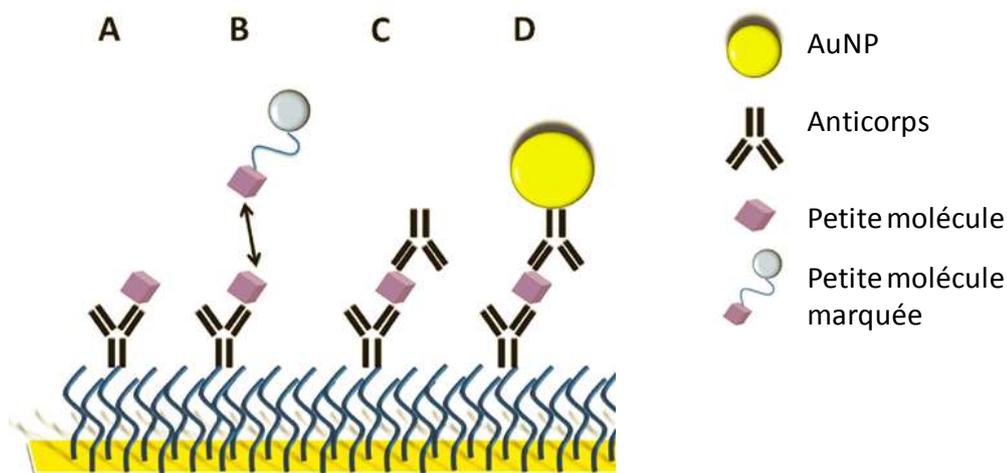


Figure 3.1 Représentation schématique de différentes stratégies de détection de petites molécules basées sur l'utilisation d'anticorps par inhibition indirecte (A), compétition (B) et configuration sandwich avec une anticorps secondaire (C) ou une nanoparticule d'or (D). Adapté de Zeng et *al.* [13].

3.1.2 Les nanoparticules d'or comme agents d'amplification

Propriétés optiques

Une nanoparticule d'or (AuNP), qui correspond à un assemblage de quelques centaines à quelques milliers d'atomes, est le terme générique définissant tout objet dont au moins une des trois dimensions est de taille nanométrique (inférieure à 100 nm). Dans ce cas, contrairement aux matériaux macroscopiques, un objet nanométrique, dont la fraction des atomes présents au niveau de la surface est loin d'être négligeable, va offrir de nouvelles propriétés à la matière. Celles-ci concernent notamment la température de fusion du matériau, sa dureté, mais également sa dynamique d'interaction avec les champs électromagnétiques (lumière). Cette interaction intéresse tout particulièrement les physiciens et a fait l'objet d'un nombre conséquent d'études. La première d'entre elles, consacrée aux nanoparticules d'or, a été réalisée par M. Faraday en 1857 et a permis de mettre en évidence la relation entre la couleur des suspensions colloïdales et la taille de nanoparticules [14]. A l'échelle nanométrique, il présente des propriétés optiques singulières. En effet, du fait d'un rapport surface/volume élevé et d'une dimension inférieure ou du même ordre de grandeur que la longueur d'onde de la lumière dans le visible, l'interaction entre des photons et une nanoparticule d'or entraîne, par excitation des électrons libres de surface, des effets de résonance particulièrement élevés (**Figure 3.2**).

Ces oscillations électroniques créent une séparation des charges électriques à la surface de la particule induisant une forte augmentation du champ électrique par effet de confinement.

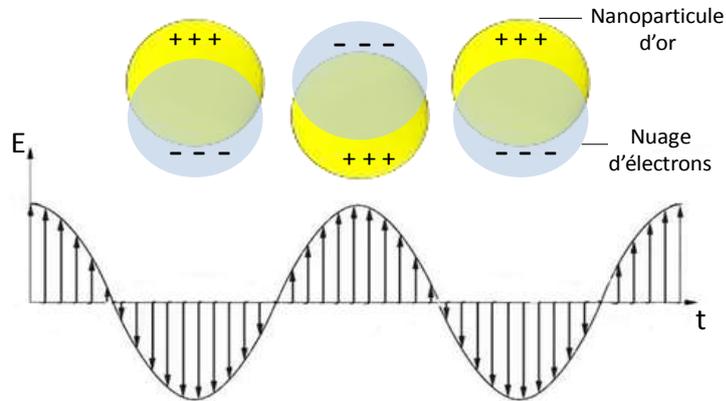


Figure 3.2 Représentation schématique de l'interaction de nanoparticules d'or avec un champ électromagnétique ($r \ll \lambda$). Les propriétés optiques des nanoparticules sont dominées par l'excitation collective des électrons de conduction qui entrent en résonance avec le champ électrique oscillant d'une radiation électromagnétique. Ce champ électrique provoque l'apparition d'un dipôle électrique dans la particule.

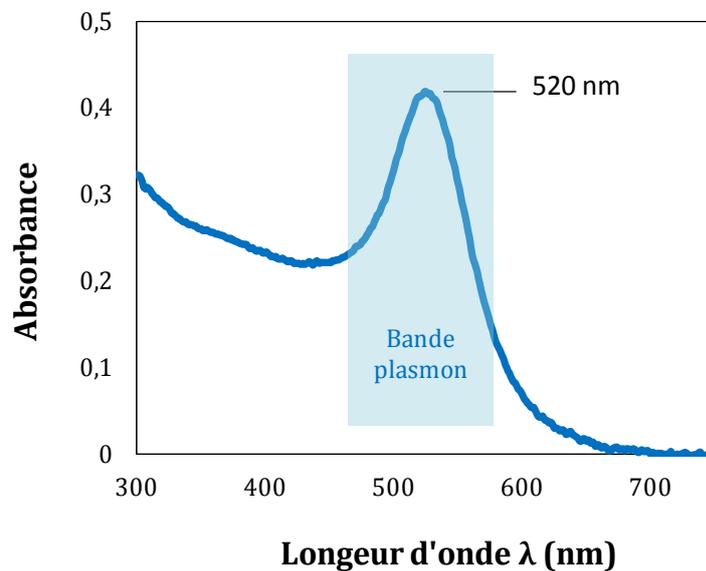


Figure 3.3 Spectre d'absorbance d'une suspension aqueuse de nanoparticules d'or sphériques de 20 nm de diamètre. La position spectrale de la résonance plasmon, caractérisée par la bande plasmon, se situe aux longueurs d'onde d'absorption centrées autour du vert. Dans ce cas, la longueur d'onde maximale (pic plasmon) vaut expérimentalement $\lambda = 520$ nm.

L'augmentation du champ électrique peut être détectée dans la région UV-Vis (500 nm – 600 nm) du spectre d'absorbance par l'apparition d'une bande d'absorption, appelée bande plasmon [15, 16]. La coloration des suspensions de nanoparticules d'or est donc directement liée à ce phénomène de résonance. Pour des tailles de nanoparticules comprises entre 3 et 80 nm, cela se traduit par une absorbance de la lumière verte à une longueur d'onde autour de 520 nm (**Figure 3.3**). La solution apparaîtra de ce fait de couleur rouge.

L'effet plasmon caractéristique d'une nanoparticule est par ailleurs différent de celui observé à la surface plane d'une couche d'or, comme celle de la biopuce décrite précédemment. Dans ce cas, le rapport surface/volume est faible et la contribution optique des plasmons de surface devient négligeable face à celle des plasmons de volume. Si l'on réduit la taille de l'objet, ce rapport augmente jusqu'à rendre l'effet des plasmons de surface dominant lorsque la structure atteint des dimensions sublongueur d'onde (nanométriques). Quand les plasmons peuvent se propager dans au moins une direction de l'espace (couches minces, nanofils), il est alors question de « plasmon polariton de surface » ou SPP (pour Surface Plasmon Polariton en anglais). Dans le cas des nanoparticules, où les plasmons sont confinés à la surface sans possibilité de propagation, on ne parlera plus de plasmon de surface mais de « plasmon de surface localisé » abrégé LSP (Localized Surface Plasmon). Par extension, la résonance plasmonique considérée est alors appelée « résonance plasmonique de surface localisée » ou LSPR (pour Localized Surface Plasmon Resonance).

A noter que le comportement optique global de tels objets est décrit par la théorie de Mie [17] qui découle de l'utilisation des lois de l'électromagnétisme au moyen des équations de Maxwell. Ainsi, il a été démontré que plusieurs paramètres étaient susceptibles d'agir sur la qualité des phénomènes de résonance à la surface des nanoparticules d'or (LSPR) [18], et donc sur la position spectrale et la largeur de la bande plasmon :

- **Taille des particules.** Plus la taille des nanoparticules est petite (avec une limite inférieure de 3 nm) plus le maximum d'absorbance de la bande plasmon se déplace vers les faibles longueurs d'onde (dans le bleu). A l'inverse, un élargissement et un décalage vers les grandes longueurs d'onde (dans le rouge) est observé quand le diamètre de la nanoparticule augmente.

- **Forme des particules.** La géométrie des nanoparticules va déterminer le mode d'oscillation des électrons à la surface. En conséquence, la réponse optique sera sensible à la forme de la particule considérée. Ainsi, plus la géométrie est complexe, plus les fréquences de résonance qui composent la bande plasmon seront nombreuses. Pour une forme sphérique, un seul mode de résonance est observé (**Figure 3.3**), et donc une seule fréquence de résonance associée.
- **Indice du milieu.** L'effet de l'indice du milieu environnant (n) est similaire à celui induit par l'augmentation du diamètre de la particule. Lorsque n augmente, il se produit un décalage de la bande plasmon vers les grandes longueurs d'onde.
- **Distance inter-particulaire.** La proximité entre particules peut avoir pour conséquence des effets de couplage plasmonique induits par des phénomènes de résonance entre les nuages électroniques des nanobjets considérés.

Application à la détection de petites molécules

L'une des applications les plus connues exploitant les propriétés optiques des nanoparticules d'or concerne le développement de détecteurs colorimétriques [19, 20]. Historiquement, la première application bioanalytique réalisée dans ce sens a été développée par Mirkin et *al.* [21] en 1996. Comme précisé plus haut, la réponse spectrale est sensible au couplage inter-particules lorsque celles-ci se rapprochent ou s'agrègent. Dans les travaux de Mirkin, des nanoparticules de 13 nm de diamètre, fonctionnalisées avec des oligonucléotides, s'agrégeaient spécifiquement suite à leur interaction avec des brins complémentaires. Cette agrégation implique un déplacement du maximum d'absorption vers le rouge. En résulte une modification de la couleur de la solution du rouge vers le bleu/pourpre (**Figure 3.4**). Ce processus est néanmoins réversible par simple déshybridation thermique. Ainsi, en se basant sur ce principe, par simple dépôt d'une goutte d'une telle solution sur un guide optique, il a été possible de créer un détecteur « spot and read » dont la limite de détection d'oligonucléotides atteignent des concentrations de l'ordre du zeptomole [22].

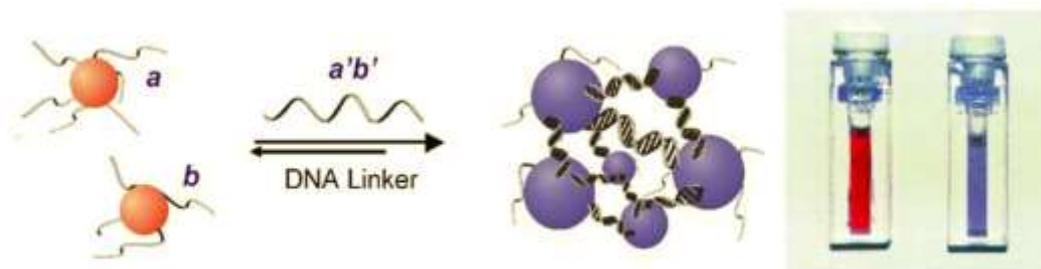


Figure 3.4 Schéma représentant des AuNPs fonctionnalisées avec deux séquences d'oligonucléotides **a** et **b**. Quand une séquence d'oligonucléotide complémentaire à **a** et à **b** (**a'b'**) est ajoutée à la solution, les particules s'agrègent, provoquant un déplacement de la bande plasmon. Il en résulte un changement de couleur de la solution du rouge vers le bleu/pourpre (cuvette de gauche : particules non agrégées ; cuvette de droite : particules agrégées) [23].

Concernant la détection de petites molécules, les premiers détecteurs colorimétriques impliquant l'utilisation d'aptamères et de nanoparticules d'or ont été développés par Liu et *al.* en 2004 [24]. Dans leur stratégie, un DNAzyme (molécules d'ADN possédant une activité catalytique) couplé à un aptamère, peut interagir avec une séquence complémentaire conjuguée à des nanoparticules, induisant ainsi leur agrégation. La présence de la cible (adénosine) en solution et son interaction avec l'aptamère permet d'enclencher l'activité catalytique du DNAzyme par clivage des liaisons avec les séquences complémentaires. Il en résulte la dispersion des nanoparticules et le changement de couleur de la solution.

Zhao et *al.* [25], de même que Chavez et *al.* [26], adoptèrent une stratégie simplifiée pour la détection d'adénosine et de théophylline. Celle-ci est basée sur le changement de conformation de l'aptamère en présence de la cible et l'induction de l'agrégation des nanoparticules fonctionnalisées par augmentation de la concentration saline. En clivant la séquence d'aptamère anti-adénosine en deux parties (*Split aptamers*), il a également été possible de détecter l'adénosine en solution à une concentration limite de 250 μM [27]. Dans ce cas, les deux séquences sont conjuguées à des nanoparticules et la présence de la cible en solution induit leur interaction pour la formation du complexe tertiaire. Cette interaction provoque alors l'agrégation des nanoparticules (**Figure 3.5**).

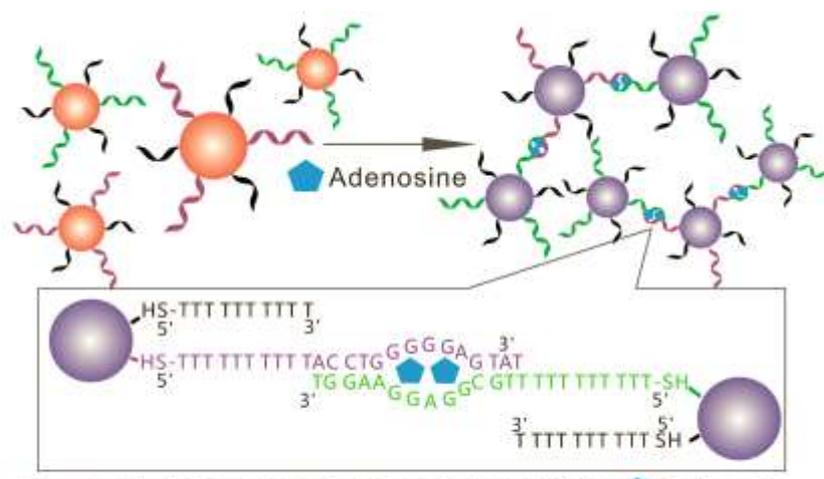


Figure 3.5 Détection d'adénosine par dosage colorimétrique. Les séquences de l'aptamère clivé sont spécifiquement greffées sur la surface des AuNPs. La présence de l'adénosine va induire l'agrégation des AuNPs et le changement de coloration de la solution [27].

Si les méthodes sus-citées impliquent l'emploi d'une chimie de greffage pour fonctionnalisation des AuNPs, d'autres stratégies de détection n'impliquant aucun greffage de molécules ont été développées. Celles-ci sont basées sur la stabilisation électrostatique des AuNPs induite par l'adsorption non spécifique des séquences d'aptamères à la surface. La présence de la cible en solution et son interaction avec les aptamères provoque leur désorption de la surface des nanoparticules. La stabilisation électrostatique n'étant plus assurée, l'addition de sel provoque alors l'agrégation des nanoparticules. Ainsi, plusieurs petites molécules ont pu être détectées suivant ce principe parmi lesquelles on peut citer : la tyrosinamide [28], la kanamycine [29], la dopamine [30] l'ochratoxine A [31], et l'oxytétracycline [32]. Enfin, il convient de souligner que si ces méthodes de détection présentent l'avantage de permettre une analyse rapide et à faible coût, elles demeurent préférentiellement des outils qualitatifs et renseignent rarement sur la concentration de la cible recherchée.

Une seconde application du phénomène LSPR des nanoparticules est celle qui nous intéresse tout particulièrement. Elle concerne l'utilisation de l'outil SPR en tant que méthode de détection, et le phénomène LSPR pour l'amplification du signal et l'amélioration des performances de détection, notamment des petites molécules.

Principe d'amplification du signal SPR par les nanoparticules d'or

Nous l'avons vu, à l'inverse des plasmons de surface propagatifs qui se déplacent le long d'un film, la LSPR confine le plasmon résonant dans une nanostructure métallique. Ainsi, tout comme la proximité entre particules permet un effet de couplage plasmonique des phénomènes de résonance, celui entre les nanoparticules et une couche métallique est également possible. En plus des effets de masse, c'est cette propriété même qui est au cœur de la stratégie d'amplification du signal SPR au moyen de l'utilisation de nanoparticules d'or.

En effet, lors d'une détection SPR classique, si des AuNPs se retrouvent à proximité de la couche métallique, leur densité va modifier d'une part, la distance inter-particules, et d'autre part, la masse globale déposée au niveau de l'interface. La diminution de la distance inter-particules va déplacer le maximum d'absorbance des AuNPs vers de plus grandes longueurs d'onde. Ceci implique alors une modification de l'indice optique local et une variation du signal SPR mesuré [33]. Par ailleurs, la masse des nanoparticules déposées à la surface altère également les propriétés diélectriques locales du milieu et implique à son tour une augmentation du signal SPR mesuré. En résumé, nous pouvons classer les facteurs d'amplification des nanoparticules d'or en SPR selon deux catégories : l'effet de couplage SPR/ LSPR et l'effet de masse.

C'est la combinaison de ces deux effets qui permet d'obtenir les meilleurs facteurs d'amplification SPR. Pour autant, si l'augmentation de la taille des nanoparticules influe sur le facteur d'amplification [34], l'étude de Zeng *et al.* [35] a montré que cette augmentation n'était pas systématiquement favorable. En analysant, par simulation théorique et par expérimentation, l'influence de différentes tailles de nanoparticules d'or sphériques (40-80 nm), c'est la plus faible d'entre elles, à savoir 40 nm, qui a permis d'obtenir l'effet de couplage SPR/LSPR le plus important. Il est également ressorti de cette étude qu'un autre paramètre, plus important encore, avait une influence significative sur le facteur d'amplification : la distance des AuNPs par rapport à la surface plane du capteur. En effet, dans cette première étude, l'amplification maximale n'a été observée qu'à une distance de 5 nm par rapport à la couche métallique plane.

Les travaux de Hong *et al.* [36] ont permis de mettre en évidence l'influence de ce paramètre sur l'amplification du signal SPR. En utilisant un système de détection SPR basé sur une lecture par suivi de la variation de la longueur d'onde du faisceau réfléchi (à angle fixe), il a été démontré que l'effet de couplage SPR/LSPR, induit par des AuNPs de 20 nm, ne se produisait qu'à une distance d'environ 10 nm de la surface. Celui-ci était à son maximum à partir de 1-2 nm et avait tendance à diminuer jusqu'à s'annuler au-delà de 11-12 nm. A ces faibles dimensions, c'est donc l'effet de couplage SPR/LSPR qui domine l'amplification du signal en comparaison avec l'effet de masse dont la contribution demeure constante et en moyenne 5 fois plus faible (**Figure 3.6**). Au-delà de 10 nm, c'est en revanche l'effet de masse qui domine du fait de la disparition de l'effet de couplage.

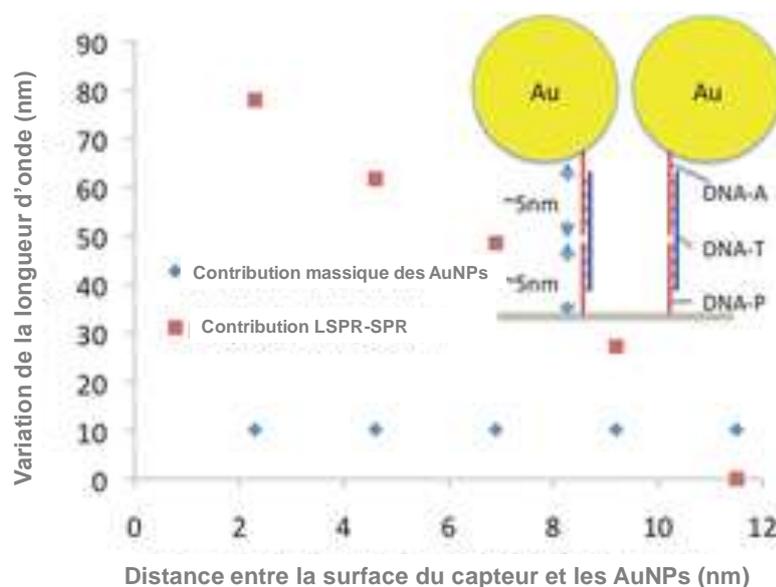


Figure 3.6. Illustration de la contribution des effets de masse et de couplage SPR/LSPR sur l'amplification du signal SPR en fonction de la distance des AuNPs par rapport à la surface. A des distances comprises entre 2 et 10 nm, l'effet de couplage domine l'effet de masse en induisant une variation de la longueur d'onde du faisceau réfléchi à raison de 7 nm pour chaque nanomètre de distance. Au-delà de 10 nm, l'effet de couplage s'estompe et l'amplification du signal est dominée par l'effet de masse. En haut à droite: Schéma illustrant l'hybridation de séquences d'oligonucléotides de 40 mères conjuguées à une AuNPs sur une distance de 10 nm par rapport à la surface. Adapté de Hong *et al.* [36].

Afin d'assurer l'obtention d'un facteur d'amplification optimal, il semble donc nécessaire de limiter l'interaction des sondes et des cibles aux distances inférieures ou égales à 10 nm. En effet, la limite du couplage peut être atteinte avec l'utilisation de séquences d'environ 40 bases dont l'épaisseur considérée, suite à leur hybridation, a été estimée entre 9 et 11 nm.

Par ailleurs, le facteur d'amplification du signal SPR évalué par Hang *et al.* lors de l'hybridation de séquences d'oligonucléotides de 41 bases en présence de AuNPs de 20 nm était de l'ordre de 10. Ces résultats se sont révélés être en accord avec ceux de Golden *et al.* [37] qui évaluèrent l'influence de la distance (0 -23 nm) des AuNPs de 10 nm sur le couplage SPR/LSPR de même que l'influence de la valeur de la longueur d'onde d'excitation (540 – 780 nm). Utilisant un dispositif de type imageur SPR, il a été démontré qu'à des distances inférieures à 10 nm, l'effet de couplage était proportionnel à l'augmentation de la longueur d'onde d'excitation. Au-delà de 10 nm, le couplage diminuait drastiquement, et ce indépendamment de la variation de la longueur d'onde.

L'utilisation du principe de la LSPR en détection SPR a pu être entreprise de différentes façons, notamment par structuration directe de la surface de la couche métallique à l'aide d'un réseau de nanoparticules [38]. Néanmoins, les applications relatives à la détection de petites molécules par SPR au moyen d'une puce à aptamères ont principalement concerné des méthodes indirectes par l'utilisation de AuNPs fonctionnalisées pour l'amplification du signal [39]. On retrouve ainsi l'utilisation du principe de détection par compétition indirecte [40, 41] où l'aptamère immobilisé à la surface, interagit avec la petite molécule injectée en formant un complexe tridimensionnel. Le nombre de complexes formés étant proportionnel à la concentration de cible, l'injection de nanoparticules fonctionnalisées avec la séquence complémentaire induira un signal SPR inversement proportionnel à la concentration de petites molécules mise en jeu. Cette méthode souffre néanmoins d'un niveau de signal non spécifique décrit comme étant important. Afin de pallier cet inconvénient, des stratégies impliquant l'utilisation de *Split aptamers* ont été développées. A ce jour, seules deux d'entre-elles concernent la détection de petites molécules par SPR.

Celle de Golub et *al.* [42] concernant la détection de cocaïne avec une limite de détection à 1 μM et celle de Wang et *al.*[43] relative à la détection d'adénosine à une concentration limite de l'ordre du pM. Ces deux études ont été basées sur une détection SPR selon un mode de lecture par variation de la longueur d'onde du faisceau réfléchi.

3.1.3 Stratégie de détection développée

Au regard des informations développées précédemment, nous avons décidé d'opter pour une stratégie de détection impliquant d'une part, l'utilisation de nanoparticules d'or pour l'amplification du signal SPR, et d'autre part, l'utilisation des *Split aptamers* pour une détection de l'adénosine.

Notre choix relatif à l'utilisation de nanoparticules d'or s'appuie principalement sur leurs propriétés optiques singulières (LSPR) telles que décrites précédemment. Contrairement aux méthodes d'amplification décrites plus haut, elles sont de plus faciles à mettre en œuvre et présentent une chimie de surface particulièrement adaptée à la fonctionnalisation par des molécules tierces, telles que les aptamères.

Le choix du clivage des aptamères anti-adénosine pour en faire des séquences *Split aptamers* s'appuie quant à lui, en partie, sur la base des enseignements théoriques et expérimentaux liés au couplage LSPR/SPR : afin d'assurer un facteur d'amplification optimal, la distance entre les AuNPs et la surface de la biopuce doit être limitée à 10 nm. Ceci peut être assuré par l'utilisation de séquences d'aptamères d'une longueur inférieure à 40 bases, comme le cas des *Split aptamers* (27 bases). Par ailleurs, la stratégie impliquant des *Split aptamers*, qui peut-être qualifiée de récente, a fait l'objet de très peu d'études dans le cadre de la détection de petites molécules, et n'a encore jamais concerné l'utilisation de l'imagerie SPR. Il nous semblait donc intéressant d'évaluer les potentialités de l'imagerie SPR dans le cadre d'une telle configuration.

La mise en œuvre d'une stratégie de détection a donc impliqué au préalable le clivage des séquences d'aptamères anti-adénosine (APT4 et APT 8) telles que décrites au chapitre 2. Pour cela nous nous sommes inspirés des travaux de Li et *al.* [27] qui, les premiers, ont réussi à détecter l'adénosine par dosage colorimétrique au moyen de *Split aptamers*.

A partir des séquences APT4 et APT8, celles-ci ont été clivées de sorte que la région d'interaction avec l'adénosine, de même que la partie comportant les bases complémentaires se retrouvent réparties sur les deux séquences coupées (**Figure 3.7**). Ainsi, il en résulte une séquence commune, notée SplitAPT, capable de s'hybrider avec les deux autres séquences obtenues, SplitAPT4 et SplitAPT8 sur 4 et 8 bases respectivement.

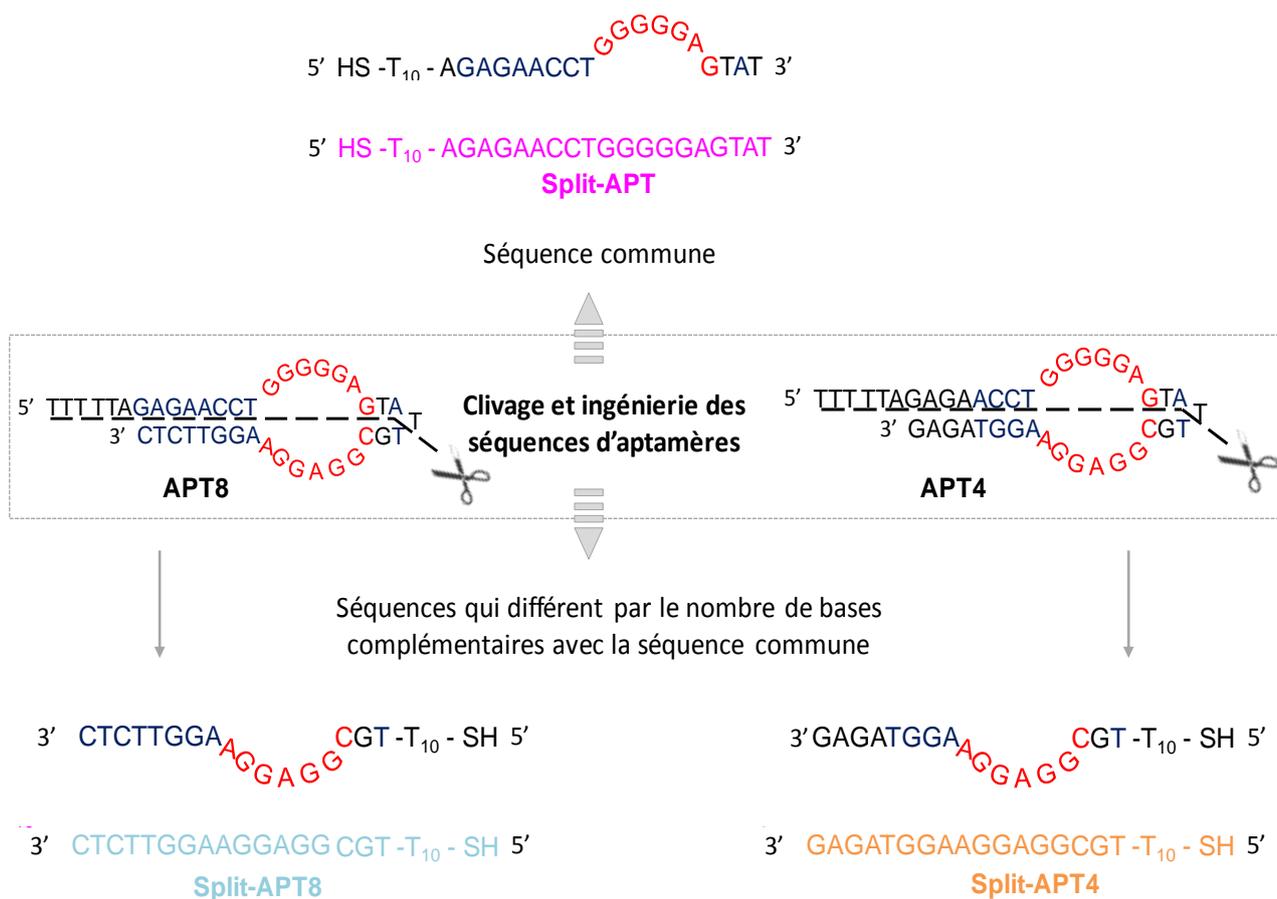


Figure 3.7. Stratégie de clivage des séquences d'aptamères anti-adénosine (APT4 et APT8). Le clivage est réalisé de sorte que la région d'interaction avec l'adénosine (en rouge) et la partie comportant les bases complémentaires (en bleu foncé) se retrouvent réparties sur les deux séquences coupées. Il en résulte une séquence commune (Split-APT) capable de s'hybrider avec les deux autres séquences (SplitAPT4 et SplitAPT8). Un groupement -SH et une queue poly-Thymidine de 10 unités sont ajoutés à l'ensemble des séquences clivées, au niveau de leur extrémité 5'.

Un groupement -SH a été ajouté à l'ensemble des séquences des aptamères clivés afin d'assurer leur greffage sur les différentes surfaces. Une queue poly-Thymidine de 10 unités est également ajoutée dans le but de favoriser leur accessibilité.

En immobilisant les séquences SplitAPT4 et SplitAPT8 à la surface de la biopuce, l'injection de la séquence Split-APT conjuguée à une nanoparticule d'or (AuNP-SplitAPT) est donc susceptible de générer un signal d'hybridation SPR sur ces deux plots. Ce signal sera comparé à celui produit par une co-injection des conjugués AuNPs-SplitAPT et la molécule d'adénosine.

La présence d'adénosine permettra en effet de restituer une structure 3D proche de celle originelle (en tige-boucle) de l'aptamère anti-adénosine [27] (**Figure 3.8**). Elle est ainsi en mesure de stabiliser les complexes et d'augmenter le nombre d'interactions spécifiques [24, 40, 41, 43], nous nous attendons donc à retrouver une variation de réflectivité plus importante dans ce cas de figure. Sera donc évaluée au moyen de cette stratégie, l'influence des concentrations d'adénosine mises en jeu, de même que celle du nombre de bases complémentaires des split-aptamères (4 et 8) sur le signal d'hybridation obtenu par imagerie SPR.

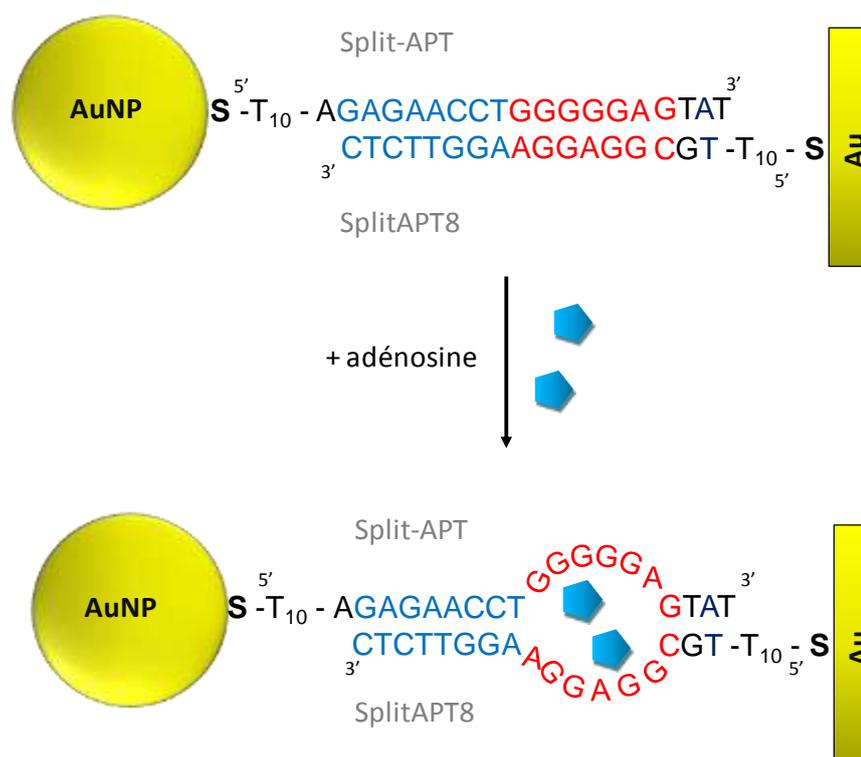


Figure 3.8. Représentation schématique de l'interaction des conjugués AuNP-SplitAPT avec les séquences sondes SplitAPT8. La présence d'adénosine permet de restituer une structure 3D, proche de celle originelle (en tige-boucle) de l'aptamère anti-adénosine.

3.2 Caractéristiques et fonctionnalisation des nanoparticules d'or

3.2.1 Choix des nanoparticules d'or

Si différentes méthodes de synthèse de nanoparticules d'or existent [44], la plus commune, du fait de sa facilité de mise en œuvre, consiste en une réaction chimique entre un sel d'or, un agent réducteur et un agent stabilisant. Dans ce type de synthèse, la forme et la taille définitives des AuNPs dépendent fortement des paramètres expérimentaux, tels que la nature et la concentration des réactifs, la vitesse d'agitation, le pH, la température ainsi que l'ordre d'addition des composés [45]. Les coefficients de variation (COV) relatifs à la taille des AuNPs obtenues sont généralement compris entre 10 et 30%. Afin de favoriser la reproductibilité de nos expériences SPRi mettant en jeu les AuNPs, il était important que les COV soient les plus faibles possibles. Or ceci requiert une maîtrise absolue du processus de synthèse, de même qu'une multiplication des étapes de caractérisation. Nous avons donc fait le choix d'utiliser des nanoparticules commerciales directement fournies par la firme BBISolutions® (Grande Bretagne) et dont le COV est estimé à moins de 10%. Les caractéristiques générales de ces AuNPs, notamment la concentration de la solution mère, sont également renseignées par la firme. Néanmoins, il nous paraissait utile de confronter ces données avec les études théoriques disponibles dans la littérature afin de nous assurer de leur fiabilité et nous permettre de choisir la taille de AuNPs la plus adaptée. L'étude théorique qui fait actuellement office de référence dans ce domaine a été réalisée par Haiss et *al.* [46].

Les chercheurs ont pu analyser les propriétés optiques de nanoparticules sphériques dispersées dans une solution aqueuse. Ces AuNPs, dont la taille varie entre 5 et 100 nm, ont été chimiquement synthétisées et caractérisées par microscopie électronique à transmission (MET ou TEM pour l'acronyme anglais) et spectroscopie ultraviolet-visible (UV-Vis). A titre comparatif, des nanoparticules commerciales ont également été soumises aux tests. En conséquence, une méthode permettant de calculer le diamètre (d) des nanoparticules à partir d'une valeur d'absorbance a pu être développée, de même qu'une relation analytique entre le coefficient d'extinction molaire (ϵ) et le diamètre des AuNPs, permettant ainsi de déduire la concentration en solution (C).

Nous avons utilisé cette méthode pour estimer le diamètre et la concentration des AuNPs reçues par BBISolutions[®]. Au total, quatre solutions différentes ont été testées. Celles-ci présentaient des nanoparticules dont les diamètres ont été évalués par le fournisseur à 5, 10, 20 et 40 nm. Le principe de détermination du diamètre de Haiss et *al* est basé sur une simple corrélation avec la valeur de longueur d'onde, notée λ_{SPR} , pour laquelle le pic plasmon est visible. Pour les diamètres supposés inférieurs à 25 nm, la valeur du diamètre est obtenue par le rapport des absorbances à λ_{SPR} et $\lambda_{450\text{nm}}$. La concentration peut quant à elle être estimée à partir du rapport entre la valeur de l'absorbance à $\lambda_{450\text{nm}}$ et le coefficient d'extinction molaire à cette même longueur d'onde (450nm). L'ensemble des valeurs obtenues sont alors reportées sur le tableau des corrélations proposé par les auteurs et permet de déduire les diamètres et les concentrations recherchées. Le détail des calculs réalisés dans ce but est présenté en **Annexe C**.

En croisant les deux études comparatives pour l'estimation du diamètre et de la concentration, il apparaît que les données du fournisseur pour les AuNPs de 20 nm soient les plus concordantes avec l'estimation théorique, et donc, à notre sens, les plus fiables. Nous avons donc fait le choix d'utiliser exclusivement des AuNPs de 20 nm afin de favoriser la reproductibilité de nos expériences de fonctionnalisation et de détection SPRi. Ce diamètre est également celui testé par l'étude de Hong et *al*. [36] sur le couplage LSPR/SPR présenté dans la section 3.2, nous fournissant ainsi une raison supplémentaire d'opter pour ce choix. Enfin, une dernière raison, d'ordre purement pratique cette fois-ci, nous incite également à faire ce choix. En effet, les différentes étapes de préparation et fonctionnalisation des AuNPs nécessitent de multiples étapes de centrifugation, or, le temps nécessaire à la précipitation de nanoparticules est inversement proportionnel à leur taille. Ainsi, quand il ne faut qu'une dizaine de minutes pour centrifuger une solution de AuNPs de 20 nm, un temps 5 à 10 fois plus long est nécessaire pour obtenir le même résultat avec des tailles de 10 et 5 nm respectivement. Choisir des AuNPs d'un diamètre de 20 nm nous permet donc de faire un gain de temps considérable.

Les caractéristiques générales des nanoparticules de 20 nm utilisées sont présentées dans le **Tableau 3.1**. Elles sont maintenues dans un tampon stabilisant composé d'ions citrate (source BBISolutions[®]) et présentent donc à leur surface une charge nette négative. La concentration de la solution mère est évaluée à 1,16 nM, calculée à partir du rapport entre le nombre de particules par unité de volume et la constante d'*Avogadro*.

Une mesure de l'absorbance de cette solution nous permet de calculer le coefficient d'extinction molaire à partir de la loi de Beer-Lambert. La valeur de ce coefficient, estimée à $\epsilon = 8,96 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, est par la suite systématiquement utilisée pour déterminer la concentration de nos solutions de nanoparticules tout au long du processus de fonctionnalisation et de préparation des injections pour la détection en SPRi.

Diamètre (nm)	Nbre particules/mL	Nbre moles /mL	Concentration (mol/L)	Masse d'or/ mL (g)
20	$7,00 \cdot 10^{11}$	$1,16 \cdot 10^{-12}$	$1,16 \cdot 10^{-9}$	$5,66 \cdot 10^{-5}$

Tableau 3.1 Caractéristiques des AuNPs de 20 nm de diamètre fournies par BBISolutions® et utilisées dans le cadre de ce projet pour l'amplification du signal SPR et la détection d'adénosine.

En résumé, il s'agit d'utiliser des nanoparticules de 20 nm de diamètre pour assurer le couplage LSPR/SPR afin de permettre une détection de l'adénosine par l'imageur SPR.

3.2.2 Couplage aptamères - nanoparticules d'or

Comme décrit précédemment, les AuNPs font partie des nanomatériaux les plus intéressants pour l'amplification du signal SPR et sont de fait au cœur même de notre stratégie de détection d'adénosine au moyen d'une biopuce à aptamères. Ceci requiert la fonctionnalisation de leur surface par des séquences spécifiques, les *Split aptamers*.

En règle générale, la fonctionnalisation de AuNPs peut se faire soit directement, c'est-à-dire durant le processus de synthèse par l'addition d'un ligand lors de la réduction du sel, soit postérieurement à cette étape de synthèse (post-fonctionnalisation). Dans ce cas, la fonctionnalisation des AuNPs, dispersées dans un milieu donné, intervient dans une deuxième étape par échange de ligand. Cet échange peut alors avoir lieu par transfert de phase d'un milieu à un autre ou alors en milieu homogène dans lequel l'agent fonctionnalisant et le stabilisant sont solubles (**Figure 3.9**). En ce qui nous concerne, s'agissant de nanoparticules commerciales maintenues dans un tampon citrate, c'est logiquement de post-fonctionnalisation dont il sera question dans le cadre de ces travaux.

On le devine aisément, tout comme le greffage d'ADN à la surface de notre biopuce, celui faisant intervenir les AuNPs peut également avoir lieu de différentes façons. C'est au milieu des années 1990 que Chad Mirkin de l'université de Northwestern [21] et Paul Alivisatos de l'université de Berkeley [47], ont commencé à s'intéresser à la conjugaison de molécules d'ADN avec des AuNPs. Ils sont reconnus aujourd'hui comme étant les pionniers et les leaders incontestés dans ce domaine.

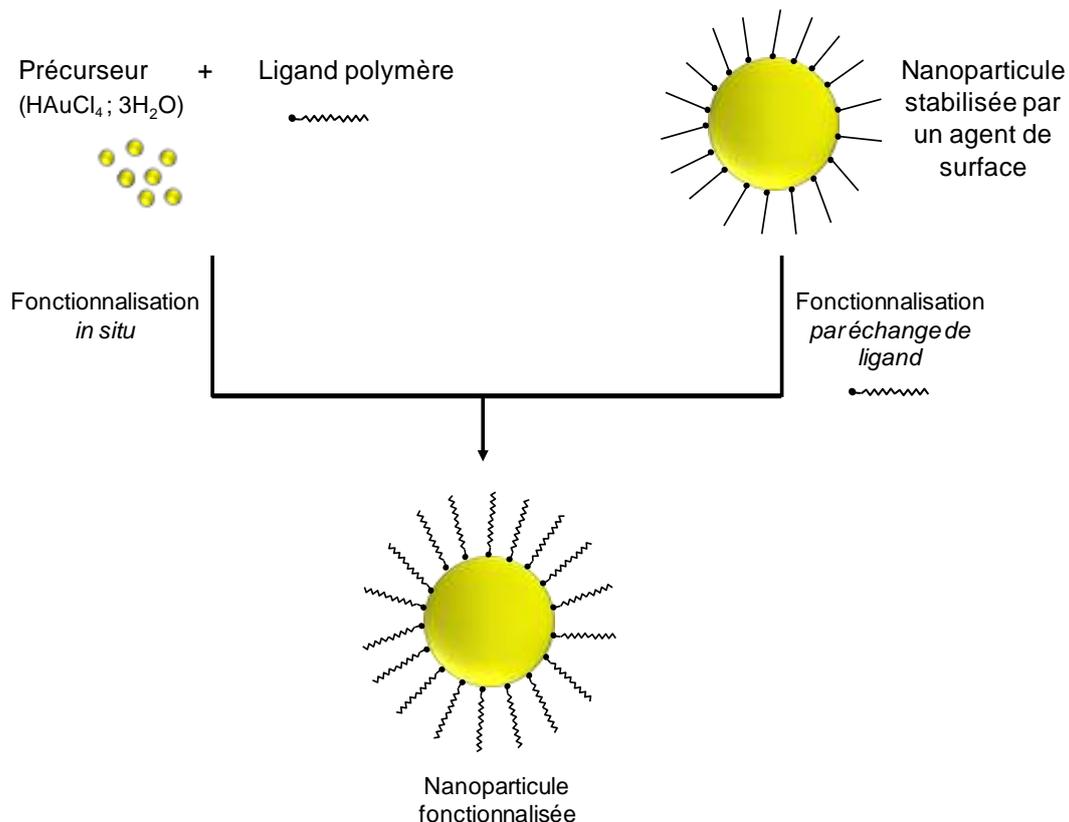


Figure 3.9 Représentation schématique des deux méthodes de fonctionnalisation de nanoparticules d'or : *In situ* (gauche) et post-fonctionnalisation (à droite).

Le groupe de C. Mirkin s'est focalisé sur une chimie de greffage basée sur l'auto-assemblage de molécules d'ADN thiolées à la surface des AuNPs [21]. Depuis, cette méthode est l'une des plus utilisées pour la formation de AuNPs couplées à des molécules d'ADN [48], notamment dans le cadre de l'amplification du signal d'hybridation ADN-ADN par SPRi [49].

Le protocole fait généralement intervenir un large excès d'oligonucléotides thiolés mis en contact avec les AuNPs dans un tampon adéquat appelé *tampon de couplage*. On retrouve également des exemples de greffage d'aptamères selon cette méthode dans les travaux de Liu *et al.* [50] et Zhao *et al.* [51]. Une variation de cette chimie de couplage a principalement fait l'objet de l'utilisation de groupements thiols multiples, supposés assurer une meilleure stabilité, via la modification de l'ADN par un dérivé stéroïde cyclique avec deux fonctions thiols [52] ou même un ligand mercaptohexyl comportant trois fonctions thiols [53].

L'équipe de P. Alivisatos a développé une méthode alternative basée sur une chimie conjuguée faisant intervenir une liaison covalente, via un groupement maleimide, permettant un couplage entre les AuNPs et la molécule d'ADN [47]. A noter toutefois que ce type de couplage, du fait de son très faible rendement, a très vite été abandonné au profit d'une chimie *thiol* classique lors des travaux postérieurs du groupe Alivisatos [54-59]. Néanmoins, d'autres types de greffage basés cette fois-ci sur une chimie bio-conjuguée ont été développés. Les plus emblématiques concernent sans doute l'utilisation du couple Streptavidine-Biotine où la Biotine a pu être utilisée en tant que ligand greffé à la surface de la nanoparticule [60].

Dans notre cas, nous nous baserons sur la chimie *thiol*, qui semble être la plus simple à mettre en œuvre pour le greffage des molécules d'ADN sur les AuNPs. Elle présente également l'avantage d'avoir déjà été utilisée et maîtrisée pour la fonctionnalisation de la surface de notre biopuce [61, 62]. Il convient toutefois de préciser que si le groupement *thiol* présente une grande affinité pour l'or ($K = 200 \text{ kJ mol}^{-1}$) [63] le mécanisme exact de sa liaison avec les métaux demeure encore sujet à discussion. De plus, contrairement à l'autoassemblage relativement homogène de SAMs sur la surface plane de la biopuce, celle des AuNPs présente des caractéristiques beaucoup plus hétérogènes [64]. En effet, à l'échelle du nanomètre se produit une transition de phase structurale correspondant à une diminution du paramètre de maille (réduction des distances entre les atomes d'or).

Cette diminution du paramètre de maille varie généralement avec l'inverse du rayon de la nanoparticule [65]. L'énergie de surface qui devient plus importante, entraîne alors un changement dans la structure cristalline des particules vers des états énergétiques plus favorables (faible énergie de surface). Il en résulte une variation de l'affinité des groupements thiols pour les différents sites de liaisons disponibles au niveau de la surface, rendant difficile la caractérisation de SAMs formées à la surface des AuNPs.

Il a également été démontré que les thiols sont d'autant plus mobiles à la surface des nanoparticules, capable de diffuser plus rapidement et donc susceptible d'être facilement interchangés par d'autres ligands [64].

Le protocole de couplage développé pour cette étude a été inspiré des travaux de Claridge et al. [54]. Il fait intervenir trois étapes principales :

1. Préparation des nanoparticules d'or par échange de ligand

Les nanoparticules de 20 nm utilisées étant initialement présentes dans un tampon citrate, la première étape de leur préparation pour le couplage avec l'ADN consiste en une substitution de ce ligand. En effet, lors de nos premières expériences de couplage, nous avons très vite remarqué que les AuNPs n'étaient pas stables dans ce milieu et avaient tendance à s'agréger rapidement suite aux variations des conditions expérimentales (changement pH, concentration en sel). Ce prétraitement vise donc à assurer une meilleure stabilité des AuNPs en solution afin de prévenir leur agrégation.

La question de la stabilité des nanoparticules en solution est cruciale et nécessite d'être maîtrisée afin de garantir le succès de notre couplage. Cette stabilité est intimement liée à la distance inter-particulaire. Ainsi, si au cours de leur déplacement, les AuNPs (sur lesquels la pesanteur a peu d'emprise et est compensée par les mouvements Browniens) étaient amenées à se rapprocher, les interactions de Van der Waals se manifesteraient. Il en résulte une attraction entre les AuNPs qui forment alors des agglomérats de plus en plus volumineux jusqu'à floculation. Une façon de maintenir la stabilité des AuNPs consiste donc à créer une répulsion électrostatique (**Figure 3.10**) entre elles par adsorption d'ions citrate par exemple, ou plus généralement par des acides mercaptocarboxyliques [66].

L'ADN, en tant qu'électrolyte chargé négativement, peut également contribuer à stabiliser les AuNPs une fois adsorbé à leur surface. Toutefois, en présence d'une forte concentration saline, les charges électriques sont neutralisées induisant un rapprochement puis une agrégation des nanoparticules, souvent irréversible dans le cas des ions citrate [67].

En fonction du pH de la solution, ces charges sont également susceptibles de varier ou d'être neutralisées. Bien que ce phénomène ait été largement étudié, le mécanisme exact demeure encore obscur dans le cas des nanoparticules, dont les propriétés particulières (notamment de forme) en font un modèle complexe : Les AuNPs ne peuvent pas être simplement assimilées à des structures parfaitement sphériques au diamètre défini, mais plutôt à un objet en cœur-coquille. Le cœur étant le cluster des atomes d'or et la coquille le champ électrique qui l'enveloppe. La distribution des charges au niveau de cette enveloppe est dépendante des facteurs externes et reste très souvent difficile à caractériser [68].

Une alternative à cette méthode de stabilisation des AuNPs consiste à créer une répulsion stérique (**Figure 3.10**), conséquence de l'adsorption de molécules volumineuse ou à longues chaînes. Il s'agit le plus souvent de polymères de type poly(éthylène-glycol) (PEG) ou encore de phosphines [69]. Ils sont connus pour conférer une meilleure stabilité aux AuNPs dans les conditions de pH et de concentrations salines extrêmes [70]. En fonction de la force des interactions, ces ligands peuvent une nouvelle fois être substitués. De même, plus un ligand assurera une forte interaction avec la surface des nanoparticules, plus celles-ci seront stables dans le temps. Enfin, il convient d'ajouter qu'une combinaison entre ces deux méthodes de stabilisation (répulsion électrostatique et stérique) est également possible par l'emploi de polymères ioniques ou d'agents tensioactifs [71, 72].

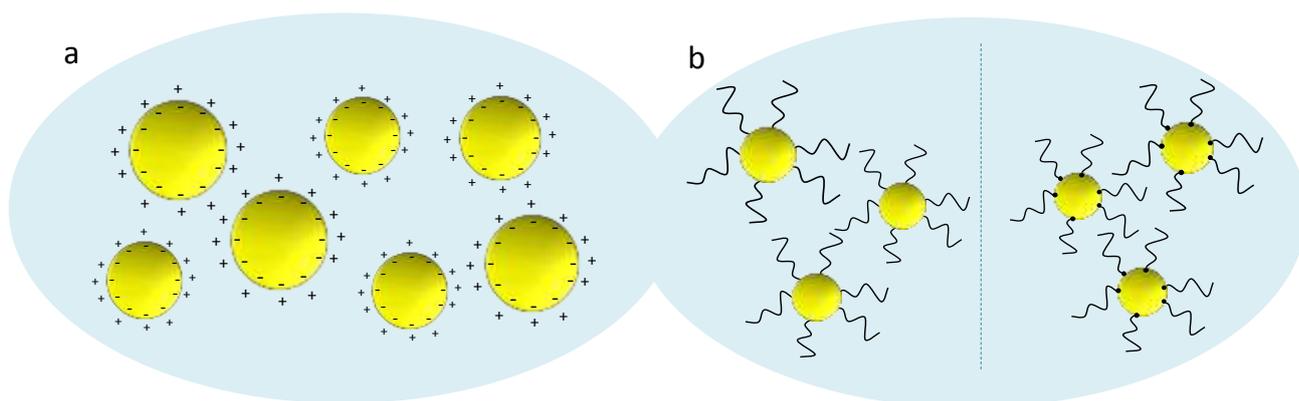


Figure 3.10 Illustration d'une suspension de nanoparticules d'or de différentes tailles, stabilisées par répulsion électrostatique (a) et stérique (b) suite à l'adsorption (à gauche) ou au greffage (à droite) de molécules au niveau de la surface.

Nous avons choisi de privilégier la stabilisation stérique en substituant les ions citrate recouvrant initialement les AuNPs par des molécules de phosphines de type Bis(p-sulfonatophenyl)phenylphosphine dihydrate dipotassium (BSPP) comme cela a déjà été mis en œuvre dans les travaux de Claridge et *al.* [54] et Tamaki et *al.* [73]. La solution est ensuite incubée sur la nuit sous agitation à température ambiante. L'élimination du citrate est réalisée par une centrifugation de la solution pendant une dizaine de minute. Celle-ci est alors reprise dans un tampon BSPP avant le couplage avec les molécules d'intérêt.

2. Fonctionnalisation avec les aptamères

Le couplage des nanoparticules avec l'ADN a lieu dans un volume total de 100 μL : 70 μL de la solution de AuNPs préparées comme décrit précédemment est ajoutée e à 30 μL d'une solution contenant un mélange de 10 μL d'ADN (*Split aptamers* thiolés ou aptamères complémentaires thiolés) à 10 μM , 10 μL de BSPP à 93,5 mM et 10 μL de PBS à pH 7,4, constituant ainsi le tampon de couplage. Le ratio ADN/AuNPs est estimé à 85 : 1. La chimie de greffage mise en jeu concerne l'autoassemblage des ADN par chimisorption via leurs groupements thiols (-SH) en 5'. Après une incubation sur la nuit à température ambiante, la solution est centrifugée pour éliminer l'excès d'ADN et reprise dans 1 mL de tampon SPRi.

Une mesure d'absorbance UV-Vis permet d'évaluer la concentration finale de la solution de AuNPs. En général, les pertes dues aux étapes de centrifugation sont estimées à moins de 15%. Sur le spectre UV-Vis (**Figure 3.11**), il est possible de remarquer un déplacement du pic plasmon d'environ 8 nm ($\lambda_{\text{max}} = 528$ nm) par rapport à celui de la solution de AuNPs non fonctionnalisées ($\lambda_{\text{max}} = 520$ nm). La résonance plasmonique localisée (LSPR) dépendant notamment de la taille des nanoparticules, cette observation n'est pas surprenante. En effet, des simulations basées sur la théorie de Mie réalisées par Bohren et *al.* [74] ont permis de rendre compte de l'influence de l'épaisseur d'une couche de polyélectrolytes adsorbée à la surface d'AuNPs de 20 nm de diamètre. Il a ainsi pu être démontré que pour des épaisseurs de couches entre 1 et 10 nm, l'augmentation de l'indice de réfraction localisé conduisait à un déplacement du pic plasmon. Celui-ci ne s'effectuait toutefois que sur quelques nanomètres et dépassait rarement les 10 nm.

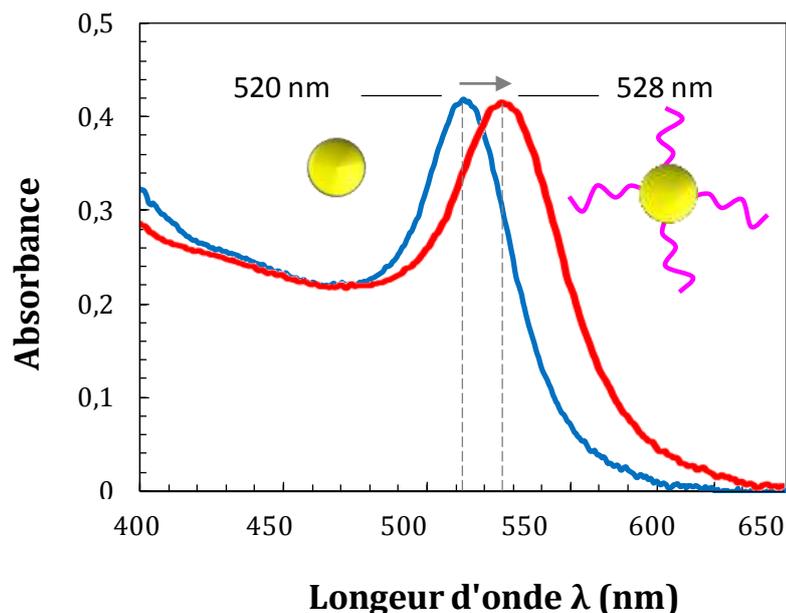


Figure 3.11. Spectre d'absorbance dans l'UV-Vis des nanoparticules de 20 nm avant (courbe bleue) et après fonctionnalisation avec les séquences d'aptamères (courbe rouge). Le déplacement du pic plasmon vers une longueur d'onde plus élevée (528 nm) est une conséquence directe du greffage des molécules d'aptamère à la surface des nanoparticules. Ceci a pour effet d'augmenter la taille des AuNPs et donc, le décalage de la bande plasmon vers le rouge.

En résumé, le spectre d'absorption des AuNPs varie en fonction de l'épaisseur de la couche à leur surface puisque celle-ci induit une augmentation générale de leur taille. Il semble donc raisonnable de conclure que le déplacement du pic plasmon observé ici est une conséquence directe du revêtement des AuNPs par les molécules d'ADN.

La figure 3.12 permet de nous éclairer sur les dimensions mises en jeu (représentation à l'échelle) lors de l'adsorption de différentes molécules (ADN, BSPP, PEG) à la surface d'une nanoparticule de 10 nm. Il est par ailleurs admis qu'une molécule d'ADN simple brin est beaucoup plus flexible qu'une molécule double brin, qui aura tendance à adopter une structure en double hélice relativement rigide [75]. Une fois adsorbé à la surface d'une nanoparticule, l'ADN simple brin peut prendre une conformation incurvée ou enroulée. Cette conformation se trouvera néanmoins étirée lorsque de fortes densités de greffage sont mises en jeu, induisant une pression stérique, ou lorsqu'une hybridation avec le brin complémentaire a lieu [55, 76, 77]. Partant d'un ratio en solution ADN/AuNPs de 85 : 1, le taux de recouvrement des molécules d'ADN après couplage par rapport à la surface développée des nanoparticules a été estimé à 1 molécule/14 nm², soit une densité de greffage, dans les conditions idéales, de 85 molécules pour chaque nanoparticule. A noter que dans ce cas, nous sommes encore loin des conditions de saturation, évaluées à ~ 6000 molécules/AuNP de 20 nm [78].

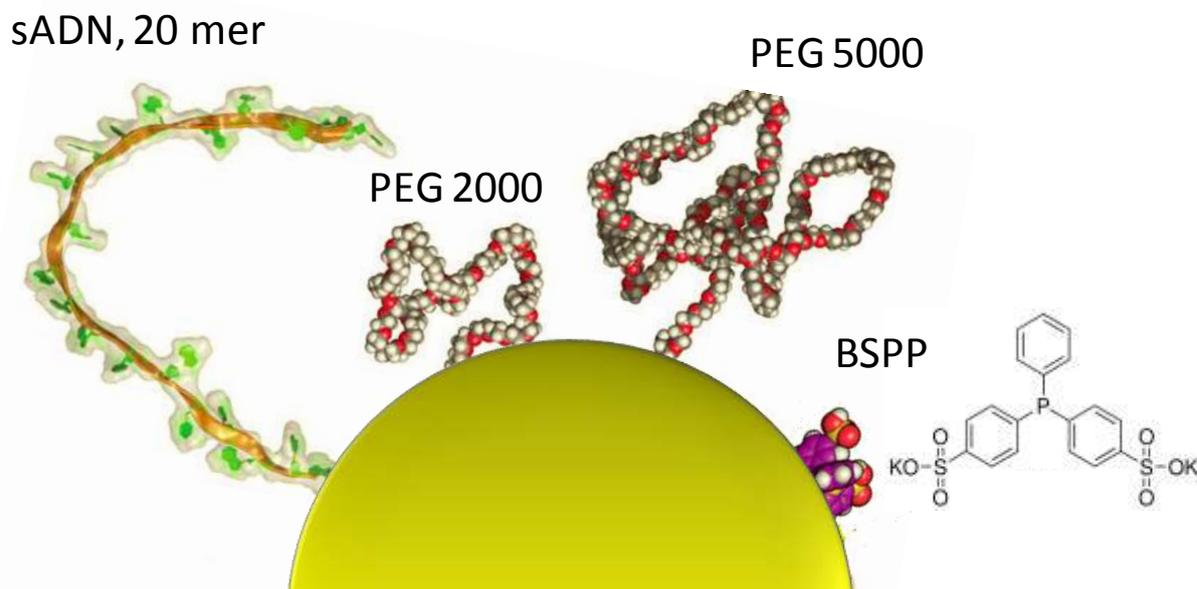


Figure 3.12 Représentation à l'échelle d'une nanoparticule de 10 nm fonctionnalisée avec différents ligands. De gauche à droite : Une molécule d'ADN simple brin de 20 bases (sADN), un poly(éthylène-glycol) de 2 kDa (PEG2000) et 5 kDa (PEG5000), une molécule de Bis(p-sulfonatophenyl)phenylphosphine dihydrate dipotassium (BSPP). Les atomes d'oxygène sont représentés en rouge et les atomes de carbone en blanc. Adapté de Sperling et *al.* [48].

3. Blocage de la surface des AuNPs fonctionnalisées

La dernière étape de fonctionnalisation des nanoparticules concerne le blocage de la surface par un polymère, le poly(éthylène-glycol) (PEG). Encore une fois, le PEG représente la molécule inerte et biocompatible par excellence. Une fois adsorbé ou greffé à la surface, il permet de repousser les molécules environnantes par effet stérique, celles-ci ne sont plus attirées par les forces électrostatiques mises en jeu et se retrouvent incapables de pénétrer la couche superficielle, caractérisée alors par un environnement hydrophile inerte.

Comme précisé plus haut, la présence de PEG à la surface de nanoparticules leur confère une plus grande stabilité et résistance aux fluctuations de la salinité mais également de la température.

Dans le cadre d'une utilisation des AuNPs pour une expérience de reconnaissance moléculaire, comme c'est le cas ici, la propriété des PEG relative à la réduction de l'adsorption non spécifique est, par ailleurs, un avantage considérable. Il n'est donc pas étonnant de retrouver son utilisation dans une grande partie des études impliquant la fonctionnalisation de nanoparticules pour des applications de reconnaissance [44]. Dans le protocole de Claridge et *al.* [54], le PEG utilisé est de type PEG alcool de 336,53 Da (PEG300), possédant de plus une fonction thiol afin d'assurer son adsorption à la surface par chimisorption : $\text{HO} - (\text{CH}_2)_{11} - (\text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{O})_3 - \text{SH}$. Il est ajouté suite à l'étape d'incubation des nanoparticules avec les ADN. Les solutions sont ensuite centrifugées pour éliminer l'excès d'ADN et de PEG. La fixation des molécules de PEG à la surface des AuNPs déjà fonctionnalisées avec de l'ADN permet donc d'augmenter la pression stérique sur les molécules adsorbées. Le processus de diffusion des SAMs sur la surface des AuNPs étant dynamique, il peut se produire un échange entre des molécules d'ADN et de PEG. L'estimation théorique de la densité de greffage finale des ADN à la surface des AuNPs s'avère donc peu évidente sans des techniques de caractérisation spécifiques.

Nous nous sommes interrogés sur l'effet d'une telle post-fonctionnalisation des AuNPs avec les PEG300 sur l'interaction avec les aptamères fixés à la surface des biopuces. Cette fois-ci encore, l'accessibilité des ADN à la surface des nanoparticules doit être optimale, tout comme le rapport signal/bruit résultant de l'interaction des AuNPs avec la surface de la biopuce doit être maximal.

La mise en œuvre d'un protocole d'amplification du signal SPRi par les AuNPs pour la détection d'adénosine implique donc deux niveaux d'optimisation relatifs à la stratégie de blocage. Celui concernant la surface de la nanoparticule, et celui inhérent à la surface de la biopuce. Comme nous l'avons vu, ce dernier a été défini suite à nos premières expériences de traitement de surface (Chapitre 2). Il consiste en un blocage de la surface par un PEG de 2 kD pour lequel les signaux d'adsorption non-spécifique à la surface de la biopuce et sur les plots contrôles se sont révélés être extrêmement faibles ($\Delta R \sim 0,08\%$). S'agissant cette fois-ci d'une interaction impliquant des AuNPs fonctionnalisées avec des molécules d'ADN, nous avons confronté cette stratégie de blocage de la biopuce avec celle utilisant une molécule de PEG plus courte (300 Da). Une expérience initiale n'impliquant aucun blocage sur l'une ou l'autre des surfaces a également été réalisée afin de servir de référence.

Quelle combinaison se révélera être la plus efficace pour la réduction du signal non-spécifique et l'amplification optimale des signaux d'hybridation ? Dans la configuration qui est la nôtre, une faible longueur des agents bloquants favorise-t-elle réellement l'accessibilité des ADN au niveau des surfaces ? Ce sont, entre autres, les questions auxquelles nous souhaitons répondre.

3.2.3 Stratégies de blocage des surfaces pour la réduction du signal non spécifique

Le choix d'une stratégie optimale pour le blocage des surfaces a impliqué l'analyse des cinétiques d'hybridation en SPRi des molécules d'aptamères fixés à la surface avec leur complémentaire conjugué aux AuNPs de 20 nm. La séquence complémentaire utilisée est celle adaptée à l'APT8, elle est notée cAPT8. Deux effets seront particulièrement évalués : l'intensité de l'amplification apportée par la nanoparticule fonctionnalisée et le taux de signal non spécifique. Ces expériences, que l'on peut qualifier de préliminaires, ont exclusivement impliqué les molécules d'aptamères anti-adénosine non clivées (APT8 et APT4). Les résultats ainsi obtenus ont été déterminants pour le choix du protocole final qui sera appliqué à notre stratégie de détection d'adénosine au moyen des *Split aptamers* (SplitAPT4 et SplitAPT8).

La fabrication de la biopuce a été réalisée selon le protocole détaillé dans le Chapitre 2. Les aptamères ont été greffés à la surface plane par co-adsorption avec les molécules de PEG2000 selon un ratio 2 : 1 en solution. Les plots contrôles ont impliqué les séquences CN4, CN8 et Zip9.

La procédure de détection SPR est également similaire à celle présentée dans la section 2.4. Le suivi de l'interaction des sondes aptamères avec leur séquence complémentaire a été réalisé suite à l'injection d'une solution de nanoparticules fonctionnalisées à une concentration de 200 pM. Pour les différentes stratégies testées, les courbes cinétiques sont comparées à celles obtenues après l'injection des séquences complémentaires en l'absence de AuNPs afin de rendre compte de l'effet d'amplification sur le signal SPRi.

Stratégie n'impliquant aucun blocage des surfaces

Pour cette première expérience, aucun traitement par un agent bloquant n'a été réalisé sur les surfaces. Les courbes cinétiques obtenues suite à l'injection des séquences seules (1 μ M) et conjuguées au AuNPs sont présentées sur la **Figure 3.13**.

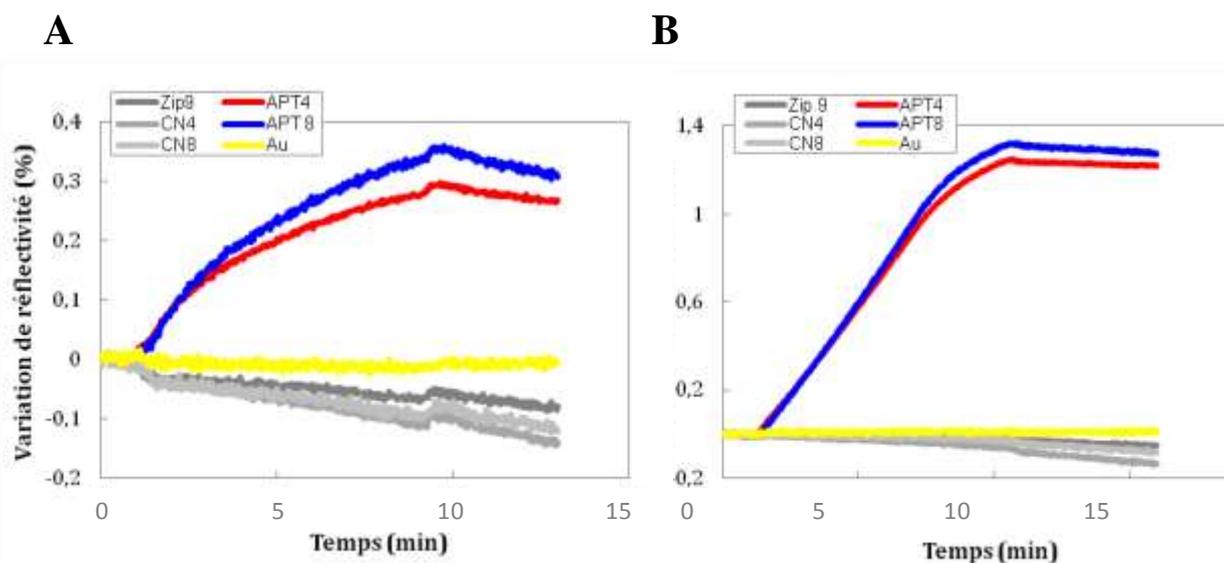


Figure 3.13 Signaux SPR mesurés lors d'une détection n'impliquant aucun blocage des surfaces. Les courbes cinétiques sont obtenues suite à l'interaction des séquences complémentaires cAPT8 seules (1 μ M) (**A**) ou conjuguées aux AuNPs (200 pM) (**B**) avec les sondes aptamères immobilisées à la surface. Les signaux correspondent à la moyenne de la variation de réflectivité calculée sur trois plots similaires.

Ces premiers résultats se révèlent surprenants car, contrairement à ce que l'on pouvait s'attendre, l'absence de blocage sur les surfaces ne favorise pas pour autant l'apparition du signal non spécifique. Celui-ci est même totalement absent. Par ailleurs, l'injection des séquences cAPT8 à 1 μ M génère sans surprise un signal SPR spécifique sur les plots APT8 et APT4 avec une variation de réflectivité maximale moyenne estimée à $\Delta R + 0,31$ %.

L'amplification du signal d'hybridation apportée par les AuNPs fonctionnalisées a cependant permis d'augmenter cette valeur moyenne de réflectivité maximale à $\Delta R + 1,38$ %, soit un facteur d'amplification d'environ 4,5. Néanmoins, nous pouvons observer une dérive sur les signaux des plots non-spécifiques. Celle-ci s'est poursuivie et accentuée tout au long de l'expérience, jusqu'à s'étendre à l'ensemble des plots. L'absence de blocage est donc susceptible de favoriser la désorption des séquences thiolées à la surface de la biopuce, hypothèse qui pourrait expliquer un tel phénomène. Envisager de s'affranchir d'un traitement de blocage des surfaces semble donc peu opportun.

L'utilisation du PEG300 pour le blocage des surfaces

Les courbes cinétiques relatives à l'utilisation de PEG300 pour le blocage de la surface de la biopuce sont représentées sur la **Figure 3.14**. La surface des AuNPs n'a dans ce cas subit aucun traitement.

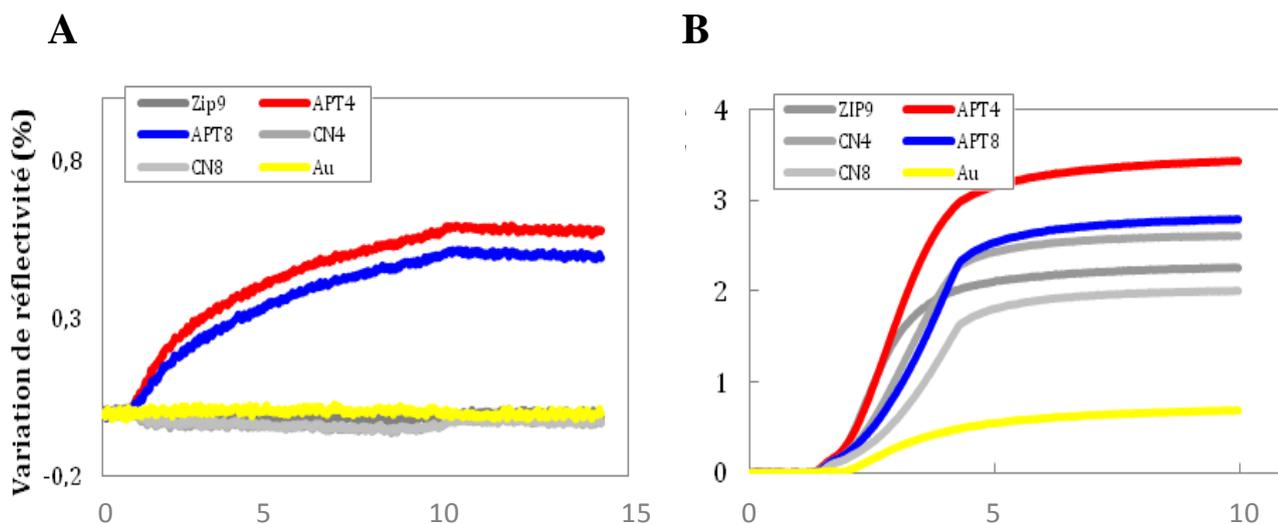


Figure 3.14 Influence du blocage de la surface des biopuces par le PEG300 sur les signaux d'hybridation SPR. Les courbes cinétiques sont obtenues suite à l'interaction des séquences complémentaires cAPT8 seules (1 μ M) (**A**) ou conjuguées aux AuNPs (200 pM) (**B**) avec les sondes aptamères immobilisées à la surface. Les signaux correspondent à la moyenne de la variation de réflectivité calculée sur trois plots similaires.

Si l'injection des cAPT8 (1 μ M) induit une variation de réflectivité de l'ordre de + 0,6% au niveau des plots spécifiques APT8 et APT4, nous pouvons remarquer que l'interaction des AuNPs passivées avec du PEG300, bien qu'ayant effectivement amplifié le signal SPR, engendre néanmoins un phénomène d'adsorption non spécifique.

Ceci a lieu sur l'ensemble des plots et, dans une moindre mesure, sur la surface du prisme non fonctionnalisée. De ce fait, l'utilisation du PEG300 en tant qu'agent bloquant de la surface de la biopuce ne nous semble pas adaptée à notre étude.

Par ailleurs, l'utilisation du PEG300 pour la passivation de la surface des AuNPs comme l'illustre la **Figure 3.15**, induit un dépôt massif des nanoparticules sur la surface du prisme (également passivée avec le PEG300). Ceci se caractérise par une augmentation significative de la réflectivité sur le plot contrôle de l'or nu.

Cette interaction PEG300-PEG300 est d'autant plus forte qu'il est difficile de s'en affranchir après l'injection d'une solution de NaOH (50 mM) censée régénérer la surface de la biopuce. Les signaux SPR mesurés restent donc stables au niveau des plots contrôles. A l'inverse, les plots spécifiques (APT4 et APT8) réagissent à l'injection de NaOH qui permet une déshybridation des séquences d'aptamères et donc une baisse de réflectivité. Après soustraction de la valeur du signal non spécifique, on peut alors arriver à une estimation moyenne de la valeur de réflectivité maximale à 2,5% pour les plots spécifiques (sans tenir compte du signal de la surface d'or nu). Ainsi, contrairement au protocole de Claridge et *al.* [54] qui impliquait l'utilisation d'un PEG300 pour la passivation des AuNPs, le notre fera certainement appel à une autre stratégie, plus favorable à l'optimisation du signal d'hybridation spécifique et à la réduction du signal non spécifique.

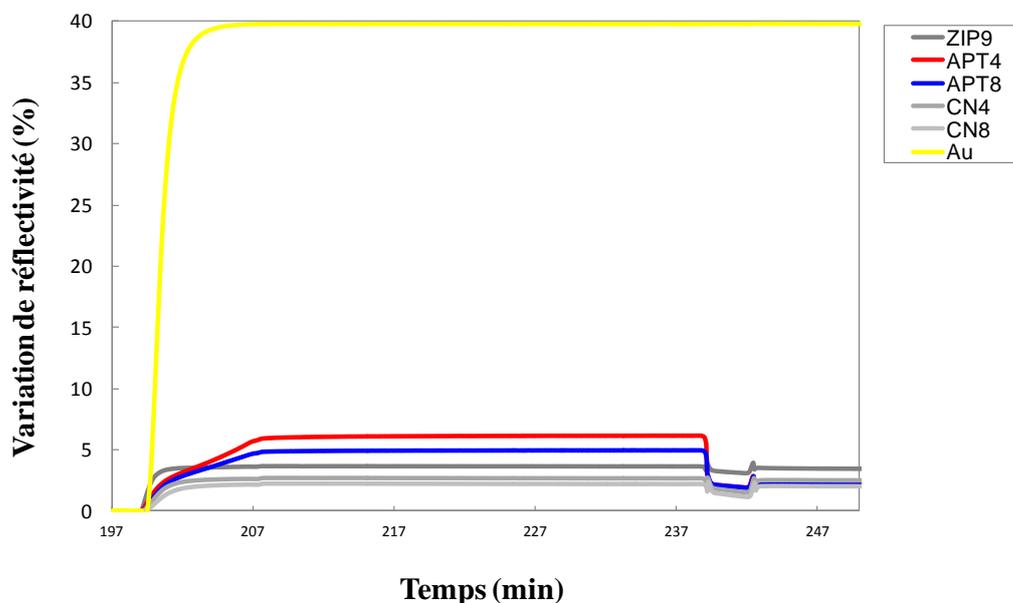


Figure 3.15 Influence du blocage par le PEG300 au niveau de la surface de la biopuce et des AuNPs. Les courbes cinétiques sont obtenues suite à l'interaction des séquences complémentaires (1 μ M) ou conjuguées aux AuNPs (200 pM) avec les sondes aptamères immobilisées à la surface. Les signaux correspondent à la moyenne de la variation de réflectivité calculée sur trois plots similaires.

L'utilisation du PEG2000 pour la passivation des surfaces

Cette expérience de blocage a impliqué l'utilisation du PEG2000 pour la passivation de la surface du prisme mais également celle des AuNPs.

Si cette méthode s'est révélée être la plus efficace lorsqu'il s'agissait de caractériser par SPRi l'hybridation de séquences d'aptamères anti-adénosine avec leur complémentaire, de même que l'interaction spécifique de la thrombine avec ses aptamères, il est légitime de nous interroger sur une telle efficacité lorsque des AuNPs sont mises en jeu, d'autant plus si l'on tient compte des expériences de passivation avec les PEG300. **La Figure 3.16** présente les résultats obtenus.

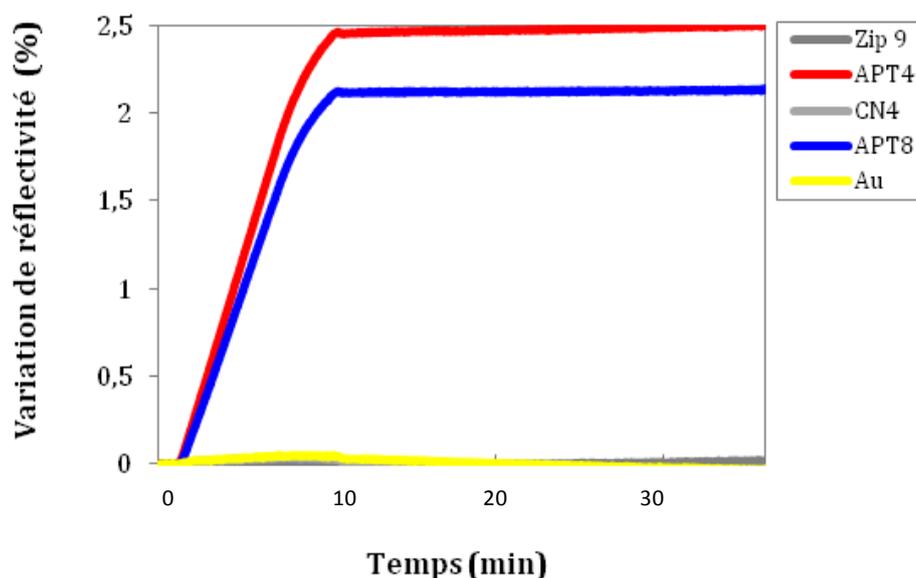


Figure 3.16 Influence du blocage par le PEG2000 au niveau de la surface de la biopuce et des AuNPs. Les courbes cinétiques sont obtenues suite à l'interaction des séquences complémentaires seules (1 μ M) ou conjuguées aux AuNPs (200 pM) avec les sondes aptamères immobilisées à la surface. Les signaux correspondent à la moyenne de la variation de réflectivité calculée sur trois plots similaires.

Il est possible de constater que c'est la passivation des surfaces avec la molécule de PEG2000 qui offre le meilleur ratio signal/ bruit. Celui-ci, équivalent à 25, est supérieur à celui retrouvés pour les stratégies précédentes. Le facteur d'amplification du signal SPR est quant à lui estimé à 5. Si l'on compare ces résultats avec les résultats obtenus lors de la passivation avec le PEG300, nous pouvons supposer que la longueur de la chaîne du polymère est le paramètre directement lié à une plus forte neutralisation du signal non spécifique.

Celle-ci semble favoriser la formation d'un environnement hydrophile compact autour des séquences sondes et sur la surface de la biopuce, empêchant les cibles de s'adsorber non spécifiquement à leur niveau. D'autre part, ceci n'affecte pas l'accessibilité des ADN conjugués à la surface de la biopuce qui peuvent de fait interagir avec les sondes aptamères greffés sur la biopuce.

A ce niveau des résultats, il est raisonnable de conclure que la nature hydrophile de la surface de la biopuce est celle qui assure le meilleur rapport signal/bruit suite à son interaction avec les AuNPs. Pour autant, cela n'est pertinent que si la chaîne des molécules de PEG mis en jeu est suffisamment longue. Dans notre cas, 44 unités d'éthylène glycol (PEG2000) au lieu de 3 (PEG300). Ce sera donc cette stratégie de blocage des surfaces au PEG2000 qui sera finalement retenue et appliquée pour les tests d'hybridation des sondes *Split aptamers* en vue d'une optimisation finale du protocole de fonctionnalisation et de détection SPRi.

3.2.4 Caractéristiques de la cinétique d'amplification par les AuNPs

Après la détermination du protocole de fonctionnalisation des AuNPs et de la surface de la biopuce, nous avons consacré la suite de nos expériences à l'analyse des courbes cinétiques obtenues par amplification des nanoparticules conjuguées. Les biopuces réalisées dans ce cadre ont été soumises au même procédé d'élaboration. Toutefois, cette fois-ci, les sondes *Split aptamers* (SplitAPT4 et SplitAPT8) ont également été greffées à la surface de la biopuce afin de caractériser leur interaction avec les séquences complémentaires cAPT8. Les signaux d'hybridation obtenus suite à l'injection de AuNPs conjuguées aux séquences cAPT8 sont présentés sur la **Figure 3.17**.

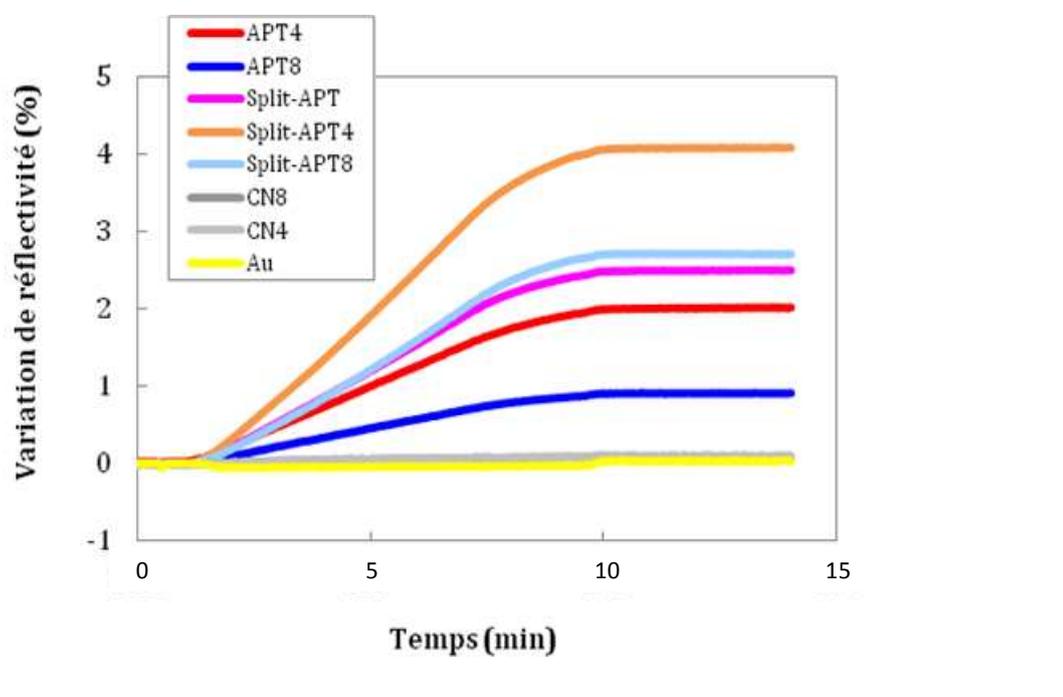


Figure 3.17 Courbes cinétiques obtenues suite à l'interaction des conjugués AuNPs-cAPT8 (200 pM) avec les sondes aptamères (APT8, APT4) et *Split aptamers* (SplitAPT8, SplitAPT4 et SplitAPT) immobilisées à la surface. Les signaux correspondent à la moyenne de la variation de réflectivité calculée sur trois plots similaires.

Si l'ensemble des séquences d'aptamères greffées à la surface sont susceptibles d'interagir spécifiquement avec le cAPT8 conjugué aux AuNPs, ce sont les séquences *Split aptamers* (SplitAPT8, SplitAPT4 et SplitAPT) qui présentent la plus grande variation de réflectivité : jusqu'à $\Delta R + 4,1 \%$ pour SplitAPT4 et un rapport signal/bruit équivalent à 50. Bien que le nombre de bases complémentaires (Nb) mis en jeu au sein des séquences aptamères non coupées APT4, APT8 (Nb = 42) soit plus élevé que celui des *Split aptamers* (Nb < 30), les signaux d'hybridation SPR mesurés sont plus faibles. Une première hypothèse peut être avancée pour expliquer cette faible réactivité. Celle-ci repose sur l'effet du couplage SPR/LSPR tel qu'explicité dans la section 1. Les séquences APT4 et APT8 étant composées de 42 bases, suite à leur hybridation avec les séquences split-APT, il est probable que les nanoparticules se retrouvent éloignées de la surface d'une distance supérieure à 10 nm. Dans ce cas, l'effet de couplage SPR/LSPR sur l'amplification du signal disparaît au profit l'effet de masse, évalué comme étant 5 fois plus faible [36, 37].

Il n'est donc pas étonnant d'obtenir une moindre réponse SPR en comparaison avec l'interaction des *Split aptamers*, dont les séquences courtes garantissent une interaction avec les AuNPs à une distance inférieure à 10 nm (combinaison effet de couplage et effet de masse).

Cette faible réactivité des séquences longues peut également s'expliquer par un éventuel repliement des aptamères susceptible de limiter leur interaction spécifique. La cinétique d'hybridation est de ce fait, comme on peut le voir, plus lente au sein de ces plots. Toutefois, la variation du signal SPR obtenu sur les plots APT8 est en moyenne 5 fois plus faible que celle trouvée lors des expériences précédentes ($\Delta R + 0,5 \%$ au lieu de $2,5 \%$) or, rien ne semble expliquer un telle baisse de réactivité. En effet, les paramètres de l'expérience tels que la nature des séquences et les concentrations utilisées sont invariables. De plus, si la cinétique d'hybridation au sein des plots APT4 et APT8 est effectivement plus lente en comparaison avec celle des *Split aptamers*, l'état d'équilibre n'est pas pour autant atteint durant l'injection des AuNPs. A partir de ce constat, un essai de sur-amplification par une double injection de AuNPs conjuguées a été mené (**Figure 3.18**).

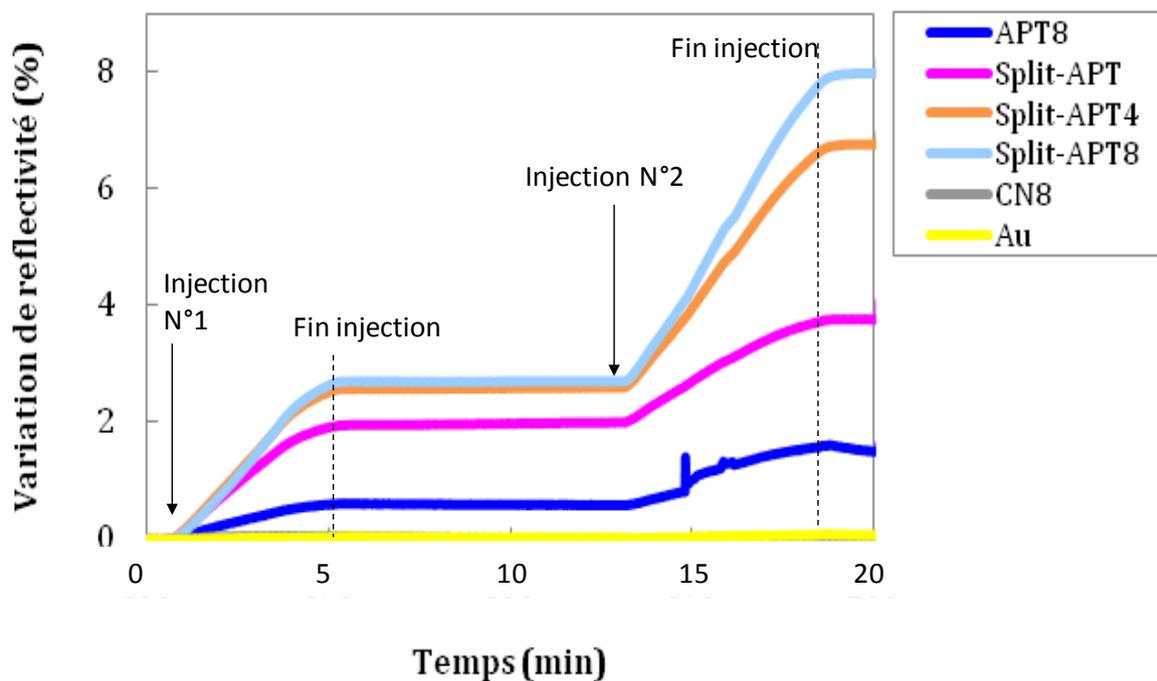


Figure 3.18 Sur-amplification du signal SPR par une double injection des conjugués AuNPs-cAPT8 (200 pM). Les signaux correspondent à la moyenne de la variation de réflectivité calculée sur trois plots similaires.

Sans surprise, une injection supplémentaire de AuNPs permet d'augmenter une nouvelle fois les signaux SPR obtenus sur les plots spécifiques, et pour lesquels l'équilibre ne semble toujours pas atteint. On observe un facteur d'amplification d'une valeur moyenne de 2 pour l'ensemble des plots considérés. Ceci laisse supposer qu'une troisième injection de nanoparticules fonctionnalisées, de même qu'une réduction du débit d'injection est susceptible d'amplifier d'avantage le signal SPR.

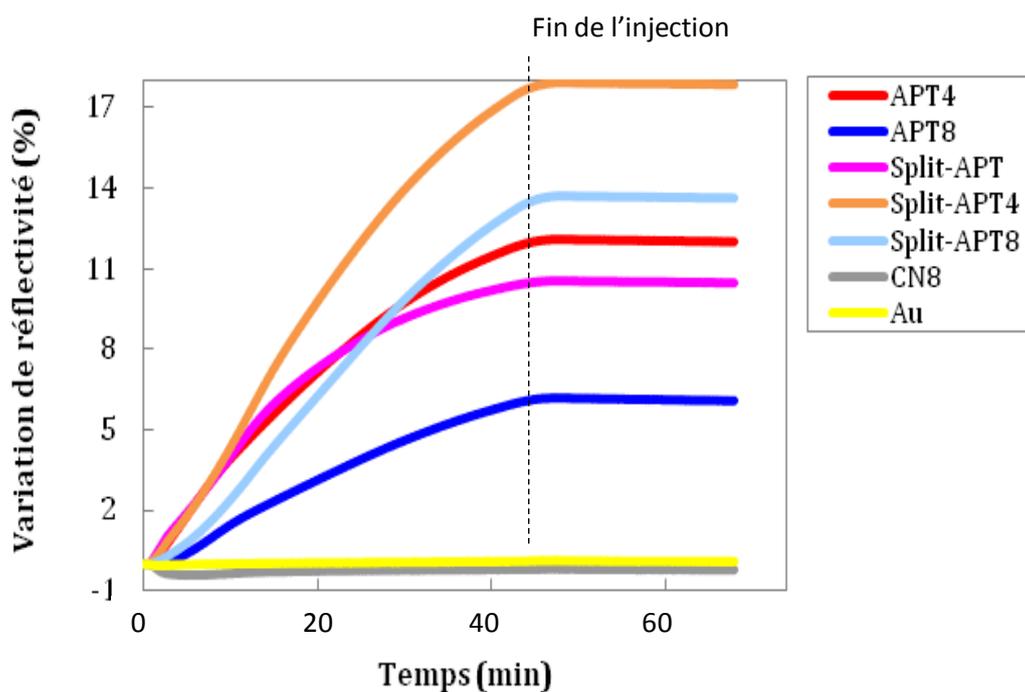


Figure 3.19 Courbes cinétiques obtenues suite à une injection en mode agitation (volume poussé 15 μL , volume aspiré 10 μL , débit constant 50 $\mu\text{L}/\text{min}$) des conjugués AuNPs-cAPT8 (200 pM). Les signaux correspondent à la moyenne de la variation de réflectivité calculée sur trois plots similaires.

Afin d'obtenir un facteur d'amplification plus important, nous avons choisi de faire des injections de 40 minutes à un débit de 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ avec le mode va-et-vient (en agitation) : 10 μL de volume poussé, 5 μL de volume aspiré (**Figure 3.19**). Ceci a permis l'obtention d'un signal SPR en moyenne 5 fois plus important que lors des injections classiques. La spécificité des interactions est par ailleurs conservée. En effet, les mêmes tendances sont retrouvées, avec néanmoins une plus forte variation de réflectivité pour les plots SplitAPT4. Nous remarquons également que le taux de signal non spécifique, caractérisé par la variation de réflectivité sur les pots contrôle est quant à lui toujours aussi faible ($\Delta R + 0,12\%$), soit un rapport signal/bruit moyen de 100.

L'ajustement de ce dernier paramètre nous fournit donc les conditions expérimentales optimales pour mener à bien notre objectif de détection d'adénosine à l'aide d'une biopuce à aptamères. Dans le cadre de notre stratégie de détection, ceci met en jeu l'utilisation des sondes *Split aptamers* au niveau de la surface du prisme mais également au niveau de la surface des nanoparticules.

Si l'ensemble des séquences concernées ont été greffées au niveau de la biopuce, seule une d'entre elles, SplitAPT a été conjuguée à la surface des AuNPs. Celle-ci peut de ce fait spécifiquement s'hybrider avec les séquences SplitAPT4 et SplitAPT8 au niveau de 4 et 8 bases complémentaires respectivement. La caractérisation de cette cinétique d'hybridation, en mode *agitation*, par SPRi est présentée dans la **Figure 3.20**.

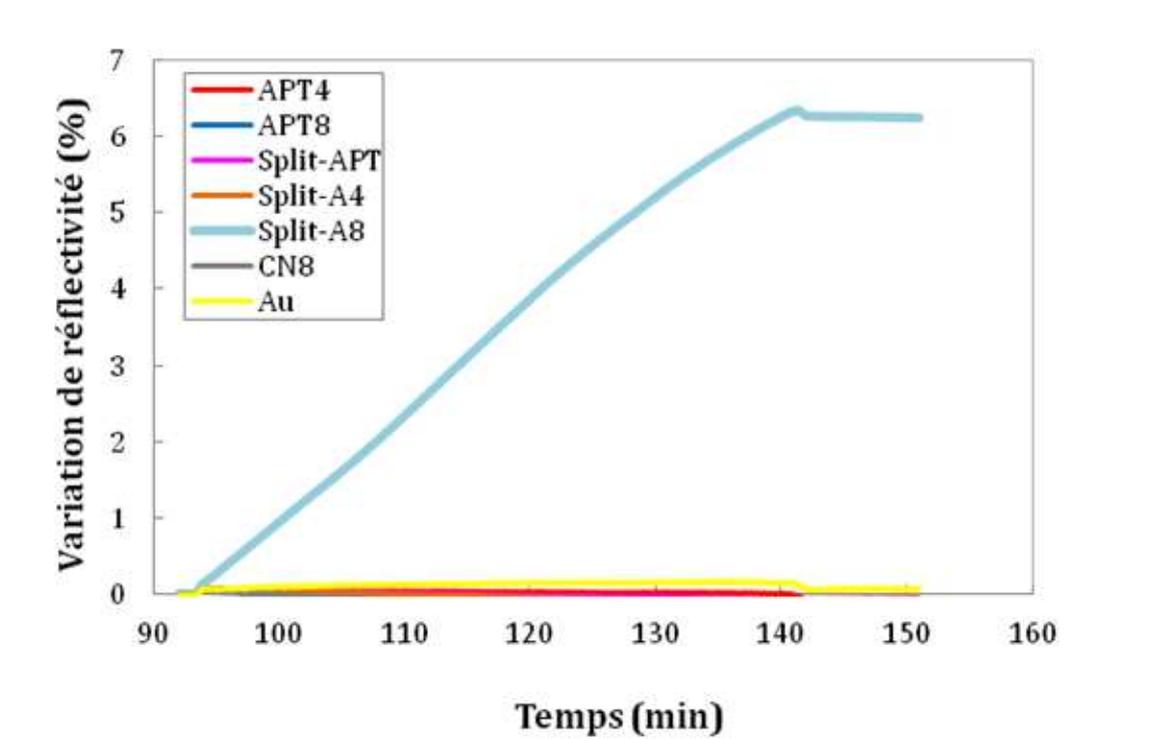


Figure 3.20 Signaux SPR obtenus suite à l'interaction des conjugués AuNPs-SplitAPT (200 pM) avec les séquences sondes (APT8, APT4, SplitAPT8, SplitAPT4 et SplitAPT). Les signaux correspondent à la moyenne de la variation de réflectivité calculée sur trois plots similaires.

Nous remarquons que l'injection des conjugués AuNPs-SplitAPT ne génère une variation de réflectivité qu'au niveau des plots SplitAPT8, soit une hybridation des deux séquences sur 8 bases. Cette variation est estimée à $\Delta R + 6\%$, avec un rapport signal/bruit équivalent à 80.

Aucune interaction n'est constatée avec les plots Split-APT4 bien que 4 bases soient complémentaires avec la séquence SplitAPT. Le nombre de bases complémentaires est donc un paramètre discriminant pour assurer l'hybridation des séquences d'aptamères considérées par SPRi. Au nombre de 4, le complexe formé semble trop instable thermodynamiquement pour pouvoir persister et générer un signal SPR.

D'un autre côté, il est étonnant de constater que les sondes APT8 ne réagissent pas non plus à l'injection des conjugués AuNPs-SplitAPT, bien que leur séquence présente 8 bases complémentaires avec celle des SplitAPT. Ceci appuie donc l'hypothèse que les aptamères anti-adénosine non coupés se trouvent dans une conformation repliée (en tige-boucle) au niveau de la surface, rendant l'accès à la séquence complémentaire difficile (**Figure 3.21**).

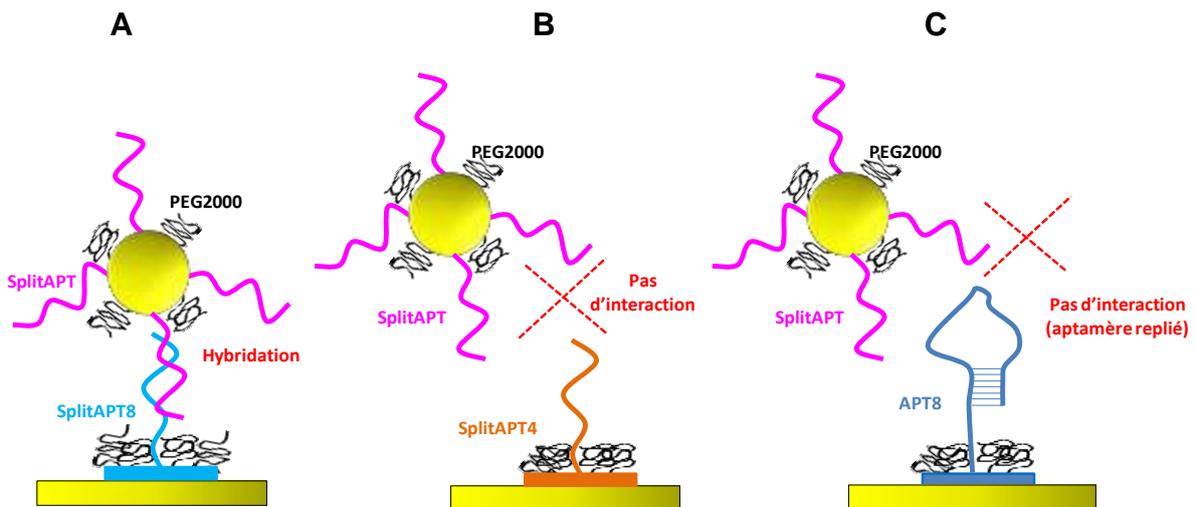


Figure 3.21 Schéma de principe illustrant l'interaction des sondes SplitAPT8 (A), SplitAPT4 (B) et APT8 (C) avec les conjugués AuNPs-SplitAPT.

La définition du protocole de fonctionnalisation des AuNPs, l'ajustement des paramètres de détection et la caractérisation de la cinétique d'hybridation des séquences *Split aptamers* nous permet de passer à l'étape suivante, à savoir la mise en œuvre de notre stratégie pour la détection d'adénosine.

3.3 Application à la détection d'adénosine

3.3.1 Détection *via* l'interaction des conjuguées AuNPs-SplitAPT avec les sondes SplitAPT8

Afin de caractériser, par SPRi, l'interaction spécifique de l'adénosine avec les *Split aptamers* greffés sur la puce, nous avons comparé les cinétiques d'hybridation des séquences SplitAPT8/SplitAPT conjuguées aux AuNPs en absence et en présence d'adénosine. Afin de rendre compte d'un quelconque effet de l'adénosine, une gamme de concentration allant de 20 μM à 100 μM a été réalisée puis injectée sur la puce.

Un contrôle négatif impliquant l'utilisation de guanosine a également été testé. En effet, la guanosine, qui est un analogue structural de l'adénosine, est usuellement employée en tant que contrôle négatif dans les expériences de détection de l'adénosine afin de rendre compte de la spécificité de l'interaction d'intérêt. Il est également possible de retrouver l'utilisation d'autres analogues structuraux tels que la cytosine ou l'uridine.

Le protocole employé est tel que décrit dans la section précédente, la concentration des conjugués AuNPs-SplitAPT mise en jeu est toujours de 200 pM. Le mode *agitation* permettant des injections de longue durée (40 minutes) a été systématiquement enclenché. La première injection a concerné celle des AuNPs-SplitAPT en l'absence d'adénosine. Les suivantes correspondaient aux co-injections de AuNPs-SplitAPT en présence d'adénosine aux différentes concentrations indiquées plus haut. Enfin, la dernière injection correspond à celle des AuNPs-SplitAPT en présence de guanosine à une concentration maximale de 100 μM . Les signaux SPR obtenus suite à l'ensemble de ces injections sont représentés dans la **Figure 3.22**. Ceux-ci caractérisent l'interaction des séquences SplitAPT8 immobilisés à la surface de la biopuce avec les séquences SplitAPT greffés à la surface des AuNPs. Nous pouvons remarquer que la variation de réflectivité ($\Delta R + 6\%$) des plots SplitAPT8 en absence d'adénosine est similaire à celle obtenue précédemment.

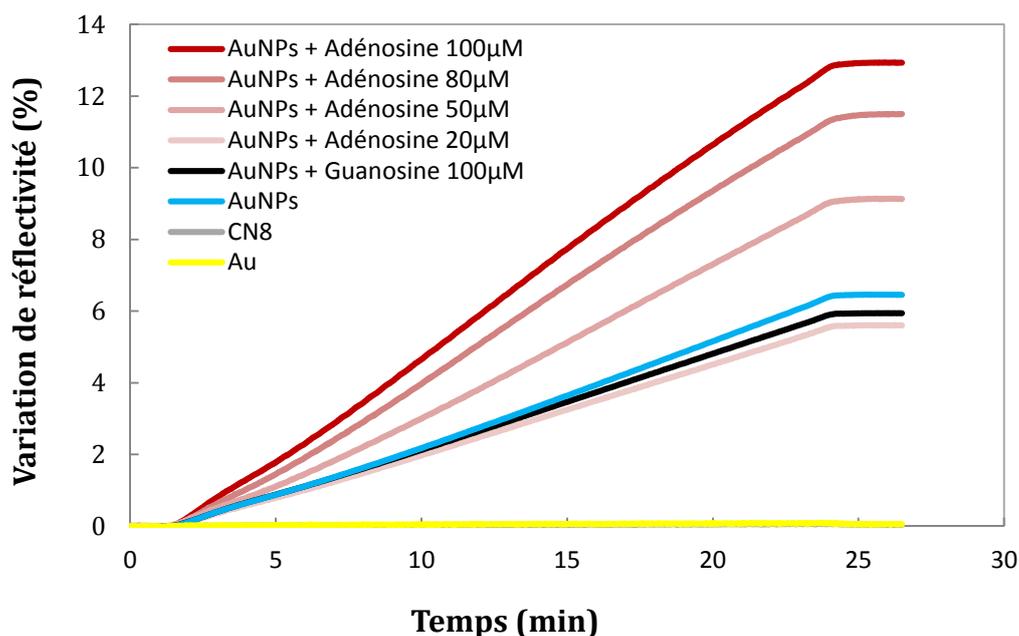


Figure 3.22 Sensogrammes obtenus sur les plots SplitAPT8 à partir d'injections des conjugués AuNPs-SplitAPT (200 pM). En présence de différentes concentration d'adénosine (20, 50, 80, 100 μM) ou de guanosine (100 μM). Chaque courbe représente la moyenne des signaux obtenus sur 3 réplicats. La moyenne des plots contrôles (CN8) est représentée en gris mais est confondue avec l'axe des abscisses.

La présence d'adénosine à une concentration de 100 μM lors d'une co-injection avec les AuNPs-SplitAPT permet d'obtenir variation de réflectivité équivalente à une valeur de $\Delta R + 13\%$, soit un facteur d'amplification de 2,1 en comparaison avec l'injection en absence d'adénosine. L'injection de concentrations plus faibles d'adénosine (80 - 50 μM) se traduit également par une augmentation proportionnelle de la variation de réflectivité par rapport aux injections en absence d'adénosine, attestant ainsi d'un *effet adénosine* sur l'interaction des séquences *Split aptamers*. Néanmoins, pour une concentration d'adénosine de 20 μM , l'effet d'amplification n'est plus observé et les signaux SPR détectés sont du même ordre que ceux en absence d'adénosine. Par ailleurs, la co-injection de AuNPs conjuguées en présence de guanosine à une concentration de 100 μM se traduit par une variation de signal similaire à celle en absence d'adénosine. Cela permet de confirmer la spécificité de l'effet adénosine observé pour la gamme 50 – 100 μM .

Si peu d'études impliquant l'utilisation de *Split aptamers* pour la détection d'adénosine ont été réalisées, il est néanmoins possible de se baser sur les travaux de Wang et *al.* [40, 41, 43] pour conforter nos résultats.

En effet, il a été démontré à travers ces études que la concentration de petites molécules mise en jeu est proportionnelle au taux d'interaction des séquences d'aptamères caractérisées par SPR. Par ailleurs, dans le cas des *Split aptamers*, lorsqu'un faible nombre de bases complémentaires est impliqué dans le processus d'hybridation des séquences, le duplex est considéré comme instable d'un point de vue thermodynamique [27, 43]. La présence de la cible, par formation du complexe tertiaire au détriment du duplex initial, contribuait à augmenter la stabilité des structures. De plus, il est admis que l'interaction de séquences d'aptamères avec leur cible présente une plus grande affinité que celle impliquant l'interaction avec les séquences complémentaires seules [79]. Cette différence se répercute sur certains paramètres cinétiques, notamment la vitesse d'association et de dissociation des complexes. La présence de la cible peut ainsi accélérer le processus de reconnaissance, permettant de mobiliser un plus grand nombre de séquences et donc, sur une même durée de temps, générer une variation de réflectivité plus importante en comparaison avec les expériences en absence d'adénosine. Pour autant, ceci n'est valable que dans le cas où les conditions de saturation et d'équilibre ne sont pas atteintes lors des étapes de détection. L'avantage qu'offre une détection SPR en temps réel s'illustre ainsi parfaitement car il permet de visualiser les cinétiques d'interaction, pour un ajustement optimal des paramètres de détection.

L'augmentation de la réflectivité constatée semble néanmoins limitée aux fortes concentrations d'adénosine (50 – 100 μM). La limite de détection –LOD- (pour l'acronyme anglais Limit Of Detection), estimée à 50 μM , se révèle donc beaucoup plus faible que celle obtenue par Golub et *al.* [42] (LOD = 1 μM) ainsi que Wang et *al.* [43] (LOD = 1,5 pM).

Par ailleurs, l'interaction de petites molécules au niveau de la surface, même à de fortes concentrations, n'est pas susceptible, par simple effet de masse, de générer un signal SPR directement mesurable. Toutefois, une seule étude fait office d'exception dans ce domaine : celle relativement récente (février 2014) de Chang et *al.* [80]. Si le sujet principal concerne la détermination des paramètres cinétiques relatifs à l'interaction entre les petites molécules et les aptamères, il y est également stipulé qu'une telle caractérisation est possible suite à la mesure du signal SPR directement généré par la présence de la cible à la surface.

L'argument avancé fait état de l'utilisation d'une chimie de surface de type dextran, qui, en assurant un greffage des aptamères à de très fortes densités (valeurs non précisées), permettait de mettre en évidence l'effet de masse induit par leur interaction avec les petites molécules. Il est ainsi étonnant de constater que les fortes densités de greffage mentionnées dans cette étude ne semblent pas affecter la reconnaissance spécifique entre les espèces d'intérêt. Il est par ailleurs dommage qu'une simple phrase d'indication ait été consacrée à cet aspect de la problématique, alors qu'il s'agit là de la première étude mettant en œuvre l'utilisation de la SPR pour une détection directe de petites molécules via une biopuce à aptamères. Néanmoins, en ce qui concerne notre stratégie de détection, il semble raisonnable d'éliminer l'hypothèse relative à l'effet de masse induit par le dépôt d'adénosine à la surface de notre biopuce et se focaliser sur la première explication détaillée plus haut. Ainsi, suite aux résultats obtenus avec ces premières expériences de détection, il nous paraît intéressant de nous interroger à présent sur l'effet de l'adénosine, en termes de variation de signal SPR, sur, non plus les plots SplitAPT8, mais SplitAPT4. Comme nous l'avons vu, en absence d'adénosine, le duplex SplitAPT4/SplitAPT ne génère pas une variation de réflectivité. La présence d'adénosine va-t-elle induire une réponse SPR différente ?

3.3.2 Détection au moyen des séquences sondes SplitAPT4

L'application de cette stratégie s'est basée sur un principe de détection similaire à celui utilisé précédemment : Les signaux SPR obtenus suite à l'injection de nanoparticules conjuguées aux séquences SplitAPT ont été comparés selon que l'adénosine soit présente ou non au moment de l'injection. La concentration des AuNPs injectées, sous agitation, est toujours de 200 pM. La guanosine a été utilisée en tant que contrôle négatif à une concentration de 1 μ M. La **Figure 3.23** présente les courbes cinétiques obtenues suite à l'injection des cojugés AuNPs-SplitAPT en présence d'adénosine à une concentration de 1 μ M.

Nous pouvons remarquer qu'en absence d'adénosine (courbe bleue), seule une très faible variation de réflectivité ($\Delta R \sim 0.04$ %), attribuée au taux de signal non spécifique, est observée sur les plots SplitAPT4, comme cela a déjà été vu lors des expériences précédentes. En revanche, une co-injection des AuNPs-SplitAPT en présence d'adénosine à une concentration de 1 μ M permet de générer une variation de signal d'une valeur $\Delta R + 0,5$ % après 40 minutes.

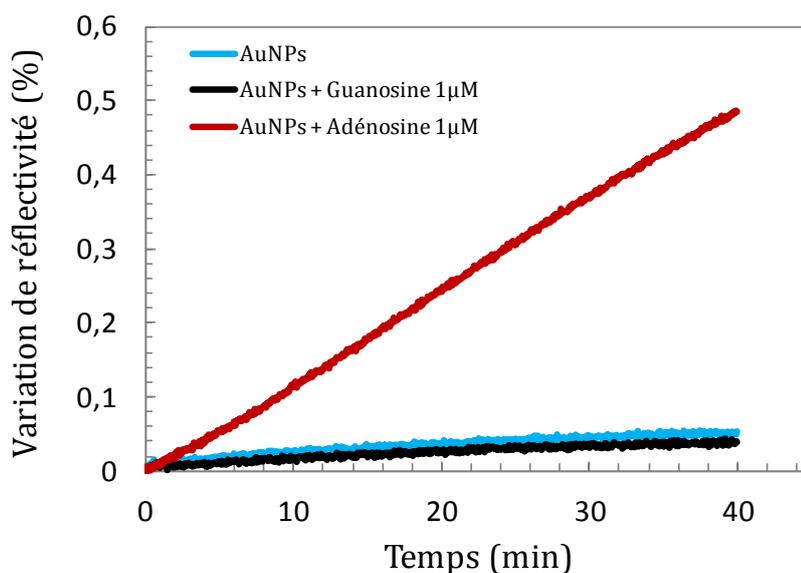


Figure 3.23 Courbes cinétiques obtenus pour les plots Split-APT4 suite à une injection (en mode agitation) de AuNPs conjuguées aux séquences SplitAPT seules (courbe bleue), en présence d'adénosine (courbe rouge) ou de guanosine (courbe noire). Les signaux correspondent à la moyenne de la variation de réflectivité calculée sur trois plots similaires.

Ce résultat est en concordance avec celui de Wang *et al.* [43] et confirme que la présence d'adénosine induit effectivement la formation du complexe tertiaire au niveau de la surface et ce, indépendamment du nombre de bases complémentaires disponibles pour l'hybridation des séquences. La formation du complexe tertiaire génère alors une variation de réflectivité mesurable par SPRi. Celle-ci est alors due aux effets cumulés de la masse des AuNPs conjuguées (interagissant avec les sondes) et au couplage LSPR/SPR (**Figure 3.24**).

La concentration mise en jeu avec cette stratégie de détection est de 1 μM , soit 50 fois plus faible que la LOD obtenue avec la stratégie impliquant les plots APT8 (LOD = 50 μM). Quand la première permettait de comparer la cinétique de formation des complexes tertiaires (en présence d'adénosine) avec la cinétique d'hybridation des séquences SplitAPT8/Split-APT (absence d'adénosine), cette méthode, basée sur un mode de détection de type On/Off, met directement en évidence la formation du complexe tertiaire SplitAPT4/SplitAPT/adénosine et l'absence d'interaction des séquences par hybridation (en absence d'adénosine) (**Figure 3.24**).

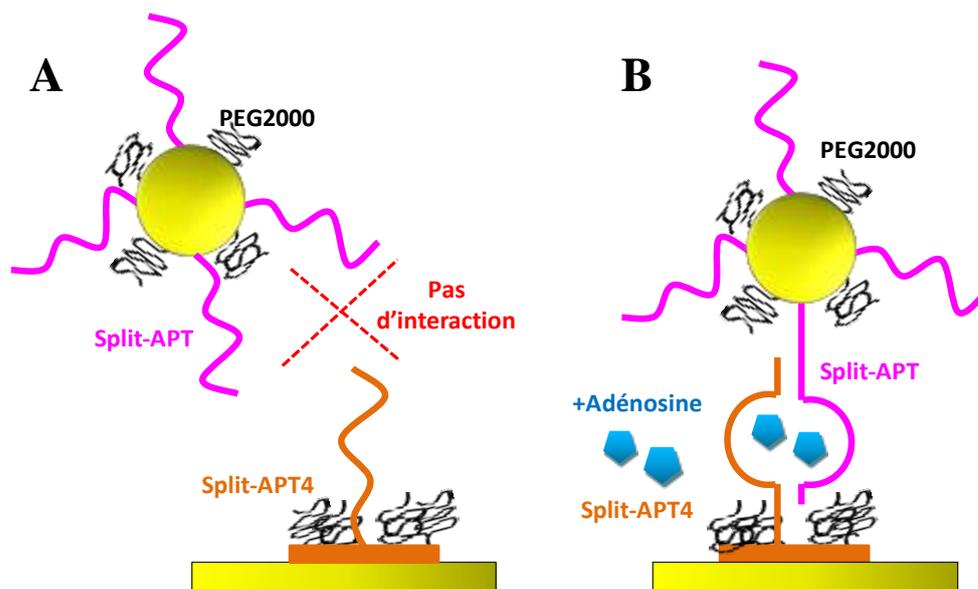


Figure 3.24 Représentation schématique de l'interaction des séquences SplitAPT conjuguées aux AuNPs avec les sondes SplitAPT4 en absence (A) et en présence d'adénosine (B). Seule la présence d'adénosine permet la formation du complexe tertiaire.

Afin d'évaluer la limite de détection, une gamme de concentration d'adénosine (1 nM – 1 μ M) a été réalisée (**Figure 3.25**). L'exploitation des cinétiques d'interaction en temps réel a également permis de représenter les signaux SPR en fonction de la concentration d'adénosine. La pente initiale des signaux SPR, calculée après correction par le signal d'un plot contrôle, est ainsi tracée en fonction des différentes concentrations d'adénosine (**Figure 3.26**).

Une courbe de calibration des signaux SPR en fonction du logarithme de la concentration d'adénosine est également obtenue à partir des valeurs calculées de la pente des signaux (**encadré Figure 3.26**). Ces résultats permettent de rendre compte de la limite de détection qu'offre l'utilisation de cette méthode de détection. Celle-ci peut être évaluée à 50 nM ($\Delta R + 0.14\%$), valeur pour laquelle le signal SPR mesuré est significativement différent de celui des injections contrôles ($\Delta R \sim 0,04\%$, soit un rapport signal/ bruit > 3). Une gamme de quantification de la concentration d'adénosine de 1 μ M à 50 nM est donc possible, permettant un gain de sensibilité d'un facteur 1000 en comparaison avec la méthode impliquant l'interaction des séquences SplitAPT8 (LOD = 50 μ M).

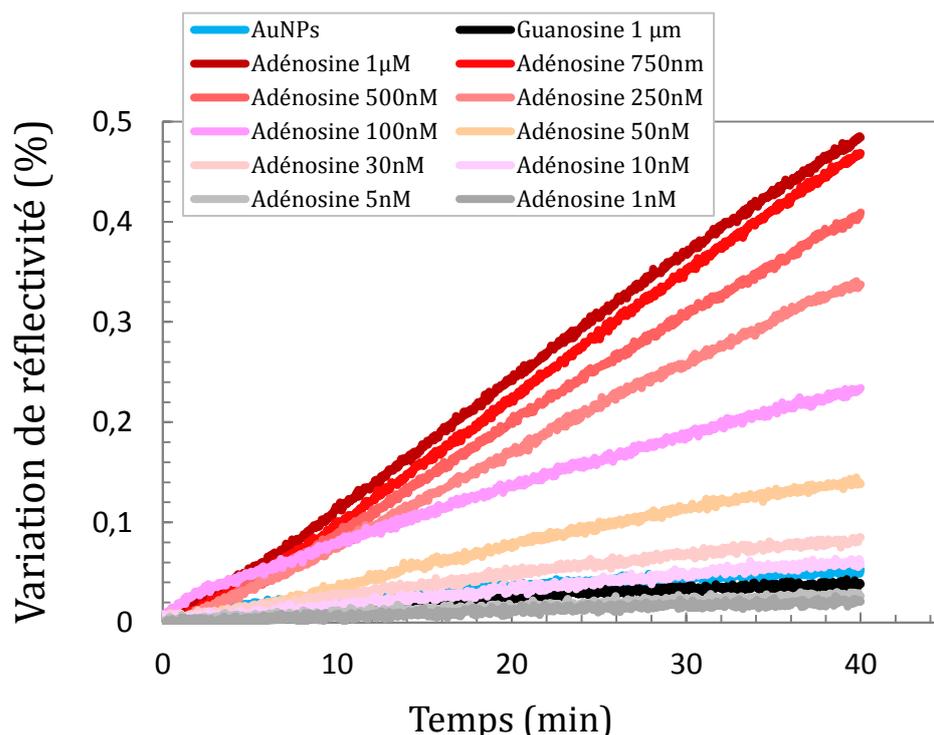


Figure 3.25 Sensogrammes obtenus sur les plots Split-APT4 à partir d'injections de AuNPs conjuguées aux séquences SplitAPT, en présence de différentes concentration d'adénosine (de 1 nM à 1 μ M) ou de guanosine (1 μ M). Chaque courbe représente la moyenne des signaux obtenus sur 3 réplicats.

Si cette LOD est plus faible que celle trouvée par Golub et *al.* [42] dans le cas de l'utilisation des *Split aptamers* pour la détection de cocaïne, il n'est toujours pas possible de rivaliser avec la LOD décrite dans l'étude de Wang et *al.* (LOD = 1,5 pM) [43] et dont le modèle d'étude se rapproche davantage du notre.

Une des raisons pouvant expliquer cette différence est le mode de détection SPR utilisé. En effet, si nous nous sommes basés sur une détection de type imagerie SPR, Wang et *al.* ont utilisé une détection SPR selon un mode de lecture obtenu par variation de la longueur d'onde. Or, il a été démontré [81, 82] que cette technique de détection SPR présentait une sensibilité, inhérente à l'effet de couplage SPR/LSPR, en moyenne 7 fois plus importante en comparaison avec les deux autres modes de lecture possibles (variation d'angle, variation de réflectivité). Il n'est donc pas étonnant que la LOD obtenue par SPRi soit supérieure à celle retrouvée par Wang et *al.*

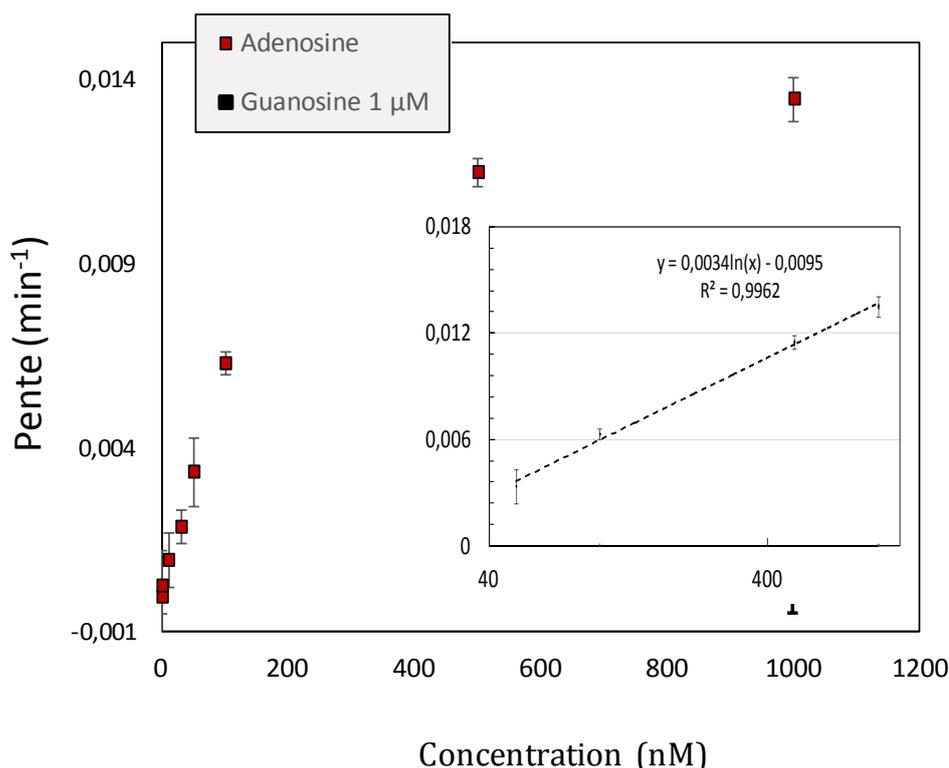


Figure 3.26 Représentation de la pente des signaux SPR en fonction de différentes concentrations d'adénosine (1000 nM, 500, 100, 50, 30 et 10 nM) et de guanosine à une concentration de 1 µM. La barre d'erreur représente l'écart type des valeurs de variation de réflectivité obtenue durant deux différentes expériences. Encadré : représentation logarithmique des résultats pour les concentrations d'adénosine entre 1 µM et 50 nM.

Par ailleurs, l'explication avancée par Wang et *al.* par rapport cette faible limite de détection en comparaison avec celle de Golub et *al.* est justement liée à l'effet d'amplification du couplage LSPR/SPR et sa dépendance par rapport à la distance (D) des AuNPs de la surface.

Dans le modèle de Golub et *al.*, l'interaction des séquences *Split aptamers* et de la cible se déroule de sorte que la nanoparticule se retrouve très proche de la surface ($D < 5$ nm). Dans celui de Wang et *al.*, de même que le nôtre, la distance des AuNPs par rapport à la surface est évaluée à 9 – 10 nm. Or, conformément à ce que nous avons vu dans la section 3.2, l'effet de couplage est d'autant plus important lorsque D diminue (avec une limite supérieure de 10 nm) [36, 37]. Ainsi, contrairement à ce qui est stipulé par Wang et *al.* -en se basant sur une étude non adaptée [83]-, c'est théoriquement la configuration de Golub et *al.* qui permet d'obtenir la meilleure sensibilité au couplage, et donc, la plus faible limite de détection. L'argument avancé par Wang et *al.*, ne peut donc servir de faire-valoir pour expliquer cette différence de sensibilité.

Si nous devons à notre tour comparer nos résultats avec ceux de Golub *et al*, nous avancerions préférentiellement l'argument de la densité de greffage des split-aptamères sur les AuNPs. Quand celle-ci est estimée à 3 unités/ AuNP par Golub *et al*, la nôtre est en moyenne 20 fois plus importante. L'augmentation de la densité de greffage peut ainsi avoir pour conséquence l'augmentation des interactions avec les sondes présentes au niveau de la surface [51], et de ce fait, une plus grande variation de réflectivité lors du processus de reconnaissance.

3.4 Conclusion

Nous avons exposé dans ce chapitre la première stratégie mise en œuvre pour la détection d'adénosine au moyen de la biopuce élaborée au cours de ce travail de thèse, et ce par la technique d'imagerie de résonance des plasmons de surface. Afin d'améliorer les performances de détection par SPRi, reconnues comme étant limitées dans le cas des petites molécules, il est nécessaire de recourir à l'amplification du signal d'interaction spécifique. Pour ce faire, notre choix s'est porté sur l'utilisation de nanoparticules d'or (AuNPs) lors des étapes de détection. Celles-ci sont en effet caractérisées par des propriétés optiques singulières, relatives à l'existence d'un phénomène de résonance plasmonique localisée (LSPR) au niveau de leur surface. Le couplage plasmonique entre les résonances localisées des AuNPs et celles propagatives d'un film métallique (surface de la biopuce) induit une modification de l'indice optique local et, de fait, une variation du signal SPR mesuré. Si ce couplage est limité à des distances inférieures ou égales à 10 nm, il peut être additionné aux effets de masse et contribuer à amplifier significativement le signal SPR. Néanmoins, l'utilisation de AuNPs dans un protocole de détection SPR nécessite la prise en compte d'un nombre conséquent de paramètres. Le premier travail réalisé a donc concerné le développement d'un protocole de blocage des surfaces des AuNPs efficace, susceptible de réduire le taux de signal non spécifique suite à leur interaction avec la surface de la biopuce. Deux agents bloquants de type PEG ont ainsi été testés sur la surface des AuNPs et/ou celle de la biopuce : un poly(éthylène-glycol) de 2kDA (PEG2000) et un autre de 300 Da (PEG300). La validation du protocole optimal a été réalisée par analyse des cinétiques d'hybridation des sondes aptamères avec leur séquence complémentaire conjuguée à des nanoparticules de 20 nm de diamètre.

Deux paramètres essentiels ont ainsi pu être évalués : l'intensité de l'amplification apportée par la présence des AuNPs et le taux de signal non spécifique.

Il a ainsi pu être démontré qu'un facteur d'amplification significatif ($\times 5$), de même qu'un faible taux de signal non-spécifique ($\Delta R \sim 0,02 \%$) est obtenu suite à l'utilisation du PEG2000 pour le blocage de la surface des AuNPs ainsi que celle de la biopuce.

Si l'utilisation de nanoparticules d'or pour l'amplification du signal SPR est au cœur de notre stratégie de détection, un autre aspect a concerné le clivage des séquences d'aptamères anti-adénosine (APT4 et APT8) en *Split aptamers*. Il en résulte une séquence commune, SplitAPT, greffée sur la surface des AuNPs et capable de s'hybrider avec les deux autres séquences SplitAPT4 et SplitAPT8, immobilisées au niveau de la surface de la biopuce. Ce signal d'hybridation SPR est alors comparé à celui obtenu en présence d'adénosine. Celle-ci est en effet en mesure d'initier une conformation proche de celle de l'aptamère originel et, par stabilisation des complexes, d'assurer l'augmentation du rendement de reconnaissance spécifique.

Ainsi, une fois le protocole de fonctionnalisation et de blocage des surfaces validé, une caractérisation de la cinétique d'amplification par les AuNPs, impliquant les séquences *Split aptamers*, a été réalisée. Ces expériences ont permis d'ajuster le dernier paramètre du protocole de détection par augmentation de la durée d'injection (mode agitation) lors des mesures SPR. Cela a permis l'obtention d'un facteur d'amplification équivalent à 20, ainsi qu'un rapport de signal/bruit de l'ordre de 80. Pour autant, l'interaction spécifique des AuNPs conjuguées à la séquence SplitAPT n'a concerné que les sondes SplitAPT8, révélant l'influence du nombre de bases complémentaires nécessaires à la génération du signal d'hybridation SPR. Au nombre de 4 (cas des SplitAPT4), le duplex formé est à priori trop instable pour perdurer et induire une variation de réflectivité.

L'application du protocole établi pour la détection d'adénosine a donc au préalable impliqué l'interaction des séquences splitAPT8 avec les séquences SplitAPT conjuguées aux AuNPs. Nous avons observé que la présence d'adénosine, par formation du complexe tertiaire au détriment du duplex, contribuait à favoriser la cinétique de reconnaissance, induisant une plus grande variation de réflectivité en comparaison avec les expériences d'hybridation en absence d'adénosine. Cette augmentation de réflectivité était néanmoins limitée aux concentrations d'adénosine de l'ordre du micromolaire, avec une limite de détection LOD estimée à 50 μM .

C'est par ailleurs le recours à l'exploitation de l'instabilité thermodynamique de l'interaction SplitAPT4/SplitsAPT lors de la détection SPR qui a permis de réduire la LOD par un facteur 1000. Dans ce cas, seule la présence d'adénosine lors de l'injection permettait d'induire une variation de réflectivité. Une gamme de quantification de la concentration d'adénosine de 1 μM à 50 nM a pu ainsi être réalisée.

Sans pouvoir encore rivaliser avec les performances de détection d'adénosine annoncées par certaines études (LOD = 1,5 pM), le protocole mis au point ici a néanmoins permis de mettre en évidence les potentialités d'une détection de petites molécules par imagerie SPR selon la configuration imaginée. En effet, la preuve de concept du couplage de la SPRi avec les nanoparticules d'or pour la détection d'adénosine, en temps réel, au moyen d'une biopuce impliquant l'utilisation de séquences *Split aptamers* est effectivement réalisée. Si la LOD obtenue demeure satisfaisante pour d'éventuelles applications en diagnostic, il est cependant important de rappeler que cette détection est réalisée en milieu tamponné de composition simple, encore loin des milieux complexes, d'intérêt biologique. Pour autant, la biopuce telle qu'élaborée ici constitue déjà un outil intéressant pour l'étude de l'interaction des petites molécules, en l'occurrence l'adénosine, avec les séquences *Split aptamers*. Notamment sur les aspects relatifs à la stabilité thermodynamique du complexe tertiaire formé. En exploitant le rôle de l'adénosine dans l'augmentation de la stabilité thermodynamique du complexe, il est ainsi possible d'imaginer une nouvelle stratégie de détection, comme nous le verrons dans la suite du manuscrit.

BIBLIOGRAPHIE

1. Morrill, P.R., R.B. Millington, and C.R. Lowe, Imaging surface plasmon resonance system for screening affinity ligands. *Journal of Chromatography B*, 2003. **793**(2): p. 229-251.
2. Nelson, B.P., et al., Surface Plasmon Resonance Imaging Measurements of DNA and RNA Hybridization Adsorption onto DNA Microarrays. *Analytical Chemistry*, 2000. **73**(1): p. 1-7.
3. Livache, T., et al., Polypyrrole based DNA hybridization assays: study of label free detection processes versus fluorescence on microchips. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2003. **32**(45): p. 687-696.
4. Piliarik, M. and J.í. Homola, Surface plasmon resonance (SPR) sensors: approaching their limits? *Optics Express*, 2009. **17**(19): p. 16505-16517.
5. Kochergin, V.E., et al., Phase properties of a surface-plasmon resonance from the viewpoint of sensor applications. *Quantum Electronics*, 1998. **28**(5): p. 444.
6. Nedelkov, D. and R.W. Nelson, Analysis of native proteins from biological fluids by biomolecular interaction analysis mass spectrometry (BIA/MS): exploring the limit of detection, identification of non-specific binding and detection of multi-protein complexes. *Biosensors and Bioelectronics*, 2001. **16**(9-12): p. 1071-1078.
7. Mitchell, J., Small Molecule Immunosensing Using Surface Plasmon Resonance. *Sensors*, 2010. **10**(8): p. 7323-7346.
8. Sakai, G., et al., Highly selective and sensitive SPR immunosensor for detection of methamphetamine. *Electrochimica Acta*, 1999. **44**(21-22): p. 3849-3854.
9. Yu, Q., et al., Detection of low-molecular-weight domoic acid using surface plasmon resonance sensor. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2005. **107**(1): p. 193-201.
10. Shankaran, D.R., et al., A novel surface plasmon resonance immunosensor for 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) based on indirect competitive immunoreaction: a promising approach for on-site landmine detection. *Sensors Journal, IEEE*, 2005. **5**(4): p. 616-621.
11. Shankaran, D.R., K.V. Gobi, and N. Miura, Recent advancements in surface plasmon resonance immunosensors for detection of small molecules of biomedical, food and environmental interest. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2007. **121**(1): p. 158-177.
12. Yuan, J., et al., Sensitivity enhancement of SPR assay of progesterone based on mixed self-assembled monolayers using nanogold particles. *Biosensors and Bioelectronics*, 2007. **23**(1): p. 144-148.
13. Zeng, S., et al., Nanomaterials enhanced surface plasmon resonance for biological and chemical sensing applications. *Chemical Society Reviews*, 2014. **43**(10): p. 3426-3452.
14. Faraday, M., The Bakerian Lecture: Experimental Relations of Gold (and Other Metals) to Light. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 1857. **147**: p. 145-181.
15. Dahmen, C. and G. von Plessen, Optical Effects of Metallic Nanoparticles. *Australian Journal of Chemistry*, 2007. **60**(7): p. 447-456.
16. Kelly, K.L., et al., The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2002. **107**(3): p. 668-677.
17. Mie, G., Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen. *Annalen der Physik*, 1908. **330**(3): p. 377-445.

18. Logunov, S.L., et al., Electron Dynamics of Passivated Gold Nanocrystals Probed by Subpicosecond Transient Absorption Spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry B*, 1997. **101**(19): p. 3713-3719.
19. Haes, A.J. and R.P.V. Duyne, Preliminary studies and potential applications of localized surface plasmon resonance spectroscopy in medical diagnostics. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 2004. **4**(4): p. 527-537.
20. Willets, K.A. and R.P. Van Duyne, Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy and Sensing. *Annual Review of Physical Chemistry*, 2007. **58**(1): p. 267-297.
21. Mirkin, C.A., et al., A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials. *Nature*, 1996. **382**(6592): p. 607-609.
22. Storhoff, J.J., et al., Homogeneous detection of unamplified genomic DNA sequences based on colorimetric scatter of gold nanoparticle probes. *Nat Biotech*, 2004. **22**(7): p. 883-887.
23. Thaxton, C.S., D.G. Georganopoulou, and C.A. Mirkin, Gold nanoparticle probes for the detection of nucleic acid targets. *Clinica Chimica Acta*, 2006. **363**(12): p. 120-126.
24. Liu, J. and Y. Lu, Adenosine-Dependent Assembly of Aptazyme-Functionalized Gold Nanoparticles and Its Application as a Colorimetric Biosensor. *Analytical Chemistry*, 2004. **76**(6): p. 1627-1632.
25. Zhao, W., et al., Simple and Rapid Colorimetric Biosensors Based on DNA Aptamer and Noncrosslinking Gold Nanoparticle Aggregation. *ChemBioChem*, 2007. **8**(7): p. 727-731.
26. Chavez, J.L., et al., Theophylline detection using an aptamer and DNA-gold nanoparticle conjugates. *Biosensors and Bioelectronics*, 2010. **26**(1): p. 23-28.
27. Li, F., et al., Adenosine detection by using gold nanoparticles and designed aptamer sequences. *Analyst*, 2009. **134**(7): p. 1355-1360.
28. Guieu, V., et al., Aptamer enzymatic cleavage protection assay for the gold nanoparticle-based colorimetric sensing of small molecules. *Analytica Chimica Acta*, 2011. **706**(2): p. 349-353.
29. Song, K.-M., et al., Gold nanoparticle-based colorimetric detection of kanamycin using a DNA aptamer. *Analytical Biochemistry*, 2011. **415**(2): p. 175-181.
30. Zheng, Y., Y. Wang, and X. Yang, Aptamer-based colorimetric biosensing of dopamine using unmodified gold nanoparticles. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2011. **156**(1): p. 95-99.
31. Yang, C., et al., Aptamer-based colorimetric biosensing of Ochratoxin A using unmodified gold nanoparticles indicator. *Biosensors and Bioelectronics*, 2011. **26**(5): p. 2724-2727.
32. Kim, Y.S., et al., A novel colorimetric aptasensor using gold nanoparticle for a highly sensitive and specific detection of oxytetracycline. *Biosensors and Bioelectronics*, 2010. **26**(4): p. 1644-1649.
33. Ghosh, S.K. and T. Pal, Interparticle Coupling Effect on the Surface Plasmon Resonance of Gold Nanoparticles: From Theory to Applications. *Chemical Reviews*, 2007. **107**(11): p. 4797-4862.
34. Lyon, L.A., D.J. Pena, and M.J. Natan, Surface Plasmon Resonance of Au Colloid-Modified Au Films: Particle Size Dependence. *The Journal of Physical Chemistry B*, 1999. **103**(28): p. 5826-5831.
35. Zeng, S., et al., Size dependence of Au NP-enhanced surface plasmon resonance based on differential phase measurement. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2013. **176**(0): p. 1128-1133.

36. Hong, X. and E.A.H. Hall, Contribution of gold nanoparticles to the signal amplification in surface plasmon resonance. *Analyst*, 2012. **137**(20): p. 4712-4719.
37. Golden, M.S., A.C. Bjonnes, and R.M. Georgiadis, Distance- and Wavelength-Dependent Dielectric Function of Au Nanoparticles by Angle-Resolved Surface Plasmon Resonance Imaging. *The Journal of Physical Chemistry C*, 2010. **114**(19): p. 8837-8843.
38. Bolduc, O.R. and J.-F. Masson, Advances in Surface Plasmon Resonance Sensing with Nanoparticles and Thin Films: Nanomaterials, Surface Chemistry, and Hybrid Plasmonic Techniques. *Analytical Chemistry*, 2011. **83**(21): p. 8057-8062.
39. Feng, C., S. Dai, and L. Wang, Optical aptasensors for quantitative detection of small biomolecules: A review. *Biosensors and Bioelectronics*, 2014. **59**(0): p. 64-74.
40. Wang, J., A. Munir, and H.S. Zhou, Au NPs-aptamer conjugates as a powerful competitive reagent for ultrasensitive detection of small molecules by surface plasmon resonance spectroscopy. *Talanta*, 2009. **79**(1): p. 72-76.
41. Wang, J. and H.S. Zhou, Aptamer-Based Au Nanoparticles-Enhanced Surface Plasmon Resonance Detection of Small Molecules. *Analytical Chemistry*, 2008. **80**(18): p. 7174-7178.
42. Golub, E., et al., Electrochemical, Photoelectrochemical, and Surface Plasmon Resonance Detection of Cocaine Using Supramolecular Aptamer Complexes and Metallic or Semiconductor Nanoparticles. *Analytical Chemistry*, 2009. **81**(22): p. 9291-9298.
43. Wang, Q., et al., Surface plasmon resonance detection of small molecule using split aptamer fragments. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2011. **156**(2): p. 893-898.
44. Saha, K., et al., Gold Nanoparticles in Chemical and Biological Sensing. *Chemical Reviews*, 2012. **112**(5): p. 2739-2779.
45. Nguyen Ngoc, L., et al., Synthesis and optical properties of colloidal gold nanoparticles. *Journal of Physics: Conference Series*, 2009. **187**(1): p. 012026.
46. Haiss, W., et al., Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV-Vis Spectra. *Analytical Chemistry*, 2007. **79**(11): p. 4215-4221.
47. Alivisatos, A.P., et al., Organization of 'nanocrystal molecules' using DNA. *Nature*, 1996. **382**(6592): p. 609-611.
48. Sperling, R.A. and W.J. Parak, Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 2010. **368**(1915): p. 1333-1383.
49. He, L., et al., Colloidal Au-Enhanced Surface Plasmon Resonance for Ultrasensitive Detection of DNA Hybridization. *Journal of the American Chemical Society*, 2000. **122**(38): p. 9071-9077.
50. Liu, J., J.H. Lee, and Y. Lu, Quantum Dot Encoding of Aptamer-Linked Nanostructures for One-Pot Simultaneous Detection of Multiple Analytes. *Analytical Chemistry*, 2007. **79**(11): p. 4120-4125.
51. Zhao, W., et al., DNA Aptamer Folding on Gold Nanoparticles: From Colloid Chemistry to Biosensors. *Journal of the American Chemical Society*, 2008. **130**(11): p. 3610-3618.
52. Letsinger, R.L., et al., Use of a Steroid Cyclic Disulfide Anchor in Constructing Gold Nanoparticle-Oligonucleotide Conjugates. *Bioconjugate Chemistry*, 2000. **11**(2): p. 289-291.
53. Li, Z., et al., Multiple thiol-anchor capped DNA-gold nanoparticle conjugates. *Nucleic Acids Research*, 2002. **30**(7): p. 1558-1562.

54. Claridge, S.A., et al., Isolation of Discrete Nanoparticle-DNA Conjugates for Plasmonic Applications. *Nano Letters*, 2008. **8**(4): p. 1202-1206.
55. Pellegrino, T., et al., Gel Electrophoresis of Gold-DNA Nanoconjugates. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2007. **2007**.
56. Zanchet, D., et al., Electrophoretic Isolation of Discrete Au Nanocrystal/DNA Conjugates. *Nano Letters*, 2000. **1**(1): p. 32-35.
57. Zanchet, D., et al., Electrophoretic and Structural Studies of DNA-Directed Au Nanoparticle Groupings. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2002. **106**(45): p. 11758-11763.
58. Chen, Q., et al., 3D Motion of DNA-Au Nanoconjugates in Graphene Liquid Cell Electron Microscopy. *Nano Letters*, 2013. **13**(9): p. 4556-4561.
59. Mastroianni, A.J., S.A. Claridge, and A.P. Alivisatos, Pyramidal and Chiral Groupings of Gold Nanocrystals Assembled Using DNA Scaffolds. *Journal of the American Chemical Society*, 2009. **131**(24): p. 8455-8459.
60. Niemeyer, C.M., W. Bürger, and J. Peplies, Covalent DNA–Streptavidin Conjugates as Building Blocks for Novel Biometallic Nanostructures. *Angewandte Chemie International Edition*, 1998. **37**(16): p. 2265-2268.
61. Daniel, C., et al., Real time monitoring of thrombin interactions with its aptamers: Insights into the sandwich complex formation. *Biosensors and Bioelectronics*, 2013. **40**(1): p. 186-192.
62. Daniel, C., et al., Solution-Phase vs Surface-Phase Aptamer-Protein Affinity from a Label-Free Kinetic Biosensor. *PLoS ONE*, 2013. **8**(9): p. e75419.
63. Love, J.C., et al., Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology. *Chemical Reviews*, 2005. **105**(4): p. 1103-1170.
64. Hostetler, M.J., A.C. Templeton, and R.W. Murray, Dynamics of Place-Exchange Reactions on Monolayer-Protected Gold Cluster Molecules. *Langmuir*, 1999. **15**(11): p. 3782-3789.
65. Solliard, C. and P. Buffat, Variation de la maille cristalline de petits cristaux d'or par effet de taille. *J. Phys. Colloques*, 1977. **38**(C2): p. C2-167-C2-170.
66. Laaksonen, T., et al., Stability and Electrostatics of Mercaptoundecanoic Acid-Capped Gold Nanoparticles with Varying Counterion Size. *ChemPhysChem*, 2006. **7**(10): p. 2143-2149.
67. Lin, S.-Y., et al., Two-Step Functionalization of Neutral and Positively Charged Thiols onto Citrate-Stabilized Au Nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2004. **108**(7): p. 2134-2139.
68. Yao, H., et al., Phase Transfer of Gold Nanoparticles across a Water/Oil Interface by Stoichiometric Ion-Pair Formation on Particle Surfaces. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 2000. **73**(12): p. 2675-2678.
69. Moores, A., et al., Phosphinine stabilised gold nanoparticles; synthesis and immobilisation on mesoporous materials. *Chemical Communications*, 2004(24): p. 2842-2843.
70. Sakura, T., et al., One-pot preparation of mono-dispersed and physiologically stabilized gold colloid. *Colloid and Polymer Science*, 2005. **284**(1): p. 97-101.
71. Fritz, G., et al., Electrosteric Stabilization of Colloidal Dispersions. *Langmuir*, 2002. **18**(16): p. 6381-6390.
72. Stenkamp, V.S., P. McGuiggan, and J.C. Berg, Restabilization of Electrosterically Stabilized Colloids in High Salt Media. *Langmuir*, 2001. **17**(3): p. 637-651.
73. Tamaki, T., et al., Isolation of Gold Nanoparticle/Oligo-DNA Conjugates by the Number of Oligo-DNAs Attached and Their Formation of Self-assembly. *Chemistry Letters*, 2010. **39**(10): p. 1084-1085.

74. Bohren, C.F. and D.R. Huffman, Absorption and Scattering by a Sphere, in Absorption and Scattering of Light by Small Particles. 2007, Wiley-VCH Verlag GmbH. p. 82-129.
75. Steel, A.B., et al., Immobilization of Nucleic Acids at Solid Surfaces: Effect of Oligonucleotide Length on Layer Assembly. *Biophysical Journal*, 2000. **79**(2): p. 975-981.
76. Parak, W.J., et al., Conformation of Oligonucleotides Attached to Gold Nanocrystals Probed by Gel Electrophoresis. *Nano Letters*, 2002. **3**(1): p. 33-36.
77. Pena, S.R., et al., Hybridization and Enzymatic Extension of Au Nanoparticle-Bound Oligonucleotides. *Journal of the American Chemical Society*, 2002. **124**(25): p. 7314-7323.
78. Ulman, A., Wetting studies of molecularly engineered surfaces. *Thin Solid Films*, 1996. **273**(12): p. 48-53.
79. Wu, Z.-S., et al., Reusable Electrochemical Sensing Platform for Highly Sensitive Detection of Small Molecules Based on Structure-Switching Signaling Aptamers. *Analytical Chemistry*, 2007. **79**(7): p. 2933-2939.
80. Chang, A.L., et al., Kinetic and Equilibrium Binding Characterization of Aptamers to Small Molecules using a Label-Free, Sensitive, and Scalable Platform. *Analytical Chemistry*, 2014. **86**(7): p. 3273-3278.
81. Chien, F.C. and S.J. Chen, A sensitivity comparison of optical biosensors based on four different surface plasmon resonance modes. *Biosensors and Bioelectronics*, 2004. **20**(3): p. 633-642.
82. Nenninger, G.G., et al., Long-range surface plasmons for high-resolution surface plasmon resonance sensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2001. **74**(13): p. 145-151.
83. He, L., et al., The Distance-Dependence of Colloidal Au-Amplified Surface Plasmon Resonance. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2004. **108**(30): p. 10973-10980.

CHAPITRE 4

DÉTECTION DE L'ADÉNOSINE PAR UTILISATION DES RAMPES DE TEMPERATURE

4.1 Introduction	122
4.2 Stratégies de détection de l'adénosine à partir des profils de dénaturation	125
4.2.1 Dispositif expérimental	126
4.2.2 Protocole de détection	128
4.3 Caractéristiques des profils de dénaturation	131
4.3.1 Cas des séquences SplitAPT8	131
4.3.2 Application à la détection d'adénosine à partir des séquences SplitAPT8	134
4.3.3 Gamme de détection	136
4.3.4 Influence du nombre de bases complémentaires	139
4.4 Considérations thermodynamiques	143
4.4.1 Généralités sur le modèle de Langmuir	143
4.4.2 Adaptation au modèle d'étude	147
4.5 Conclusion	153
BIBLIOGRAPHIE	155

4.1 Introduction

L'interaction de l'adénosine avec les *split aptamers*, nous l'avons vu, peut à elle seule conditionner la stabilité du complexe formé. Celle-ci est alors principalement dépendante de la concentration d'adénosine, de même que du nombre de bases complémentaires des séquences d'ADN impliquées dans le processus d'hybridation. En tenant compte de ce dernier paramètre, il s'avère possible d'envisager de caractériser cette interaction à travers l'étude de la stabilité du duplexe d'ADN. Une méthode classique, largement employée pour l'étude quantitative de la dissociation des paires de bases dans les structures en double hélice, fait intervenir la notion de *dénaturation*. En effet, soumise à des contraintes extérieures diverses (thermiques, mécaniques, ioniques), la double hélice d'ADN se retrouve déstabilisée et peut être dissociée par rupture des liaisons hydrogène entre les paires de bases, caractérisant ainsi le phénomène – réversible - de la dénaturation. Des études de ce phénomène ont ainsi pu être menées tant au niveau expérimental que théorique [1]. Sur le plan théorique, les modèles physiques existants considèrent majoritairement la structure secondaire et tertiaire des molécules d'ADN. Les énergies d'interaction mises en jeu étant de l'ordre de celles fournies par l'agitation thermique, ces modèles permettent également d'intégrer l'aspect thermodynamique à l'analyse. Expérimentalement, plusieurs méthodes, réalisées le plus souvent en solution et à l'équilibre, permettent de rendre compte de la dénaturation des acides nucléiques. La plus courante concerne l'absorbance UV (à $\lambda = 260$ nm) d'une solution d'ADN en fonction d'un paramètre ajustable (température, concentration en sel...).

Dans le cas d'un ADN en double hélice, l'empilement des bases a pour conséquence une forte diminution de leur absorption UV (hypochromisme) : la dénaturation se traduit par une augmentation de la densité optique à $\lambda=260$ nm. Le suivi des variations de la densité optique à 260 nm constitue ainsi une méthode standard pour mesurer la température de fusion d'un duplexe. De plus, l'absorbance d'une paire de bases étant variable selon qu'elle soit appariée ou non, il est possible de suivre l'évolution du nombre total de bases appariées en fonction du paramètre d'étude et d'estimer ainsi différentes propriétés thermodynamiques (telle que l'énergie libre nécessaire à la dénaturation de la molécule) [2, 3]. Par ailleurs, d'autres méthodes permettant d'étudier la stabilité des molécules d'ADN en solution ont également été développées, telles que celles basées sur la résonance magnétique nucléaire (RMN) [4-7] ou encore la calorimétrie [8-10].

Pour autant, si la dénaturation des duplexes d'ADN peut être obtenue sous différentes conditions, nous nous focaliserons ici sur celles impliquant exclusivement l'utilisation de la variation de température.

Si l'on considère le cas classique de la dénaturation thermique de l'ADN, l'augmentation de la température induira l'ouverture de la double hélice. Le phénomène de dénaturation sera alors caractérisé par une transition entre la structure en double hélice et l'état dénaturé [11]. Il en résulte un profil de dénaturation caractéristique des séquences étudiées (**Figure 4.1**). A partir de ce profil, il est possible de définir une température de fusion, dite T_m (*Temperature of melting*) pour laquelle la moitié des séquences sont considérées à l'état dénaturé. Dans ce cas, la détermination des profils de dénaturation, à travers la caractérisation des T_m , se révèle être un bon moyen pour évaluer la stabilité des duplexes d'ADN en fonction de divers facteurs (mésappariements, force ionique, présence d'agents chaotropiques...) [12-16].

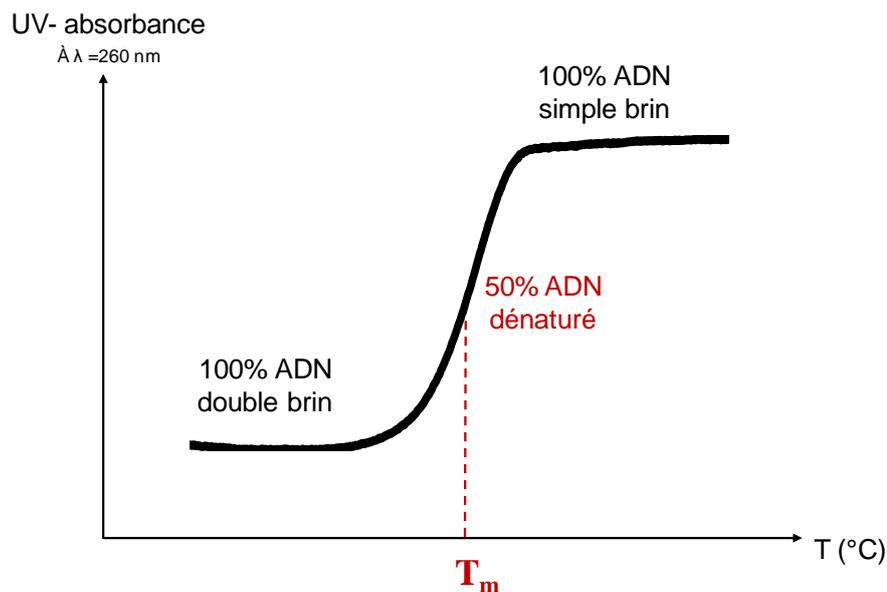


Figure 4.1 Représentation d'une courbe de dénaturation de brins d'ADN en fonction de la température, obtenue par absorbance UV à 260 nm.

L'adaptation de telles études au format biopuce (sur support) offre par ailleurs un avantage considérable en ce sens qu'il est possible de réaliser des analyses haut débit (multiplexage). Les principales applications concernent alors la détection de mutations [17, 18] ou encore des aspects plus fondamentaux, relatifs à l'interaction des acides nucléiques aux interfaces [19-21].

L'étude des profils de dénaturation sur support implique néanmoins la prise en compte de nouveaux facteurs susceptibles d'influencer l'hybridation de l'ADN, telles que la chimie de greffage, la densité des sondes ou encore la diffusion des cibles sur la surface. Il convient également de distinguer deux cas particuliers : la dénaturation hors équilibre et la dénaturation en équilibre. Dans le premier cas, un déséquilibre est observé entre le taux d'hybridation et de déshybridation des séquences sondes/cibles. Ces conditions sont obtenues lors d'un chauffage trop rapide ou de l'utilisation d'une faible concentration en cibles, rendant ainsi difficile l'extraction des caractéristiques thermodynamiques de l'interaction. A l'inverse, les conditions de dénaturation à l'équilibre, caractérisées par une concentration constante des cibles et une faible vitesse de rampe, vérifiées par la superposition des cycles de chauffage et refroidissement, permettent de remonter vers les données thermodynamiques de l'hybridation.

L'étude de la dénaturation thermique de l'ADN sur support a impliqué l'utilisation de différentes méthodes, dont l'électrochimie [19, 21-23], la diffusion dynamique de la lumière [24] ou encore, la fluorescence [25-31]. Si cette dernière méthode demeure la plus commune, elle nécessite néanmoins souvent le marquage des séquences cible et/ou sondes par des molécules fluorescentes. La SPRi est à ce titre idéale puisqu'elle permet une détection parallélisée, sans marquage, mais surtout en temps-réel, favorisant ainsi l'accès aux paramètres cinétiques de l'hybridation et à l'étude de l'influence de différents facteurs (densité de greffage longueur des séquences...).

Si Peterlinz et *al.* [32] ont été les premiers à s'intéresser à la question, les principaux travaux sur l'étude des profils de dénaturation de l'ADN sur support par SPRi ont par la suite été exclusivement réalisés dans notre laboratoire, par Fiche et *al.* [18, 33] ainsi que Fuchs et *al.* [18, 34, 35]. Cela a été possible grâce au développement inédit d'un système de régulation de température couplé au dispositif SPRi classique [33]. L'application majeure l'étude des effets de la concentration saline [35], de même que la présence d'agents dénaturants [34] sur les profils de dénaturation, mais également et surtout, la détection de mutations ponctuelles [18]. En se basant sur le principe selon lequel la présence de mutations provoque une diminution de la température de dénaturation T_m liée à la présence de paires de bases non appariées, une discrimination entre les séquences mutées et non mutées a été possible.

Il a été démontré que la variation ΔT_m (jusqu'à une limite de 1 °C) mesurée entre le duplexe parfaitement complémentaire et le duplexe muté, était caractéristique de la séquence étudiée, de la nature de la mutation ainsi que des bases placées à proximité.

Si la stabilité des duplexes ADN peut ainsi être évaluée au moyen de la technique SPRi, il est possible d'envisager d'appliquer une telle stratégie pour caractériser l'interaction de séquences d'aptamères avec leur cible. La présence de la cible au moment de l'interaction, en favorisant la stabilité du complexe, est donc susceptible d'augmenter la température de dénaturation mesurée. A notre connaissance, seule une étude, réalisée par Belozerova *et al.* [19], a permis récemment de mettre en évidence l'interaction sur support de séquences d'ADN avec un ligand (antibiotique) au moyen des profils de dénaturation. Il a ainsi été prouvé que la fixation de la cible sur le duplexe contribuait effectivement à générer une variation de T_m . Dans le cas de l'interaction de séquences d'aptamères avec les petites molécules, une stratégie de caractérisation et de détection, basée sur l'étude des profils de dénaturation thermique, nous semble tout aussi pertinente. Elle a ainsi fait l'objet du présent chapitre.

4.2 Stratégie de détection de l'adénosine à partir des profils de dénaturation

En nous basant sur les travaux de Fiche *et al.* [33] sur la conception d'un système de régulation de température couplé à l'imageur SPR, nous nous proposons d'adapter et valider cet outil pour la détection d'adénosine au moyen d'une biopuce à aptamères. Il sera ainsi possible d'observer en temps réel la dissociation des séquences *split aptamers* en fonction de la température et d'en déduire la température de dénaturation caractéristique. Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, l'interaction de l'adénosine avec le duplexe *split aptamers* conduit à la formation d'un complexe tertiaire stable. Nous pouvons de ce fait exploiter l'effet de cette stabilité thermodynamique afin de statuer sur la présence de la cible dans l'échantillon injecté. En effet, la valeur de la température de dénaturation étant dépendante du degré de stabilité des duplexes, nous nous attendons à trouver des valeurs plus élevées pour le complexe tertiaire (en présence d'adénosine) en comparaison avec celui du duplexe *split aptamers* simple. L'étude du processus de dénaturation thermique de séquences d'aptamères en présence de leur cible, et ce, dans le but de détecter des petits molécules, est, à notre connaissance, la première dans son genre.

La mise en œuvre d'une telle stratégie a nécessité en premier lieu le contrôle précis de la température pendant les expériences SPRi. La technique SPR étant sensible aux changements d'indice local survenant sur la surface d'or, elle est tributaire des facteurs susceptibles de le modifier, telle que la température. La variation de la température fait varier l'indice de l'eau [36, 37], induisant un changement de réflectivité, estimé dans notre cas à $-0,35\%$ par degré Celsius ($^{\circ}\text{C}$) [33]. Dans ces conditions, la régulation de la température pendant les mesures SPR est un facteur critique, notamment pour les études impliquant l'hybridation de l'ADN [17, 32, 38].

4.2.1 Dispositif expérimental

Une cellule chauffante (**Figure 4.2**) a été mise au point par Fiche *et al.* [33] afin de permettre l'étude thermodynamique de l'interaction de séquences d'ADN sur support par SPRi. Celle-ci a été adaptée de sorte que le tampon d'hybridation SPR, de même que les échantillons injectés, puissent diffuser et atteindre rapidement la surface de la biopuce afin d'assurer le suivi des interactions en temps réel. Une fois dégazé, la solution pénètre au sein de la cellule, sa température est alors ajustée avec une précision de $0,05\text{ }^{\circ}\text{C}$ (régulateur PID Oxford ITC). La cellule chauffante est composée d'acier inoxydable, offrant une conduction thermique adéquate à la régulation en température du liquide circulant, tout en étant chimiquement inerte vis-à-vis de l'échantillon. L'épaisseur de la chambre de réaction ($50 \pm 10\ \mu\text{M}$) est assurée par une pièce circulaire en aluminium d'un diamètre de 1 cm.

L'étanchéité du système est rendue possible par l'utilisation d'une seconde pièce en PDMS d'une épaisseur de 1 mm (**Figure 4.2**). La cellule est alors placée sur le dispositif expérimental, au sein de l'imageur SPR (**Figure 4.3**). La régulation de la température s'effectue à l'aide d'une résistance électrique. Une thermistance, placée à proximité, est utilisée en tant que thermomètre. Un programme LabViewTM a également été développé, permettant de définir les paramètres de la régulation thermique. Il est ainsi possible de définir une température de consigne et de réaliser des rampes linéaires allant de la température ambiante jusqu'à $85\text{ }^{\circ}\text{C}$, avec des vitesses comprises entre 1 et $15\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

La température de l'enceinte SPR est quant à elle fixée à des valeurs inférieures à 20°C, afin d'assurer l'observation du phénomène d'hybridation impliquant un faible nombre de bases complémentaires (< à 8). Par ailleurs, cette « faible » température permet également d'accélérer le retour en température après l'étape de chauffage, réduisant ainsi la durée de l'expérience.

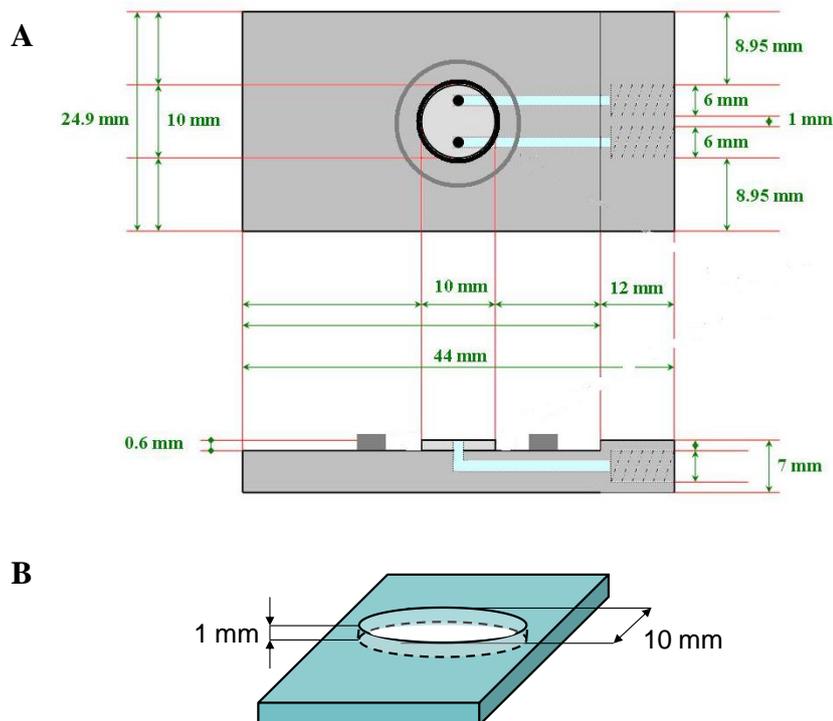


Figure 4.2 Représentation du système de régulation locale de la température. **A)** Caractéristiques dimensionnelles de la cellule chauffante. Celle-ci est composée d'un support en acier inoxydable et d'une pièce circulaire en aluminium. **B)** Schéma de la pièce en PDMS utilisée pour assurer l'étanchéité du système.

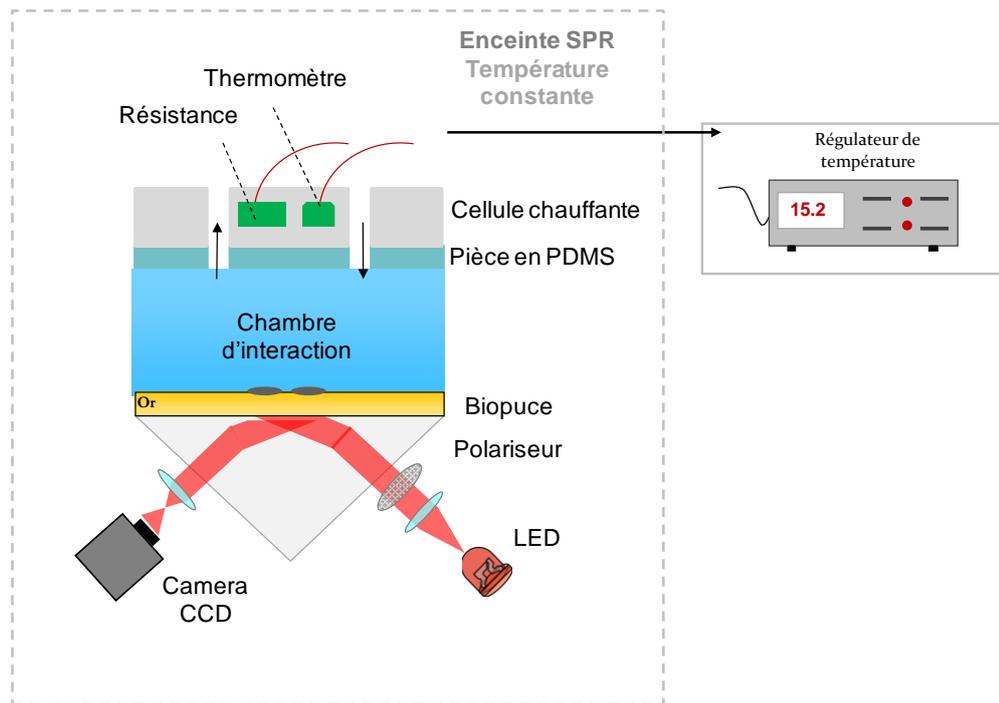


Figure 4.3 Représentation schématique de la cellule chauffante dans l'enceinte SPR, une fois intégrée au dispositif expérimental.

4.2.2 Protocole de détection

Nous avons choisi de travailler sur une gamme de température allant de 20 à 65 °C avec une vitesse de rampe fixée à 2 °C/min. La variation de réflectivité pendant une rampe de température peut ainsi être estimée à 14 %. L'obtention des courbes de dénaturation n'est rendue possible qu'à la suite de l'utilisation du protocole illustré par la **Figure 4.4** :

- Une première rampe ($R_{\text{réf}}$) est réalisée en absence de molécules cibles, le signal mesuré, utilisé comme référence, correspond donc uniquement à la variation de la température.
- Une fois le signal stabilisé, les molécules cibles (AuNPs-SplitAPT +/- adénosine) sont injectées dans la cellule de réaction et peuvent interagir avec les sondes, générant un signal d'hybridation en SPRi entre les *Split aptamers*.
- Une seconde rampe ($R_{\text{dét}}$) est réalisée et le signal mesuré correspond cette fois ci à la variation de température et à la dissociation des duplexes ou complexes formés à la surface.

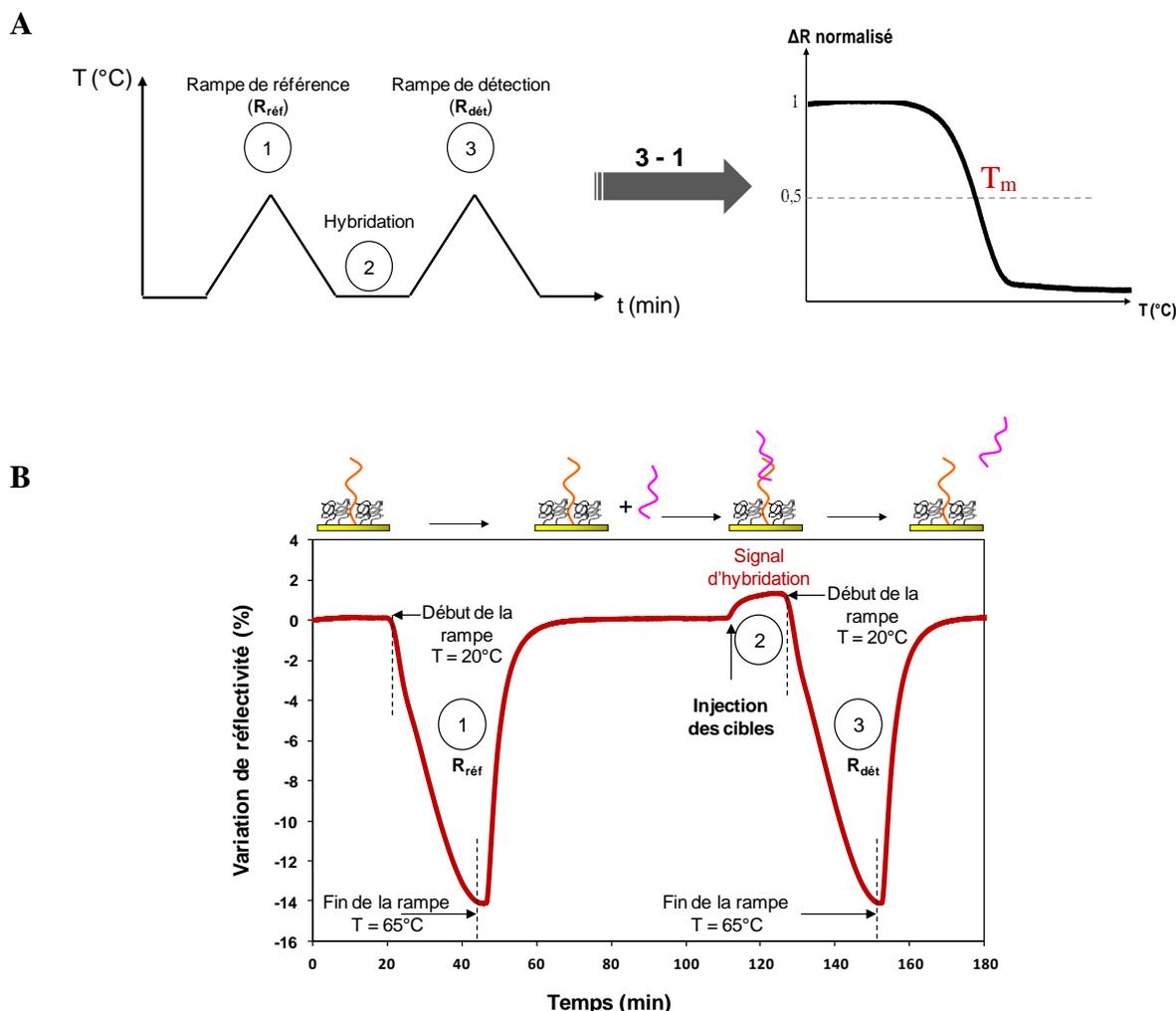


Figure 4.4 Illustration du protocole utilisé pour l'obtention des courbes de dénaturation (ici en absence d'adénosine). (A) Corrélation entre les rampes de variation de température et la variation de réflectivité mesurée. (B) Effet d'une rampe de température entre 20 et 65°C sur le signal SPR. La variation totale du signal est estimée à - 14%.

La courbe de dénaturation est obtenue par la soustraction $R_{\text{réf}} - R_{\text{dét}}$, en faisant correspondre la variation de réflectivité en fonction de la température pour chaque plot. La comparaison des différentes courbes de dénaturation obtenues en absence et en présence d'adénosine permet alors de rendre compte d'un éventuel effet de stabilisation (variation des températures de dénaturation). Celles-ci sont normalisées afin d'homogénéiser les résultats et faciliter la comparaison.

Il nous faut souligner que ce protocole doit être utilisé avec précaution, notamment en ce qui concerne la rampe de référence $R_{\text{réf}}$. Celle-ci, mesurée pour chaque plot, nécessite en effet d'être réalisée dans des conditions optimales, en absence de signaux parasites liés aux interactions non spécifiques et/ou phénomènes de désorption des sondes en surface. Une calibration, sous forme de 2 à 3 rampes successives, est donc nécessaire au début de chaque expérience de détection. Par ailleurs, si une seule référence peut être utilisée pour l'ensemble de l'expérience, l'idéal consisterait à réaliser une rampe référence au préalable de chaque injection. Afin de concilier une durée d'expérience raisonnable avec la rigueur qu'exige une telle procédure de détection, le protocole optimal que nous avons développé consiste en l'alternance d'une rampe référence pour deux injections.

Enfin, il convient de préciser que la rampe de température est lancée à la fin de l'injection des cibles, suite à l'hybridation des séquences *split aptamers* et la stabilisation du signal. Préalablement au lancement de la rampe, le flux de circulation du tampon SPR est maintenu en continu, induisant l'élimination des séquences non hybridées au niveau de la surface (diminution de la concentration des cibles en solution). Ceci nous place donc dans des conditions expérimentales *hors-équilibre*. En effet, dans le sens strict du terme, la température de fusion T_m est définie à l'équilibre, à savoir, avec une concentration en cibles constante et une vitesse de rampe suffisamment lente (inférieure ou égale à $2^\circ\text{C}/\text{min}$) [5, 7, 35]. Or, ces conditions ne sont pas vérifiées dans notre cas. Il en résulte une diminution de la température de fusion, comme cela a déjà été démontré par Fiche et *al.* [33]. Cette diminution de la température de fusion dans le cas hors-équilibre impose donc la définition d'une nouvelle température caractéristique du phénomène de dissociation, fortement dépendante des conditions expérimentales [38]. Nous l'avons désignée sous le terme T_d , pour *température de dissociation*.

4.3 Caractéristiques des profils de dénaturation

4.3.1 Cas des séquences SplitAPT8

Souhaitant étudier au préalable la cinétique de dissociation des séquences *split aptamers* en fonction de la température, nous avons consacré les premières expérimentations à l'interaction des conjugués AuNPs-SplitAPT avec les sondes SplitAPT8. Le protocole de fabrication des puces, de même que la fonctionnalisation des nanoparticules d'or sont identiques à ceux décrits dans les chapitres 2 et 3 et peuvent être résumés comme suit :

- Les plots SplitAPT8 sont présents en trois répliqués et greffés par SAMs à la surface avec une concentration de départ en solution de 20 μM et un ratio aptamères/PEG2000 de 2 : 1, soit une densité de greffage en molécules d'aptamère estimée à 8 pmol/cm^2 [39]. Sauf mention, les résultats exposés dans la suite du chapitre correspondent systématiquement à la moyenne des données obtenues sur l'ensemble des répliqués.
- Les plots contrôles sont cette fois-ci limités aux séquences Zip9 et SplitAPT (concentration à 20 μM dans la solution de dépôt), présents en deux et trois répliqués respectivement.
- Les biopuces sont toujours soumises à une étape de blocage avec le PEG2000 avant une détection en SPR et sont ensuite caractérisées par les injections successives des séquences complémentaires aux sondes greffées afin de vérifier la réponse appropriée de chaque plot.
- Les AuNPs de 20 nm sont fonctionnalisées avec les séquences SplitAPT selon un ratio SplitAPT/AuNPs de 85 :1. La surface est ensuite bloquée avec le PEG2000 à une concentration initiale de 150 μM .

Le protocole de détection par SPRi fait principalement intervenir les étapes suivantes :

- Le tampon de course est délivré à un débit constant de 50 $\mu\text{L}/\text{min}$. Les différentes injections sont néanmoins réalisées en mode *agitation*, avec un volume poussé de 15 μL et un volume aspiré de 10 μL , coupées au bout de 40 minutes.
- Les injections des AuNPs sont toujours réalisées à une concentration de 200 pM. L'adénosine est co-injectée avec les AuNPs-SplitAPT puis réinjectée préalablement au lancement de la rampe. La concentration d'adénosine est fixée en fonction des paramètres testés. La guanosine, utilisée en tant que contrôle négatif, est injectée à une concentration de 1 μM .
- La température de l'enceinte SPR est fixée à 17 $^{\circ}\text{C}$, tandis que la température de consigne, régulée par la cellule chauffante, est à 20 $^{\circ}\text{C}$.

- Les rampes sont réalisées sur une gamme de température allant de 20 à 65 °C avec une vitesse de 2 °C/min. Le flux est stoppé durant les rampes afin de limiter la fluctuation de température au sein de la chambre de réaction.
- La régénération de la puce est systématiquement réalisée avec une rampe de température. En effet, l'emploi de NaOH (50 mM) s'est révélé fortement déstabilisant pour le signal SPR mesuré.

La courbe de dénaturation obtenue pour les plots SplitAPT8 suite à leur hybridation avec les séquences SplitAPT seules (1 μM) et conjuguées aux AuNPs est illustrée par la **Figure 4.5**.

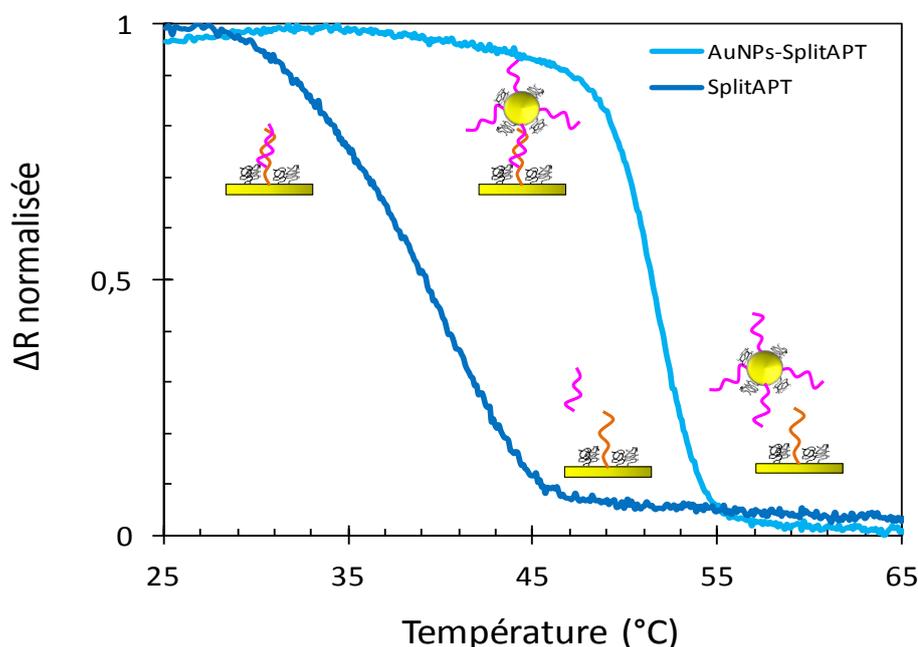


Figure 4.5 Courbe de dénaturation des sondes SplitAPT8 obtenues par SPRi suite à l'injection des séquences SplitAPT à 1 μM et des conjugués AuNPs-SplitAPT. La vitesse de la rampe est fixée à 2 °C/min.

Nous pouvons constater que les profils de dénaturation des séquences SplitAPT8 diffèrent significativement selon que la séquence SplitAPT soit conjuguée ou non aux nanoparticules. Ainsi, en absence de AuNPs, les séquences *split aptamers* se dissocient à « basse » température ($T_d = 39 \pm 0,2$ °C). Viennent ensuite les séquences conjuguées aux AuNPs avec une température de dissociation estimée à $T_d = 51 \pm 0,4$ °C. Dans ce cas, la cinétique présente un profil abrupte, caractéristique d'un effet coopératif à la surface. En effet, la nanoparticule d'or est multi-conjuguée par les séquences SplitAPT, son interaction avec la surface ne mobilise donc pas une seule sonde, mais un nombre plus important.

Il en résulte une forte affinité d'interaction et donc une diminution des constantes de dissociation K_D [40] par rapport aux cas des séquences libres. Cette forte stabilité se traduit par un décalage positif de la température de dissociation T_d , évaluée à $\Delta T_d \sim 12^\circ \text{C}$. Ceci a déjà été observé par Sithara *et al.* [40] dans leurs travaux relatifs à l'étude des propriétés de dénaturation de l'ADN couplé à des nanoparticules d'or en solution. Il a ainsi pu être démontré que le profil de dissociation de séquences d'ADN conjuguées aux AuNPs, en comparaison avec l'ADN libre, était caractérisé par une transition abrupte et demeurerait largement dépendant de la taille des nanoparticules, de la longueur des séquences d'ADN et de la densité de greffage [40, 41]. Il est par ailleurs possible de mettre en évidence l'effet coopératif observé en réduisant la densité de greffage des séquences SplitAPT8 au niveau de la surface de la biopuce. A de faibles densités, du fait de la dilution des sondes, l'effet coopératif s'estompe, impliquant une diminution de la température de dissociation mesurée, comme nous pouvons le voir sur la **Figure 4.6**.

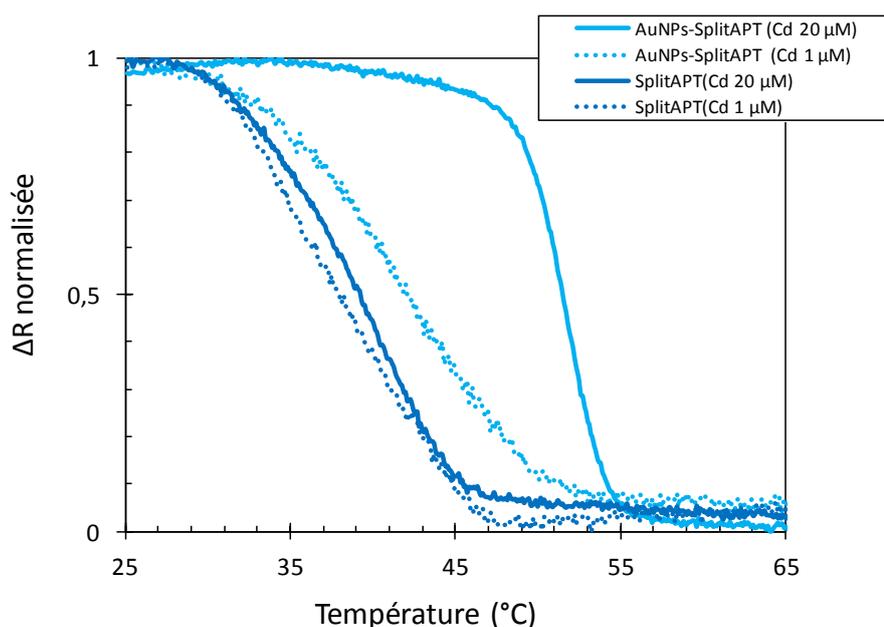


Figure 4.6 Effet de la densité de greffage des sondes SplitAPT8 sur les courbes de dénaturation obtenues par SPRi. Les courbes pleines représentent le profil obtenu pour une densité de $7,9 \pm 0,7 \text{ pmol/cm}^2$ (réalisée à partir d'une concentration de dépôt $C_d = 20 \mu\text{M}$). Les courbes en pointillés représente le profil obtenu pour une densité estimée à $3,2 \pm 0,4 \text{ pmol/cm}^2$ (réalisée à partir de concentration de dépôt $C_d = 1 \mu\text{M}$).

Pour une concentration dans la solution de dépôt (C_d) des séquences SplitAPT8 à 1 μM , nous remarquons que la température de dissociation des séquences SplitAPT conjuguées aux nanoparticules atteint cette fois-ci une valeur moyenne de 42°C, soit un décalage, par rapport à celle retrouvée pour une forte densité de greffage, de $\Delta T_d \sim +9^\circ\text{C}$. Comme attendu, les profils de dénaturation des séquences *Split aptamers* libres présentent quant à eux un faible décalage des valeurs de T_d en fonction de la variation de la densité de greffage ($\Delta T_d \sim 1^\circ\text{C}$).

A noter cependant que la réduction de la densité de greffage induit une diminution de la valeur de réflectivité mesurée suite à l'hybridation des cibles injectées, rendant difficile l'application du protocole établi pour l'obtention des courbes de dénaturation. En effet, une valeur minimale du signal SPR mesuré, évaluée à 0,2 % [33], est nécessaire afin de garantir l'obtention de profils de dénaturation exploitables. Nous décidons donc pour la suite des expériences de ne pas nous affranchir de l'effet coopératif en maintenant la densité de greffage usuelle ($7,9 \pm 0,7 \text{ pmol/cm}^2$; $C_d = 20 \mu\text{M}$) et en utilisant exclusivement les séquences SplitAPT conjuguées aux AuNPs.

4.3.2 Application à la détection d'Adénosine à partir des séquences SplitAPT8

La **Figure 4.7** présente le profil de dénaturation obtenu après une co-injection des conjugués AuNPs-SplitAPT (200 pM) et d'adénosine à une concentration de 1 μM . Celui-ci est comparé à celui relatif à l'injection des conjugués en absence d'adénosine mais également en présence du contrôle négatif guanosine à une concentration de 1 μM . Les courbes sont moyennées pour chaque triplicat et sont toujours normalisées afin d'en faciliter la lecture.

A partir de ces profils, nous remarquons que la présence d'adénosine induit un décalage des courbes de dissociation évalué à $\Delta T_d \sim +3^\circ\text{C}$ en comparaison avec les contrôles, soit une température de dissociation T_d équivalente à 53,9 °C. En permettant la formation des complexes tertiaires, l'adénosine augmente la stabilité des séquences hybridées, impliquant ainsi une augmentation de la température de dissociation. Cet effet spécifique est donc non retrouvé en l'absence d'adénosine ou en présence d'un analogue structural tel que la guanosine.

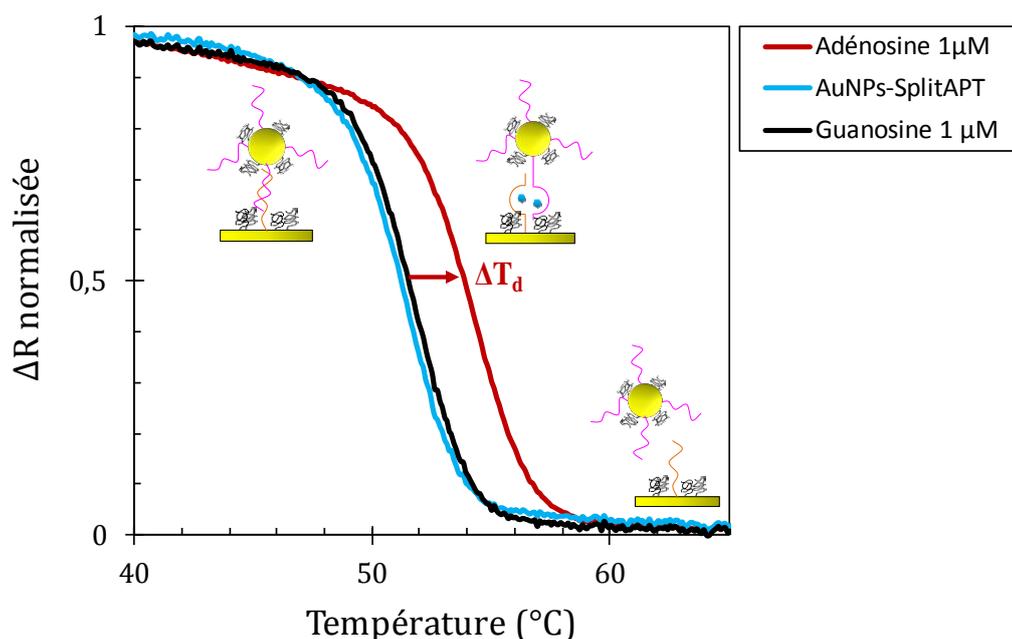


Figure 4.7 Courbe de dénaturation des sondes SplitAPT8 obtenues par SPRi suite à l'injection des conjugués AuNPs-SplitAPT seules, en présence d'adénosine (1 μM) ou de guanosine (1 μM). La vitesse de la rampe est fixée à 2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

Ce résultat nous permet déjà de conclure sur l'efficacité de la stratégie imaginée pour la détection d'adénosine au moyen d'une biopuce à aptamères par SPRi. Comme attendu, l'analyse des profils de dénaturation permet en effet de mettre en évidence un décalage de la valeur de T_d mesurée, et statuer ainsi sur la présence de la cible dans l'échantillon injecté. A noter que la dispersion des courbes n'a été observée que dans le cas impliquant l'utilisation des AuNPs. Le signal SPR mesuré lors de l'interaction des séquences SplitAPT libres étant en moyenne trop faible ($\Delta R = 0,8 \%$) pour assurer une discrimination entre les profils de dissociation. Par ailleurs, l'utilisation d'une concentration de AuNPs-SplitAPT deux fois plus élevée (400 μM), bien qu'induisant un signal SPR plus important ($\Delta R + 10 \%$), n'a pas conduit à une variation plus élevée de la température de dissociation en comparaison avec celle retrouvée pour une concentration de 200 μM ($\Delta T_d \sim + 3^{\circ}\text{C}$). Ceci laisse supposer que, les courbes étant normalisées, la méthode est uniquement sensible à la présence d'adénosine et non à la quantité d'ADN hybridé à la surface.

Cette première preuve de concept a été réalisée avec une concentration en adénosine équivalente à 1 μM . Afin d'évaluer les performances de notre stratégie de détection, il nous semblait important de déterminer la limite de détection de la méthode.

Nous nous sommes ainsi interrogés sur l'influence de la concentration en adénosine présente en solution sur les profils de dénaturation obtenus. L'effet stabilisant observé est-il proportionnel à la quantité d'adénosine injectée ?

4.3.3 Gamme de détection

La mise en évidence d'une relation entre la concentration d'adénosine injectée et l'effet stabilisant de la structure tertiaire observé au moyen du décalage des profils de dénaturation, a impliqué l'utilisation d'une gamme de concentration.

Avant de discuter des résultats obtenus, il nous faut préciser que la stratégie de détection développée, bien que simple sur le principe, impose néanmoins de nombreuses contraintes sur les conditions expérimentales. Celles-ci englobent principalement la reproductibilité et la stabilité des signaux SPR. En effet, la variation de réflectivité mesurée durant l'hybridation des séquences détermine directement la qualité des courbes de dissociation en fixant le rapport signal/bruit. De la même façon, elle permet également de fixer la valeur minimale de la concentration en cibles susceptible de fournir des courbes de dissociation exploitables. En général, la variation des signaux d'hybridation SPR est principalement conditionnée par la stabilité de la chimie de surface employée. Fuchs et *al.* [34, 35] ont déjà permis de mettre en évidence l'influence des rampes de température sur le signal d'hybridation mesuré.

Dans le cas de l'utilisation de la chimie thiol, une diminution globale du signal d'hybridation SPR mesuré était observée pour des températures supérieures à 75 °C. En réalisant plusieurs cycles de températures à 70 °C sur notre puce, la diminution des signaux SPR n'est observée qu'à partir de la 19^{ème} rampe de température (**Figure 4.8**), assurant ainsi les conditions de reproductibilité dans le cadre d'une expérience de détection d'adénosine (nombre de rampes < 10).

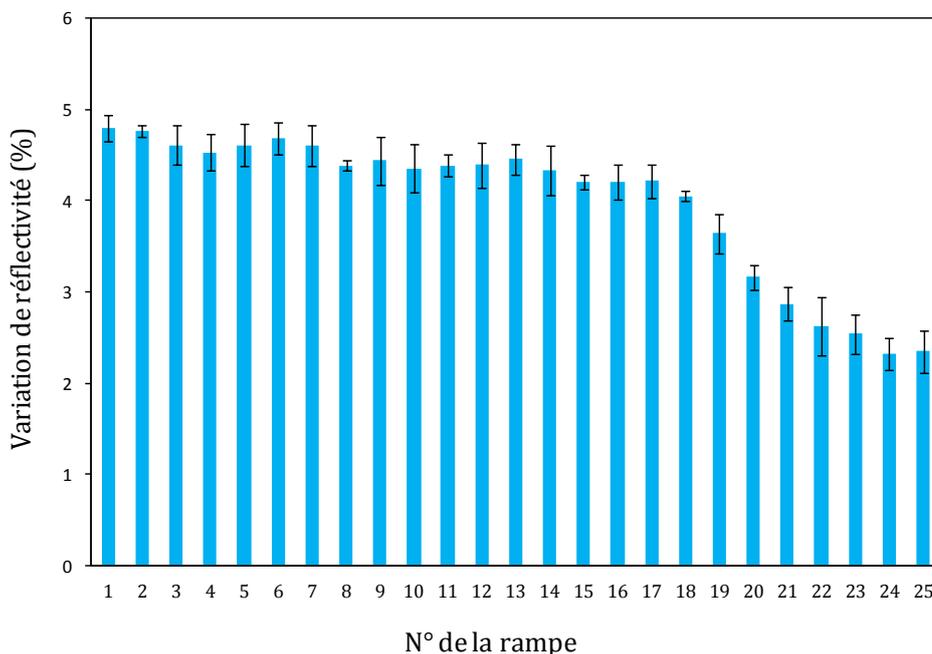


Figure 4.8 Variation du signal d'hybridation mesuré pour les sondes SplitAPT8 en fonction du nombre de rampes réalisées. Les rampes de température sont effectuées sur une gamme allant de 20 °C à 70 °C. La température de l'enceinte SPR est fixée à 17 °C, tandis que la température de consigne, réglée par la cellule chauffante, est à 20 °C. La perte de signal au bout du 25^{ème} cycle de température est estimée à ~ 50%. La barre d'erreur représente la variation des valeurs de réflectivité mesurées sur trois plots similaires.

Pour autant, si la reproductibilité des signaux d'hybridation SPR est vérifiée sur les plots d'une même puce, ceux obtenus sur des puces différentes peuvent également différer. Il en résulte alors une variation des valeurs de T_d mesurées. Or, l'application de la stratégie de détection telle que présentée dans ce chapitre ne s'est pour l'heure limitée qu'à un faible nombre d'expériences, empêchant de réaliser une étude de reproductibilité significative. Ainsi, bien que les tendances retrouvées soient similaires, les résultats présentés dans cette section n'ont concerné qu'une seule et même puce afin de garantir une comparaison plus pertinente entre les différents profils de dénaturation et de s'affranchir d'éventuelles variations inter-puces.

La **Figure 4.9** présente les profils de dissociation obtenus à partir d'une gamme de concentration d'adénosine (1000, 700, 500, 300, 200, 100, 50 et 30 nM) ainsi qu'une injection contrôle en absence d'adénosine et en présence de guanosine à une concentration de 1 μ M.

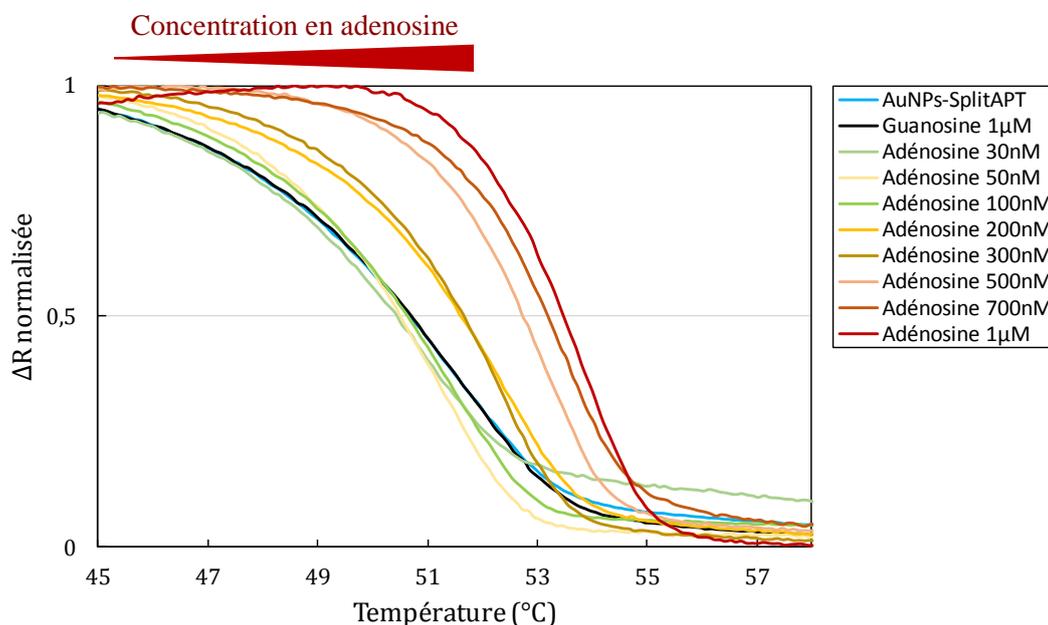


Figure 4.9 Effet de la variation de la concentration d'adénosine sur le profil de dissociation des sondes SplitAPT8 obtenues par SPRi. Les injections ont concerné les conjugués AuNPs-SplitAPT seuls (200 μ M), en présence de guanosine (1 μ M) et en présence d'adénosine à différentes concentrations (1000, 700, 500, 300, 200, 100, 50 et 30 nM).

En analysant ces profils, nous pouvons observer une relation de proportionnalité entre la concentration d'adénosine injectée et le décalage des températures de dissociation associées. Néanmoins, la plage de dispersion des courbes de dénaturation est restreinte à 3 $^{\circ}$ C, limitant ainsi la résolution des profils de dissociation obtenus. Ainsi, quand une concentration d'adénosine à 1 μ M permet d'obtenir un décalage de + 3 $^{\circ}$ C, comme cela a été trouvé lors de l'expérience précédente, celui-ci diminue jusqu'à disparaître pour les concentrations inférieures à 200 nM ($\Delta T_d \sim 1,5^{\circ}$ C). Cela se traduit par un profil de dissociation similaire à celui retrouvé en absence d'adénosine ou en présence de guanosine ($\Delta T_d = 0^{\circ}$ C). Ainsi, l'utilisation des séquences sondes SplitAPT8 pour l'application de notre stratégie limite la détection spécifique à une concentration d'adénosine à 200 nM. Dans ce cas, la stabilité des complexes est assurée par l'hybridation des séquences (sur 8 bases) de même que par l'interaction de l'adénosine avec les séquences pour la formation de la structure tertiaire.

Afin de limiter l'effet stabilisant de l'hybridation et mettre en exergue celui relatif à la fixation de l'adénosine sur les duplexes, il nous semblait intéressant de reproduire ces expériences avec des séquences *split aptamers* comportant un faible nombre de bases complémentaires.

4.3.4 Influence du nombre de bases complémentaires

Afin d'évaluer les performances de détection de notre biopuce au moyen de l'utilisation des courbes de dénaturation, cette étude a concerné l'utilisation des séquences SplitAPT4 de même que deux autres séquences SplitAPT5 et SplitAPT6, comportant respectivement 5 et 6 bases complémentaires avec la séquence SplitAPT. **Le Tableau 4.1** présente l'ensemble des séquences utilisées dans le cadre de la stratégie de détection décrite dans ce chapitre. La **Figure 4.10** représente quant à elle les profils de dénaturation obtenus pour chacune de ces séquences (à l'exception des SplitAPT8).

Nom de la séquence sonde	Séquence 3' > 5'	Interaction avec les conjugués AuNPs-SplitAPT en présence d'adénosine
SpliAPT4	GAGATGGAAGGAGGCCGTTTTTTTTTT-SH	
SplitAPT5	GAGTTGGAAGGAGGCCGTTTTTTTTTT-SH	
SplitAPT6	GACTTGGAAGGAGGCCGTTTTTTTTTT-SH	
SplitAPT8	CTCTTGGAAGGAGGCCGTTTTTTTTTT-SH	

Tableau 4.1 Séquences des *split aptamers* utilisées en tant que sondes à la surface de la biopuce. Les bases en bleu représentent la zone d'hybridation avec la séquence SplitAPT, les bases en rouge, la zone d'interaction avec l'adénosine.

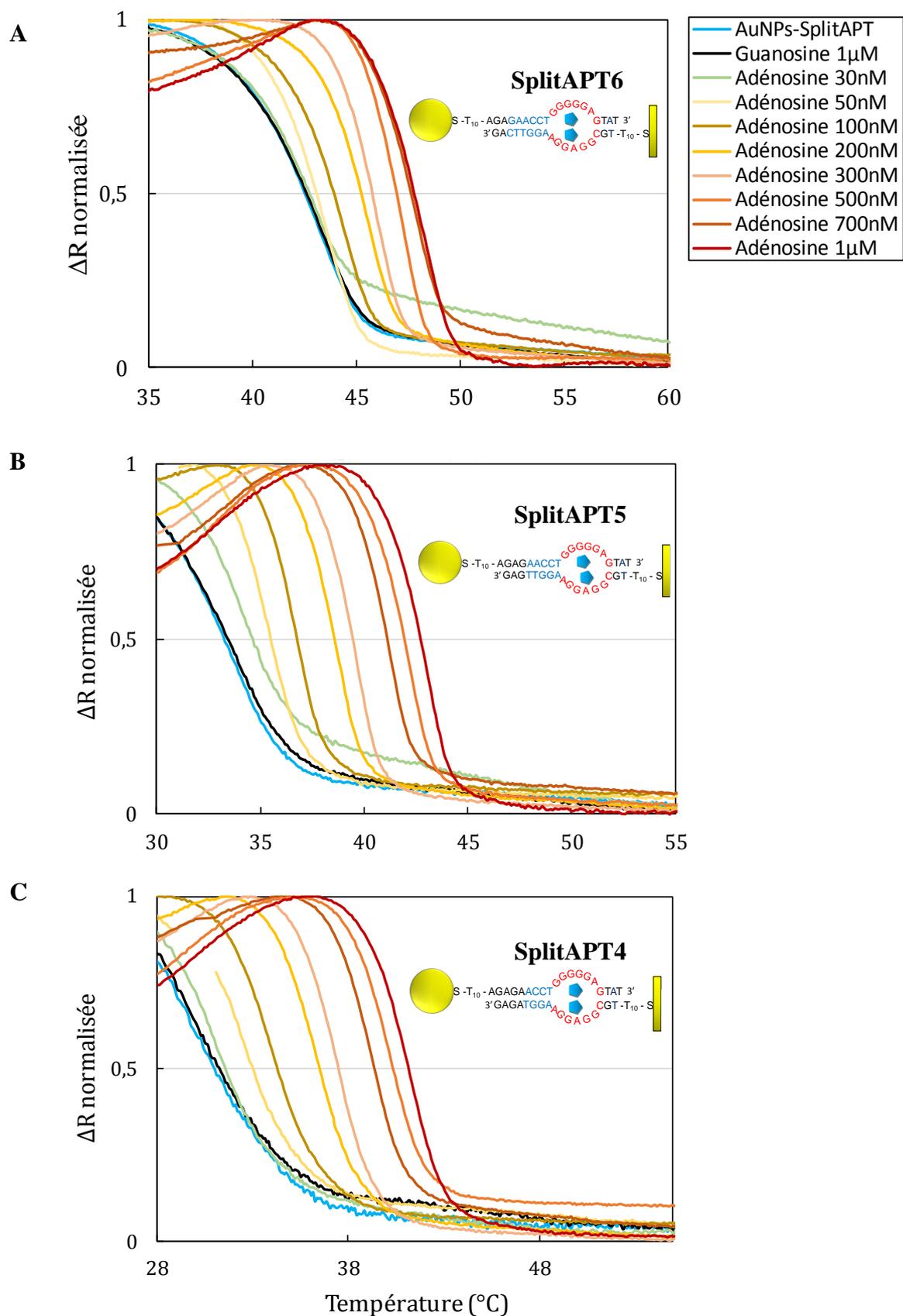


Figure 4.10 Effet de la variation de la concentration d'adénosine sur le profil de dissociation des sondes SplitAPT6 (A), SplitAPT5 (B) et SplitAPT4 (C). Les injections les conjugués AuNPs-SplitAPT seules, en présence de guanosine (1 μM) et en présence d'adénosine à différentes concentrations (1000, 700, 500, 300, 200, 100, 50 et 30 nM).

En comparant les résultats obtenus, nous observons en premier lieu un décalage global des profils de dissociation vers les faibles températures lorsque le nombre de bases complémentaires tend à diminuer. Ceci peut aisément s'expliquer par l'influence du nombre de bases complémentaires sur la stabilisation des duplexes d'ADN. En effet, plus ce nombre est élevé, plus l'énergie d'activation pour rompre les liaisons hydrogène et séparer les deux brins sera importante [5, 7]. A titre d'exemple, la valeur de T_d mesurée pour la dissociation des duplexes *split aptamers* (en absence d'adénosine) est estimée à 42 °C pour les séquences SplitAPT6, contre 33 et 31°C pour les séquences SplitAPT5 et SplitAPT4 respectivement.

Par ailleurs, nous remarquons que la réduction du nombre de bases complémentaires impliquées dans l'hybridation des séquences est inversement proportionnelle aux plages de dispersion des courbes de dissociation (**Voir Tableau 4.2**). Ainsi, quand la dispersion s'étend sur ~ 5°C dans le cas des séquences SplitAPT6, elle est équivalente à ~ 9 et ~ 10°C pour les séquences SplitAPT5 et SplitAPT4, respectivement. Nous pouvons par ailleurs déduire que la discrimination la plus pertinente de l'effet stabilisant de l'adénosine en fonction de la concentration injectée a été obtenue pour les séquences pplitAPT5. C'est en effet l'utilisation de cette séquence qui permet l'obtention de la plus faible limite de détection.

Séquence	Valeur de T_d (°C) en fonction de la concentration en adénosine (nM)								
	0	30	50	100	200	300	500	700	1000
SpliAPT8	50,1 ± 0,3	50,4 ± 0,2	50,5 ± 0,1	51,0 ± 0,2	51,6 ± 0,2	51,7 ± 0,1	52,7 ± 0,1	50,2 ± 0,1	53,5 ± 0,1
SplitAPT6	42,5 ± 0,1	42,7 ± 0,2	43,1 ± 0,2	43,9 ± 0,2	45,2 ± 0,1	45,7 ± 0,1	46,9 ± 0,1	47,6 ± 0,1	47,7 ± 0,1
SplitAPT5	33,1 ± 0,4	34,6 ± 0,3	35,4 ± 0,2	36,6 ± 0,2	38,5 ± 0,3	39,4 ± 0,2	41,0 ± 0,2	41,9 ± 0,2	42,7 ± 0,1
SplitAPT4	31,2 ± 0,3	31,5 ± 0,2	33,0 ± 0,3	34,2 ± 0,2	36,5 ± 0,1	37,4 ± 0,1	39,3 ± 0,1	40,3 ± 0,2	41,1 ± 0,1

Tableau 4.2 Récapitulatif des valeurs de T_d (°C) obtenues pour l'ensemble des séquences *split aptamers* étudiées en fonction de différentes concentrations d'adénosine. L'erreur représente la variation des valeurs mesurées pour chaque triplicat.

Un décalage significatif de $\Delta T_d \sim 1,5 \text{ }^\circ\text{C}$ (signal/bruit > 3), des profils de dénaturation est ainsi observé pour une concentration minimale d'adénosine de 30 nM.

La représentation de la variation des températures de dissociation obtenues en fonction de la concentration en adénosine pour les séquences SplitAPT5 est représentée dans la **Figure 4.11**. Nous pouvons ainsi remarquer qu'une très bonne reproductibilité est observée en comparant les données récoltées sur les différents triplicats, avec une variation standard de $\pm 0,4^\circ\text{C}$.

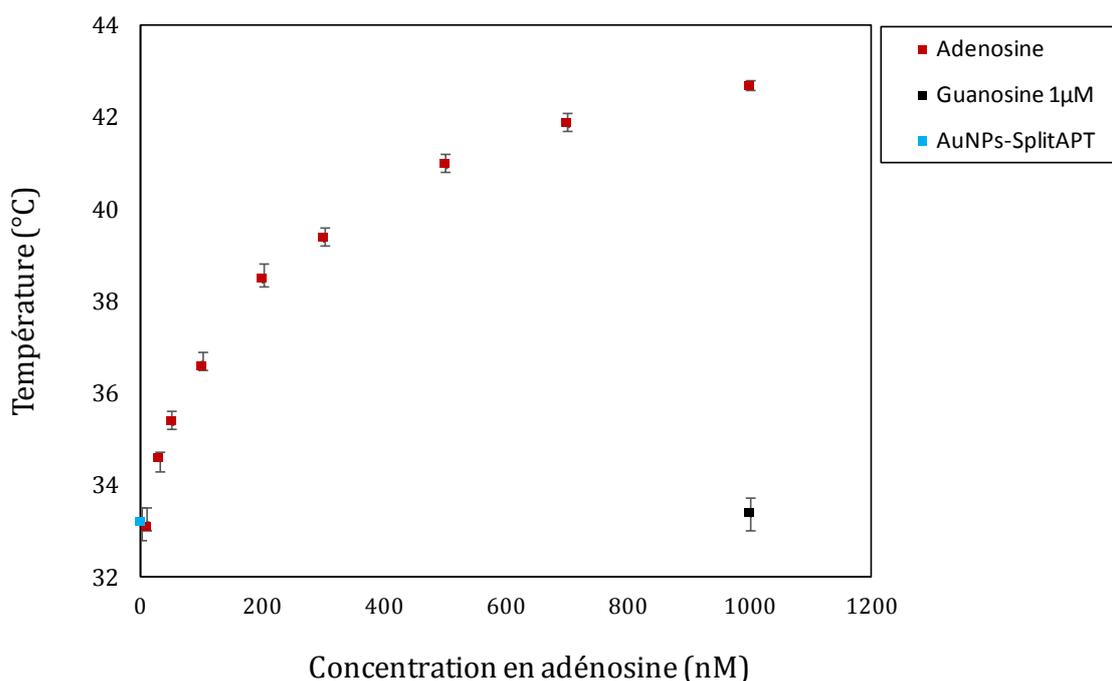


Figure 4.11 Variation de la température de dissociation T_d en fonction de la concentration d'adénosine obtenue à partir des courbes de dénaturation des séquences SplitAPT5. La barre d'erreur représente l'écart-type des valeurs mesurées pour trois plots de réplicats.

Ainsi, si la faisabilité de la stratégie employée pour détecter l'adénosine a été prouvée, est-il possible d'aller plus loin dans l'investigation ? Les données obtenues permettent-elles d'analyser quantitativement le phénomène observé ?

4.4 Considérations thermodynamiques

4.4.1 Généralités sur le modèle Langmuir

La majorité des travaux réalisés sur l'étude de l'hybridation de l'ADN sur support sont basés sur l'utilisation de la fluorescence et ont notamment permis de définir le rôle de ces paramètres sur le processus d'hybridation et d'en établir les conséquences en termes thermodynamiques [31, 42]. Le développement des méthodes sans marquage, telle que la SPR, a fourni des outils pertinents pour mener de telles études, à travers notamment l'observation de l'hybridation sur un plan cinétique [18, 33, 35]. En effet, un des grands avantages de la SPR réside en la possibilité de suivre en temps réel les dynamiques d'interaction, rendues accessibles par l'obtention des sensogrammes. Cette technologie peut ainsi être utilisée dans le but de caractériser qualitativement et quantitativement l'interaction cible/sonde, à travers notamment le calcul de la constante cinétique (K) du couple ligand-récepteur [18, 35].

Ce calcul repose sur l'application du modèle de Langmuir, développé pour caractériser l'interaction entre des molécules et une surface [43-46]. Ce modèle a par ailleurs été validé par Fiche et *al.* ainsi que Fuchs et *al.* [33, 35] pour l'étude des cinétiques d'hybridation d'ADN sur puce en fonction de la température, permettant ainsi l'estimation des paramètres thermodynamiques caractéristiques des séquences. Ainsi, un intérêt non négligeable, offert par la détermination des profils de dissociation à partir de mesures SPRi, correspond à la possibilité de caractériser quantitativement l'interaction étudiée (paramètres cinétiques et thermodynamiques). Il est donc pertinent d'envisager une analyse quantitative de notre modèle d'étude. Pour ce faire, il convient au préalable de présenter le modèle de Langmuir, afin de déterminer s'il est possible de l'adapter à notre cas d'étude [47].

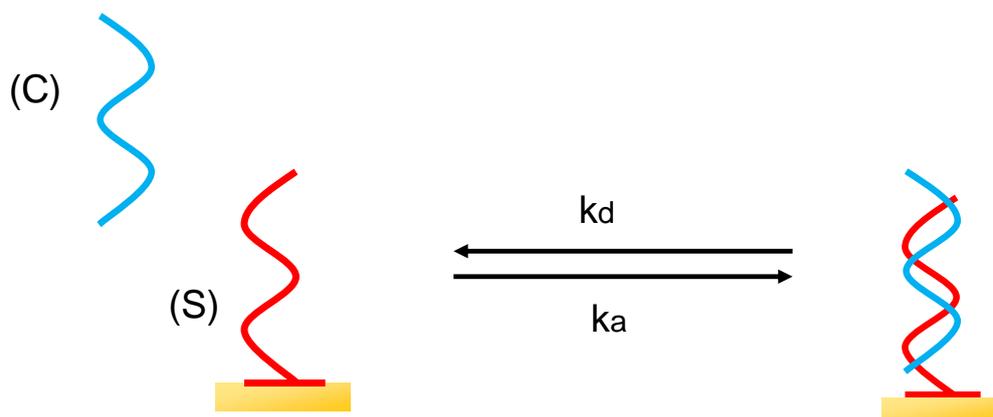


Figure 4.12 Schéma illustrant l'hybridation de l'ADN en surface selon le modèle de Langmuir. Ce modèle est caractérisé par les constantes de vitesse d'association (k_a) et de dissociation (k_d). Le taux de recouvrement de la surface est défini par θ , représentant la fraction de sites occupés.

Le modèle de Langmuir décrit une interaction faisant intervenir des séquences sondes (S) immobilisées sur une surface, et des séquences cibles (C), libres en solution (**Figure 4.12**). L'interaction de ces deux entités est alors réversible et peut être caractérisée par deux constantes cinétiques : la constante de vitesse de formation du complexe notée k_a ($M^{-1} \cdot s^{-1}$) et la constante de vitesse de dissociation du complexe notée k_d (s^{-1}). Le rapport de ces deux constantes de vitesse (k_a/k_d) ou (k_d/k_a) fournit respectivement la constante cinétique d'association notée K_A , et de dissociation K_D du complexe.

Ainsi, plus K_A sera grand, et inversement plus K_D sera petit, plus élevée sera la force de l'interaction. Ces deux grandeurs thermodynamiques sont donc importantes pour la qualification des interactions entre un ligand et un récepteur. Pour autant, c'est majoritairement la constante de dissociation K_D qui sert de référence pour évaluer l'affinité entre les deux entités concernées. En effet, pour des concentrations en cibles supérieures à K_D ($C > K_D$), on considère les complexes majoritairement formés, contrairement au cas pour lequel $C < K_D$. A noter qu'il reste cependant difficile de s'affranchir des effets de surface lors du calcul du K_D , principalement en raison de l'hétérogénéité du greffage [48, 49] et à la mauvaise accessibilité des sondes [50]. Il en résulte que la constante de dissociation K_D , déterminée à la surface d'un biocapteur par application du modèle de Langmuir, est bien souvent différente de ce qu'elle serait en solution [47, 51, 52].

A titre d'exemple, dans le cas de puces à ADN, un écart de plus de 10 ordres de grandeur a déjà été observé entre la constante d'affinité en solution et celle à la surface d'une biopuce pour l'hybridation de brins complémentaires [20].

Un second paramètre issu du modèle de Langmuir permet également de caractériser le phénomène d'hybridation en surface, il s'agit de la grandeur θ qui correspond aux taux d'hybridation (fraction de sondes hybridées). Cette grandeur vaut donc 0 en absence de cibles et 1 si l'on considère l'ensemble des sondes hybridées. Dans le cadre d'une mesure SPR, cette fraction est mesurée par le signal obtenu durant l'hybridation (la variation de réflectivité était provoquée par une variation d'indice - et donc de masse - au niveau de la surface). L'évolution du taux d'hybridation est donc corrélée à la variation de concentration (C) des cibles. L'expression de la fraction de brins hybridés est donnée par l'équation (I) suivante :

$$\theta (C) = \frac{K_A C}{1 + K_A C} \quad (\text{I})$$

K_A (M^{-1}) désigne la constante d'affinité donnée par le rapport des constantes cinétiques k_a/k_d de même que l'inverse de la constante de dissociation ($1/K_D$).

D'un point de vue thermodynamique, cette grandeur s'exprime en fonction de la variation d'enthalpie libre de Gibbs (ΔG) :

$$\Delta G(T) = - RT \ln [K_A(T)] \quad (\text{II})$$

R , la constante des gaz parfait ($J \text{ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$), T la température absolue exprimée en Kelvin et ΔG l'enthalpie libre de Gibbs ($J \text{ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$). A partir de la formule (II), il est donc possible de déduire l'expression de K_A :

$$K_A = \exp \left(\frac{-\Delta G}{RT} \right) \quad (\text{III})$$

Par ailleurs, l'expression de l'enthalpie libre de Gibbs est donnée par la formule suivante :

$$\Delta G (T) = \Delta H - T\Delta S \quad (\text{IV})$$

ΔH correspond à la variation d'enthalpie ($\text{kJ M}^{-1} \text{K}^{-1}$) et ΔS la variation d'entropie ($\text{J M}^{-1} \text{K}^{-1}$).

L'estimation de ces paramètres thermodynamiques à partir des courbes de dissociation a ainsi pu être réalisée par Fuchs *et al.* [33, 35] dans le cadre de mesures par SPRi. Néanmoins, ceci n'a été possible que dans le cas où les conditions d'équilibre sont respectées durant le processus d'hybridation des séquences d'ADN. La concentration des cibles en solution doit donc être constante de même que la vitesse des rampes suffisamment lente. Cela peut être vérifié en s'assurant de l'absence d'hystérésis entre les courbes de dissociation et les courbes mesurées lors du retour à la température de consigne. Par ailleurs, l'application du modèle de Langmuir pour la détermination des paramètres cinétiques et thermodynamiques repose principalement sur les hypothèses suivantes [47] :

- Une seule interaction est possible entre la sonde et la cible (monovalence).
- Les sondes sont greffées à la surface de façon uniforme
- Absence d'interaction compétitive en solution.
- Le greffage des sondes doit être suffisamment faible pour éviter tout effet d'interaction inter-sondes (encombrement, interactions électrostatiques).

Ainsi, si l'on considère une valeur de T_m (conditions à l'équilibre) caractéristique de la dénaturation d'une séquence d'ADN, celle-ci sera définie par un taux d'hybridation équivalent à $\theta = 1/2$ pour lequel la moitié des sondes sont hybridées, soit $K_{AC} = 1$ (équation I). En remplaçant la valeur de K_A par son expression donnée par la formule (III) et ΔG par son expression à partir de la formule (IV), nous pouvons déduire l'expression de la variation de la température de dénaturation à l'équilibre (T_m) en fonction de la concentration en cibles :

$$T_m (C) = \frac{\Delta H}{\Delta S} - \frac{RT_m}{\Delta S} \ln C \quad (\text{V})$$

De plus, pour une valeur référence de T_m évaluée à une concentration en cible à 1 M, il est possible, par approximation, de déterminer la valeur de $T_m(C)$ (les températures étant exprimées en Kelvin, la variation globale des T_m mesurés en fonction des différentes concentrations peut être considérée comme faible). Ainsi, pour $T_m = 1 \text{ M}$, soit $\ln C = 0$, nous pouvons déduire l'expression de la valeur de $T_m(1 \text{ M})$:

$$T_m(1 \text{ M}) = \frac{\Delta H}{\Delta S} \quad (\text{VI})$$

De ce fait, à partir des expressions (V) et (VI), nous retrouvons une relation linéaire entre la valeur de $T_m(C)$, $T_m(1 \text{ M})$ et le logarithme de la concentration en cibles. Celle-ci est alors donnée par l'expression suivante :

$$T_m(C) \approx T_m(1 \text{ M}) \left(1 - \frac{R}{\Delta S} \ln C \right) \quad (\text{VII})$$

La formule (VII) peut donc être utilisée pour extraire les paramètres thermodynamiques caractérisant une interaction sonde/cible à partir des données expérimentales (ΔS , ΔH , K_D). La valeur de $T_m(1 \text{ M})$ étant alors la coordonnée à l'origine et $(-RT_m(1 \text{ M})/\Delta S)$, la pente de la droite obtenue.

4.4.2 Adaptation au modèle d'étude

A la lumière des informations exposées ci-dessus, et en se focalisant exclusivement sur l'hybridation des séquences *split aptamers*, force est de constater, qu'en l'état, notre modèle d'étude ne vérifie pas les conditions nécessaires à l'application du modèle de Langmuir. En effet, comme précisé précédemment, les conditions expérimentales menant à l'hybridation des séquences sont réalisées hors-équilibre. De plus, la présence de nanoparticules d'or multifonctionnalisées génère un effet coopératif au niveau de la surface, modifiant ainsi la cinétique d'interaction des séquences *split aptamers*. Enfin, les courbes de dénaturation obtenues en présence d'adénosine ne caractérisent pas exclusivement la dissociation des duplexes *Split aptamers* mais plutôt la dissociation du complexe tertiaire *split aptamers* et cible. Le phénomène concerné implique donc simultanément un processus d'hybridation et de reconnaissance moléculaire.

Les paramètres cinétiques sont donc d'autant plus nombreux en comparaison avec le modèle de Langmuir, rendant difficile une description théorique du phénomène observé. En effet, la notion de K_D pour caractériser des interactions multiples n'est pas rigoureuse : plusieurs constantes doivent dans ce cas être définies, autant en fait qu'il existe d'interactions (**Figure 4.13**). Pour autant, il est néanmoins possible de considérer la réaction d'interaction de l'adénosine avec les séquences *split aptamers* comme étant à l'équilibre. Contrairement aux conjugués AuNPs-AplitAPT, la concentration d'adénosine est effectivement maintenue constante dans le milieu pendant la rampe de température.

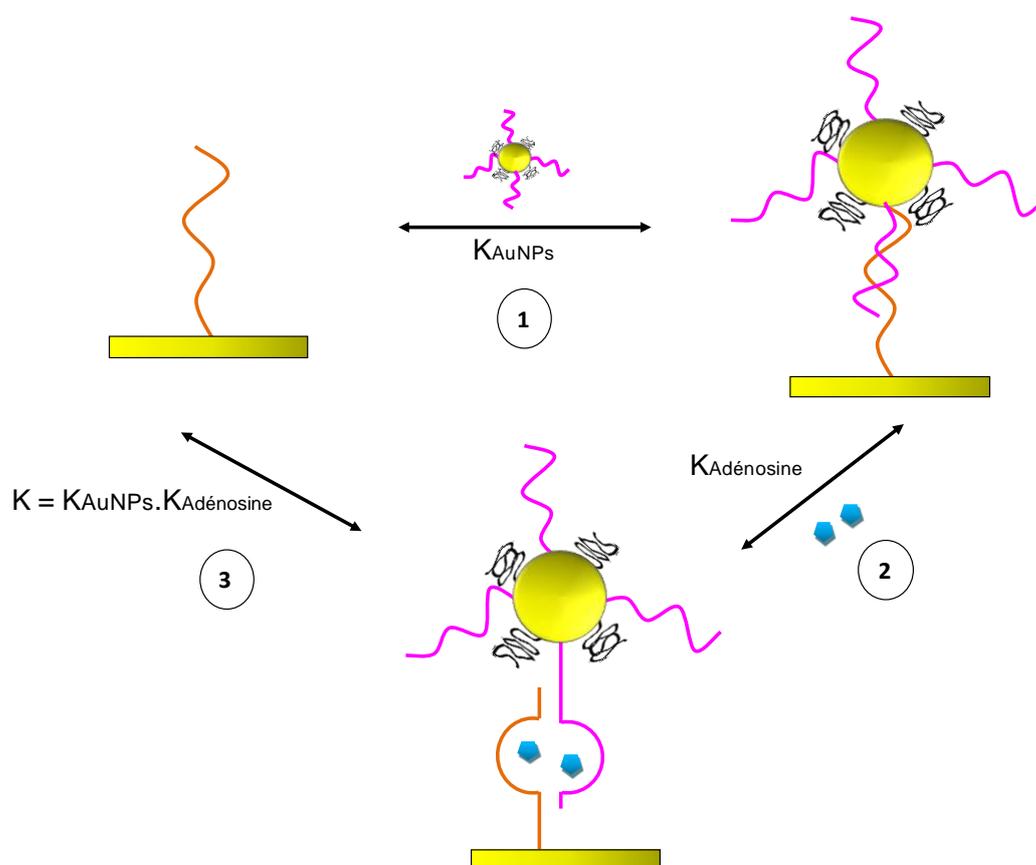


Figure 4.13 Schéma illustrant les différentes interactions caractérisant notre modèle d'étude (sauf coopérativité). Plusieurs constantes cinétiques caractérisent les phénomènes d'interaction se déroulant à l'interface. La concentration des conjugués AuNPs-SplitAPT n'étant pas maintenue constante durant les rampes de température, les réactions (1) et (3) ne sont pas considérées comme étant à l'équilibre. La présence d'adénosine et l'arrêt du flux pendant la rampe permettent de considérer la réaction (2) à l'équilibre.

En partant du principe qu'à fortes concentrations d'adénosine, la stabilité du complexe tertiaire est principalement assurée par la fixation de cette dernière, il est possible de formuler l'hypothèse suivante : Pour les concentrations d'adénosine ($C_{dét}$) générant un décalage de la valeur du T_d , témoignant de la formation du complexe tertiaire et de l'effet stabilisant de l'adénosine, les valeurs de T_d mesurées peuvent alors être assimilées, par approximation, à des T_m (l'interaction de l'adénosine avec les *split aptamers* étant considérée à l'équilibre). Nous pouvons ainsi nous attendre à retrouver une dépendance logarithmique entre les T_d et la concentration d'adénosine dans la gamme $C_{dét}$, comme dans le cas du modèle de Langmuir, soit $T_d \sim T_m$. Pour des concentrations inférieures à $C_{dét}$, la stabilité des complexes n'est plus dominée par la fixation d'adénosine, mais uniquement par l'hybridation des séquences. Celle-ci se déroulant hors-équilibre, les températures de dénaturation mesurées ne peuvent plus être assimilées aux T_m , nous parlerons donc exclusivement de T_d . L'utilisation de la formule (VI) pour l'extraction des paramètres thermodynamiques dans cette gamme ($C < C_{dét}$) n'est donc plus possible (Figure 4.14).

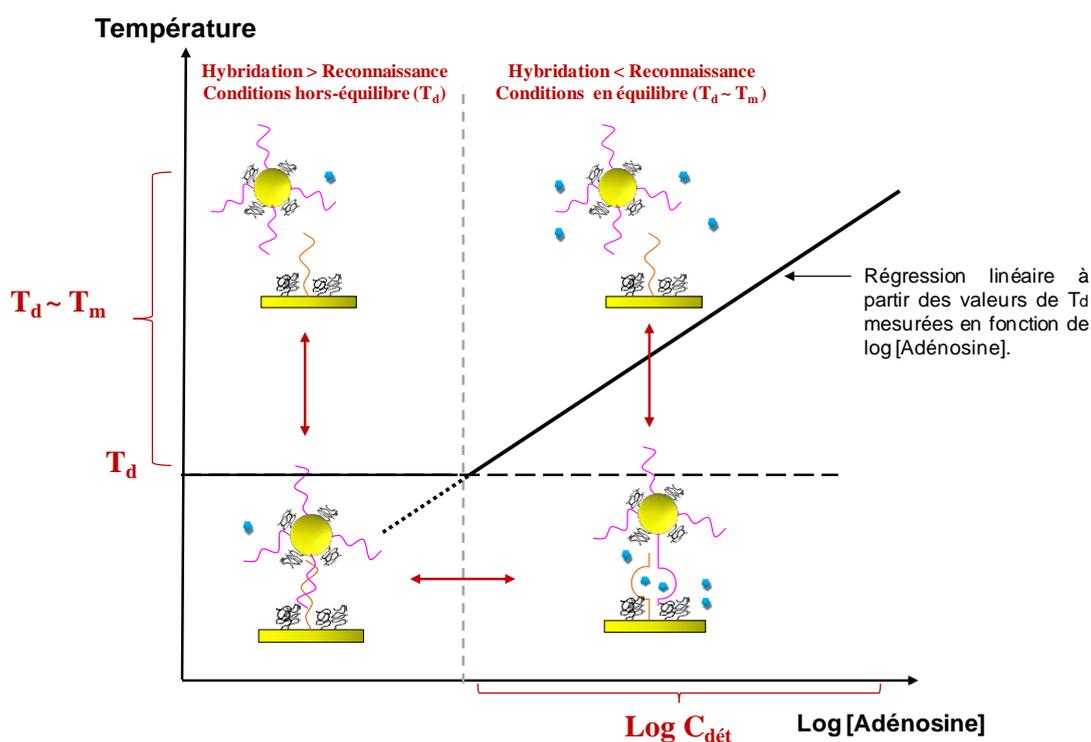


Figure 4.14 Représentation schématique du processus d'interaction des conjugués AuNPs-SplitAPT avec l'adénosine en fonction de la variation de la concentration en adénosine. Pour les concentrations dans la gamme $C_{dét}$, l'interaction est considérée à l'équilibre ($T_d \sim T_m$). Une relation linéaire est alors retrouvée entre le logarithme de la concentration d'adénosine et les T_m mesurées (modèle Langmuir). Pour la gamme de concentration inférieure à $C_{dét}$, le phénomène d'interaction est dominé par l'hybridation des séquences *Split aptamers* qui a lieu hors-équilibre. L'effet stabilisant de l'adénosine est de ce fait négligeable, les températures de dénaturation mesurées correspondent à des T_d et se confondent avec celles obtenues pour les contrôles (- adénosine/ + guanosine).

Si l'on se réfère aux profils de dénaturation obtenus expérimentalement, nous pouvons représenter la variation de la température de dénaturation mesurée en fonction du logarithme de la concentration en adénosine. Nous obtenons alors une courbe linéaire caractéristique pour les séquences SplitAPT4, SplitAPT5 et SpliAPT6 dans la gamme $C_{\text{dét}}$, soit respectivement 30 nM - 1 μ M et 50 nM - 1 μ M (**Figure 4.15**). La vérification du caractère linéaire de la fonction $T_m(C) = f(\ln C)$ nous permet donc de valider l'hypothèse formulée ci-dessus.

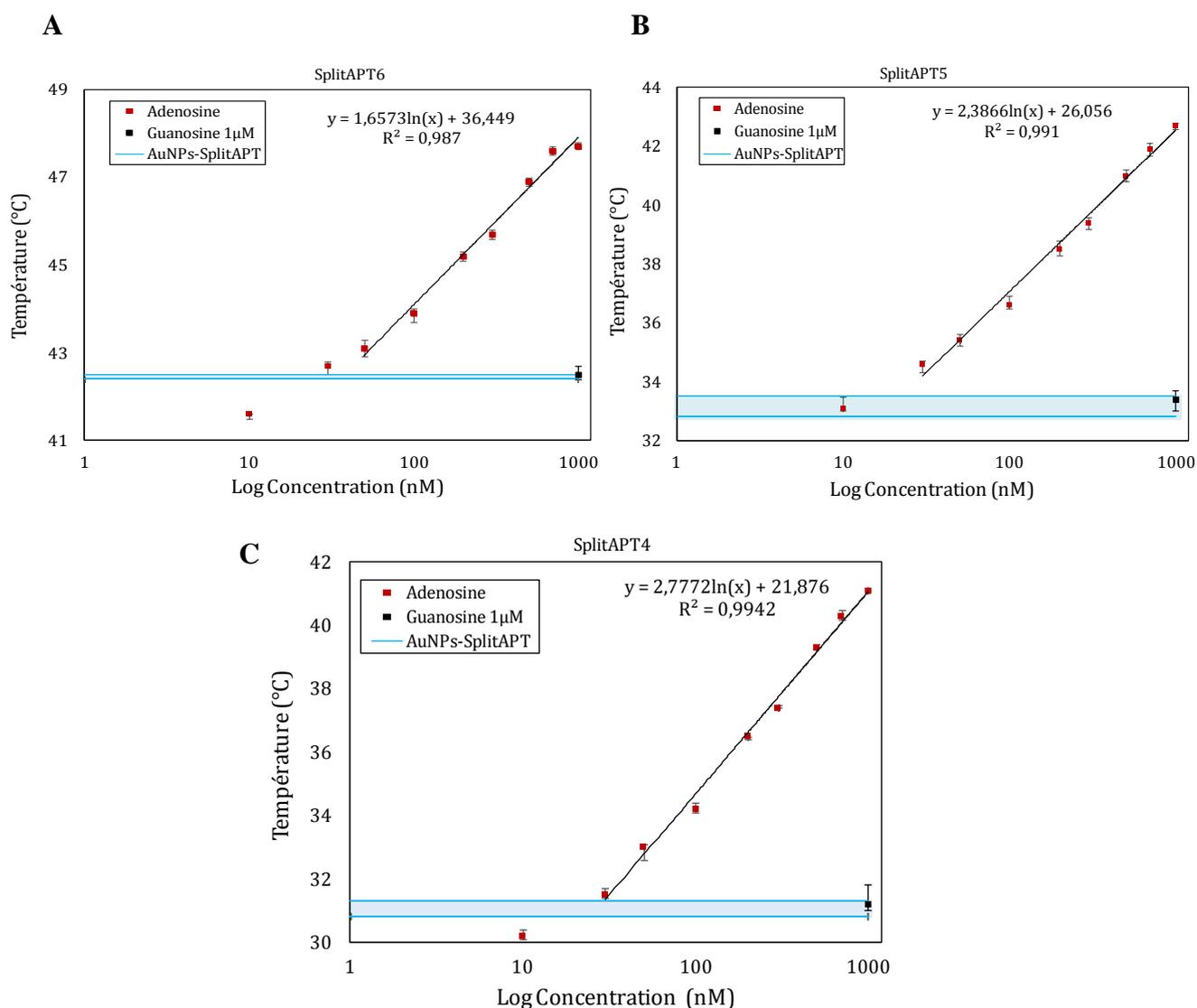


Figure 4.15 Courbes d'étalonnage obtenues à partir des valeurs de T_m en fonction du logarithme de la concentration en adénosine pour les séquences SplitAPT6 (A), SpliAPT5 (B) et SplitAPT4 (C). La droite en pointillés correspond à la régression linéaire réalisée sur ces points. La barre d'erreur représente l'écart-type mesuré sur les valeurs obtenues sur trois plots similaires. La gamme de concentration d'adénosine évaluée s'étend systématiquement de 10 nM à 1 μ M (10 nM, 30 nM, 50 nM, 100 nM, 200 nM, 300 nM, 500 nM, 700 nM et 1 μ M).

Il a ainsi été possible d'extraire les paramètres thermodynamiques à partir des courbes obtenues. Nous avons pu estimer, pour les séquences concernées, la variation d'entropie (ΔS) et d'enthalpie (ΔH) avec une précision satisfaisante ($\sim 1\%$ d'erreur) (**Tableau 4.3**). Si l'enthalpie libre de Gibbs (ΔG) est estimée avec une erreur relative équivalente à $\sim 10\%$, la détermination de la valeur de K_D à partir de la formule de K_A (équation III) est quant elle entachée d'une grande erreur. Seule l'estimation d'un ordre de grandeur caractérisant l'affinité de l'interaction est donc envisageable.

Séquences	Paramètres thermodynamiques	
	ΔS (J M ⁻¹ K ⁻¹)	ΔH (KJ M ⁻¹)
SplitAPT6	- 1653,7 ± 16	- 545,0 ± 5
SplitAPT5	- 1111,9 ± 9	- 354,9 ± 3
SplitAPT4	- 943,1 ± 7	- 297,7 ± 2

Tableau 4.3 Valeurs des paramètres thermodynamiques (ΔH et ΔS) caractérisant l'interaction de l'adénosine avec les séquences sondes *Split aptamers*, avec [NaCl] = 120 mM et [MgCl₂] = 5 mM.

Les valeurs négatives de l'enthalpie mesurées ΔH indiquent que l'interaction des sondes avec la cible demeure énergétiquement favorable. De même que les valeurs négatives des entropies ΔS révèlent une perte du degré de liberté des sondes lorsque celles-ci se lient aux cibles [53]. Par ailleurs, la comparaison des paramètres thermodynamiques estimés pour chacune des sondes permet de rendre compte de la diminution des valeurs absolues d'enthalpie $|\Delta H|$ et d'entropie $|\Delta S|$ en fonction de la réduction du nombre de bases complémentaires. Ce comportement est parfaitement cohérent avec celui retrouvé en solution. En effet, la variation d'enthalpie $|\Delta H|$ et d'entropie $|\Delta S|$ caractérise la stabilité du complexe, laquelle augmente avec le nombre de bases complémentaires. A noter que les valeurs retrouvées sont néanmoins supérieures (~ 1 ordre de grandeur) à celles évaluées par André et *al.* [53] dans leur étude consacrée à la caractérisation de l'interaction de l'adénosine avec son aptamère originel par électrophorèse capillaire ($\Delta S = - 123,1 \pm 0,4$ J mol⁻¹K⁻¹; $\Delta H = - 69,6 \pm 0,2$ kJ mol⁻¹).

Cette différence peut être due à la faible concentration des ions Na^+ utilisée dans le cadre de cette étude ($[\text{Na}^+] = 20 \text{ mM}$) en comparaison avec la nôtre ($[\text{Na}^+] = 120 \text{ mM}$). En effet, il a été démontré par Fuchs et *al.* [35] que l'augmentation de la concentration des ions Na^+ permettait de décaler les courbes de dénaturation obtenues par SPRi vers les hautes températures dans le cas de l'hybridation de séquences d'ADN. Ainsi, l'augmentation en cations Na^+ contribue, par neutralisation des charges, à favoriser le phénomène d'hybridation et à augmenter la stabilité des duplexes. Pour autant, dans le cas de l'interaction de l'adénosine avec son aptamère, André et *al.* [53] ont révélé que l'augmentation de la concentration des ions Na^+ induisait une diminution de la constante d'affinité K_A , et donc de la stabilité des complexes tertiaires. Or, dans notre cas, les deux phénomènes sont concernés, à savoir, l'hybridation et la reconnaissance moléculaire. Nous devons effectivement envisager la possibilité que notre détermination des paramètres thermodynamiques ΔS et ΔH incorpore une partie de l'enthalpie et entropie de l'hybridation des séquences *Split aptamers*. Il est ainsi difficile de statuer sur l'origine de la différence de nos résultats avec ceux de André et *al.* [53] en considérant uniquement l'influence des cations Na^+ .

Par ailleurs, si l'on considère les séquences sondes SplitAPT5 et SplitAPT4 (pour lesquelles les coefficients de corrélation retrouvés sont satisfaisants), les valeurs de K_D estimées sont respectivement de $7 \mu\text{M}$ et $210 \mu\text{M}$. Notons que cette différence peut être due au nombre de bases complémentaires impliquées dans le phénomène d'hybridation. En effet, celle-ci débute par l'association des bases voisines et demeure peu favorable énergétiquement pour les premiers appariements. Toutefois, dès que le nombre de bases dépasse la valeur critique de quatre, l'hybridation des séquences devient d'autant plus favorable énergétiquement [54]. Ainsi, plus le nombre de bases complémentaires est important, plus la constante de dissociation K_D , caractérisant la stabilité des duplexes, est faible. Si dans le cas des séquences SplitAPT5, la valeur de K_D est proche de celle retrouvée dans la littérature ($K_D = 6 \pm 3 \mu\text{M}$) [53, 55] dans le cadre de la caractérisation de l'interaction (en solution) de l'adénosine avec son aptamère originel, il est étonnant de ne pas retrouver une plus grande différence dans notre cas. Le phénomène d'interaction se déroulant sur support, il est admis que celui-ci soit limité par différents facteurs, tels que l'hétérogénéité du greffage [48, 49] et l'accessibilité des sondes [50].

Bien qu'aucune étude n'ait pu le démontrer jusqu'à présent, il est également plausible que le clivage de la séquence d'aptamère originel contribue à réduire l'affinité de l'adénosine pour les *Split aptamers*. Néanmoins, ceci est *à priori* vérifié uniquement dans le cas des séquences SplitAPT4. Pour autant, comme mentionné plus haut, l'estimation des valeurs de K_D , du fait de son imprécision, est à considérer avec précaution.

Il n'est donc pas encore possible d'évaluer l'influence du clivage des séquences d'aptamères sur l'affinité de l'interaction avec leurs cibles. Une multiplication des données, obtenues à partir d'un nombre significatif d'expériences, la modification des conditions expérimentales (équilibre/hors-équilibre), de même que la variation des cibles étudiées, sont tout autant de perspectives d'étude susceptible d'apporter des éléments de réponses à cette question. Retenons enfin que notre méthode permet d'ores et déjà de déterminer les paramètres thermodynamiques (ΔH , ΔS) impliqués dans l'interaction de l'adénosine avec le duplexe d'aptamères. A notre connaissance, elle demeure à ce jour la seule à avoir été utilisée pour la caractérisation quantitative de l'interaction des petites molécules avec les *Split aptamers*.

4.5 Conclusion

Nous avons exposé dans ce chapitre les performances atteintes par notre biopuce à aptamères suite à l'application d'une stratégie originale pour la détection d'adénosine. Celle-ci repose sur le couplage de la SPRi avec un système de régulation locale de la température. Dans cette approche, l'effet stabilisant induit par l'interaction de la petite molécule avec les séquences d'aptamères a été mis en évidence par les profils de dénaturation obtenus. Il a ainsi été possible de détecter la présence d'adénosine par SPRi, validant la faisabilité de la stratégie imaginée.

Plusieurs séquences sondes (SplitAPT8, SplitAPT6, SplitAPT5 et SplitAPT4), caractérisées par un nombre de bases complémentaires de 8, 6, 5 et 4 respectivement, ont pu être testées. L'influence du nombre de bases complémentaires impliqué dans l'interaction des *split aptamers* en présence d'adénosine s'est en effet révélé être un paramètre déterminant.

Dans le cadre d'une stratégie de détection basée sur la stabilité des complexes, il semble nécessaire de limiter ce nombre afin de mettre en évidence l'effet stabilisant de la molécule cible, au détriment de celui de l'hybridation, permettant ainsi d'abaisser les limites de détection.

Dans le cas particulier de l'adénosine, et dans la limite des expériences menées, ce sont les séquences SplitAPT5 qui représentent les structures sondes optimales. La limite de détection obtenue est alors estimée à $LOD = 30$ nM, contre 50, 100 et 200 nM respectivement, pour les séquences SplitAPT4, SplitAPT6 et SplitAPT8. Par ailleurs, une gamme logarithmique de quantification a pu être mise en évidence pour l'interaction des sondes SplitAPT6, SplitAPT5 et SplitAPT4 avec les conjugués AuNPS-SplitAPT en présence d'adénosine. Il a de ce fait été possible de déterminer les paramètres thermodynamiques relatifs à la variation d'entropie (ΔS) et d'enthalpie (ΔH) caractérisant cette interaction.

Ainsi, outre la détection, nous avons pu constater que l'utilisation des rampes de température en SPRi ouvrait, pour la première fois, de nouvelles perspectives pour l'étude des phénomènes d'interaction entre les petites molécules et leurs aptamères. Application d'autant plus pertinente lorsque des effets de stabilité sont mis en jeu et impliquent des séquences d'aptamères non originelles (*Split aptamers*). Cette étude, qui peut être qualifiée d'exploratoire, nous montre ainsi le potentiel d'une telle stratégie dans le cadre d'une sélection optimale de séquences d'aptamères sondes ou encore la caractérisation quantitative des interactions d'intérêts.

BIBLIOGRAPHIE

1. Wartell, R.M. and A.S. Benight, Thermal denaturation of DNA molecules: A comparison of theory with experiment. *Physics Reports*, 1985. **126**(2): p. 67-107.
2. Leung, M.L.C., B.Y. Tong, and F.Y. Wu, Thermal denaturation and renaturation of DNA molecules. *Physics Letters A*, 1975. **54**(5): p. 361-362.
3. Thomas, R., Recherches sur la dénaturation des acides desoxyribonucléiques. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1954. **14**(0): p. 231-240.
4. Peyret, N., et al., Nearest-Neighbor Thermodynamics and NMR of DNA Sequences with Internal A.A, C.C, G.G, and T.T Mismatches *Biochemistry*, 1999. **38**(12): p. 3468-3477.
5. Allawi, H.T. and J. SantaLucia, Nearest-Neighbor Thermodynamics of Internal A.C Mismatches in DNA: Sequence Dependence and pH Effects. *Biochemistry*, 1998. **37**(26): p. 9435-9444.
6. Allawi, H.T. and J. SantaLucia, NMR solution structure of a DNA dodecamer containing single G.T mismatches. *Nucleic Acids Research*, 1998. **26**(21): p. 4925-4934.
7. Allawi, H.T. and J. SantaLucia, Thermodynamics and NMR of Internal G.T Mismatches in DNA. *Biochemistry*, 1997. **36**(34): p. 10581-10594.
8. Owczarzy, R., et al., Predicting sequence-dependent melting stability of short duplex DNA oligomers. *Biopolymers*, 1997. **44**(3): p. 217-239.
9. Owczarzy, R., et al., Thermodynamic treatment of oligonucleotide duplex-simplex equilibria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003. **100**(25): p. 14840-14845.
10. Mikulecky, P.J. and A.L. Feig, Heat capacity changes associated with nucleic acid folding. *Biopolymers*, 2006. **82**(1): p. 38-58.
11. Doty, P., The physical chemistry of deoxyribonucleic acids. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 1957. **49**(S1): p. 27-57.
12. Nelson, J.W., F.H. Martin, and I. Tinoco, DNA and RNA oligomer thermodynamics: The effect of mismatched bases on double-helix stability. *Biopolymers*, 1981. **20**(12): p. 2509-2531.
13. Blake, R.D. and S.G. Delcourt, Thermodynamic Effects of Formamide on DNA Stability. *Nucleic Acids Research*, 1996. **24**(11): p. 2095-2103.
14. Sadhu, C., S. Dutta, and K.P. Gopinathan, Influence of formamide on the thermal stability of DNA. *Journal of Biosciences*, 1984. **6**(6): p. 817-821.
15. Spink, C.H., S.E. Wellman, and M.J.W. Jonathan B. Chaires, Thermal denaturation as tool to study DNA-ligand interactions, in *Methods in Enzymology*. 2001, Academic Press. p. 193-211.
16. Spink, C.H. and J.B. Chaires, Effects of Hydration, Ion Release, and Excluded Volume on the Melting of Triplex and Duplex DNA *Biochemistry*, 1998. **38**(1): p. 496-508.
17. Persson, B.r., et al., Analysis of Oligonucleotide Probe Affinities Using Surface Plasmon Resonance: A Means for Mutational Scanning. *Analytical Biochemistry*, 1997. **246**(1): p. 34-44.
18. Fiche, J.B., et al., Point Mutation Detection by Surface Plasmon Resonance Imaging Coupled with a Temperature Scan Method in a Model System. *Analytical Chemistry*, 2008. **80**(4): p. 1049-1057.
19. Belozeroва, I. and R. Levicky, Melting Thermodynamics of Reversible DNA/Ligand Complexes at Interfaces. *Journal of the American Chemical Society*, 2012. **134**(45): p. 18667-18676.

20. Levicky, R. and A. Horgan, Physicochemical perspectives on DNA microarray and biosensor technologies. *Trends in Biotechnology*, 2005. **23**(3): p. 143-149.
21. Ge, D., et al., Thermostable DNA Immobilization and Temperature Effects on Surface Hybridization. *Langmuir*, 2012. **28**(22): p. 8446-8455.
22. Nasef, H., V. Beni, and C.K. O'Sullivan, Labelless electrochemical melting curve analysis for rapid mutation detection. *Analytical Methods*, 2010. **2**(10): p. 1461-1466.
23. Nasef, H., V. Beni, and C.K. O'Sullivan, Electrochemical melting-curve analysis. *Electrochemistry Communications*, 2010. **12**(8): p. 1030-1033.
24. Xu, J. and S.L. Craig, Thermodynamics of DNA Hybridization on Gold Nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 2005. **127**(38): p. 13227-13231.
25. Watterson, J.H., et al., Effects of Oligonucleotide Immobilization Density on Selectivity of Quantitative Transduction of Hybridization of Immobilized DNA. *Langmuir*, 2000. **16**(11): p. 4984-4992.
26. Nasef, H., et al., Melting temperature of surface-tethered DNA. *Analytical Biochemistry*, 2010. **406**(1): p. 34-40.
27. Russom, A., et al., Rapid Melting Curve Analysis on Monolayered Beads for High-Throughput Genotyping of Single-Nucleotide Polymorphisms. *Analytical Chemistry*, 2006. **78**(7): p. 2220-2225.
28. Wang, X. and U.J. Krull, Synthesis and fluorescence studies of thiazole orange tethered onto oligonucleotide: development of a self-contained DNA biosensor on a fiber optic surface. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2005. **15**(6): p. 1725-1729.
29. Ozel, A.B., et al., Target concentration dependence of DNA melting temperature on oligonucleotide microarrays. *Biotechnology Progress*, 2012. **28**(2): p. 556-566.
30. Rampal, J., et al., Predicting DNA Duplex Stability on Oligonucleotide Arrays, in *Microarrays*. 2007, Humana Press. p. 393-403.
31. Forman Jonathan, E., et al., Thermodynamics of Duplex Formation and Mismatch Discrimination on Photolithographically Synthesized Oligonucleotide Arrays, in *Molecular Modeling of Nucleic Acids*. 1997, American Chemical Society. p. 206-228.
32. Peterlinz, K.A., et al., Observation of Hybridization and Dehybridization of Thiol-Tethered DNA Using Two-Color Surface Plasmon Resonance Spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*, 1997. **119**(14): p. 3401-3402.
33. Fiche, J.B., et al., Temperature Effects on DNA Chip Experiments from Surface Plasmon Resonance Imaging: Isotherms and Melting Curves. *Biophysical Journal*, 2007. **92**(3): p. 935-946.
34. Fuchs, J., et al., Effects of formamide on the thermal stability of DNA duplexes on biochips. *Analytical Biochemistry*, 2010. **397**(1): p. 132-134.
35. Fuchs, J., et al., Salt Concentration Effects on Equilibrium Melting Curves from DNA Microarrays. *Biophysical Journal*, 2010. **99**(6): p. 1886-1895.
36. Aly, K.M. and E. Esmail, Refractive index of salt water: effect of temperature. *Optical Materials*, 1993. **2**(3): p. 195-199.
37. Jung, L.S., et al., Quantitative Interpretation of the Response of Surface Plasmon Resonance Sensors to Adsorbed Films. *Langmuir*, 1998. **14**(19): p. 5636-5648.
38. Thiel, A.J., et al., In Situ Surface Plasmon Resonance Imaging Detection of DNA Hybridization to Oligonucleotide Arrays on Gold Surfaces. *Analytical Chemistry*, 1997. **69**(24): p. 4948-4956.
39. Daniel, C., et al., Solution-Phase vs Surface-Phase Aptamer-Protein Affinity from a Label-Free Kinetic Biosensor. *PLoS ONE*, 2013. **8**(9): p. e75419.
40. Geddes, C.D., et al., Melting Transitions of DNA-Capped Gold Nanoparticle Assemblies, in *Reviews in Plasmonics 2010*. 2010, Springer New York. p. 269-282.

41. Sun, Y., N. Harris, and C.-H. Kiang, Phase Transition and Optical Properties of DNA-Gold Nanoparticle Assemblies. *Plasmonics*, 2007. **2**(4): p. 193-199.
42. Fotin, A.V., et al., Parallel thermodynamic analysis of duplexes on oligodeoxyribonucleotide microchips. *Nucleic Acids Research*, 1998. **26**(6): p. 1515-1521.
43. Okahata, Y., et al., Kinetic Measurements of DNA Hybridization on an Oligonucleotide-Immobilized 27-MHz Quartz Crystal Microbalance. *Analytical Chemistry*, 1998. **70**(7): p. 1288-1296.
44. Nelson, B.P., et al., Surface Plasmon Resonance Imaging Measurements of DNA and RNA Hybridization Adsorption onto DNA Microarrays. *Analytical Chemistry*, 2000. **73**(1): p. 1-7.
45. McKendry, R., et al., Multiple label-free biodetection and quantitative DNA-binding assays on a nanomechanical cantilever array. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002. **99**(15): p. 9783-9788.
46. Tawa, K. and W. Knoll, Mismatching base-pair dependence of the kinetics of DNA-DNA hybridization studied by surface plasmon fluorescence spectroscopy. *Nucleic Acids Research*, 2004. **32**(8): p. 2372-2377.
47. Halperin, A., A. Buhot, and E.B. Zhulina, On the hybridization isotherms of DNA microarrays: the Langmuir model and its extensions. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 2006. **18**(18): p. S463.
48. O'Shannessy, D.J. and D.J. Winzor, Interpretation of Deviations from Pseudo-First-Order Kinetic Behavior in the Characterization of Ligand Binding by Biosensor Technology. *Analytical Biochemistry*, 1996. **236**(2): p. 275-283.
49. Rao, A.N., C.K. Rodesch, and D.W. Grainger, Real-Time Fluorescent Image Analysis of DNA Spot Hybridization Kinetics To Assess Microarray Spot Heterogeneity. *Analytical Chemistry*, 2012. **84**(21): p. 9379-9387.
50. Steel, A.B., et al., Immobilization of Nucleic Acids at Solid Surfaces: Effect of Oligonucleotide Length on Layer Assembly. *Biophysical Journal*, 2000. **79**(2): p. 975-981.
51. Halperin, A., A. Buhot, and E.B. Zhulina, Brush Effects on DNA Chips: Thermodynamics, Kinetics, and Design Guidelines. *Biophysical Journal*, 2005. **89**(2): p. 796-811.
52. Halperin, A., A. Buhot, and E.B. Zhulina, Sensitivity, Specificity, and the Hybridization Isotherms of DNA Chips. *Biophysical Journal*, 2004. **86**(2): p. 718-730.
53. André, C., A. Xicluna, and Y.-C. Guillaume, Aptamer-oligonucleotide binding studied by capillary electrophoresis: Cation effect and separation efficiency. *ELECTROPHORESIS*, 2005. **26**(17): p. 3247-3255.
54. Parish, J.H., Principles of nucleic acid structure: By W Saenger. pp 556. Springer-Verlag, New York. 1984. DM 79. ISBN 3-540-90761-0. *Biochemical Education*, 1985. **13**(2): p. 92-92.
55. Huizenga, D.E. and J.W. Szostak, A DNA Aptamer That Binds Adenosine and ATP. *Biochemistry*, 1995. **34**(2): p. 656-665.

CHAPITRE 5

Conclusion et perspectives

Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés au développement d'un biocapteur à aptamères pour la détection de petites molécules, ici l'adénosine, au moyen de la technique de résonance plasmonique de surface. Le défi principal consistait à mettre en œuvre des stratégies de détection originales en vue de palier les limitations de la SPRi pour la détection de petites molécules et démontrer, dans ce contexte, la pertinence de son couplage avec l'utilisation d'aptamères en tant qu'élément de reconnaissance.

Dans un premier temps, notre attention s'est focalisée sur la procédure d'élaboration de la biopuce à aptamères. Différentes stratégies de modification de surface ont pu être testées dans le but de limiter les phénomènes d'adsorption non spécifiques et d'optimiser l'interaction de des aptamères avec leur cible. Cette première étude a nécessité le recours à un modèle d'étude de type *grande molécule*, la thrombine, plus adaptée à une détection directe par imagerie de résonance des plasmons de surface. En mettant en évidence l'influence de divers paramètres tels que l'accessibilité des sondes ou encore la densité de greffage, un protocole optimisé a pu être développé. Celui-ci est basé sur un greffage localisé des sondes par chimie thiols (SAMs) et l'utilisation d'un co-adsorbant de type poly(éthylène-glycol) (PEG). Les performances de détection obtenues alors ont été jugées très satisfaisantes. Ces premiers travaux nous ont donc permis de valider les conditions expérimentales nécessaires à une analyse ultérieure mettant en jeu les aptamères de notre modèle d'étude principal, l'adénosine.

Une seconde partie des travaux a été consacrée à la mise en œuvre de la biopuce à aptamères développée pour la détection d'adénosine. Afin d'améliorer les performances de détection par SPRi, la première stratégie imaginée a fait appel à l'utilisation de nanoparticules d'or (AuNPs) pour l'exaltation du signal d'interaction spécifique. C'est l'effet combiné de leur masse et leurs propriétés optiques singulières liées à l'existence d'un phénomène de résonance plasmonique localisé (LSPR) qui permet d'amplifier le signal SPR mesuré.

Une validation préalable d'un protocole optimal de fonctionnalisation des surfaces des AuNPs a nécessité l'analyse des cinétiques d'hybridation des sondes aptamères avec leurs séquences complémentaires conjuguées aux AuNPs. Il a pu être démontré que l'utilisation d'un PEG à longue chaîne (2 kDa) en tant qu'agent bloquant sur les surfaces des AuNPs mais également de la biopuce, offrait le facteur d'amplification le plus élevé ($\times 5$) et le taux de signal non-spécifique le plus faible $\Delta R \sim 0,02\%$. Cela a permis l'application de cette première stratégie qui repose par ailleurs sur le clivage et l'ingénierie de la séquence d'aptamère originel sélectionné contre l'adénosine. Nous obtenons alors une séquence commune, SplitAPT, qui sera conjuguée aux AuNPs, et deux différentes séquences SplitAPT4 et SplitAPT8, utilisées comme sondes, et pouvant d'hybrider avec SplitAPT sur 4 et 8 bases, respectivement. L'adénosine étant en mesure de stabiliser le complexe tertiaire formé et d'augmenter le rendement de reconnaissance, la comparaison des signaux d'hybridation mesurés par SPR en présence et en absence de la cible permet alors de valider sa détection. Concernant l'interaction des séquences SplitAPT8 avec les conjugués AuNPs-SplitAPT, il a été démontré qu'une augmentation proportionnelle des signaux SPR en fonction de la concentration d'adénosine était effectivement retrouvée, mais néanmoins limitée à une LOD de 50 μM . La détection de l'interaction SplitAPT4 avec les conjugués AuNPs-SplitAPT n'était par ailleurs possible qu'en présence d'adénosine, permettant de rendre compte d'un effet stabilisant apporté et de réduire la LOD d'un facteur 1000. Ces résultats ont ainsi permis de valider la preuve de concept impliquant l'utilisation de la SPRi pour la détection de petites molécules au moyen d'*aptasensors*, avec des performances jugées satisfaisantes au regard des LOD retrouvées dans la littérature. Plus pertinent encore, cette stratégie a mis en évidence l'importance de l'effet stabilisant de la molécule cible sur l'interaction des séquences *Split aptamers*, notamment par rapport au nombre de bases complémentaires impliquées dans l'hybridation. Ceci a ouvert la voie vers une toute nouvelle stratégie de détection qui a fait l'objet du dernier chapitre exposé dans ce manuscrit.

La dernière stratégie développée pour la détection de l'adénosine, sans doute la plus originale, fait intervenir l'utilisation d'un protocole de dénaturation thermique couplée à l'imagerie par résonance de plasmons de surface. Dans ce cas, l'effet stabilisant induit par l'interaction de la petite molécule avec les séquences *Split aptamers* est mis en évidence par les profils de dénaturation obtenus.

L'influence du nombre de bases complémentaires des séquences *Split aptamers* s'est révélée être déterminante pour la qualité de l'interaction avec la cible. Pour une stratégie de détection basée sur la stabilité thermodynamique des complexes, il convient de favoriser l'effet stabilisant apporté par la petite molécule au détriment de celui apporté par le phénomène d'hybridation des séquences. Ainsi, il semble nécessaire de limiter le nombre de bases complémentaires entre les séquences *Split aptamers*. Dans notre cas, c'est l'utilisation des séquences SplitAPT5, avec 5 bases complémentaires, qui a permis d'obtenir les limites de détection les plus faibles (LOD = 30 nM).

La stratégie telle que développée ici permet également de caractériser quantitativement le phénomène d'interaction des séquences avec l'adénosine. A partir de gammes logarithmiques de quantification, il a en effet été possible d'extraire les paramètres thermodynamiques (variation d'entropie ΔS et d'enthalpie ΔH) caractérisant l'interaction des séquences étudiées avec leur cible.

Ce résultat, qui ouvre pour la première fois de nouvelles perspectives pour l'étude de l'interaction des aptamères avec les petites molécules, nous montre ainsi tout l'intérêt de l'association de la SPRi avec un dispositif de contrôle local de la température : la première donnant accès aux cinétiques d'interaction et le second aux paramètres thermodynamiques. D'autres études pourraient ainsi être menées parmi lesquelles l'influence des conditions hors-équilibre sur la dénaturation, dont nous avons vu qu'elle ne pouvait être décrite en utilisant simplement le modèle de Langmuir. L'ensemble des résultats confirme par ailleurs l'intérêt que présente l'emploi de nanoparticules d'or dans les stratégies de détection de petites molécules par SPRi. Nul doute que l'amélioration future des performances de cette technique ira de pair avec le progrès des nanosciences et nanotechnologies.

La caractéristique multiplexable de la SPRi est également un avantage considérable dont il est possible de tirer pleinement profit en vue des perspectives d'amélioration du dispositif et de la stratégie de détection tels qu'imaginés ici. En effet, cette stratégie, validée pour l'interaction des *Split aptamers* avec l'adénosine, peut également être appliquée sur de nouveaux modèles d'étude. Il est ainsi possible d'envisager de greffer sur la puce différentes séquences d'aptamères originels directement fonctionnalisées avec les nanoparticules d'or.

Il suffirait alors de comparer les profils de dénaturation de ces séquences avec ceux obtenus en présence des petites molécules spécifiques à chaque sonde. Outre la réduction du temps d'expérience et du coût lié à l'utilisation récurrente de AuNPs, la gamme d'aptamères pouvant être caractérisée de la sorte s'en trouve fortement augmentée. Il ne sera alors plus question de se restreindre aux séquences *Split aptamers*, qui finalement n'ont été obtenus que pour très peu de petites molécules à ce jour. Cette nouvelle stratégie, qui fera très probablement suite à ces travaux de thèse, présente néanmoins un défi considérable, celui de la mono-fonctionnalisation de nanoparticules d'or avec des séquences nucléotidiques. Des résultats préliminaires (nos exposés dans ce manuscrit), laissent toutefois envisager qu'une telle chose demeure possible, bien que nécessitant un nombre important d'optimisations, notamment en ce qui concerne les rendements de couplage obtenus.

Enfin, les résultats présentés ici ont à notre sens contribué à démontrer le potentiel des biocapteurs à aptamères pour la détection de petites molécules. Si la technologie *aptasensors* demeure encore « immature » au regard de celle impliquant l'utilisation des anticorps, il est certain qu'elle offre les perspectives d'application les plus prometteuses. Plus particulièrement dans le domaine environnemental et alimentaire, du fait de la difficulté d'obtenir des anticorps contre les petites molécules concernées, et du besoin de réaliser des analyses sur le terrain, exigeant un élément de reconnaissance hautement stable. Ce sont là tout autant de raisons susceptibles de faire sortir les aptamères du rôle passif auquel ils sont confinés depuis de nombreuses années.

ANNEXE A. Matériel expérimental

Réactifs chimiques

CH₃O-PEG-SH ; Rapp Polymere GmbH (Germany).

HO-(CH₂)₁₁-PEG-SH ; Sigma-Aldrich (France)

11-Mercapto-Undecane-1 NHS ; synthétisé au laboratoire.

1-Dodécane-thiol ; Sigma-Aldrich (France)

6-Mercaptohexanol

Bis-(p-sulfonatophenyl)phenylphosphine dihydrate dipotassium (BSPP); Sigma-Aldrich (France)

Solution de nanoparticules d'or de 2 nm de diamètre ; *BBI Solution (Royaume-Uni)*

Le reste des réactifs chimiques provient de Sigma-Aldrich (France).

Oligonucléotides

Les oligonucléotides proviennent de la firme Eurogentec (France).

Nom	Séquence (5' -> 3')
APT1	₂ HN-T ₁₀ -GGTTGGTGTGGTTGG
APT2	₂ HN -T ₁₀ -AGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGACT
APT8	HS- T ₅ -AGAGAACCTGGGGGAGTATTGCGGAGGAAGGTTCTC
APT4	HS- T ₅ -AGAGAACCTGGGGGAGTATTGCGGAGGAAGGTAGAG
SplitAPT8	HS- T ₁₀ -TGCGGAGGAAGGTTCTC
SplitAPT6	HS- T ₁₀ -TGCGGAGGAAGGTTTCAG
SplitAPT5	HS- T ₁₀ -TGCGGAGGAAGGTTGAG
SplitAPT4	HS- T ₁₀ -TGCGGAGGAAGGTAGAG
SplitAPT	HS-T ₁₀ -AGAGAACCTGGGGGAGTAT
CN	₂ HN - T ₄ -TAAGTTCATCTCCCCGGTGGTGGTTGTGGTT
Zip9	HS-GACCATCGTGCGGGTAGGTAGACC
cAPT8	HS-T ₅ .GAGAACCTTCCTCCGCAATACTCCCCAGGTTCTCT-T ₅

Tableau A. 1 Séquence des oligonucléotides apparaissant dans ce manuscrit.

Molécules cibles et contrôle

Thrombine (THR) ; Cryopep (France)

Adénosine ; Sigma-Aldrich (France)

Guanosine; Sigma-Aldrich (France)

Tampons

Les tampons et solutions utilisés pour la SPRi sont préparés au laboratoire avec de l'eau déionisée (18,2 MΩ.cm), purifiés avec un filtre 0,22 µm et conservés à -20°C.

Nom et fonction	Composition
Tampon de course SPR (Thrombine)	Tris-HCl 20 mM, MgCl ₂ 1 mM, NaCl 120 mM, KCl 10 mM, pH 7,4
Tampon de course SPR (Adénosine)	HEPES 10 mM, MgCl ₂ 5mM, NaCl 150mM, 0,005 % Tween20
Tampon de greffage thiol	HK ₂ PO ₄ 1M pH 9,25
Tampon de couplage oligonucléotides	PBS pH 8 (ou NaHCO ₃ 0,5 M pH 8)
Tampon BSPP1	1 mg/mL de BSPP (1,87mM) dans de l'eau miliQ filtré à 0,2 µm.
Tampon BSPP2	1 mg/20µL de BSPP (93,5mM) dans de l'eau miliQ filtré à 0,2 µm.
Solution de blocage	BSA 500 nM et cyt c 500 nM dilués dans le tampon de course
Solution de blocage PEG	PEG 2kDa 150 µM
Solution de regeneration	NaOH 50 mM

Tableau A. 3 Liste des solutions utilisées dans le cadre de ces travaux de thèse.

Matériel

Prisme de verre haut indice (angle 60°) recouvert d'une double couche métallique : titane 5 nm et or 45 nm d'épaisseur ; Horiba Scientific-GenOptics (France).

Colonne NAPTM 5, SephadexTM G-25 ; GE Healthcare (UK)

Spectrophotomètre ND-1000 Nanodrop ; Labtech International (UK)

Robot piézoélectrique sans contact ; Siliflow (France)

Générateur de plasma Femto ; Diener Electronic (Allemagne)

Imageur SPR SPRi-Lab+ ; Horiba Scientific-GenOptics (France).

Dégazeur ; Altech (France)

Pompe seringue Cavro ; Tecan (USA)

ANNEXE B. Protocoles expérimentaux

Fonctionnalisation des oligonucléotides

Cette fonctionnalisation a impliqué uniquement les séquences d'aptamères anti-thrombine (AP1 et APT2). D'après un protocole inspiré de Grosjean et *al.*¹ La molécule de couplage (thiol-NHS) est ajoutée en large excès (ratio 80:1) à une solution PBS pH 8 (ou NaHCO₃ 0,5 M pH 8) contenant 4 nmoles d'oligonucléotides (comportant une modification amine primaire en 5') dans un volume final de 200 µL. La réaction est maintenue pendant 60 min minimum à température ambiante avant que le produit conjugué ne soit purifié sur une colonne NAPTM 5 (GE Healthcare, UK) par élution avec de l'eau déionisée. Après lyophilisation, les oligonucléotides sont resuspendus dans l'eau déionisée ou le tampon de greffage et la concentration est déterminée par mesure de l'absorbance à 260 nm (spectrophotomètre ND-1000 Nanodrop, Labtech International, UK).

Fabrication des biopuces à aptamères par formation de SAMs thiol

Le protocole présenté ici correspond au protocole optimisé utilisé lors de l'élaboration de toutes les biopuces dont les résultats pour la détection de la thrombine sont présentés dans ce manuscrit. Les biopuces à aptamères élaborées par chimie thiol (formation de SAMs mixtes) sont toutes nettoyées par un traitement plasma (0,6 mbar, 75 % Oxygène, 25 % Argon, puissance 40 W, 6 min) dans un générateur de plasma Femto (Diener Electronic, Allemagne) la veille de leur fonctionnalisation. Le lendemain, les surfaces sont à nouveau nettoyées à l'eau déionisée et l'éthanol (96,2 %) avant d'être séchées sous flux d'argon et positionnées dans un dispositif de greffage robotisé par dispense de nanovolumes sans contact (Siliflow, France). Les solutions de greffage, contenant les oligonucléotides modifiés avec un groupe terminal thiol en 5', sont préparées dans un tampon de greffage HK₂PO₄ (**Tableau A. 3**). Chaque solution correspond à une unique espèce de plot, généralement répliquée en 3 ou 4 exemplaires sur la surface, et contient 10 µM de PEG modifiés (CH₃O-PEG-SH) et 10 µM ou 20 µM d'oligonucléotides modifiés. Le greffage est réalisé dans une enceinte à l'humidité contrôlée (~80-85 % d'humidité) par l'éjection de gouttes (~4 nL) de la solution de greffage sur la surface (taille des gouttes ~500 µm, espacées tous les 1,25 mm). L'éjecteur est nettoyé à l'eau déionisée entre chaque chargement de solution de greffage de façon à limiter les risques de contamination entre les différentes solutions. Lorsque la matrice de plots est complète, la biopuce est encore laissée dans l'enceinte humide pendant 60 min afin d'assurer la bonne formation des SAMs, puis retirée et placée à sécher sous sorbonne pour la nuit. Le lendemain, les biopuces sont rincées abondamment à l'eau déionisée avant d'être séchées sous flux d'argon et stockées à 4°C. Les biopuces sont en général utilisées en SPRi dans les jours suivants. Avant une première utilisation, une étape de blocage, visant à limiter le signal non spécifique, est réalisée par immersion de la biopuce dans une solution de blocage (**Tableau A. 3**) pendant 1h30 à température ambiante.

¹ Grosjean, L., et al., A polypyrrole protein microarray for antibody-antigen interaction studies using a label-free detection process. *Analytical Biochemistry*, 2005. 347(2): p. 193-200.

Couplage AuNPs-oligonucléotides

Le protocole utilisé pour le couplage des nanoparticules avec les oligonucléotides est inspiré de Claridge et al.¹

A. Remplacement du citrate par la Phosphine (BSPP)

La solution mère de nanoparticules BBI est stabilisée dans un tampon Citrate. On souhaite remplacer ce ligand avec de la BSPP pour optimiser le couplage avec les oligonucléotides. Le ligand BSPP nous permet en effet d'obtenir une meilleure stabilité des nanoparticules en solution:

- Ajouter 3mg de BSPP à 1mL de solution de la solution mère en nanoparticules (AuNPs)

>Au NPs BBI 20nm dans du citrate

> Concentration en nanoparticules 1,16 nM

> Rapport en masse AuNPs/BSPP 1 : 50.

- Incuber pendant la nuit sous agitation lente, à température ambiante (vortex IKA VIBRAX VXR).

B. Préparation des nanoparticules pour le couplage

- Centrifuger 1mL de la solution précédente de AuNPs :

>Vitesse : 15300 rpm (16750 G)

>Accélération et décélération : 19

> Temps de centrifugation : 10 min

- Retirer le surnageant et resuspendre les NPs dans 500 µL de tampon BSPP1.

- Ajouter une pincée de NaCl en poudre (environ 5mg) jusqu'à ce que la couleur de la solution change avec agitation : la couleur passe du rouge au pourpre et enfin au gris lorsque les nanoparticules s'agrègent (Etape à réaliser avec Vortex).

- Centrifuger pendant 10 min (15300 rpm, acc : 19).

- Retirer le surnageant et suspendre dans 70 µL de tampon BSPP1.

C. Couplage des nanoparticules

Le couplage se fait dans 100 µL de solution finale :

>70 µL de Nps dans le tampon BSPP1 préparées précédemment.

>10 µL de BSPP2,

>10 µL de PBS à (pH=7,4)

>10 µL d'oligonucléotides thiolés (10µM dans du PBS pH=7,4) pour une concentration finale de 1 µM

- Mélanger les 10 µL de PBS (pH=7,4) avec les 10 µL de BSPP2 et les 10 µL d'oligonucléotides.

- Ajouter ensuite ces 30 µL de PBS, BSPP2 et oligonucléotides à la solution de 70 µL de nanoparticules.

- Laisser incuber pendant la nuit à une température de 4°C

¹ Claridge, S.A., et al., *Isolation of Discrete Nanoparticle-DNA Conjugates for Plasmonic Applications*. Nano Letters, 2008. 8(4): p. 1202-1206.

D. Ajout de PEG et mise dans le tampon

- Ajouter 7 μL de PEG 2kDa (à 150 μM dans du PBS à pH=7,4) , concentration finale de 10 μM .
- Laisser incuber pendant 1h30 à température ambiante.
- Centrifuger pendant 10min (15300 rpm, acc : 19).
- Enlever le surnageant et suspendre dans 200 μL de tampon SPRi.
- Centrifuger à nouveau pendant 10 min (15300 rpm, acc : 19).
- Suspendre dans 1mL de tampon SPRi. C'est cette solution qui est utilisée comme solution mère pour les injections en SPRi aux concentrations souhaitées. Pour les injections de NPs en SPRi on utilise des concentrations d'environ 200 pM de nanoparticules.

ANNEXE C. Estimation de la taille et de la concentration des nanoparticules utilisées

Il s'agit d'évaluer la taille et la concentration des AuNPs (BBI) par spectrophotométrie en se référant à la méthode théorique proposée par Haiss et al.¹

Intérêt : Trouver une méthode simple et efficace qui nous permettrait d'estimer à tout moment la concentration d'une solution colloïdale de AuNPs.

1. Estimation du diamètre des AuNP

Pour faire cette estimation, quatre diamètres de billes, *à priori* connus, ont été sélectionnés : **5, 10, 20** et **40 nm** de diamètre. La méthode préconisée est basée sur une corrélation entre la longueur d'onde où apparait le pic plasmon (absorbance est maximale), notée λ_{spr} , et le diamètre de la nanoparticule (**d**) qui sera alors déduit.

Pour les petites particules (**d < 25 nm**), il est conseillé de déduire de diamètre de la nanoparticule d'or en se basant sur un rapport d'absorbance à λ_{spr} et λ_{450} : (A_{spr}/A_{450}).

▪ Contraintes

- Utilisation d'une solution aqueuse.
- Billes nues (non fonctionnalisées).
- Pourcentage d'erreur **18%** (**d < 25nm**) et **3%** (**d > 25nm**).

▪ Résultats

Pour les faibles diamètres (5 et 10 nm), aucune corrélation directe n'a été retrouvée (Tableau C.1). Les rapports d'absorbance obtenus se rapprochent davantage de 3 nm et 7 nm respectivement. Par ailleurs une très bonne corrélation a été retrouvée pour les AuNP de 20 et 40nm.

Diamètre AuNP (connu)	λ_{sp} (nm)	A_{spr}	A_{450}	A_{spr}/A_{450}	Corrélation avec les données (<i>d</i> déduit)
40 nm	527				40 nm
20 nm		0,107	0,061	1,75	20 nm
10 nm		0,081	0,058	1,39	-
5 nm		0,078	0,073	1,09	-

Tableau C.1 Résultats de l'estimation théorique du diamètre des nanoparticules

2. Estimation de la concentration des AuNP

Dans ce cas, l'estimation de la concentration est obtenue en utilisant une corrélation entre le diamètre **d** (connu), le coefficient d'extinction ϵ à λ_{450} (connu) et l'absorbance **A** à λ_{450} . La concentration (**C**) est alors déduite à partir de la formule suivante :

$$C (M) = A_{450} / \epsilon_{450}$$

▪ Contraintes

- Utilisation d'une solution aqueuse.
- Billes nues (non fonctionnalisées).
- Pourcentage d'erreur **6 %**.
- Données uniquement vérifiées pour une gamme de taille entre 5 et 100 nm.

▪ Résultats

La meilleure corrélation a été retrouvée pour les nanoparticules de 20 nm (Tableau C.2)

Diamètre AuNP (connu)	Absorbances mesurées à λ_{450}								Moyenne	ϵ_{450} ($\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$)	C (M) calculée	C (M) connue
40 nm	0,057	0,055	0,055	0,055	0,054	0,057	0,057	0,057	0.0558	4.92 E9	1.13 E⁻¹⁰	1.49 E⁻¹⁰
20 nm	0,062	0,060	0,057	0,056	0,056	0,056	0,058	0,058	0.0578	5.03 E7	1.15 E⁻⁹	1.16 E⁻⁹
10 nm	0,058	0,059	0,060	0,058	0,058	0,057	0,058	0,058	0.0582	6.45 E6	9.01 E⁻⁹	9.46 E⁻⁹
5 nm	0,075	0,075	0,075	0,071	0,072	0,074	0,073	0,073	0.0735	7.20 E6	1.02 E⁻⁸	8.30 E⁻⁸

Tableau C.2 Résultats de l'estimation théorique du diamètre des nanoparticules

¹Haiss, W., et al., Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV-Vis Spectra. Analytical Chemistry, 2007. 79(11): p. 4215-4221.

Résumé

Les aptamères sont de courtes séquences d'oligonucléotides possédant une forte affinité et spécificité envers un ligand (petites molécules organiques, peptides, acides nucléiques, protéines, cellules). Du fait de leurs remarquables propriétés, ils peuvent être utilisés comme alternative aux anticorps dans les dispositifs de type biocapteur/biopuce, notamment pour la détection de petites molécules (PM < 2000 Da). L'imagerie de résonance des plasmons de surface (SPRi) est une technique de détection optique qui a gagné une attention croissante ces dernières années. Dans le cadre de ces travaux, nous avons développé une biopuce à aptamères appliquée à la détection d'une petite molécule, l'adénosine, au moyen de la SPRi. Pour cela, deux différentes stratégies ont été développées. La première combine l'utilisation de nanoparticules d'or (AuNPs) pour l'amplification du signal SPRi avec l'ingénierie des séquences d'aptamères (*split aptamers*). La seconde stratégie est basée sur l'exploitation de la stabilité thermodynamique apportée par l'interaction de la cible (adénosine) avec les séquences d'aptamères. Le dispositif SPRi est alors couplé à un système de régulation de température, permettant ainsi d'assurer la dissociation des complexes et d'établir des profils de dénaturation caractéristiques. Nos résultats initient ainsi une nouvelle approche dans la détection de petites molécules par SPRi et ouvrent de nouvelles perspectives de développement pour les biopuces à aptamères.

Mots-clés : *aptamères, imagerie de résonance plasmonique de surface, nanoparticules d'or, petites molécules, adénosine, courbes de dénaturation*

Abstract

Aptamers are single-stranded DNA (ssDNA) or RNA molecules able to bind target molecules, including proteins, metal ions and drugs. Because of their specific binding abilities and many advantages over antibodies (higher stability, lower cost, easy chemical modification...), they provide a great opportunity to produce sensing surfaces for effective and selective detection of small molecules. Surface Plasmon Resonance imaging (SPRi) has become one of the most widely used label-free methods for the study of biorecognition events on sensor surfaces. This technique provides a rapid approach, however, limited by low refractive index changes occurring when small molecules (< 2000 Da) are captured on the sensor. In this work, we developed two bioassay strategies for the detection of a model small molecule, adenosine, using the SPRi. The first one combines the SPRi signal enhancement effect induced by gold nanoparticles (AuNPs) with the advantage of using engineered DNA aptamers into *split aptamers*. The second strategy is based on the thermodynamics of binding between adenosine and its aptamers. To that end, SPRi technique was coupled with rigorous temperature control and the aptamer duplex stability was monitored (affected by target binding) by quantification of melting transitions. Our results initiate a new approach for small molecule detection using SPRi with the aim to validate future prospects for integration in parallelized platform.

Keywords: *aptamers, surface plasmon resonance imaging, gold nanoparticles, small molecules, adenosine, melting curves*