

Titre: Biocapteur hybride combinant la plasmonique et l'électrochimie
Title: pour l'observation biologique

Auteur: Laurent Doré-Mathieu
Author:

Date: 2014

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Doré-Mathieu, L. (2014). Biocapteur hybride combinant la plasmonique et l'électrochimie pour l'observation biologique [Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie. <https://publications.polymtl.ca/1634/>
Citation:

Document en libre accès dans PolyPublie Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/1634/>
PolyPublie URL:

Directeurs de recherche: Michel Meunier
Advisors:

Programme: Génie physique
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

BIOCAPTEUR HYBRIDE COMBINANT LA PLASMONIQUE ET
L'ÉLECTROCHIMIE POUR L'OBSERVATION BIOLOGIQUE

LAURENT DORÉ-MATHIEU

DÉPARTEMENT DE GÉNIE PHYSIQUE
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES
(GÉNIE PHYSIQUE)
DÉCEMBRE 2014

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé:

BIOCAPTEUR HYBRIDE COMBINANT LA PLASMONIQUE ET L'ÉLECTROCHIMIE
POUR L'OBSERVATION BIOLOGIQUE

présenté par : DORÉ-MATHIEU Laurent

en vue de l'obtention du diplôme de : Maîtrise ès sciences appliquées

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

M. GERVAIS Thomas, Ph. D., président

M. MEUNIER Michel, Ph. D., membre et directeur de recherche

Mme SANTATO Clara, Doctorat, membre

DÉDICACE

À mes parents, Lyne et Louis,

Pour votre appui inconditionnel.

REMERCIEMENTS

En premier lieu, j'aimerais remercier mon directeur de recherche, Michel Meunier, pour son soutien, ses précieux conseils ainsi qu'un support financier me permettant de mener à terme ce projet de maîtrise. Je témoigne également ma reconnaissance à Sergiy Patskovsky pour le support quotidien qu'il m'a apporté tout au long du projet.

Je remercie Anne-Marie Dallaire pour son aide directe sur mon projet, Éric Bergeron et Alexandra Thibeault-Eybalin pour la culture de mes cellules et leurs nombreux conseils pour tout ce qui touche l'aspect biologique de mes expériences, Mathieu Maisonneuve et André-Pierre Blanchard-Dionne pour leur aide avec la théorie et les systèmes optiques que j'ai utilisés, David Rioux et Vincent Latendresse pour les instructions concernant l'utilisation du laser femtoseconde, Thomas Gervais pour son apport dans le projet de détection de marqueurs de cancer (présenté en annexe du présent mémoire) ainsi que Rodrigue Beaini qui, pendant son stage d'été, a poursuivi mes travaux déjà amorcés sur cette détection de marqueurs de cancer. De plus, sans l'assistance de Christophe Clément et Alireza Mesgar, je n'aurais pu mener à bien les travaux que j'ai effectués en salle blanche.

Je me dois de remercier particulièrement les membres de mon jury soit les professeurs Thomas Gervais (président) et Clara Santato (membre).

J'en profite aussi pour exprimer ma reconnaissance envers tout le reste de l'équipe qui a su rendre l'ambiance de travail dynamique et agréable tout au long des deux années que j'ai passées au sein de cette équipe.

Également, j'aimerais également remercier Vincent Latendresse et Lyne Mathieu de m'avoir aidé durant la relecture et la correction de ce mémoire.

Finalement, je tiens à témoigner de ma reconnaissance envers le programme ISS (*integrated sensor systems*), parrainé par l'université McGill, qui m'a fourni une bourse NSERC-CREATE ainsi que l'accès à de nombreuses formations et séminaires très enrichissants.

RÉSUMÉ

Les biocapteurs occupent une place grandissante dans de nombreux domaines allant des diagnostics médicaux aux analyses environnementales, en passant par la recherche pharmaceutique. La résonance plasmonique de surface ainsi que l'électrochimie sont des technologies prometteuses pour le développement de méthodes de détection sensibles, abordables, rapides, portables et simples, ce qui en fait des candidats de choix pour de nombreuses applications.

Un biocapteur hybride combinant la résonance plasmonique de surface (SPR) et l'électrochimie a été développé. Le principe de fonctionnement repose sur la mesure du signal SPR découlant de l'application d'un potentiel alternatif par un potentiostat sur une surface d'or servant aussi d'électrode de travail. La composante du signal SPR ayant la même fréquence que le potentiel appliqué est mesurée à l'aide d'un amplificateur à détection synchrone (*lock-in amplifier*). Ce potentiel alternatif module la densité de charges sur la surface d'or, qui influence à son tour les conditions de résonance des plasmons de surface. Un tel système mesure l'admittance électrique du système électrode/solution, pouvant être approximé par différents circuits électriques équivalents permettant d'en décrire les caractéristiques.

Ce biocapteur hybride a un bon potentiel pour des applications biomédicales, notamment lors de l'observation de comportements cellulaires ou de réactions chimiques. Il a en outre été utilisé pour suivre la variation de l'admittance électrique de l'électrode de travail lors de l'ajout de monocouches de molécules sur cette dernière, causant une diminution du signal pouvant atteindre plus de 90%. De plus, le détachement d'une monocouche de cellules RGC-5 cultivées sur l'électrode de travail a été observé et s'est traduit par une augmentation d'environ 40% du signal mesuré. Il a aussi été démontré que des réactions d'oxydoréduction peuvent générer un signal très fort en électrochimie-SPR. Des mesures de spectroscopie d'impédance, de SPR spectral ainsi que des images prises à l'aide d'un microscope permettent de valider les résultats fournis par le biocapteur développé.

De nombreux paramètres expérimentaux ont été optimisés tout au long de ce projet. En général, la fréquence de travail donnant le meilleur rapport sur bruit est 100Hz. De plus, l'application d'un potentiel fixe de -200mV sur l'électrode de travail lors de l'observation de cellules permet de maximiser l'augmentation de signal lors de leur détachement.

ABSTRACT

The use of biosensors is currently growing in numerous research fields such as environmental analysis, clinical diagnosis or pharmaceutical research. Surface plasmon resonance and electrochemistry are among promising technologies for the development of sensitive, affordable, fast, portable and easy to use detection techniques, which makes them great solutions for future clinical applications.

An hybrid biosensor combining electrochemistry and surface plasmon resonance was developed (EC-SPR). The working principle is based on the measurement of the SPR signal resulting from the application of an alternative electrical potential with a potentiostat on a gold thin layer that is also used as the working electrode. The component of the SPR signal that has the same frequency as the applied potential is measured by a lock-in amplifier. The applied potential modulates the charge density in the surface plasmon supporting layer, which in turn influence the coupling conditions between the surface plasmons and the incident light beam. The data acquired this way reflect the electrical admittance of the studied system (electrode and solution), which can be approximated with equivalent electrical circuits to describe its characteristics.

The developed biosensor has a good potential for biomedical applications, notably for the observation of cellular behaviour or chemical reactions. It was used to follow the electrical admittance of the working electrode while self-assembled monolayers were added on it, which caused a decrease of the signal that can reach more than 90%. The detachment of an RGC-5 cell layer cultivated on the working electrode was observed to induce a 40% rise of the EC-SPR signal. It was also shown that redox reactions on the electrode can produce strong electrochemical-SPR signals. Impedance spectroscopy and spectral SPR measurements along with microscope images are used to validate the results generated by the EC-SPR biosensor.

Many experimental parameters had to be optimized during this project. Usually, a frequency of 100Hz leads to the best signal to noise ratio. A fixed negative potential of -200mV, applied to the working electrode during the observation of cells maximize the signal increase following their detachment.

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE.....	III
REMERCIEMENTS	IV
RÉSUMÉ.....	V
ABSTRACT	VI
TABLE DES MATIÈRES	VII
LISTE DES TABLEAUX.....	X
LISTE DES FIGURES	XI
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XVI
LISTE DES ANNEXES	XX
INTRODUCTION.....	1
Objectifs de ce mémoire	4
CHAPITRE 1 THÉORIE & CONCEPTS	5
1.1 Biocapteur	5
1.2 Biocapteur plasmonique	8
1.2.1 Plasmons de surface	8
1.2.2 Excitation des plasmons de surface.....	10
1.2.3 Montages expérimentaux	13
1.2.4 Applications à la biodétection	15
1.3 Biocapteur électrochimique.....	16
1.3.1 Considérations générales.....	17
1.3.2 Capacité double couche.....	19
1.3.3 Spectroscopie d'impédance.....	21
1.3.4 Spectroscopie d'impédance en biodétection	24

1.4	Électrochimie-SPR	27
1.4.1	Relation entre électrochimie et signal SPR	27
1.4.2	Applications à la biodétection	30
CHAPITRE 2	DESIGN ET MÉTHODOLOGIE PROPOSÉS.....	33
2.1	Comparaisons entre le système proposé et la littérature	33
2.2	Biocapteur hybride proposé	35
2.3	Systèmes secondaires	39
2.4	Fabrication des électrodes	40
2.5	Manipulations avec cellules	42
CHAPITRE 3	CARACTÉRISATION DU BIOCAPTEUR HYBRIDE.....	45
3.1	Calibration de base	45
3.1.1	Limite de détection SPR spectral	45
3.1.2	Influence de la concentration ionique	46
3.1.3	Effet de l'angle d'incidence	52
3.1.4	Balayage du potentiel appliqué et influence de l'angle incident.....	53
3.2	Attache de monocouches de molécules.....	56
3.3	Tests avec bleu de méthylène.....	60
CHAPITRE 4	TESTS <i>IN VITRO</i> SUR CELLULES	64
4.1	Mesures SPR avec cellules.....	64
4.2	Mesures du système hybride avec cellules.....	66
4.2.1	Détachement de cellules RGC-5	67
4.2.2	Influence du potentiel appliqué	70
4.2.3	Influence de la fréquence utilisée	72
4.2.4	Dépendance spatiale des mesures	73

CHAPITRE 5 PORTÉE DE CES RÉSULTATS ET DISCUSSION	76
5.1 Impact des résultats	76
5.2 Améliorations tentées	78
5.3 Étapes futures	80
CONCLUSION	84
BIBLIOGRAPHIE	86
ANNEXE	91

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 3.1 : Paramètres du circuit équivalent estimés à l'aide des données obtenues en spectroscopie d'impédance pour différentes concentrations de PBS.	49
Tableau 3.2 : Paramètres du circuit équivalent estimés à l'aide des données EC-SPR obtenues pour différentes concentrations de PBS.	51
Tableau 3.3 : Paramètres du circuit équivalent estimés à l'aide des données de spectroscopie d'impédance recueillies lors de l'attache de mercaptoéthanol sur l'électrode de travail.	58
Tableau 3.4 : Paramètres du circuit équivalent estimés à l'aide des données EC-SPR recueillies lors de l'attache de mercaptoéthanol sur l'électrode de travail.	59
Tableau 3.5 : Paramètres de la couche capacitive associés à différents types de molécules et déterminés à partir des données d'électro-SPR.	59
Tableau 4.1 : Paramètres du circuit équivalent d'une électrode avant et après le détachement des cellules RGC-5, estimés à l'aide des données de spectroscopie d'impédance.	70
Tableau 4.2 : Paramètres du circuit équivalent d'une électrode avant et après le détachement des cellules RGC-5, estimés à l'aide des données d'électrochimie-SPR.	70
Tableau 4.3 : Caractéristiques expérimentales de signaux typiques d'électro-SPR à différentes fréquences.....	73

LISTE DES FIGURES

Figure 1-1 : Types de biocapteurs étudiés. A) Capteur plasmonique; B) Capteur électrochimique; C) Capteur électro-plasmonique (EC-SPR).	6
Figure 1-2: Guide d'onde semi-infini avec une interface métal/diélectrique. Les plasmons de surface se propagent sur l'interface en direction de l'axe z et ils décroissent dans chaque milieu selon l'axe x.....	9
Figure 1-3 : A) Lorsqu'un faisceau lumineux est incident dans l'air, il ne peut y avoir de couplage avec les plasmons de surface. B) Les relations de dispersion de l'onde incidente et du plasmon de surface ne se croisent en aucun point (angle d'incidence de 72°).....	12
Figure 1-4 : A) Lorsque l'onde est incidente dans un prisme d'indice $n_p=1,5$ (configuration Kretschmann), il peut y avoir couplage avec un plasmon de surface. B) Relations de dispersion correspondant à ce montage (angle incident de 72°); l'intersection entre les 2 courbes définit les conditions de couplage.....	12
Figure 1-5 : Déplacement du pic plasmonique lors d'une variation de l'indice de réfraction de l'eau de 0,02 RIU (pour un prisme d'indice $n_p=1,5$ et un angle d'incidence de 72°). En plus de la variation de la position du minimum angulaire ou spectral, une variation de l'intensité réfléchie peut être mesurée si l'angle et la longueur d'onde sont fixés.	13
Figure 1-6: Montage expérimental d'un système SPR angulaire.	14
Figure 1-7 : A) Circuit équivalent de Randles d'une électrode (dans l'encadré) en solution. B) En l'absence de couple redox, la branche resistive peut être négligée ($R_{TC} = \text{infini}$).	18
Figure 1-8: Système de mesure électrochimique à 3 électrodes; l'électrode de référence contrôle le potentiel et la contre-électrode mesure le courant.....	19
Figure 1-9 : Formation de la double couche capacitive lorsque le potentiel appliqué est : A) négatif et B) positif.....	21
Figure 1-10 : Diagramme de <i>Bode</i> de l'impédance pour : A) une électrode comprenant une capacité et une résistance de transfert de charge et B) une électrode pour laquelle le transfert de charge est négligé. Les paramètres utilisés sont : $R_S = 100\Omega$, $R_{TC} = 5k\Omega$ et $C_{DC} = 1\mu F$	23

Figure 1-11 : Modifications possibles du circuit équivalent de base. A) Ajout d'une capacité en série avec la capacité de l'électrode d'or. B) En présence d'un couple de molécules redox, toute modification peut être vue comme l'ajout d'une résistance en série avec la résistance de transfert de charge.	24
Figure 1-12 : Prédominance de la voie : A) paracellulaire à basse fréquence ou b) transcellulaire à haute fréquence.	26
Figure 1-13 : Circuit équivalent à une monocouche de cellules.	26
Figure 1-14 : Module (A) et phase (B) du signal EC-SPR théorique lorsque la résistance de transfert de charge est négligée avec une capacité idéale ($m=1$, courbes noires) ou un élément à phase constante ($m=0.98$, courbes rouges). Pour les calculs, $C_{DC}=1\mu F$ et $R_S=100\Omega$	30
Figure 2-1 : Schéma de fonctionnement du système EC-SPR.	37
Figure 2-2 : Amplitude du signal EC-SPR en fonction de l'angle incident. Les deux courbes SPR correspondent aux états où le potentiel appliqué est minimum et maximum et le signal mesuré est une oscillation entre ces 2 courbes. Le signal est maximisé lorsque la dérivée du pic SPR est maximale.....	38
Figure 2-3 : Système SPR spectral installé sur les 2 faces libres du prisme (rotation de 90 degrés par rapport à la figure 2-1) et objectif de microscope 10X pour l'observation de cellules....	40
Figure 2-4 : Pétri dont le fond est composé d'un échantillon de verre couvert de 50 nm d'or, fixé à l'aide d'époxy. Le ruban adhésif en cuivre permet d'assurer le contact électrique avec le potentiostat.	42
Figure 2-5 : Monocouche de cellules RGC-5 situées A) au centre de l'électrode et B) en périphérie de cette dernière. Barres de dimension : 150 μm . Images obtenues à l'aide d'un microscope optique à contraste de phase.	44
Figure 3-1 : Courbe de calibration du système SPR spectral effectuée avec des concentrations d'éthanol dans l'eau DI de 0,5%, 1% et 2%. La limite de détection déterminée est de 1,1 *10 ⁻⁵ RIU.....	46

Figure 3-2 : Courbes de calibration pour différentes concentrations de PBS : A) Signal SPR spectral; B) Signal de spectroscopie d'impédance à 100 Hz; C) Signal EC-SPR. Des splines ont été utilisées afin d'approximer l'allure des courbes.....	48
Figure 3-3: Données expérimentales de spectroscopie d'impédance pour différentes concentrations de PBS (points) et courbes permettant d'approximer les paramètres du circuit équivalent à ce système (lignes pleines). A) Module de l'impédance. B) Phase de l'impédance	49
Figure 3-4 : Données expérimentales (points) et courbes recalculées (lignes pleines) d'électrochimie SPR pour différentes concentrations de PBS. A) Amplitude du signal. B) Phase du signal.....	51
Figure 3-5 : Dérivée calculée du pic SPR en fonction de l'angle incident du faisceau laser (en rouge, ligne pleine) et amplitude du signal EC-SPR en fonction de l'angle incident (ligne noire avec points). Les deux courbes ont été normalisées.	53
Figure 3-6 : A) Profil temporel du potentiel appliqué. B) Variation de la position du minimum spectral du pic SPR en fonction du potentiel. C) Variation de l'intensité lumineuse en fonction du potentiel pour différents angles d'incidence. D) Profil de l'impédance (amplitude et phase) de l'électrode de travail en fonction du potentiel.	54
Figure 3-7 : Amplitude et phase du signal EC-SPR lors de balayages du potentiel constant appliqué pour différents angles d'incidence du faisceau laser.....	56
Figure 3-8 : Attache de mercaptoéthanol sur l'électrode de travail. A) Signal SPR spectral; B) Amplitude du signal EC-SPR et C) Phase du signal EC-SPR.	57
Figure 3-9 : Données expérimentales (points) et calculées (lignes pleines) d'EIS avant (noir) et après (rouge) l'attache de mercaptoéthanol. Module (A) et Phase (B) de l'impédance.	57
Figure 3-10 : Données expérimentales (points) et calculées (lignes pleines) d'électro-SPR avant (noir) et après (rouge) l'attache de mercaptoéthanol sur l'électrode de travail. A) Amplitude du signal. B) Phase du signal (les lignes bleues représentent les courbes calculées décalées de 60°).....	58
Figure 3-11 : Données obtenues en spectroscopie d'impédance (A : amplitude et B : phase) pour 5 conditions expérimentales : électrode d'or nu (noir), faisceau dirigé sur une zone de	

l'électrode fonctionnalisée uniquement avec du mercaptoéthanol à 0V (rouge) et -275mV (vert), faisceau dirigé sur une zone fonctionnalisée avec des complexes oligonucléotides-BM en plus du mercaptoéthanol à 0V (bleu) et -275mV (cyan).	61
Figure 3-12 : Données obtenues en EC-SPR (A : amplitude et B : phase) obtenues pour les 5 mêmes conditions expérimentales que sur la figure 3-11.	62
Figure 3-13 : Courbes du signal EC-SPR (A : amplitude et B : phase) sans le brin d'ARN complémentaire (en noir) et en présence d'une concentration de brins complémentaires de 600nM (en rouge).	62
Figure 4-1 : Courbes SPR lorsque différentes concentrations de trypsine sont utilisées.	65
Figure 4-2 : Couche de cellules RGC-5. A) Avant l'ajout de trypsine à une concentration de 0,01%; B) Après 1 minute; C) Après 5 minutes; D) Après 10 minutes et E) Après 20 minutes. Barres de dimension : 100µm. Images obtenues à l'aide d'un microscope optique à contraste de phase.	66
Figure 4-3 : Mesures prises durant le détachement des cellules. A) Mesures SPR; B) Amplitude du signal EC-SPR à 50 Hz, 50 mV d'amplitude et C) Phase du signal EC-SPR.	68
Figure 4-4 : Courbes d'impédance (A) amplitude et B) phase) pour un échantillon avant (en noir) et après (en rouge) le détachement des cellules. Les points représentent les données expérimentales et les courbes, les valeurs calculées à partir des paramètres du tableau 4.1.	69
Figure 4-5: Courbes d'EC-SPR (A) amplitude et B) phase) pour un échantillon avant (en noir) et après (en rouge) le détachement des cellules. Les points représentent les données expérimentales et les courbes, les valeurs calculées à partir des paramètres du tableau 4.2.	70
Figure 5-1 : A) Électrode circulaire fabriquée en salle blanche; la bande en or dans le bas sert à assurer le contact électrique avec le potentiostat. B) Photo de cellules RGC-5 situées à la limite de l'électrode, le haut de la photo étant de l'or et le bas du verre. Barres de dimension : 150µm.	79
Figure A-1 : A) Attache d'un anticorps à l'aide d'une molécule d'OPSS-PEG-NHS. B) Attache à l'aide d'un agent réducteur venant briser les ponts disulfure (liens noirs).	94
Figure A-2 : Courbe de calibration lors de l'attache de PEG-SH sur une surface d'or.	95

Figure A-3 : Simulation du signal SPR attendu en fonction de la couverture de la surface d'or par une couche d'anticorps ayant une épaisseur de 15nm et un indice de réfraction effectif de 1,42.....	95
Figure A-4 : Comparaison des signaux obtenus lors de l'attache d'anticorps conjugués avec des molécules d'OPSS-PEG (en noir), d'anticorps réduits à l'aide de TCEP (en rouge) ou d'anticorps sans fonctionnalisation particulière (en bleu). Dans tous les cas, la concentration utilisée est de 10 μ g/ml.....	96
Figure A-5 : Courbes SPR obtenues lors de l'ajout de solutions de LDH à 5 μ g/ml (à la 12 ^e minute) sur une surface non fonctionnalisée (en bleu), une surface sur laquelle des anticorps réduits ont été préalablement attachés (en noir) et une surface couverte d'anticorps n'ayant pas subi de modifications (en rouge).....	97
Figure A-6 : Courbes correspondant à l'attache non spécifique de BSA sur une surface bloquée par des PEG-SH (en rouge) et sur une surface sans blocage (en noir).....	98
Figure A-7 : Courbes d'attache de LDH sur une surface fonctionnalisée avec des anti-LDH réduits (en noir) ou non modifiés (en rouge) ainsi qu'avec un blocage par des molécules de PEG-SH.....	99

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

A	Admittance
ATR	<i>Attenuated total reflection</i> (Réflexion totale atténuée)
BK7	Verre borosilicate
BM	Bleu de méthylène
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (albumine de sérum bovin)
c	Vitesse de la lumière dans le vide
C	Capacité
°C	Degrés Celsius
C _{cl}	Capacité associée à une couche de cellules
C _{DC}	Capacité double couche se formant à la surface d'une électrode
CA	Courant alternatif
CC	Courant continu
CCD	<i>Charged-coupled device</i>
CO ₂	Dioxyde de carbone
CPE	<i>Constant phase element</i> (Élément à phase constante)
d	Épaisseur de la double couche capacitive
<i>d_m</i>	Épaisseur de la couche métallique
Da	Dalton
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
e	Charge de l'électron
<i>e⁻</i>	Électron
Eau DI	Eau déionisée

EC-SPR	<i>Electrochemical surface plasmon resonance</i> (Électrochimie combinée à la résonance de plasmons de surface)
EIS	<i>Electrochemical impedance spectroscopy</i> (Spectroscopie d'impédance électrochimique)
EQM	Erreur quadratique moyenne
f	Fréquence
F	Farad
FBS	<i>Fetal bovine serum</i> (sérum de veau foetal)
i	Nombre imaginaire ($\sqrt{-1}$)
I	Courant circulant entre 2 électrodes; Intensité lumineuse
I_0	Amplitude du courant
j	Indice de numérotation
J	Densité de courant
k	Nombre d'onde
K_d	Constante d'équilibre
K_{off}	Constante de dissociation
K_{on}	Constante d'association
LDH	Lactate déshydrogénase
LOD	<i>Limit of detection</i> (Limite de détection)
M	Molaire
m	Coefficient de l'élément à phase constante
m_e	Masse de l'électron
n	Indice de réfraction; nombre de données
N	Concentration d'électrons libres dans un métal

OE	Onde évanescante
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i> (tampon de phosphate salin)
PEG (-SH)	Polyéthylène glycol (avec un groupement thiol)
PS	Plasmons de surface
R	Résistance
R_{cl}	Résistance associée à la couche de cellules
R_s	Résistance de la solution
R_{TC}	Résistance de transfert de charge sur une électrode
RIU	<i>Refractive index unit</i> (Unité d'indice de réfraction)
SAM	<i>Self-assembled monolayer</i> (Monocouche auto-assemblée)
SNR	<i>Signal to noise ratio</i> (Rapport signal sur bruit)
SPR	<i>Surface plasmon resonance</i> (Résonance plasmonique de surface)
t	Temps
TE	Polarisation transverse électrique
TM	Polarisation transverse magnétique
u. a.	Unités arbitraires
V	Potentiel entre 2 électrodes
V_0	Amplitude du potentiel
x	Mesure effectuée
Z	Impédance
α_i	Coefficients des contributions au signal EC-SPR
β	Constante de propagation
δ	Profondeur de pénétration d'un plasmon de surface
Δ	Variation d'un paramètre comme une concentration ou un indice de réfraction

ϵ_0	Permittivité du vide
$\epsilon_{m,d}$	Fonction diélectrique d'un milieu (m pour métal, d pour diélectrique)
ϵ_r	Permittivité relative d'un milieu (pour $\omega = 0$)
θ	Angle d'incidence d'une onde lumineuse
λ	Longueur d'onde
v	Fréquence de collision des électrons libres
σ	Écart-type
σ_q	Densité de charge surfacique
φ	Phase
ω	Fréquence angulaire d'une onde / fréquence angulaire du potentiel appliqué en EIS
ω_p	Fréquence plasma
Ω	Ohm

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE A – DÉTECTION DE MARQUEURS DU CANCER DE LA PROSTATE.....	91
Mise en contexte.....	91
Système expérimental et méthodologie.....	92
Méthodes de fonctionnalisation.....	93
Attache d'anticorps.....	94
Détection de l'antigène	96
Blocage de la surface	97
Perspectives	99

INTRODUCTION

Les biocapteurs sont des systèmes permettant de mesurer un changement physique, comme les propriétés optiques, électriques ou mécaniques d'un système, occasionné par un événement biologique, par exemple l'attache d'un analyte, et de traduire ce changement en une information pertinente sur le composé biologique étudié, comme sa concentration. Ils servent soit à la détection où à l'étude d'entités biologiques et sont utilisés dans de nombreux domaines dont la surveillance environnementale, l'industrie agroalimentaire, la recherche pharmaceutique ou encore les diagnostics médicaux [1].

L'utilisation des biocapteurs remonte déjà à plusieurs années. On n'a qu'à penser aux mineurs qui, pour se protéger de la présence de gaz nocifs ou explosifs, descendaient dans les mines de charbon accompagnés de canaris, ces derniers étant affectés par ces gaz bien avant que l'humain ne puisse détecter quoi que ce soit. Depuis, les technologies se sont raffinées et se basent généralement sur des méthodes optiques, électriques ou mécaniques. Un des plus grands succès dans ce domaine est sans contredit l'analyseur de glucose sanguin dont le développement commença en 1962 lorsque Clark utilisa une électrode mesurant des variations de potentiel électrochimique (changement physique) d'un échantillon contenant du glucose mis en contact avec une membrane recouverte de glucose oxydase, un enzyme transformant le glucose en acide gluconique (événement biologique) [2]. Le biocapteur permet de déterminer la concentration de glucose à l'aide des mesures fournies par l'électrode. Aujourd'hui, le même principe de fonctionnement s'applique aux capteurs utilisés par les personnes diabétiques qui peuvent obtenir une mesure précise du taux de glucose dans leur sang en quelques secondes tout en utilisant à peine une gouttelette de sang [3]. D'importantes avancées technologiques ont permis la miniaturisation, l'automatisation et la fiabilité des mesures, au point où la présence de gens qualifiés n'est plus requise pour prendre ces mesures, ce qui permet donc l'économie de ressources précieuses autant pour le système de santé que pour les patients.

Pour des raisons similaires, les systèmes basés sur la résonance de plasmons de surface, sensibles aux variations d'indice de réfraction d'un milieu diélectrique à l'interface d'une couche mince de métal, suscitent aussi énormément d'intérêt de la part des milieux scientifiques. Bien que la première observation des plasmons de surface date du début du vingtième siècle, le lien entre la réflexion totale atténuée (ATR) et l'excitation de plasmons de surface n'a été compris

qu'en 1968 suite aux travaux d'Otto, Kretschmann et Raether qui sont parvenus à reproduire le phénomène de résonance en utilisant différentes configurations [4]. Par la suite, Liedberg et al ont développé le premier capteur basé sur l'utilisation de la résonance de plasmons de surface (SPR) pour la détection de gaz [5]. Ces deux méthodes présentent des avantages similaires : elles sont très sensibles, rapides et faciles à utiliser, ne nécessitent aucun marquage (*label free*) tout en offrant un potentiel intéressant de miniaturisation. Elles permettent cependant l'observation de paramètres différents d'un échantillon donné, soit les caractéristiques électriques ou optiques.

Pour de nombreux chercheurs, une des voies d'avenir des biocapteurs réside dans l'augmentation de la quantité d'informations tirées d'un échantillon. Cela peut se faire en détectant la présence de nombreux analytes en parallèle, comme avec les systèmes d'analyse totale (*total analysis systems*), qui effectuent toutes les étapes de préparation de l'échantillon (dilution, filtration, transport, etc.) en plus de la détection [6].

Ce mémoire présente une approche alternative, basée sur la mesure simultanée d'un plus grand nombre de paramètres d'un même échantillon en combinant un système SPR avec un système électrochimique. Cette combinaison électro-optique peut se faire soit de manière passive, avec des détections en parallèle ou active, en mesurant l'impact du potentiel appliqué sur le signal SPR.

Le biocapteur développé est basé sur une méthode sensible et sélective présentant un potentiel de multiplexage attrayant. Son principe de fonctionnement repose sur l'application d'un potentiel électrique alternatif sur une électrode servant aussi de support pour des plasmons de surface. Ensuite, un amplificateur à détection synchrone (*lock-in amplifier*) permet de mesurer uniquement la composante du signal SPR oscillant à la même fréquence que le potentiel alternatif appliqué entre les électrodes du système électrochimique. Ces variations sont principalement dues à des changements dans la composition de la couche capacitive formée sur l'électrode ou dans la densité d'électrons dans la surface d'or. Une telle combinaison active de l'électrochimie et de la SPR permet de nombreux types d'analyses innovantes dont la comparaison du signal obtenu à diverses fréquences (spectroscopie SPR) ou encore l'utilisation d'un potentiel fixe superposé à un signal alternatif afin de favoriser certaines réactions électrochimiques d'oxydoréduction (voltamétrie cyclique). Toute modification de la surface de l'électrode ayant un impact sur les caractéristiques électriques de cette dernière influencera l'amplitude du signal SPR

alternatif. La technique proposée sonde optiquement les caractéristiques électriques d'une surface, plus précisément l'admittance de cette dernière. Cela ouvre la voie à des applications pour l'étude de modifications de la surface au niveau moléculaire, comme la formation de monocouches autoassemblées ou l'attache de molécules causant une variation des propriétés électriques de la surface. Son application à l'observation de monocouches cellulaires est aussi étudiée dans ce projet, afin de sonder optiquement les caractéristiques capacitives (corps des cellules) et résistives (jonctions intercellulaires) de cette dernière, surtout lors de la variation des conditions expérimentales ou de l'ajout de toxines ou de médicaments.

Pour des travaux futurs, l'application d'un potentiel électrique sur l'électrode de travail pourrait permettre d'utiliser la diélectrophorèse afin de faciliter la fonctionnalisation de l'électrode ou encore de réduire l'adsorption non-spécifique sur la surface de cette dernière en contrôlant l'attraction des diverses espèces chimiques par l'électrode. De plus, l'utilisation de molécules actives en oxydoréduction pourrait permettre des tests de détection très ciblés, comme lors de l'utilisation de *switch* optiques [7].

Le premier chapitre explore la théorie derrière le fonctionnement des biocapteurs basés sur la SPR et la spectroscopie d'impédance ainsi que l'effet de la combinaison des deux types de systèmes. Une revue de la littérature et des applications existantes de biocapteurs SPR, électrochimiques et électro-SPR (EC-SPR) est aussi incluse dans cette section.

Le deuxième chapitre présente les solutions retenues pour développer ce biocapteur hybride ainsi que la méthodologie choisie pour le tester expérimentalement, en s'appuyant sur les concepts développés dans la première section.

Le troisième chapitre est consacré à la caractérisation du biocapteur, de ses performances et de ses limites. Les résultats d'expériences simples comme la formation de monocouches autoassemblées (SAM) de molécules seront aussi présentés afin de valider les modèles et hypothèses proposés.

Le quatrième chapitre présente les résultats des expériences effectuées avec des cellules de photorécepteurs de la rétine et s'intéresse particulièrement à l'influence de divers paramètres expérimentaux sur les résultats obtenus. En général, la méthode employée est de provoquer le détachement de la monocouche de cellules de l'électrode de travail à l'aide d'une enzyme et de comparer les caractéristiques du système avant et après le détachement de cette dernière.

Dans le cinquième et dernier chapitre, une discussion sur la portée des résultats présentés est développée et des pistes de solution sont suggérées afin d'améliorer les performances du biocapteur hybride et de guider les prochains pas de son développement.

Finalement, une annexe relate les expériences effectuées en vue de détecter des marqueurs du cancer de la prostate à l'aide d'une couche d'anticorps spécifiques pour ces protéines attachés sur une surface d'or.

Objectifs de ce mémoire

L'objectif premier de ce projet de maîtrise est de concevoir un biocapteur combinant la plasmonique à l'électrochimie, et ce, de manière active. Plus précisément, les mesures SPR sont prises à la fréquence du potentiel électrique appliqué à l'électrode de travail afin de recueillir le signal SPR découlant de ce potentiel.

Par la suite, la caractérisation de ce biocapteur se doit d'être effectuée afin d'en évaluer les performances et caractéristiques. Pour ce faire, le comportement en fréquence ainsi que la variation de l'amplitude du signal SPR sont observés pour différentes conditions expérimentales impliquant différentes concentrations des espèces ioniques en solution ou la présence de molécules formant des monocouches sur la surface d'or du détecteur. Cette caractérisation a aussi pour but de valider la justesse du cadre théorique développé au premier chapitre de ce mémoire, notamment de la relation entre le signal électro-SPR mesuré et l'admittance électrique de l'électrode étudiée.

Finalement, l'utilisation efficace de ce biocapteur pour des tests *in vitro* doit être validée. Pour ce faire, l'effet du détachement d'une monocouche de cellules cultivées sur la surface d'or du détecteur déclenché par l'ajout de trypsine est mesuré par électro-SPR. Les conditions expérimentales (fréquence de travail, potentiel fixe appliqué, etc...) permettant de maximiser le contraste entre le signal mesuré avant et après le détachement des cellules doivent alors être déterminées.

CHAPITRE 1 THÉORIE & CONCEPTS

Le développement d'un biodétecteur multiparamétrique fait nécessairement appel à plusieurs principes physiques permettant de comprendre les phénomènes optiques et électriques en jeu. Ce chapitre présente donc les concepts théoriques nécessaires à une bonne compréhension de ce projet et de ce mémoire. Dans un premier temps, le principe général de biocapteur sera présenté et les principaux paramètres permettant d'en mesurer les performances seront définis. Ensuite, les principes physiques derrière le couplage des plasmons de surface avec une onde électromagnétique ainsi que les méthodes d'excitation de ces derniers seront présentés. Puis, les bases de la spectroscopie d'impédance, une branche de l'électrochimie, seront explicitées. Finalement, l'influence de la combinaison d'un capteur SPR avec un capteur d'impédance et les informations pouvant en être extraites seront explorées.

1.1 Biocapteur

Comme il a été mentionné dans l'introduction, les biocapteurs permettent de convertir des événements biologiques en signaux mesurables et interprétables. Le principe de fonctionnement de tout biocapteur peut être décomposé en trois étapes générales. Dans un premier temps, un événement biologique se produit et entraîne un changement des propriétés électriques, mécaniques, optiques ou autres du système étudié, appelé transduction. Lors de l'analyse du signal généré par l'étape de transduction, l'ampleur de la variation peut être corrélée à l'événement biologique étudié. Dans ce mémoire, divers événements biologiques seront étudiés, dont l'attache de molécules sur une surface d'or ainsi que le détachement de cellules d'une surface d'or.

Un système SPR seul permet de détecter des variations de l'indice de réfraction près d'une surface d'or (figure 1-1 A; sera décrit à la section 1.2) tandis qu'un système électrochimique est sensible aux propriétés électriques de l'électrode de travail (figure 1-1 B; sera décrit à la section 1.3). Lors de la combinaison des deux systèmes suivant la configuration proposée, ce sont les changements de l'indice de réfraction et de la densité de charges sur la surface d'or causés par l'application d'un signal électrique alternatif qui sont mesurés (figure 1-1 C; sera décrit à la section 1.4). La réponse à cette stimulation électrique est modulée par de nombreux paramètres, dont les propriétés électriques de la surface.

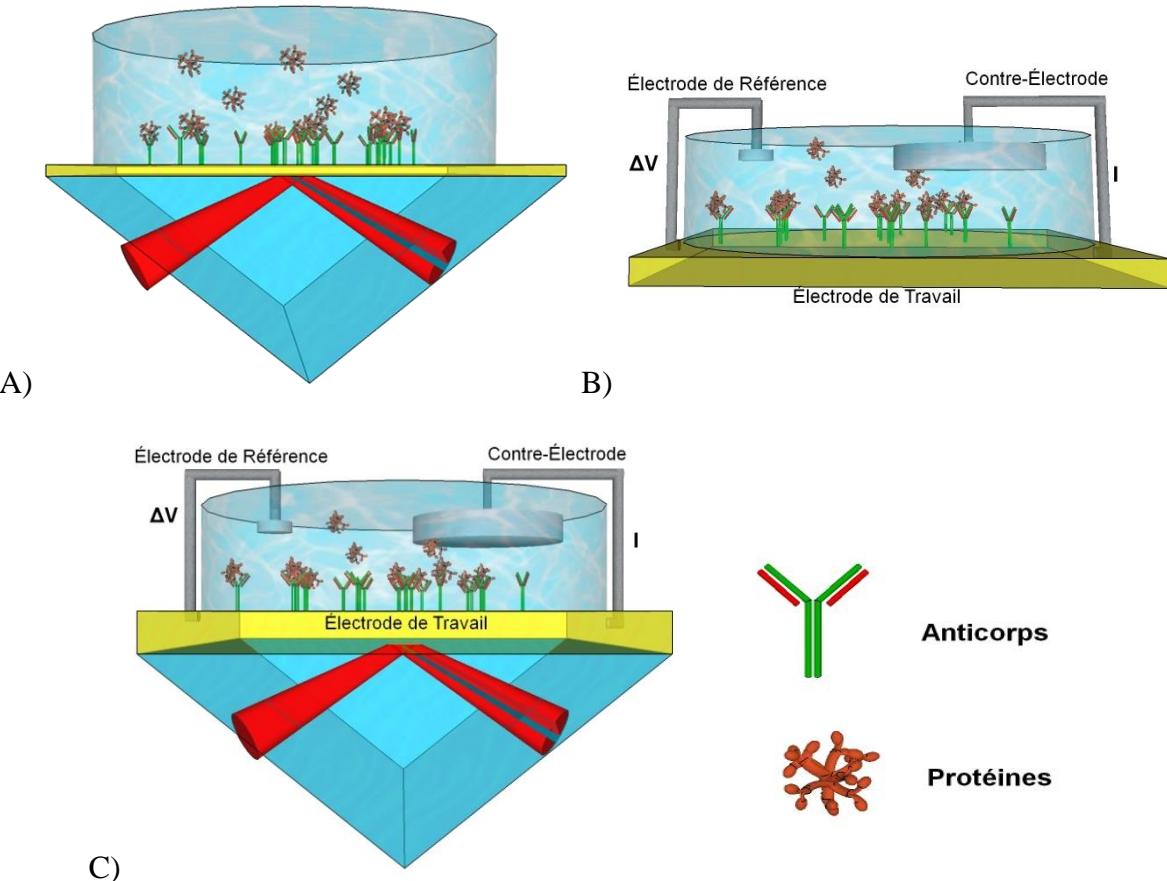


Figure 1-1 : Types de biocapteurs étudiés. A) Capteur plasmonique; B) Capteur électrochimique; C) Capteur électro-plasmonique (EC-SPR).

Les principaux paramètres dont il faut tenir compte en analysant les performances d'un biocapteur sont la sensibilité, la spécificité, la plage dynamique, le rapport signal sur bruit ainsi que la limite de détection (LOD) [8]. Pour décrire ces paramètres, l'exemple utilisé sera la mesure de la concentration d'une protéine X en solution avec un capteur SPR.

La sensibilité est définie comme le rapport entre le signal mesuré et la variation du paramètre physique correspondant. Dans le cas du capteur SPR, c'est le rapport entre la variation angulaire ou spectrale de la position du minimum du pic d'absorption plasmonique et le nombre de RIU (unités d'indice de réfraction) ou la concentration correspondant. Avec un détecteur dont la sensibilité est élevée, de plus petites variations de RIU entraînent de plus grandes variations de signal.

La spécificité est la capacité d'un biocapteur à fournir un signal dépendant uniquement du paramètre étudié, par exemple, la présence de la protéine X. Ainsi, un biocapteur dans lequel on

injecterait un mélange de protéines X et Y en solution serait spécifique si le signal fourni ne dépend que de la concentration de la protéine X et non de celle de la protéine Y. Dans les applications réalistes ou cliniques, les solutions sont rarement purifiées et contiennent en général de nombreuses protéines et composants biologiques dont la concentration peut parfois être bien plus élevée que celle de l'analyte étudié. La fonctionnalisation de la surface des biocapteurs devient rapidement incontournable et pose un défi majeur dans le développement de nouveaux biodétecteurs. De nombreuses avenues sont étudiées, dont l'utilisation de couches autoassemblées, d'anticorps hautement sélectifs, ou encore d'oligonucléotides [9]. D'importants efforts de recherche sont aussi investis afin de limiter l'absorption non-spécifique [10].

L'intervalle à l'intérieur duquel la variation de signal peut être correctement corrélée à l'événement biologique étudié est dénommé la plage dynamique. Elle s'étend généralement de la limite de détection au plus grand changement pouvant être détecté avant la saturation du capteur. La zone sur laquelle le signal varie linéairement avec le changement biologique étudié est aussi fréquemment utilisée comme plage dynamique. Le développement d'un biocapteur pouvant être précis sur plusieurs ordres de grandeur du paramètre à détecter (par exemple pouvant différencier des concentrations de l'ordre des nM et des μM) est un autre défi accaparant de nombreux chercheurs.

Le rapport signal sur bruit (SNR) est le ratio entre la variation du signal et le bruit de fond de ce signal. Mathématiquement, il est défini comme : $SNR = \left| \frac{\bar{x}_f - \bar{x}_i}{\bar{\sigma}} \right|$, où \bar{x} représente les signaux moyens avant et après le changement biologique étudié et $\bar{\sigma}$ est la moyenne des écarts-types des mesures respectives. C'est une indication largement utilisée de la clarté et de la qualité d'une mesure. Dans le cas du SPR, les signaux mesurés sont la position du minimum angulaire ou spectral ou encore l'intensité du signal. Les sources de bruit sont principalement l'instabilité du système en température, les vibrations mécaniques, les fluctuations d'intensité de la source lumineuse ainsi que les limites de détection dues au bruit électronique du photodétecteur.

La limite de détection représente le plus petit changement qu'il est possible de mesurer avec une certaine précision. Généralement, cela équivaut au changement physique induit (changement d'indice de réfraction ou concentration d'analyte injecté) divisé par le SNR

correspondant puis multiplié par un facteur, généralement 2 ou 3 afin d'augmenter la confiance de la mesure et réduire l'impact du bruit. On obtient donc l'expression $LOD = 3 * \Delta n * \bar{\sigma} / \Delta \bar{x}$.

1.2 Biocapteur plasmonique

1.2.1 Plasmons de surface

Un plasmon de surface (PS) est l'oscillation du nuage électronique d'un métal à l'interface entre ce dernier et un milieu diélectrique [11]. Sous certaines conditions, une onde électromagnétique peut se coupler avec un PS et engendrer le phénomène de résonance de plasmons de surface. En prenant comme support plasmonique un guide d'onde plan composé d'un milieu métallique semi-infini juxtaposé à un milieu diélectrique semi-infini (figure 1-2) ayant des permittivités complexes s'exprimant comme $\varepsilon_j = \varepsilon'_j + i\varepsilon''_j$ (l'indice j représente le milieu; m pour le métal et d pour le diélectrique) et en utilisant les lois de Maxwell, les constantes de propagation des PS peuvent être retrouvées. Ces constantes de propagation décrivent la propagation d'une onde guidée par l'interface et liée à celle-ci qui décroît de manière exponentielle perpendiculairement à cette interface. Seuls les modes ayant une polarisation TM (transverse magnétique ou polarisation p) peuvent mener à des modes liés; les conditions associées aux modes TE (transverse électrique ou polarisation s) ne pouvant être remplies, ils ne peuvent générer de modes liés [4]. La valeur propre associée aux modes TM est définie selon la constante de propagation des plasmons de surface, β_{PS} , qui définit le vecteur d'onde du PS :

$$\beta_{PS} = k \sqrt{\frac{\varepsilon_d \varepsilon_m}{\varepsilon_d + \varepsilon_m}} \quad (1.1)$$

Où k est le nombre d'onde ($k = 2\pi/\lambda = \omega/c$, avec λ , la longueur d'onde, ω , la fréquence angulaire et c , la vitesse de la lumière dans le vide).

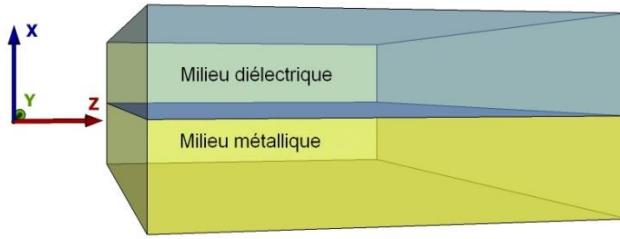


Figure 1-2: Guide d'onde semi-infini avec une interface métal/diélectrique. Les plasmons de surface se propagent sur l'interface en direction de l'axe z et ils décroissent dans chaque milieu selon l'axe x.

En supposant que les matériaux sont sans pertes ($\epsilon_d'' = \epsilon_m'' = 0$, les parties imaginaires des permittivités sont nulles), que les permittivités sont de signes opposés et que la condition 1.2 sur les parties réelles des permittivités est satisfaite, la relation 1.1 définit les constantes de propagation des modes liés supportés par le guide d'onde [4].

$$\epsilon_m' < -\epsilon_d' \quad (1.2)$$

Puisque la permittivité des milieux diélectriques est normalement positive, ϵ_m' doit être négative avec un module supérieur à ϵ_d' pour que β_{PS} puisse avoir une valeur réelle et que le plasmon puisse transporter de l'énergie. Il est aussi important de noter qu'en réalité les matériaux métalliques occasionnent toujours des pertes ($\epsilon_m'' \neq 0$), ce qui introduit une composante imaginaire d'atténuation β_{PS}'' à la constante de propagation β_{PS} et limite la distance de propagation des PS. Cette longueur caractéristique est définie comme la distance nécessaire dans la direction de propagation pour que l'énergie du plasmon de surface ait diminué d'un facteur $1/e$ et vaut $L = 1/2\beta_{PS}''$. Pour des longueurs d'onde du visible, cette distance est généralement de l'ordre de quelques microns. Si la composante imaginaire de la permittivité du métal reste petite par rapport à la composante réelle, des modes liés peuvent tout de même exister et la composante réelle de la constante de propagation β_{PS}' est décrite par l'équation 1.1, en prenant les valeurs réelles des permittivités.

Selon le modèle de l'électron libre, la permittivité relative d'un métal est donnée par l'équation 1.3. Il s'ensuit que la fréquence doit être plus petite que la fréquence plasma, une caractéristique intrinsèque de chaque métal (équation 1.4), pour que la partie réelle de la

permittivité soit négative. Certains métaux comme l'or, l'argent ou l'aluminium remplissent cette condition pour des fréquences situées dans le visible ou le proche infrarouge et peuvent donc supporter des plasmons de surface à ces fréquences [12]. Dans ces équations, ε_0 est la permittivité du vide, ω est la fréquence, ω_p est la fréquence plasma, ν est la fréquence des collisions, N est la concentration d'électrons libres dans le métal, e est la charge de l'électron et m_e , sa masse.

$$\varepsilon_m = \left(1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + i\omega\nu}\right) \quad (1.3)$$

$$\omega_p = \sqrt{\frac{Ne^2}{\varepsilon_0 m_e}} \quad (1.4)$$

L'autre longueur caractéristique des PS est la profondeur de pénétration $\delta_{m,d}$ dans chacun des milieux perpendiculaire à l'interface sur laquelle ils se propagent. Cette propagation est caractérisée par une décroissance exponentielle. Pour une couche métallique d'or déposée sur un diélectrique d'indice de réfraction $n_d = 1.32$, la profondeur de pénétration du plasmon de surface augmente avec la longueur d'onde et varie de 100 à 600 nm pour une plage de longueurs d'onde allant de 600 à 1000 nm [1]. Les plasmons de surface sont sensibles à tout changement d'indice de réfraction dans le milieu diélectrique ($\dot{\varepsilon}_d = n_d^2$) dans la couche d'une épaisseur δ_d adjacente à l'interface métal/diélectrique, car cela vient modifier les conditions de couplage entre une onde électromagnétique incidente et le PS.

1.2.2 Excitation des plasmons de surface

La section précédente explorait les conditions nécessaires à l'existence des plasmons de surface. Par contre, certaines conditions doivent être remplies afin d'assurer le couplage entre une onde incidente et les modes plasmoniques de surface. Afin qu'un transfert d'énergie soit possible, il faut utiliser une onde électromagnétique suivant une polarisation TM dont la composante du vecteur d'onde parallèle à l'interface métal/diélectrique soit égale au vecteur d'onde du plasmon de surface, β_{PS} [4].

Une onde lumineuse se propageant dans un milieu d'indice n avec un angle θ par rapport à une surface métallique d'épaisseur finie déposée sur un matériau diélectrique est représentée sur la figure 1-3A). L'onde incidente est réfléchie par la surface métallique et possède une composante évanescante (OE) se propageant à l'intérieur du milieu métallique. C'est cette onde évanescante qui peut donner lieu à un couplage entre cette dernière et un plasmon de surface, si la composante tangentielle de sa constante de propagation (k_z , partie gauche de l'équation 1.5) est égale à la constante de propagation du plasmon, β_{PS} (partie droite de l'équation 1.5). Pour une épaisseur optimale de la couche métallique (dimension nanométrique), le transfert d'énergie peut être complet, résultant en une réflectivité nulle pour les conditions de couplage. Il est important de noter que cette égalité ne peut être vraie si le milieu diélectrique dans lequel le plasmon décroît et le milieu incident sont les mêmes. Le plasmon de surface se propage donc sur la face de la couche métallique opposée au milieu incident.

$$\beta_{OE} = k_z = \frac{\omega_{OE}}{c} n \sin \theta = \operatorname{Re}\{\beta_{PS}\} = \frac{\omega_{PS}}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_d \epsilon_m}{\epsilon_d + \epsilon_m}} = \frac{\omega_{PS}}{c} n_{PS}^{\text{eff}} \quad (1.5)$$

Si le milieu incident est de l'air ($n=1$), comme schématisé sur la figure 1-3 A, cette relation ne peut être satisfaite, car les relations de dispersion de l'onde incidente (équation 1.6) et du plasmon de surface (équation 1.7) ne se croisent en aucun point (voir figure 1-3 B) puisque le terme sous la racine carrée (n_{PS}^{eff}) est toujours plus grand que 1, ϵ_d et ϵ_m ayant des signes opposés.

$$\omega_{oe} = \frac{ck_z}{n \sin \theta} \quad (1.6)$$

$$\omega_{PS} = \frac{c \operatorname{Re}(\beta_{PS})}{n_{PS}^{\text{eff}}} \quad (1.7)$$

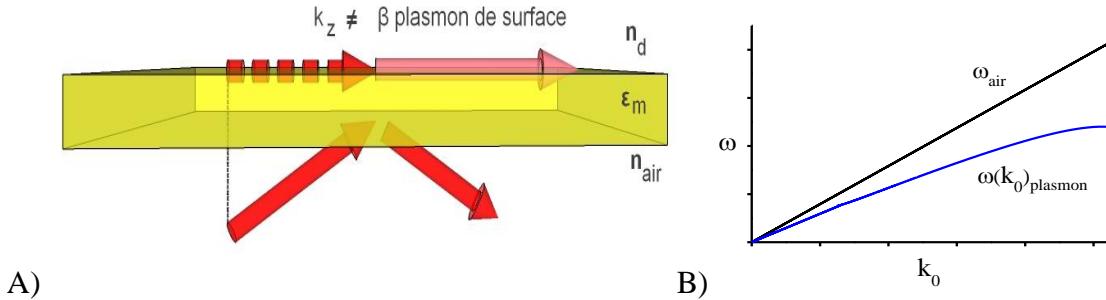


Figure 1-3 : A) Lorsqu'un faisceau lumineux est incident dans l'air, il ne peut y avoir de couplage avec les plasmons de surface. **B)** Les relations de dispersion de l'onde incidente et du plasmon de surface ne se croisent en aucun point (angle d'incidence de 72°).

Afin d'exciter les PS, il faut augmenter la valeur du vecteur d'onde de la lumière incidente. La méthode la plus courante est d'utiliser un prisme en verre ayant un indice de réfraction n_p élevé, selon la configuration Kretschmann (voir figure 1-4 A). Cela permet de diminuer la pente de la relation de dispersion de la composante parallèle de l'onde incidente afin qu'elle puisse intercepter la relation de dispersion du plasmon de surface (figure 1-4 B). Ce point d'interception, correspondant aux conditions d'excitation du plasmon de surface menant au phénomène de résonance de plasmons de surface, est défini par l'équation 1.8. D'autres méthodes existent pour permettre le couplage entre l'onde incidente et le PS comme l'utilisation d'un réseau de diffraction ou d'un guide d'onde, mais ne seront pas explorées dans ce mémoire.

$$n_p \sin(\theta) = \sqrt{\frac{\epsilon_d \epsilon_m}{\epsilon_d + \epsilon_m}} \quad (1.8)$$

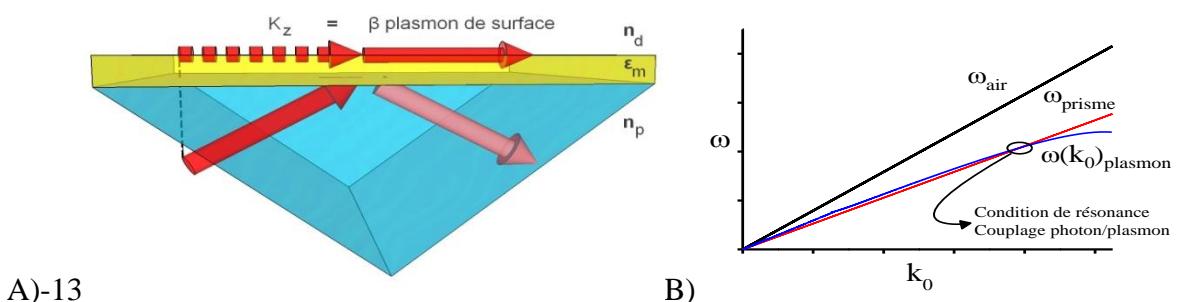


Figure 1-4 : A) Lorsque l'onde est incidente dans un prisme d'indice $n_p=1,5$ (configuration Kretschmann), il peut y avoir couplage avec un plasmon de surface. **B)** Relations de dispersion correspondant à ce montage (angle incident de 72°); l'intersection entre les 2 courbes définit les conditions de couplage.

1.2.3 Montages expérimentaux

Les conditions de résonance entre l'onde incidente et le plasmon de surface dépendent de l'angle incident de l'onde électromagnétique ainsi que de sa longueur d'onde, mais aussi de l'indice de réfraction du milieu diélectrique dans une couche mince adjacente à la surface métallique. La lumière incidente dans le prisme est réfléchie par réflexion totale interne, sauf près de la condition de résonance, où son énergie est transmise au plasmon de surface, ce qui engendre un creux dans le spectre de réflexion (angulaire ou spectral) pour lequel le coefficient de réflexion devient presque nul, communément appelé pic plasmonique. Lorsque l'analyte à détecter s'approche de la surface métallique, il provoque un changement dans l'indice de réfraction du milieu adjacent à la surface sur laquelle se propagent les PS, ce qui modifie les conditions de couplage entre le PS et l'onde incidente. Ainsi, le pic SPR va se déplacer, ce qui peut être mesuré par diverses techniques dont certaines sont décrites plus bas (figure 1-5).

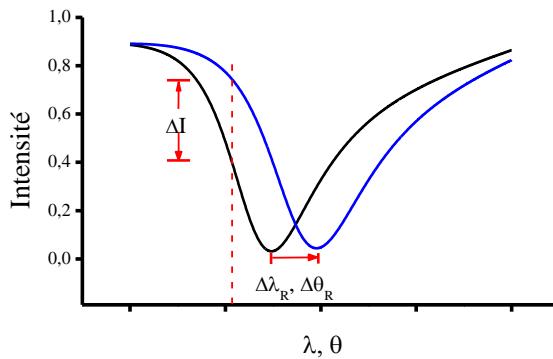


Figure 1-5 : Déplacement du pic plasmonique lors d'une variation de l'indice de réfraction de l'eau de 0,02 RIU (pour un prisme d'indice $n_p=1,5$ et un angle d'incidence de 72°). En plus de la variation de la position du minimum angulaire ou spectral, une variation de l'intensité réfléchie peut être mesurée si l'angle et la longueur d'onde sont fixés.

La méthode la plus simple d'interrogation est de mesurer l'intensité de lumière réfléchie par l'interface or/prisme en utilisant un faisceau lumineux collimaté provenant d'une source monochromatique (angle d'incidence et longueur d'onde fixes). En effet, lorsque le pic plasmonique se déplace suite à un changement de l'indice de réfraction, l'intensité du signal varie, comme le montre la figure 1-5.

Les deux autres méthodes les plus répandues d'interrogation du signal SPR ont pour but de suivre la position du minimum du pic plasmonique. Dans un premier cas, une source

monochromatique est utilisée et un balayage angulaire est effectué afin de retrouver la courbe du pic SPR, comme le montre la figure 1-6. Ce balayage peut être effectué en utilisant une lentille focalisant le faisceau lumineux sur la surface d'or, provoquant un cône de lumière permettant de prendre des mesures simultanées sur une plage angulaire de quelques degrés. Ensuite, le cône réfléchi est recueilli par une caméra et la position du pic SPR sera caractérisée par une diminution marquée de l'intensité lumineuse pour une plage angulaire très étroite, pouvant presque atteindre 0% lorsque les conditions expérimentales sont optimales. La position précise de ce minimum est calculée et collectée en temps réel par un logiciel. Dans les nombreux algorithmes permettant d'estimer la position du minimum, les régressions polynomiales permettent d'obtenir une très bonne précision tout en restant assez simples à implémenter.

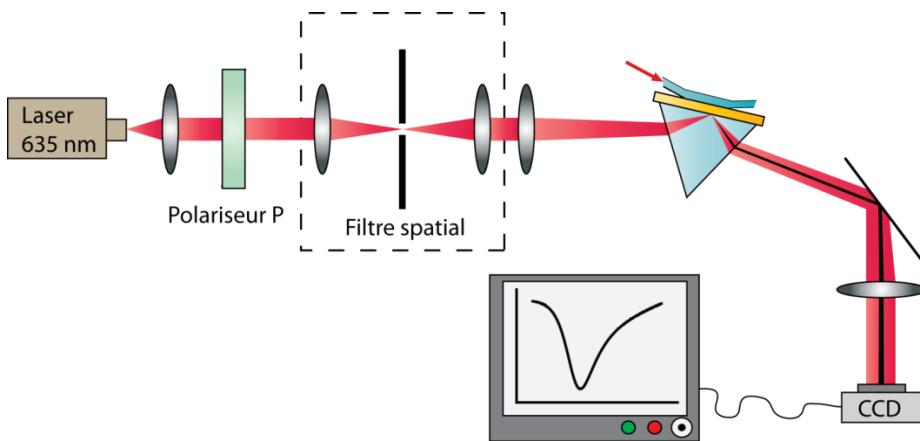


Figure 1-6: Montage expérimental d'un système SPR angulaire.

Dans l'autre cas, une source de lumière blanche est utilisée à un angle fixe et c'est la position spectrale du minimum du pic plasmon qui est suivie par le système. Un spectromètre est alors nécessaire afin de diviser le faisceau lumineux en ses différentes longueurs d'onde. Un algorithme similaire à celui utilisé par les systèmes angulaires permet de retrouver la position du minimum spectral. Un avantage de cette méthode est de ne pas avoir à focaliser le faisceau lumineux sur l'échantillon, ce qui permet de recueillir un signal provenant d'une plus grande surface, contribuant à diminuer le niveau de bruit, l'influence de défauts ponctuels sur la surface, ainsi que la densité d'énergie déposée sur cette dernière.

La méthode mesurant l'intensité est la moins précise, car une fluctuation de l'intensité de la source affecte directement la mesure. Cependant, dans un système spectroscopique (angulaire ou spectral), la mesure de position du pic plasmonique n'est pas corrélée aux fluctuations

d'intensité de la source [13]. Chaque pixel du détecteur est donc affecté également, provoquant un déplacement vertical de la courbe SPR venant peu influencer la position du pic SPR.

1.2.4 Applications à la biodétection

Depuis une trentaine d'année, la SPR a suscité un intérêt grandissant dans les milieux scientifiques, principalement grâce à son potentiel pour le développement de biodéTECTEURS simples, rapides et très sensibles ne nécessitant pas de marqueurs biologiques. De nombreuses applications ont été envisagées pour la détection d'un large éventail d'analytes allant de gaz jusqu'à de plus grosses molécules (toxines, protéines, oligonucléotides) ou encore de bactéries [1]. Cependant, ce n'est que récemment que la technique a commencé à être utilisée pour des applications impliquant des cellules; le principal obstacle à cette avancée étant la faible distance de pénétration du plasmon de surface dans le milieu de détection par rapport à la taille des cellules étudiées. Puisque le gap entre la membrane de cellules adhérant sur la surface d'or et cette dernière se situe généralement entre 20 et 200 nm, la SPR ainsi que la spectroscopie d'impédance représentent des techniques prometteuses pour l'étude des phénomènes ayant lieu entre les cellules et la surface ou impliquant les membranes cellulaires ainsi que les nombreuses molécules s'y rattachant [14]. Cela implique notamment l'adhésion, la migration et le détachement des cellules d'une surface.

De plus, il convient de noter qu'une cellule est un milieu hétérogène dont l'indice de réfraction est plus élevé que celui du milieu dans lequel elle baigne. Elle est principalement composée du cytosol, une solution complexe d'électrolytes et de protéines, dont l'indice de réfraction est d'environ 1,38, de membranes lipidiques ayant un indice de réfraction nettement plus élevé valant approximativement 1,48 et du noyau dont l'indice de réfraction peut être estimé à 1,39 [15, 16]. Vu la différence entre l'indice de réfraction des cellules et de leur milieu extracellulaire, il est normal qu'une variation du taux de couverture de la surface par les cellules ait un impact marqué sur le signal SPR.

En utilisant un système SPR en configuration *Kretschmann* avec une source lumineuse collimatée dirigée vers une surface d'or sur laquelle des cellules ont été cultivées, le comportement de ces dernières face à divers stimulus peut être étudié en mesurant l'intensité du faisceau réfléchi ou la position du pic plasmonique. Ainsi, la variation du volume occupé par les cellules près de la surface d'or suite à un choc osmotique, soit une augmentation ou une

diminution soudaine de la concentration en sels du milieu extracellulaire, a pu être corrélée à une fluctuation significative de l'intensité lumineuse réfléchie par la surface d'or [17]. De manière similaire, le changement de conformation des cellules suite à l'ajout de certaines toxines peut être mesuré par SPR car la couverture de la surface par les cellules peut varier considérablement, généralement à la baisse [18]. Ainsi, un détecteur SPR pourrait servir à estimer la cytotoxicité associée à diverses toxines en suivant le taux de couverture de la surface par les cellules en temps réel et en se basant sur un signal quantifiable.

De plus, Yanase et al. ont démontré qu'en plus de la surface occupée par les cellules, la réorganisation des structures internes des cellules (phosphorylation de protéines membranaires, migration de ces protéines au sein de la cellule ou encore une variation de paramètres internes comme le pH ou la température) peut aussi induire d'importantes fluctuations du signal SPR [19], pouvant étendre le champ d'application de ces détecteurs.

Une autre méthode plasmonique d'observation de cellules consiste à utiliser un système d'imagerie comprenant un objectif de microscope et une caméra afin d'obtenir une image dans laquelle l'intensité lumineuse de chaque pixel correspond au signal SPR en un point de l'échantillon mesuré. Avec cette technique, il est possible de cartographier la distance de contact de la membrane cellulaire, car le profil d'indice de réfraction correspondant à chaque pixel et le signal SPR qui en découle dépendent fortement de cette distance [20]. Cependant, la résolution obtenue est limitée par la distance de propagation des plasmons dans le métal et aussi par l'ouverture numérique de l'objectif utilisé.

1.3 Biocapteur électrochimique

L'électrochimie étudie la transition entre le courant électronique (circulant dans des fils métalliques) et le courant ionique (mouvement d'ions en solution) ainsi que les phénomènes se rattachant à cette transition, notamment les réactions d'oxydoréduction. Les applications de l'électrochimie ainsi que les techniques expérimentales associées sont très variées et s'étendent de la fabrication industrielle de métaux à haute pureté par électrodéposition à la biodétection au niveau moléculaire. Une technique populaire de cette discipline, la spectroscopie d'impédance, a été utilisée durant ce projet et est brièvement présentée dans cette section, en plus de quelques principes et considérations de base en électrochimie.

1.3.1 Considérations générales

L'électrochimie s'intéresse principalement à la relation existant entre le courant circulant dans une cellule électrochimique et la différence de potentiel aux bornes de cette dernière. Deux familles de techniques expérimentales existent : celles dites galvanostatiques, pour lesquelles un courant est imposé entre les électrodes du système et la différence de potentiel en découlant est mesurée ainsi que celles dites potentiostatiques, pour lesquelles un potentiel est appliqué et le courant résultant est mesuré. Les techniques utilisées durant ce projet sont de type potentiostatique. Ainsi, un potentiostat a été utilisé afin d'appliquer avec précision la différence de potentiel désirée entre deux électrodes plongées en solution. En plus de permettre une grande liberté sur les paramètres du potentiel appliqué (type d'onde, fréquence, amplitude, etc...), cet appareil sert aussi à mesurer le courant circulant entre les électrodes.

La transition entre le courant ionique et électronique a lieu de deux façons : par un courant capacitif dans l'électrode de travail qui agit comme un condensateur (section 1.3.2) ou au moyen de réactions chimiques d'oxydoréduction sur la surface des électrodes. La réaction d'oxydation (perte d'électrons, réaction 1.9) a lieu sur l'anode tandis que la réaction de réduction (gain d'électrons, réaction 1.10) a lieu sur la cathode. Le symbole I représente un ion en solution. Les réactions ayant lieu dans une cellule électrochimique donnée dépendent des conditions expérimentales comme (ions en présence, type de solvant, potentiel appliqué, pH, etc...), car chaque réaction a un potentiel qui lui est propre. Selon ces conditions, différents ions peuvent se trouver impliqués dans les réactions et l'ion H_3O^+ joue souvent un rôle important [21].



Une importante caractéristique des électrodes utilisées en électrochimie est leur polarisabilité, un indicateur de l'effet du courant sur le potentiel de l'électrode. Ainsi, le potentiel d'une électrode idéalement non polarisable ou réversible variera très peu lorsqu'un courant circulera dans l'électrode, ce qui correspond à une faible résistance électrique. Au contraire, si la résistance de l'électrode est élevée, le potentiel sera très affecté lorsqu'un courant y circulera, l'électrode est alors fortement polarisable. Ces considérations sont de première importance afin de choisir judicieusement des électrodes afin de s'adapter à différents types de mesures.

Lorsqu'une électrode est plongée dans un solvant, il se crée un équilibre électrostatique à l'interface entre l'électrode et les ions en solution, afin de s'adapter au potentiel existant entre les deux milieux. Cela confère un caractère capacitif à l'électrode, qui s'ajoute à la résistance due à la polarisabilité de cette dernière. Puisque les deux phénomènes ont lieu en parallèle, l'électrode peut être schématisée par le circuit équivalent, aussi appelé circuit de Randles, affiché sur la figure 1-7 A, où R_s est la résistance de la solution, R_{TC} , la résistance de transfert de charge à travers l'interface solution/métal sur l'électrode et C_{DC} , la capacité de la double couche se formant sur la surface de l'électrode. Pour procéder à une mesure sur une électrode afin de la caractériser, il faut obligatoirement utiliser une deuxième électrode, dont les propriétés viendront nécessairement influencer la mesure initiale. Afin de mieux représenter la réalité, ce circuit équivalent doit être dédoublé afin de contenir deux interfaces électrode/solution.

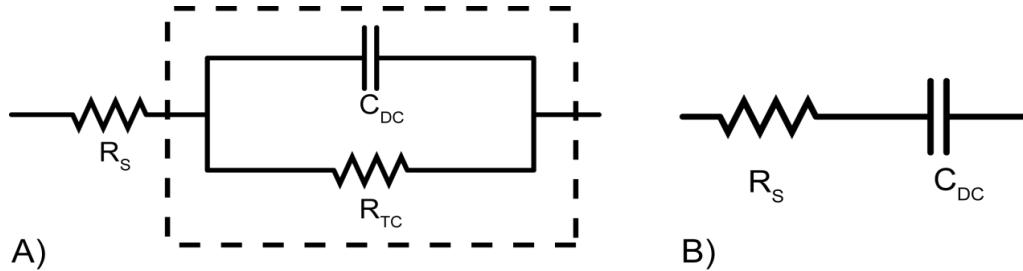


Figure 1-7 : A) Circuit équivalent de Randles d'une électrode (dans l'encadré) en solution. **B)** En l'absence de couple redox, la branche résistive peut être négligée ($R_{TC} = \text{infini}$).

Pour une électrode suivant le modèle présenté sur la figure 1-7, le courant mesuré peut être de nature capacitive ou résistive selon la branche du circuit ayant la plus faible impédance (C_{DC} ou R_{TC}). L'ajout d'un couple de molécules actives en oxydoréduction comme le ferri/ferrocyanide permet de diminuer beaucoup la résistance de transfert de charge. Les électrons formant le courant qui circule dans R_{TC} le font par le biais de réactions d'oxydoréduction à la surface des électrodes (réactions 1.9 et 1.10) [22]. En l'absence de ces molécules, la résistance de transfert de charge R_{TC} devient très grande et peut être considérée comme infinie [23]. Le comportement capacitif de l'électrode domine alors et le nouveau circuit équivalent étudié est présenté sur la figure 1.7 B.

Afin d'obtenir les meilleures mesures possible en électrochimie, un système à 3 électrodes est couramment utilisé, comme schématisé sur la figure 1-8. Dans un tel montage, un potentiel est appliqué entre une électrode de référence (ou électrode auxiliaire) et l'électrode de travail (celle

qui est étudiée). Le courant résultant est mesuré entre l'électrode de travail et la contre-électrode. Afin que ces mesures soient précises, quelques conditions doivent être respectées. Premièrement, l'électrode de référence doit être réversible et le courant la traversant doit être pratiquement nul, ce qui minimise la différence de potentiel aux bornes de cette dernière. De cette façon, son potentiel peut être considéré comme étant constant tout au long de l'expérience, peu importe le courant circulant entre l'électrode de travail et la contre-électrode et toute variation de potentiel durant l'expérience peut alors être attribuée à l'électrode de travail. Finalement, l'utilisation d'une contre-électrode non polarisable et ayant la plus grande surface possible permet de minimiser son impédance et de concentrer la variation de potentiel sur l'électrode de travail.

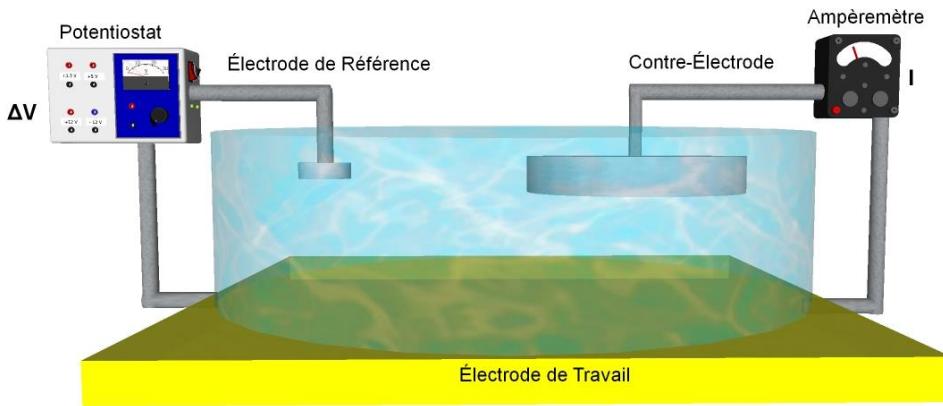


Figure 1-8: Système de mesure électrochimique à 3 électrodes; l'électrode de référence contrôle le potentiel et la contre-électrode mesure le courant.

Finalement, même si le courant circulant dans l'électrode de référence est nul, le potentiel entre cette dernière et l'électrode de travail ne peut être associé complètement à la variation de potentiel de l'électrode de travail. En effet, la résistance de la solution cause une baisse de potentiel dont il faut tenir compte.

1.3.2 Capacité double couche

La formation d'une double couche capacitive sur la surface des électrodes a une grande influence en électrochimie et est exploitée dans plusieurs applications, la plus notable étant le développement de batteries et de condensateurs électrolytiques [24]. Cette couche mobile est formée d'un mélange d'ions entourés de molécules de solvant (de l'eau dans le cas général) qui viennent équilibrer la charge résiduelle des électrons présents à la surface métallique de l'électrode. Puisque les ions doivent traverser la double couche afin qu'il y ait un transfert

d'électrons possible avec l'électrode, ses caractéristiques ont une influence directe sur les mesures de courant obtenues. Il est important de préciser que l'équilibre des charges doit être préservé dans l'ensemble du système.

La capacité d'un condensateur par unité de surface est donnée par l'équation 1.11, où C est la capacité, ϵ_r , la permittivité relative d'un milieu (à une fréquence nulle), ϵ_0 , la permittivité du vide et d est l'épaisseur de la double couche [24]. Puisque la capacité est inversement proportionnelle à l'épaisseur de la double couche, l'ajout d'une couche de molécules ou protéines adsorbées sur l'électrode peut modifier considérablement la capacité de l'électrode. Normalement, l'épaisseur de la double couche se situe entre 1 et 2 nm. De plus, la permittivité relative de l'eau dans la double couche, qui vaut environ 6 selon les ions en solution et leur concentration, n'est pas la même que celle de l'eau dans la solution (≈ 78) car le type ainsi que l'arrangement des molécules diffère [25].

$$C = \frac{\epsilon_r \epsilon_0}{d} \quad (1.11)$$

Les ions ne se comportent pas tous de la même manière en solution, d'où l'influence du type de solution sur la capacité double couche. En effet, les anions (ions négatifs) ont tendance à ne pas être entourés d'un grand nombre de molécules d'eau, ils se trouvent donc souvent à entrer en contact direct avec la surface de l'électrode, ce qui favorise des réactions chimiques plus spécifiques. Au contraire, les cations (ions positifs) ont tendance à être fortement hydratés et une couche de molécules d'eau tendra à se former entre ces derniers et la surface de l'électrode. Leur interaction avec la surface est donc surtout due aux forces électrostatiques en jeu. La surface de l'électrode est aussi fortement hydratée, dû à la présence de charges surfaciques dans le métal. Comme énoncé plus haut, la composition de la double couche dépend du potentiel appliqué. Ainsi, si le potentiel de l'électrode est positif, la double couche aura tendance à être composée principalement d'anions tandis que pour un potentiel négatif, elle aura tendance à être composée de cations (figure 1-9). Puisque les caractéristiques de la double couche dépendent de nombreux facteurs (espèces ioniques, potentiel, chimie de surface...), il est clair que le modèle décrit par l'équation 1.11 n'est pas complet et que des raffinements s'imposeraient [26]. Cependant, ces modèles dépassent la portée de ce mémoire et l'équation présentée fournit tout de même une bonne première approximation.

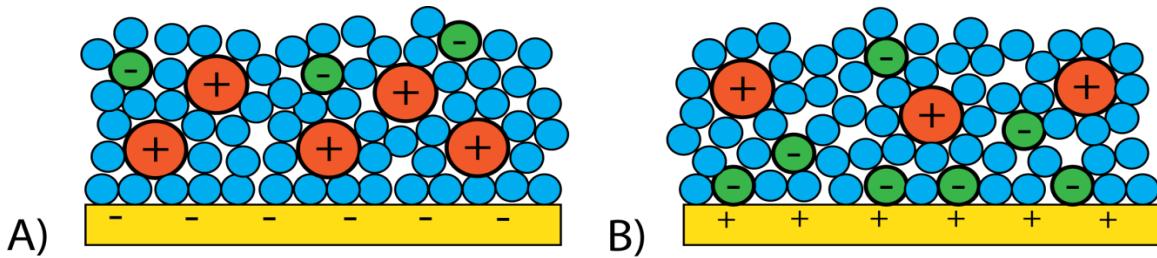


Figure 1-9 : Formation de la double couche capacitive lorsque le potentiel appliqué est : A) négatif et B) positif.

1.3.3 Spectroscopie d'impédance

La spectroscopie d'impédance (souvent dénotée EIS) est une technique permettant de retrouver l'impédance d'un système électrochimique en appliquant de faibles perturbations sinusoïdales au voltage et en mesurant le courant qui en résulte, et ce, pour plusieurs fréquences. Cette analyse est particulièrement utile pour étudier séparément différents phénomènes ayant lieu sur l'électrode, mais ayant des constantes de temps différentes, comme des réactions d'oxydoréduction sur l'électrode versus le courant de charge de la double couche. L'impédance, dénotée Z , est définie comme étant le rapport entre les perturbations de voltage appliquées et le courant mesuré, comme le montre l'équation 1.12 [27]. L'admittance est l'inverse de l'impédance et est désignée par la variable A .

$$Z = \frac{V(t)}{I(t)} = \frac{V_0 \sin(\omega t)}{I_0 \sin(\omega t + \varphi)} = \frac{1}{A} \quad (1.12)$$

Ces mesures sont effectuées à l'aide d'un potentiostat permettant d'appliquer un potentiel alternatif de module V_0 à une fréquence ω et de mesurer un courant à la même fréquence ayant un module I_0 et un déphasage φ . Ce dernier est jumelé à une cellule électrochimique comprenant 3 électrodes, comme décrit dans la section 1.3.1 afin d'obtenir des mesures qui soient les plus justes possible. L'impédance peut alors être calculée pour différentes fréquences appliquées. Un système à 3 électrodes est nécessaire, surtout si un potentiel constant est ajouté aux perturbations appliquées. Ces perturbations doivent être de faible amplitude afin de minimiser leur impact sur le système et d'assurer une réponse en courant linéaire. De plus, les conditions expérimentales du système étudié (comme la température) doivent être stables durant l'expérience afin que le courant mesuré ne soit dû qu'aux variations de potentiel appliquées. Les expériences peuvent être

effectuées en balayant une plage de fréquences pour caractériser plusieurs paramètres de l'électrode ou en observant une fréquence fixée dans le temps afin d'étudier un phénomène particulier comme l'attache d'un analyte sur l'électrode. Le choix de cette fréquence influencera le comportement du circuit. Par exemple, il est possible de la choisir afin d'isoler le caractère capacitif de l'électrode.

Cette dernière relation est une forme généralisée de la loi d'Ohm représentée par une fonction généralement complexe (sauf dans le cas d'un circuit purement résistif, où elle revient à la loi d'Ohm) comprenant une dépendance en fréquence. L'impédance s'exprime donc comme $Z = Z' + iZ''$, où Z' est sa composante réelle et Z'' , sa composante imaginaire. Graphiquement, l'impédance est souvent représentée à l'aide d'un diagramme de *Bode*, où son module (en Ohm, avec une échelle logarithmique) ainsi que sa phase (en degrés) sont affichés en fonction de la fréquence sur une échelle logarithmique, comme sur la figure 1-10. D'autres représentations des données sont couramment utilisées en EIS mais ne seront pas explorées dans ce travail.

En spectroscopie d'impédance, les mesures expérimentales permettent d'estimer les valeurs des composants du circuit de Randles équivalent au système étudié (figure 1.7). Il est ensuite possible de calculer l'impédance théorique du circuit en fonction de la fréquence en suivant les lois de Kirchhoff et de comparer ce résultat aux valeurs expérimentales mesurées afin de valider le circuit proposé et d'évaluer la valeur de ses composants. L'impédance d'une résistance est simplement R , le module de la résistance, tandis que celle d'un condensateur est $Z_C = 1/(i\omega C)$, où C est le module de la capacité.

Cependant, expérimentalement, et principalement lorsque les mesures sont effectuées sur une plage de fréquences étendue, une dispersion de la capacitance en fonction de la fréquence est observée et la valeur observée de la capacité double couche dépend de la fréquence de travail [28]. Ce phénomène peut être causé par plusieurs facteurs dont l'hétérogénéité de la surface de l'électrode utilisé ou par l'adsorption de molécules à la surface de l'électrode [29]. Afin de tenir compte de ce phénomène et pour approximer l'impédance de manière plus exacte, la capacité double couche peut parfois être remplacée par un élément de phase constante (CPE) dont l'impédance est donnée par $Z_{CPE} = 1/C(i\omega)^m$ [23]. Dans cette équation, m a une valeur comprise entre 0 (résistance pure) et 1 (condensateur parfait), généralement comprise entre 0,9 et 1.

Par exemple, pour le circuit RC de base d'une électrode en solution (figure 1.7 A), l'expression de l'impédance est donnée par l'équation 1.13, ce qui correspond graphiquement aux courbes de la figure 1-10 A pour une résistance de la solution de 100Ω , une résistance de transfert de charge de $5k\Omega$ et une capacité double couche de $1\mu F$. À basse fréquence, un plateau ayant une impédance valant $R_s + R_{TC}$ est observable et à haute fréquence, un plateau correspondant à la résistance de la solution est présent. La décroissance de l'impédance entre ces deux plateaux est contrôlée par la présence de la capacité double couche, comme en témoigne le déphasage présent aux fréquences correspondantes.

$$Z = R_s + \frac{R_{TC}}{1 + i\omega C_{DC} R_{TC}} \quad (1.13)$$

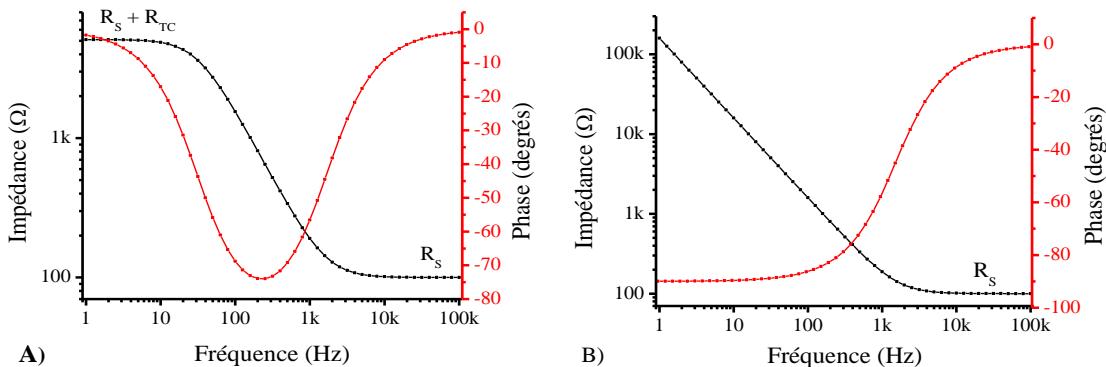


Figure 1-10 : Diagramme de Bode de l'impédance pour : A) une électrode comprenant une capacité et une résistance de transfert de charge et B) une électrode pour laquelle le transfert de charge est négligé. Les paramètres utilisés sont : $R_s = 100\Omega$, $R_{TC} = 5k\Omega$ et $C_{DC} = 1\mu F$.

Lorsque la résistance de transfert de charge peut être négligée ($R_{TC} = \text{infini}$), en l'absence de couple d'oxydoréduction, l'impédance du système est résumée par l'équation 1.14 et sa valeur en fonction de la fréquence est schématisée sur la figure 1-10 B. On peut remarquer que plus la résistance de transfert de charge est élevée, plus le comportement de l'électrode est capacitif sur une grande plage de fréquences. À haute fréquence, l'impédance est dominée par la résistance de la solution et un caractère résistif domine (phase de $\sim 0^\circ$).

$$Z = R_s + \frac{1}{i\omega C_{DC}} \quad (1.14)$$

Lors de la fonctionnalisation de la surface d'or, le circuit équivalent de cette dernière peut être modifié de diverses manières, à commencer par les valeurs des paramètres R_{TC} et C_{DC} . Comme première approximation, il est possible de modéliser toute molécule s'attachant à la surface de l'électrode comme l'ajout d'une capacité en série avec la capacité double couche de l'électrode ou comme une résistance en série avec la résistance de transfert de charge lors de la présence d'un couple redox, comme schématisé sur la figure 1-11 [23]. La solution utilisée ainsi que sa concentration en ions (ou force ionique) a un impact sur la résistance de la solution R_s . Cette dernière doit être minimisée afin que les mesures d'impédance reflètent les propriétés de la surface de l'électrode et non celles de la solution.

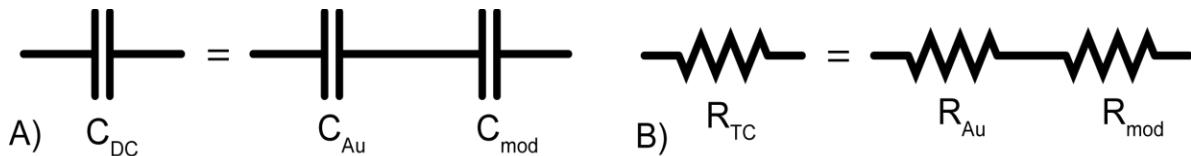


Figure 1-11 : Modifications possibles du circuit équivalent de base. A) Ajout d'une capacité en série avec la capacité de l'électrode d'or. B) En présence d'un couple de molécules redox, toute modification peut être vue comme l'ajout d'une résistance en série avec la résistance de transfert de charge.

1.3.4 Spectroscopie d'impédance en biodétection

Les biocapteurs basés sur la spectroscopie d'impédance présentent sensiblement les mêmes avantages que ceux basés sur la SPR (simplicité, rapidité, absence de marqueurs, etc...) et puisque la disponibilité et le coût des instruments nécessaires se sont beaucoup améliorés dans les dernières décennies, cette technique suscite beaucoup d'intérêt chez les chercheurs. Pour ces raisons, la EIS a été utilisée dans de nombreuses applications en biodétection, comme l'hybridation de brins d'ADN ou d'ARN complémentaires, la détection de protéines à l'aide d'anticorps ou encore l'étude de la formation de monocouches auto-assemblées [22]. Vu la polyvalence de la méthode, les possibilités expérimentales sont très vastes et il est possible de modifier de nombreux paramètres afin de cibler l'analyse d'un phénomène particulier. Par exemple, il est possible d'appliquer des perturbations autour d'un potentiel fixe entre les électrodes afin de cibler une réaction chimique particulière, d'explorer différentes géométries pour les électrodes ou encore d'utiliser différentes fréquences d'analyse afin de cibler l'effet mesuré [30].

Une des applications un peu plus marginale, mais tout de même assez répandue de l'EIS consiste à suivre dans le temps les propriétés électriques d'une monocouche de cellules ayant été cultivées sur une surface d'or servant d'électrode de travail. Une méthode basée sur ce principe et nommée ECIS (*Electric Cell-substrate Impedance Sensing*) a été commercialisée et brevetée [31]. L'EIS est tout indiquée pour l'étude des cellules, car c'est une technique non invasive très précise, polyvalente et dont les résultats peuvent assez facilement être corrélés à certaines caractéristiques d'une culture cellulaire. La présence de cellules ou la prolifération de ces dernières sur une électrode en or vient modifier ses caractéristiques électriques, qui sont mesurées dans le temps. Dans ces expériences, la taille de l'électrode de travail est plus petite que celle de la contre électrode d'environ deux ordres de grandeur afin d'amplifier les variations d'impédance causées par la présence des cellules, qui seraient diluées si une électrode de travail trop étendue était utilisée [14]. De plus, l'amplitude des perturbations appliquées au potentiel doit être petite afin de ne pas affecter les cellules.

La circulation d'un courant à travers une monocouche de cellules se fait de deux manières : soit en passant entre les cellules par les jonctions intercellulaires (voie paracellulaire) ou directement à travers les cellules (voie transcellulaire) [14]. Le choix de la fréquence de travail revêt alors une importance particulière, car les jonctions cellulaires démontrent un caractère résistif [32] tandis qu'un courant alternatif de fréquence assez élevée peut traverser les cellules de manière capacitive (l'impédance associée à la voie transcellulaire étant inversement proportionnelle à la fréquence). La présence de cellules sur l'électrode affecte normalement les caractéristiques de cette dernière sur une plage de fréquences s'étendant de 10 Hz à 100 kHz. Il est généralement admis que pour des fréquences plus faibles que 10 kHz, le courant circule majoritairement entre les cellules, tandis que pour des fréquences supérieures à 10 kHz, la voie transcellulaire est privilégiée, comme le schématisé la figure 1-12. Pour ces raisons, une couche de cellules est généralement représentée par un condensateur (voie transcellulaire) et une résistance (voie paracellulaire) placés en parallèle puis en série avec la résistance de la solution et la capacité de l'électrode (en l'absence de couple redox), comme illustré sur la figure 1-13 [33]. L'impédance de cette couche de cellules est donnée par l'équation 1.15, où le premier terme représente la capacité double couche de l'électrode, approximée par un élément à phase constante, le deuxième terme, la couche de cellules et le troisième, la résistance de la solution. Il est aussi important de noter que ce modèle n'est valide que lorsque les cellules étudiées ont

atteint la confluence. De plus, il ne peut être utilisé que pour interpréter les caractéristiques macroscopiques de la couche de cellules étudiées, moyennées pour un grand nombre de cellules, sur une électrode étendue et non les caractéristiques de quelques cellules ayant crues sur une microélectrode.

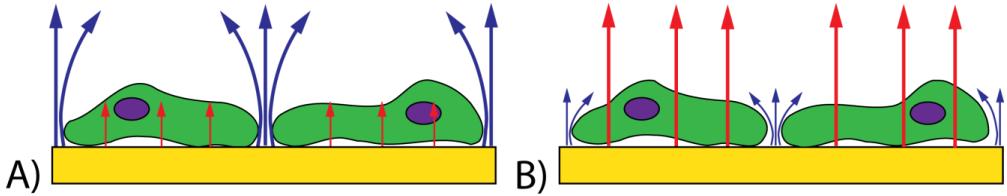


Figure 1-12 : Prédominance de la voie : A) paracellulaire à basse fréquence ou b) transcellulaire à haute fréquence.

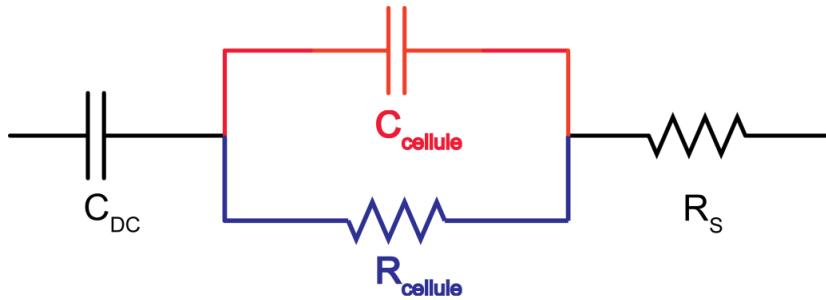


Figure 1-13 : Circuit équivalent à une monocouche de cellules.

$$Z_{cells} = \frac{1}{(i\omega)^m C_{DC}} + \frac{R_{cl}}{1 + i\omega C_{cl} R_{cl}} + R_s \quad (1.15)$$

La première application de la spectroscopie d'impédance sur des cellules a permis d'étudier les micromouvements de l'ordre du nanomètre de ces dernières sur une électrode, un comportement cellulaire témoignant de la santé de ces dernières [34]. Les dynamiques d'attachement de cellules et de formation de leur matrice extracellulaire sur une surface d'or en fonction de la fonctionnalisation de cette dernière ont aussi été étudiées en détail à l'aide de la spectroscopie d'impédance [35]. La méthode étant très polyvalente, de nombreuses autres applications ont été envisagées comme l'étude de la migration cellulaire suite à une rupture dans la monocouche (due à un choc électrique) ou l'étude du comportement des cellules suite à divers stimuli [14].

1.4 Électrochimie-SPR

En effectuant des mesures SPR sur une surface d'or faisant office d'électrode de travail et sur laquelle un potentiel est appliqué, il est possible d'observer certains phénomènes avec une approche différente de ce que permet la SPR ou l'électrochimie seule et qui est souvent désignée sous le nom d'électrochimie SPR (ou EC-SPR). Ces phénomènes incluent les réactions d'oxydoréduction puisque les produits et les réactifs d'une réaction ont des indices de réfraction différents, le chargement et le déchargement de la double couche capacitive ou encore la variation de l'épaisseur d'une monocouche de molécules ou de cellules due aux forces électrostatiques en jeu.

1.4.1 Relation entre électrochimie et signal SPR

Lorsqu'une variation de potentiel V est appliquée sur l'électrode de travail, le signal SPR mesuré (Δx , où x peut représenter l'intensité ou la position du minimum angulaire ou spectral) provient de plusieurs contributions comme le décrit l'équation 1.16, où les coefficients α_1 , α_2 et α_3 sont des constantes déterminant l'importance relative de chaque contribution.

$$\frac{\Delta x}{\Delta V} = \alpha_1 \frac{\Delta n}{\Delta V} + \alpha_2 \frac{\Delta d}{\Delta V} + \alpha_3 \frac{\Delta \sigma_q}{\Delta V} \quad (1.16)$$

Dans cette équation, Δn représente un changement d'indice de réfraction souvent causé par une réaction chimique, Δd , un changement de l'épaisseur de la couche moléculaire à la surface de l'électrode dû à l'adsorption, la désorption ou la réorganisation de molécules sur la surface où à cause d'un effet de type piézo-électrique et $\Delta \sigma_q$, une variation de la densité de charges surfaciques sur l'électrode [36]. Le premier et le deuxième terme sont reliés, car un changement de potentiel peut modifier la composition chimique de la double couche sur l'électrode (figure 1-9), ce qui peut avoir des répercussions autant sur l'épaisseur de cette dernière que sur son indice de réfraction. Normalement, l'épaisseur d'une monocouche de molécules ne variera pas beaucoup selon le potentiel appliqué (à moins qu'il y ait adsorption, désorption ou une réaction chimique). L'état électronique des molécules vient aussi modifier l'indice de réfraction effectif de ces dernières; cette contribution est plus marquée lors de

l'observation de réaction d'oxydoréduction ayant lieu à certains potentiels particuliers comme avec le bleu de méthylène, qui réagit à un potentiel de -275 mV.

Pour le raisonnement qui suit, les deux premiers termes de l'équation 1.16 seront négligés. Lorsqu'un potentiel est appliqué sur l'électrode de travail, la formation de la double couche capacitive modifie la concentration de charges dans la couche mince métallique, ce qui a une incidence sur les conditions de couplage des plasmons de surface et est quantifiée par le troisième terme de l'équation 1.16. En négligeant le terme d'amortissement ($i\omega\nu$) de la fonction diélectrique du métal (équation 1.3) et en supposant une variation de la concentration d'électrons dans le métal ΔN , la variation de la fonction diélectrique induite par les perturbations du potentiel est donnée par :

$$\frac{\Delta \varepsilon_m'}{\varepsilon_m - 1} = \frac{\Delta N}{N} \quad (1.17)$$

Cette variation de densité d'électrons peut être reliée à une concentration de charges surfaciques $\Delta \sigma_q$ en multipliant par la valeur de la charge de l'électron et l'épaisseur d_m de la couche métallique ($\Delta \sigma_q = -ed_m \Delta N$). Pour ce faire, il faut supposer que cette variation est uniforme dans tout le métal, même si elle n'a lieu qu'en surface. Il est ensuite possible de retrouver la relation entre la variation de densité de charges surfaciques et la variation de la permittivité du métal :

$$\Delta \sigma_q = -\frac{ed_m N}{\varepsilon_m - 1} \Delta \varepsilon_m' \quad (1.18)$$

Il est clair que cette variation modifiera les conditions de couplage des plasmons de surface (équation 1.5). Foley et al ont dérivé analytiquement la relation entre la variation angulaire du pic plasmonique et le potentiel appliqué, qui est linéaire pour de faibles perturbations, ce qui revient à déterminer l'expression du coefficient α_3 dans l'équation 1.16 [37]. Il serait possible de retrouver cette dépendance pour la position spectrale du pic ou pour le signal SPR en intensité.

Lorsqu'un potentiel alternatif de fréquence ω et d'amplitude V_0 est appliqué, la densité de charge surfacique (équation 1.19) est modulée à la même fréquence, avec une amplitude σ_{q0} et un

déphasage φ . La densité de courant surfacique J correspond à la dérivée temporelle de la densité surfacique de charge et est donnée par l'équation 1.20.

$$\sigma_q = \sigma_{q0} e^{-i\omega t + i\varphi} \quad (1.19)$$

$$J = \frac{d\sigma_q}{dt} = -i\omega \sigma_{q0} e^{-i\omega t + i\varphi} = -i\omega \sigma_q \quad (1.20)$$

En combinant l'équation 1.20 à l'équation 1.16, dans laquelle les deux premiers termes sont négligés, et puisque l'admittance correspond au courant divisé par le potentiel, il est possible de relier directement l'admittance du système électrochimique à l'amplitude de la composante alternative du signal SPR mesuré, comme le montre l'équation 1.21 [38]. Dans cette équation, la constante plus générale α a été introduite, à des fins de simplification.

$$A_c(\omega) = -\frac{i\omega \Delta x(\omega)}{\alpha_3 \Delta V} = \frac{i\omega \Delta x(\omega)}{\alpha} \quad (1.21)$$

Cependant, puisqu'en l'absence de couple redox, le signal SPR Δx provient d'une variation de la densité de charges due à la capacité double couche, c'est uniquement l'admittance de la branche capacitive du circuit de Randles (figure 1.7 B) qui doit être considérée [39]. Pour ce circuit, cette admittance est donnée par l'expression 1.22, similaire à l'équation 1.13. Cette situation est un cas idéal; en réalité, la capacité est souvent mieux approximée par un élément à phase constante. La présence de cellules ou d'une monocouche de molécules sur la surface peuvent aussi modifier le circuit équivalent ainsi que l'expression de l'admittance qui en découle.

$$A_c = \frac{i\omega C_{DC}}{1 + i\omega C_{DC} R_s} \quad (1.22)$$

En utilisant cette dernière expression, il est possible de réécrire l'expression 1.21 :

$$\Delta x(\omega) = \alpha \frac{C_{DC}}{1 + i\omega C_{DC} R_s} \quad (1.23)$$

Le signal EC-SPR attendu en fonction de la fréquence est représenté graphiquement sur la figure 1-14 par un diagramme de *Bode*, et ce, pour une capacité idéale ainsi que pour un élément à phase constante ($m = 0,98$). Ces courbes affichent des comportements très similaires à ceux observés expérimentalement, comme il sera présenté dans les prochains chapitres.

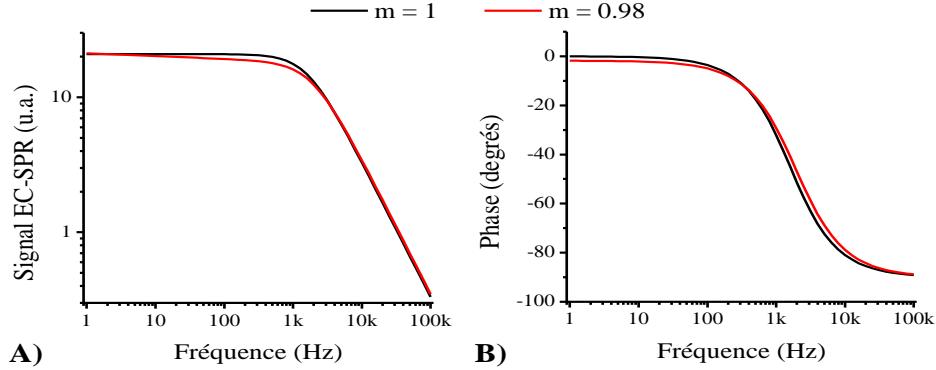


Figure 1-14 : Module (A) et phase (B) du signal EC-SPR théorique lorsque la résistance de transfert de charge est négligée avec une capacité idéale ($m=1$, courbes noires) ou un élément à phase constante ($m=0.98$, courbes rouges). Pour les calculs, $C_{DC} = 1\mu F$ et $R_S = 100\Omega$.

De plus, puisque le troisième terme de l'équation 1.16 représente un comportement capacitif (une quantité de charges divisée par une variation de potentiel), il est inversement proportionnel à d , l'épaisseur de la double couche capacitive. Cette épaisseur peut varier selon les molécules attachées ou adsorbées sur l'électrode de travail. Si les deux premières contributions au signal EC-SPR sont faibles, il est possible d'exprimer la réponse du système à l'aide de l'équation 1.24 [40]. Dans leurs travaux, Wang et ses collaborateurs ont validé cette équation faisant le lien entre l'épaisseur de la double couche capacitive et la réponse EC-SPR obtenue en fonctionnalisant des électrodes d'or avec des monocouches d'alkanethiols de différentes longueurs.

$$\frac{\Delta x}{\Delta V} = cste + \frac{\alpha_3}{d} \quad (1.24)$$

Il est important de noter que d'autres phénomènes peuvent induire une variation du signal SPR lors de l'application d'un potentiel, dont une variation de température ou des changements structurels dans la couche d'or de l'électrode. Cependant, vu la faible amplitude des potentiels utilisés dans ce projet, ces effets seront négligés.

1.4.2 Applications à la biodétection

Comme mentionné dans l'introduction, une des voies empruntée dans le développement des biocapteurs est la multiplication des paramètres mesurés sur un même échantillon, en combinant diverses techniques de biodétection. Cela ouvre d'énormes possibilités et de nouveaux

concepts de détecteurs multiparamétriques voient ainsi le jour régulièrement [41, 42]. La combinaison de l'électrochimie à la résonance de plasmons de surface (EC-SPR) peut s'effectuer de diverses manières, vu la polyvalence respective des deux méthodes.

Dans un premier cas, il est possible de juxtaposer de manière passive les deux méthodes de mesure, ce qui permet de caractériser en parallèle les propriétés électriques de l'électrode ainsi que tout changement de l'indice de réfraction près de sa surface. La première application de cette approche remonte à 1993 lors de l'étude de la formation de couches lipidiques directement sur une surface d'or et de l'affinité entre des toxines liées au choléra et leurs récepteurs situés dans ces couches de lipides [43]. Par la suite, l'utilisation de peignes d'électrodes interdigitées servant à la fois d'électrodes pour l'EIS et de supports pour les plasmons de surface pour des applications biologiques a été démontrée par notre groupe de recherche [44]. Dans ce système, la diffraction du faisceau de lumière blanche incident causée par les électrodes interdigitées a pu être exploitée, car le pic SPR est aussi présent dans les ordres de diffraction. Finalement, un système combinant la SPR et la spectroscopie d'impédance a fourni une solution non invasive, précise et ayant une bonne résolution temporelle pour l'observation de l'adhésion de cellules sur une surface d'or et de la formation de jonctions intercellulaires [45]. Dans cette étude, les mesures SPR se sont avérées être complémentaires avec celles d'impédance afin de caractériser les différentes étapes de la formation d'une monocouche de cellules directement sur l'électrode de travail.

L'autre approche consiste à combiner la SPR et l'électrochimie de manière active, en mesurant l'influence de la tension appliquée à l'électrode sur les mesures SPR, ce qui peut être effectué de plusieurs façons dans une variété intéressante d'applications. Les premières applications rapportées utilisaient la voltamétrie cyclique, soit un balayage du potentiel appliqué autour du potentiel spécifique à une réaction chimique, afin d'étudier des réactions d'oxydoréduction, comme celle de la protéine cytochrome C, se produisant sur les électrodes à l'aide du signal SPR résultant [46]. Lors de l'étude de réactions d'oxydoréduction, le signal SPR provient principalement du transfert d'électrons sur l'électrode dû à la réaction chimique, aussi dénommé courant faradique, et de la différence d'indice de réfraction entre la molécule oxydée et réduite. Le signal SPR correspond alors à la convolution du courant faradique circulant dans l'électrode et peut remplacer la mesure de courant normalement effectuée avec un potentiostat, ce qui peut simplifier significativement le montage expérimental [47]. Parmi les applications

possibles de l'EC-SPR, il faut noter l'étude des spectres d'absorption de molécules à l'aide de l'effet Stark, soit l'influence d'un potentiel appliqué sur le spectre d'absorption d'une molécule [36], ou encore la détermination des caractéristiques de monocouches de molécules (épaisseur, propriétés diélectriques) selon l'état chimique de ces molécules [48].

L'essor de l'imagerie SPR suscite de l'intérêt en EC-SPR pour l'étude de réactions chimiques inhomogènes sur l'électrode de travail [49] ou encore pour cartographier l'impédance ou la capacitance reliée à la double couche sur l'électrode [37]. Ces mesures peuvent être d'une grande précision, car c'est la densité de courant locale qui est mesurée et non le courant total circulant dans l'électrode. La résolution est alors déterminée par les caractéristiques du système d'imagerie utilisé. NJ Tao et son équipe [38] ont utilisé cette technique pour étudier différents processus sur des cellules uniques comme l'apoptose ou l'électroporation en imageant l'impédance sur la surface de l'électrode d'or avec une haute résolution. Pour ce faire, une tension alternative de faible amplitude à une fréquence constante est appliquée sur l'électrode de travail et la densité de courant de chaque point de cette dernière est mesurée dans le temps. La composante de la densité de courant évoluant à la même fréquence est ensuite déterminée lors du traitement des données. Finalement, l'usage de nanostructures plasmoniques comme des nanoparticules, des nanofils ou des nanotrous pour des applications d'EC-SPR est de plus en plus populaire, grâce à la simplicité du montage expérimental nécessaire et à la possibilité accrue de miniaturisation [42].

CHAPITRE 2 DESIGN ET MÉTHODOLOGIE PROPOSÉS

Dans ce chapitre, le système proposé sera décrit et les raisons justifiant le choix des paramètres utilisés seront expliquées, en se basant sur la littérature ainsi que différents tests de calibration. Le système hybride combinant la plasmonique à la spectroscopie d'impédance est présenté, de même que le type d'expériences qui ont été conduites afin de valider ses performances.

Une approche active a été retenue, en combinaison avec d'autres modules comme un microscope ainsi qu'un système SPR spectral standard, permettant de sonder un plus grand nombre de paramètres en parallèle et de valider les résultats obtenus par EC-SPR. Les applications pour ce système qui sont explorées dans ce mémoire concernent principalement la caractérisation de monocouches de molécules ou de cellules et seront présentées dans les prochains chapitres.

Les avantages d'un système hybride sont de pouvoir sonder un plus grand nombre de paramètres simultanément (SPR, EIS et EC-SPR). De plus, en utilisant le potentiel appliqué de manière active, il est possible de contrôler divers phénomènes se produisant sur l'électrode de travail comme des réactions d'oxydoréduction ou la formation et la composition de la double couche capacitive. Finalement, un avantage non négligeable de ces techniques lors de l'observation de cellules par rapport aux méthodes usuelles (qui impliquent généralement l'analyse d'images prises par microscope) est qu'elles fournissent directement des données numériques avec une bonne résolution temporelle. Il est souvent plus facile et rapide d'en tirer des informations comme le taux de couverture de la surface par les cellules.

2.1 Comparaisons entre le système proposé et la littérature

Le premier biocapteur hybride développé par notre groupe de recherche consistait en un système passif utilisant une source supercontinuum de lumière blanche et dont les électrodes de travail étaient des peignes interdigités [44]. Puisque ces peignes formaient un réseau de diffraction dont le pas avait été optimisé pour le support des plasmons de surface, les ordres de diffraction peuvent être utilisés autant que la réflexion spéculaire pour effectuer des mesures SPR. Dans ce cas-ci, les mesures électrochimiques sont effectuées parallèlement aux mesures

SPR spectrale et l'influence d'un système sur l'autre se veut minimale. Ce biocapteur a été utilisé pour la détection de brins complémentaires ou non-complémentaires d'oligonucléotides.

Le groupe de recherche du professeur N. J. Tao, à l'université d'Arizona a été l'un des précurseurs dans le domaine de l'électrochimie-SPR, notamment avec l'étude de réactions redox à l'aide de la SPR [46]. Ils ont ensuite développé la théorie reliant l'oscillation locale du signal SPR découlant de l'application d'un potentiel alternatif à l'électrode de travail à l'impédance de cette électrode et proposé une méthode permettant d'imager cette impédance sur une surface d'or [37]. Cette méthode consiste à utiliser une source de lumière monochromatique polarisée en p et focalisée sur la surface d'or à l'aide d'un objectif ayant une grande ouverture numérique. La lumière réfléchie sur la surface d'or est ensuite captée par une caméra CCD. Plusieurs images sont acquises pour chaque cycle du courant alternatif. Ce dernier est appliqué à l'électrode de travail par un potentiostat jumelé à un système utilisant trois électrodes. La variation de l'intensité lumineuse de chaque pixel est reliée à l'impédance locale suite au traitement numérique des images acquises. Un tel système a d'ailleurs été utilisé pour imager des cellules uniques durant des expériences d'apoptose et d'électroporation [38].

Un autre projet effectué dans le laboratoire du professeur Tao consiste à remplacer le système d'imagerie précédemment développé par un simple photodétecteur relié à un amplificateur à détection synchrone (*lock-in*) [39]. Ce système permet de mesurer l'amplitude ainsi que la phase de l'admittance moyenne sur toute la surface de l'électrode sondée par le faisceau lumineux. La mesure moyennée provenant du photodétecteur fournit un signal SPR en intensité. Le système électrochimique utilisé pour générer un potentiel alternatif est le même que précédemment. Ce système a été utilisé pour l'étude de la cinétique d'attache de différentes molécules sur la surface d'or étudiée en suivant la variation des signaux SPR et EC-SPR suivant l'ajout de molécules ayant des affinités diverses avec l'électrode.

Le système EC-SPR proposé dans ce mémoire et détaillé dans la sous-section qui suit, consiste en un système SPR utilisant une source monochromatique, basé sur une détection en intensité et dont le photodétecteur est jumelé à un *lock-in*. Le peigne d'électrodes interdigitées a été remplacé par une simple électrode de travail plane, jumelée à deux électrodes en solution (contre-électrode et référence), ce qui permet une stabilité et une précision accrues des mesures. Le signal alternatif imposé entre les électrodes est contrôlé par un potentiostat, dont le rôle est

aussi de recueillir des mesures de spectroscopie d'impédance. Un des principal avantage d'un système utilisant un *lock-in* au lieu d'un système d'imagerie, outre la simplicité du montage expérimental, est qu'il analyse la composante du signal à la fréquence voulue, et ce, en temps réel. Il est donc possible de faire varier la fréquence de travail durant une expérience et les données n'ont pas à être traitées ultérieurement pour retrouver le signal correspondant à la fréquence désirée. De plus, la quantité de données à stocker est petite, si on la compare à un système d'imagerie, avec lequel il faudrait enregistrer au moins dix images par cycle de courant appliqué, ce qui donne environ mille images par seconde si la fréquence de travail est de 100 Hz. Cela mène à une quantité énorme de données, surtout pour des expériences dont la durée peut s'étirer jusqu'à quelques heures. Cela se fait cependant au prix de la perte de l'information spatiale fournie par une technique d'imagerie. Ce système est donc fortement inspiré de celui présenté dans le paragraphe précédent. Cependant, l'application développée durant ce projet consiste à observer le détachement *in vitro* de cellules de l'électrode de travail. Lors de l'observation d'un grand nombre de cellules, c'est la réponse moyenne de toute la population étudiée qui est importante et non celle de cellules uniques. Le signal fourni par le *lock-in* est alors parfaitement adapté à cette application. Les pétris ainsi que la méthode de culture cellulaire ont aussi dû être adaptés afin que les cellules cultivées puissent être utilisées dans le montage EC-SPR.

Une amélioration importante proposée dans ce projet est l'utilisation de systèmes de mesure secondaires permettant de valider les mesures d'électro-SPR. Ces systèmes permettent de prendre des mesures SPR spectrales à l'aide d'un montage installé en parallèle, des données de spectroscopie d'impédance par le potentiostat ainsi que des images à intervalles réguliers à l'aide d'un microscope en réflexion.

2.2 Biocapteur hybride proposé

Pour le système hybride, la méthode de détection SPR en intensité a été retenue, car le système optique est simplifié, ne nécessitant pas de balayage angulaire ou spectral. De plus, puisque le faisceau collimaté est plus gros qu'un faisceau focalisé, avec un diamètre pouvant aller de 1 à 5 mm environ, le signal mesuré reflète mieux les caractéristiques de l'ensemble de l'électrode et non celles d'un point en particulier (se référer au schéma expérimental de la figure

2-1). La source monochromatique utilisée est une diode laser centrée à 633 nm (*Crystal laser, DL-633-05-SO*, 50 mW) dont l'intensité est ajustée à l'aide d'un polariseur avant que le faisceau ne soit injecté dans une fibre optique afin d'être acheminé au système expérimental. À la sortie de la fibre, le faisceau est polarisé en p par un deuxième polariseur et son diamètre est ajusté par un iris. Ces dernières composantes sont fixées à une plaque tournante permettant de définir l'angle d'incidence. Le faisceau est ensuite dirigé sur un prisme en verre BK7 à base carrée sur lequel repose un échantillon de verre dont le dessus est couvert d'une couche de 50 nm d'or. Pour ce projet, une électrode plane a été préférée aux électrodes interdigitées précédemment utilisées afin de favoriser la culture d'une couche stable et uniforme de cellules sur cette dernière. La liaison optique entre le prisme et l'échantillon de verre s'effectue à l'aide d'une goutte d'huile d'immersion ayant le même indice de réfraction que le verre BK7. À la sortie du prisme, le faisceau est capté par un photodétecteur (*Thorlabs*) et son intensité est mesurée.

Ce système SPR est conjugué à un système d'électrochimie comprenant 3 électrodes : l'électrode de travail est une couche d'or circulaire d'une épaisseur de 50 nm, ayant un diamètre d'environ 10 mm et est aussi utilisée comme support pour les plasmons de surface; la contre-électrode est un disque de platine ayant un diamètre d'environ 8 mm et l'électrode de référence, baignant dans une solution concentrée de KNO_3 , est de type $\text{Ag}|\text{AgCl}$. La contre-électrode et la référence sont plongées en solution, à une distance de quelques millimètres de l'électrode de travail. À l'aide d'un potentiostat (*Solartron Analytical, 2100A*), un signal sinusoïdal de faible amplitude, généralement de 50mV, est injecté entre l'électrode de travail et l'électrode de référence à une certaine fréquence et le courant entre l'électrode de travail et la contre-électrode est mesuré, ce qui fournit des mesures d'EIS. Cette amplitude a été choisie, car elle permet un bon compromis entre un signal EC-SPR fort, tout en ayant une faible influence sur le système à l'étude. Cette amplitude est de l'ordre de grandeur des potentiels naturellement présents dans les membranes cellulaires durant divers phénomènes physiologiques [33]. Le potentiostat permet aussi d'ajouter une composante continue (ou *offset*) au potentiel appliqué et de balayer une certaine plage de fréquences. Le nombre de points par décade est typiquement fixé à 10 et la durée pendant laquelle un signal est appliqué à chaque fréquence est normalement de 5 secondes.

Le signal injecté dans les électrodes par le potentiostat est aussi transmis en entrée à un amplificateur à détection synchrone (*lock-in amplifier, Stanford Research Systems, SR830*) et fait office de signal de référence avec lequel le signal SPR en intensité est comparé. Le *lock-in*

mesure l'amplitude et la phase de la composante du signal SPR ayant la même fréquence que le signal injecté par le potentiostat dans le système électrochimique en multipliant les 2 signaux entre eux. Puisque deux fonctions sinus n'ayant pas la même fréquence sont orthogonales entre elles, seule la composante du signal à analyser ayant la même fréquence que le signal de référence est conservée. Ainsi, seule la composante du signal SPR associée à la perturbation du potentiel appliqué est mesurée, ce qui reflète l'admittance du système [39]. L'amplitude du signal capté par le photodétecteur est aussi mesurée par un voltmètre (*Kethley 2100*) afin de pouvoir normaliser le signal fourni par le *lock-in*. Toutes les données provenant du *lock-in* ou du voltmètre, soit la phase et l'amplitude de la composante alternative du signal SPR ainsi que l'intensité de la composante continue du faisceau lumineux, sont traitées et enregistrées à l'aide d'un programme développé avec *Labview*. De plus, le *lock-in* se synchronise automatiquement avec le signal reçu en entrée; il détecte donc la fréquence appliquée en temps réel, ce qui s'avère très utile, notamment lors de balayages de fréquences. L'ensemble de ce système est schématisé sur la figure 2-1. Les unités du signal alternatif recueilli sont arbitraires et représentent en fait une variation de l'intensité lumineuse réfléchie qui est transformée en signal électrique par le photodétecteur puis par le *lock-in*. Ce signal est lui-même dépendant de l'admittance de la surface de l'électrode, en plus de l'indice de réfraction à sa surface.

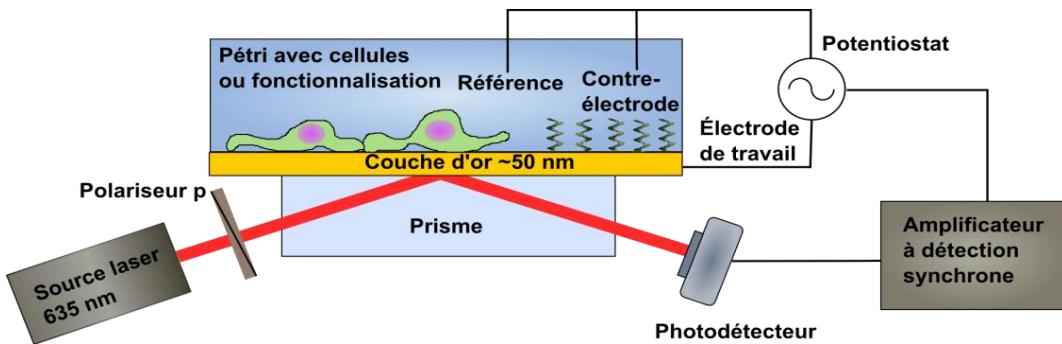


Figure 2-1 : Schéma de fonctionnement du système EC-SPR.

Afin de pouvoir couvrir une large plage de fréquences, il est important que le taux de répétition des mesures SPR soit élevé, ce que les techniques impliquant la détermination de la position d'un minimum SPR (angulaire ou spectral) ne permettent pas. C'est la principale raison pour laquelle un système mesurant l'intensité lumineuse à un angle et une longueur d'onde fixes a été utilisé. Au début de chaque expérience, l'angle d'incidence du signal est choisi afin de maximiser le signal SPR alternatif. Cet angle correspond à celui pour lequel la pente du pic SPR

est maximale, car c'est à ce point qu'un faible déplacement du pic engendre la plus grande variation d'intensité du signal SPR. En effet, lorsqu'un potentiel alternatif est appliqué, le signal SPR correspond à une oscillation entre deux états, soit celui correspondant au minimum et au maximum du potentiel (ou à $\pm V_0$), représentés par 2 courbes SPR. En d'autres mots, le signal électro-SPR est proportionnel à la dérivée du pic SPR, comme le décrit la figure 2-2.

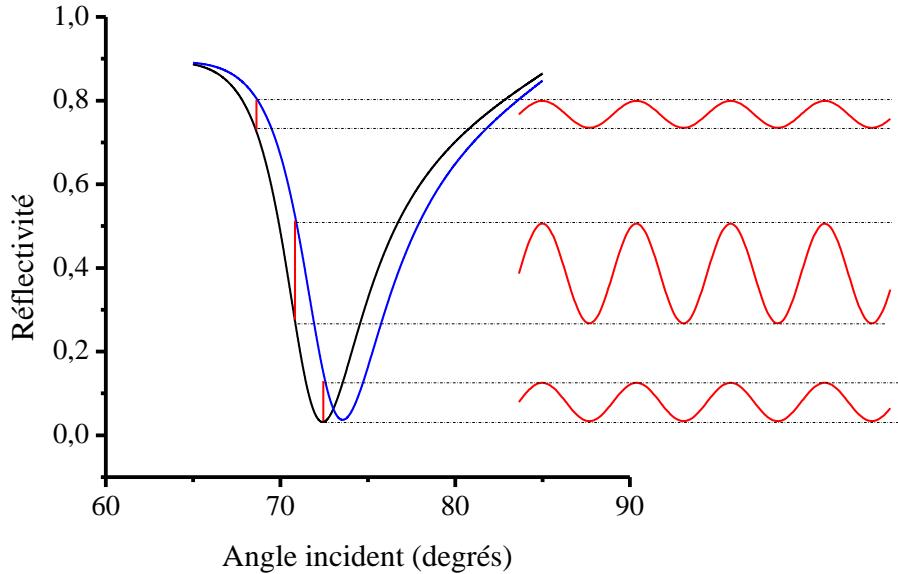


Figure 2-2 : Amplitude du signal EC-SPR en fonction de l'angle incident. Les deux courbes SPR correspondent aux états où le potentiel appliquée est minimum et maximum et le signal mesuré est une oscillation entre ces 2 courbes. Le signal est maximisé lorsque la dérivée du pic SPR est maximale.

En combinant le photodétecteur avec le *lock-in*, la plage de fréquence allant de 10 Hz à 100 kHz fournit un bon rapport signal-sur-bruit, lorsqu'une constante de temps de 100 ms est utilisée avec le *lock-in*. En dehors de cette plage fréquentielle et pour cette constante de temps, le niveau de bruit est plus élevé et l'intérêt diminue, car les phénomènes étudiés induisent des changements principalement dans la plage de fréquence citée ci-haut.

Dans ce système, le matériau retenu pour former l'électrode de travail ainsi que la surface supportant les plasmons de surface est l'or, et ce, pour de multiples raisons. C'est un métal chimiquement stable et biocompatible dont les propriétés électroniques, qui s'approchent du modèle de Drude idéal, permettent une excellente conductivité et un couplage photon-plasmon fort [42]. De plus, il est facile à fonctionnaliser, notamment par le biais de liens thiols. Dans les

longueurs d'onde du visible/proche infrarouge, le couplage est maximal lorsque la couche d'or a une épaisseur d'environ 50nm.

2.3 Systèmes secondaires

Une particularité importante de ce projet consiste au jumelage de systèmes secondaires au système EC-SPR présenté plus haut, ce qui permet de valider et de mieux interpréter les mesures fournies par ce dernier. Dans un premier temps, le potentiostat enregistre le courant circulant entre l'électrode de travail et la contre-électrode durant les expériences consistant à balayer la plage de fréquence d'intérêt. Ces mesures de spectroscopie d'impédance permettent d'estimer les valeurs des composantes du circuit équivalent de Randles décrivant le mieux la situation à l'électrode.

Puisqu'un prisme à base carré dont toutes les faces sont polies est utilisé, un système SPR spectral a pu être installé sur la paire de faces inutilisées par le système EC-SPR (figure 2-3). Ce système comprenait un faisceau de lumière blanche (*Thorlabs*) dirigé vers la surface d'or, environ au même endroit que le faisceau du système EC-SPR, et recueilli dans une fibre optique comprenant un polariseur à l'entrée ajusté de manière à conserver uniquement la polarisation p. La lumière est ensuite transmise dans un spectromètre contrôlé par un programme *Labview* permettant de retrouver la position spectrale du pic SPR, qui est mesurée dans le temps. La taille du faisceau sur la surface d'or et de celui à l'entrée de la fibre optique est contrôlée par des iris. Ce système est assez précis et permet de suivre les étapes cruciales d'une expérience donnée (comme l'attache d'une couche de molécule ou le détachement de cellules) en termes de changements d'indice de réfraction. De plus, l'utilisation d'un faisceau collimaté de lumière blanche permet de mesurer un signal moyen sur une plus grande surface et à un angle constant, ce qui lui confère une plus grande stabilité.

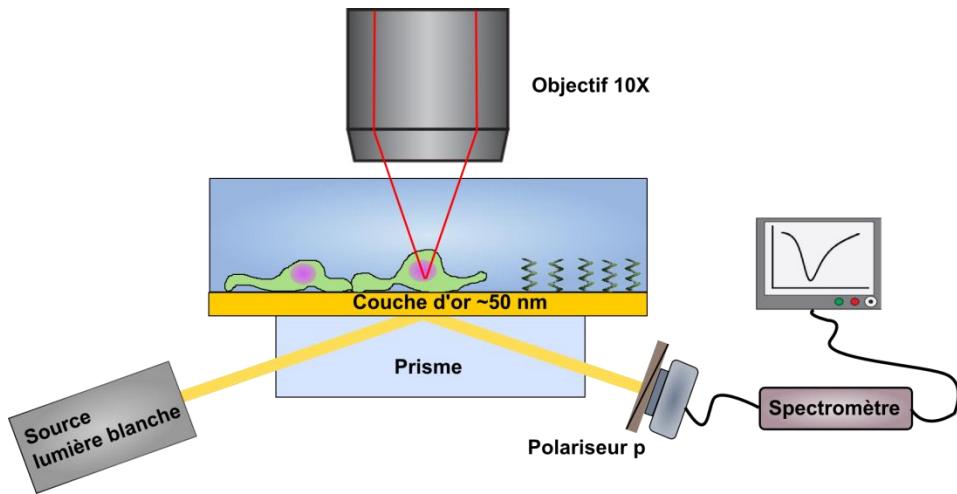


Figure 2-3 : Système SPR spectral installé sur les 2 faces libres du prisme (rotation de 90 degrés par rapport à la figure 2-1) et objectif de microscope 10X pour l'observation de cellules.

Durant les tests incluant des cellules, un microscope en réflexion (*Nikon*) muni d'un objectif 10X ayant une longue distance de travail et d'une caméra (*QImaging*) commandée par un programme *Labview* peut être installé sur le dessus du pétri. Des images des cellules sur la surface d'or peuvent ainsi être enregistrées en temps réel tout au long de l'expérience avec des intervalles plus ou moins longs entre les images afin d'observer la couche de cellules et corrélérer les mesures SPR et EC-SPR avec l'état des cellules.

2.4 Fabrication des électrodes

Les échantillons sont fabriqués en déposant par évaporation une couche d'adhésion de 3nm de chrome, suivie d'une couche de 50nm d'or sur une lame de verre BK7 d'une épaisseur de 1mm. La lame est ensuite découpée en petits échantillons carrés de 12,5 ou 15mm de côté à l'aide d'une scie de précision.

Une étape cruciale de toute expérience impliquant des mesures SPR est sans contredit le nettoyage de la surface d'or. La méthode de nettoyage utilisée va influencer les caractéristiques de cette surface, notamment son hydrophobicité, et avoir une influence directe sur la qualité de l'attache sur cette surface ainsi que sur la largeur du pic SPR mesuré. En général, les molécules formant un lien thiol avec l'or, les composants biologiques comme les protéines, et même les cellules ont une plus grande affinité avec les surfaces hydrophiles [14].

Pour les tests nécessitant l'attache de molécules uniquement (anticorps, PEG, oligonucléotides, etc.), la procédure de nettoyage consiste à plonger successivement l'échantillon dans des solutions d'acétone, d'isopropanol et d'eau DI (eau déionisée ou eau *Milli-Q*) durant 10 minutes dans un bain sonique. Ensuite, l'échantillon est immergé dans une solution de piranha composée d'un mélange d'acide sulfurique et de peroxyde d'hydrogène dans une proportion de 3 : 1 afin d'enlever tous les résidus organiques qui se trouvent sur la surface. Finalement, après un rinçage abondant avec de l'eau *Milli-Q*, l'échantillon est déposé durant 10 minutes dans l'eau DI au bain sonique. L'échantillon est alors assez hydrophile pour que l'attache de matière biologique sur la surface d'or se fasse avec succès et il est prêt à être installé sur le système SPR. Pour ce faire, l'échantillon est déposé sur le centre du prisme avec une goutte d'huile d'immersion servant d'intermédiaire optique entre ces derniers. Ensuite, un *O-ring* en téflon assurant l'étanchéité du système est placé entre l'échantillon et un pétri dont le fond est percé (*Mateks*).

Pour les tests utilisant des cellules, la méthode diffère quelque peu, car l'échantillon doit être stérile et fixé sur le dessous d'un pétri pour permettre la culture des cellules directement sur la surface de travail. Pour commencer, l'échantillon est plongé successivement dans des solutions d'acétone, d'isopropanol et d'eau DI durant 10 minutes dans un bain sonique, puis séché à l'aide d'un jet d'azote. Pour ces échantillons, aucune solution de piranha n'est utilisée afin d'éviter tout résidu acide sur la surface. Un pétri dont le fond est percé d'un trou de 10 mm de diamètre et bouché par une lamelle de verre BK7 sur sa face inférieure est utilisé (*Mateks*). Une fois nettoyé, l'échantillon est fixé sous le pétri à la place de la lamelle de verre à l'aide d'une colle de type époxy conçue pour les applications biomédicales (*Loctite M-31CL*). Une pression est ensuite appliquée sur le pétri durant le séchage de la colle afin d'éviter toute fuite. Finalement, suivant une exposition de 30 minutes aux rayons UV afin de le stériliser, le pétri est prêt à recevoir des cellules. Ce protocole de nettoyage permet aux cellules de bien adhérer à la surface d'or et de former une monocouche de qualité.

Dans tous les cas, des morceaux de ruban adhésif conducteur en cuivre ont été utilisés afin de connecter électriquement l'électrode de travail au potentiosstat, en prenant soin d'éviter tout contact entre le cuivre et le liquide contenu dans le pétri. Un exemple de pétri fabriqué en suivant ce protocole est montré dans la figure 2-4.



Figure 2-4 : Pétri dont le fond est composé d'un échantillon de verre couvert de 50 nm d'or, fixé à l'aide d'époxy. Le ruban adhésif en cuivre permet d'assurer le contact électrique avec le potentiostat.

2.5 Manipulations avec cellules

Les cellules utilisées sont de la lignée RGC-5; ce sont des cellules de photorécepteurs provenant de la rétine de souris [50]. Lorsqu'elles croissent sur une surface, elles forment une monocouche et développent des jonctions cellulaires entre elles, c'est pourquoi elles ont été choisies pour ces expériences. De plus, la réponse anatomique de cette lignée cellulaire suite à l'exposition à de la lumière à différentes longueurs d'onde a déjà été étudiée en utilisant la spectroscopie d'impédance [51, 52].

Les cellules ont été cultivées dans du milieu de culture DMEM contenant 10% de FBS ainsi que 1% d'antibiotiques (pénicilline + streptomycine). Ce milieu est changé de 2 à 3 fois par semaine et un passage est effectué environ une fois par semaine en suivant un protocole standard utilisant la trypsine. Les cellules sont ensemencées dans les pétris avec des concentrations variant entre 10 000 et 30 000 cellules/cm² afin de contrôler le temps nécessaire pour atteindre la confluence et pouvoir étaler les tests sur plusieurs journées après l'ensemencement. À ces concentrations, la confluence est atteinte en deux ou trois jours, ce qui laisse le temps aux cellules de produire une matrice extracellulaire stable et mène à un attachement de qualité sur l'or. Les cellules sont conservées dans un incubateur dans des conditions physiologiques, c'est-à-dire une température de 37 °C avec une atmosphère contenant 5% de CO₂.

Lorsque les cellules atteignent la confluence, le milieu de culture est remplacé par 4ml de PBS (tampon de phosphate salin) préalablement réchauffé à 37 °C. Le PBS est une solution tampon ayant les mêmes conditions de pH et de salinité que l'environnement physiologique des

cellules. Le pétri est ensuite installé sur le prisme du système SPR par l'intermédiaire d'une goutte d'huile d'immersion et l'électrode de référence ainsi que la contre-électrode sont plongées dans le PBS. Après l'acquisition d'un balayage en fréquence, puis d'un signal de base durant une dizaine de minutes, un certain volume de trypsine à 37°C est ajouté, pour atteindre une concentration finale variant entre 0,01% et 0,05%. La trypsine est une enzyme qui clive certaines liaisons peptidiques des protéines membranaires des cellules, ce qui mène au détachement des cellules de la surface du pétri. Cette enzyme permet de simuler l'action de toxines, comme par exemple des lipopolysaccharides ou de l'azoture de sodium [18], provoquant une variation du taux de couverture de la surface par les cellules, soit en causant une contraction, le détachement ou la mort des cellules. Des mesures sont prises en continu tout au long de l'expérience. Une fois les cellules détachées, un autre balayage en fréquence est effectué, avant de retirer le pétri du système et d'en disposer. Cette routine constitue une expérience typique accomplie durant ce projet.

Certains pétris ont été imagés avec un microscope à contraste de phase utilisant un objectif 10X avant d'être installés sur le système SPR, afin de caractériser la monocouche obtenue. Des images typiques du centre de l'électrode ainsi qu'en périphérie de cette dernière sont incluses dans la figure 2-5. Le centre de l'électrode est très bien recouvert d'une couche de cellules à confluence qui semblent former des jonctions intercellulaires (figure 2-5 A), comme en témoignent les parois cellulaires de cellules voisines ayant la même orientation. Cependant, en périphérie, les cellules ne couvrent pas toute la surface de l'électrode (figure 2-5 B), ce qui pourrait causer des fuites de courant. En effet, ce dernier aura tendance à privilégier la voie de moindre résistance et à éviter la couche de cellules ayant nécessairement une impédance plus élevée que l'or nu.

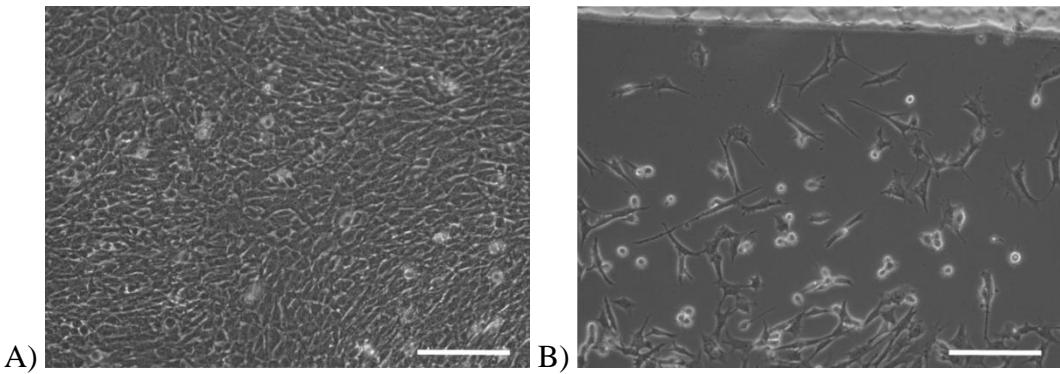


Figure 2-5 : Monocouche de cellules RGC-5 situées A) au centre de l'électrode et B) en périphérie de cette dernière. Barres de dimension : 150µm. Images obtenues à l'aide d'un microscope optique à contraste de phase.

CHAPITRE 3 CARACTÉRISATION DU BIOCAPTEUR HYBRIDE

Avant d'effectuer des expériences avec des cellules ou des analytes plus complexes, il convient d'analyser les limites et les performances du système utilisé (limites de détection, plage dynamique, ratio signal sur bruit, etc.). Pour ce faire, différents tests ont été exécutés avec les systèmes individuels dans un premier temps, puis avec le système combiné. Par la suite, l'attache de monocouches de diverses molécules a été effectuée avec le système afin de simuler des conditions plus près de vraies expériences de biodétection et aussi pour valider les modèles de circuits équivalents employés. De plus, des expériences impliquant des oligonucléotides conjugués avec une molécule active en oxydoréduction, le bleu de méthylène, ont été menées.

Une des méthodes d'analyse retenue consiste à faire des ajustements entre les données expérimentales obtenues lors de balayages en fréquence et les valeurs théoriques calculées à-partir des circuits équivalents retenus pour l'électrode de travail. Il convient de noter que cette méthode a été utilisée afin de valider le lien existant entre les mesures d'EC-SPR et l'admittance électrique de l'électrode de travail (en supposant bien sûr que cette dernière se comporte comme les circuits équivalents généralement admis dans la littérature). De plus, cette méthode permet de voir si les données de spectroscopies d'impédance concordent avec les données d'électro-SPR, en décrivant le même circuit équivalent. Il faut rester prudent en analysant les valeurs obtenues lors de l'estimation des paramètres car le nombre de paramètres utilisés est assez élevé et pourrait mener à certaines erreurs. Bien entendu, lors de démarches expérimentales plus routinières, comme lors de tests de détection, la méthode d'analyse se devrait d'être différente et simplifiée.

3.1 Calibration de base

3.1.1 Limite de détection SPR spectral

Dans un premier temps, le système SPR spectral a été calibré afin de déterminer le changement minimal d'indice de réfraction pouvant être détecté. Pour ce faire, une ligne de base a d'abord été enregistrée en présence d'eau DI dans le pétri utilisé pour la mesure durant 20 minutes. Puis, de faibles quantités d'éthanol ont été ajoutées afin d'obtenir des concentrations volumiques successives de 0,5%, 1% puis 2%. À la fin, un rinçage avec de l'eau DI a été effectué afin que le signal revienne au plateau initial. Cette courbe de calibration est affichée sur la figure

3-1. En utilisant des valeurs d'indice de réfraction pour l'eau DI et l'éthanol à 688 nm (position initiale du pic SPR) de 1,3304 et 1,3591 [53], et en supposant que la variation d'indice en fonction de la concentration d'éthanol est linéaire, une limite de détection de $1,1 \times 10^{-5}$ RIU a pu être déterminée en utilisant trois fois l'écart-type des données, et ce, pour les trois concentrations testées. Cela est tout à fait acceptable, compte tenu de la simplicité du système ainsi que de son rôle de validation du système électro-SPR, qui ne nécessite pas une sensibilité trop élevée. De plus, le ratio des réponses obtenues pour chaque concentration respecte le ratio des changements d'indice; il est de 2,04 entre les réponses obtenues pour les concentrations d'éthanol de 0,5% et 1%, et de 2,01 entre les concentrations de 1% et 2%. Par ailleurs, après le rinçage final à l'eau DI, le signal revient à une position moyenne de -0,035nm par rapport à la position moyenne durant la ligne de base, ce qui s'approche de la limite de détection correspondant à un signal de 0,026nm.

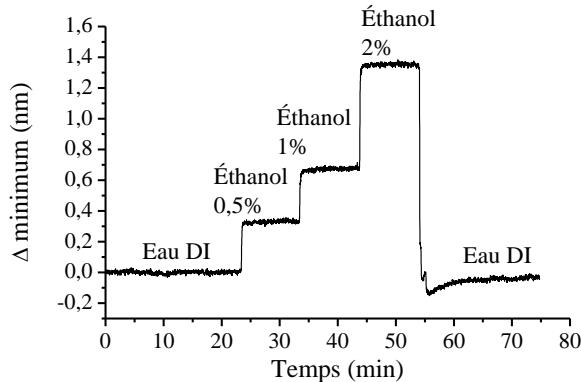


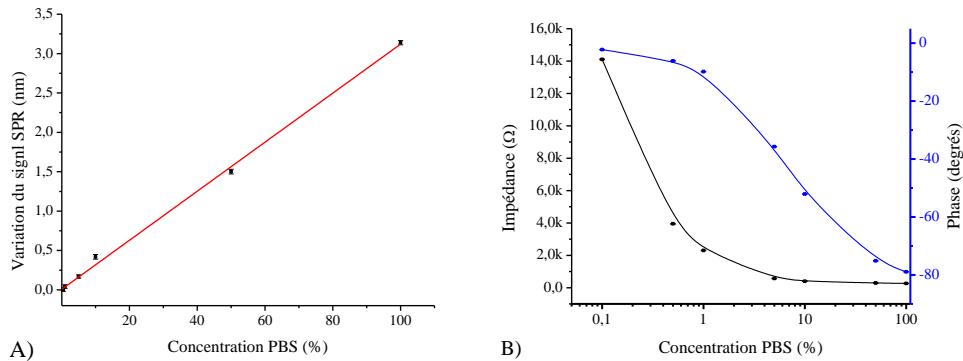
Figure 3-1 : Courbe de calibration du système SPR spectral effectuée avec des concentrations d'éthanol dans l'eau DI de 0,5%, 1% et 2%. La limite de détection déterminée est de $1,1 \times 10^{-5}$ RIU.

3.1.2 Influence de la concentration ionique

Ensuite, le système SPR spectral ainsi que le système EC-SPR ont été calibrés avec des solutions ayant différentes conductivités. Pour ce faire, du PBS concentré 10X a été dilué dans de l'eau DI afin d'obtenir un éventail de concentrations en PBS allant de 0,1% à 100% par rapport à une solution régulière de PBS dont le pH est de 7,4 et l'osmolarité est la même que celle rencontrée dans un milieu physiologique. Une première courbe de calibration a été obtenue avec le système SPR spectral sans potentiel appliqué afin de minimiser les perturbations au système. Ensuite, la même courbe a été mesurée, cette fois en appliquant un potentiel alternatif de 50mV

d'amplitude à 100Hz (se référer à la figure 3-2). De plus, entre chaque changement de concentration, un balayage de fréquences a été effectué (se référer aux figures 3-3 et 3-4).

Premièrement, le signal SPR spectral n'est sensible qu'à partir d'une concentration d'environ 1% de PBS, et le signal augmente ensuite linéairement jusqu'à une solution de PBS à 100% avec un coefficient de corrélation de 0,999. Le signal électrochimique est plus sensible aux faibles concentrations ioniques et le signal devient presque constant dès une concentration de 5%. De plus, l'observation de la phase permet de voir une transition d'un comportement purement résistif à de faibles concentrations vers un comportement capacitif lorsque la constitution de la solution s'approche de celle du PBS. Pour ce qui est du signal electro-SPR, il est comparable au niveau de bruit pour de faibles concentrations ioniques. Il commence à devenir détectable lorsque la concentration dépasse 1% et continue de croître à mesure qu'elle augmente. Une augmentation de la concentration ionique au-delà de celle du PBS continuerait vraisemblablement à amplifier davantage le signal. Cela est compréhensible puisque la quantité de charges en solution pouvant contribuer au courant capacitif est proportionnelle à la concentration en PBS. Cependant, un autre aspect dont il faut tenir compte lors d'un changement important de l'indice de réfraction est la variation de signal pouvant être imputée au fait que l'on se déplace sur la courbe du pic SPR. Le comportement de la phase du signal EC-SPR pourrait en partie être expliqué par ce phénomène. Il faut donc tenter de rester dans la zone linéaire du pic SPR. Les courbes de calibration du signal SPR, électrochimique et EC-SPR sont affichées dans la figure 3-2; les barres d'erreur y ont été déterminées à partir de l'écart-type des données recueillies pour chaque point.



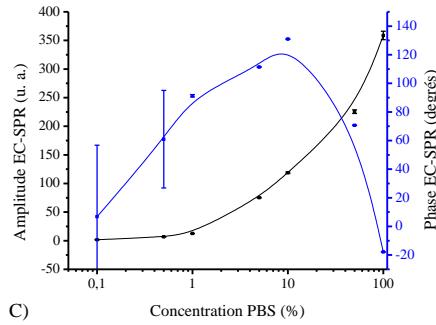


Figure 3-2 : Courbes de calibration pour différentes concentrations de PBS : A) Signal SPR spectral; B) Signal de spectroscopie d’impédance à 100 Hz; C) Signal EC-SPR. Des splines ont été utilisées afin d’approximer l’allure des courbes.

À l'aide des courbes de balayage en fréquence, il est possible d'estimer les valeurs de la capacité double couche ainsi que la résistance de la solution, et ce pour différentes concentrations ioniques. Cela peut être effectué à partir des mesures électrochimiques ou avec les courbes d'EC-SPR, en s'intéressant soit à l'impédance ou à l'admittance.

Dans un premier temps, les paramètres associés à l'impédance ont été approximés à l'aide des données expérimentales. Le circuit équivalent retenu est la résistance de la solution en série avec la capacité de l'électrode de travail (figure 1-7B). De plus, afin d'ajouter un degré de liberté, la capacité a été remplacée par un élément à phase constante, défini par le coefficient m . La valeur de ces paramètres a pu être estimée en minimisant l'écart entre les données expérimentales et l'expression théorique de l'amplitude de l'impédance pour le circuit considéré (équation 3.1), à l'aide de l'outil *Curve fitting tool* de Matlab. Les valeurs de phase théorique ont pu être recalculées à partir des paramètres estimés du circuit équivalent. Les résultats de ces simulations sont comparés aux données expérimentales sur la figure 3-3 et les valeurs approximées sont affichées dans le tableau 3.1.

$$Z = R_s + \frac{1}{(i\omega)^m C_{DC}} \quad (3.1)$$

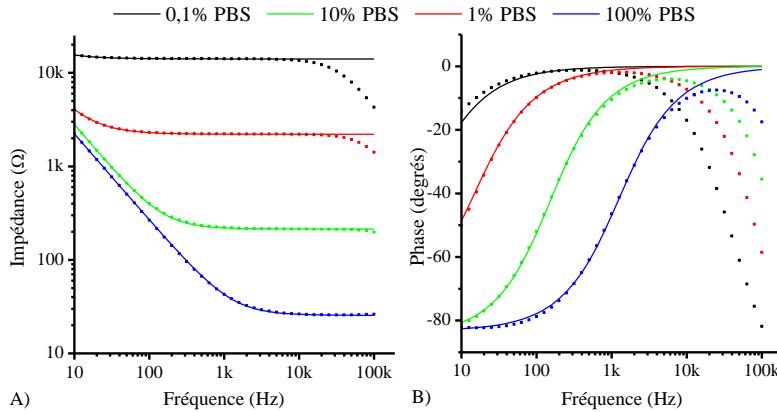


Figure 3-3: Données expérimentales de spectroscopie d'impédance pour différentes concentrations de PBS (points) et courbes permettant d'approximer les paramètres du circuit équivalent à ce système (lignes pleines). A) Module de l'impédance. B) Phase de l'impédance.

Tableau 3.1 : Paramètres du circuit équivalent estimés à l'aide des données obtenues en spectroscopie d'impédance pour différentes concentrations de PBS.

Concentration (%)	R _s (Ω)	C _{dc} (μF)	m	EQM
0,1 %	1,4*10 ⁴	5,0	0,90	140
1 %	2,2*10 ³	7,9	0,90	25
10 %	210	7,2	0,94	4,6
100 %	26	9,8	0,92	1,9

Ces courbes ainsi que les valeurs estimées de R_s , qui varient de 3 ordres de grandeur selon la concentration en PBS, confirment la domination de l'aspect résistif du système lorsque la force ionique de la solution est faible alors que le plateau caractéristique de la résistance de la solution est très élevé. À plus haute concentration ionique, un caractère capacitif émerge, à mesure que le plateau associé à la résistance de la solution s'abaisse et que la pente associée à la capacité devient observable dans les basses fréquences. La valeur de la capacité double couche, pour sa part, reste plus stable. L'introduction du paramètre m a permis d'ajuster la valeur de la pente associée à la capacité double couche. L'impact de ce dernier est plus marqué à plus haute force ionique, lorsqu'un caractère capacitif est observable. Afin d'évaluer la justesse des approximations faites, l'écart quadratique moyen (EQM) entre les courbes calculées et les données expérimentales a été estimé pour chaque courbe du module de l'impédance (voir équation 3.2). Puisqu'il est difficile d'évaluer l'erreur commise sur chaque paramètre pris

individuellement, l'EQM donne une bonne idée de la justesse de l'ajustement global entre les données expérimentales et le modèle théorique choisi. En tenant compte du fait qu'il est proportionnel à la valeur de l'impédance pour la courbe considérée, l'EQM représente environ 1% de la valeur des mesures, ce qui valide la qualité de ces approximations.

$$EQM = \frac{1}{n} \sum_n (x_{calculé} - x_{exp})^2 \quad (3.2)$$

Par contre, à haute fréquence, et surtout lorsque la concentration ionique est faible, les données ne suivent pas le modèle proposé et un caractère capacitif semble émerger. Puisque le courant ne peut pas circuler dans un milieu trop résistif, l'électrode de travail et l'électrode de référence forment probablement un condensateur. Cependant, dans ce projet, l'accent est mis sur les fréquences plus basses, car le signal EC-SPR étant inversement proportionnel à la fréquence (équation 1.20), il devient très faible à haute fréquence. De plus, du PBS non-dilué est généralement utilisé dans les expériences réalisées.

Ensuite, la même démarche est effectuée et l'équation 3.3 a été ajustée aux courbes d'amplitude du signal EC-SPR des balayages fréquentiels à l'aide de l'outil *Curve fitting*. Dans cette équation, c'est l'admittance qui est considérée. Elle est divisée par la fréquence puis multipliée par un coefficient de proportionnalité α , dont les unités sont arbitraires. Cependant, puisque la valeur de ce coefficient dépend de plusieurs paramètres expérimentaux comme la fonction diélectrique du métal, l'indice de réfraction du milieu diélectrique, la densité électronique et l'angle d'incidence, il est possible que sa valeur varie d'une courbe à l'autre. Pour cette raison, il a été évalué pour chaque courbe, en plus des trois paramètres évalués précédemment. La figure 3.4 montre les données expérimentales d'électro-SPR ainsi que les courbes théoriques permettant de les approximer. Les valeurs estimées des paramètres R_s , C_{dc} , m et α sont consignées dans le tableau 3.2. De la même façon qu'énoncé précédemment, l'EQM a été calculé pour chaque courbe ajustée.

$$\Delta x = \frac{\alpha}{i\omega Z} = \frac{\alpha(i\omega)^{m-1} C_{dc}}{(i\omega)^m C_{dc} R_s + 1} \quad (3.3)$$

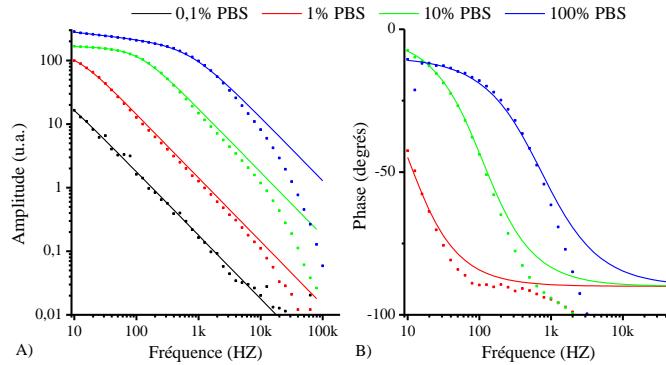


Figure 3-4 : Données expérimentales (points) et courbes recalculées (lignes pleines) d'électrochimie SPR pour différentes concentrations de PBS. A) Amplitude du signal. B) Phase du signal.

Tableau 3.2 : Paramètres du circuit équivalent estimés à l'aide des données EC-SPR obtenues pour différentes concentrations de PBS.

Concentration (%)	R _s (Ω)	C _{dc} (μF)	m	α (u.a.)	EQM
0,1 %	1,4*10 ⁴	5,4	0,90	1,6*10 ⁷	0,3
1 %	2,2*10 ³	7,1	1,00	2,0*10 ⁷	0,7
10 %	200	8,4	0,98	2,2*10 ⁷	1,3
100 %	26	219	0,89	2,1*10 ⁷	3,0

La section où la pente est la plus raide sur les courbes d'amplitude représente un comportement résistif et le décalage entre les courbes découle d'une diminution de la résistance de la solution, causant une augmentation de l'admittance du système et du signal EC-SPR. Les plateaux observables sur la courbe verte et la courbe bleue témoignent d'un phénomène capacitif et la pente non nulle de ces plateaux vient du fait que le coefficient m a une valeur inférieure à 1. Il est donc possible de conclure que le signal est dominé par la résistance de la solution jusqu'à une concentration ionique équivalente à environ 10% de la concentration du PBS. Pour des concentrations inférieures, en plus d'obtenir un signal de faible amplitude, ce signal sera peu relié aux caractéristiques de l'électrode, mais plus à celles de la solution. Afin que les mesures reflètent les caractéristiques de l'électrode de travail, il faut s'assurer d'être en présence d'une solution ionique conduisant bien le courant. Les solutions physiologiques remplissent bien ce rôle.

Pour ce qui est de la phase, l'ajustement des données expérimentales est de meilleure qualité pour les fréquences plus faibles et pour des concentrations salines au-delà de 10% de la concentration de PBS. En effet, lorsque l'amplitude du signal diminue, l'imprécision augmente et cette erreur est encore plus marquée pour la phase. C'est pourquoi l'erreur est plus grande à haute fréquence, mais aussi lorsque la concentration ionique est trop faible. D'ailleurs, la courbe de la phase pour la concentration en PBS de 0,1% n'a pas été affichée, car elle était fortement dominée par le bruit et aucun ajustement valable ne pouvait être effectué. De plus, afin d'arriver à faire concorder les courbes calculées avec les données expérimentales, un décalage de 180° des données expérimentales, probablement causé par le montage expérimental (branchements électriques ou décalage entre le photodétecteur et le *lock-in*), a dû être appliqué.

Comme le montre le tableau 3.2, les valeurs de R_s et de C_{DC} calculées à partir des données d'électro-SPR sont très similaires à celles obtenues en électrochimie. Les valeurs du coefficient m sont plus significatives à des concentrations ioniques plus élevées et diffèrent significativement par rapport à celles du tableau 3.1. Finalement, l'EQM est généralement faible, surtout à plus haute concentration ionique, avec des valeurs correspondant à environ 1% du signal.

Pour la suite du projet, ce sont principalement les fréquences comprises entre 10Hz et 1kHz qui seront retenues, car le rapport signal sur bruit est le meilleur dans cette plage. À plus basse fréquence, le bruit occasionné par le *lock-in*, pour la constante de temps utilisée, augmente et à plus haute fréquence, l'amplitude du signal décroît fortement. De plus, c'est à ces fréquences que les caractéristiques de l'électrode ont le plus d'influence sur le signal tandis qu'à haute fréquence, le signal dépend principalement de la solution.

3.1.3 Effet de l'angle d'incidence

De plus, afin de valider le modèle proposé dans le chapitre 2, stipulant que l'amplitude du signal EC-SPR est proportionnelle à la dérivée du pic SPR, les amplitudes mesurées pour différents angles incidents ont été comparées à la dérivée numérique du pic SPR angulaire calculé théoriquement. Pour effectuer ce calcul, la méthode proposée par Homola [4] a été suivie en utilisant les fonctions diélectriques trouvées dans des banques de données [54]. La dérivée numérique du pic SPR en fonction de l'angle ainsi que l'amplitude du signal EC-SPR mesurée en fonction de l'angle d'incidence du faisceau laser sont affichées sur la figure 3-5. Les mesures ont été prises alors que les électrodes baignaient dans une solution de PBS. Cependant, le pétri utilisé

avait déjà servi pour faire croître des cellules qui étaient détachées de la surface au moment de cette expérience. Une couche de protéines était donc nécessairement adsorbée sur la surface de cette dernière, ce qui n'est pas un cas idéal. Les deux courbes concordent bien entre elles, ce qui démontre l'importance de bien choisir l'angle d'incidence utilisé lors d'une expérience, qui se trouve à être environ 71° dans ce cas-ci.

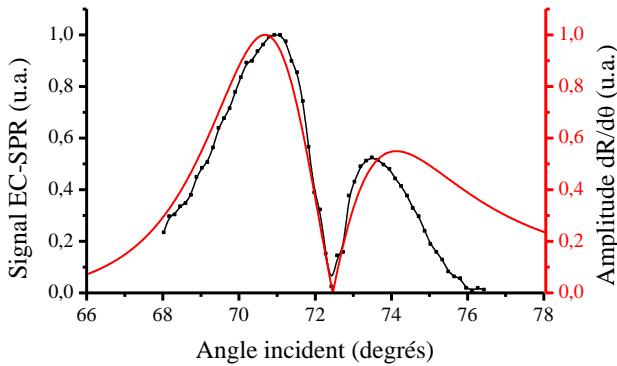


Figure 3-5 : Dérivée calculée du pic SPR en fonction de l'angle incident du faisceau laser (en rouge, ligne pleine) et amplitude du signal EC-SPR en fonction de l'angle incident (ligne noire avec points). Les deux courbes ont été normalisées.

3.1.4 Balayage du potentiel appliqué et influence de l'angle incident

Ensuite, l'effet de l'application d'une composante constante au voltage alternatif a été étudié. En effet, comme il a été discuté dans la section 1.3.2, le potentiel externe peut modifier considérablement la composition de la capacité double couche. Ainsi, en présence d'un potentiel positif, les anions seront majoritairement en contact avec l'électrode tandis qu'une électrode soumise à un potentiel négatif aura tendance à attirer les cations. De plus, lors de la présence de cellules, l'effet pourrait être important puisque les membranes cellulaires ont généralement une charge négative résiduelle et seront donc affectées différemment en présence d'un potentiel positif ou négatif [55]. De plus, différentes fonctions cellulaires comme le transport de charges à travers les membranes ou l'action d'un potentiel dans les cellules musculaires pourraient être perturbées par l'application d'un potentiel externe. Il est donc important de comprendre l'effet d'un potentiel fixe appliqué à l'électrode de travail.

Afin de comprendre l'impact du potentiel fixe appliqué entre l'électrode de travail et l'électrode de référence, un balayage triangulaire du potentiel de -400mV à 400mV aller-retour a

été effectué en 10 minutes (à un taux de 2,66mV/s, voir figure 3-6A), et ce, pour plusieurs angles incidents. Des oscillations d'une amplitude de 10mV à une fréquence de 100Hz ont été ajoutées à cette onde triangulaire. Pour ce faire, les électrodes baignaient dans une solution de PBS et l'électrode de travail a bien été nettoyée et n'a subie aucune modification. Des mesures ont aussi été prises avec le potentiostat ainsi qu'avec le système SPR spectral, sans être affectées par l'angle incident. La figure 3-6 B montre la variation de la position spectrale du pic SPR en fonction du potentiel appliqué tandis que l'intensité du faisceau laser utilisé en EC-SPR en fonction du potentiel est affichée dans la figure 3-6 C, et ce, pour plusieurs angles incidents. De plus, les courbes de l'amplitude ainsi que la phase de l'impédance de l'électrode de travail en fonction du potentiel de cette dernière sont incluses dans la figure 3-6 D. Il est à noter que les angles incidents ont été calculés pour l'incidence à l'intérieur du prisme en BK7 (ce qui donne entre 68,9° et 71,3°) à partir des angles affichés sur le support angulaire de la partie incidente du montage optique (la plage correspondante s'étend de 177° à 181°).

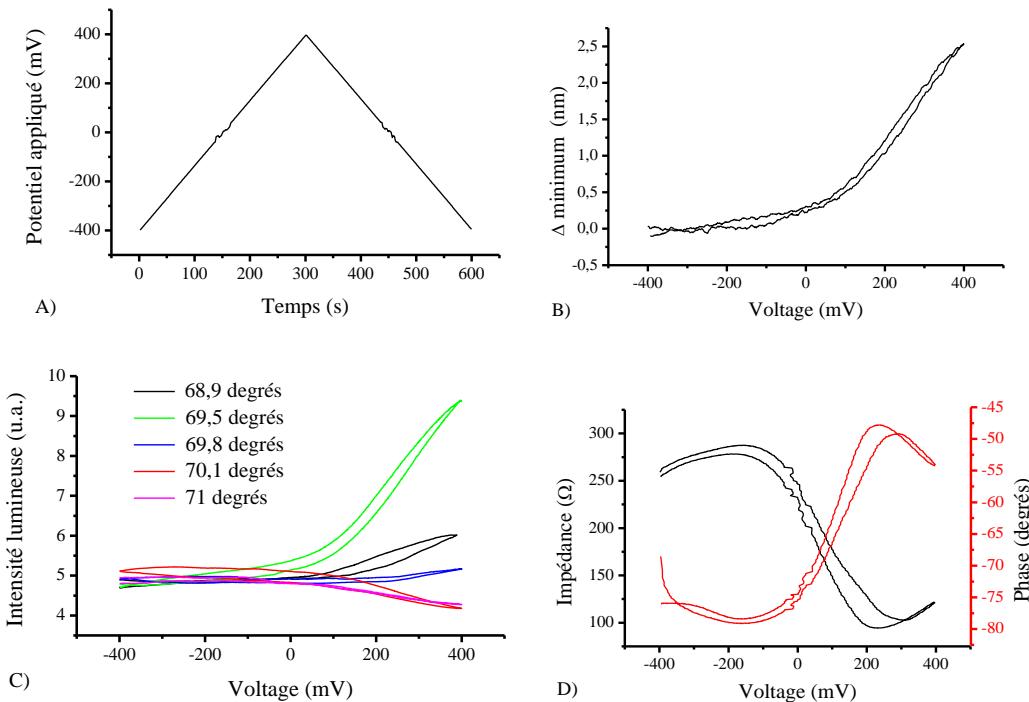


Figure 3-6 : A) Profil temporel du potentiel appliqué. B) Variation de la position du minimum spectral du pic SPR en fonction du potentiel. C) Variation de l'intensité lumineuse en fonction du potentiel pour différents angles d'incidence. D) Profil de l'imp  endance (amplitude et phase) de l'electrode de travail en fonction du potentiel.

La courbe de l'intensité du signal SPR a un profil similaire à la courbe SPR spectrale, constante pour tous les angles, en présence de petits angles incidents, surtout à 69,5°. Cependant, à mesure que l'angle incident augmente, l'endroit correspondant au signal sur le pic SPR angulaire (ligne rouge sur la figure 1-5) varie et le comportement de la courbe en intensité évolue puisqu'un changement de l'indice de réfraction a un effet plus ou moins marqué sur l'intensité lumineuse transmise selon la position sur le pic SPR. Les courbes d'impédance démontrent un caractère capacitif plus marqué à un potentiel négatif et plus résistif à un potentiel positif, avec une baisse de l'amplitude de l'impédance notamment. Cela est dû au fait qu'à un potentiel négatif, ce sont les cations, fortement hydratés, qui se trouvent le plus près de l'électrode (voir figure 1-9) avec une couche de molécules d'eau entre ces derniers et l'électrode, ce qui peut agir comme une capacité. À un potentiel positif, les anions qui sont attirés sur l'électrode ont tendance à entrer en contact direct avec cette dernière, ce qui facilite nécessairement le transfert de charges et diminue l'impédance, car l'épaisseur de la double couche diminue.

Finalement, la figure 3-7 comprend les courbes de l'amplitude et de la phase du signal EC-SPR en fonction du potentiel appliqué pour différents angles d'incidence. Premièrement, le signal est beaucoup plus élevé en présence de potentiels positifs, ce qui s'explique probablement par les mêmes raisons que celles avancées pour l'EIS, soit la présence de cations ou d'anions près de la surface d'or, causant une augmentation de l'admittance pour des potentiels positifs. Puisque les potentiels électrochimiques des réactions d'oxydoréduction impliquant les ions présents dans le PBS (K^+ , Na^+ , Cl^- et PO_4^{3-}) se situent à l'extérieur de l'intervalle de $\pm 400mV$ utilisé, ces réactions particulières ne devraient pas influencer le signal mesuré [56]. De plus, le potentiel générant une amplitude maximale du signal est peu dépendant de l'angle d'incidence (autant pour le signal EC-SPR – figure 3-7 que pour l'intensité transmise – figure 3-6C), ce qui suggère que les variations des caractéristiques électriques de l'électrode découlant du potentiel appliqué ont plus d'impact que les variations de l'indice de réfraction près de la surface causées par ce potentiel. En contrepartie, l'amplitude du signal ainsi que la phase du signal dépendent fortement de l'angle d'incidence, comme mentionné plus tôt. La phase subit entre autre un décalage de π entre les angles situés de part et d'autre du minimum du pic SPR, ce qui s'explique par le changement de signe de la pente de ce dernier.

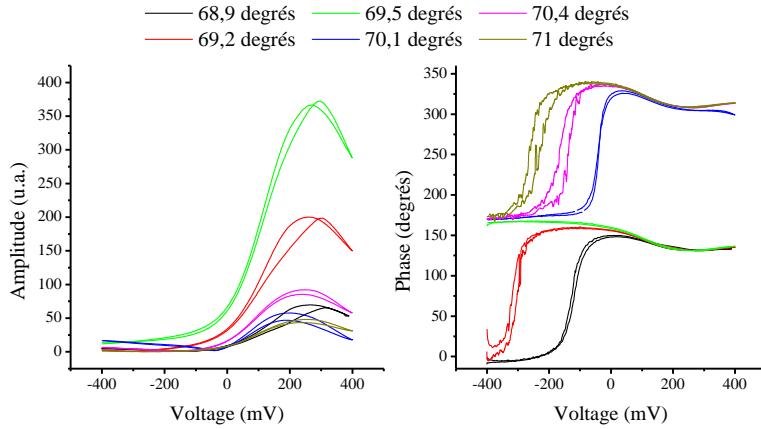


Figure 3-7 : Amplitude et phase du signal EC-SPR lors de balayages du potentiel constant appliqué pour différents angles d'incidence du faisceau laser.

3.2 Attache de monocouches de molécules

Cette section présente les résultats de quelques tests qui ont été effectués avec des molécules formant généralement une monocouche autoassemblée sur une surface d'or (PEG-SH ou mercapto-éthanol) ou ayant une forte affinité avec cette dernière (Albumine de sérum bovin ou BSA). Dans les deux cas, l'impact sur les propriétés électro-optiques de la surface étudiée est important, car ces molécules agissent comme un isolant et bloquent le transfert de charge sur la surface, en plus d'augmenter l'épaisseur de la couche capacitive de l'électrode. Le cas de l'attache de mercaptoéthanol sera étudié un peu plus en profondeur. L'attache a été effectuée en ajoutant une solution de mercaptoéthanol dans le pétri utilisé pour l'expérience, à la quinzième minute, afin d'obtenir une concentration finale en solution de 0,4mM et en laissant reposer durant environ vingt minutes avant de rincer le système avec du PBS, à la 37^e minute. D'ailleurs, le signal électro-SPR a été enregistré durant l'attache, à une fréquence de 100 Hz et un potentiel alternatif de 50 mV. Le signal SPR spectral a aussi été enregistré. Ces courbes sont affichées sur la figure 3-8. L'attache a lieu très rapidement, comme le montre la courbe SPR (courbe A) avec un déplacement très rapide du minimum du pic SPR. De plus, le changement de solution cause un changement important de l'indice de réfraction. Comme il fallait s'y attendre, l'ajout d'une monocouche de mercaptoéthanol sur l'électrode cause une diminution importante du signal électro-SPR, d'un facteur de presque 9. La phase du signal varie aussi significativement, d'environ 26 degrés.

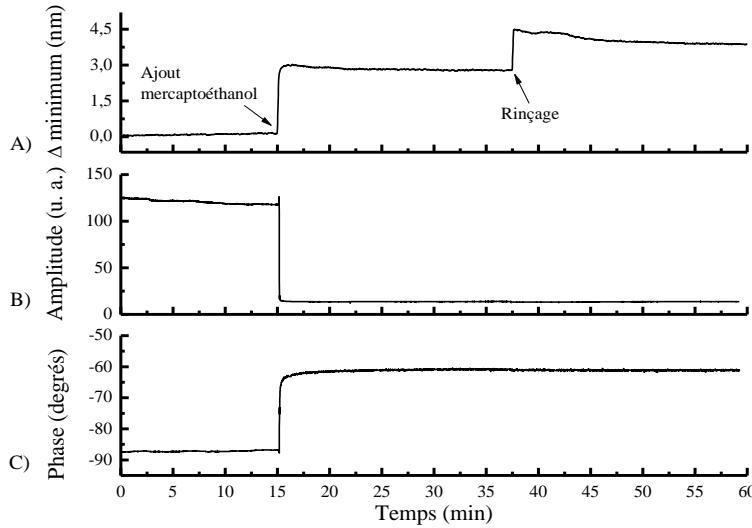


Figure 3-8 : Attache de mercaptoéthanol sur l'électrode de travail. A) Signal SPR spectral; B) Amplitude du signal EC-SPR et C) Phase du signal EC-SPR.

Ensuite, une analyse en fréquence a été menée afin de retrouver les paramètres du système correspondant le mieux aux mesures récoltées. Pour ce faire, la même méthodologie d'analyse que celle utilisée dans la section 3.2.1 a été employée et le modèle de circuit équivalent capacitif (équation 3.1) a été retenu, car c'est celui qui décrit le mieux la situation. L'ajout d'une résistance de transfert de charge n'améliore pas la précision des ajustements, en plus de complexifier les calculs. Cela s'explique par l'absence de réaction d'oxydoréduction dans ce test. Les courbes expérimentales et théoriques de l'impédance sont affichées dans la figure 3-9 et les paramètres déduits des courbes expérimentales et utilisés pour le calcul des courbes théoriques sont consignés dans le tableau 3.3.

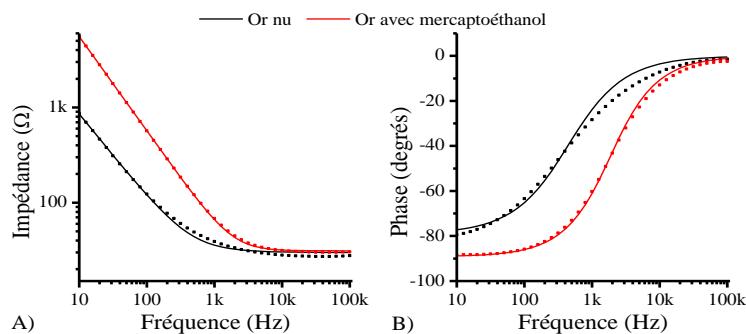


Figure 3-9 : Données expérimentales (points) et calculées (lignes pleines) d'EIS avant (noir) et après (rouge) l'attache de mercaptoéthanol. Module (A) et Phase (B) de l'impédance.

Ces ajustements sont très satisfaisants, comme en témoignent les faibles valeurs d'EQM, qui se rapportent, encore une fois, aux courbes du module de l'impédance. De plus, R_s est constante d'une courbe à l'autre. Cependant, la valeur de C_{DC} est réduite d'un facteur 10 tandis que le coefficient m de l'élément à phase constante passe d'une valeur de 0,88 pour l'or nu, ce qui s'éloigne considérablement d'un condensateur idéal à une valeur de 0,99, très proche du modèle idéal. Cette couche de molécules à la surface de l'électrode forme donc un condensateur, ce qui est confirmé par les valeurs de la phase à faible fréquence, dont la valeur approche 90°.

Tableau 3.3 : Paramètres du circuit équivalent estimés à l'aide des données de spectroscopie d'impédance recueillies lors de l'attache de mercaptoéthanol sur l'électrode de travail.

	R_s (Ω)	C_{DC} (μF)	m	EQM
Or nu	30	31	0,88	3,4
Or + mercaptoéthanol	31	3,0	0,99	1,1

La figure 3-10 renferme les courbes relatives au signal EC-SPR de la même expérience et le tableau 3.4 montre les paramètres permettant d'approximer les données expérimentales par un modèle théorique (équation 3.3). Encore une fois, l'approximation est assez bonne, surtout pour les fréquences plus faibles que 10kHz. Par contre, il y a un décalage d'environ 60° entre la phase expérimentale et la phase recalculée en utilisant les paramètres du circuit équivalent fournis par l'ajustement des courbes d'amplitude. Malgré ce décalage, le modèle semble valable pour la phase uniquement pour des fréquences plus faibles que 1kHz.

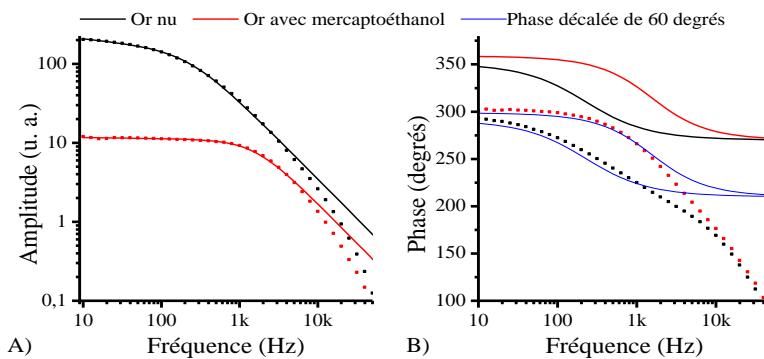


Figure 3-10 : Données expérimentales (points) et calculées (lignes pleines) d'électro-SPR avant (noir) et après (rouge) l'attache de mercaptoéthanol sur l'électrode de travail. A) Amplitude du signal. B) Phase du signal (les lignes bleues représentent les courbes calculées décalées de 60°).

Les estimations des paramètres du circuit équivalent obtenues en ajustant les données de l'amplitude du signal EC-SPR suivent la même tendance que celles effectuées avec les données de spectroscopie d'impédance, suggérant une diminution d'environ un ordre de grandeur de la valeur de C_{DC} ainsi qu'un comportement plus capacitif. De plus, le coefficient m s'approche aussi de 1 lors de la formation d'une monocouche de molécules sur l'électrode. Seule la valeur de R_s avec une électrode d'or nu ne semble pas concorder.

Tableau 3.4 : Paramètres du circuit équivalent estimés à l'aide des données EC-SPR recueillies lors de l'attache de mercaptoéthanol sur l'électrode de travail.

	R_s (Ω)	C_{dc} (μF)	m	α (u.a.)	EQM
Or nu	49	30	0,90	$1,1 \times 10^7$	1,4
Or + mercaptoéthanol	30	3,8	0,99	$3,2 \times 10^6$	0,2

Les paramètres extrapolés des données d'électro-SPR recueillies lors de l'attache de BSA ou de PEG-SH sur l'électrode sont réunis dans le tableau 3.5 et comparés avec ceux du mercaptoéthanol. Ainsi, l'attache de mercaptoéthanol ou de PEG-SH mène à la formation d'une couche capacitif assez étanche aux charges électriques, comme en témoignent la diminution de la capacité double couche d'un facteur d'environ 10 dans les deux cas ainsi que la variation du coefficient m , qui tend vers 1 pour une électrode sur laquelle une monocouche de molécules s'est formée. De plus, le ratio du signal avant et après l'attache, calculé à 100Hz, sur l'avant-dernière ligne du tableau 3.5, est élevé pour ces deux molécules. En contrepartie, l'attache de la BSA mène à une diminution beaucoup plus faible du signal EC-SPR et de la valeur de la capacité double couche. De plus, la valeur du coefficient m tend à diminuer aussi, ce qui suggère une plus grande rugosité de surface [23]. La BSA forme probablement une couche moins régulière que les autres molécules, ce qui expliquerait la moins forte diminution du signal EC-SPR qui lui est associée.

Tableau 3.5 : Paramètres de la couche capacitif associés à différents types de molécules et déterminés à partir des données d'électro-SPR.

Paramètres	Mercaptoéthanol	PEG-SH	BSA
C_{DC} or nu (μF)	30	20	5,9
C_{DC} après attache (μF)	3,8	2,3	5,0
m or nu	0,90	0,95	0,97

m après attache	0,99	1,0	0,90
Ratio signal à 100 Hz	13	93	3,3
EQM	0,2	0,5	1,7

3.3 Tests avec bleu de méthylène

Afin de valider certains aspects de l'électrochimie-SPR reliés à l'effet de réactions d'oxydoréduction, un test utilisant du bleu de méthylène a été mené. Le potentiel d'oxydoréduction de cette molécule est fixé à -0,275 mV, provoquant un transfert d'électrons vers l'électrode qui va diminuer la résistance de transfert de charge sur cette dernière et causer une augmentation marquée du signal EC-SPR. Afin de valider ces effets, la moitié d'une électrode d'or a été fonctionnalisée avec des oligonucléotides conjugués à des molécules de bleu de méthylène (BM) et l'autre moitié n'a pas été modifiée. Ce complexe est conçu de manière à ce que la molécule de bleu de méthylène, initialement en contact avec l'or ne le soit plus lorsque que le brin d'ARN complémentaire s'hybride avec l'oligonucléotide, ce qui inhibe le transfert de charges entre cette dernière et l'électrode (voir figure 3-11). Ensuite, des molécules de mercaptoéthanol, ayant une forte affinité avec l'or sous forme de liens thiols, ont été ajoutées afin de bloquer électriquement les endroits de la surface d'or n'ayant pas été fonctionnalisés.

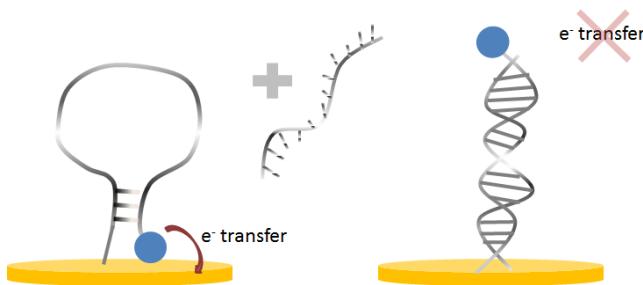


Figure 3-11 : Lorsque les brins d'ARN se lient avec leur brin complémentaire, un changement de conformation éloigne la molécule de bleu de méthylène de la surface d'or et inhibe tout transfert d'électrons entre ces derniers.

Lorsqu'un potentiel alternatif oscillant autour du potentiel de la réaction est appliqué, le signal EC-SPR provient en partie du transfert d'électrons dû à la réaction chimique, mais aussi de l'oscillation entre l'état réduit et oxydé de la molécule qui n'ont généralement pas le même indice de réfraction [39]. Des balayages en fréquence ont été effectués pour 5 conditions distinctes : (i) l'électrode nue, sans modification, à 0V; lorsque le faisceau laser du système électro-SPR est

dirigé vers la section de l'électrode couverte de mercaptoéthanol avec des potentiels de (ii) 0V et (iii) -275mV ainsi que lorsque le faisceau est dirigé sur la section modifiée avec des complexes oligonucléotides-BM, avec des potentiels de (iv) 0V et (v) -275mV. Les profils d'impédance en fonction de la fréquence pour ces 5 conditions expérimentales sont affichés dans la figure 3-12. La figure 3-13 contient les courbes du signal EC-SPR correspondantes. Sans surprise, l'électrode nue a une impédance plus faible et une plus grande admittance, d'où le signal EC-SPR fort. Ensuite, pour les courbes de spectroscopie d'impédance, elles devraient toutes être semblables pour un même potentiel, car ces mesures ne dépendent pas de la position du faisceau laser, le signal provenant de l'ensemble de l'électrode de travail. Cependant, en déplaçant le pétri pour positionner le faisceau, les distances entre les électrodes ont été légèrement modifiées, ce qui explique la différence de hauteur des plateaux caractéristiques de R_S à haute fréquence. La réaction du bleu de méthylène avec l'électrode a un effet beaucoup moins marqué en EIS qu'en electro-SPR, effet surtout visible à basse fréquence.

Pour les courbes EC-SPR, elles sont similaires lorsqu'une tension nulle est appliquée et l'amplitude du signal est relativement faible à cause de la présence de mercaptoéthanol sur la surface, qui bloque le transfert de charge et crée un comportement capacitif. Lorsque l'électrode oscille autour du potentiel redox du bleu de méthylène, le signal EC-SPR est presque nul si le faisceau est dirigé sur la section ne contenant qu'un blocage avec du mercaptoéthanol, mais augmente d'environ un ordre de grandeur s'il est dirigé sur la portion ayant été fonctionnalisée avec des complexes oligonucléotides-BM.

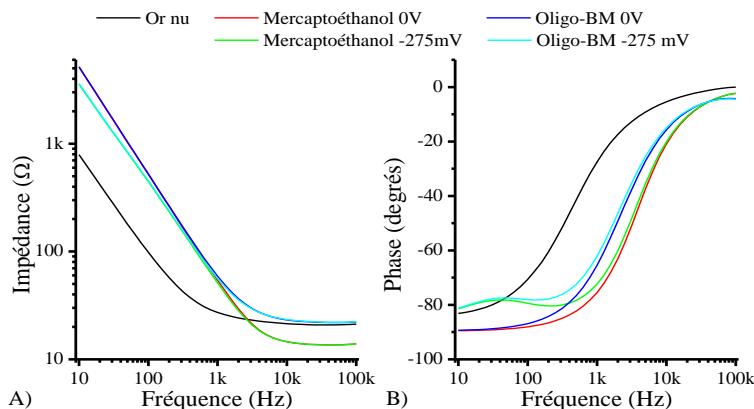


Figure 3-11 : Données obtenues en spectroscopie d'impédance (A : amplitude et B : phase) pour 5 conditions expérimentales : électrode d'or nu (noir), faisceau dirigé sur une zone de l'électrode fonctionnalisée uniquement avec du mercaptoéthanol à 0V (rouge) et -275mV (vert), faisceau dirigé sur une zone

fonctionnalisée avec des complexes oligonucléotides-BM en plus du mercaptoéthanol à 0V (bleu) et -275mV (cyan).

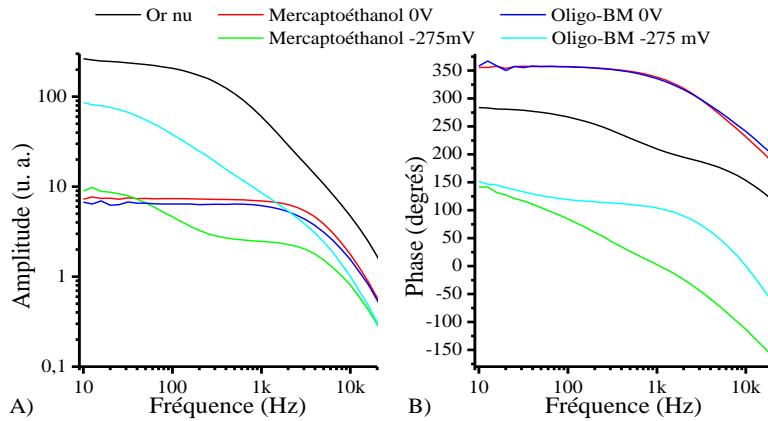


Figure 3-12 : Données obtenues en EC-SPR (A : amplitude et B : phase) obtenues pour les 5 mêmes conditions expérimentales que sur la figure 3-11.

Pour compléter la preuve de concept de ce système lors de l’observation de réactions chimiques, une solution ayant une concentration de 600nM de brins complémentaires aux oligonucléotides présents sur une moitié de l’électrode de travail. Comme mentionné plus haut, lorsque les brins d’ARN se lient avec leurs brins complémentaires, ils changent de conformation, ce qui éloigne les molécules de bleu de méthylène de la surface de l’électrode et inhibe la réaction d’oxydoréduction et le transfert d’électrons entre ces molécules et l’or (figure 3-11). Comme le montre la figure 3-14, l’ajout de brins d’ARN complémentaires cause une diminution marquée du signal EC-SPR, d’un facteur d’environ 3 pour la concentration testée.

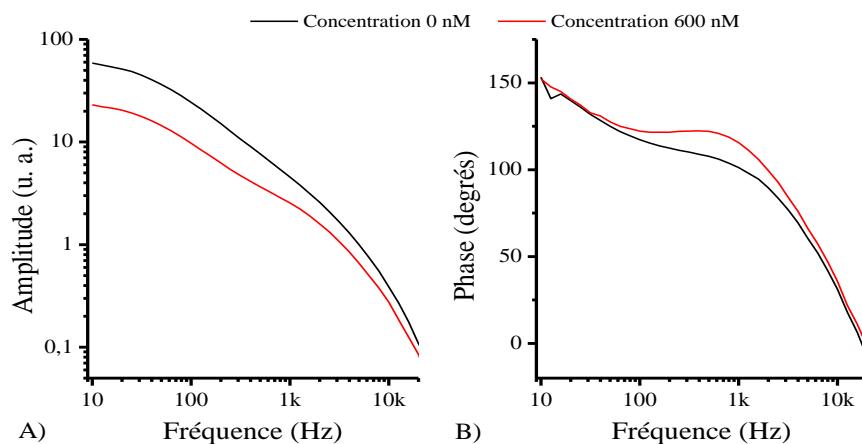


Figure 3-13 : Courbes du signal EC-SPR (A : amplitude et B : phase) sans le brin d’ARN complémentaire (en noir) et en présence d’une concentration de brins complémentaires de 600nM (en rouge).

Ces constatations démontrent l'utilité d'un système électro-SPR pour l'étude de réactions d'oxydoréduction, notamment de réactions ayant lieu de manière hétérogène sur l'électrode puisque le système est sensible uniquement sur la zone de l'électrode ciblée par le faisceau laser.

CHAPITRE 4 TESTS *IN VITRO* SUR CELLULES

L’application finale visée par ce système est l’observation d’une population de cellules soumises à divers stress ou stimulants et ayant été cultivées sur une surface d’or. Dans les expériences présentées ci-dessous, la méthodologie employée consiste à ajouter une solution de trypsine sur les cellules afin de causer leur détachement de la surface, causant une modification radicale des paramètres électriques et optiques de la surface d’or, ce qui devrait être aisément mesurable. Ce test causant une réponse des cellules simple à mesurer fournit donc un bon barème avant de tester des applications plus poussées nécessitant un système plus sensible. Dans un premier temps, les mesures obtenues par SPR uniquement sont introduites, puis les résultats découlant de l’utilisation du système hybride sont présentés pour diverses conditions expérimentales. Les expériences traitées dans cette section ont un faible nombre de répliquats, l’emphase ayant été mise sur le test du plus grand nombre de conditions expérimentales possible. En général, une expérience concluante a été effectuée pour chaque condition expérimentale testée.

4.1 Mesures SPR avec cellules

L’effet de l’injection de trypsine sur une population de cellules cultivées sur une surface d’or dans un système microfluidique a déjà été mesuré à l’aide d’un système SPR basé sur le contraste de phase [57]. Dans un premier temps, le détachement simple des cellules de la surface d’or est étudié à l’aide du système SPR spectral. Pour ce faire, de la trypsine à 37°C est ajoutée sur des populations de cellules baignant dans du PBS afin d’obtenir une concentration finale située entre 0,05% et 0,01%. Le détachement des cellules cause une variation négative de la position spectrale du pic SPR, comme il est possible de voir sur la figure 4-1, où les courbes SPR associées à l’utilisation de trypsine à diverses concentrations sont affichées. L’utilisation d’une faible concentration permet d’étaler l’observation du phénomène de détachement des cellules sur une plus grande période de temps. Lors de la culture cellulaire, de la trypsine à plus forte concentration (0,25%) est généralement utilisée durant une période d’environ 5 minutes pour s’assurer que les cellules sont bien détachées. En SPR, vu la faible profondeur de pénétration de la technique, l’effet s’observe beaucoup plus rapidement : environ 1 minute à 0,05% et jusqu’à 20

minutes à une concentration de 0,01%. Pour la suite, afin de permettre une meilleure observation du détachement des cellules, une concentration de 0,01% sera utilisée.

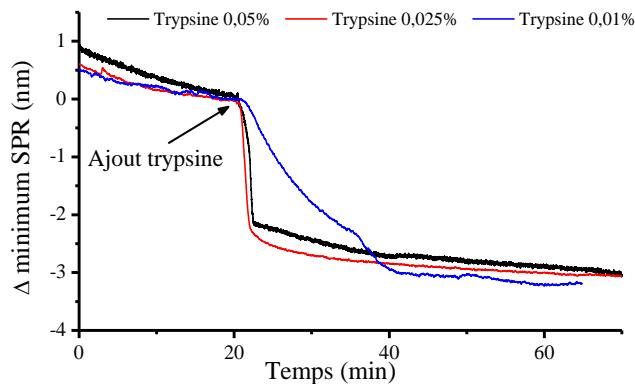


Figure 4-1 : Courbes SPR lorsque différentes concentrations de trypsine sont utilisées.

La figure 4-2 montre des images prises par un microscope en réflexion à divers stades de l'expérience, soit avant l'ajout de la trypsine ainsi que 1, 5, 10 et 20 minutes après son ajout. La trypsine venant cliver certains liens des protéines formant la matrice extracellulaire des cellules, ces dernières cessent de s'étendre sur la surface d'or et se replient sur elles-mêmes jusqu'à atteindre une forme sphérique, à mesure que la trypsine accomplit son action. Bien que la surface soit complètement recouverte de cellules au début de l'expérience, la surface d'or est de plus en plus visible à mesure que les cellules se détachent. Le taux de détachement cellulaire causé par la trypsine n'a pas été quantifié précisément. Cependant, en observant les images de la figure 4-2, il est possible de remarquer que toutes les cellules ou presque sont affectées par la trypsine, comme en témoigne leur forme qui s'arrondie ainsi que la diminution de la surface en contact avec la surface d'or. En effectuant un brassage léger des pétris quelques minutes après l'ajout de trypsine, il est possible de voir que les cellules ne sont plus attachées sur la surface (image non-affichée) mais seulement déposée sur cette dernière et qu'elles y restent grâce à la gravité. Sur l'image 4-2 A), un peu plus de 50% de la surface d'or est visible à l'aide d'un microscope optique. Cependant, la profondeur de pénétration de la SPR étant beaucoup plus faible, de l'ordre de quelques centaines de nm, et considérant que les cellules ont une forme arrondie, la proportion de la surface d'or qui apparaît libérée de cellules lorsqu'elle est sondée par SPR devrait être encore plus grande.

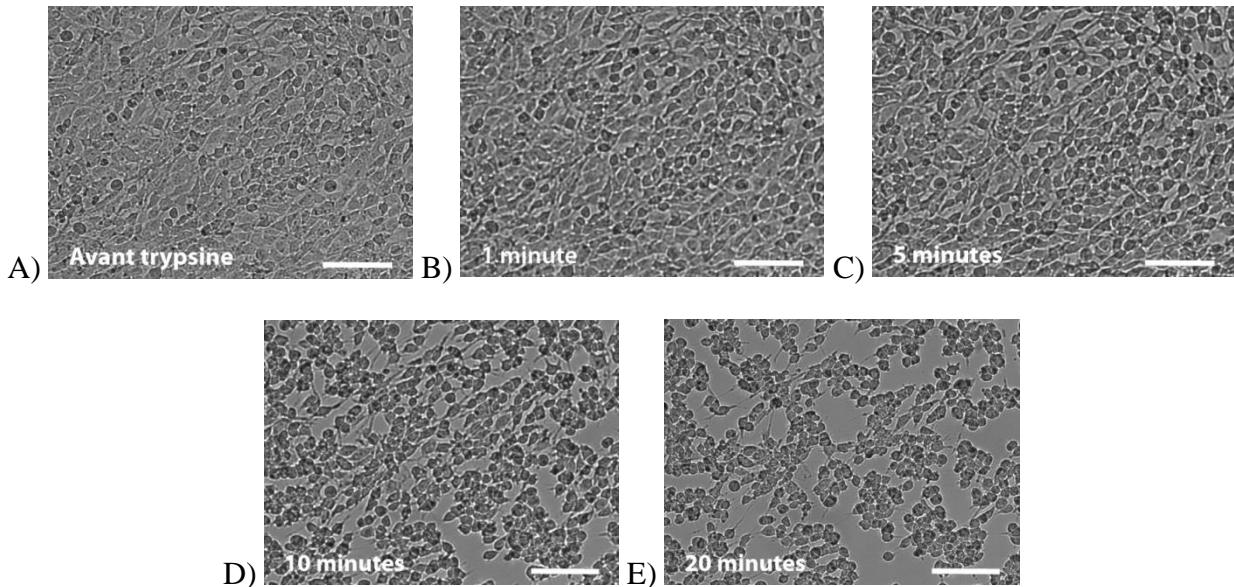


Figure 4-2 : Couche de cellules RGC-5. A) Avant l'ajout de trypsine à une concentration de 0,01%; B) Après 1 minute; C) Après 5 minutes; D) Après 10 minutes et E) Après 20 minutes. Barres de dimension : 100µm. Images obtenues à l'aide d'un microscope optique à contraste de phase.

4.2 Mesures du système hybride avec cellules

Une des applications phares envisagée pour ce système hybride est sans contredit l’observation de cellules et des phénomènes reliés à ces dernières, comme des tests de toxicité ou de migration cellulaire. De tels phénomènes sont couramment observés à l’aide de l’EIS [14], ce qui pourrait se transposer à l’électro-SPR. Dans le cadre de ce projet, l’observation des paramètres électro-optiques d’une couche de cellules RGC-5 durant son détachement de l’électrode de travail suite à l’action de la trypsine est retenue afin de fournir une preuve de concept du système proposé. Pour y arriver, différents paramètres ont été testés, en faisant varier la fréquence de travail utilisée ainsi que le potentiel constant appliqué à l’électrode. Puisque les cellules doivent être cultivées durant quelques journées afin d’atteindre la confluence sur la surface d’or et que les conditions peuvent varier légèrement d’un pétri à l’autre, les résultats des tests employant des cellules sont beaucoup plus variables et moins reproductibles que ceux utilisant de simples monocouches de molécules.

4.2.1 Détachement de cellules RGC-5

Dans cette section, les résultats d'une expérience typique avec une monocouche de cellules RGC-5 sont exposés puis analysés. Durant l'observation du détachement des cellules, un potentiel de 50mV a été appliqué à une fréquence de 50Hz, en l'absence d'un potentiel constant. La trypsine a été ajoutée à la dixième minute pour atteindre une concentration finale de 0,01%. Il convient de noter le fait que, prises individuellement, ces courbes ne représentent pas les meilleurs résultats obtenus. Cependant, puisqu'ils se réfèrent tous au même échantillon, ils ont été retenus afin de présenter le portrait global d'un échantillon.

La figure 4-3 présente les courbes obtenues durant le détachement des cellules. La première courbe (figure 4-3 A) est le signal SPR, où on peut voir la diminution caractéristique de quelques nanomètres causée par la variation de l'indice de réfraction sur la surface d'or. La deuxième (figure 4-3 B) représente l'évolution temporelle de l'amplitude du signal EC-SPR. Lorsque la trypsine est ajoutée, le signal augmente de manière constante, à mesure que les cellules se détachent, jusqu'à se stabiliser à un nouveau plateau correspondant à une augmentation du signal d'environ 25%. Afin de minimiser le niveau de bruit et de stabiliser la courbe, le signal est normalisé par rapport à l'intensité du faisceau lumineux. Cependant, les variations de l'intensité du faisceau peuvent provenir de fluctuations de la source même, mais aussi de variations de l'indice de réfraction sur la surface. De manière générale, la normalisation a surtout permis d'éliminer une source de bruit sans affecter autre mesure l'amplitude du signal. Finalement, l'évolution de la phase est affichée sur la troisième courbe (figure 4-3 C); sa variation est beaucoup moins marquée que celle de l'amplitude du signal SPR alternatif.

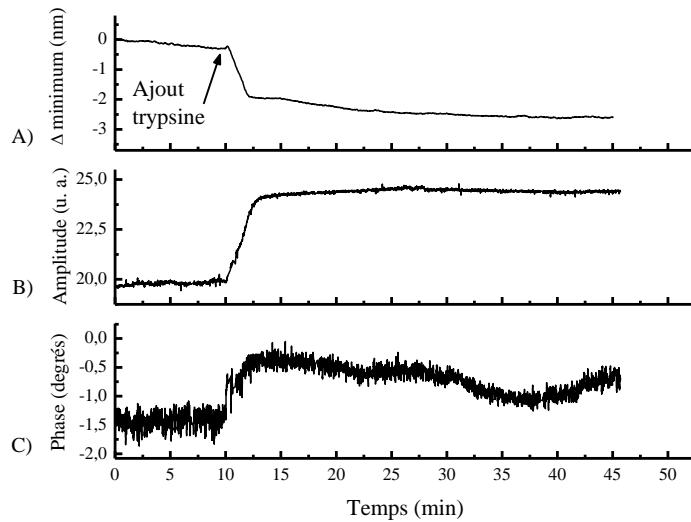


Figure 4-3 : Mesures prises durant le détachement des cellules. A) Mesures SPR; B) Amplitude du signal EC-SPR à 50 Hz, 50 mV d'amplitude et C) Phase du signal EC-SPR.

Avant et après le détachement des cellules, des balayages en fréquence ont été effectués et comparés entre eux. Les résultats ne sont pas aussi spectaculaires que lors de la formation d'une monocouche de molécules sur la surface (voir chapitre 3) car après que les cellules se soient détachées de l'électrode, il reste encore une couche de protéines sur cette dernière, provenant à la fois du milieu de culture utilisé et de la matrice extracellulaire produite par les cellules, la trypsin n'ayant aucun effet sur ces dernières. De plus, il serait difficile de comparer ces résultats avec ceux obtenus à partir d'électrodes non modifiées (or nu) car les conditions expérimentales sont trop différentes d'une électrode à l'autre (conditions de nettoyage, temps d'incubation avec les cellules, intensité de la source d'une expérience à l'autre...). Et au final, c'est l'évolution des cellules sur la surface qui représente l'intérêt principal de ces expériences.

Les courbes d'impédance sont affichées sur la figure 4-4 et les courbes d'électro-SPR sur la figure 4-5. La différence entre les courbes est petite et cela est amplifié par l'utilisation d'une échelle logarithmique. Pour les courbes avec cellules, le modèle incluant une capacité et une résistance en parallèle décrivant la couche de cellules (figure 1-13, équation 4.1) est utilisé tandis que pour les courbes sans cellules, le modèle typique d'une capacité double couche en série avec la résistance de la solution (équation 3.1) donne les meilleurs résultats. Cette manière de faire permet de minimiser l'écart quadratique moyen entre les courbes. Les ajustements obtenus sont d'ailleurs assez justes.

$$Z_{cellules} = \frac{1}{(i\omega)^m C_{DC}} + \frac{R_{cl}}{1+i\omega C_{cl} R_{cl}} + R_s \quad (4.1)$$

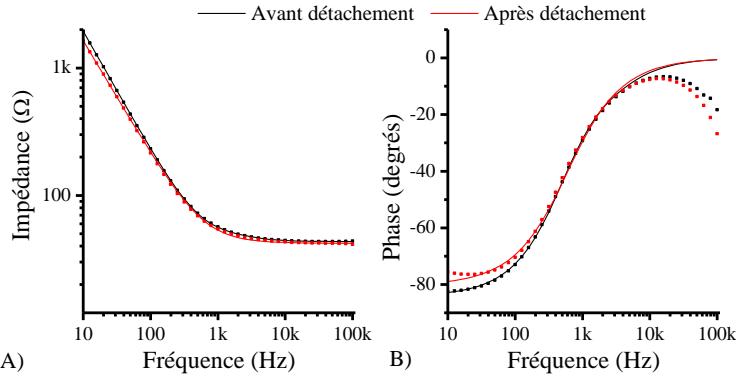


Figure 4-4 : Courbes d'impédance (A) amplitude et B) phase) pour un échantillon avant (en noir) et après (en rouge) le détachement des cellules. Les points représentent les données expérimentales et les courbes, les valeurs calculées à partir des paramètres du tableau 4.1.

Les paramètres ayant permis d'ajuster les courbes d'impédance se trouvent dans le tableau 4.1 et ceux correspondant aux courbes d'électro-SPR sont dans le tableau 4.2. Les paramètres C_{cl} et R_{cl} , correspondant à la capacité et à la résistance de la couche de cellules, ont de très faibles valeurs et contribuent peu au signal qui est dominé par la capacité de l'électrode à basse fréquence et la résistance de la solution à haute fréquence. De plus, en spectroscopie d'impédance, les valeurs du coefficient m , assez éloignées de la valeur idéale de 1 suggèrent une couche de protéines plutôt irrégulière tandis que le même paramètre retrouvé à partir des données d'électro-SPR est très proche de 1, suggérant une capacité idéale. Aussi, les valeurs approximées de la capacité de la couche de cellules par les données de spectroscopie d'impédance et par les données d'électro-SPR divergent d'environ deux ordres de grandeur. Cette importante variation est intrigante et pourrait s'expliquer par l'utilisation de l'outil *Fitting tool* de *Matlab*. En effet, certains paramètres ont moins d'impact sur l'ajustement que d'autres et peuvent varier sur une grande plage de valeurs tout en ayant très peu d'influence sur la valeur calculée de l'EQM. Ainsi, en analysant ces résultats, la couche de cellules semble très fragile et les jonctions intercellulaires ne paraissent pas très fortes, comme en témoignent les faibles valeurs estimées de R_{cl} . La taille de l'électrode ainsi que la présence d'une couche de protéines résiduelles pourraient contribuer à diminuer l'influence des paramètres R_{cl} et C_{cl} .

Tableau 4.1 : Paramètres du circuit équivalent d'une électrode avant et après le détachement des cellules RGC-5, estimés à l'aide des données de spectroscopie d'impédance.

	R_s (Ω)	C_{dc} (μF)	R_{cl} (Ω)	C_{cl} (μF)	m	EQM
Avant détachement	44	11	3,6	14	0,94	1,0
Après détachement	42	15	-	-	0,89	2,7

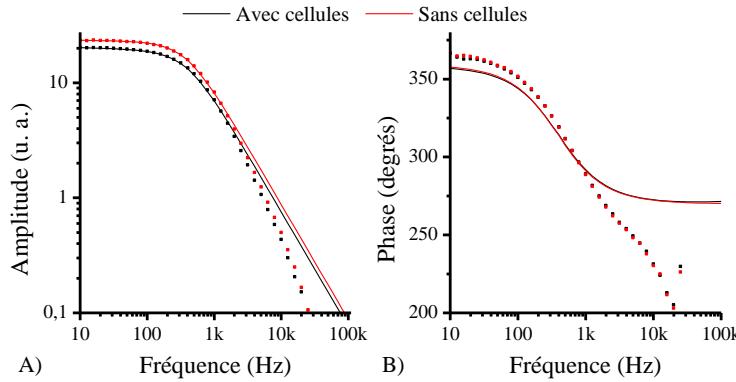


Figure 4-5: Courbes d'EC-SPR (A) amplitude et B) phase) pour un échantillon avant (en noir) et après (en rouge) le détachement des cellules. Les points représentent les données expérimentales et les courbes, les valeurs calculées à partir des paramètres du tableau 4.2.

Tableau 4.2 : Paramètres du circuit équivalent d'une électrode avant et après le détachement des cellules RGC-5, estimés à l'aide des données d'électrochimie-SPR.

	R_s (Ω)	C_{dc} (μF)	R_{cl} (Ω)	C_{cl} (μF)	m	α (u.a.)	EQM
Avant détachement	50	8,4	4,5	0,1	0,98	$2,6 \times 10^6$	0,2
Après détachement	46	9,7	-	-	0,99	$2,5 \times 10^6$	0,3

4.2.2 Influence du potentiel appliqué

Comme il a déjà été mentionné, l'application d'un potentiel fixe sur l'électrode de travail peut avoir d'importantes conséquences sur les résultats d'une expérience, surtout en sachant que les cellules portent une charge résiduelle négative sur leurs membranes cellulaires. De plus, les potentiels électriques jouent un rôle prépondérant dans la fonction physiologique d'un grand nombre de cellules, par exemple lors d'une contraction musculaire ou de la transmission d'un influx nerveux. Afin d'étudier l'impact de ce paramètre expérimental, un des premiers tests effectués a été de prendre des balayages en fréquence pour différents potentiels appliqués avant et

après le détachement des cellules. Ensuite, le ratio entre les mesures avant et après le détachement des cellules est calculé pour différents potentiels à chaque fréquence. Ces résultats sont affichés dans la figure 4-6 qui montre que les données prises à 0mV ou -200mV donnent généralement un meilleur contraste entre les mesures prises avant et après le détachement des cellules, surtout à des fréquences plus faibles que 200Hz.

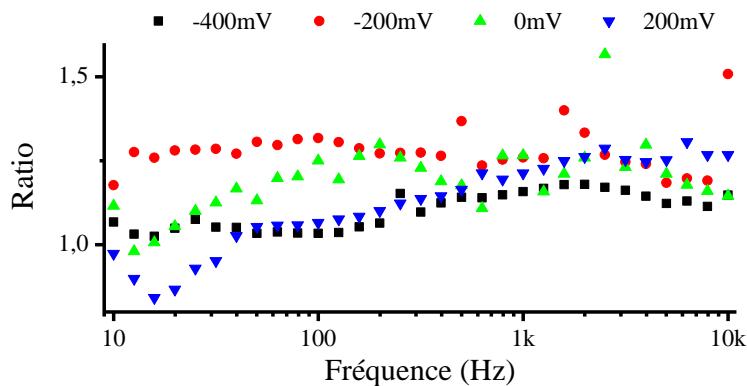


Figure 4-6 : Ratios avant et après le détachement des cellules sur l'électrode pour la plage de fréquence entre 10Hz et 10kHz pour différents potentiels fixes appliqués.

Selon ce graphique, une augmentation de 25% du signal EC-SPR accompagne le détachement de la couche de cellules RGC-5 lorsqu'un potentiel de -200mV est appliqué (points rouges), ce qui est légèrement plus élevé que sans potentiel appliqué (points verts). De plus, lorsqu'un potentiel négatif trop fort est appliqué, cette augmentation semble moins marquée et la tendance peut même s'inverser pour un potentiel positif. Cela pourrait s'expliquer par la présence de charges négatives sur les membranes cellulaires. Ainsi, en présence d'un potentiel positif, les cellules pourraient être attirées par l'électrode, même après que la trypsine ait brisé les liens entre ces dernières. L'application d'un potentiel négatif pourrait avoir l'effet inverse en causant une force de répulsion entre l'électrode et les cellules, ce qui faciliterait le détachement des cellules suite à l'action de la trypsine. Un potentiel trop fort pourrait cependant perturber l'activité des cellules, sans améliorer la qualité des résultats.

Ensuite, plusieurs expériences ont été effectuées en travaillant à un potentiel légèrement négatif de -200mV et se sont avérées concluantes. Les courbes présentées dans la figure 4-7 correspondent à une expérience durant laquelle un potentiel fixe de -200mV est ajouté à un potentiel alternatif de 50mV à 100Hz. De la trypsine à une concentration de 0,01% a été ajoutée à la vingtième minute. La figure 4-7 A correspond au signal SPR et affiche la décroissance

habituelle tandis que la courbe 4-7 B représente l'amplitude du signal EC-SPR en fonction du temps. Suite à l'action de la trypsine, l'amplitude de ce signal croît de 35%, un résultat significatif permettant d'envisager des applications plus poussées pour ce système que le simple détachement de cellules.

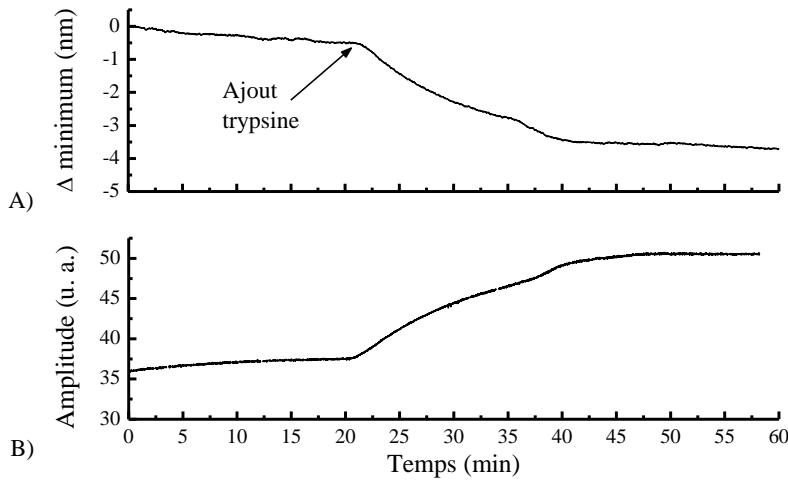


Figure 4-7 : Ajout de trypsine à une concentration de 0,01% à 20 minutes, potentiel alternatif de 50mV à 100Hz avec un potentiel fixe de -200mV. A) Signal SPR spectral et B) signal EC-SPR.

4.2.3 Influence de la fréquence utilisée

Ensuite, différentes fréquences de travail ont été utilisées lors du détachement des cellules de la surface d'or avec un potentiel fixe de -200mV appliqué sur l'électrode de travail. Le graphique 4-8 affiche les courbes de l'amplitude du signal EC-SPR durant le détachement des cellules lorsque de la trypsine à une concentration de 0,01% est ajoutée à la dixième minute de chaque expérience. Les courbes ont été normalisées par rapport à leur ligne de base afin de mieux comparer les courbes entre elles. En effet, d'une expérience à l'autre, plusieurs facteurs comme l'alignement optique, la qualité de la surface d'or utilisée, la confluence des cellules et la qualité de leur attache sur la surface font varier l'amplitude du signal mesuré. La normalisation permet d'aplanir ces différences. Le signal à 1kHz augmente légèrement moins que les signaux à 50Hz et 100Hz, ce qui s'explique par une diminution du signal EC-SPR à haute fréquence (signal qui est inversement proportionnel à la fréquence), comme en témoignent les courbes de balayages en fréquence. En revanche, c'est la courbe la moins bruitée. À 50Hz, malgré un signal fort, le bruit est assez important pour distordre considérablement les données. Il a été corrigé pour les 3 courbes affichées afin qu'elles soient plus lisibles, mais le bruit est tout de même perceptible,

surtout pour la courbe à 50Hz (en noir). Le tableau 4.3 compare quelques paramètres de ces courbes à différentes fréquences : l'augmentation relative du signal suite au détachement des cellules, le bruit de la ligne de base normalisée ainsi que l'amplitude du signal de la ligne de base. Le meilleur compromis semble donc être une fréquence de travail de 100Hz afin de réduire le bruit du signal (d'environ un facteur 3) tout en obtenant une amplitude de signal maximale. Certains paramètres du *lock-in* comme le gain ou la constante de temps ont été ajustés lors d'expériences préliminaires afin de diminuer ce niveau de bruit.

Tableau 4.3 : Caractéristiques expérimentales de signaux typiques d'électro-SPR à différentes fréquences.

	Augmentation du signal	Bruit normalisé	Force du signal (u. a.)
50Hz	37%	0,039	24
100Hz	37%	0,013	38
1kHz	30%	0,010	26

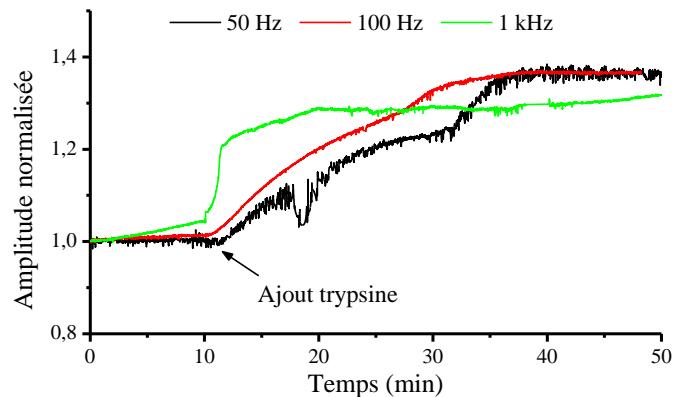


Figure 4-8 : Courbes d'électro-SPR lors de l'ajout de trypsine pour différentes fréquences de travail.

4.2.4 Dépendance spatiale des mesures

Le fait que les mesures prises en EC-SPR dépendent de la position du faisceau lumineux sur l'électrode représente un avantage incontestable de la méthode ayant déjà mené à des systèmes d'imagerie électro-SPR pour l'observation de cellules [38] où à des expériences impliquant des réactions chimiques inhomogènes sur l'électrode [49], comme présenté dans la section 3.3. De plus, c'est un avantage lors de tests impliquant des cellules, car comme le montre la figure 2-5, les cellules en périphérie de l'électrode couvrent moins bien la surface et ne développent pas de jonctions intercellulaires. Cela invalide l'utilisation du modèle électrique

équivalent impliquant une résistance et une capacité, les trous entre les cellules agissant comme des courts-circuits mis en parallèle à ces composants. Or, en dirigeant le faisceau lumineux au centre de l'électrode, où il y a confluence de la couche cellulaire, les mesures correspondent au flux d'électrons traversant localement la couche de cellules.

Afin de démontrer cela, des mesures ont été prises avec des échantillons sur lesquels les cellules n'avaient pas poussé uniformément, c'est-à-dire, où il y avait une zone avec une couche de cellules à confluence et une autre où les cellules n'avaient pas poussé. À l'aide d'une plateforme pouvant être déplacée en translation, la position du faisceau sur l'électrode peut être contrôlée. Durant l'expérience présentée sur la figure 4-9, le faisceau a été dirigé dans un premier temps sur une zone couverte de cellules (jusqu'à la 15e minute). Pour les 10 minutes suivantes, il a été placé sur une zone ne contenant pas de cellules, ce qui a permis d'augmenter le signal. Ensuite, lorsque le faisceau a été repositionné à la position de départ, couverte de cellules, le signal est redescendu au même niveau qu'en début d'expérience. L'ajout de trypsine à une concentration de 0,025% à la 32e minute a causé une augmentation soutenue du signal lors du détachement des cellules, jusqu'à un niveau supérieur à celui enregistré dans la zone sans cellules. Durant cette expérience, une fréquence de travail de 100 Hz a été retenue.

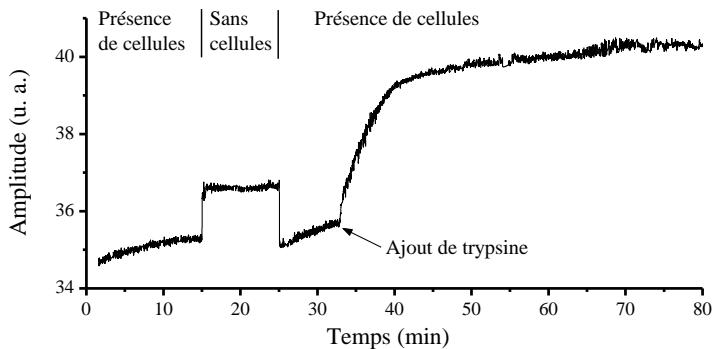


Figure 4-9 : Déplacement spatial entre une zone sans cellules (minutes 15 à 25) et une zone couverte de cellules (minutes 0 à 15 et 25 à 80). De la trypsine a été ajoutée au pétri à la 32^e minute.

Ce résultat démontre bien l'impact du positionnement spatial du faisceau lumineux sur l'électrode et ouvre la porte à diverses applications impliquant des phénomènes inhomogènes sur la surface. Par exemple, une surface d'or contenant plusieurs électrodes de travail adjacentes soumises à diverses conditions expérimentales (fréquence de travail ou potentiel appliqué) pourraient être testées simultanément. Les cellules d'une section de l'électrode pourraient aussi

être endommagées (par électrochoc ou par grattage mécanique) et leur régénération sur la surface suivie à l'aide d'une référence. La fonctionnalisation de la surface pourrait aussi varier spatialement, ce qui pourrait occasionner la détection simultanée de plusieurs analytes selon l'endroit sur l'électrode ou une croissance différenciée des cellules selon la protéine d'adhérence utilisée localement (fibronectine, laminine ou autre).

CHAPITRE 5 PORTÉE DE CES RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les résultats présentés dans le chapitre précédent sont intéressants et ouvrent la voie à des expérimentations plus poussées avec la méthode d'électrochimie-SPR. Cependant, en termes de précision, ces résultats d'électro-SPR ne rivalisent pas avec les techniques couramment répandues d'observation de cellules, comme celles utilisant un microscope optique, l'électrochimie (ECIS) ou encore la fluorescence, car, pour l'instant, le bruit est souvent plus élevé et le signal plus faible. Ce chapitre explore diverses idées mises de l'avant afin d'améliorer le rapport signal sur bruit de la méthode. Tout d'abord, une analyse de l'impact des résultats contenus dans ce travail est élaborée. Ensuite, certaines solutions explorées afin d'améliorer la qualité des résultats sont présentées. Le chapitre conclut en proposant quelques pistes d'actions à entreprendre afin d'améliorer les performances du biocapteur hybride, d'élargir le spectre d'applications possibles et d'approfondir l'analyse des mesures effectuées.

5.1 Impact des résultats

Le biocapteur hybride développé permet de réaliser des mesures multiparamétriques combinant d'une manière active l'électrochimie à la SPR. Un tel système peut trouver de nombreuses applications en biodétection ou en observation de phénomènes biologiques ou cellulaires. Cet outil s'avère très efficace pour l'observation de la formation de monocouches moléculaires, comme montré dans la section 3.2. Cela tient en partie du fait que la formation d'une SAM change dramatiquement les propriétés de l'électrode de travail, mais aussi de la sensibilité du système à une mesure qui influence toute la surface de l'électrode de manière égale (en contraste avec l'observation de cellules qui se trouvent surtout au centre de l'électrode). Pour la biodétection d'analytes à faibles concentrations, le système comme il est proposé actuellement ne serait pas idéal, car l'ajout de quelques molécules sur la surface de l'électrode (qui fait plusieurs mm²) affecterait peu le signal mesuré.

Les mesures d'électro-SPR peuvent être reliées à l'admittance électrique de l'électrode, ce qui a été démontré par l'utilisation de circuits équivalents afin d'ajuster les valeurs théoriques avec les mesures expérimentales. Cependant, la méthode d'analyse utilisée (*fit* de courbes avec l'outil *Curve fitting tool* de Matlab) a des limites, notamment lorsque le nombre de paramètres

utilisés est grand. Il conviendrait donc de revoir cette méthode afin de diminuer les incertitudes qu'elle soulève.

Par contre, l'observation de réactions d'oxydoréduction sur la surface est aussi un champ d'application très prometteur (section 3.3) sur lequel des travaux sont présentement effectués au sein du groupe de recherche du professeur M. Meunier. En effet, cette méthode pourrait permettre de réduire l'influence du signal non spécifique sur les mesures, car le signal mesuré provient de la présence d'une réaction redox sur l'électrode (ou de son absence). L'adhésion de molécules non désirées sur la surface peut causer une variation de l'indice de réfraction local sans pour autant influencer le signal provenant du transfert d'électrons lorsque la molécule redox étudiée (bleu de méthylène ou autre) est en contact avec l'électrode. Un tel biodétecteur permet donc dans une certaine mesure de distinguer les interactions électroniques (réaction redox) des réactions d'affinité entre la surface de l'électrode et les analytes étudiés. De plus, cette mesure est indépendante de l'aire de l'électrode étudiée, puisque la densité de courant est proportionnelle à la densité locale de molécules redox (à condition de se trouver au potentiel caractéristique de la réaction étudiée). Cependant, comme il a été discuté plus haut, en l'absence de réaction redox sur l'électrode, l'aire de cette dernière devient un enjeu important dont il faut tenir compte, à moins d'étudier une réaction entraînant un changement radical des propriétés électriques de l'électrode sur l'entièreté de sa surface, comme durant la formation d'une SAM.

Le biocapteur hybride proposé a un potentiel certain pour l'étude de différents processus cellulaires comme le montre certains des résultats présentés dans le chapitre précédent, pour lesquels le signal augmente d'environ 40% lorsque les cellules se détachent de la surface. Dans un cas idéal, le signal augmenterait de 100% ou même plus. Cependant, comme preuve de concept, ces résultats font miroiter un potentiel intéressant pour l'étude de divers processus cellulaires à l'aide d'une méthode combinant l'électrochimie et la SPR. De plus, ce biocapteur hybride permet une observation de cellules par SPR malgré une faible profondeur de pénétration, car c'est la variation de la densité électronique sur la couche d'or modulée par le comportement des cellules sur l'électrode qui est mesurée. D'ailleurs, une variante de cette méthode utilisant un système d'imagerie électro-SPR avec des cellules a déjà été appliquée à l'étude de l'apoptose ainsi qu'à la récupération d'électrochocs [38]. De plus, les résultats fournissent des mesures quantitatives sur l'état de la couche de cellules étudiée, ce qui simplifie et complète grandement l'analyse de ces cellules, qui est très souvent effectuée à l'aide d'images prises au microscope.

Dans ce projet, le détachement complet des cellules causé par l'action de la trypsine a été observé. C'est un changement trop radical pour la couche de cellules pour être d'un réel intérêt pratique ou clinique mais qui constitue tout de même un bon point de départ lors de tests préliminaires d'EC-SPR. L'action d'une toxine (lipopolysaccharides, azoture de sodium ou autre) ou d'un médicament (médicament contre le cancer) sur une population de cellules, à une faible concentration, par exemple pour satisfaire des normes de Santé Canada, aurait fort probablement un effet beaucoup moins marqué et moins rapide que la trypsine sur la population de cellules. Avec un système EC-SPR plus perfectionné, il serait probablement possible de détecter de tels changements, que ce soit une variation du taux de couverture de la surface ou un changement de conformation des cellules et de les relier à des concentrations des produits chimiques testés. Cependant, avant de pouvoir utiliser ce biocapteur pour des applications plus poussées, il faudra améliorer de nombreux aspects expérimentaux qui s'y rattachent. La suite de ce chapitre propose quelque pistes de réflexion afin d'améliorer les performances et la sensibilité du biocapteur hybride développé.

5.2 Améliorations tentées

Afin d'améliorer les résultats des tests effectués avec des cellules, deux expériences ont été tentées avec des résultats mitigés.

Dans un premier temps, des électrodes circulaires ont été fabriquées afin que la couche de cellules puisse recouvrir complètement la partie métallique de ces dernières (figure 5-1 A). Ces électrodes ont été conçues afin d'éviter la situation décrite dans la figure 2-5, lorsque les cellules ne recouvrent pas la périphérie de l'électrode tout en ayant atteint la confluence au centre. Une telle situation risque fortement de diminuer le courant circulant au centre de l'électrode (où la présence de cellules augmente l'impédance locale) en faveur de la périphérie, où l'impédance électrique est plus faible. Normalement, en EIS, l'électrode de travail a une surface beaucoup plus faible que la contre-électrode, d'environ deux ordres de grandeur [14, 34], ce qui concentre l'impédance du système et de toute variation de cette dernière sur l'électrode de travail.

Des électrodes circulaires de différents diamètres (2, 3 et 4 mm, voir figure 5-1A) en or ayant une épaisseur de 50nm ont été déposées sur des morceaux de lamelles de microscope en salle blanche. Pour ce faire, un protocole composé d'une étape de photolithographie suivie d'un

dépôt de 3nm de chrome puis de 50nm d'or par évaporation. Les cellules ont bien réagi à ces électrodes et ont pu couvrir complètement les électrodes, comme le montre la figure 5-1 B, sur laquelle des cellules sur la limite de l'électrode sont visibles, le haut de la figure correspondant à une surface d'or et le bas à du verre. Encore une fois, les cellules n'ont pas réussi à pousser en périphérie, mais cette région est du verre et ne fait plus partie de l'électrode. Cependant, l'utilisation de ces électrodes circulaires n'a pas amélioré significativement le signal obtenu. Cela est probablement dû au fait que la taille de l'électrode de travail est encore du même ordre de grandeur que la contre-électrode, ce qui diminue son impédance relative dans le système. De plus, vu le nombre de cellules nécessaires pour la recouvrir, il serait surprenant que l'uniformité de la couche de cellules soit maintenue sur toute cette surface. Cependant, une électrode ayant une surface minimale est nécessaire afin de pouvoir y diriger un faisceau lumineux assez gros pour générer un signal EC-SPR suffisant sans avoir à utiliser une trop grande densité d'énergie lumineuse, qui pourrait être dommageable pour les cellules.

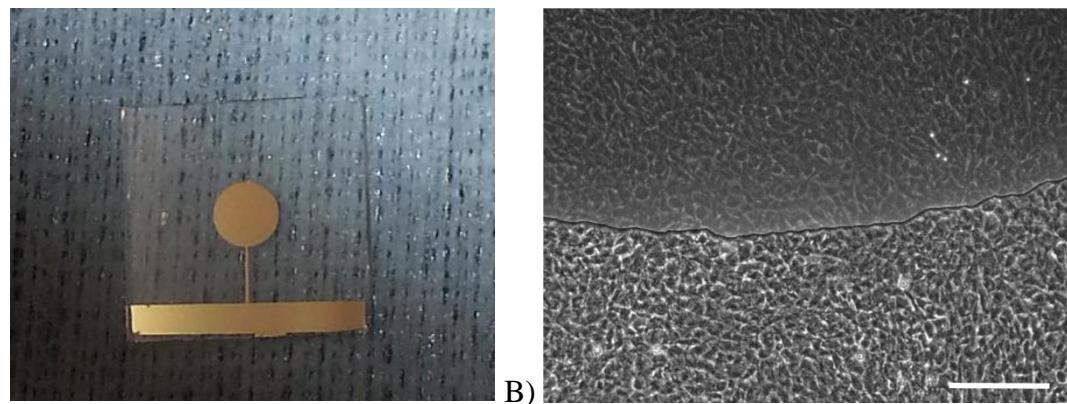


Figure 5-1 : A) Électrode circulaire fabriquée en salle blanche; la bande en or dans le bas sert à assurer le contact électrique avec le potentiostat. **B)** Photo de cellules RGC-5 situées à la limite de l'électrode, le haut de la photo étant de l'or et le bas du verre. Barres de dimension : 150µm.

L'autre tentative pour augmenter le contraste entre la présence et l'absence de cellules sur l'électrode a été d'incuber les cellules avec des molécules permettant de bloquer électriquement la surface d'or non occupée par des cellules juste avant d'effectuer une expérience. Ainsi, lorsque les cellules se détacheraient, elles exposerait de l'or sur lequel il pourrait y avoir un transfert de charge ou un courant capacitif important. Pour ce faire, les molécules retenues ont été le mercaptoéthanol ainsi que les PEG-SH. Bien que ces molécules soient très efficaces pour bloquer les transferts de charge sur la surface d'or, leur utilisation pourrait s'avérer toxique pour les

cellules. Les résultats préliminaires semblent démontrer que ces molécules endommageraient la couche de cellules et pourraient même causer un détachement prématûre de cette dernière. D'autres molécules biocompatibles pourraient certainement être utilisées à la place du mercaptoéthanol ou des PEG-SH afin d'accroître le contraste entre le signal EC-SPR en présence et en l'absence de cellules sur la surface d'or. Cependant, un autre aspect à considérer est que l'électrode, en plus des cellules, est aussi couverte d'une couche de protéines provenant du milieu de culture ainsi que de la matrice extracellulaire générée par les cellules. Ces protéines ne se détacheront pas sous l'effet de la trypsine et l'état initial de l'électrode d'or nu ne sera jamais retrouvé. Cette couche de protéines agira donc comme une capacité supplémentaire ajoutée en série à la capacité double couche de l'or nu et contribuera à bloquer l'intensité du signal EC-SPR mesuré. L'ajout d'une couche de molécules, comme proposé plus haut, ne pourra empêcher l'effet de cette couche de protéines et va peut-être simplement réduire d'autant plus le signal.

5.3 Étapes futures

Plusieurs solutions sont envisageables pour améliorer la qualité des résultats obtenus en EC-SPR ou les rendre plus significatifs pour des applications concrètes comme des tests de cytotoxicité. Des événements affectant les jonctions intercellulaires (associées à la résistance de la couche de cellules) ou l'intégrité des membranes cellulaires (associées à une capacité) seraient des candidats de choix pour de potentielles applications du biocapteur hybride. Par exemple, la perforation de membranes cellulaires par des nanoparticules plasmoniques activées par un laser pourrait logiquement être suivie en électrochimie-SPR car l'effet capacitif de la membrane serait compromis par ces perforations. Cependant, afin d'espérer étendre l'utilisation du biocapteur proposé à de telles applications, les conditions expérimentales du système devront être optimisées, tout comme les protocoles biologiques utilisés (type de cellules, fonctionnalisation de l'électrode, etc.).

Une application logique pour un biocapteur combinant l'électrochimie et la SPR serait d'utiliser le potentiel appliqué à l'électrode de travail afin d'attirer des molécules chargées près de l'électrode par diélectrophorèse [58]. Cela permettrait de surmonter les limites de transport de masse qui affectent souvent les systèmes microfluidiques, surtout en présence de faibles concentrations d'analytes. La détection SPR serait ainsi facilitée et de plus faibles limites de

détection seraient atteignables. Le potentiel appliqué pourrait aussi aider à fonctionnaliser la surface.

Ensuite, une manière intéressante d'amplifier le signal serait d'ajouter du ferrocyanide ou toute autre molécule active en oxydoréduction dans la solution utilisée durant une expérience impliquant des cellules, tant que cette molécule n'est pas toxique pour les cellules considérées. Le ferrocyanide est une molécule active en redox qui est souvent utilisée pour amplifier le signal obtenu en EIS. Lorsque l'électrode est dégagée, la molécule peut interagir avec cette dernière et procurer un signal de grande amplitude. Cette amplitude diminue fortement lorsque l'électrode est bloquée. Cette technique a notamment été utilisée pour observer l'attache de bactéries sur une surface [59]. La résistance de transfert de charge, considérée comme infinie jusqu'à présent doit alors être prise en compte, car l'ajout de molécules redox en diminue fortement la valeur. De plus, certaines protéines démontrent aussi une activité en oxydoréduction [60], ce qui ouvrirait la porte à leur utilisation en biodétection. L'expression de telles protéines par des cellules pourrait être suivie en électro-SPR. Dans le cas de protéines membranaires, le contact de ces membranes pourrait activer la réaction d'oxydoréduction tandis qu'un changement de conformation l'inhiberait, ce qui aurait le potentiel d'améliorer le contraste lors du détachement des cellules.

De nombreuses améliorations de l'aspect biologique de ce projet seraient à prévoir, notamment en ce qui a trait au choix de la lignée cellulaire. En effet, des cellules ne formant pas de jonctions intercellulaires étanches ne permettront pas d'obtenir un contraste optimal entre le signal obtenu avant et après le détachement des cellules [33]. Bien que les cellules RGC-5 aient déjà été utilisées pour des expériences d'EIS [51], ces caractéristiques n'ont pu être retrouvées de manière totalement satisfaisante durant ce projet. Cela peut être dû à plusieurs facteurs, dont les conditions de culture cellulaire, les conditions expérimentales (expériences effectuées à température pièce dans du PBS) ou encore la taille de l'électrode utilisée. De plus, en vue d'effectuer des expériences plus poussées utilisant des cellules, il serait important de fournir des conditions expérimentales optimales pour les cellules, en commençant par l'ajout d'une enceinte dans laquelle la température et la concentration en CO₂ sont contrôlées à 37°C et 5% respectivement. L'utilisation de milieu de culture au lieu de PBS durant les expériences permettrait aussi aux cellules d'être moins affectées par le déroulement des expériences. En ce moment, la durée des expériences est limitée, car bien que le PBS utilisé pour remplacer le milieu de culture soit chauffé à 37°C, il refroidit avec le temps, en plus de ne pas contenir de nutriments

pour les cellules. Avec une enceinte expérimentale, il serait concevable d'observer la croissance de cellules sur l'électrode ou encore d'effectuer des tests de cytotoxicité, des expériences s'étalant généralement sur des durées de plus de 24h, ce qui n'est pas le cas avec le système actuel. De plus, cela stabiliseraient les cellules ainsi que le système en entier, ce qui contribuerait à diminuer le niveau de bruit du signal. L'utilisation de protéines d'adhérence comme la fibronectine devrait aussi être envisagée afin de faciliter la formation d'une monocouche de cellules.

De plus, la démarche d'analyse effectuée nécessiterait quelques raffinements afin de la rendre plus rigoureuse et d'augmenter la portée des résultats retrouvés. En effet, comme mentionné au troisième chapitre, la méthode d'analyse utilisant des *fits* des données expérimentales par-rapport à un modèle théorique comporte des limites, en particulier lorsque le nombre de paramètres devient trop élevé. L'utilisation de paramètres placés en exposant comme le coefficient m peut aussi rapidement causer des instabilités du *fit*. Ainsi, les mesures de la résistance de la solution ainsi que de la capacité double couche pourraient être effectuées séparément des mesures d'electro-SPR, en prenant par exemple une mesure d'impédance à très haute fréquence pour mesurer la résistance de la solution et une autre à plus basse fréquence pour estimer la valeur de la capacité double couche. Cela pourrait permettre d'avoir deux paramètres de moins à inclure dans le traitement des données EC-SPR. De plus, il serait impératif de mener une analyse de la sensibilité des divers paramètres utilisés. Il est important aussi de noter que cette méthode d'analyse a permis de comprendre les phénomènes en cours mais que lors de vrais tests en laboratoires de biodétection (soit d'un analyte, soit d'un phénomène cellulaire), une procédure plus rapide et plus simple qu'une analyse par ajustement serait de mise. L'idéal serait de trouver une fréquence de travail optimale et d'ensuite mesurer l'amplitude du signal EC-SPR à cette fréquence et de la relier au phénomène étudié. L'étude de la double couche capacitive devrait aussi être approfondie et reliée à un modèle théorique (Helmholtz, Gouy-Chapman ou autre [21]) afin de bien en comprendre la composition et d'en évaluer les caractéristiques avec plus de précision.

Expérimentalement, de nombreuses améliorations seraient possibles. Le principal obstacle à l'obtention de mesures de haute qualité est sans contredit le niveau de bruit dans ces dernières, qui doit être diminué. L'ajout d'un puissancemètre couplé à une lame séparatrice permettrait de normaliser les mesures en temps réel avec la puissance à la sortie de la source lumineuse, ce qui

diminuerait le bruit présent dans le signal. Pour le moment, la normalisation est effectuée avec l'intensité du faisceau lumineux utilisé en EC-SPR, qui varie avec l'indice de réfraction près de la surface de l'électrode, une situation non idéale qui permet tout de même de stabiliser le signal. Comme spécifié plus tôt, l'optimisation de la taille de l'électrode de travail sera déterminante pour les applications futures. De plus, l'intensité du faisceau lumineux doit être contrôlée afin d'affecter minimalement les cellules, tout en étant suffisamment élevée pour fournir un signal EC-SPR fort, sans devoir couvrir une trop grande surface de l'électrode. Par ailleurs, des systèmes utilisant des sources lumineuses dans le proche infrarouge ont été proposés pour des applications utilisant des cellules ou des bactéries, lorsqu'une distance de pénétration accrue des plasmons est souhaitable [61]. Cependant, l'utilisation d'une source infrarouge ne permettrait pas d'améliorer la sensibilité lors de la mesure de la densité électronique dans l'électrode, la profondeur de pénétration accrue étant surtout utile lors de la détection de variations de l'indice de réfraction. Finalement, en vue de simplifier le système et d'en diminuer le coût, le potentiostat pourrait être remplacé par un générateur de fonction, au détriment de la polyvalence du système actuel qui permet des balayages en fréquence ou en potentiel.

Des modifications plus substantielles du système EC-SPR pourraient être très bénéfiques pour les performances de ce dernier. L'utilisation d'un système d'imagerie au lieu d'un unique photodétecteur permettrait de tirer profit de la résolution spatiale fournie par cette technique qui permettrait d'imager directement l'impédance électrique en chaque point de l'électrode. Cependant, l'utilisation d'un *lock-in* deviendrait alors désuète (à moins d'utiliser un appareil par pixel). Il faudrait utiliser des logiciels de traitement de signal afin d'imager les composantes fréquentielles du signal mesuré à la fréquence choisie. Une autre manière de tirer parti de la résolution spatiale serait de séparer le faisceau lumineux en deux et de sonder simultanément deux zones distinctes de l'électrode, soit dans deux canaux différents du *lock-in* (en parallèle) ou en mode soustractif (un des signaux est alors utilisé comme une référence).

Finalement, l'utilisation de structures nanométriques plasmoniques en tant qu'électrode de travail pourrait ouvrir la voie à de nouvelles applications [42], notamment en biodétection, mais permettrait aussi de simplifier significativement le montage expérimental, car la présence d'un prisme ne serait plus nécessaire. De plus, le photodétecteur et la caméra pourraient être utilisés autant en transmission qu'en réflexion, ce qui ajouterait de la flexibilité au montage.

CONCLUSION

Le but premier de ce projet était de valider la possibilité d'utiliser un biocapteur hybride combinant la plasmonique à l'électrochimie de manière active à des fins d'observation biologique. Pour y arriver, une couche mince d'or déposée sur du verre a été utilisée simultanément comme support de plasmons de surface et comme électrode de travail. Cette électrode est ensuite soumise à un potentiel alternatif de faible amplitude à une fréquence donnée et la composante de l'intensité du faisceau lumineux utilisé pour les mesures SPR variant à la même fréquence est déterminée et mesurée en temps réel à l'aide d'un amplificateur à détection synchrone (*lock-in amplifier*). De cette façon, c'est le potentiel appliqué qui cause une variation du signal SPR, en modifiant la densité de charge dans la couche d'or, qui à son tour influence les conditions de couplage des plasmons de surface. L'utilisation d'un potentiostat permet de nombreuses possibilités expérimentales comme le balayage d'un spectre de fréquence ou d'une plage de potentiel, comme en voltamétrie cyclique.

Les applications possibles pour un tel système hybride sont nombreuses et vont de la simple biodétection, à l'observation de la formation de monocouches moléculaires sur l'électrode ou encore l'observation de cellules. La mesure des propriétés électro-optiques de la surface d'or durant la formation d'une monocouche autoassemblée de molécules comme le mercaptoéthanol a servi à calibrer, étudier et comprendre le système, en plus de permettre de valider la justesse des circuits équivalents à l'électrode de travail. Il a ainsi été déterminé qu'en l'absence de couple de molécules redox, le circuit permettant de décrire l'électrode consiste en une capacité double couche non idéale (élément à phase constante décrit par un coefficient m) en série avec la résistance électrique de la solution. De plus, le blocage du transfert d'électrons sur l'électrode de même que l'augmentation de l'épaisseur de la couche capacitive causés par l'ajout d'une SAM sur l'or provoquent une diminution du signal EC-SPR d'un facteur allant de 8,9 (mercaptoéthanol) à 93 (PEG-SH). Le dépôt d'une couche de protéines, formant une couche moins ordonnée engendre une diminution moindre, comme l'a montré un test avec de la BSA (facteur de 3,3).

Il a aussi été démontré que l'utilisation de molécules redox comme le bleu de méthylène peut permettre d'augmenter drastiquement la force du signal observé autour du potentiel redox de la molécule, cette dernière provoquant un transfert d'électrons sur l'électrode lorsqu'elle passe

d'un état oxydé à réduit (et vice-versa). Cela ouvre la porte à des applications très intéressantes en biodétection, car ce serait une manière de s'affranchir de l'adsorption non spécifique.

Ensuite, des expériences ont été menées avec des cellules de la lignée RGC-5 en comparant le signal avant et après le détachement de ces dernières de la surface de l'électrode. Le circuit électrique équivalent retenu pour la couche de cellules consiste en une résistance (jonctions entre les cellules) en parallèle à une capacitance (corps des cellules). Une augmentation de l'amplitude du signal allant jusqu'à 40% peut-être observée lors du détachement de la couche de cellules. Pour ces expériences, la fréquence de travail optimale trouvée est de 100Hz et un potentiel fixe de -200mV appliqué sur l'électrode permet d'obtenir la meilleure variation de signal lors du détachement des cellules.

L'objectif fixé pour le projet a été atteint, car le biocapteur hybride a pu être utilisé pour des applications variées et démontre un bon potentiel de développements futurs. Cependant, le système actuel doit être amélioré pour que son utilisation puisse s'étendre à un plus grand éventail d'applications ayant un intérêt pratique accru.

De nombreuses améliorations seraient envisageables, notamment l'optimisation de la taille des électrodes afin de maximiser la sensibilité en électrochimie, tout en ayant une surface assez grande pour bien y diriger le faisceau lumineux. La normalisation du signal avec l'intensité de la source lumineuse permettrait de diminuer le bruit. Afin de réduire les coûts du système, le potentiostat pourrait être remplacé par un générateur de fonction au détriment de la polyvalence du système actuel. De plus, une enceinte avec un environnement contrôlé permettrait de stabiliser le système et le signal en plus de fournir des conditions saines pour les cellules.

Finalement, de nombreuses orientations pour un biocapteur EC-SPR sont possibles, notamment la combinaison avec un système d'imagerie SPR ou encore l'utilisation de nanoplasmonique, qui, en plus de simplifier le montage expérimental, pourrait élargir le spectre d'applications possibles du système.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. Homola, "Surface Plasmon Resonance Sensors for Detection of Chemical and Biological Species," *Chemical Reviews*, vol. 108, n°. 2, p. 462-493, 2008.
- [2] L. C. Clark et C. Lyons, "Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery," *Annals of the New-York Academy of Sciences*, vol. 102, n°. 1, p. 29-45, 1962.
- [3] J. Wang, "Electrochemical glucose sensing," *Chemical Reviews*, vol. 108, n°. 2, p. 814-825, 2008.
- [4] J. Homola, "Electromagnetic theory of surface plasmons," dans *Surface Plasmon Resonance Based Sensors*, J. Homola, Édit.: Springer Berlin Heidelberg, 2006, p. 3-44.
- [5] C. Nylander et al., "Gas detection by means of surface plasmon resonance," *Sensors and Actuators*, vol. 3, p. 79-88, 1982.
- [6] A. Manz et al., "Miniaturized total chemical analysis systems: a novel concept for chemical sensing," *Sensors and Actuators*, vol. 1, n°. 1-6, p. 244-248, 1990.
- [7] A. Vallee-Belisle et K. W. Plaxco, "Structure-switching biosensors: inspired by Nature," *Current opinion in structural biology*, vol. 20, n°. 4, p. 518-526, 2010.
- [8] J. Homola et M. Piliarik, "Surface plasmon resonance (SPR) sensors," dans *Surface Plasmon Resonance Based Sensors*, J. Homola, Édit.: Springer Berlin Heidelberg, 2006, p. 45-67.
- [9] S. Löfas et M. A., "The art of immobilization for SPR sensors," dans *Surface plasmon resonance based sensors*, J. Homola, Édit.: Springer Berlin Heidelberg, 2006, p. 117-151.
- [10] E. Ostuni et al., "A Survey of Structure–Property Relationships of Surfaces that Resist the Adsorption of Protein," *Langmuir*, vol. 17, n°. 18, p. 5605-5620, 2001.
- [11] J. Homola et al., "Surface plasmon resonance sensors: review," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 54, n°. 1–2, p. 3-15, 1999.
- [12] M. A. Ordal et al., "Optical properties of the metals Al, Co, Cu, Au, Fe, Pb, Ni, Pd, Pt, Ag, Ti, and W in the infrared and far infrared," *Appl. Opt.*, vol. 22, n°. 7, p. 1099-1119, 1983.
- [13] M. Piliarik et J. Homola, "Surface plasmon resonance (SPR) sensors: approaching their limits?," *Opt Express*, vol. 17, n°. 19, p. 16505-16517, 2009.
- [14] S. Michaelis et al., "Studying cell-surface interactions in vitro: a survey of experimental approaches and techniques," *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, vol. 126, p. 33-66, 2012.
- [15] V. A. Loiko et al., "Mononuclear cells morphology for cells discrimination by the angular structure of scattered light," communication présentée dans *Tenth Electromagnetic and Light Scattering Conference*, à Bodrum, Turquie, 2007, p. 105-108.
- [16] J. Beuthan et al., "The spatial variation of the refractive index in biological cells," *Physics in Medicine and Biology*, vol. 41, n°. 3, p. 369-382, 1996.

- [17] S. Baumgarten et R. Robelek, "Surface plasmon resonance (SPR) sensors for the rapid, sensitive detection of the cellular response to osmotic stress," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 156, n°. 2, p. 798-804, 2011.
- [18] V. Chabot et al., "Biosensing based on surface plasmon resonance and living cells," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 24, n°. 6, p. 1667-1673, 2009.
- [19] Y. Yanase et al., "The SPR signal in living cells reflects changes other than the area of adhesion and the formation of cell constructions," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 22, n°. 6, p. 1081-1086, 2007.
- [20] K. F. Giebel et al., "Imaging of cell/substrate contacts of living cells with surface plasmon resonance microscopy," *Biophysical journal*, vol. 76, n°. 1, p. 509-516, 1999.
- [21] E. Gileadi, *Physical Electrochemistry: Fundamentals, Techniques and Applications*. Weinheim: Wiley-VCH, 2011.
- [22] O. Pänke et al., "Impedance Spectroscopy and Biosensing," dans *Biosensing for the 21st Century*, vol. 109, R. Renneberg et F. Lisdat, Édit.: Springer Berlin Heidelberg, 2008, p. 195-237.
- [23] E. Katz et I. Willner, "Probing biomolecular interactions at conductive and semiconductive surfaces by impedance spectroscopy: routes to impedimetric immunosensors, DNA-sensors, and enzyme biosensors," *Electroanalysis*, vol. 15, n°. 11, p. 913-947, 2003.
- [24] R. Kötz et M. Carlen, "Principles and applications of electrochemical capacitors," *Electrochimica Acta*, vol. 45, n°. 15–16, p. 2483-2498, 2000.
- [25] O. Teschke et E. F. de Souza, "Dielectric exchange: The key repulsive or attractive transient forces between atomic force microscope tips and charged surfaces," *Applied Physics Letters*, vol. 74, n°. 12, p. 1755-1757, 1999.
- [26] V. Lockett et al., "Differential capacitance of the double layer at the electrode/ionic liquids interface," *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 12, n°. 39, p. 12499-12512, 2010.
- [27] H. H. Girault, "Impédance électrochimique," dans *Électrochimie physique et analytique*, 2^e éd., Lausanne: Presses polytechniques et universitaires romandes, 2007, p. 441-477.
- [28] P. Zoltowski, "On the electrical capacitance of interfaces exhibiting constant phase element behaviour," *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol. 443, n°. 1, p. 149-154, 1998.
- [29] T. Pajkossy, "Capacitance dispersion on solid electrodes: anion adsorption studies on gold single crystal electrodes," *Solid State Ionics*, vol. 94, n°. 1-4, p. 123-129, 1997.
- [30] C. Berggren et al., "Capacitive biosensors," *Electroanalysis*, vol. 13, n°. 3, p. 173-180, 2001.
- [31] A. B. Inc. *Applied Biophysics - ECIS*. [En ligne]. Disponible: <http://www.biophysics.com/>. [Consulté le 11 octobre 2014].

- [32] C. Lo et al., "Cell-substrate contact: another factor may influence transepithelial electrical resistance of cell layers cultured on permeable filters," *Experimental cell research*, vol. 250, n°. 2, p. 576-580, 1999.
- [33] J. Wegener et al., "Impedance analysis of epithelial and endothelial cell monolayers cultured on gold surfaces," *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, vol. 32, n°. 3, p. 151-170, 1996.
- [34] I. Giaever et C. R. Keese, "Monitoring fibroblast behavior in tissue culture with an applied electric field," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 81, n°. 12, p. 3761-3764, 1984.
- [35] J. Wegener et al., "Electric cell-substrate impedance sensing (ECIS) as a noninvasive means to monitor the kinetics of cell spreading to artificial surfaces," *Experimental cell research*, vol. 259, n°. 1, p. 158-166, 2000.
- [36] S. Wang et al., "Surface plasmon resonance spectroscopy: applications in protein adsorption and electrochemistry," dans *Biomolecular films : design, function and applications*, J. F. Rusling, Édit. New York: Marcel Dekker, 2003, p. 213-251.
- [37] K. J. Foley et al., "Surface impedance imaging technique," *Analytical Chemistry*, vol. 80, n°. 13, p. 5146-5151, 2008.
- [38] W. Wang et al., "Single cells and intracellular processes studied by a plasmonic-based electrochemical impedance microscopy," *Nature chemistry*, vol. 3, n°. 3, p. 249-55, 2011.
- [39] J. Lu et al., "Plasmonic-based electrochemical impedance spectroscopy: application to molecular binding," *Analytical Chemistry*, vol. 84, n°. 1, p. 327-333, 2012.
- [40] S. Wang et al., "High-sensitivity stark spectroscopy obtained by surface plasmon resonance measurement," *Analytical Chemistry*, vol. 72, n°. 17, p. 4003-4008, 2000.
- [41] V. Chabot et al., "Identification of the molecular mechanisms in cellular processes that elicit a surface plasmon resonance (SPR) response using simultaneous surface plasmon-enhanced fluorescence (SPEF) microscopy," *Biosensors & bioelectronics*, vol. 50, p. 125-131, Dec 15 2013.
- [42] A. B. Dahlin et al., "Electrochemical plasmonic sensors," *Analytical & Bioanalytical Chemistry*, vol. 402, n°. 5, p. 1773-84, 2012.
- [43] S. Terrettaz et al., "Protein binding to support lipid membranes - impedance spectroscopy with SPR," *Langmuir*, vol. 9, n°. 5, p. 1361-1369, 1993.
- [44] S. Patkovsky et al., "Combined surface plasmon resonance and impedance spectroscopy systems for biosensing," *The Analyst*, vol. 139, n°. 3, p. 596-602, 2014.
- [45] S. Michaelis et al., "Label-free monitoring of cell-based assays: combining impedance analysis with SPR for multiparametric cell profiling," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 49, p. 63-70, 2013.
- [46] N. J. Tao et al., "High resolution surface plasmon resonance spectroscopy," *Review of Scientific Instruments*, vol. 70, n°. 12, p. 4656-4660, 1999.
- [47] S. Wang et al., "Electrochemical surface plasmon resonance: basic formalism and experimental validation," *Analytical Chemistry*, vol. 82, n°. 3, p. 935-941, 2010.

- [48] J. Xiang et al., "Scanning electrochemical microscopy combined with surface plasmon resonance: studies of localized film thickness variations and molecular conformation changes," *Analytical Chemistry*, vol. 78, n°. 5, p. 1418-1424, 2006.
- [49] X. Shan et al., "Imaging local electrochemical current via surface plasmon resonance," *Science*, vol. 327, n°. 5971, p. 1363-1366, 2010.
- [50] R. R. Krishnamoorthy et al., "A forensic path to RGC-5 cell line identification: lessons learned," *Investigative ophthalmology & visual science*, vol. 54, n°. 8, p. 5712-5719, 2013.
- [51] D. Bennet et S. Kim, "Impedance-based cell culture platform to assess light-induced stress changes with antagonist drugs using retinal cells," *Analytical Chemistry*, vol. 85, n°. 10, p. 4902-4911, 2013.
- [52] D. Bennet et al., "Light-induced anatomical alterations in retinal cells," *Analytical biochemistry*, vol. 436, n°. 2, p. 84-92, 2013.
- [53] S. Kedenburg et al., "Linear refractive index and absorption measurements of nonlinear optical liquids in the visible and near-infrared spectral region," *Opt. Mater. Express*, vol. 2, n°. 11, p. 1588-1611, 2012.
- [54] M. N. Polyanskiy. *Refractive index database*. [En ligne]. Disponible: <http://refractiveindex.info>. [Consulté le 04 novembre 2014].
- [55] R. Elul, "Fixed Charge in the Cell Membrane," *The Journal of Physiology*, vol. 189, p. 351-365, 1967.
- [56] P. Vanysek, "Electrochemical series," dans *Handbook of Chemistry and Physics*, 95th^e éd., 2014, p. 5.80-5.89.
- [57] K. F. Lei et al., "A vortex pump-based optically-transparent microfluidic platform for biotech and medical applications," *P I Mech Eng H*, vol. 221, n°. 2, p. 129-141, 2007.
- [58] M. J. Heller et al., "Active microelectronic chip devices which utilize controlled electrophoretic fields for multiplex DNA hybridization and other genomic applications," *Electrophoresis*, vol. 21, n°. 1, p. 157-164, 2000.
- [59] A. R. Heiskanen et al., "Monitoring of *Saccharomyces cerevisiae* cell proliferation on thiol-modified planar gold microelectrodes using impedance spectroscopy," *Langmuir*, vol. 24, n°. 16, p. 9066-9073, 2008.
- [60] T. Noll et G. Noll, "Strategies for "wiring" redox-active proteins to electrodes and applications in biosensors, biofuel cells, and nanotechnology," *Chemical Society reviews*, vol. 40, n°. 7, p. 3564-3576, 2011.
- [61] R. Ziblat et al., "Infrared surface plasmon resonance: a novel tool for real time sensing of variations in living cells," *Biophysical journal*, vol. 90, n°. 7, p. 2592-2599, 2006.
- [62] T. Das et al., "Empirical chemosensitivity testing in a spheroid model of ovarian cancer using a microfluidics-based multiplex platform," *Biomicrofluidics*, vol. 7, n°. 1, p. 11805, 2013.
- [63] H. B. Lu et al., "Attachment of functionalized poly(ethylene glycol) films to gold surfaces," *Langmuir*, vol. 16, n°. 4, p. 1711-1718, 2000.

- [64] S. Patskovsky et al., "Wide-field hyperspectral 3D imaging of functionalized gold nanoparticles targeting cancer cells by reflected light microscopy," *Journal of biophotonics*, 2014.
- [65] A. A. Karyakin et al., "Oriented immobilization of antibodies onto the gold surfaces via their native thiol groups," *Analytical Chemistry*, vol. 72, n°. 16, p. 3805-3811, 2000.
- [66] M. M. C. Sun et al., "Reduction-alkylation strategies for the modification of specific monoclonal antibody disulfides," *Bioconjugate Chemistry*, vol. 16, n°. 5, p. 1282-1290, 2005.
- [67] H. Sharma et R. Mutharasan, "Half antibody fragments improve biosensor sensitivity without loss of selectivity," *Analytical Chemistry*, vol. 85, n°. 4, p. 2472-2477, 2013.
- [68] J. Voros, "The density and refractive index of adsorbing protein layers," *Biophysical journal*, vol. 87, n°. 1, p. 553-561, 2004.
- [69] R. E. Marc. *Marc Laboratory - University of Utah - Substrates: Molecular Trapping and Sample Array Fabrication.* [En ligne]. Disponible: http://prometheus.med.utah.edu/~marclab/CMP_substrates.html. [Consulté le 27 mai 2014].

ANNEXE A – DÉTECTION DE MARQUEURS DU CANCER DE LA PROSTATE

Dans cette annexe, des expériences de détection biologique effectuées en marge du projet principal présenté dans le corps de ce travail seront décrites. Elles ont été menées avec l'aide d'un stagiaire d'été, Rodrigue Beaini. Cette section est placée en annexe afin que son contenu n'interfère pas avec celui du projet de biocapteur hybride. Elle résume un projet entrepris en partenariat avec le professeur Thomas Gervais, du département de génie physique de l'École Polytechnique de Montréal, et la professeure Anne-Marie Mes-Masson, du département de médecine de l'Université de Montréal. L'idée de base est d'utiliser la SPR afin de détecter la production de marqueurs associés au cancer de la prostate (IL-8 et LDH) par des sphéroïdes cancéreux à des fins de diagnostic et de validation de traitements. La section qui suit relate les expérimentations préliminaires effectuées afin de valider l'attache orientée des anticorps qui serviront éventuellement à la détection des marqueurs ciblés et aussi l'attache d'antigènes sur ces anticorps. De plus, des tests visant à diminuer l'adsorption non spécifique en bloquant la surface à l'aide de PEG-SH sont présentés.

Mise en contexte

Des recherches sont actuellement menées par le groupe du professeur Thomas Gervais, en collaboration avec des oncologues au CHUM, afin d'explorer la possibilité de traitements personnalisés aux patients atteints du cancer de la prostate. En effet, chaque cas étant différent, tous les patients ne réagiront pas de la même façon à un traitement donné, d'où l'intérêt de traitements personnalisés. Dans les recherches effectuées, des sphéroïdes (amas de cellules cancéreuses mimant la structure tridimensionnelle d'une tumeur) cultivés en laboratoire sont utilisés, car ils sont plus accessibles que des morceaux de tissus cancéreux provenant de biopsies et que leur réaction à des médicaments est plus réaliste que celle d'une couche bidimensionnelle de cellules [62]. Différents médicaments traitant le cancer sont ensuite testés sur ces sphéroïdes au sein d'une plateforme microfluidique. Une manière d'évaluer l'effet de ces médicaments, outre les méthodes permettant de quantifier la mort cellulaire, est de mesurer les concentrations de différents marqueurs sécrétés par les cellules soumises à divers stress ou inflammation. Parmi ces marqueurs, les interleukines (surtout les types 6 et 8) sont souvent produites à des

concentrations anormalement élevées par les cellules cancéreuses, surtout en présence d'inflammation. De plus, l'enzyme lactate déshydrogénase (LDH) représente un intérêt puisqu'elle est relâchée par les cellules lorsque ces dernières meurent.

L'idée au centre de ce projet est d'utiliser un biocapteur SPR afin de mesurer en temps réel la concentration de ces marqueurs du cancer aux abords des sphéroïdes lorsque ces derniers sont traités à l'aide de divers médicaments. Le capteur SPR pourrait même éventuellement être intégré dans le système microfluidique, au sein duquel les sphéroïdes sont triés puis perfusés avec des nutriments ou des médicaments. Les prochaines pages présentent les étapes préliminaires à un tel projet, soit des tests de calibration du capteur SPR ainsi que l'essai de différents protocoles de fonctionnalisation de la surface d'or des échantillons utilisés. En effet, afin de pouvoir effectuer des tests de détection qui soient le plus spécifiques et le plus fiables possible, la surface d'or du détecteur doit être tapissée d'une couche d'anticorps spécifiques aux marqueurs testés. Malheureusement, la fonctionnalisation n'a pas donné les résultats escomptés, malgré l'essai de plusieurs méthodes différentes.

Système expérimental et méthodologie

Pour ces expériences préliminaires, le système SPR est basé sur une configuration Kretschmann et utilise un balayage angulaire afin de suivre la position du pic plasmonique (figure 1-6). La source est une diode superluminescente (SLED - *Thorlabs*) centrée à 633nm et stabilisée en température. Un filtre spatial, un polariseur ainsi qu'une lentille ayant une longueur focale de 10cm permettent de focaliser un faisceau de qualité ayant une polarisation p sur l'échantillon d'or, fixé sur un prisme en BK7. La lentille permet de produire un faisceau conique couvrant une plage angulaire de quelques degrés. Le faisceau, après avoir subi une réflexion totale interne sur l'échantillon, est capté par une caméra (*Hamamatsu*) qui relaie l'image à un programme informatique permettant de retrouver la position du minimum du pic SPR, représenté par une raie sombre dans l'image. Chaque ligne verticale de cette image correspond à une plage angulaire de 3,8mDeg. Le prisme est encastré dans une cellule de mesure microfluidique contenant des canaux acheminant différents fluides sur la surface d'or à des fins de fonctionnalisation et de détection. La variation de l'indice de réfraction causée par la présence de ces fluides ou des molécules qu'ils contiennent près de la surface d'or cause un déplacement du pic SPR mesuré.

Des tests de calibration effectués à l'aide d'éthanol et d'eau DI, suivant un protocole similaire à celui présenté dans la section 3.1.1, ont permis de déterminer une limite de détection de $1,6 \times 10^{-6}$ RIU lorsque 3 écarts types du signal sont considérés pour le système SPR angulaire.

La méthode de nettoyage standard des échantillons d'or commence par 3 bains soniques successifs de 10 minutes chacun : acétone, isopropanol puis eau déionisée. Ensuite, l'échantillon est plongé dans une solution de piranha (acide sulfurique et peroxyde d'hydrogène dans un ratio 3 : 1) pour une durée d'environ 5 minutes avant d'être rincé abondamment avec de l'eau DI. Une fois nettoyé, l'échantillon est placé contre le prisme en BK7 avec une goutte d'huile d'immersion comme intermédiaire et un flux de PBS est injecté dans la cellule microfluidique durant l'alignement du faisceau sur la caméra et jusqu'à ce que le signal se soit stabilisé. Ensuite, une ligne de base est enregistrée durant 10 à 20 minutes avant de procéder à l'injection d'une quelconque solution à tester (anticorps, antigène, BSA, etc.). Une fois le test effectué, du PBS est réinjecté afin de nettoyer la surface de tout résidu non attaché à cette dernière. C'est la différence entre le signal à la fin de l'expérience et celui de la ligne de base qui est utilisée pour déterminer le déplacement total du pic SPR.

Méthodes de fonctionnalisation

Diverses méthodes ont été testées afin d'attacher les anticorps sur la surface d'or. Un anticorps est une grosse protéine pouvant se lier de manière spécifique à une molécule particulière appelée antigène. Il possède deux sites actifs (en bleu sur la figure A-1) ainsi qu'une base (en vert). Dans une fonctionnalisation idéale, tous les anticorps auraient la même orientation avec les sites actifs libres et dirigés vers la solution. Cependant, sans aucune modification particulière des anticorps, ces derniers vont s'attacher sur l'or (par des effets d'attraction électrostatique), mais avec une orientation aléatoire et une bonne proportion des sites actifs seront alors inutiles. Les anticorps et les antigènes utilisés durant ce projet sont de l'anti-LDH et du LDH (*Santa Cruz Biotechnology*). Les méthodes de fonctionnalisation proposées sont illustrées dans la figure A-1.

La première méthode testée est la combinaison de l'anticorps avec une molécule d'OPSS-PEG-NHS de 5kDa. Le groupement NHS de cette molécule réagit rapidement avec un groupement amine de l'anticorps et le groupement OPSS formera des liens thiols avec la surface

d'or [63, 64]. Dans un premier temps, les anticorps sont incubés avec un excès de molécules d'OPSS-PEG-NHS dans un ratio molaire de 1,88 et sont ensuite rangés au réfrigérateur.

La seconde méthode testée consiste à utiliser un agent réducteur afin de briser les ponts disulfures attachant les différentes sous-unités de l'anticorps ensemble et de fixer les fragments d'anticorps ainsi produits directement sur l'or, à l'aide des groupements thiols nouvellement créés [65]. L'agent réducteur choisi est le TCEP, avec un excès molaire de 100 :1 par rapport aux anticorps [66, 67]. Le temps d'incubation des anticorps avec le TCEP a été fixé à 1 heure.

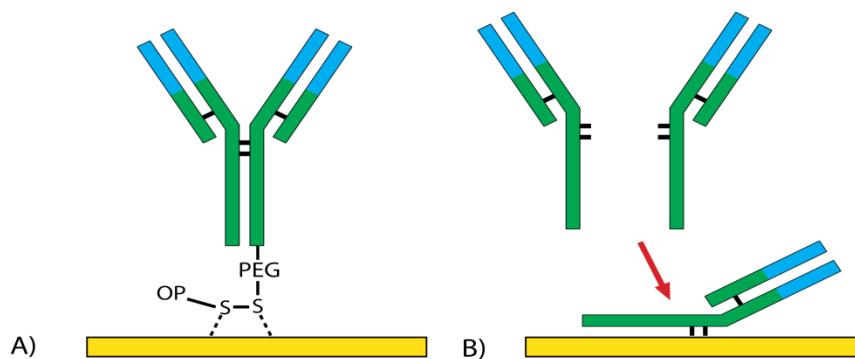


Figure A-1 : A) Attache d'un anticorps à l'aide d'une molécule d'OPSS-PEG-NHS. B) Attache à l'aide d'un agent réducteur venant briser les ponts disulfure (liens noirs).

Attaché d'anticorps

Dans un premier temps, une calibration de l'attache de PEG-SH sur l'or a été effectuée afin de s'assurer que les caractéristiques de la surface d'or permettent une attache de qualité de matériel biologique. Pour ce faire, un éventail de concentrations allant de $0,5\mu\text{g}/\text{ml}$ à $50\mu\text{g}/\text{ml}$ a été testé; la figure A-2 montre la courbe de calibration y correspondant. La concentration pour laquelle le signal est égal à la moitié du signal associé à une concentration infinie permet d'approximer la constante d'équilibre de la réaction, K_d , une mesure de l'affinité des PEG-SH avec la surface d'or. Cette constante, ayant pour unité une concentration, correspond au ratio de la constante de dissociation sur la constante d'association (K_{off}/K_{on}). C'est la concentration pour laquelle la moitié de la surface utile sera couverte de molécules de PEG-SH. Dans ce cas-ci, cette concentration est d'environ $1,5\mu\text{g}/\text{ml}$ (lignes noires sur la figure A-2). Cependant, vu différents problèmes de fluidique et de stabilité du signal, surtout en présence de faibles concentrations, il n'est pas évident d'interpréter plus en profondeur ces résultats.

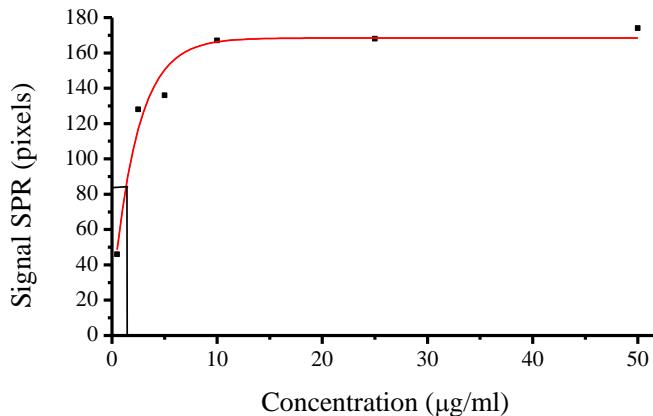


Figure A-2 : Courbe de calibration lors de l'attache de PEG-SH sur une surface d'or.

Avant de procéder à des tests d'attache des anticorps, quelques simulations ont été effectuées avec le logiciel *Mathcad* afin de prédire la variation de signal en fonction du pourcentage de couverture de la surface par des anticorps. Pour y arriver, l'indice de réfraction effectif des anticorps a été estimé à 1,42 [68] et l'épaisseur de la couche formée à 15nm (5nm de longueur pour les PEG et 10nm pour les anticorps). L'indice de réfraction effectif d'une couche de protéines couvrant partiellement la surface d'or a été déterminé à l'aide de l'approximation de Maxwell-Garnett. Le signal SPR anticipé en nombre de pixels en fonction du pourcentage de couverture de la surface par les anticorps est montré sur la figure A-3. On peut voir que cette courbe est presque parfaitement linéaire et qu'un signal de 100 pixels correspond à un pourcentage de couverture d'environ 30%, ce qui équivaut à une densité surfacique d'environ $6,8 \times 10^{11}$ anticorps/cm² ou 0,18ng/cm², en considérant que chaque anticorps occupe une surface de 2nm par 7nm [69].

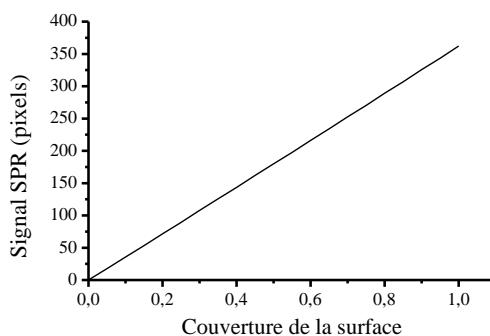


Figure A-3 : Simulation du signal SPR attendu en fonction de la couverture de la surface d'or par une couche d'anticorps ayant une épaisseur de 15nm et un indice de réfraction effectif de 1,42.

Les signaux obtenus avec les deux méthodes de fonctionnalisation proposées pour fixer les anticorps sur la surface d'or sont comparés avec le signal obtenu lorsqu'une solution d'anticorps est utilisée sans fonctionnalisation particulière dans la figure A-4. Pour ces courbes, des concentrations d'anticorps de $10\mu\text{g/ml}$ ont été injectées à la dixième minute. L'attache d'anticorps conjugués avec des molécules d'OPSS-PEG est très limitée en comparaison avec les deux autres méthodes. De plus, l'utilisation de TCEP facilite l'attache des anticorps sans toutefois mener à un signal aussi fort que lorsque les anticorps sont injectés seuls. Ces résultats semblent indiquer que l'attraction électrostatique entre la surface d'or et les anticorps est plus importante que l'attraction entre les groupements thiols ajoutés sur les anticorps et l'or.

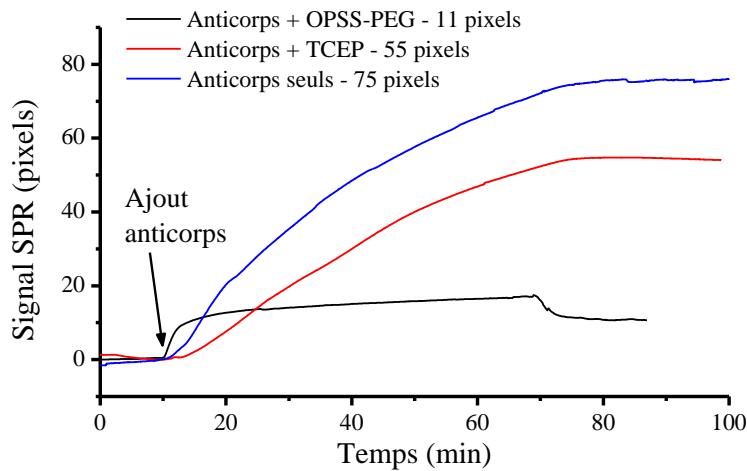


Figure A-4 : Comparaison des signaux obtenus lors de l'attache d'anticorps conjugués avec des molécules d'OPSS-PEG (en noir), d'anticorps réduits à l'aide de TCEP (en rouge) ou d'anticorps sans fonctionnalisation particulière (en bleu). Dans tous les cas, la concentration utilisée est de $10\mu\text{g/ml}$.

Détection de l'antigène

Par la suite, des solutions de LDH à une concentration de $5\mu\text{g/ml}$ ont été injectées sur les surfaces d'or précédemment modifiées avec des anti-LDH afin de tester l'attache de ces antigènes avec les anticorps. Les courbes SPR obtenues sont présentées dans la figure A-5, où un test d'attache de LDH sur de l'or nu (sans anticorps) a été ajouté à des fins de comparaison. Le signal le plus fort (~37,5 pixels) provient de l'attache sur de l'or nu tandis que l'attache des anticorps sans agent réducteur donne un signal plus faible (~25,5 pixels) et une courbe moins régulière. Puisque l'enzyme a une forte affinité avec l'or, il est difficile d'analyser si le signal d'attache de

la courbe pour laquelle les anticorps réduits ont été utilisés (~35 pixels) provient d'interactions entre les molécules de LDH et la surface d'or ou entre l'anticorps et son antigène.

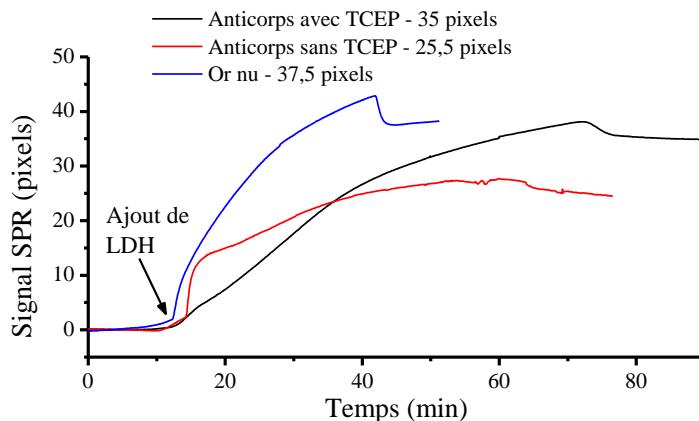


Figure A-5 : Courbes SPR obtenues lors de l'ajout de solutions de LDH à 5µg/ml (à la 12^e minute) sur une surface non fonctionnalisée (en bleu), une surface sur laquelle des anticorps réduits ont été préalablement attachés (en noir) et une surface couverte d'anticorps n'ayant pas subi de modifications (en rouge).

Blocage de la surface

Afin de clarifier cette situation, un blocage de la surface avec des PEG-SH a été tenté après l'ajout des anticorps. Pour ce faire, une solution d'anticorps à une concentration de 10µg/ml est injectée sur la surface d'or durant 30 minutes à 1 heure afin d'avoir une bonne couverture de la surface par ces derniers. Ensuite, une solution de PEG-SH ayant une concentration de 5µg/ml est ajoutée afin que ces molécules viennent s'attacher sur les endroits de la surface d'or non occupés par des anticorps. Après ce protocole, il ne devrait plus rester de surface d'or qui puisse être en contact avec la solution injectée. Cela devrait réduire l'adsorption non spécifique, car des molécules autres que l'antigène correspondant aux anticorps utilisés ne devraient pas avoir d'affinité avec les anticorps ou les PEG-SH.

Afin de valider l'efficacité de cette méthode, une solution de BSA ayant une concentration de 1µM (66,5µg/ml) est injectée sur une surface ayant été bloquée et aussi sur une autre surface avec des anticorps, mais sans blocage. La figure A-6 contient les deux courbes obtenues, qui montrent clairement que le blocage empêche l'attache de la BSA sur la surface. En effet, lorsqu'une couche de molécules de PEG-SH est ajoutée après les anticorps, le signal SPR correspondant à l'attache de la BSA passe d'environ 56,5 pixels à moins de 4 pixels, une

diminution du signal d'un facteur d'environ 15. De plus, le signal obtenu après le blocage semble plus découler d'une dérive du signal que d'une attache de BSA sur la surface bloquée.

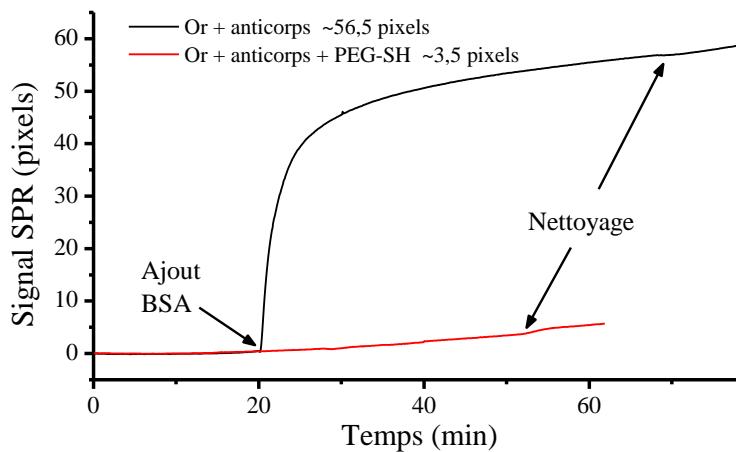


Figure A-6 : Courbes correspondant à l'attache non spécifique de BSA sur une surface bloquée par des PEG-SH (en rouge) et sur une surface sans blocage (en noir).

À partir de ces résultats, un blocage de la surface d'or a été effectué avant de refaire des tests de détection de LDH, avec des solutions dont la concentration est de $5\mu\text{g}/\text{ml}$. Préalablement à ce blocage, des anti-LDH avaient été injectés sur la surface avec et sans agent réducteur. Les courbes montrant l'attache des LDH sur ces surfaces sont affichées sur la figure A-7. Bien que les anticorps ayant été réduits mènent à un signal légèrement plus faible que ceux s'étant attachés de manière aléatoire (signal de 11,8 pixels comparé à 13,5 pixels), la courbe obtenue est plus lisse et régulière lorsque les anticorps sont réduits. Un blocage de la surface cause une diminution du signal lors de l'attache de LDH (en comparant avec les courbes de la figure A-5), qui est probablement dû à l'élimination d'une grande portion du signal non spécifique, une plus grande portion du signal restant serait donc attribuable à des interactions entre les anticorps et les molécules de LDH. Un calcul préliminaire permet de trouver une limite de détection de $22\text{ng}/\text{ml}$, en considérant que le signal minimal détectable soit équivalent à trois fois le niveau de bruit de la ligne de base.

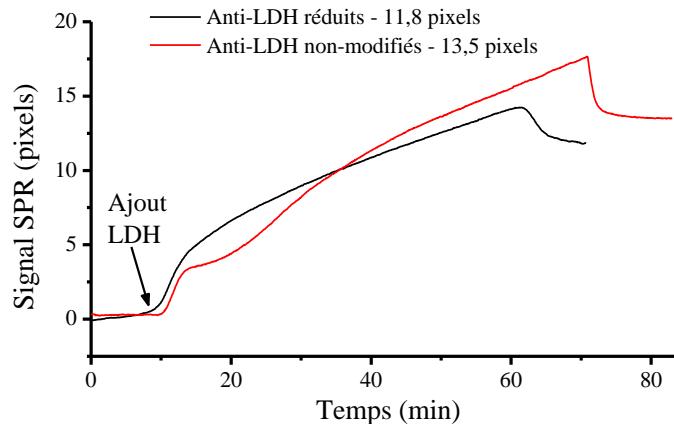


Figure A-7 : Courbes d'attache de LDH sur une surface fonctionnalisée avec des anti-LDH réduits (en noir) ou non modifiés (en rouge) ainsi qu'avec un blocage par des molécules de PEG-SH.

Perspectives

Les derniers résultats obtenus sont encourageants, surtout lorsqu'un blocage de la surface est effectué. De plus, la méthode de fonctionnalisation utilisant du TCEP comme agent réducteur semble prometteuse. Cependant, des tests plus poussés devront être effectués afin de déterminer la provenance précise du signal, s'il provient d'interactions antigène/anticorps ou d'interactions non spécifiques. De plus, la limite de détection devra être abaissée d'au moins un ordre de grandeur afin d'atteindre les concentrations en biomarqueurs rencontrées dans l'environnement des cellules cancéreuses étudiées. Par ailleurs, dans l'application proposée, soit la mesure dans l'environnement de sphéroïdes cancéreux, les sources de signal non spécifique seront beaucoup plus importantes et pourraient même générer un signal plus fort que l'antigène recherché. D'autres méthodes de fonctionnalisation comme l'utilisation de protéines A ou de protéines G devraient aussi être envisagées. La taille des canaux microfluidiques, ayant actuellement une hauteur d'environ 500 μ m, devrait aussi être réduite afin d'accélérer les interactions entre les analytes en solution et la surface d'or.