

Les nanoparticules au cœur des biocapteurs miniatures à lecture optique

Résumé Que ce soit pour diagnostiquer une grossesse ou une maladie, les biocapteurs miniatures font désormais partie de notre quotidien et permettent un dépistage rapide hors de l'hôpital. La plupart du temps, ces dispositifs jetables à usage unique, contiennent des nanoparticules d'or et des anticorps. D'autres technologies sont en cours de développement afin, d'une part, d'en diminuer le coût de production, d'autre part de les rendre plus sensibles et utilisables plusieurs fois. Enfin, l'utilisation de nanoparticules optiquement actives mais exemptes de métaux est en cours de développement.

Mots-clés Biosenseur, colloïdes, diagnostic, transferts d'énergie, luminescence, nanoparticules, point-of-care.

Abstract **Optically-active nanoparticles for point-of-care biosensors**

Whether used to diagnose pregnancy or illness, point-of-care biosensors are now part of our everyday lives, enabling rapid screening outside hospital. Most of these disposable, single-use devices, contain gold nanoparticles and antibodies. Other technologies are being developed to reduce production costs and make them more sensitive and suitable for repeated use. Finally, the use of metal-free optically active nanoparticles is under development.

Keywords Biosensor, colloids, diagnostic, energy transfers, luminescence, nanoparticle, point-of-care.

Les biocapteurs miniatures

Un biocapteur est un dispositif analytique qui utilise un composant biologique pour détecter la présence d'un analyte (petite molécule, protéine, oligonucléotide...). Le biocapteur comprend un biorécepteur (aptamer, anticorps, enzyme...) qui a été sélectionné pour sa capacité à se lier de manière spécifique à l'analyte d'intérêt. Ce biorécepteur est couplé à un transducteur dont le rôle est de traduire la reconnaissance de l'analyte au biorécepteur en un signal quantifiable (électrique, optique, thermique...). Enfin le signal est analysé et traduit pour faciliter la lecture du résultat (à l'œil nu, sur un smartphone...). Cet ensemble est appelé biocapteur (figure 1).

Le marché mondial des biocapteurs a été évalué à \$22.4 milliards en 2020 et une croissance de +8 % est attendue pour ce marché entre 2021 et 2028 [1]. Les biocapteurs sont principalement utilisés pour des applications biomédicales, par des patients souhaitant accéder : à des indicateurs de santé en

temps réel (ex : glycémie), au suivi de l'évolution d'une maladie (ex : charge virale) ou à leur capacité à procréer (ex : tests de grossesse/ovulation). Les avancées technologiques, les applications non médicales, et l'accroissement de la part de la population âgée permettent de prédire une continuité dans l'augmentation du marché. Aujourd'hui ce dernier est principalement dominé par les capteurs électrochimiques (70 %), mais celui des capteurs optiques est supposé augmenter (+9 % en 7 ans), notamment grâce à la miniaturisation et aux progrès réalisés sur les caméras et à leur versatilité à détecter divers analytes (pH, hormones, métaux, antibiotiques...).

La première génération de biocapteurs optiques, encore utilisée et disponible en libre-service, est celle des tests dits à flux latéral permettant par exemple de diagnostiquer le Covid-19 ou une grossesse (figure 2). Ces tests sont immunochromatographiques, c'est-à-dire qu'ils utilisent des anticorps comme biorécepteurs. Leur principe est le suivant (figure 2) : l'échantillon biologique (urine, prélèvement nasal mis en solution

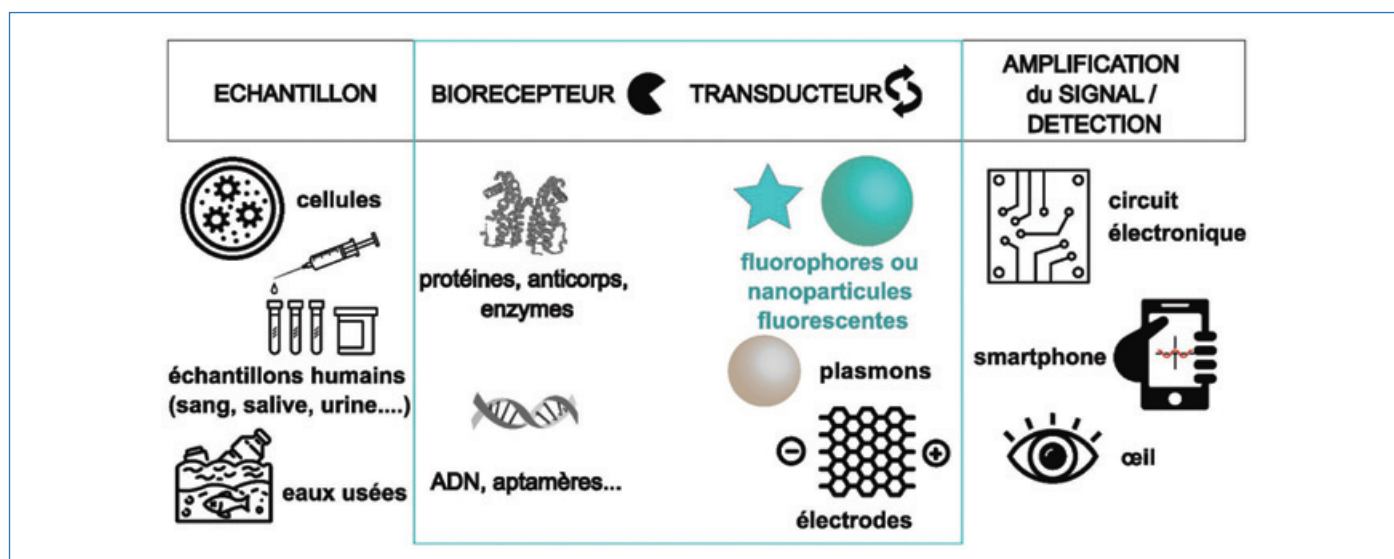


Figure 1 - Schéma d'ensemble d'un biocapteur. La partie encadrée en bleu [biorécepteur+transducteur] constitue le biosenseur.

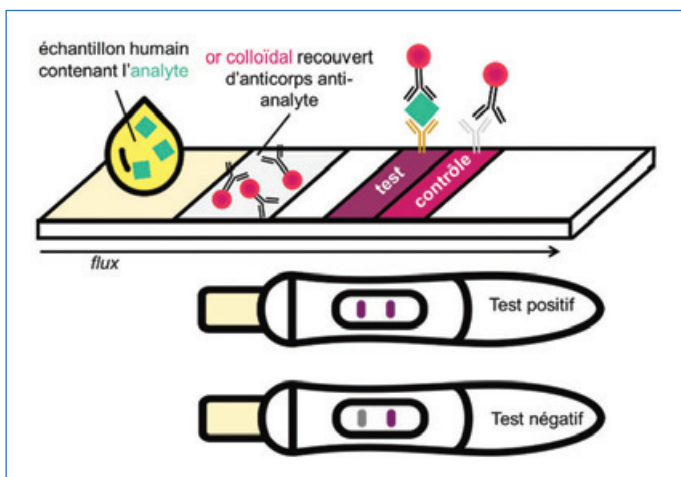


Figure 2 - Principe des tests à flux latéral immunochromatographiques utilisant de l'or colloïdal.

dénaturante...) est déposé sur une bandelette de papier. Par capillarité cet échantillon va migrer sur la bandelette jusqu'à arriver dans une zone contenant l'anticorps spécifique de l'analyte à détecter (ici l'analyte est un antigène – grossesse : hormone *human chorionic gonadotropin hCG* – Covid19 : protéines du *SARS-CoV-2*). Cet anticorps a au préalable été greffé à la surface d'une particule d'or colloïdal ayant un fort coefficient d'extinction (ou coefficient d'atténuation), afin de le rendre visible par absorption (couleur rouge). Le flux va continuer sa progression et entraîner l'anticorps marqué vers les zones « test » et « contrôle ». Ces zones contiennent un second anticorps dirigé contre l'anticorps marqué (contrôle) ou bien dirigé contre l'analyte présent dans l'échantillon (test). Dans tous les cas (test positif ou négatif), la particule d'or greffée anticorps (en excès) doit s'arrêter sur la zone de contrôle (bande fine rouge) et ainsi en confirmer la stabilité chimique. En revanche, seulement dans le cas où l'ensemble analyte-anticorps-or existe (et est suffisamment concentré), celui-ci s'arrêtera sur la zone test, permettant une lecture optique (bande fine rouge) du test positif.

Le biorécepteur

Bien que les biocapteurs soient largement utilisés et facilement accessibles, la principale limite de ces dispositifs est qu'il est difficile de quantifier la concentration de l'analyte (tests binaires : oui/non) et qu'ils ne sont ni réutilisables, ni réversibles. Ils ne peuvent donc pas être utilisés pour des diagnostics *in situ* ou en continu. La raison de leur non réversibilité est

liée d'une part au dispositif lui-même, d'autre part à l'utilisation d'anticorps. Ces protéines sont certes très spécifiques, mais leur affinité avec l'analyte est telle qu'il est très difficile de les dissocier une fois assemblées. Plus précisément, l'affinité d'un biorécepteur avec son ligand (biorécepteur-ligand \rightleftharpoons biorécepteur+ligand, figure 3) est donnée par la constante de dissociation à l'équilibre, K_D où $[X]$ représente la concentration

$$K_D = \frac{k_{off}}{k_{on}} = \frac{[\text{biorécepteur}] \times [\text{ligand}]}{[\text{biorécepteur-ligand}]}$$

Plus la valeur K_D est basse, plus l'affinité de liaison entre le ligand et le récepteur est élevée et *vice versa*. Typiquement, dans le cas d'un anticorps avec son antigène, $K_D \sim 10^{-12}$ mol/L, ce qui est très faible, et renseigne donc sur la difficulté à séparer l'anticorps de son antigène une fois liés.

Un autre défaut des anticorps est leur difficulté et coût de production qui restent très élevés. C'est pourquoi, depuis une trentaine d'années, de nombreuses équipes de recherche développent des alternatives aux anticorps, comme les aptamères [2]. Ces biomolécules sont des oligonucléotides de synthèse sélectionnés pour leur spécificité à reconnaître des analytes choisis. Leur affinité cette fois-ci est de l'ordre de $K_D \sim 10^{-9}$ - 10^{-8} mol/L, donc moins forte, ce qui permet de les rendre réversibles. Le groupe de Plaxco aux Etats-Unis a ainsi montré que l'utilisation d'aptamères permettait de suivre en temps réel une concentration en antibiotiques chez le petit animal (capteur électrochimique) [3].

En 2020, l'équipe de James Galagan à l'université de Boston a développé une nouvelle famille de biorécepteurs en utilisant un facteur de transcription (FT) reconnaissant la progestérone (SRTF1) [4,5]. Un des avantages de cette famille de biorécepteurs est que ce sont des protéines recombinantes qui peuvent être produites dans des bactéries de type *E. Coli*, ce qui en diminue le coût de production. Ces protéines jouent un rôle important en biologie en tant que protéines régulatrices des gènes et constituent ainsi un exemple de système dynamique naturel hybride ADN-protéine (figure 3). Dans le cas d'une utilisation comme biorécepteurs, la modulation de la liaison entre l'ADN et le FT sous ajout d'un analyte (ligand du FT) sera le phénomène d'intérêt. En effet, ces FT sont des protéines allostériques, c'est-à-dire que lorsque l'analyte va s'y lier, la protéine changera de conformation, se détachant ainsi de l'ADN. La constante de dissociation ($K_D^1 = \frac{[\text{SRTF1}][\text{ADN}]}{[\text{SRTF1-ADN}]}$) entre le FT reconnaissant la progestérone (SRTF1) avec une séquence d'ADN spécifique (20 bases, double brin) est d'environ 5×10^{-9} mol.L⁻¹. En présence de progestérone, l'hormone va se lier à la SRTF1 ($K_D^2 = \frac{[\text{SRTF1}][\text{progesterone}]}{[\text{SRTF1-progesterone}]}$) $\sim 25 \times 10^{-9}$ mol/L) et en changera la conformation, ce qui détachera le FT de l'ADN. Ces diverses



Figure 3 - L'affinité entre le facteur de transcription (protéine) et un segment d'oligonucléotide est un équilibre régi par les constantes d'affinité k_{on} et k_{off} (chaque constante étant différente, les exposants 1 et 2 permettent de les identifier séparément et décrivent chaque processus). En présence d'un analyte (représenté ici par une structure chimique moléculaire), ce dernier va se lier au facteur de transcription qui va changer de conformation et se dissocier de l'oligonucléotide.

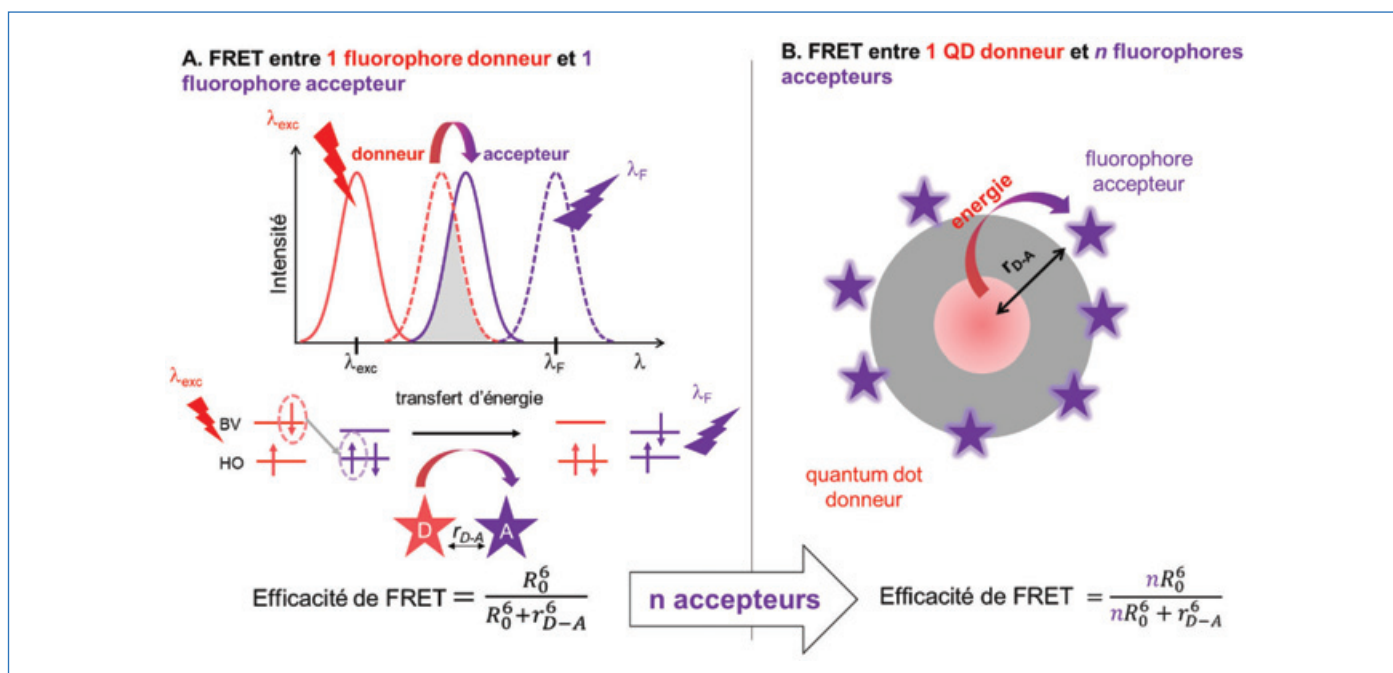


Figure 4 - Schéma simplifié du principe du FRET. A. Principe du FRET dans le cas d'une paire de fluorophores moléculaires et équation d'efficacité associée. B. Exemple de FRET avec les QDs et équation du FRET dans le cas d'un QD donneur et de multiples fluorophores (n) accepteurs.

associations [SRTF1-ADN] et [SRTF1-progesterone] sont dynamiques et réversibles, ce qui signifie qu'en jouant sur les concentrations molaires en SRTF1, ADN et progesterone, il est possible de changer l'état d'association du système. Cet ensemble [SRTF1-ADN] et [SRTF1-progesterone] peut donc permettre de construire un biosenseur réversible, mais quid du transducteur ?

Le transducteur

Il permet d'identifier l'interaction entre le biorécepteur et l'analyte par la génération d'un signal. Dans le cadre du développement d'un biocapteur à lecture optique⁽¹⁾ les nanoparticules (NPs) fluorescentes sont particulièrement intéressantes de par leur grande brillance [7] (jusqu'à 1000 fois plus qu'un luminophore classique) et résistance au photoblanchiment. Par conséquent elles permettent de détecter des événements plus rares et sur de plus longs temps d'observation. De plus, la fluorescence est une technique bien plus sensible que l'absorbance. Les nanoparticules fluorescentes [8] peuvent être de diverses natures : composées de semi-conducteurs comme les Quantum Dots (QDs), chargées en luminophores (organiques ou lanthanides) comme les particules de silice ou de polymères, ou bien encore composées uniquement de fluorophores agrégés et dispersés dans l'eau. Afin de pouvoir être utilisées comme biosenseurs, toutes ces NPs doivent être dispersables dans l'eau, colloïdalement stables et fonctionnalisable par un biorécepteur. Toutefois, attacher un biorécepteur à une NP fluorescente n'en fait pas un senseur... Pour doser, il faut mesurer une variation de signal qui est directement proportionnelle à la concentration d'analyte en solution.

Le FRET

À cette fin, le principe du FRET (Förster Resonance Energy Transfer) est très utile. En effet, le FRET est un transfert d'énergie non radiatif (donc n'émettant pas de lumière)

résultant d'une interaction entre les dipôles de transition⁽²⁾ de deux molécules (figure 4). Le FRET a lieu entre une entité fluorescente et une entité absorbante seulement si ces dernières ont un bon recouvrement spectral, sont suffisamment proches dans l'espace, et que leurs dipôles de transition ne sont pas orthogonaux. En irradiant le fluorophore dans sa bande d'absorption (*i.e.* avec des photons de même énergie qu'une des transitions électroniques du fluorophore), ce dernier, appelé *donneur* va passer dans un état excité. Si un autre chromophore (ou fluorophore), appelé *accepteur*, remplit les conditions évoquées ci-dessus, le donneur va pouvoir lui transférer son énergie. L'accepteur va alors passer à son tour dans un état excité et le donneur va revenir dans son état fondamental. Le fluorophore donneur s'est ainsi désexcité sans émettre de photon, il est donc non fluorescent. L'accepteur est quant à lui excité : s'il est fluorescent il pourra revenir à l'état fondamental en émettant un photon moins énergétique (de plus haute longueur d'onde), s'il est un simple chromophore il n'émettra pas non plus de lumière. En théorie il devrait être possible de pouvoir collecter seulement l'émission de photons de l'accepteur s'il est fluorescent, mais en pratique, n'ayant jamais 100 % d'efficacité de FRET, l'émission de fluorescence est mesurée à deux longueurs d'ondes : celle résiduelle du donneur et celle de l'accepteur fluorescent. Ainsi, en choisissant judicieusement un couple donneur/accepteur, le FRET permet de savoir si deux molécules sont proches dans l'espace. Typiquement, pour un couple classique, le rayon de Förster (*i.e.* la distance pour laquelle on a 50 % d'efficacité de transfert d'énergie) est d'environ 5 nm. Sachant que les biorécepteurs mesurent en moyenne entre 2 et 10 nm, la mesure de variation d'un signal FRET est parfaitement adaptée pour sonder l'environnement des biorécepteurs [9].

Néanmoins, dans le cas où le donneur n'est plus un fluorophore organique (dont la taille est généralement de l'ordre du nm), mais une nanoparticule, le diamètre de cette dernière est un frein inhérent à l'efficacité du transfert d'énergie. Typiquement, une nanoparticule de polymère ou de silice

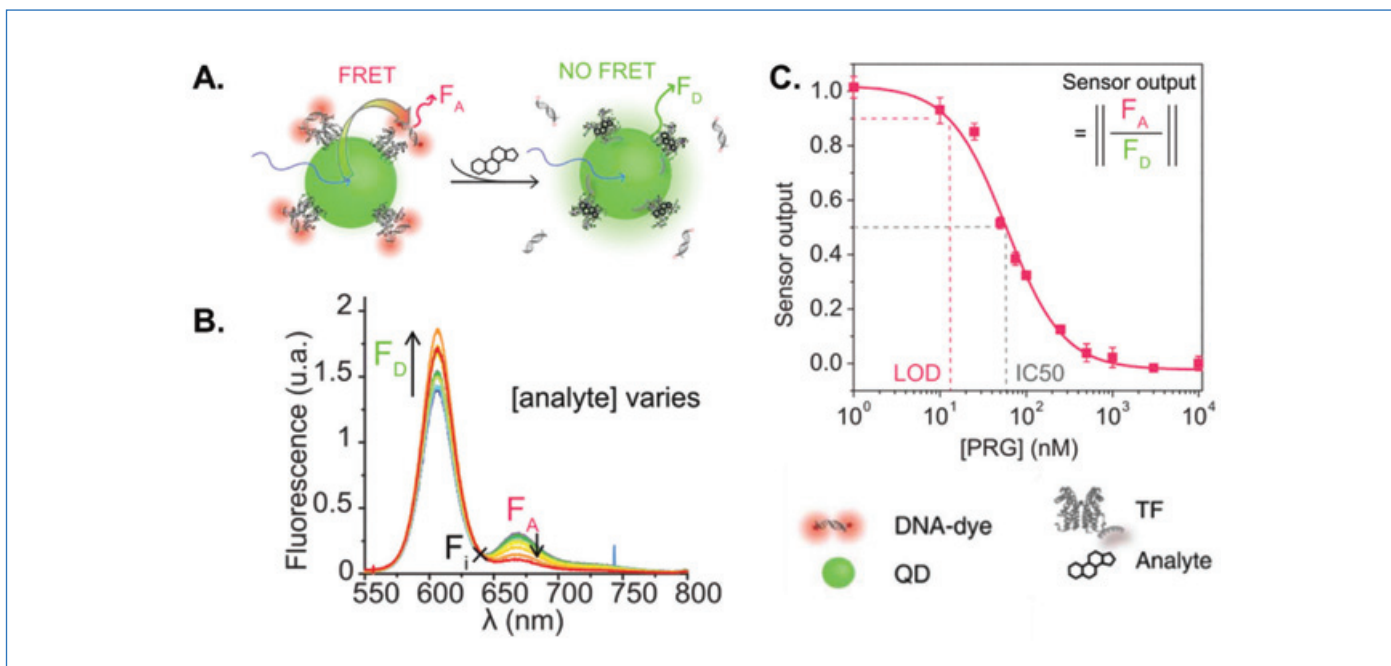


Figure 5 - A. Principe du biosenseur à progestérone utilisant des QDs décorés de facteurs de transcription comme donneurs d'énergie, et des oligonucléotides marqués Cyanine 5 comme accepteurs. B. Evolution de l'émission de fluorescence avec l'ajout de progestérone ($\lambda_{exc}=405$ nm, c'est-à-dire préférentiellement dans la bande d'absorption du QD) : quand on ajoute la progestérone, le signal du donneur (QD) augmente et celui de l'accepteur Cy5 diminue à cause du FRET qui diminue. C. Rapport de la fluorescence du donneur (QD) sur celui de l'accepteur (Cy5) en fonction de la concentration en progestérone. Issu de [5].

fluorescente mesure au minimum 10-20 nm de diamètre, un QD dans l'eau environ 5-15 nm de diamètre. De plus, dans le cas de ces derniers, seul l'exciton confiné au cœur du QDs participe au phénomène de fluorescence et de transfert d'énergie. Toutefois, il a été démontré en 2004 par des chercheurs américains (dont M. G. Bawendi – prix Nobel de chimie 2023) que, dans le cas de QDs décorés par n accepteurs en surface répartis suivant une distribution de Poisson, l'efficacité de FRET était significativement augmentée (voir équation figure 4B) [10]. Ainsi, l'inconvénient de la taille des nanoparticules est compensé par leur multivalence qui permet de positionner de nombreux accepteurs autour d'un seul donneur. La littérature regorge d'exemples impliquant les QDs comme donneurs d'énergie décorés d'accepteurs de natures variées comme des protéines fluorescentes, des chromophores, d'autres nanoparticules fluorescentes permettant d'en faire des biosenseurs [11].

Un biosenseur pour la progestérone réversible

Suite à la découverte des facteurs de transcription comme nouveaux biorécepteurs potentiellement réversibles, un biosenseur pour la progestérone a été développé (figure 5). Pour cela, des QDs compacts et colloïdalement stables dans l'eau ont été synthétisés et décorés du facteur de transcription sensible à la progestérone (SRTF1) possédant un motif histag⁽³⁾ à son extrémité C-terminale. Ces QD-SRTF1 ont été mélangés avec des oligonucléotides marqués par une cyanine (Cy5) à chaque extrémité et ayant une affinité pour le SRTF1. En l'absence de progestérone, l'ADN-Cy5 est lié au SRTF1 qui est lui-même lié au QD et donc il peut y avoir un transfert d'énergie depuis le QD (donneur) vers le Cy5 (accepteur). En excitant sélectivement le QD vers 400 nm, des photons de la fluorescence du QD (vers 600 nm) et de la Cy5 (vers 670 nm) sont détectés. Lorsque de la progestérone est ajoutée, celle-ci va décrocher l'ADN en se liant au SRTF1. L'ADN-Cy5 étant alors

trop éloigné du QD, le transfert d'énergie n'est plus possible et le signal de fluorescence de la Cy5 est perdu, tout en restaurant celui du QD. Cette modification du signal de fluorescence du QD et de la Cy5 est directement proportionnelle à la concentration en progestérone et permet donc d'en faire un biosenseur sensible. Avec ce système, dans le meilleur des cas une concentration en progestérone de 15 nM a pu être mesurée, c'est-à-dire de l'ordre de grandeur de la concentration en cette hormone dans l'urine féminine. Par la suite il a également été démontré que pour diminuer la limite de détection du biosenseur il était préférable que le biorécepteur soit lié au fluorophore donneur, et non à l'accepteur [12].

Des biosenseurs réversibles

L'intérêt d'utiliser un facteur de transcription est que l'affinité [biorécepteur-ligand] est environ 1000 fois plus faible qu'avec un anticorps, donc le système biorécepteur-ligand peut potentiellement être désassemblé. Ce principe a été démontré en utilisant tout simplement un système de dialyse : une fois la progestérone ajoutée, le biosenseur est placé à l'intérieur d'un boudin de dialyse (choisi pour ne laisser passer que l'analyte) durant 24h afin de dissocier la progestérone par dilution. La lecture du biosenseur se fait ensuite par spectroscopie de fluorescence et de la progestérone est à nouveau ajoutée. Ce cycle a été répété 3 fois afin de démontrer que ce biosenseur est réversible.

Vers des nanosenseurs sans métaux

Je m'intéresse maintenant au développement de nanoparticules fluorescentes aussi petites et compactes que les QDs, mais exemptes de métaux. Les nanoparticules organiques fluorescentes (dFONs) [13] – développées dans notre équipe à l'ISM-Bordeaux par Mireille Blanchard-Desce [14] – sont exclusivement composées de fluorophores hydrophobes

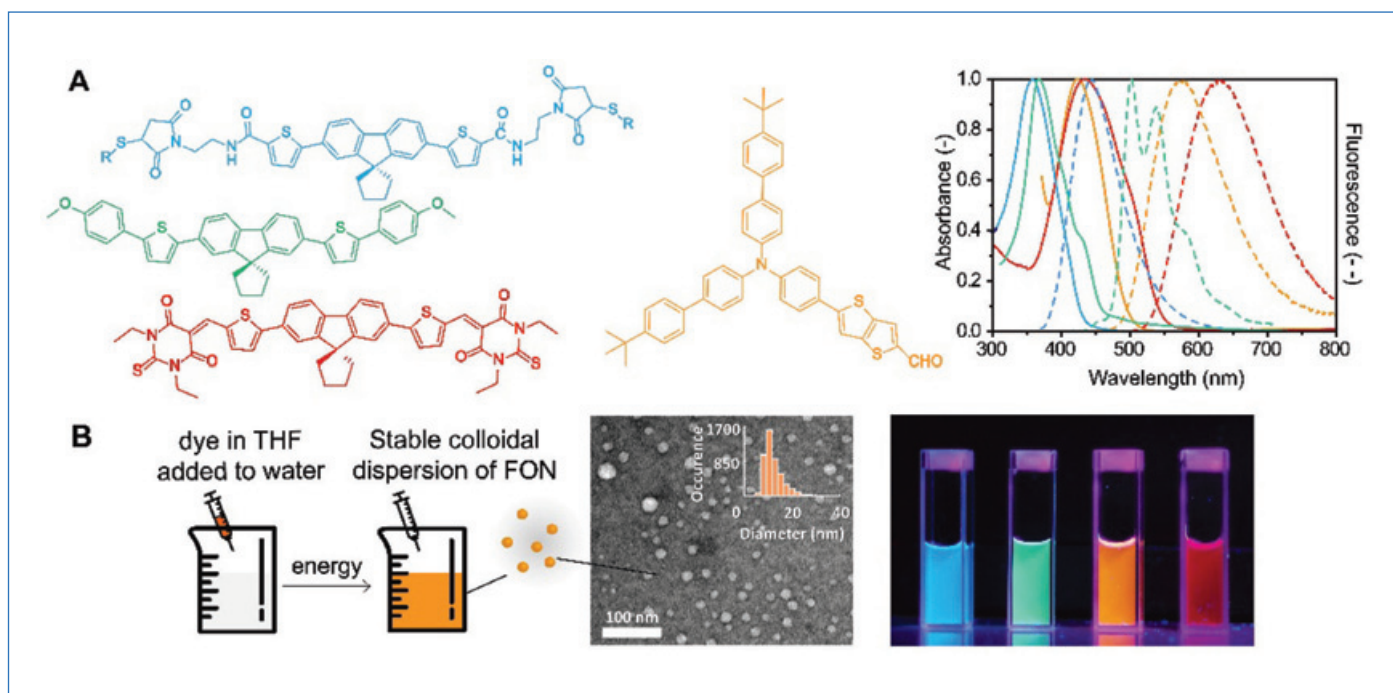


Figure 6 - A. Exemples de fluorophores synthétisés dans notre groupe à l'ISM et capables de s'assembler sous forme de nanoparticules organiques fluorescentes. Spectres d'absorption (de 350 à 450 nm) et d'émission de fluorescence (de 500 à 650 nm) des dFONs dans l'eau et en dessous photo des dispersions colloïdales associées. B. Préparation des dFONs par nanoprecipitation. Image TEM de dFONs ayant un diamètre moyen de 12 nm. Adapté des références [15-17].

agregés sous forme de nanoparticules. Leur préparation est simple puisqu'il suffit de faire précipiter au goutte-à-goutte un colorant dissout à forte concentration dans un solvant organique miscible à l'eau (typiquement du THF) dans un grand volume d'eau (technique de *nanoprecipitation*). Les propriétés optiques et colloïdales des NPs dépendent de la nature des fluorophores qui les composent, comme illustré sur la figure 6.

Ces nanoparticules organiques ont pu être utilisées avec succès en imagerie confocale, multiphotonique, et imagées à l'échelle individuelle par suivi de particules uniques [16]. Toutefois à l'heure actuelle il n'existe pas de stratégie de fonctionnalisation de surface covalente de ces objets et ils ne peuvent donc – pour l'instant – pas être utilisés comme biosenseurs. Développer de nouveaux outils chimiques afin de pouvoir utiliser ces nanoparticules organiques comme biosenseurs réversibles fait partie de mon projet de recherche initié en 2020.

Chloé Grazon remercie l'ERC pour le financement Starting grant, projet COMET n°101077364 / 2023-2028. <https://cordis.europa.eu/project/id/101077364/fr>

La plupart des références citées ci-dessous sont accessibles en libre accès.

(1) Cet article ne traite que du cas des nanoparticules fluorescentes excitées par un photon. Il est également possible de faire passer une nanoparticule à l'état excité par voie électrochimique et que celle-ci émette ensuite un photon en revenant à l'état fondamental, c'est le cas de l'électrochimiluminescence [6].

(2) Moment dipolaire électrique associé à la transition électronique entre l'état fondamental et l'état excité.

(3) Motif peptidique de six histidines inséré en fin de chaîne protéique, connu pour avoir une affinité avec les métaux cationiques, *i.e.* le Zn^{2+} , en surface des QDs.

[1] Biosensors Market Size, Share & Trends Analysis Report By Technology (Electrochemical, Thermal, Piezoelectric), By Application (Medical, Agriculture), By End-user (PoC Testing, Food Industry), And Segment Forecasts, 2024 - 2030, **2021**.

[2] J.J. Toulme, R. Giegé, *MS Médecine Sci. Rev. Pap.* ISSN 0767-0974 1998 Vol 14 N° 2 P155-66 **1998**.

[3] N. Arroyo-Currás, J. Somerson, P.A. Vieira, K.L. Ploense, T.E. Kippin, K.W. Plaxco, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2017**, *114*, 645.

[4] J.E. Galagan, A.M. Dennis, C. Klapperich, M.W. Grinstaff, T. Nguyen, R.C. Baer, U. Kuzmanović, M. Zamani, M. Chen, M. Chern, C. Grazon, *Microbial based biosensors*, **2019**.

[5] C. Grazon, R.C. Baer, U. Kuzmanović, T. Nguyen, M. Chen, M. Zamani, M. Chern, P. Aquino, X. Zhang, S. Lecommandoux, A. Fan, M. Cabodi, C. Klapperich, M.W. Grinstaff, A.M. Dennis, J.E. Galagan, *Nat. Commun.*, **2020**, *11*, 1276.

[6] A. Kuhn, L. Bouffier, N. Sojic, *Applications analytiques de l'électrochimiluminescence - p20 - N°400-401 - L'Actualité Chimique, le journal de la SCF*.

[7] A. H. Ashoka, I.O. Aparin, A. Reisch, A.S. Klymchenko, *Chem. Soc. Rev.*, **2023**.

[8] E. Ishow, M. Blanchard-Desce, Bassani, Dario, *La lumière sur les nanomatériaux au service de la lumière - p95 - N°397-398 - L'Actualité Chimique, le journal de la SCF*.

[9] F. Merola, H. Pasquier, M. Erard, *Lumières sur le vivant : protéines fluorescentes et senseurs optogénétiques - p23 - N°397-398 - L'Actualité Chimique, le journal de la SCF*.

[10] A.R. Clapp, I.L. Medintz, J.M. Mauro, B.R. Fisher, M.G. Bawendi, H. Mattoussi, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 301.

[11] N. Hildebrandt, C.M. Spillmann, W.R. Algar, T. Pons, M.H. Stewart, E. Oh, K. Susumu, S.A. Díaz, J.B. Delehanty, I.L. Medintz, *Chem. Rev.*, **2017**, *117*, 536.

[12] C. Grazon, M. Chern, P. Lally, R.C. Baer, A. Fan, S. Lecommandoux, C. Klapperich, A.M. Dennis, J.E. Galagan, M.W. Grinstaff, *Chem. Sci.*, **2022**, *13*, 6715.

[13] S. Fery-Forgues, *Nanoscale*, **2013**, *5*, 8428.

[14] J. Daniel, O. Dal Pra, E. Kurek, C. Grazon, M. Blanchard-Desce, *Comptes Rendus Chim.*, **2024**, <https://comptes-rendus.academie-sciences.fr/chimie/articles/10.5802/crchim.294/>

[15] C. Mastrodonato, P. Pagano, J. Daniel, M. Vaultier, M. Blanchard-Desce, *Molecules*, **2016**, *21*, 1227.

[16] M. Rosendale, J. Flores, C. Paviolo, P. Pagano, J. Daniel, J. Ferreira, J.-B. Verlhac, L. Groc, L. Cognet, M. Blanchard-Desce, *Adv. Mater.*, **2021**, *33*, 2006644.

[17] J. Daniel, A.G. Godin, M. Palayret, B. Lounis, L. Cognet, M. Blanchard-Desce, *J. Phys. Appl. Phys.*, **2016**, *49*, 084002.

Chloé GRAZON,

Chercheuse CNRS, Institut des Sciences Moléculaires - UMR 5255, Université de Bordeaux, 351 cours de la libération, 33405 Talence, France.

*chloe.grazon@u-bordeaux.fr