

Titre : DEVELOPPEMENTS DE TECHNIQUES DE MICROSCOPIE HOLOGRAPHIQUE NUMERIQUE POUR OBSERVER DES AFFINITES CELLULAIRES IN VIVO

Directeur(s) de Thèse : TAKAKURA Yoshitane, MCF-HDR (y.takakura@unistra.fr).

Co-encadrant : TWARDOWSKI Patrice, MCF (twardows@unistra.fr).

Unité d'Accueil : ICube.

Établissement de rattachement : Unistra.

Collaborations : Ce travail de thèse aura lieu au sein de l'équipe TRIO (activités en imagerie interférentielle/holographie, Yoshitane Takakura, MCF-HDR) en collaboration avec Patrice Twardowski, MCF (simulations optiques/photoniques).

Rattachement à un programme (s'il y a lieu) : /

Résumé :

Les affinités anticorps-antigènes, ainsi que la cinétique des réactions associées, permettent d'appréhender les mécanismes cellulaires comme ceux responsables de maladies infectieuses, de pathologies immunitaires, ou encore ceux que l'on cherche à déclencher dans la recherche des médicaments adaptés. Ces mécanismes peuvent s'observer à l'aide de techniques optiques comme la résonance du plasmon de surface (SPR : surface plasmon resonance) qui a permis un développement significatif de dispositifs d'observation imageants ou non-imageants, pour le monde industriel ou pour la recherche en amont.

Les biopuces SPR sont des substrats supportant de fines couches nanométriques de métal, en général des films d'or, qui ont été fonctionnalisées par des molécules pouvant recevoir des ligands – anticorps ou antigènes – capables de capturer des analytes – antigènes ou anticorps – lorsque ces derniers passent à proximité de la couche active. L'accumulation de couples ligands-analytes au niveau de l'interface se manifeste par la création d'une strate auto-assemblée (SAM : self assembled monolayer) qui modifie les conditions de la résonance SPR lorsque la puce est éclairée par une lumière adaptée, induisant un décalage angulaire de la raie d'absorption caractéristique de l'excitation du plasmon de surface.

La détection SPR reposant sur les variations temporelles du minimum de lumière réfléchi, les systèmes associés ne permettent pas d'analyser le mécanisme tridimensionnel de capture ou de libération des analytes par les ligands lors des essais d'affinités anticorps-antigènes. Des techniques impliquant la microscopie Raman confocale ont été développées dans cette optique mais nécessitent une instrumentation conséquente pour un champ d'analyse restreint.

L'équipe TRIO du laboratoire ICube a significativement contribué au développement d'instruments et de traitements dédiés aux recherches d'holographies analogique et numérique. Elle a récemment mis en place un microscope holographique numérique (DHM : digital holographic microscope) dont l'architecture sera optimisée pour l'observation des mécanismes moléculaires conduisant à la formation de la SAM.

Le travail de la thèse qui est proposée consiste à poursuivre le développement du DHM pour l'analyse des réactions moléculaires grâce à des outils de conception assistée par ordinateur, à proposer des méthodes numériques de traitement pour imager dynamiquement la SAM de manière tridimensionnelle et à initier un travail de validation sur des réactions anticorps-antigènes connues.

Descriptif du sujet :

Contexte général

L'observation des affinités anticorps-antigènes ainsi que l'analyse de la cinétique associée représentent des étapes critiques dans le diagnostic de maladies infectieuses, de pathologies immunitaires, ainsi que dans la recherche de médicaments adaptés. La nécessité de disposer d'un dispositif quantitatif et efficace pour ces observations a conduit au développement de biopuces optiques autour de la résonance des plasmons de surface (SPR : Surface Plasmon Resonance) qui constitue aujourd'hui la technique sans marquage la plus développée pour appréhender les réactions anticorps-antigènes [1-5].

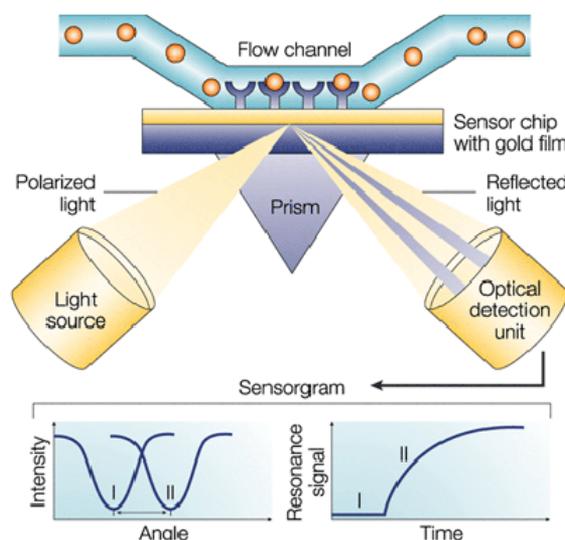


Figure 1 : Principe de la SPR [2]

La SPR est un effet optique qui se manifeste lorsqu'on éclaire une couche de métal nanométrique avec une lumière qui est polarisée correctement. Le plasmon de surface ainsi excité est une onde à décroissance exponentielle de part et d'autre d'une interface séparant un conducteur (or, argent, etc.) d'un milieu diélectrique sans pertes (milieu biologique par exemple) et suivant laquelle elle se propage. La fixation de molécules sur la surface altère la phase et l'amplitude de l'onde plasmonique qui joue le rôle de sonde dans le milieu de la réaction biomoléculaire dont les informations seront véhiculées par la lumière réfléchie. La SPR se traduit par l'apparition d'une raie sombre lorsque les conditions de résonance sont atteintes. Les systèmes à biopuces SPR suivent temporellement le décalage angulaire de cette raie d'absorption pour en extraire les paramètres d'intérêt de couches qui auront été préalablement fonctionnalisées avec des ligands [6].

Les dispositifs SPR aussi bien imageants que non-imageants délivrent des images ou signaux temporels dépendant de la densité de monocouches auto-assemblées (SAM : self assembled monolayers) produites lors de la capture d'anticorps par des antigènes, d'antigènes par des anticorps ou des libérations subséquentes [7]. S'agissant d'effets intégrés, il n'est de fait pas possible d'accéder aux mécanismes surfaciques d'affinités locales entre molécules.

La microscopie holographique numérique (DHM : digital holographic microscopy) est une modalité d'imagerie qui consiste à enregistrer à l'échelle microscopique et sur un capteur CCD ou CMOS une figure produite par une lumière dite de référence interférant avec celle provenant du phénomène à analyser (ici l'onde réfléchie par l'interface). Contrastant avec l'holographie analogique, il n'est pas nécessaire, dans le contexte de la DHM, de procéder aux développements chimiques d'hologrammes enregistrés, des algorithmes numériques étant utilisés pour la restitution, la refocalisation ou l'élimination de composantes indésirables [8]. L'équipe TRIO du Laboratoire ICube a significativement contribué aux développements instrumentaux et logiciels d'holographie numérique [9-11], ainsi qu'aux techniques de microscopie non conventionnelles.

Le travail doctoral s'articulera autour de développements instrumentaux et logiciels impliquant la conception optique, le montage du DHM adapté à l'analyse plasmonique des réactions anticorps-

antigènes, ainsi que la mise au point de méthodes numériques de restitution, d'exploration d'informations contenues dans les séquences d'images du DHM. En particulier, on s'intéressera au mécanisme de formation des images interférentielles dans ce contexte pour proposer des approches algorithmiques originales adaptées à la configuration choisie, la finalité du travail consistant à fournir des séquences dynamiques de cartographies tridimensionnelles quantitatives imageant les interactions anticorps-antigènes.

Moyens

Le Laboratoire ICube dispose d'un savoir-faire reconnu et d'un environnement unique pour faire des recherches en holographies analogiques et numériques. Il dispose de composants optiques dédiés et d'un local conçu sur mesure pour des activités holographiques. Les études de conception seront menées grâce à des logiciels de simulation de systèmes imageants. Le travail de validation portera sur des biopuces plasmoniques qui ont été mises au point lors du développement d'un dispositif de Kretschman-Raether imageant (Figure 2).

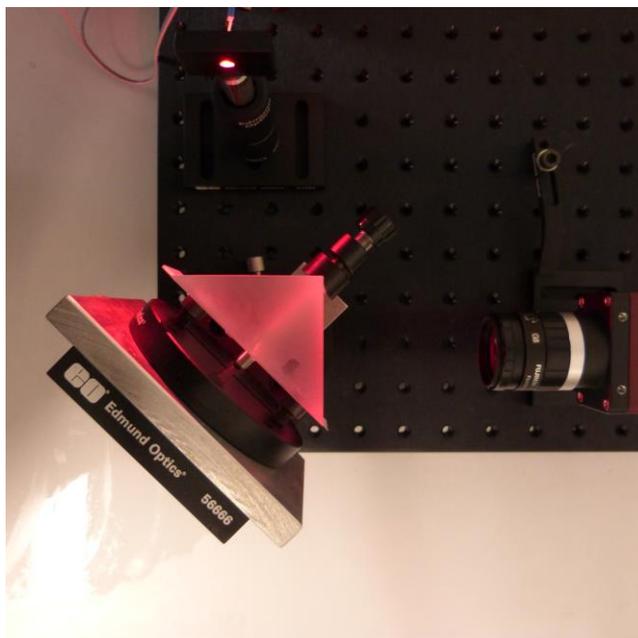


Figure 2 : Dispositif de Kretschmann-Raether imageant.

Profil du candidat

Le sujet doctoral s'adresse à un(e) étudiant(e) titulaire d'un master M2 en optique / photonique ayant de bonnes connaissances en Imagerie Optique et Traitement d'Images. Un intérêt prononcé pour l'expérimentation couplée à des simulations numériques de modélisation et de traitement est souhaité.

Références (liste non exhaustive)

1. W. M. Mullett, E. P. C. Lai, and J. M. Yeung, "Surface Plasmon Resonance-Based Immunoassays," *Methods* **22**, 77–91 (2000).
2. M. A. Cooper, "Optical biosensors in drug discovery," *Nature Reviews Drug Discovery* **1**, 515–528 (2002).
3. W. L. Then, M.-I. Aguilar, and G. Garnier, "Quantitative Detection of Weak D Antigen Variants in Blood Typing using SPR," *Scientific Reports* **7**:1616 (2017).
4. N. Yeow, R. F. Tabor, and G. Garnier, "Mapping the distribution of specific antibody interaction forces on individual red blood cells," *Scientific Reports* **7**:41956 (2017).
5. M. Galanti, D. Fanelli, and F. Piazza, "Conformation-controlled binding kinetics of antibodies," *Scientific Reports* **6**:18976 (2016).

6. J. Homola, "Surface Plasmon Resonance Based Sensors," Springer, 2006.
7. C. A. K. Borrebaeck, A.-C. Malmborg, C. Furebring, A. Michaelsson, S. Ward, L. Danielsson, and M. Ohlin, "Kinetic Analysis of Recombinant Antibody-Antigen Interactions: Relation Between Structural Domains and Antigen Binding," *Nature Biotechnology* **10**, 697–698 (1992).
8. U. Snars, and W. P. O. Jüptner, "Digital recording and numerical reconstruction of holograms," *Meas. Sci. Technol.* **13**, R85–R101 (2002).
9. N. Demoli, D. Vukicevic, and M. Torzynski, "Dynamic digital holographic interferometry with three wavelengths," *Optics Express* **11**, 767-774 (2003).
10. N. Demoli, K. Šariri, D. Vukicevic, and M. Torzynski, "Applications of time-averaged digital holographic interferometry. In: Osten W. (eds) Fringe 2005," Springer, 2006.
11. N. Demoli, H. Halaq, K. Šariri, M. Torzynski, and D. Vukicevic, "Undersampled digital holography," *Optics Express* **17**, 15842-15852 (2009).