

Introduction

Les systèmes biologiques, tel le corps humain, sont d'une grande complexité et peuvent être comparés à une horloge. Comme le résultat de l'engrenage des pignons d'une horloge, de nombreuses minuscules réactions contribuent à la réaction globale de l'ensemble du système; par exemple l'augmentation de la température du corps résulte d'une infection. Ainsi la plupart des mécanismes et des réactions essentielles peuvent être réduites aux interactions qui ont lieu à l'échelle du nanomètre. Il est d'une grande importance d'étudier ces interactions pour les comprendre et démontrer leurs impacts dans l'ensemble d'un système. Les informations obtenues peuvent améliorer les traitements médicaux au cas où l'horloge devient défaillante. Cependant l'étude de ces mécanismes exige une sensibilité élevée et une méthode analytique précise. Un accès optique à l'échelle nanométrique peut être obtenu par des techniques de microscopie à super-résolution, mais la nécessité d'une instrumentation sophistiquée et le traitement complexe des images obtenues limitent leur applicabilité.

Par opposition, le transfert d'énergie par résonance de type Förster (FRET) est une méthode analytique simple qui a fait ses preuves pour être très appropriée pour l'étude des mécanismes à l'échelle nanométrique. FRET est un transfert d'énergie non radiatif allant d'un donneur à un accepteur basé sur des interactions de Coulomb. [1-3] Les descriptions théoriques datent du milieu des années 1940, lorsque Theodor Förster a proposé une description de ce processus par mécanique quantique, encore utilisée jusqu'à ce jour. [4] Une pierre angulaire de la grande popularité du FRET dans les mesures nanométriques est la forte dépendance de l'efficacité de transfert à la distance, aussi appelé l'efficacité de FRET. La dépendance r^{-6} permet l'accès à des mesures de distances sensibles, aux changements structurels et aux mécanismes biomoléculaires dans une plage de distance d'environ 1 nm à 20 nm. [1,3,5] La distance effective pour la mesure de FRET dépend fortement de la paire donneur-accepteur sélectionnée et se caractérise par leur distance Förster, qui est la distance donneur-accepteur, à laquelle l'efficacité de FRET est égale à 50%. Les paires de FRET ordinairement utilisées présentent une distance Förster d'environ 3 à 6 nm, en contraste avec la combinaison de complexes de lanthanides de Terbium (CLT) en tant que donneurs FRET et les boîtes quantiques (QD) comme accepteurs FRET qui permet d'atteindre des distances Förster exceptionnelles jusqu'à environ 11 nm. [6-8] Le processus FRET a un impact direct sur les propriétés photophysiques du donneur et entraîne une diminution de son intensité en luminescence, le rendement quantique, et la durée de vie. La détermination de ces paramètres permet le calcul de l'efficacité de FRET en utilisant les données spectroscopiques du donneur. Le calcul de l'efficacité de FRET avec la distance Förster

donne accès à l'estimation de la distance donneur-accepteur, ainsi FRET peut être utilisée en tant que réglette moléculaire.

Les CLT possèdent d'exceptionnels longs temps de décroissance de photoluminescences (PL) de quelques millisecondes par rapport à des luminophores classiques, qui ont un temps de décroissance PL dans la gamme de la nanoseconde. [9-10] Ces longs temps de décroissance ainsi que des bandes d'émission PL bien structurées de CLT proviennent des transitions f-f interdites au sein de l'ion Tb^{3+} . En raison de la nature de ces transitions interdites, les coefficients d'extinction de l'ion Tb^{3+} est très faible et l'utilisation de ligands de coordination à une cage est bénéfique. Les ligands servent d'antennes qui collectent la lumière et transfèrent leur énergie d'excitation à l'ion Tb^{3+} . En outre, le ligand protège l'ion Tb^{3+} des effets d'extinction induits par l'environnement, par exemple, par des molécules d'eau, et fournit la possibilité de conjuguer des CLT à des biomolécules d'intérêt. [11-13] L'utilisation de CLT en tant que donneurs FRET a montré qu'il est avantageux lorsque leur temps de décroissance à long PL peut être utilisé pour des mesures à résolution temporelle, qui permettent la distinction entre le signal CLT et courte durée d'autofluorescence en bruit de fond, et d'entraîner ainsi une sensibilité de détection accrue pour les applications biologiques. [14-15] En outre, la distinction des bandes d'émission PL de CLT permet une simple déconvolution du signal du signal CLT en présence de plusieurs accepteurs FRET, ce qui s'avère bénéfique pour des applications multiplexées. [16-19] QDs sont des nanocristaux semi-conducteurs ayant des propriétés photophysiques uniques. Leur absorption forte et large, lumineuse et à bande étroite d'émission PL avec des rendements élevés quantiques, ainsi que la forte photostabilité les rendent supérieurs par rapport à des fluorophores conventionnels. [20] Une caractéristique unique est leurs bandes d'émission de taille modulable, qui est un résultat de l'effet de confinement quantique. En raison de la petite taille de boîtes quantiques calculée par rapport au rayon de Bohr de l'exciton (qui peut être considéré à la distance trou-électron) l'excitation d'un QD conduit à la création d'un exciton qui est confinée dans les trois dimensions. En conséquence, les bandes d'énergie continue se partagent en niveaux discrets. Ainsi une taille décroissante renforce cet effet et résulte à une émission décalée vers le bleu. [21,22] Au cours des dernières décennies, des stratégies de synthèse bien établies ainsi que diverses méthodes pour rendre QDs biocompatibles et pour permettre la conjugaison de biomolécules ont abouti à une énorme quantité d'applications basées sur les QD. [23-28] Dans les applications à base de FRET, les QDs sont le plus souvent utilisés comme donneurs et rarement comme accepteurs. En raison de leurs larges bandes d'absorption et de leurs hauts coefficients d'extinction, les QDs présentent d'excellentes propriétés pour l'utilisation en tant qu'accepteurs. Cependant ces mêmes propriétés empêchent une excitation sélective du donneur

FRET. En outre, seulement une petite partie des boîtes quantiques peut être utilisée efficacement à l'état non-excité comme donneurs FRET à cause de la similitude en temps de vie par rapport à la plupart des fluorophores conventionnels. [29-31] Contrairement à des fluorophores conventionnels, les LTCs sont bien adaptés comme donneurs pour QDs en raison de leur longue période de décroissance PL. Des bandes d'émission CLT PL bien structurées combinées à la taille modulable des QD PL font de cette paire de FRET un choix idéal pour les applications multiplexées. [6,7,30-32]

Le diagnostic in vitro peut être utilisé pour indiquer le début d'une maladie et de la progression de celle-ci. Par conséquent, la concentration des marqueurs biologiques spécifiques est mesurée dans des échantillons de sang, de plasma ou de sérum d'un patient. L'approche la plus populaire pour cibler ces biomarqueurs est l'utilisation d'anticorps dans les dosages immunologiques. De ce fait les dosages immunologiques peuvent être divisés en deux types, à savoir des dosages hétérogènes et homogènes. A la différence du type hétérogène, le dosage immunologique homogène évite les étapes fastidieuses de séparation et de lavage, ce qui simplifie la réalisation et requiert de faibles exigences imposées au système de mesure. [33] FRET est une méthode analytique appropriée pour des analyses immunologiques homogènes puisque la présence des biomarqueurs résulte en une proximité de donneur et accepteur conjugué à la détection de deux anticorps différents et permet ainsi un FRET. [33,34] Les dosages immunologiques basés sur des lanthanides FRET sont bien établis et ont certains avantages en raison de leur temps de décroissance à long PL, qui permet une détection très sensible des biomarqueurs contre un faible bruit de fond.[15,35-39] La distance à l'intérieur des dosages immunologiques est déterminée par les anticorps, les biomarqueurs et les luminophores utilisés; ces trois acteurs faisant office de système de génération de signal. Les deux derniers ne peuvent être modifiés dans leur taille, mais les anticorps peuvent être fragmentés et serait capable de se lier au biomarqueur. L'un des objectifs de ce travail était d'étudier l'influence de différentes tailles d'anticorps sur la sensibilité du test immunologique pour la détection de biomarqueurs spécifiques. Par conséquent, les anticorps IgG à longueur complète ont été fragmentés en $F(ab')_2$ et $F(ab)$ et conjugués soit au donneur ou l'accepteur. Les biomarqueurs utilisés dans ce travail étaient l'antigène prostatique spécifique totale (TPSA), l'antigène carcino (CEA), l'énolase spécifique des neurones (NSE), et le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR). TPSA comprend la somme de PSA libre et PSA lié à des protéines dans le sang et une augmentation du niveau TPSA peut être concomitante à la présence d'un cancer de la prostate. La seuil clinique de TPSA est de 4 ng/ml. NSE et CEA appartiennent à une famille de biomarqueurs de cancer du poumon utilisés pour la différenciation entre le cancer du poumon à petites cellules et le cancer non à petites cellules du poumon. Les concentrations des seuils cliniques sont respectivement de

12.5 ng/ml et 5 ng/mL pour NSE et CEA, respectivement. Ces biomarqueurs aussi diffèrent largement dans leurs poids moléculaires, qui sont 32 kDa (TPSA), 95 kDa (NSE), et 180 kDa (CEA). En raison de la forte dépendance en distance impliquée dans le FRET, un des objectifs de ce travail a été l'optimisation de la distance donneur-accepteur par l'intermédiaire d'anticorps à différentes tailles conjugués soit aux donneurs soit aux accepteurs afin de trouver la meilleure combinaison pour fournir la plus haute sensibilité. Il existe des anticorps à domaine unique, également appelés nanobodies, plus petit qu'un fragment F(ab). Les nanobodies sont des antigènes à domaine unique des fragments d'anticorps à chaînes lourdes de liaison ayant un poids moléculaire de 15 kDa seulement et sont utilisés dans de nombreux anticorps différents en fonction applications.[40-43] Dans ce travail, ils sont utilisés pour la première fois dans un dosage immunologique homogène pour la détection d'une forme soluble de l'EGFR sur la base d'un FRET CLT-à-QD .

En parallèle des études menées sur le FRET avec des CLT-à-QD pour des dosages immunologiques, ce travail inclut également l'application de ce système CLT-à-QD en tant que réglettes moléculaires. La possibilité d'obtenir des mesures de distance par FRET a été initialement publiée par Stryer. [44,45] Aujourd'hui, le FRET est utilisé pour le suivi des interactions inter- et intramoléculaires, [46] le repliement des protéines, [47] ou le mouvement des transporteurs cellulaires. [48] Les paires habituels de donneur-accepteur sont basées sur des colorants organiques ou des protéines fluorescentes, qui sont limitées dans leurs propriétés photophysiques. La faible photostabilité, les temps de décroissance similaires à ceux du bruit de fond, et un petit décalage de Stokes entre l'absorbance et l'émission peuvent rendre les mesures difficiles. En outre, les petites distances Förster limitent la distance mesurable et empêchent leur utilisation dans les grands systèmes biologiques. La combinaison de CLT et QDs offre plusieurs avantages comme une bonne photostabilité, longs temps de décroissance et de plus grandes distances Förster. Un des objectifs de cette thèse a été l'utilisation de FRET CLT-à-QD pour la caractérisation de la taille et la forme de boîtes quantiques. Ces paramètres sont cruciaux car ils sont responsables du comportement des boîtes quantiques dans des applications biologiques. Les analyses structurales des boîtes quantiques sont principalement basées sur la microscopie électronique à transmission (MET), la diffusion de lumière dynamique (DLS) et la chromatographie d'exclusion de taille sur HPLC. [49] Toutes ces techniques présentent des inconvénients comme une vue limitée à 2 dimensions sur les boîtes quantiques en utilisant le TEM. Bien que mesures de DLS fournissent des informations sur le QD avec le revêtement de surface, la forme ne peut pas être résolue et, en outre une couche d'hydratation est incluse dans ces calculs, ce qui conduit à une surestimation de la taille réelle. Dans les mesures HPLC, la taille est estimée en corrélation avec le temps de rétention d'une norme, qui également ne

permet pas une résolution de la forme et montre une forte dépendance à l'égard de la norme. Des approches plus sophistiquées sont possibles, mais dans le but d'enquêter sur la taille et la forme de QD dans les mesures homogènes dans une gamme de concentration sub-nanomolaire, dans des conditions qui sont similaires à celles utilisées plus tard dans l'application réelle, FRET se montre être la méthode de choix. Une analyse résolue en temps du système FRET CLT-à-QD permet l'estimation des distances donneur-accepteur en utilisant les temps de décroissance mathématiquement ajustés et a déjà été démontrée pour être en mesure d'offrir des informations sur la taille et la forme de boîtes quantiques. [6]

La thèse se compose de deux études utilisant FRET-CLT-QD. Dans la première étude de l'application de CLT-à-QD FRET aux dosages immunologiques homogènes à base de sérum est étudiée. Une caractérisation spectroscopique détaillée des luminophores utilisés est effectuée avant et après la conjugaison avec différents types d'anticorps en utilisant la spectroscopie stationnaire UV/Vis d'absorption et la spectroscopie stationnaire et résolue dans le temps de luminescence afin d'obtenir le nombre d'anticorps par luminophore et pour vérifier toute modification des propriétés photophysiques en raison de la conjugaison de biomolécules. Dans ce qui suit, différentes combinaisons de conjugués à taille entière (IgG) d'anticorps ou de leurs fragments ($F(ab')_2$, $F(ab)$) pour la détection de TPSA ont été étudiés pour optimiser la sensibilité du dosage immunologique en utilisant le complexe Lumi4-Tb comme donneur de FRET et eFluor 650 nanocristal comme accepteur FRET. Les résultats présentés dans cette première étude montre l'influence de la fragmentation des anticorps sur la performance des dosages immunologiques pour la détection de TPSA, publiés dans la référence [50] - l'article étant accessible en version complète avec informations supplémentaires à la fin de ce travail. Suite à cette étude, l'influence de biomarqueurs de différentes tailles est étudiée en utilisant TPSA, NSE, et CEA. En outre, deux autres points quantiques (eFluor 605 nanocristaux, Qdot 705 ITK) ont été inclus comme accepteurs FRET et conjugués avec les anticorps IgG, $F(ab')_2$ et $F(ab)$ pour la détection des différents biomarqueurs. La performance du dosage immunologique utilisant différentes combinaisons de tailles et de couleurs d'anticorps QD sont comparées aux résultats de kits de diagnostic commerciaux déjà établis ciblant les mêmes biomarqueurs et mesurée dans les mêmes conditions. Les échantillons cliniques (humains) ont été mesurés pour le biomarqueur TPSA afin de montrer l'applicabilité clinique du dosage immunologique du FRET CLT-à-QD développé dans ce travail. Enfin, des mesures duplexées des biomarqueurs NSE et CEA prouvent la performance supérieure de CLT-à-QD FRET dans les applications de multiplexage. L'étude est complétée par une analyse approfondie de nanobodies conjugués soit au complexe Lumi4-Tb ou au nanocristal eFluor 650 pour la détection de l'EGFR soluble. Les

résultats présentés sont les premières démonstrations des dosages immunologiques FRET se basant sur des nanobody - en utilisant le transfert d'énergie-CLT-QD- et ont été publiées dans la référence [51]. L'article est accessible en version complète en fin de ce manuscrit ainsi que les informations supplémentaires.

Dans la seconde partie de cette thèse, le FRET CLT-à-QD en tant que réglette moléculaire a été utilisée pour l'analyse structurale des boîtes quantiques. Avant la présentation des résultats, l'obtention des distances à partir des courbes de décroissance multi-exponentielles mesurées, y compris la correction nécessaire pour les CLT ne participant pas au FRET est expliquée, suivie par la caractérisation spectrale des donneurs et accepteurs FRET utilisés. Dans la première partie de l'étude, trois lots différents de QDs biotinylés ayant des longueurs d'onde d'émission similaires sont utilisés en combinaison avec des complexes Lumi4-Tb liés à la streptavidine. La reconnaissance forte de la biotine à la streptavidine permet d'obtenir des FRET efficaces et résulte en une distribution de distance donneur-accepteur selon le lot de boîtes quantiques, qui a été utilisé pour estimer la taille, la forme et le nombre de biotine lié à la surface. Pour éviter de nouvelles modifications de la surface de QD par la conjugaison de la biotine, une deuxième approche pour la mise en place d'une proximité entre CLT et QD a été étudiée, à savoir l'auto-assemblage via la polyhistidine. Par conséquent, le CLT a été conjugué à un peptide et à une protéine liante au maltose, qui présente à la fois une étiquette hexahistidine qui permet, en fonction du revêtement de QD, la coordination de la surface de Zn riche en boîtes quantiques ou à des ligands de surface carboxylées. Une étude détaillée en résolution temporelle de 11 boîtes quantiques a été réalisée avec différentes tailles, formes et revêtements de surface en combinaison avec les deux CLT donneurs FRET, ces derniers possédant eux-mêmes aussi différentes tailles, formes, orientations et conditions liantes. L'analyse des courbes de décroissance multi-exponentielles de donneur et accepteur ont permis d'obtenir des informations sur la taille, la forme et la biofonctionnalité des bioconjugués QD étudiés. Les résultats sont en accord avec d'autres méthodes d'analyses structurales, telles que la MET ou le DLS, mais avec l'avantage d'une mesure en milieu homogène avec une résolution en trois dimensions (pas facilement possible pour MET), sans l'inclusion d'une couche d'hydratation (inconvenient dans le cas du DLS) et à de faibles concentrations dans le même environnement que celui utilisé pour l'application biologique. Les résultats des deux études, en utilisant la reconnaissance de la biotine-streptavidine et l'auto-assemblage via la polyhistidine, sont publiés dans les références [52] et [53], respectivement. Ces articles sont accessibles en version complète comprenant les informations supplémentaires à la fin de ce manuscrit.

Résultats et discussion

Ce travail présente l'application de complexes de lanthanides de terbium (CLT) et des boîtes quantiques (QD) comme paire donneur-accepteur pour Förster transfert d'énergie par résonance (FRET) dans deux domaines de recherche distincts. Les longs temps de décroissance PL de CLT ainsi que leurs bandes d'émission PL bien structurées en combinaison avec les bandes d'absorbance larges et de taille-réglable, bandes d'émission étroites de boîtes quantiques offrent des avantages exceptionnels par rapport à d'autres paires de FRET, comme une augmentation du rapport signal sur bruit et un rapport de multiplexage à forte capacité. Ces avantages ont été exploités pour l'application dans des dosages immunologiques homogènes pour la détection de plusieurs biomarqueurs et en tant que réglette moléculaire pour l'analyse structurale de QDs biocompatibles. Le contexte théorique nécessaire au FRET, au CLT, et aux boîtes quantiques ont été également décrit dans ce travail, y compris un bref aperçu de leurs avantages dans différentes applications biologiques.

Dans la première partie expérimentale de ce travail, la forte dépendance du FRET aux distances a été exploitée pour l'optimisation de la performance des dosages immunologiques homogènes pour détecter les biomarqueurs de la prostate totale antigène spécifique (TPSA), l'énolase spécifique des neurones (NSE), l'antigène carcino (CEA) et le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR). Par conséquent, les anticorps de taille différente ont été préparés en utilisant un kit commercial de fragmentation pour la production de fragments $F(ab')_2$ et $F(ab)$ d'un anticorps IgG. Les anticorps préparés diffèrent largement dans leur taille, l'anticorps IgG a un poids moléculaire de 150 kDa, $F(ab')_2$ a un poids moléculaire de 100 kDa, et $F(ab)$ a un poids moléculaire de 50 kDa, et tous étaient capables de se lier aux biomarqueurs. Après la préparation réussie d'anticorps de différentes tailles conjugués avec CLT ou à différents boîtes quantiques, une caractérisation approfondie a été conduite spectroscopie d'absorption fixe et spectroscopie de luminescence en résolution temporelle. La caractérisation a été utilisée pour vérifier toute altération causée par la conjugaison du luminophore avec l'anticorps et pour estimer le rapport de conjugaison.

La conjugaison de CLT aux anticorps de tailles différentes a donné lieu à aucune modification du spectre d'absorbance, en effet, le principal pic d'absorbance à 340 nm est resté inchangé pour tous les conjugués. La conjugaison a été vérifiée avec succès en observant une augmentation de l'absorption à 280 nm, longueur d'onde typique de la des protéines. En utilisant une approche de combinaison linéaire nous avons pu calculer le rapport de l'étiquetage de LTS par rapport aux anticorps à partir des mesures d'absorbance. Ainsi le taux de marquage décroît de l'anticorps IgG au fragment $F(ab)$, qui a été attribué à la plus petite taille du fragment d'anticorps. Le spectre PL mesuré de

CLT conjugués a montré les quatre bandes d'émission intenses typiques à 495 nm, 545 nm, 585 nm et 625 nm, et des différences mineures dans la séparation des bandes individuelles après conjugaison d'anticorps ont pu être observées. En fonction de la présence de sérum dans la solution tampon, la forme bi-exponentielle des courbes de décroissance PL a permis le calcul de l'amplitude moyenne de temps de décroissance entre 2.2 ms et 2.8 ms. Les rendements quantiques calculés à partir des temps de décroissances moyens sont compris entre 64% et 81% et sont aussi utilisés pour le calcul de la distance de Förster. Comme pour les conjugués anticorps-CLT, les conjugués anticorps-QD ont eux aussi montré aucune altération dans leur spectres d'absorption en raison de la conjugaison. Les larges spectres typiques des bandes d'absorbance avec des coefficients d'extinction élevés ont été observés et une approche de combinaison linéaire a été utilisée pour calculer les rapport de marquage. En raison de l'important bruit de fond de l'absorption à 280 nm, l'estimation de la concentration de QD-anticorps a été affligé avec de plus grandes incertitudes que pour les conjugués anticorps-CLT. Cependant, certaines tendances générales ont été observées. Tout d'abord avec la diminution de la taille de l'anticorps par rapport QD a été augmentée, ce qui est attribuable à la taille plus petite des fragments par rapport à l'anticorps IgG à un premier abord. Une comparaison du fragment F(ab')₂ sur trois boîtes quantiques différents a révélé une augmentation du taux de marquage de eQD605 à iQD705 causée par la plus grande taille et donc plus grande surface de celui-ci. Les spectres d'émission PL mesurés des trois boîtes quantiques utilisés dans les mesures de dosages immunologiques (eQD605, eQD650 et iQD705) ont montré le comportement dépendant de la taille typique et présentent une forme étroite de type gaussien couvrant la gamme de 605 nm à 705 nm. Toutes les boîtes quantiques ont montré une courbe de décroissance PL multi-exponentielle de temps de décroissance entre 10 ns à 100 ns et que des modifications mineures en fonction de l'anticorps conjugué ont été obsrvées. En général, la conjugaison des anticorps de tailles différentes a eu moins d'influence sur les paramètres importants nécessaires pour le calcul de la distance de Förster, à savoir le spectre d'émission du donneur, le rendement quantique de luminescence donneur, l'accepteur et le spectre d'absorbance. Les paires de FRET utilisés avec le CLT comme donneur et eQD605, eQD650 et iQD705 comme accepteurs aboutissent à des distances calculées Förster de 7.6 nm, 10.8 nm, et de 10.9 nm, respectivement.

Le FRET CLT-à-QD a permis de mesurer tous les biomarqueurs avec des limites de détection au niveau sub-nanomolaire dans des échantillons de sérum de 50 µL dans des dosages immunologiques homogènes mesurés sur deux lecteurs de plaques de fluorescence différentes. L'utilisation de différentes tailles d'anticorps conjugués aux LTCs ou aux QDs, a révélé que la diminution de la taille de l'anticorps accepteur est bénéfique à la sensibilité du dosage immunologique. La limite de détection (LOD), qui a

été utilisée pour comparer les performances des différentes combinaisons, a diminué de près de moitié en comparant un anticorps de taille entière aux anticorps fragmentés conjugués à la surface de QD. Cependant, la différence de sensibilité entre les anticorps $F(ab')_2$ et $F(ab)$ était négligeable pour tous les biomarqueurs étudiés. En revanche, la diminution de la taille de l'anticorps donneur n'a pas abouti à une autre sensibilité accrue. Ces résultats ont pu être observés dans d'autres cas, comme indiqué par l'utilisation de deux boîtes quantiques électroluminescentes différemment comme accepteurs FRET. La première hypothèse selon laquelle une diminution de la taille des anticorps en raison de la fragmentation résultant à une distance plus courte donneur-accepteur et donc une sensibilisation ultérieure de FRET n'a pas pu être adoptée. Les distances moyennes donneur-accepteurs à partir des courbes de décroissance ont révélées une distance similaire dans les cas d'utilisation des anticorps $F(ab)$, IgG, $F(ab')_2$ ou conjugué à la surface QD en combinaison avec un anticorps en taille réelle marqué au CLT. Une nette différence dans la distance donneur-accepteur a été observée lorsque le même anticorps a été conjugué à soit eQD605 ou eQD650, qui a été attribué à la plus grande taille de l'eQD650. Intéressant est aussi la comparaison de la distance moyenne donneur-accepteur pour les différents biomarqueurs. Bien qu'ils soient très différents en taille (TPSA avec un poids moléculaire de 32 kDa, le CEA avec un poids moléculaire de 180 kDa) il n'y avait aucune différence de distance observée dans la distance moyenne donneur-accepteur. Ceci peut être expliqué par l'origine des anticorps utilisés. Ils sont obtenus à partir de kits de diagnostic commerciaux et optimisés pour les mesures de FRET. Au cours de cette optimisation, des anticorps ont été choisis qui se lient à des épitopes différents sur le biomarqueur à des distances semblables les uns aux autres pour permettre un FRET efficace indépendant de la taille réelle du biomarqueur. Un point crucial pour l'utilisation de conjugués d'anticorps dans des applications commerciales est leur stabilité à long terme. Dans les kits de diagnostic standards, la durée de vie à long terme est d'environ 4 semaines, selon le biomarqueur utilisé et leurs anticorps correspondants. Pour prouver la stabilité à long terme des conjugués anticorps-QD la mesure de LOD a été répétée après quelques mois à un an après la préparation. Il a pu être démontré que la performance des sondes étaient similaires à celle mesurée le jour de conjugaison et révèle donc une exceptionnelle stabilité à long terme dans une solution de stockage à 4°C. Pour prouver que le système FRET CLT-QD développé pour l'application dans les mesures cliniques de concentrations de biomarqueurs, les concentrations TPSA dans des échantillons de sérum humain ont été étudiés. Les résultats sont en bon accord avec les valeurs de référence comme ils étaient dans une fourchette d'erreur de $\pm 20\%$. Cependant, en comparaison avec les kits de diagnostic commerciaux pour la mesure des mêmes marqueurs biologiques basés sur un complexe d'Europium en tant que donneur et différents colorants organiques

comme accepteur, le système FRET CLT-à-QD utilisé a montré une sensibilité plus faible. Une optimisation des concentrations utilisées anticorps, temps d'incubation, et réglages de l'instrument pourrait se traduire par au moins aussi bons, sinon meilleurs LODs que ceux des kits commerciaux. Néanmoins, la sensibilité de tous les biomarqueurs était inférieure au seuil et dans une plage de concentration concernée clinique. Bien que la sensibilité du système commercial était plus élevée, il présente l'inconvénient que le système ne peut pas être utilisé dans des applications multiplexées. L'application réussie de la détection simultanée de NSE et CEA a été montrée pour l'utilisation de CLT comme donneur FRET et eQD605 et eQD650 en tant que accepteurs FRET. Le problème majeur des mesures multiplexées est la diaphonie spectrale causée par de larges bandes accepteur d'émission, qui se traduisent par la nécessité d'un post-traitement pour corriger ces valeurs. En raison de la forme de spectres d'émission gaussienne étroite des QDs aucune correction de diaphonie n'était nécessaire et les données obtenues étaient directement utilisables pour calculer les courbes d'étalonnage. La comparaison entre la détection du biomarqueur dans un format simple et dans le format duplexé n'a révélé qu'une légère augmentation de la limite de détection et a montré également les limites de détection au niveau sub-nanomolaire cliniquement pertinentes.

Un dosage immunologique exceptionnel basé sur le FRET CLT-à-QD a été obtenu pour le cas de la détection de l'EGFR en utilisant des nanobodies. La très petite taille des nanobodies abouti à des rapports élevés de marquage sur QDs et seule une petite proportion du marquage sur les CLT. Bien que la présence de protéines a donné lieu à un signal de FRET en l'absence de l'antigène, l'augmentation du signal FRET en présence de l'EGFR a été plus prononcée et pourrait être utilisée pour la mesure d'une courbe d'étalonnage et donc une estimation de la limite de détection. Le système a montré en outre une sensibilité même en présence de sérum, ce qui augmente la limite de détection par rapport à un diluant exempt de sérum. Cependant, les cas de LODs estimés en dessous du niveau de seuil clinique pour les deux diluants et présente la première application de nanobodies pour la détection d'un antigène à l'aide du FRET CLT-QD.

En conclusion, la présente étude a examiné l'utilisation du FRET CLT-à-QD dans des dosages immunologiques homogènes à résolution temporelle en utilisant des anticorps dépendants de tailles différentes pour la détection de plusieurs biomarqueurs. Tous les biomarqueurs ont été mesurés à des concentrations cliniquement pertinentes dans de petits échantillons de sérum et de volume. La diminution de la taille de l'anticorps est bénéfique pour le rendement de la préparation de dosage immunologique et l'échantillon. Faits saillants de l'étude étaient la mesure d'échantillons réels de patients

et de la première application en duplexée du FRET CLT-à-QD pour la détection simultanée de deux biomarqueurs dans un échantillon.

La deuxième partie de la partie expérimentale a été l'étude de l'application du FRET LTC-à-QD pour l'analyse structurale des QDs biocompatibles. En effet, la taille ainsi que la forme influencent le comportement des QDs dans les applications biologiques, il est important d'étudier ces paramètres. La paire de FRET étudiée offre de nombreux avantages par rapport aux autres méthodes de caractérisation existantes telle que la MTE, le DLS, ou HPLC et surtout cela nous donne accès à l'analyse de la forme du QD. A cause de grande différence de taille entre les petites LTCs et les grands QDs, plusieurs LTCs ont été positionnés autour d'un QD, ce qui a eu comme résultat une distribution de distance donneur-accepteur avec des efficacités différentes de FRET. Une analyse détaillée des courbes de décroissance PL multi-exponentielles et LTC et des QDs ont permis d'extraire des temps de décroissances simples. Ainsi, les longs temps de décroissance des LTCs sont de plusieurs ordres de magnitudes plus longs que les durées de décroissance intrinsèque des QDs, ce qui permet d'obtenir des temps de décroissance de FRET, nécessaires à l'estimation de distance, à partir des courbes de décroissance PL du donneur ou accepteur FRET. Les efficacités FRET correspondantes ont été calculées en utilisant ces temps de décroissance and ont permis l'estimation des distances donneur-accepteur selon le formalisme de Förster. La similitude des temps de décroissance FRET a été la preuve pour le FRET avec succès entre le LTC et le QD. Avant d'utiliser les temps de décroissance pour le calcul de distance, les données ont été corrigées concernant les signaux non impliqués dans les deux canaux. Afin d'établir une proximité propice au QD, deux stratégies ont été utilisées, la reconnaissance biotin-streptavidine et l'auto-assemblage via la polyhistidine. Chaque échantillon a été soigneusement caractérisé en utilisant la spectroscopie stationnaire d'absorption et la spectroscopie de luminescence en résolution temporelle et stationnaire.

Dans les deux systèmes, le complexe LTC Lumi4-Tb a été utilisé et conjugué à la streptavidine (Tb-sAv), un peptide (Tb-PEP) et une protéine liante au maltose (Tb-MBP). Les deux derniers complexes ont montré un marquage à l'hexahistidine (His₆) pour la chélation aux cations divalent comme le Zn. Similaires aux conjugués d'anticorps LTC, les spectres d'absorbance et d'émission autant que les courbes de décroissance ont été très peu affectés par la liaison aux différentes biomolécules. L'apparition d'une bande d'absorbance à 280 nm montre une liaison réussie aux biomolécules. Les caractéristiques typiques des LTCs avec une absorbance à 340 nm avec des bandes d'émissions bien séparées et fines entre 490 nm et 650 nm ont pu être observées pour

tous les complexes donneurs. Ainsi, l'amplitude des temps de décroissance est de 2.3 ms à 2.75 ms avec des rendements quantiques compris entre 65% et 80%.

Au total, trois différents lots de QDs ont été utilisés pendant l'étude. Le premier lot était des QDs biotinylés pour permettre la reconnaissance biotin-streptavidine. Dans le cas de l'auto-assemblage via la polyhistidine, deux différents lots de QDs ont été utilisés et diffèrent principalement de la surface de recouvrement. Un premier lot exhibe des ligands de surfaces d'acide dihydrolipoïque, tandis que le deuxième lot possède de longs polymères carboxylés à la surface. Tous les QDs ont montré des bandes d'absorbance caractéristiques : larges avec des coefficients d'extinction élevés, des bandes d'émission PL fines et de forme gaussienne avec des rendements quantiques allant de 5.4 nm à 11.1 nm, selon le recouvrement spectral entre le LTC et le QD.

Dans le cas de la première application du FRET LTC-à-QD, la reconnaissance biotine-streptavidine a été appliquée en utilisant Tb-sAV et trois QDs biotinylés, qui exhibent tous un maximum d'émission similaire mais avec des revêtements de surfaces différents. Deux d'entre eux sont de sources commerciales avec un revêtement polymère amphiphile/lipidique (Biot-iQD605 et Biot-eQDD605), tandis que le troisième a été synthétisé and rendu soluble dans l'eau via une réaction d'échange de ligand (Biot-TPQD605). Les dosages FRET ont été menés en utilisant une concentration constante de Tb-sAv et en augmentant les concentrations individuelles des Biot-QD. Les courbes de décroissance PL résultantes de LTC et Biot-QD ont été mesurées dans le soit appelé canal du donneur (LTC) et de l'accepteur (Biot-QD) sur un lecteur à plaque de fluorescence. Les courbes de décroissances PL mesurées dans le canal donneur montrent une importante diminution des intensités des courbes de décroissances et des intensités concomitantes des courbes de décroissances PL dans le canal accepteur augmente à cause de la sensitisation importante du FRET du Biot-QD, ce qui a été observé pour toutes les paires FRET LTC-QD. Ces courbes de décroissance ont été utilisées pour une analyse détaillée des temps de décroissance. Le temps moyen de décroissance FRET a été utilisé pour une estimation de la taille totale du QD avec l'assomption d'une forme sphérique. Il a été montré que la taille diminue allant de Biot-iQD605 au Biot-TPQD605, ce qui est expliqué majoritairement par les différents revêtements. La réaction d'échange de ligands résulte en un QD avec un revêtement plus fin par rapport à l'approche d'encapsulation amphiphile des QDs commerciaux. A cause du revêtement plus fin et ainsi à une distance donneur-accepteur plus courte pour le Biot-TPQD605, la diminution de la participation de LTC est plus prononcée que dans le cas des autres Biot-QDs. De plus amples informations sur la forme ont pu être obtenues à partir des temps de décroissances simples et de leurs fractions, qui sont très pratiques pour établir une propriété sur la dimension du QD. Par conséquent, l'information obtenue à partir du canal accepteur était plus précise à cause du plus petit

bruit de fond du LTC ce qui a permis l'évaluation des trois distances (trois dimensions), alors que dans le canal du donneur seulement deux distances ont pu être extraites. La fraction des temps de décroissance simples est importante puisqu'ils contiennent l'information sur la quantité des paires donneurs-accepteurs dans cette distance particulière. En règle générale, les lots de QDs ont montré deux distances donneur-accepteur majeures, qui incitent à une forme allongée. Ce qui est important pour le degré de l'élongation était la proportion des fractions des deux distances majeures. Une augmentation dans la quantité des paires FRET à distance courte comparée à la fraction ayant une distance donneur-accepteur plus longue indique une forme plus allongée. Dans le cas de Biot-eQDD605, il n'y a qu'une petite fraction de distance courte et une fraction importante de distances longues, provenant plutôt d'une forme mixte. La fraction la plus importante pour la distance courte a été obtenue pour Biot-iQD605 puisque ce sont les QDs les plus allongés dans l'étude, ce qui a été confirmé par des mesures de MET. Après l'analyse de la forme, la mesure en augmentant les concentrations de Biot-QD en présence d'une concentration constante de Tb-Asv a été menée pour l'évaluation des courbes de décroissance PL obtenues en utilisant une approche à résolution temporelle. Les rapports d'intensité obtenus ont été tracés en fonction des concentrations des QDs. En raison de la sensibilisation FRET des QDs, le rapport des intensités pour tous les QDs a augmenté jusqu'à ce que toutes les biotines sur les surfaces des QD aient été saturées. Ce point de saturation a été utilisé pour l'estimation du nombre de biotines sur la surface du QD. Lors de la préparation du Biot-TPQD605, deux concentrations initiales de biotine ont été utilisées, résultant à deux lots (appelés A et B) avec un nombre inconnu de biotine. En utilisant le système FRET LTC-à-QD le nombre de biotine sur la surface a été estimé à environ 1 pour le lot A et d'environ 3 à 4 pour le lot B. Des valeurs similaires de 3 à 4 molécules de biotines par QD ont aussi été obtenues pour les autres Biot-QDs et ont permis, en plus des informations sur la taille et la forme, une vue approfondie de la performance de bioconjugaison.

La précision du système biotine-streptavidine pour une analyse dimensionnelle est limitée par le rapport de marquage des quatre molécules de LTCs par conjugués de Tb-sAv. Par conséquent, la liaison d'un Tb-sAv à une Biot-QD apporte déjà des distances différentes selon la position des molécules de LTCs dans la molécule de streptavidine. En outre, la présence de biotine sur la surface du QD est nécessaire pour établir la proximité proche entre le donneur et l'accepteur. C'est pour ces raisons citées, que d'autres stratégies de liaison ont été étudiées telles que celle basée sur l'auto-assemblage via la polyhistidine sur une surface de QD, ce qui n'implique pas d'avantage altérations à la surface du QD. Un lot des six QDs exhibe des ligands de surface d'acide

duhydrolipoïque (DHHLA-QDs), ce qui est connu pour être un ligand capable de se lier à des molécules d'hexahistidine de marquage. L'autre lot comprend cinq ITK-QDs commerciaux avec des longs polymères carboxylés à la surface. Les donneurs exhibant des marqueurs His₆ étaient Tb-PEP et Tb-MBP. Tous les QDs ont été mesurés à la fois avec des donneurs à concentration constante et à augmentation de la concentration du QD sur un lecteur à plaque de fluorescence. Les courbes de décroissances obtenues à multi-exponentielles et mesurées dans le canal du donneur et de l'accepteur ont été utilisées pour une analyse détaillée des temps de décroissance pour obtenir des temps de décroissances moyens (information de la taille moyenne) et des temps de décroissances simples (information sur la forme tridimensionnelle).

Tout d'abord, FRET a pu être observé pour tous les QDs utilisant soit Tb-MBP ou Tb-PEP en tant que donneur. Mais dans une comparaison directe du donneur utilisé a révélé de larges différences pour l'applicabilité dans une analyse structurale des QDs étudiés. Ces différences sont attribuées aux dimensions du donneur. Tb-PEP possède une longueur définie de 1.2 nm avec un marquage His₆ à une extrémité et le LTC à l'autre extrémité. Au contraire du cas du Tb-MBP qui a les dimensions 3.0 x 4.0 x 6.5 nm et offre plusieurs positions de marquage pour CLTs. Malgré le fait que le rapport de marquage pour les deux donneurs est d'environ un LTC par molécule, les différentes positions possibles dans le Tb-MBP résultent dans des distributions plus larges de distances donneurs-accepteurs que dans le cas de Tb-PEP. C'est pour cela que les distances moyennes estimées en utilisant Tb-MBP sont plus larges comparées à l'utilisation de Tb-PEP et en plus dans l'analyse de forme, les fractions des différentes paires donneur-accepteur montrent pas de différences majeures et ainsi n'ont pas pu être utilisées pour une claire affirmation de la forme. Par voie de conséquence, le donneur Tb-PEP avec une distribution de distance donneur-accepteur petite et une longueur bien définie, permet d'estimer des informations plus précises sur la dimension du QD.

L'étude des cinq différents ITK-QDs utilisant Tb-PEP comme donneur a révélé une augmentation dans la taille moyenne des ITK-QD605 et ITK-QD705. Ainsi, la taille estimée est plus large que celles des mesures de MET (en négligeant le revêtement organique) et plus petites que celles des mesures de DLS (inclusion de la couche d'hydratation). Ces résultats démontrent la précision supérieure de l'approche FRET comparée aux deux autres méthodes. L'analyse des temps de décroissance simples montre une élongation prononcée avec augmentation de la taille quand la fraction de la distance longue décroît et la fraction de distance courte augmente. Une exception est le ITK-QD525, qui ne montre qu'une seule dominante fraction pour la longue distance et des fractions mineures pour la courte distance, provenant de sa forme sphérique. Les

résultats obtenus pour les différentes formes sont en accord avec les images obtenues par MTE.

Comme les DHLA-QDs sont similaires en taille, vu par leurs maxima d'émission proche dans le spectre d'émission PL, l'analyse est plus compliquée et les différents QDs sont difficiles à distinguer. En outre, le bas QY résulte en moindre sensibilisation QD, ce qui fait l'évaluation du temps de décroissance plus sophistiqué en comparaison avec les ITK-QDs. Cependant, l'augmentation en taille générale des différents DHLA-GDs a pu être mesurée et est en accord avec les valeurs attendues comparées aux données de la MTE ou DLS. Notons en plus, que la différenciation des DHLA-QDs ayant des spectres d'émission similaires mais des formes différentes a aussi été en accord avec les images obtenues par MTE.

L'approche FRET LTC-à-QD pour l'analyse structurale de QDs biocompatible a été réussie en utilisant : i) des stratégies de liaison différentes; ii) des QDs avec des tailles, formes et des conditions de liaisons différentes; iii) des LTC conjugués à différentes biomolécules aussi avec des tailles, formes et des conditions de liaison différentes. Les grands avantages de cette approche sont que c'est homogène, rapide, utilisant de très basses concentrations dans des conditions physiologiques et surtout à une résolution sub-nanomolaire. Alors que cette méthode permet d'obtenir des informations plus précises sur la taille et la forme des QDs, dans des conditions qui seront appliquées plus tard, des mesures standard de MTE, DLS et HPLC sont toujours important pour vérifier les résultats obtenus.

Perspectives

L'application du FRET LTC-à-QD dans des dosages immunologiques et en tant que réglette moléculaire a démontré la versatilité de cette paire FRET. Les avantages comme des distances de Förster larges, des mesures à résolution temporelle, la capacité de fort multiplexage et de larges surfaces de liaison pour différents types de molécules en combinaison avec les propriétés des luminophores individuelles, font l'application de cette paire de FRET une sonde intéressante pour des mesures *in vitro* et *in vivo* et nous permet ainsi d'acquérir plus d'information sur les mécanismes complexes des systèmes biologiques.

Concernant l'application de cette paire de FRET dans des dosages immunologiques, l'utilisation ici présentée d'une troisième couleur de QD pour la détection de TPSA nous donnera accès à des mesures simultanées de trois biomarqueurs en utilisant un seul LTC comme donneur et trois QDs comme accepteurs. Il est attendu les petites bandes d'émission PL des QDs réduisent de manière considérable la probabilité de diaphonie optique, ce qui était le majeur inconvénient dans le cas des colorants organiques dans les applications multiplexées. La substitution des colorants organiques en tant qu'accepteurs dans l'application ici présentée pour la mesure simultanée de cinq différents marqueurs pour la différenciation des cancers de poumon à non-petites cellules et les cancers de poumon à petites cellules en utilisant cinq différentes couleurs de QDs sans utiliser la matrice de diaphonie et une sensibilité plus élevée serait d'une grande étape vers une application commerciale des QDs pour les diagnostics *in vitro*. Comme démontré dans cette thèse, le système est générique pour différents biomarqueurs et peut être appliqué à la détection de tous les biomarqueurs pour lesquels deux anticorps cibles existent.

La caractérisation précise de la taille et de la forme des QDs biocompatibles utilisant le FRET LTC-à-QD présente une alternative valable par rapport aux techniques d'analyse structurale déjà bien établies. Tout particulièrement la mesure à basse concentration et dans des conditions physiologiques avec une résolution de forme à trois dimensions la fait démarquer cette approche des autres. Ainsi, cette méthode versatile n'est pas limitée aux QDs, mais à n'importe quelle nanoparticule capable d'interagir en tant qu'accepteur pour le donneur LTC qui peut être caractérisé et qui peut être utilisée en tant que réglette moléculaire. A part l'analyse structurale des nanoparticules, l'expérience dans les distributions de distance dans le système LTC-QD peut être utilisée dans de futures applications de l'analyse de distance dans du *in vitro* et du *in vivo*. Par voie de conséquence, les grandes distances Förster permettront des mesures de

distances dans des systèmes biologiques larges. En outre, l'opportunité du multiplexage du système peut être étudiée pour étudier des changements de distances complexes en utilisant différents accepteurs, qui permettront la mesure de plusieurs distances provenant d'un seul échantillon.

Références

- [1] B. W. Van der Meer, G. Coker, and S.-Y. S. Chen. *Resonance Energy Transfer: Theory and Data*. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 1994.
- [2] B. Valeur. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 2002.
- [3] J. R. Lakowicz. *Principles of Fluorescence spectroscopy*. Springer, New York, 3rd edition, 2006.
- [4] T. Förster. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik*, 2:55-75, 1948.
- [5] H. Sahoo. Förster resonance energy transfer - A spectroscopic nanoruler: Principle and applications. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 12:20-30, 2011.
- [6] F. Morgner, D. Geißler, S. Stufler, N. G. Butlin, H.-G. Löhmannsröben, and N. Hildebrandt. A Quantum-Dot-Based Molecular Ruler for Multiplexed Optical Analysis. *Angewandte Chemie International Edition*, 49:7570-7574, 2010.
- [7] D. Geißler, L. J. Charbonnière, R. F. Ziessel, N. G. Butlin, H.-G. Löhmannsröben, and N. Hildebrandt. Quantum Dot Biosensors for Ultrasensitive Multiplexed Diagnostics. *Angewandte Chemie International Edition*, 49:1396-1401, 2010.
- [8] N. Hildebrandt. How to Apply FRET: From Experimental Design to Data Analysis. *In FRET - Förster Resonance Energy Transfer From Theory to Applications*, pages 105-156. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 2014.
- [9] F. S. Richardson. Terbium(III) and europium(III) ions as luminescent probes and stains for biomolecular systems. *Chemical Reviews*, 82:541-552, 1982.
- [10] J.-C. G. Bünzli. Lanthanide Luminescence for Biomedical Analyses and Imaging. *Chemical Reviews*, 110:2729-2755, 2010.
- [11] E. G. Moore, A. P. S. Samuel, and K. N. Raymond. From Antenna to Assay: Lessons Learned in Lanthanide Luminescence. *Accounts of Chemical Research*, 42:542-552, 2009.
- [12] J.-C. G. Bünzli, A.-S. Chauvin, H. K. Kim, E. Deiters, and S. V. Eliseeva. Lanthanide luminescence efficiency in eight- and nine-coordinate complexes: Role of the radiative lifetime. *Coordination Chemistry Reviews*, 254:2623-2633, 2010.
- [13] M. Starck, P. Kadjane, E. Bois, B. Darbouret, A. Incamps, R. Ziessel, and L. J. Charbonnière. Towards Libraries of Luminescent Lanthanide Complexes and Labels from Generic Synthons. *Chemistry - A European Journal*, 17:9164-9179, 2011.
- [14] E. P. Diamandis. Immunoassays with time-resolved Fluorescence spectroscopy: Principles and applications. *Clinical Biochemistry*, 21:139-150, 1988.
- [15] A. K. Hagan and T. Zuchner. Lanthanide-based time-resolved luminescence immunoassays. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 400:2847-2864, 2011.

- [16] K. R. Kupcho, D. K. Stafslie, T. DeRosier, T. M. Hallis, M. S. Ozers, and K. W. Vogel. Simultaneous Monitoring of Discrete Binding Events Using Dual-Acceptor Terbium-Based LRET. *Journal of the American Chemical Society*, 129:13372-13373, 2007.
- [17] T. Kokko, T. Liljenbäck, M. T. Peltola, L. Kokko, and T. Soukka. Homogeneous Dual-Parameter Assay for Prostate-Specific Antigen Based on Fluorescence Resonance Energy Transfer. *Analytical Chemistry*, 80:9763-9768, 2008.
- [18] T. Kokko, L. Kokko, and T. Soukka. Terbium(III) Chelate as an Efficient Donor for Multiple-Wavelength Fluorescent Acceptors. *Journal of Fluorescence*, 9:159-164, 2009.
- [19] D. Geißler, S. Stufler, H.-G. Löhmannsröben, and N. Hildebrandt. Six-Color Time-Resolved Förster Resonance Energy Transfer for Ultrasensitive Multiplexed Biosensing. *Journal of the American Chemical Society*, 35:1102-1109, 2013.
- [20] U. Resch-Genger, M. Grabolle, S. Cavaliere-Jaricot, R. Nitschke, and T. Nann. Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels. *Nature Methods*, 5:763-775, 2008.
- [21] A. P. Alivisatos. Semiconductor Clusters, Nanocrystals, and Quantum Dots. *Science*, 271:933-937, 1996.
- [22] C. J. Murphy and J. L. Coffey. Quantum Dots: A Primer. *Applied Spectroscopy*, 56:16-27, 2002.
- [23] W. J. Parak, D. Gerion, T. Pellegrino, D. Zanchet, C. Micheel, S. C. Williams, R. Boudreau, M. A. L. Gros, C. A. Larabell, and A. P. Alivisatos. Biological applications of colloidal nanocrystals. *Nanotechnology*, 14:R15-R27, 2003.
- [24] V. Biju, T. Itoh, and M. Ishikawa. Delivering quantum dots to cells: bioconjugated quantum dots for targeted and nonspecific extracellular and intracellular imaging. *Chemical Society Reviews*, 39:3031-3056, 2010.
- [25] R. A. Sperling and W. J. Parak. Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 368:1333-1383, 2010.
- [26] P. Zrazhevskiy, M. Sena, and X. Gao. Designing multifunctional quantum dots for bioimaging, detection, and drug delivery. *Chemical Society Reviews*, 39:4326-4354, 2010.
- [27] W. R. Algar, K. Susumu, J. B. Delehanty, and I. L. Medintz. Semiconductor Quantum Dots in Bioanalysis: Crossing the Valley of Death. *Analytical Chemistry*, 83:8826-8837, 2011.
- [28] E. Petryayeva, W. R. Algar, and I. L. Medintz. Quantum Dots in Bioanalysis: A Review of Applications Across Various Platforms for Fluorescence Spectroscopy and Imaging. *Applied Spectroscopy*, 67:215-252, 2013.
- [29] A. R. Clapp, I. L. Medintz, B. R. Fisher, G. P. Anderson, and H. Mattoussi. Can Luminescent Quantum Dots Be Efficient Energy Acceptors with Organic Dye Donors? *Journal of the American Chemical Society*, 127:1242-1250, 2005.

- [30] D. Geißler, S. Lindén, K. Liermann, K. D. Wegner, L. J. Charbonnière, and N. Hildebrandt. Lanthanides and Quantum Dots as Förster Resonance Energy Transfer Agents for Diagnostics and Cellular Imaging. *Inorganic Chemistry*, 53:1824-1838, 2014.
- [31] N. Hildebrandt, K. D. Wegner, and W. R. Algar. Luminescent terbium complexes: Superior Förster resonance energy transfer donors for flexible and sensitive multiplexed biosensing. *Coordination Chemistry Reviews*, 273-274:125-138, 2014.
- [32] W. R. Algar, D. Wegner, A. L. Huston, J. B. Blanco-Canosa, M. H. Stewart, A. Armstrong, P. E. Dawson, N. Hildebrandt, and I. L. Medintz. Quantum Dots as Simultaneous Acceptors and Donors in Time-Gated Förster Resonance Energy Transfer Relays: Characterization and Biosensing. *Journal of the American Chemical Society*, 134:1876-1891, 2012.
- [33] D. Wild. *The immunoassay handbook: theory and applications of ligand binding, ELISA, and related techniques*. Elsevier, Oxford; Waltham, MA, 4th edition, 2013.
- [34] J. Szöllosi, S. Damjanovich, and L. Mátyus. Application of Fluorescence resonance energy transfer in the clinical laboratory: routine and research. *Cytometry*, 34:159-179, 1998.
- [35] G. Mathis. Rare earth cryptates and homogeneous fluoroimmunoassays with human sera. *Clinical Chemistry*, 39:1953-1959, 1993.
- [36] G. Mathis. Probing molecular interactions with homogeneous techniques based on rare earth cryptates and fluorescence energy transfer. *Clinical Chemistry*, 41:1391-1397, 1995.
- [37] G. Mathis. HTRF(R) Technology. *Journal of Biomolecular Screening*, 4:309-313, 1999.
- [38] K. Blomberg, P. Hurskainen, and I. Hemmilä. Terbium and rhodamine as labels in a homogeneous time-resolved fluorometric energy transfer assay of the beta subunit of human chorionic gonadotropin in serum. *Clinical Chemistry*, 45:855-861, 1999.
- [39] G. Wang. Homogeneous time-resolved Fluoroimmunoassay of bensulfuron-methyl by using terbium fluorescence energy transfer. *Talanta*, 55:1119-1125, 2001.
- [40] R. C. Roovers, T. Laeremans, L. Huang, S. De Taeye, A. J. Verkleij, H. Revets, H. J. de Haard, and P. M. P. van Bergen en Henegouwen. Efficient inhibition of EGFR signaling and of tumour growth by antagonistic anti-EGFR Nanobodies. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 56:303-317, 2007.
- [41] G. P. Anderson, R. D. Bernstein, M. D. Swain, D. Zabetakis, and E. R. Goldman. Binding Kinetics of Antiricin Single Domain Antibodies and Improved Detection Using a B Chain Specific Binder. *Analytical Chemistry*, 82:7202-7207, 2010.
- [42] A. de Marco. Biotechnological applications of recombinant single-domain antibody fragments. *Microbial Cell Factories*, 10:44, 2011.

- [43] A. Sukhanova, K. Even-Desrumeaux, A. Kisserli, T. Tabary, B. Reveil, J.-M. Millot, P. Chames, D. Baty, M. Artemyev, V. Oleinikov, M. Pluot, J. H.M. Cohen, and I. Nabiev. Oriented conjugates of single-domain antibodies and quantum dots: toward a new generation of ultrasmall diagnostic nanoprobe. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 8:516-525, 2012.
- [44] L. Stryer and R. P. Haugland. Energy transfer: a spectroscopic ruler. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 58:719-726, 1967.
- [45] L. Stryer. Fluorescence Energy Transfer as a Spectroscopic Ruler. *Annual Review of Biochemistry*, 47:819-846, 1978.
- [46] B. Schuler, E. A. Lipman, P. J. Steinbach, M. Kumke, and W. A. Eaton. Polyproline and the "spectroscopic ruler" revisited with single-molecule fluorescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102:2754-2759, 2005.
- [47] B. Schuler and W. A. Eaton. Protein folding studied by single-molecule FRET. *Current Opinion in Structural Biology*, 18:16-26, 2008.
- [48] B. Prevo and E. J. G. Peterman. Förster resonance energy transfer and kinesin motor proteins. *Chemical Society Reviews*, 43:1144-1155, 2014.
- [49] R.A. Sperling, T. Liedl, S. Duhr, S. Kudera, M. Zanella, C.-A.J. Lin, W.H. Chang, D. Braun, and W.J. Parak. Size Determination of (Bio)conjugated Water-Soluble Colloidal Nanoparticles: A Comparison of Different Techniques. *Journal of Physical Chemistry C*, 111:11552-11559, 2007.
- [50] K. D. Wegner, Z. Jin, S. Lindèn, T. L. Jennings, and N. Hildebrandt. Quantum-Dot-Based Förster Resonance Energy Transfer Immunoassay for Sensitive Clinical Diagnostics of Low-Volume Serum Samples. *ACS Nano*, 7:7411-7419, 2013.
- [51] K. D. Wegner, S. Lindèn, Z. Jin, T. L. Jennings, R. el Khoulati, P. M. P. van Bergen en Henegouwen, and N. Hildebrandt. Nanobodies and Nanocrystals: Highly Sensitive Quantum Dot-Based Homogeneous FRET Immunoassay for Serum-Based EGFR Detection. *Small*, 10:734-740, 2014.
- [52] K. D. Wegner, P. T. Lanh, T. Jennings, E. Oh, V. Jain, S. M. Fairclough, J. M. Smith, E. Giovanelli, N. Lequeux, T. Pons, and N. Hildebrandt. Influence of Luminescence Quantum Yield, Surface Coating, and Functionalization of Quantum Dots on the Sensitivity of Time-Resolved FRET Bioassays. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 5:2881-2892, 2013.
- [53] K. D. Wegner, F. Morgner, E. Oh, R. Goswami, K. Susumu, M. H. Stewart, I. L. Medintz, and N. Hildebrandt. Three-Dimensional Solution-Phase Förster Resonance Energy Transfer Analysis of Nanomolar Quantum Dot Bioconjugates with Subnanometer Resolution. *Chemistry of Materials*, 26:4299-4312, 2014.