



Biodétection optique sans marquage basée sur la diffraction de motifs moléculaires submicroniques

Jean Christophe Cau

► To cite this version:

Jean Christophe Cau. Biodétection optique sans marquage basée sur la diffraction de motifs moléculaires submicroniques. Micro et nanotechnologies/Microélectronique. INSA de Toulouse, 2008. Français. NNT: . tel-00347874

HAL Id: tel-00347874

<https://theses.hal.science/tel-00347874>

Submitted on 17 Dec 2008

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Institut National des Sciences Appliquées

Discipline ou spécialité : Nanophysique

Présentée et soutenue par Jean-Christophe CAU

Le 21 novembre 2008

Titre : Biodétection optique sans marquage basée sur la diffraction de motifs moléculaires submicroniques

JURY

E. DELAMARCHE, rapporteur du jury, directeur de recherche, IBM, ZURICH, SUISSE

J.L VIOVY, rapporteur du jury, directeur de recherche, Institut Curie, PARIS

P. CHARETTE, professeur des universités, école centrale, LYON

P. COLPO, directeur de recherche, JRC, ISPRA, ITALIE

J.M FRANCOIS, professeur des universités, INSA, TOULOUSE

V. PAVEAU, ingénieur de recherche, INNOPSYS, CARBONNE

J.P PEYRADE, professeur des universités, INSA, TOULOUSE

C. VIEU, professeur des universités, INSA, TOULOUSE

Ecole doctorale : Science de la matière

Unité de recherche : Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes

Directeur(s) de Thèse : Jean-Pierre PEYRADE, Christophe VIEU

A LM et BC

« La chance ne sourit qu'aux esprits bien préparés. » (L.PASTEUR)

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à souligner le plaisir que j'ai eu à travailler au sein du groupe NanoBioSystèmes au LAAS-CNRS. Cette expérience de trois ans est une des pierres angulaires d'un processus d'épanouissement personnel dont l'apport provient des conditions scientifiques mais surtout humaines excellentes.

C'est pourquoi je tiens à remercier en premier lieu Christophe VIEU pour m'avoir accueilli dans son équipe mais aussi donné une liberté d'action très formatrice. Je tiens à saluer son esprit de synthèse permettant un recul sur les travaux réalisés mais aussi sa curiosité scientifique qu'il sait communiquer. C'est pourquoi, si je devais retenir une idée de ces travaux de doctorat, c'est celle résumée par la citation de L.Pasteur : « *La chance ne sourit qu'aux esprits bien préparés* » qui est représentative de cette curiosité intellectuelle.

Mes remerciements les plus sincères vont aussi à Jean-Pierre PEYRADE pour ses conseils précieux, sa disponibilité et le temps très important qu'il a passé à m'encadrer. Sa rigueur et son ingéniosité ont été un atout lors de ces travaux. Enfin, je tiens à souligner sa patience lors de nos innombrables réunions dont le sujet principal des discussions était scientifique mais où des thèmes plus sociétaux étaient abordés. C'est pourquoi sa ténacité et son engagement dans la défense de ses prises de positions est un des points remarquables de ces trois années de doctorat.

Je tiens à remercier l'ensemble du laboratoire le LAAS-CNRS et plus spécifiquement Franck CARCENAC du groupe TEAM pour ses conseils, ses idées technologiques et scientifiques.

Je tiens à saluer l'équipe de la plateforme Biopuce pour leur aide durant ses travaux : Jean-Marie FRANCOIS, Véronique LEBERRE, Emmanuelle TREVISIOL, Nathalie MARSAUD, ...

Enfin, je tiens à remercier l'ensemble du groupe NanoBioSystèmes : le responsable du groupe Liviu NICU, Aline et Thomas pour les discussions très variées dans notre bureau, mais aussi Christophe, Jérôme, Christel, Hélène, Childéric et les autres membres du groupe.

Titre : Biodétection optique sans marquage basée sur la diffraction de motifs moléculaires submicroniques

Auteur : CAU Jean-Christophe

Thèse de l'INSA de Toulouse

Date : le 21/11 à 10h30

Lieu : amphithéâtre Fourier à l'INSA

Le jury :

E. DELAMARCHE, rapporteur du jury, directeur de recherche, IBM, ZURICH, SUISSE

J.L VIOVY, rapporteur du jury, directeur de recherche, Institut Curie, PARIS

P. CHARETTE, professeur des universités, école centrale, LYON

P. COLPO, directeur de recherche, JRC, ISPRA, ITALIE

J.M FRANCOIS, professeur des universités, INSA, TOULOUSE

V. PAVEAU, ingénieur de recherche, INNOPSYS, CARBONNE

J.P PEYRADE, professeur des universités, INSA, TOULOUSE

C. VIEU, professeur des universités, INSA, TOULOUSE

Résumé :

La détection d'interactions biologiques est un des enjeux majeurs de différents domaines tels que le diagnostic médical ou le criblage de médicaments. L'objectif de ce travail est le développement d'une technique de biodétection sans marquage basée sur la diffraction d'un réseau de lignes submicroniques composées de biomolécules. Pour cela, nous développons un modèle optique permettant de simuler la réponse de biocapteurs diffractifs qui détermine les paramètres clefs adaptés à une détection optimale. Nous démontrons l'application de cette technologie à la détection de deux interactions biochimiques différentes, l'une représentant le domaine du diagnostic, l'autre celui du criblage pharmacologique. En se basant sur ces résultats, une corrélation avec le modèle développé est effectuée. Nous proposons aussi un procédé parallèle de dépôt par tamponnage moléculaire de différentes biomolécules en une seule étape, intégré dans le système de détection. Une réflexion sur le rôle et l'impact au niveau du citoyen de cette technologie, et plus généralement des nanotechnologies, est présentée.

Mot-clés : tamponnage moléculaire, biopuce, diffraction de la lumière, détection sans marquage, biodétection, diagnostic, criblage pharmacologique

Abstract :

Biodetection is one of the main challenges for different applicative fields such as diagnostic or pharmacological drug screening. The objective of this work is to develop a label-free biosensing technique based on the diffraction of light by a grating composed of submicrometric lines composed of biomolecules. For this purpose, we develop an optical model simulating the biosensor response in order to determine the key parameters used to optimize the detection. We show the application of this technique with two different interactions: one for the diagnostic, the other for pharmacological drug screening. Based on these experimental data, the optical model is validated. We also propose a new process to deposit different biomolecules in one step by micro contact printing, integrated into the biosensing set-up. The role and the impact of this technique for the citizen, are presented together with the general field of nanotechnologies.

Keywords : micro contact printing, biochip, light diffraction, label-free detection, biosensing, diagnostic, drug screening

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE.....	1
CHAPITRE I : ETAT DE L'ART SUR LA BIODETECTION	5
I. La sonde et ses méthodes de fixation sur un substrat	6
I.1. Le choix de la sonde	6
I.1.1. Premier choix	6
I.1.2. Second choix.....	7
I.2. Les chimies de surface adaptées aux substrats d'or et de SiO ₂ /Si	8
I.2.1. Le substrat : Or.....	8
I.2.2. Le substrat SiO ₂ /Si ou SiO ₂	8
I.3. La fixation des sondes sur la chimie de surface.....	10
I.4. Approche complémentaire par utilisation d'une chimie de surface passivante	13
II. Etat de l'art sur les méthodes de biodétection de l'accroche sonde-cible	14
II.1. Les méthodes de détection par marquage.....	14
II.1.1. La fluorescence.....	14
II.1.2. Les méthodes magnétiques.....	16
II.2. Les méthodes de détection sans marquage	18
II.2.1. Les méthodes mécaniques	18
II.2.2. Les méthodes électriques.....	20
II.2.3. Les méthodes optiques.....	23
III. Le multiplexage de la biodétection et de l'adressage : les biopuces.....	40
III.1. Les méthodes simples de réalisation des biopuces.....	40
III.1.1. Structuration par photolithographie	40
III.1.2. Structuration par le dépôt de gouttes.....	42
III.1.3. Structuration par une microfluidique à jet continu.....	45
III.1.4. Structuration par tamponnage moléculaire	46
III.2. Les méthodes complexes de réalisation de biopuces	48
III.3. Une solution astucieuse : le codage.....	48
IV. Qualité et défauts des techniques de biodétection développées.....	50
V. Le potentiel de la détection par diffraction couplé au tamponnage moléculaire.....	54
V.1. Des travaux préliminaires sont encourageants	54
V.2. Aucun modèle de diffraction ne prépare le développement de la biodétection au format biopuce.....	58
V.3. Le tamponnage moléculaire est la technique la plus adapté à la réalisation de biopuces diffractantes.....	59
CHAPITRE II : ETUDE THEORIQUE DE LA DETECTION SANS MARQUAGE PAR DES BIOPUCES DIFFRACTANTES.....	63
I. Rappel sur la diffraction dans le cas d'un réseau en transmission.....	65
II. Un modèle analytique simple d'un réseau en réflexion	71
II.1. Amplitude $\Psi_{0+}(x, y)$ émise par chaque point du réseau	73
II.2. Calcul de l'intensité diffractée.....	78

III. Simulation de la réponse d'un réseau dans le cadre d'une interaction spécifique idéale	82
III.1. Etude de l'influence des autres paramètres « maîtrisables » sur la puissance diffractée avant interaction spécifique	82
III.1.1. Influence de la largeur des lignes et de la période du réseau	82
III.1.2. Influence de l'épaisseur de la chimie de surface (dendrimères, streptavidine, ...).	84
III.2. Etude du gain du signal lors d'une interaction sonde/cible.....	85
IV. Etude d'artefacts : les cas d'intervention d'une interaction non spécifique	87
IV.1. Les biomolécules cibles se déposent sur les lignes et les creux.....	88
IV.2. Les biomolécules cibles se déposent dans les creux	89
V. Influence de la taille de la molécule sonde par rapport à celle de la molécule cible	91
VI. Complexification du modèle : l'interaction entraîne une croissance latérale des lignes.....	93
VII. Les états « bio-logiques » et physiques de la biopuce diffractante.....	97

CHAPITRE III : DEVELOPPEMENT DE TECHNIQUES EXPERIMENTALES GENERIQUES..... 105

I. Mise au point du procédé de réalisation de réseaux de molécules (chimiques ou biologiques) par micro contact printing	106
I.1. Le moule	106
I.2. Le timbre en PDMS	108
I.3. L'encrage du timbre.....	109
I.4. Le dépôt de biomolécules par micro contact printing classique (μ CP)	112
II. Construction d'un montage de diffraction.....	113
II.1. La récupération fibrée des signaux lumineux de référence et de l'ordre 1.....	114
II.2. La mesure de la puissance lumineuse collectée par chaque fibre.....	115
II.3. Le support du substrat.....	117
II.4. Vérification qualitative du fonctionnement du montage	118
II.5. Les perspectives ouvertes par un tel dispositif expérimental	118
III. Automatisation de la biodétection par diffraction.....	120
III.1. Automatisation générale.....	120
III.2. Procédure d'automatisation pour un mode de fonctionnement biocapteur.....	121
III.3. Vers une détection en mode biopuce - recherche de la position optimale de chaque réseau.....	122
III.3.1. Principe du positionnement du réseau.....	123
III.3.2. Centrage d'un réseau	124
III.3.3. Recherche de la réponse d'une biopuce (plusieurs réseaux).....	124
III.4. Acquisition du signal de diffraction en temps réel (mode multi biocapteurs)	125

CHAPITRE IV : LA DETECTION BIOLOGIQUE PAR DIFFRACTION 131

I. Descriptions des deux configurations biochimiques étudiées	132
I.1. L'interaction protéine/anticorps.....	132
I.2. Le criblage pharmaceutique	133
II. La chimie de surface retenue	135
II.1. Choix de la chimie de surface.....	135
II.2. Configuration du montage expérimental	136
II.3. Etude de la désorption de la streptavidine	136
II.4. Détermination de l'indice optique de la streptavidine.....	138

III. Place du tamponnage moléculaire dans le procédé.....	140
IV. Application à la détection d'interactions entre une protéine ou un peptide et son anticorps complémentaire	142
IV.1. Détection de l'interaction entre la protéine A et son anticorps complémentaire ..	142
IV.1.1. Etude de l'interaction non spécifique entre la cible (l'anticorps anti-protéine A) et le réseau de streptavidine	142
IV.1.2. Mécanisme de désorption des anticorps (cibles) lors d'interaction non spécifique	149
IV.1.3 Mesure des hauteurs.....	149
IV.1.4. Étude de l'interaction spécifique entre la protéine A et son anticorps complémentaire	151
IV.2. Vers le criblage pharmaceutique par diffraction : détection de l'interaction entre le peptide phosphorylé/ anticorps antiphosphorylation.....	155
IV.2.1. Étude de l'interaction non spécifique (ou contrôle négatif).....	155
IV.2.2. Étude de l'interaction spécifique.....	157
V. Situation du travail par rapport à l'état de l'art	162
 CHAPITRE V : DEVELOPPEMENT DU TAMPONNAGE MOLECULAIRE MULTIPLEXE.....	165
I. Le procédé de tamponnage moléculaire multiplexé (TMM)	166
I.1. Principe	166
I.2. Le macrotimbre	167
I.3. Optimisation des étapes d'encrage, séchage, impression pour applications biologiques	168
I.4. Nettoyage pour une réutilisation du macrotimbre	170
II. Une technologie couplant une résolution millimétrique à une résolution nanométrique	171
II.1. Etude de l'alignement des motifs sur les plots et la rugosité de leurs bords	171
II.2. Réalisation de motifs micrométriques	172
II.3. Réalisation de motifs nanométriques.....	173
III. Intégration du macrotimbre dans la plateforme biopuce diffractante	177
 CHAPITRE VI : PERSPECTIVES.....	187
I. Vers de nouvelles méthodes de diagnostic basées sur la diffraction	188
I.1. L'utilisation de polymères à empreintes moléculaires.....	188
I.2. Simulation de la détection par diffraction basée sur l'utilisation de MIP.....	189
I.3. Une nouvelle approche du diagnostic : l'utilisation des concepts d'apprentissage des machines (<i>machine-learning</i>).....	196
II. Vers la conception de systèmes de biodétection globaux basés sur la diffraction	197
II.1. Méthode basée sur la déconvolution du signal diffractif.....	198
II.2. Méthode basée sur l'exploitation des phénomènes d'interférence entre réseaux... ..	203
II.2.1. Principe	203
II.2.2. Etude du cas simple de deux réseaux éclairés simultanément.....	203
II.2.3. Généralisation à N réseaux de diffraction éclairés simultanément.....	205
II.3. Comparatif des deux méthodes.....	208
 CONCLUSION	211

PUBLICATIONS REALISEES AU COURS DE CES TRAVAUX.....	215
LES NANOTECHNOLOGIES DANS LA SOCIETE	217
I. les problèmes posés par les systèmes sensibles démocratisés	217
I.1. Le diagnostic précoce	217
I.2. Le pronostic	218
I.3. L'eugénisme.....	218
I.4. Les libertés individuelles	219
II l'éthique des nano(bio)technologie	220
II.1. La démarche scientifique.....	220
II.2. La gouvernance scientifique.....	222
III. la formation aux nanotechnologies : le projet « nano au lycée »	225
ANNEXE I : Fiches détaillant les biopuces optiques sans marquage existantes	227
ANNEXE II : Calcul complet de la puissance diffractée sur l'ordre 1	234
ANNEXE III : Etude de l'origine de la puissance diffractée	237
ANNEXE IV : Origines du gain	240
ANNEXE V : Détails sur l'automatisation de la biodétection par diffraction.....	242

INTRODUCTION GENERALE

« *L'histoire enseigne aux hommes la difficulté des grandes tâches et la lenteur des accomplissements, mais elle justifie l'invincible espoir* » cette citation de Jean Jaurès, humaniste engagé de la fin du XIX^{ème} et du début du XX^{ème} siècle, s'applique à la science. L'histoire nous montre en effet, que le cheminement scientifique a toujours été et est encore justifié par l'*invincible espoir* d'apporter à l'homme de plus en plus de bonheur, de bien-être par son épanouissement psychique et physique et par une aide matérielle. Dans cet esprit, ce cheminement s'est orienté vers la « *grande tâche* » de protection de sa santé, sous ses diverses formes qui débutent par la prévention qui se prolonge par le diagnostic et finalement par les soins. Dans ce domaine, nous observons là aussi « *la lenteur des accomplissements* ». L'évolution technologique devance les deux orientations, la santé (*la grande tâche*) et l'évolution des connaissances biologiques associées (Figure 1).

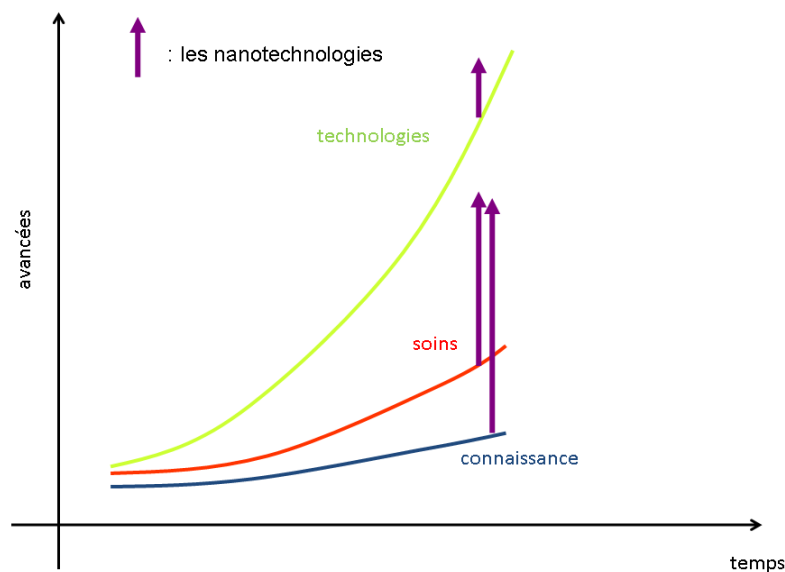


Figure 1 : schéma représentant l'évolution en fonction du temps des technologies, des soins et de la connaissance dans le domaine de la santé (*la grande tâche*).

Le développement des nanotechnologies qui permettent de manipuler la matière avec une résolution nanométrique donc à une échelle adaptée à la biomolécule porte l'espoir de mieux comprendre les mécanismes fondamentaux qui gouvernent les interactions biologiques et donc d'accélérer les *accomplissements* concernant la prévention, le diagnostic et les soins. L'emploi parallèle des termes « nanobiotechnologies » et « bionanotechnologies » est significatif de ce rapprochement. Le premier traduit le comportement classique où les nanotechnologies tirent l'évolution des connaissances en biologie alors que le second, plus

futuriste, montre que la biologie inspire de plus en plus les solutions technologiques. Ainsi cette *lenteur des accomplissements* se réduit, suscitant un *invincible espoir* d'améliorer la qualité de vie de l'homme.

La santé de l'homme repose d'abord sur la surveillance biologique continue. Pour cela, le médecin se base sur des analyses, le plus souvent sanguines, cherchant à détecter la présence mais aussi à quantifier des biomolécules spécifiques aux maladies appelées cibles. Ces biomolécules sont souvent soit de l'ADN qui révèle les anomalies génétiques soit des protéines, marqueurs d'une maladie. L'exemple le plus significatif concerne le diagnostic précoce. Plus la biodétection sera sensible, plus on détectera une faible concentration de ces molécules et plus la probabilité de survie du malade sera accrue. Cette détection s'effectue par interaction biologique de la cible recherchée sur un biocapteur comportant des sondes spécifiques.

La santé de l'homme repose aussi sur des soins qui utilisent des molécules élaborées par l'industrie pharmaceutique. Ces molécules, appelées des principes actifs, interviennent dans des processus biologiques complexes composés de différentes interactions biochimiques.

De plus, la découverte de nouveaux principes actifs médicamenteux nécessite de tester dans ce cadre l'efficacité d'un grand nombre de molécules dans une chaîne de réaction biochimique. C'est pourquoi un grand nombre de tests fiables et sensibles sont nécessaires dans une approche de type criblage. Ils sont le plus souvent réalisés sur un substrat regroupant l'ensemble de ces tests et permettant une analyse rapide des interactions biologiques recherchées. Le format de détection est alors qualifié de biopuce.

Ces deux voies, surveillance biologique et soins sont actuellement développées en détectant les molécules cibles par marquage fluorescent à un format de puce millimétrique. Ce procédé coûteux gagnerait à être remplacé par une détection de l'accroche cible sur sonde sans marquage. De premiers travaux en mode biocapteur démontrent que la diffraction par des réseaux de lignes biomoléculaires présente une telle potentialité. Son développement au format de puce micrométrique voire nanométrique nous conduirait à améliorer, par les nanobiotechnologies, la rapidité des *accomplissements*, prévention et soins, afin de combler l'*invincible espoir*, santé.

En résumé, la biologie et la médecine sont en permanence à la recherche de techniques simples, à faible coût, fiables, sensibles, utilisant le minimum de matière permettant d'identifier et si possible de doser dans une solution une (ou des) cible(s) présentes (protéines, ADN, virus, bactéries, ...). Ces disciplines exploitent pour cela l'interaction entre une biomolécule sonde connue fixée sur un support (de type ADN, anticorps, protéine, antigène...) et cette (ou ces) cible (s).

Le pharmacologue recherche d'autre part les meilleures interactions spécifiques entre une molécule sonde (issue d'un organisme vivant) et l'ensemble des molécules cibles dont il dispose ou peut concevoir (pour proposer un jour leur homologation comme médicament).

Ces deux voies d'analyse des biologistes et du criblage des médicaments des pharmacologues s'efforcent de franchir trois premiers verrous technologiques :

- la fixation d'une molécule sonde sur une lamelle de verre ce qui demande de bien maîtriser d'une part la chimie de surface de ce support et de développer une technique simple d'accroche des sondes sur celle ci. (verrou 1)

- la recherche de l'interaction sonde-cible à rendement élevé pour qu'une grande proportion de cibles interagisse. (verrou 2)

- le choix d'une technique de détection de toute interaction d'accroche (sonde – cible) fidèle et très sensible qui nécessite d'éviter le recours à l'emploi de marqueur fluorescent perturbateurs. (verrou 3)

Ces trois premiers verrous adaptés à la fabrication du biocapteur préparent le franchissement de deux autres verrous plus ambitieux qui sont le multiplexage par la miniaturisation de la fixation de multiples sondes (verrou 4) et de la détection de multiples cibles (verrou 5). Ces derniers verrous ouvrent le domaine des biopuces d'analyse et de criblage. Ils devraient permettre de déceler en une seule étape et donc en parallèle de multiples interaction sonde-cible et de retenir « in fine » la ou les plus efficaces.

Les nano biotechnologies démontraient en début de ce travail de doctorat des potentialités pour relever ces cinq défis sans utiliser les techniques de marquage des cibles.

Notre travail de doctorat s'inscrit dans cette démarche sociétale et scientifique. Nous privilégions une recherche humaniste qui développe les outils à l'échelle nanométriques qui doivent contribuer à améliorer rapidement la santé de l'homme et l'évolution des connaissances. Nous gardons de plus à l'esprit tout au long de nos travaux la condition : démocratisation des outils développés et de la connaissance. Pour cela, nous privilégions les applications à bas coût.

La première partie de ce doctorat est consacrée à une revue générale des techniques de détection des interactions biologiques et aux méthodes de structuration d'une biopuce. Les dispositifs basés sur les détections optiques sont plus particulièrement détaillés. Ensuite, dans le second chapitre, nous développons un modèle de simulation de la réponse de biocapteurs diffractifs qui détermine les paramètres clefs adaptés à une détection optimale. Les dispositifs expérimentaux, permettant d'obtenir les performances précédentes, sont présentés dans le troisième chapitre. Il se décompose en une méthode de fabrication des réseaux submicrométriques basée sur le tamponnage moléculaire et en un banc de mesure de leur spectre de diffraction. Nous démontrerons, dans le quatrième chapitre, l'application à la détection de deux interactions biochimiques différentes, l'une est un cas d'école, l'autre est utilisée pour le criblage pharmaceutique. En se basant sur ces résultats, une corrélation avec le modèle développé est effectuée. Nous proposons un procédé parallèle de dépôt par tamponnage moléculaire de différentes biomolécules en une seule étape. Ce procédé ainsi que son intégration dans le banc de diffraction fait l'objet du cinquième chapitre. Enfin, le sixième chapitre propose des perspectives d'amélioration de la méthode de biodétection par diffraction et du concept d'accroche sonde-cible.

CHAPITRE I : ETAT DE L'ART SUR LA BIODETECTION

Comme le présente l'introduction, les médecins, les biologistes et les pharmacologues s'efforcent de franchir cinq verrous. L'objet de ce chapitre est de présenter pour chacun d'eux l'état de l'art en début de ce travail. Nous décomposons pour cela la présentation en quatre parties.

- la première est consacrée aux verrous 1 et 2. Nous y détaillons les méthodes générales de fixation d'une sonde sur une surface et y faisons l'inventaire des forces d'interaction sonde-cible exploitables.

- la deuxième est réservée au verrou 3. Elle se propose de faire le bilan de la multitude des méthodes de détection de l'accouplement sonde-cible en y détaillant leurs avantages et inconvénients, et en insistant sur les méthodes sans marquage utilisant l'optique.

- la troisième présente les avancées sur les verrous 4 et 5 concernant le multiplexage en terme d'adressage mais aussi de détection (ou de multidétection en parallèle).

- la quatrième synthétise les qualités et inconvénients des techniques utilisées. Elle justifie l'importance d'une étude du potentiel d'une détection par diffraction couplée avec la technique de dépôt de tamponnage moléculaire.

I. La sonde et ses méthodes de fixation sur un substrat

La détection de molécules cibles, présentes dans une solution, en utilisant le principe de leur immobilisation sur un substrat demande de définir sur ce dernier des sites favorisant leur accueil. Ces sites sont équipés de molécules sondes idéales adaptées aux cibles et retenues parce qu'elles présentent une très forte affinité spécifique avec elles (Figure 2.A). La nature des molécules sondes est imposée par la cible.

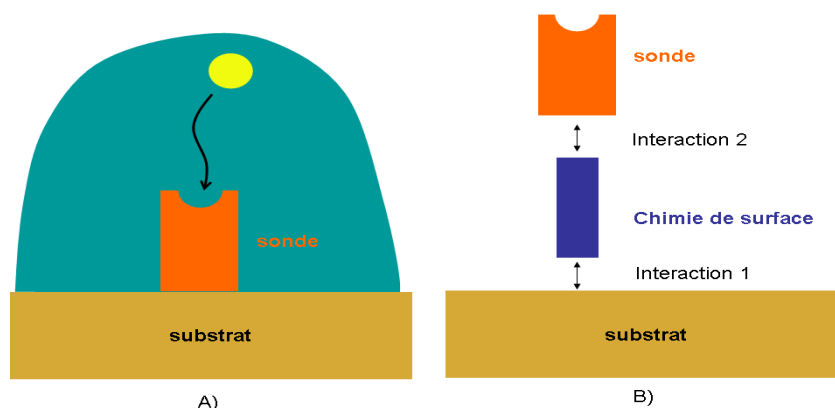


Figure 2 : schéma représentant l'empilement utilisé lors de la fixation d'une sonde

Ces molécules sondes idéales sont parfois, de par leur nature, incompatibles avec le substrat. Pour résoudre ce problème, les auteurs utilisent habituellement une molécule intermédiaire nommée « chimie de surface ». Cette molécule intermédiaire (Figure 2.B) doit présenter deux interactions fortes : la première avec le substrat et la seconde avec la sonde. Une approche complémentaire consiste à tapisser le substrat d'une chimie de surface incompatible, que l'on qualifiera de passivante, qui interdit toute fixation de la cible sur ce dernier.

L'objet de ce paragraphe est d'une part de présenter les quelques choix possibles d'accroche de la cible, puis de détailler les chimies de surface classiques, utilisées pour fixer la sonde sur le substrat (interaction 1) enfin de donner quelques éléments sur la stratégie consistant à utiliser une chimie de surface passivante.

I.1. Le choix de la sonde

I.1.1. Premier choix

La cible recherchée impose le choix de la sonde. En effet pour détecter une cible donnée, il n'existe qu'une seule sonde avec laquelle elle a une interaction fortement

spécifique. Citons comme exemple l'interaction entre un anticorps que l'on considère comme une serrure et un antigène qui est vu comme une clef.

I.1.2. Second choix

Cependant afin de préparer notre chapitre « perspectives » nous présentons une nouvelle démarche qui se développe. Pour fixer les cibles, de nouveaux polymères dont les propriétés permettent d'éliminer la sonde en se substituant à elle sont proposés. Ces polymères sont les MIP, polymères à empreinte moléculaire, qui ont la faculté de permettre la réalisation d'une empreinte de la molécule cible. La forme des sites d'accueil des cibles est réalisée par dépôt de ce polymère sur le substrat en présence de cibles sacrificielles car ces dernières sont supprimées, par des lavages successifs. Cette réticulation a lieu sous un rayonnement UV, ou une décharge plasma ou un traitement thermique. Le MIP d'accueil sur le substrat présente alors des aspérités préformées pour recevoir la cible. Lors piégeage, seule la cible se place dans ces sites.

Cette technologie est proposée pour des molécules cibles petites comme des composés chimiques¹ ou des biomolécules de type acides aminés, dont la particularité est de pouvoir diffuser à l'intérieur du MIP. Pour des molécules plus grosses (anticorps, albumine, streptavidine), l'adhésion s'effectue uniquement à la surface du MIP². La détection de virus basée sur l'utilisation de MIP est déjà utilisée³. Des entreprises développent et commercialisent des MIP pour des applications de biodétection comme *polyintell* qui résume leurs avantages : ⁴

- une haute affinité et sélectivité similaires aux récepteurs naturels,
- une stabilité supérieure à celle des biomolécules naturelles,
- une potentialité à être développée pour un nombre important de molécules
- une simplicité de leur préparation et leur possibilité de réutilisation
- une adaptation à différents domaines d'application
- un faible coût par rapport aux récepteurs naturels

De plus, nous pouvons imaginer qu'il est possible de les texturer avec les différentes technologies de la micro électronique comme la photolithographie pour réaliser sur un substrat des réseaux de diffraction d'accueil par exemple (voir chapitre VI).

1 N.M. Bergmann, N.A. Peppas / Prog. Polym. Sci. 33 (2008) 271–288

2 shi et al., Nature 398, 593 - 597 (15 Apr 1999)

3 dickert et al., Sensors 2003, 3

4 http://www.polyintell.com/f_tech_fr.htm

I.2. Les chimies de surface adaptées aux substrats d'or et de SiO₂/Si

Nous détaillons dans ce paragraphe les différentes chimie de surface utilisées pour réaliser une accroche de sonde sur un substrat d'or ou de SiO₂/Si.

I.2.1. Le substrat : Or

Un type de substrat, très présent dans les biocapteurs basés sur la résonance plasmonique de surface, présentée par la suite, utilise une couche d'accroche d'or déposée sur une surface de verre. La chimie de surface d'accroche sur de l'or, couramment utilisée, est celle des thiols. Ces molécules, schématisées sur la Figure 3.A, présentent un groupement –SH (thiol) et un autre –R permettant respectivement l'accroche sur l'or (interaction 1) et l'accroche de la sonde (interaction 2). L'interaction entre le thiol et l'or est covalente, donc forte, et conduit à une structure représentée sur la Figure 3.B. Le groupement –R est choisi afin de fixer une biomolécule (protéine⁵, anticorps⁶, ADN⁷) ou des cellules⁸ par des liaisons détaillées en I.2.

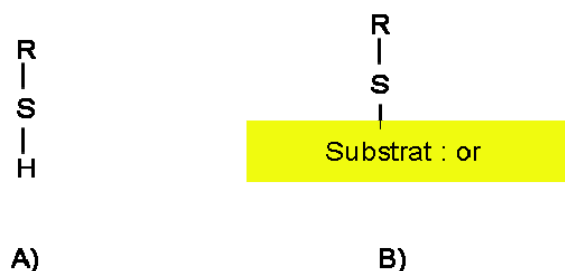


Figure 3 : schéma représentant A) la molécule thiol B) le thiol sur un substrat d'or

I.2.2. Le substrat SiO₂/Si ou SiO₂

Lorsque le substrat est composé de silicium ou de silice (SiO₂), les auteurs font souvent appel à des silanes. Ces molécules, schématisées en partie supérieure de la Figure 4.A, sont composées d'un atome de silicium lié à trois groupements R et une chaîne carbonée terminant par une fonction chimique Y. Les trois groupements R sont judicieusement choisis pour réaliser une interaction avec le substrat. Citons comme exemple de R des groupements

⁵ W. Knoll et al. :Colloids and Surfaces A : Physicochem. Eng. Aspects 161 (2000) 115–137

⁶ delamarche et al., Langmuir, Vol. 12, No. 8, 1996

⁷ G. Bidan, et al., novembre-décembre 2003.

⁸ chen et al., Biotechnol. Prog., 1998, Vol. 14, No. 3

hydroxyle : OH, méthoxy : OCH₃ ou chlorés : Cl⁹. Un exemple d'accroche d'un silane chloré sur un substrat est présenté sur la Figure 4. Dans un premier temps, la surface du substrat (une fine couche d'oxyde natif pour le silicium) est traitée pour y créer des groupements -OH par un plasma oxygène (1000mL/min, 800W, 5min) ou un traitement à l'UV ozone. L'humidité ambiante amène une hydrolyse des groupements R=Cl (B). Une réaction de condensation entre molécules voisines a alors lieu, créant des liaisons Si-O-Si entre elles et dégageant de l'eau (C). Enfin, la même réaction se produit entre le groupement -OH disponible et le substrat (D). Il y a alors une liaison covalente entre les silanes et le substrat. Les étapes (C) et (D) peuvent être inversées ou simultanées, notre représentation de la Figure 4 est donc schématique.

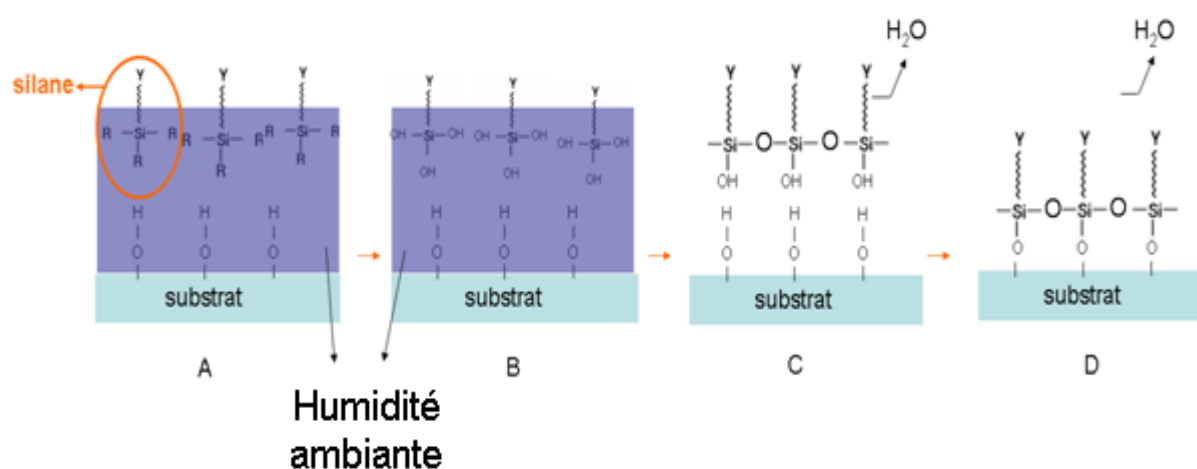


Figure 4 : schéma représentant un exemple de mécanisme d'accroche d'un silane sur une surface de silicium ou de silice.¹⁰

En se basant sur cette interaction entre un silane et un substrat de silicium ou de silice, les auteurs complexifient la chimie de surface pour mieux l'adapter à la sonde. En effet, le groupement Y (Figure 5) peut être utilisé pour réaliser l'accroche directe de la sonde ou pour rajouter une autre molécule qui est mieux appropriée à la fixation de la sonde (on superpose dans ce cas deux chimies de surface). Quelques uns des ajouts possibles sont présentés sur la Figure 5. Il est possible d'accrocher de la streptavidine par Y= fonction époxyde¹¹, des dendrimères par Y=NH₂^{12,13}, ou du PEG (Polyéthylène glycol)¹⁴. Le choix entre ces types de molécules dépend de la nature de la sonde à accrocher. Nous utiliserons cette démarche par la suite (voir chapitre IV).

9 Pallandre et al., Electrophoresis 2006, 27, 584-610

10 J.Sagiv JACS, 102, 95, 1980

11 A. Cerf et al. / Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 65 (2008) 285-291

12 Trévisiol et al., International patent WO 03/091304 A2, november 24, 2003

13 Trévisiol et al., New J. Chem., 2003, 27, 1713-1719

14 Anderson et al., Langmuir, Vol. 24, No. 5, 2008

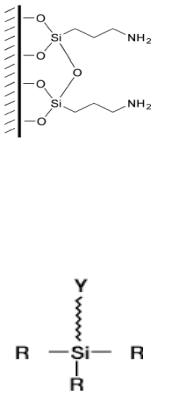
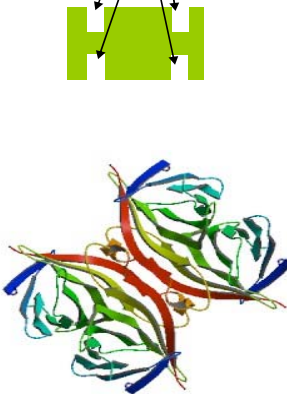
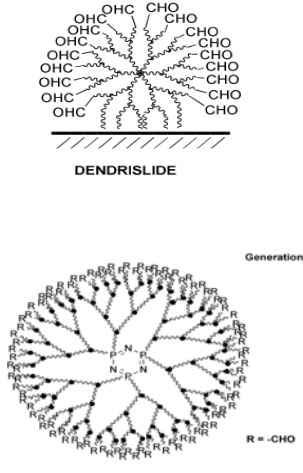
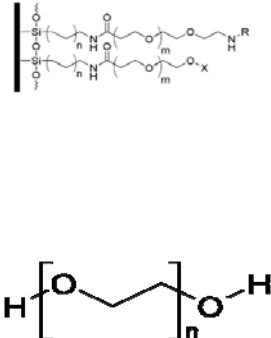
	Quatre sites d'accroches avec la biotine 		
silane	streptavidine	dendrimères	Polyethylene glycol (PEG)

Figure 5 : quelques exemples de chimies de surface basées sur des silanes

L'avantages des silanes est leur interaction forte, covalente, entre la chimie de surface et les substrats SiO₂/Si.

Cette présentation de la chimie de surface à base de silanes sur SiO₂/Si n'est pas exhaustive et nous renvoyons le lecteur à des revues plus complètes¹⁵.

I.3. La fixation des sondes sur la chimie de surface

La fixation de la sonde dont la nature est imposée par la cible, sur la chimie de surface exploite selon sa composition chimique ou sa charge une interaction. Ses divers types sont détaillés ci-dessous :

- l'interaction électrostatique. Cette solution est utilisée si la sonde est chargée. Citons comme exemple l'ADN dont l'ossature est composée de groupements phosphates qui ont la particularité d'être chargés négativement (Figure 6). Ainsi, pour accrocher des brins d'ADN sur une lame de verre, les auteurs utilisent l'interaction électrostatique. Celle-ci consiste à silaniser la surface à l'aide d'aminopropyltriméthoxysilane (APTES), silane présentant un groupement amine en terminaison (Y=NH₂). NH₂ devient NH₃⁺ dans une solution de PH=7. Il s'en suit une attraction électrostatique entre la charge positive de NH₃⁺ et la charge négative des groupements phosphates.

¹⁵ Le Trong, I et al., (2003) Acta Crystallogr.,Sect.D 59: 1567-1573

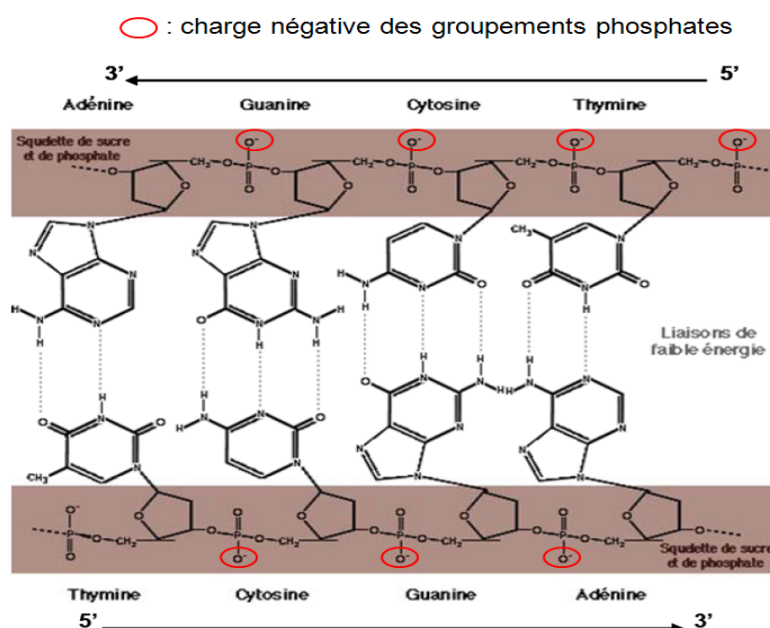


Figure 6 : schéma représentant un double brin d'ADN et plus particulièrement l'emplacement des charges négatives

- l'interaction covalente. Les sondes provenant de systèmes biologiques présentent dans leur majorité des groupements amine (exemple : les protéines sont faites d'acides aminés). Pour les fixer on utilise une interaction covalente qui cible ces groupements amine. Pour cela, plusieurs groupes terminaux de la chimie de surface (Y pour les silanes, R pour les thiols) sont utilisés. Citons comme exemple les groupements époxydes (Figure 7.A) ou aldéhydes (Figure 7.B).

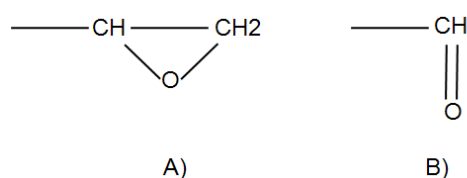


Figure 7 : schéma représentant les groupements A) époxyde B) aldéhyde

Ces fonctions sont soit initialement greffées directement sur la surface en utilisant des silanes qui portent ces groupements ou fabriquées en modifiant une chimie de surface initiale par un plasma¹⁶, un faisceau laser¹⁷ ou un rayonnement UV¹⁸. Citons comme exemple Xue et al., qui accroche des anticorps (la sonde) sur une surface initialement recouverte d'OTS modifiée par un plasma. Ce dernier génère des groupements aldéhydes permettant une interaction covalente avec les anticorps (Figure 8).

¹⁶ Chang-Ying Xue et al., Langmuir, Vol. 23, No. 10, 2007

¹⁷ brevet : (WO/2001/023866) METHOD AND DEVICE FOR ANALYSING NUCLEIC ACIDS IMMOBILISED ON A SUPPORT

¹⁸ Kechun Zhang, et al., J. AM. CHEM. SOC. 2005, 127, 10136-10137

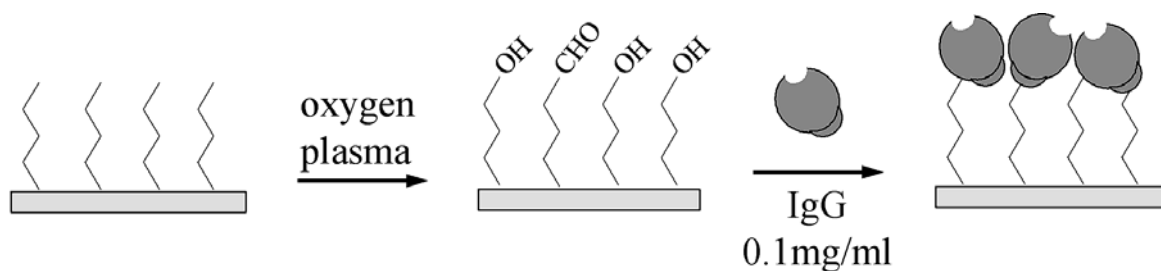


Figure 8 : exemple de création de groupements aldéhydes à la surface d'un substrat silanisé initialement avec de l'OTS (Figure 9) grâce à un plasma oxygène permettant l'accroche d'anticorps¹⁶

- l'interaction hydrophobe. Elle consiste à réaliser l'adhésion d'une sonde présentant un fort caractère hydrophobe avec un substrat traité hydrophobe. La molécule d'octadécyltrichlorosilane (OTS) présentée sur la Figure 9 est pour cela très utilisée pour des surfaces de SiO_2 . Son groupement terminal Y, qui est un méthyle a la propriété d'être très inerte chimiquement, neutre électrostatiquement et de rendre les substrats de SiO_2 hydrophobes.

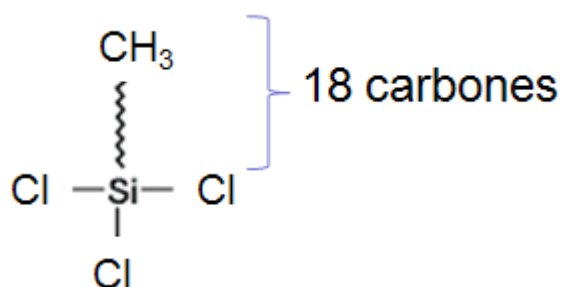


Figure 9 : schéma de la molécule d'OTS

Cette solution est appliquée dans le cas de sondes d'anticorps afin de les orienter de manière à laisser libres leurs sites d'intérêt pour la fixation des cibles.^{19,20}

- l'interaction entre la streptavidine et la biotine. L'une des interactions les plus fortes entre biomolécules est celle entre la streptavidine et la biotine. Sur une molécule de streptavidine il existe quatre zones présentant une conformation permettant uniquement à la biotine de se fixer. Une des astuces pour accrocher les sondes est d'une part de greffer sur elles des molécules de biotine, elles sont alors qualifiées de biotinylées. Elle est d'autre part d'utiliser une chimie de surface qui greffe de la streptavidine, déjà présentée. L'interaction biotine-streptavidine assure la fixation de sondes comme des brins d'ADN²¹.

¹⁹ Gao et al., J. AM. CHEM. SOC. 2006, 128, 676-677

²⁰ Frey, W.; Meyer, D. E.; Chilkoti, A. Adv. Mater. 2003, 15, 248.

²¹ Antje J. Baeumner et al., Analytical Chemistry, Vol. 76, No. 4, February 15, 2004

I.4. Approche complémentaire par utilisation d'une chimie de surface passivante

Dans le cas où il existe une affinité de la sonde et (ou) de la cible avec un substrat (cas très fréquents), l'expérimentateur fait appel à une chimie de surface dite passivante. Il utilise pour cela deux types de fonctionnalisations sur une même surface, la bifonctionnalisation (Figure 10) : la chimie de surface permettant l'accroche localisée des sondes déjà présentée et une chimie de surface excluant tout dépôt de sondes et (ou) de cible sur le substrat.

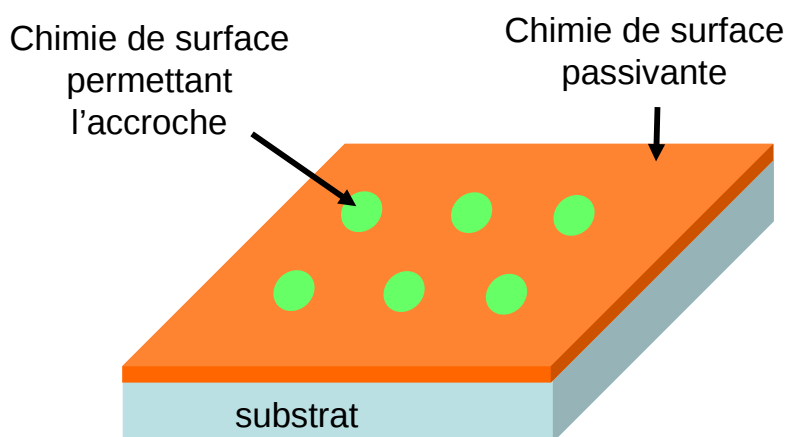


Figure 10 : schéma représentant une surface avec une bifonctionnalisation.

L'une des molécules utilisées pour passiver des surfaces est la molécule de silane octadecyltrichlorosilane (OTS voir Figure 9). Des études montrent son utilité pour passiver des substrats de SiO_2 au piégeage de bactéries²², d'anticorps²³, de peptides²⁴ et d'ADN²⁵.

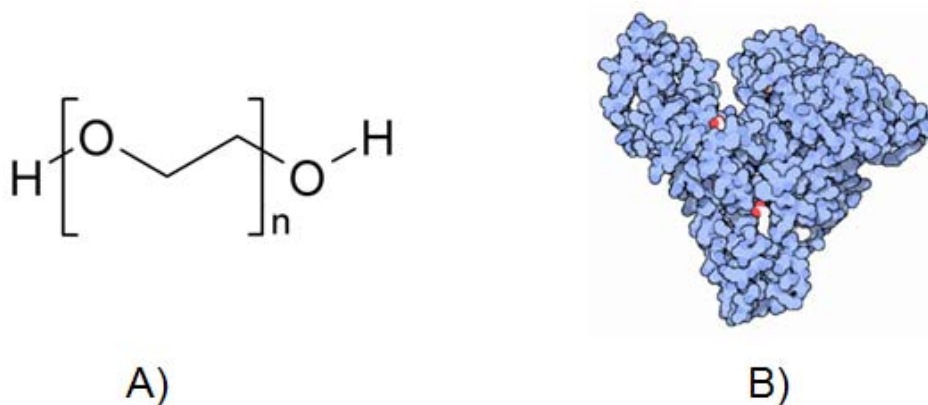


Figure 11 : schéma représentant A) la molécule de PEG B) la BSA.

Une autre molécule connue pour être passivante est le PEG (présenté sur la Figure 11.A). Cette molécule présente l'avantage par rapport à l'OTS d'être hydrophile et donc

22 J.-C. Cau et al. / Microelectronic Engineering 85 (2008) 1143–1146

23 gao et al., langmuir 2008

24 M.E. Hasenbein et al. / Biomaterials 23 (2002) 3937–3942

25 Minjung Shin et al., Nano Lett., Vol. 6, No. 7, 2006

d'interdire toutes liaisons hydrophobes avec les cibles. Des bifonctionnalisations basées sur une passivation avec du PEG permettent l'adhésion localisée de marqueurs cancéreux comme la PSA (Prostate Specific Antigen)²⁶, d'anticorps^{27,28} ou d'enzymes (ALP)²⁹.

La biomolécule BSA (Bovine Serum Albumine, Figure 11.B) sert de passivant vis-à-vis d'anticorps³⁰ ou de phospholipides³¹.

Une étude synthétisant des méthodes de bifonctionnalisation sur différents substrats est publiée³².

II. Etat de l'art sur les méthodes de biodétection de l'accroche sonde-cible

II.1. Les méthodes de détection par marquage

La méthode la plus couramment utilisée pour la détection des interactions biologiques est le marquage fluorescent. Il consiste à « attacher » sur l'une des espèces interagissant une molécule chimique présentant des propriétés de fluorescence.

II.1.1. La fluorescence

Les systèmes de détection par fluorescence sont basés sur l'excitation d'un fluorophore ou de boîtes quantiques à une longueur d'onde λ_1 donnée et une observation à une longueur d'onde supérieure $\lambda_2 > \lambda_1$ (Figure 12).

L'intérêt des boîtes quantiques est que leur structure de bandes d'énergie est quantifiée et réglée par leur taille. Ainsi selon leur diamètre et leur nature, nous disposons de boîtes dont le photon émis aura une longueur d'onde λ_2 différente. La Figure 13 montre en exemple que sous une excitation d'un rayonnement de $\lambda_1 = 385\text{nm}$, les solutions de boîtes quantiques de CdSe émettent à une longueur d'onde λ_2 allant de 550nm à 630nm qui est réglée par leur diamètre.

26 Yue, M et al., .Nano Lett.; (Letter); 2008; 8(2); 520-5

27 kyo et al., Analytical Chemistry, Vol. 77, No. 22, November 15, 2005

28 Moniraj Ghosh et al., Langmuir, Vol. 24, No. 15, 2008 8137

29 Li et al., Journal of the Association for Laboratory Automation, Volume 13, Issue 4, August 2008, Pages 237-242

30 J.B. Goh et al. / Sensors and Actuators B 106 (2005) 243–248

31 J. Chalmeau et al. / Microelectronic Engineering 84 (2007) 1754–1757

32 Senaratne et al., Biomacromolécules, vol.6, 5, 2005

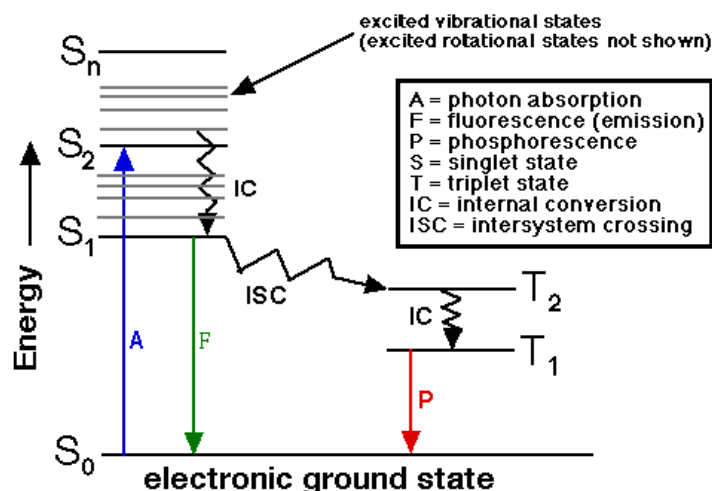


Figure 12 : schéma représentant l'évolution de l'énergie du fluorophore durant l'excitation puis l'émission (diagramme de Jablonski)

La maîtrise des techniques de synthèse de nanoparticules permet de les structurer de manière plus complexe et de leur adjoindre une couche d'accroche assurant l'interface avec les biomolécules.

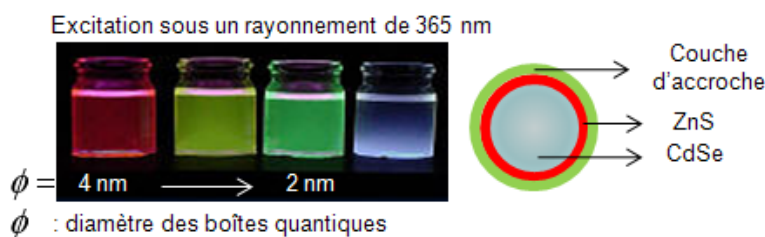


Figure 13 : exemple de structure d'une boîte quantique et de sa fluorescence selon son diamètre³³

Deux principales technologies sont pratiquées : la microscopie et le scanner à fluorescence. La première utilise un microscope qui éclaire l'échantillon à la longueur d'onde λ_1 . Cet échantillon est ensuite observé par l'intermédiaire d'un filtre qui ne laisse passer que les photons de longueur d'onde λ_2 . Ce filtre est souvent un miroir dichroïque. Le deuxième type de système basé sur la fluorescence est le scanner. Son concept est de balayer l'échantillon à observer avec un faisceau très fin de rayonnement excitateur λ_1 et à observer pour chaque point sondé le rayonnement émis à la longueur d'onde λ_2 . Ainsi, une image de fluorescence est reconstituée point par point. Cette technique est très utilisée dans les plateformes biopuces.

33 P. O'Brien et al. (2003), Chem. Commun. 2532-2533

La détection par fluorescence présente les inconvénients d'être composée d'une étape de fixation du fluorophore ou des boîtes quantiques qui est difficile, peut perturber la cinétique d'interaction et est souvent onéreuse. De plus, le phénomène de fluorescence des fluorophores n'est valable que pour une quantité de photons donnée. En effet, une quantité de photons trop importante modifie la structure chimique du fluorophore (fréquemment par oxydation). Cette oxydation entraîne une transformation des bandes d'énergie de la molécule et souvent l'extinction de la fluorescence. Ce phénomène est appelé le photo-blanchiment. Des développements sont en cours pour diminuer ce photo-blanchiment en intégrant ces fluorophores dans des nanoparticules³⁴.

L'intérêt principal de boîtes quantiques par rapport aux fluorophores réside par contre dans l'absence du phénomène de photo-blanchiment³⁵. En effet, il est très difficile de réaliser une modification de la structure de leurs bandes d'énergie. De plus, il est possible d'effectuer une véritable ingénierie des spectres d'excitation et d'émission grâce à leur taille et leur matériau.

Ces techniques sont utilisées aussi bien pour la détection de l'hybridation de brins d'ADN, que pour les tests immunologiques, le criblage pharmaceutique et les tests in-vivo de cellules malines.

II.1.2. Les méthodes magnétiques

Le principe des méthodes magnétiques, détaillé sur la Figure 14.A, consiste à marquer les biomolécules cibles avec des particules magnétiques (le plus souvent nanométriques). L'accroche de ces cibles sur les sondes est repérée par la détection du champ magnétique généré par cette particule. La lecture s'effectue simplement à l'aide d'un capteur de champ magnétique suffisamment sensible pour mesurer le champ créé.

Les matériaux composant les particules magnétiques sont par exemple du $\text{Ni}_{30}\text{Fe}_{70}$ ³⁶, de la magnétite³⁷ ou du NdFeBLa ³⁸ avec des diamètres allant de 16 nm à 4 μm ³⁹.

Les capteurs magnétiques⁴⁰ utilisent principalement deux phénomènes physiques différents : soit la magnétorésistivité (Figure 14.B), soit l'effet Hall (Figure 14.C). Le premier est composé d'un ensemble de couches magnétiques dont la résistance varie sous l'effet d'un

34 Wei Lian et al. Analytical Biochemistry, Volume 334, Issue 1, 1 November 2004, Pages 135-144

35 F. CHEN et al. Nanoletters, 4, pp. 1827-1832, 2004.

36 Miller, M.M et al., 2002. Appl. Phys. Lett. 81, 2211–2213

37 Enpuku, Ket al., ., 2005. IEEE Trans. Appl. Superconduct. 15, 660–663.

38 Baselt, D.Ret al., 1996. J. Vac. Sci. Technol. B 14, 789–793.

39 Wang, S.X et al., 2005. J.Magn. Magn. Mater. 293, 731–736.

40 C.R. Tamanaha et al. Biosensors and Bioelectronics, Volume 24, Issue 1, 15 September 2008, Pages 1-13

champ tangentiel à sa surface^{41,42,43}. Le deuxième est sensible à la composante normale à la surface du capteur⁴⁴. Un courant électrique est injecté à sa surface. Sous l'effet du champ magnétique, les électrons sont déviés et une différence de potentiel apparaît perpendiculairement au sens de propagation du courant proportionnelle au champ.

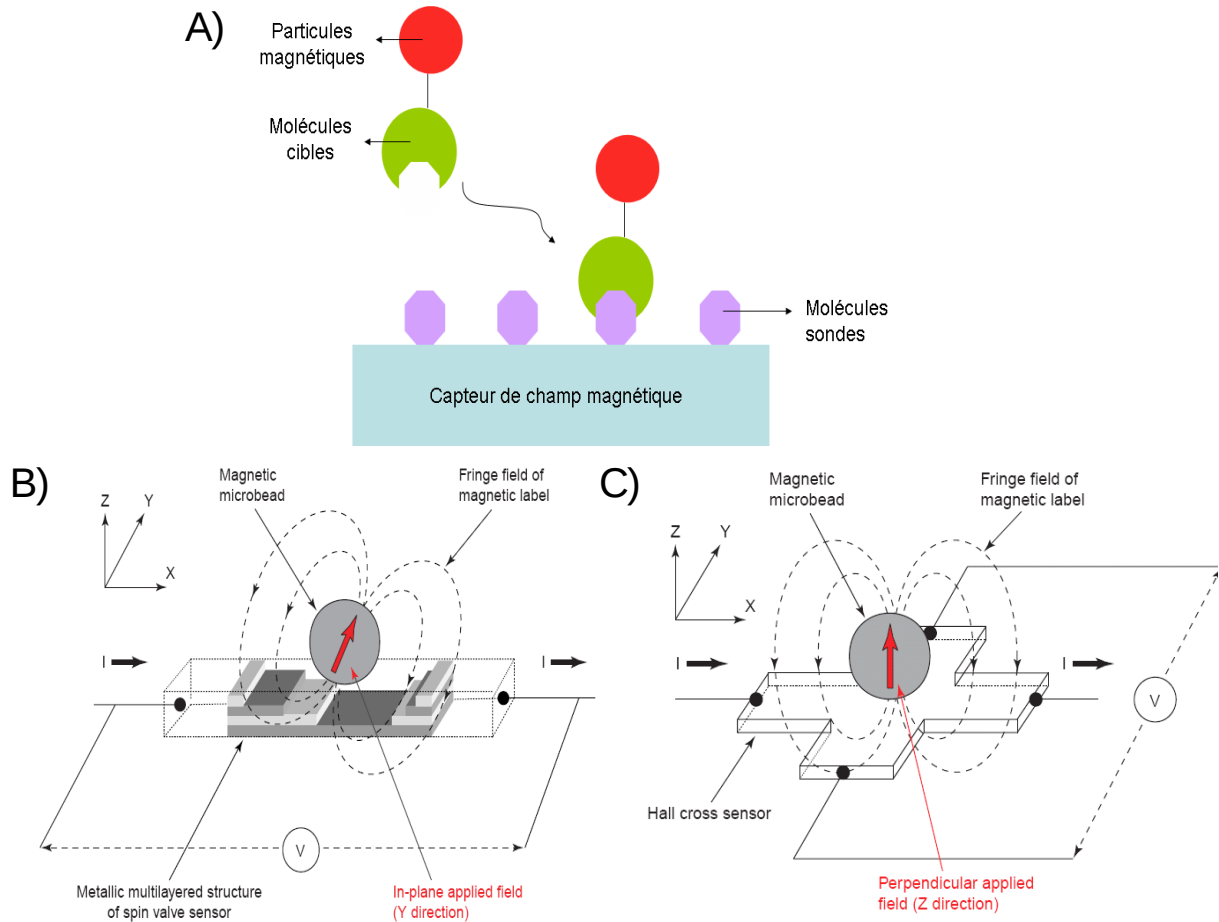


Figure 14 : A) schéma de principe d'un biocapteur magnétique B) schéma d'un capteur basé sur l'effet magnétorésistif C) schéma d'un capteur à effet Hall⁴⁵

Ces dispositifs, très sensibles, sont onéreux à cause du marquage mais sont en voie de commercialisation grâce à une réduction des coûts provenant des systèmes de détections magnétiques⁴⁶. L'application de cette technique à la détection de l'hybridation de brin d'ADN a été largement démontrée et optimisée. Nous constatons quelques études d'interaction antigène/anticorps basées sur cette technique⁴⁷.

41 Guanxiong Li et al. Sensors and Actuators A: Physical, Volume 126, Issue 1, 26 January 2006, Pages 98-106

42 Roel Wirix-Speetjens et al Sensors and Actuators B: Chemical, Volume 128, Issue 1, 12 December 2007, Pages 1-4

43 Schotter, J. et al. (2002) IEEE Trans. Magn. 38, 3365-3367

44 Besse, P.A. et al. (2002) using a miniaturized silicon Hall sensor. Appl. Phys. Lett. 80, 4199-4201

45 Daniel L. Graham et al. Trends in Biotechnology, Volume 22, Issue 9, September 2004, Pages 455-462

46 Rife, J.C., et al., 2003. Sens. Actuators A 107, 209-218

47 H.B. Fredj et al. / Talanta 75 (2008) 740-747

II.2. Les méthodes de détection sans marquage

Nous présentons dans ce paragraphe les méthodes de détection sans marquage : mécaniques, électriques et optiques. Nous insisterons sur ce dernier point pour privilégier la thématique de ce doctorat.

II.2.1. Les méthodes mécaniques

II.2.1.1. Les microbalances à quartz

La technique est basée sur le phénomène de résonance piézoélectrique. Une lame d'un matériau piézoélectrique (le quartz) est placée en résonance mécanique par application d'une tension alternative (Figure 15). Cette fréquence diminue lorsqu'on dépose de la matière sur sa surface.

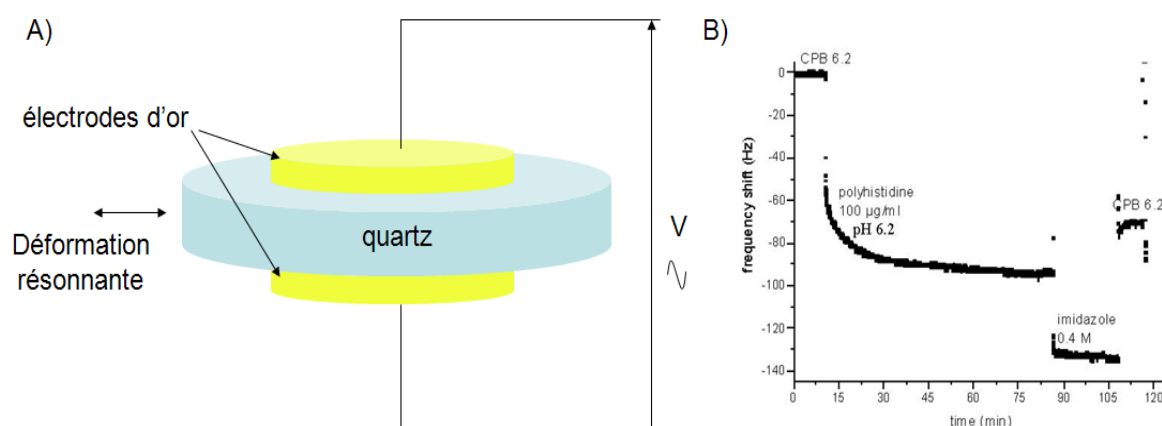


Figure 15 : A) schéma représentant un disque de quartz avec les électrodes excitatrices B) évolution typique de la fréquence de résonance en fonction du temps lorsque le quartz est placé dans une solution de polyhistidine à 100µg/mL et pH = 6,2.

Le biocapteur est généralement un cristal de quartz couplé à une électronique qui suit le décalage en fréquence de cette résonance par fixation sur sa surface de biomolécules. Un étalonnage préalable donne la masse déposée.

Le quartz peut présenter une surface d'or (l'électrode) ou être recouvert d'une couche d'un matériau différent (e.g silice). Cette technique permet d'utiliser différentes chimies de surface (thiols, silanes, ...). De plus, la mesure de la dispersion du signal piézoélectrique

permet l'acquisition d'informations sur la viscoélasticité des biomolécules qui interagissent. Cependant, il n'est possible de tester que quelques interactions en parallèle.

Ce système est utilisé pour beaucoup d'applications biologiques (interaction ADN biotinylé/streptavidine^{48,49}, interaction anticorps/antigène^{50,51}, adsorption de BSA⁵², de cellules^{53,54,55}, de bactéries^{56,57}, étude de moteurs moléculaires⁵⁸, étude de dépôts électrochimiques⁵⁹...) et commercialisé^{60,61}.

II.2.1.2. Les micro poutres⁶²

Le principe est de mesurer la déflexion d'une micro poutre sous l'effet du poids des sondes puis des cibles qui s'y fixent (Figure 16.A).

Les micro poutres sont fabriquées à l'aide des technologies de la microélectronique. Elles sont souvent en silicium mais aussi en résine SU8⁶³. Leurs géométries (épaisseur, largeur, longueur) sont adaptées au type d'interaction étudiée. L'interaction de la cible avec la sonde sur la poutre modifie sa fréquence de résonance. Les méthodes de détections des variations de fréquence de résonance développées sont soit piézorésistifs^{64,65,66}, optiques^{67,68}, ou interférométriques⁶⁹.

Deux méthodes principales de détection statique de la déflexion sont utilisées. La première consiste à quantifier la déflexion grâce à un élément piézorésistif qui délivre une tension proportionnelle à la déformation (Figure 16.B). Cette configuration est celle des jauges d'extension^{70,71}. La seconde méthode est optique. Elle consiste à mesurer la déflexion d'un faisceau laser par la poutre grâce à un photodétecteur (Figure 16.C)^{72,73}.

48 Khin Moh Aung et al. *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 131, Issue 2, 14 May 2008, Pages 371-378

49 Chunyan Yao et al. *Biosensors and Bioelectronics*, Volume 23, Issue 6, 18 January 2008, Pages 879-885

50 Elisabeth Briand et al. *Biosensors and Bioelectronics*, Volume 22, Issue 12, 15 June 2007, Pages 2884-2890

51 Cedric Ayela et al. *Biosensors and Bioelectronics*, Volume 22, Issue 12, 15 June 2007, Pages 3113-3119

52 A. Dolatshahi-Pirouz et al. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Volume 66, Issue 1, 1 October 2008, Pages 53-59

53 Megan S. Lord et al. *Biomaterials*, Volume 29, Issue 17, June 2008, Pages 2581-2587

54 L. Marcotte et al. *IRBM*, Volume 29, Issues 2-3, April-May 2008, Pages 77-88

55 Jacqueline Elsom et al. *Biosensors and Bioelectronics*, Volume 23, Issue 8, 14 March 2008, Pages 1259-1265

56 Xiang-Tao Mo et al. *Enzyme and Microbial Technology*, Volume 30, Issue 5, 2 May 2002, Pages 583-589

57 Xiao-Li Su et al. *Biosensors and Bioelectronics*, Volume 19, Issue 6, 15 January 2004, Pages 563-574

58 Nuria Albet-Torres et al. *Langmuir*, 23 (22), 11147 -11156, 2007

59 F. Wudy et al. *Electrochimica Acta*, Volume 53, Issue 22, 20 September 2008, Pages 6568-6574

60 www.q-sense.com

61 www.attana.com

62 L.G. Carrascosa et al. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, Volume 25, Issue 3, March 2006, Pages 196-206

63 A. Johansson et al. *Sensors and Actuators A: Physical*, Volumes 123-124, 23 September 2005, Pages 111-115

64 Ghi Yuun Kang et al. *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 117, Issue 2, 12 October 2006, Pages 332-338

65 Yeolho Lee et al. *Sensors and Actuators A: Physical*, Volumes 130-131, 14 August 2006, Pages 105-110.

66 W. H. Ryu et al. *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 97, Issue 1, 1 January 2004, Pages 98-102

67 Karin Y. Gfeller et al. *Biosensors and Bioelectronics*, Volume 21, Issue 3, 15 September 2005, Pages 528-533

68 Carolyn M. Hansen et al. *Methods*, Volume 37, Issue 1, September 2005, Pages 57-64

69 Jason Reed et al. *Optics and Lasers in Engineering*, 9 June 2008

70 Mukhopadhyay, et al., *Nano Lett.*; (Letter); 2005; 5(12); 2385-2388.

71 S.M. Yang et al. *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 130, Issue 2, 28 March 2008, Pages 674-681

72 Wenmiao Shu et al. *Biosensors and Bioelectronics*, Volume 22, Issues 9-10, 15 April 2007, Pages 2003-2009

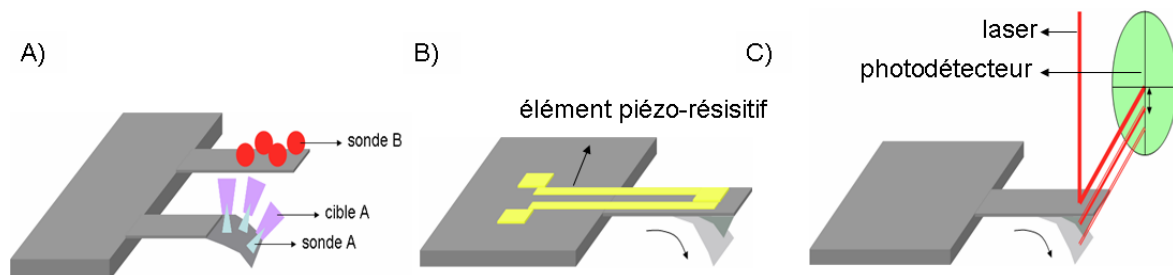


Figure 16 :A) schéma représentant la déflexion de la poutre lorsque la cible ne se fixe pas sur la sonde (sonde B) et lorsqu'elle se fixe sur la sonde (sonde A), B) schéma d'une poutre dont la déflexion est mesurée par un élément piézorésistif, C) la déflexion est mesurée par un photodétecteur

Certains auteurs utilisent le mode résonnant de la poutre qui s'inspire de la méthode utilisée pour l'imagerie à force atomique (AFM) en mode oscillant (le mode « tapping »). L'une de ses grandeurs caractéristiques est sa fréquence de résonance. Lors d'une interaction biologique entraînant un ajout de matière sur la poutre, cette fréquence d'oscillation varie. Elle donc est significative de l'accroche de bioentités.

Cette technique, quoique sensible, est actuellement l'objet d'un développement important par l'intégration de divers éléments de détection (photodiode, résistance piézoélectrique, ...) afin de la rendre plus accessible.

Elle est utilisée dans le cadre de la détection de l'hybridation d'ADN⁷⁴, de marqueurs cancéreux⁷⁵, de bactéries⁷⁶ et de virus⁷⁷.

II.2.2. Les méthodes électriques

II.2.2.1. Les électrodes interdigitées

Le dispositif consiste à suivre les variations d'impédance d'un réseau d'électrodes interdigitées lors de l'accroche des cibles sur les sondes (Figure 17).

On réalise pour cela deux « peignes » définissant un ensemble d'électrodes (ici en or) en regard séparées d'une distance nanométrique (300nm) appelée le « gap ». Un tel dispositif présente le comportement électrique schématisé sur la Figure 17.B.

73 Kwang-Ho Na et al. Ultramicroscopy, Volume 105, Issues 1-4, November 2005, Pages 223-227

74 L.M. Lechuga et al. Sensors and Actuators B: Chemical, Volume 118, Issues 1-2, 25 October 2006, Pages 2-10

75 G. Wu, et al., Nat. Biotech.,19 (2001), 856.

76 B. Ilic, . et al. Appl. Phys. Lett., 77(3) (2000), 450.

77 A. Gupta, et al., Appl. Phys. Lett., 84(11) (2004), 1976.

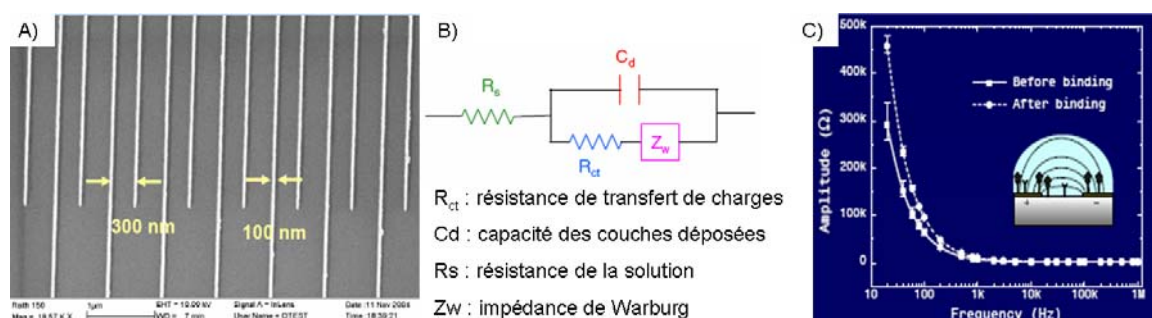


Figure 17 : A) image réalisée au MEB d'électrodes interdigitées, B) schéma électrique équivalent au système d'électrodes interdigitées C) graphe représentant la variation d'impédance du dispositif en fonction de la fréquence avant puis après interaction entre deux anticorps⁷⁸

La méthode de détection consiste à suivre les variations d'impédance lors de l'addition de biomolécules. Pour cela, le biocapteur est soumis à une tension de fréquence variable et on mesure le courant qui le traverse. Par exemple, la Figure 17.C donne les variations d'impédances obtenues par Zou et al⁷⁸ lors de l'interaction entre deux anticorps, étudiée aussi par Wang et al⁷⁹.

Ces systèmes sont très sensibles et leur principe de détection est plutôt simple. Par contre, une optimisation de la sélectivité de la détection est nécessaire afin d'éviter la présence d'artefact de mesures.

Ces dispositifs sont aussi très utilisés pour la détection électrochimique^{80,81} et dans le cadre d'interaction anticorps-anticorps⁸².

II.2.2.2. Les capteurs à effet de champs

Le second type de biocapteurs électriques est celui des capteurs à effet de champ. Il s'inspire des transistors à effet de champ, utilisés en microélectronique (Figure 18). Ils sont composés d'une source, d'un drain et d'une grille. Lorsque l'on applique une tension sur la grille, la résistance entre la source et le drain (le canal) est modifiée. Une de leurs grandeurs caractéristiques est la tension de seuil de grille à partir de laquelle le canal conducteur se bloque.

78 Zou et al., The 12th Solid State Sensor, Actuator and Microsystems Workshop (2006), June 4-8, 2006.

79 Meijia Wang et al., Biosensors and Bioelectronics 19 (2004) 575-582

80 Ian i. Suni et al, Trends in Analytical Chemistry, Vol. 27, No. 7, 2008

81 X. Zhu et al., IEEE Tran. on Nanobioscience, 4 (2005), pp. 164-169

82 Andreas Kukol et al., Anal. Biochem. 374 (2008) 143-153

Le biocapteur habituel est un transistor classique (Figure 18.A) dont la grille est modifiée afin d'être le lieu de l'interaction (ici biotine/streptavidine Figure 18.B). Durant l'interaction, la tension de seuil évolue par le remplissage du vide situé sous la grille.

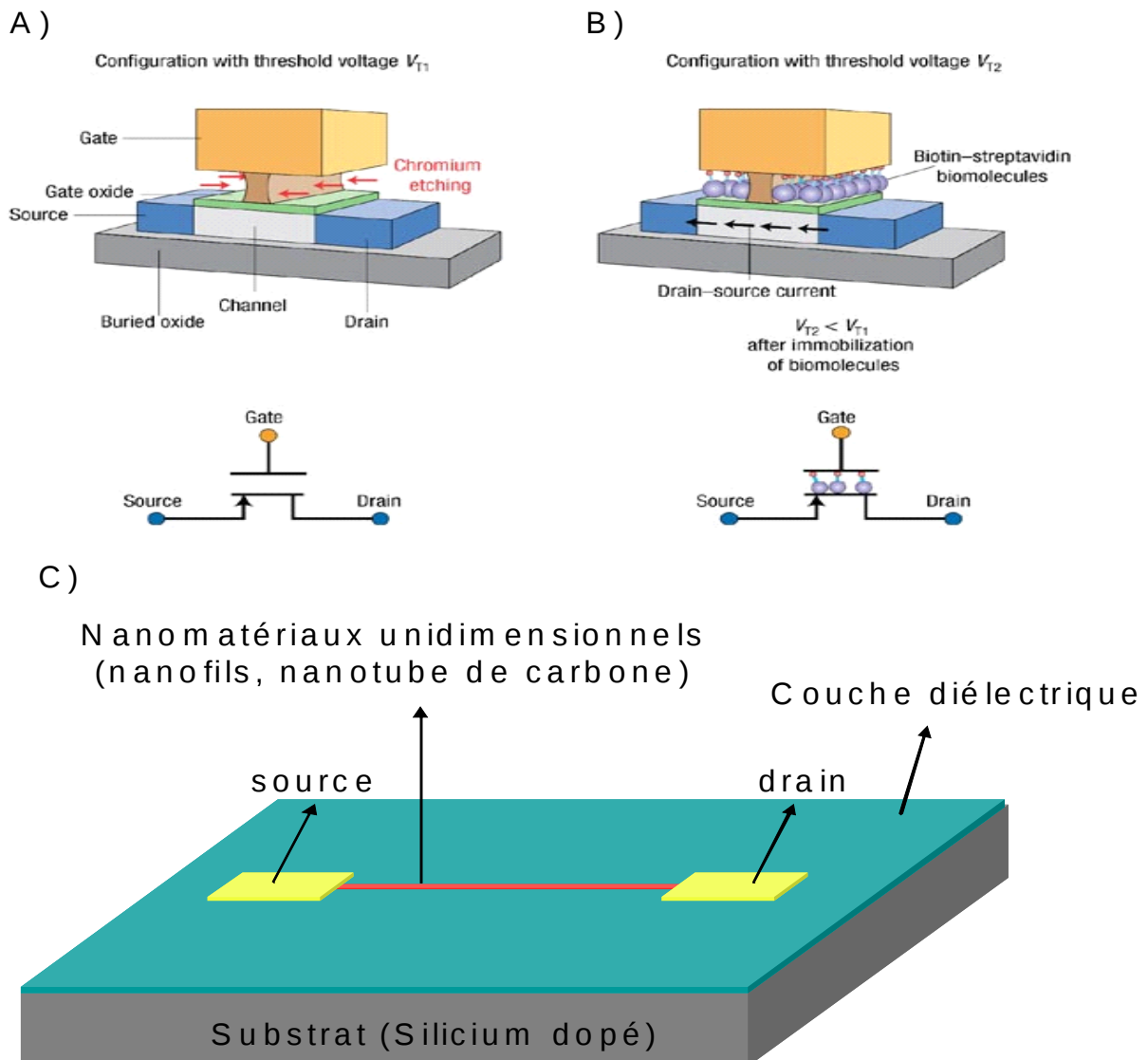


Figure 18 : schémas représentant A) la structure du biocapteur avant interaction B) à la fin de l'interaction.⁸³ C) une configuration de biocapteur à effet de champ dont le canal est un nanomatériau unidimensionnel

Une autre configuration de biocapteur à effet de champs se développe. Elle consiste à remplacer le canal généralement constitué de silicium dopé par un nanomatériau unidimensionnel (Figure 18.C) qui est soit un nanofil de silicium dopé⁸⁴ soit un nanotube de carbone⁸⁵. La conduction de ce canal est modifiée par l'accroche sur lui des biomolécules.

⁸³ Daniel Therriault et al. Nature Nanotechnology 2, 393 - 394 (2007)

⁸⁴ W.C. Maki et al. / Biosensors and Bioelectronics 23 (2008) 780-787

⁸⁵ R.A. Villamizar et al. Biosensors and Bioelectronics 24 (2008) 279-283

L'intérêt de la dimension nanométrique est d'engendrer un déplacement balistique des électrons dans le canal qui est très sensible à l'environnement. Lieber et al. ont par exemple atteint des limites de détection très importantes de l'ordre du femtomolaire lors de la détection de marqueurs cancéreux⁸⁶ (4 ordres de grandeur de précision supplémentaires par rapport à la technique ELISA*). De plus, le système de détection est fortement miniaturisé.

Ces biocapteurs sont commercialisés⁸⁷ et sont utilisés pour la détection des virus⁸⁸, de l'ADN^{89,90,91}, du glucose⁹². Des capteurs similaires mais bidimensionnels (à base de nano rubans) sont en cours de développement⁹³.

II.2.3. Les méthodes optiques

Ce paragraphe présente les méthodes de détection optique sans marquage.

II.2.3.1. La fluorescence

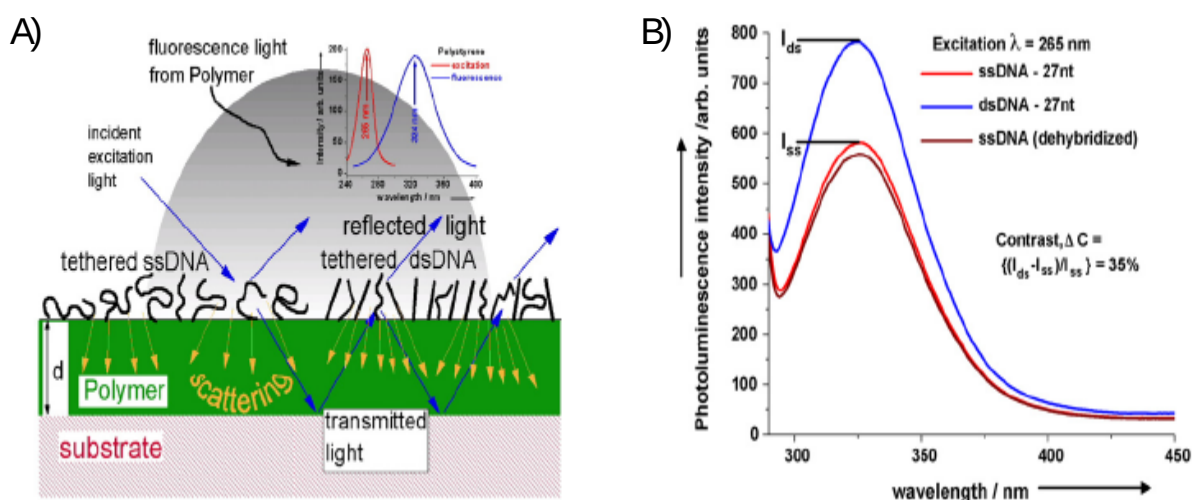


Figure 19 : A) schéma représentant le couplage entre la lumière diffusée par les brins d'ADN (simple ou double) et le substrat qui fluoresce B) spectre de fluorescence d'un simple brin d'ADN (rouge clair), puis après hybridation d'un double brin (courbe bleue) puis d'un simple brin après déshybridation (courbe rouge foncée)

86 Gengfeng Zheng et al., Nature Biotechnology 23, 1294 - 1301 (2005)

* Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay : tests immunologique base sur la capture d'un antigène dans un "sandwich" composé d'un anticorps de capture et un autre reconnaissant l'antigène, qualifié de traceur

87 www.vistatherapeutics.org/

88 F. Patolsky et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101, 14017-14022 (2004)

89 Zhang, G.-Jet al., Nano Lett.; (Letter); 2008; 8(4); 1066-1070

90 Star.al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 January 24; 103(4): 921-926.

91 Zhiqiang Gao et al. Anal. Chem., 79 (9), 3291 -3297, 2007.

92 Koen Besteman et al., Nano Letters, 3 (6), 727 -730, 2003.

93 Elfström, N et al., Nano Lett.; (Letter); 2008; 8(3); 945-949

La fluorescence est souvent présentée comme une méthode de détection avec marquage (voir II.1.1). De récents travaux démontrent qu'une lecture en fluorescence sans marquage est possible⁹⁴. Son concept développé est de coupler une lumière diffusée avec un substrat fluorescent. Les sondes et les cibles diffusent la lumière qui excite alors la fluorescence (Figure 19.A). Celle-ci est proportionnelle à la quantité de molécules présentes sur la surface. Lors d'une hybridation, le couplage est plus important et la quantité de lumière de fluorescence augmente (Figure 19.B).

Le substrat fluorescent est du polystyrène. Un faisceau laser excite dans le bleu et la lumière diffusée est analysée en longueur d'onde.

Cette technique simple est en cours de développement et nécessite une optimisation afin d'améliorer sa limite de détection. Elle n'a été démontrée que dans le cadre d'une hybridation d'ADN (Figure 19.B)⁸⁴.

II.2.3.2. Les méthodes interférométriques

Nous détaillons ici les systèmes basés sur l'interférométrie. Le phénomène physique utilisé est l'interférence de plusieurs ondes lumineuses. Un grand nombre d'interféromètre sont utilisés dans des applications industrielles de contrôles non destructifs.

a. L'interféromètre de Mach-Zehnder

L'interféromètre de Mach-Zehnder crée à partir d'une même source deux ondes lumineuses cohérentes qui sont ensuite recombinaées pour interférer entre elles. Des perturbations au cours du trajet de l'une d'elles vont modifier son amplitude et sa phase et donc le spectre d'interférence (Figure 20).

Les biocapteurs sont réalisés avec des techniques de photolithographie^{95,96}.

Le biocapteur utilise la division en deux guides d'ondes séparés que nous appellerons : les « branches » de l'interféromètre. La première est la branche de référence et la seconde est la branche réactionnelle mise en contact avec les biomolécules. L'adhésion durant l'interaction biologique sur la surface de ce deuxième guide d'onde modifie l'amplitude et la phase de l'onde qu'il guide. Il en résulte une modification de l'interférence entre les deux

94 Sanjun Niu et al. Biosensors and Bioelectronics, Volume 23, Issue 5, 15 December 2007, Pages 714-720

95 B.Y. Shew et al. / Sensors and Actuators A 120 (2005) 383-389

96 J. Hong et al. / Analytica Chimica Acta 573-574 (2006) 97-103

branches de sortie qui dépend des greffages biomoléculaires. Un photodétecteur placé à la sortie de l'interféromètre quantifie ces variations.

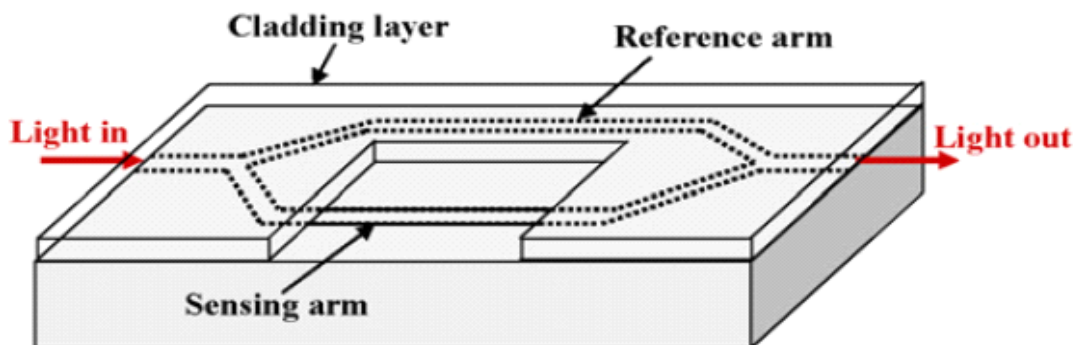


Figure 20 : schéma d'un biocapteur basé sur l'interféromètre de Mach-Zehnder⁹⁷

L'intégration électronique mais aussi fluide de ce type de dispositif est démontrée⁹⁸. Des problèmes de linéarité de la réponse lors de la biodétection ont été soulevés.

Cette configuration interférométrique est utilisée pour des interactions entre protéine (biotine/streptavidine⁹⁹) et anticorps/antigène^{100,101}.

b. Interféromètre de Young

Ce type d'interféromètre, à division de front d'onde, repose sur le principe des trous de Young. Il consiste à éclairer deux fentes se comportant comme deux sources lumineuses ponctuelles qui interfèrent entre elles (Figure 21).

Ce type de dispositif est réalisé par des techniques de photolithographie.

Comme dans le cas de l'interféromètre de Mach-Zehnder, le biocapteur comprend une branche de référence et une branche réactionnelle mise en contact avec les biomolécules. Les deux guides d'onde se comportent en sortie comme deux sources lumineuses qui émettent dans l'espace libre et qui interfèrent entre elles sur un écran. Une caméra CCD détecte alors la figure d'interférence réalisée. Cette dernière varie au cours de l'interaction biologique^{102,103}.

Ymeti et al démontrent qu'il est aussi possible de faire interférer un plus grand nombre de guides d'ondes (Figure 21). Chacun d'eux est le lieu d'une interaction biologique spécifique. L'espacement entre les divers guides d'ondes est différent pour que les fréquences

97 Fan et al., *analytica chimica acta* 620 (2008) 8–26

98 F.J. Blanco et al., *J. Micromech. Microeng.* 16, (2006).

99 S. Busse et al., *Sensors and Actuators B* 60(1999)148–154

100 F. Prieto et al. / *Sensors and Actuators B* 92 (2003) 151–158

101 B.Y. Shew et al. / *Sensors and Actuators A* 141 (2008) 299–306

102 E. Brynda et al. / *Biosensors and Bioelectronics* 17 (2002) 665–675

103 K. Schmitt et al. / *Biosensors and Bioelectronics* 22 (2007) 2591–2597

spatiales, déterminées après transformée de Fourier de la figure d'interférence mesurée, soient séparées les une par rapport aux autres¹⁰⁴.

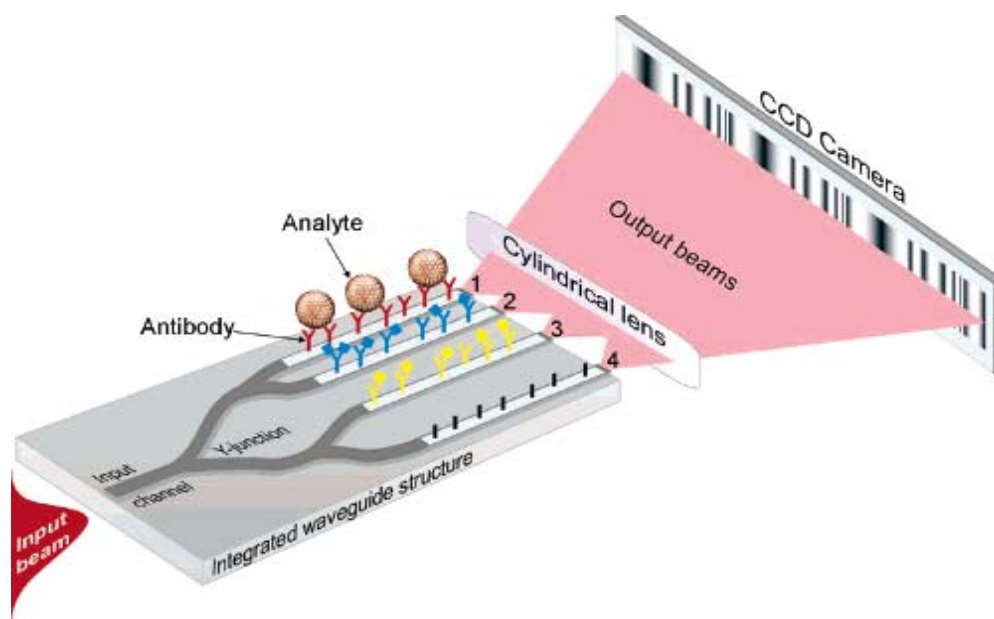


Figure 21 : schéma représentant un capteur basé sur l'interféromètre de Young composé de plusieurs branches et donc mesurant plusieurs interactions.¹⁰⁵

Ce type de dispositif présente comme l'interféromètre de Mach-Zehnder, une bonne intégration électronique et fluide. Étant donné que la mesure est différentielle, entre deux interactions, le protocole biochimique demande une attention toute particulière.

D'ailleurs, les potentialités de cette technique ont été démontrées pour des interactions entre protéines (biotine/streptavidine¹⁰⁶) ou la détection de virus¹⁰⁵

c. Interféromètre de Hartman

L'interféromètre de Hartmann est apparu en 1997¹⁰⁷. Dans ce type d'interféromètre le guide d'onde est bidimensionnel (Figure 22).

Un faisceau lumineux incident est couplé aux guides d'ondes grâce à deux réseaux. Deux autres réseaux permettent ensuite d'extraire les ondes lumineuses qui se sont propagées dans chaque zone du guide d'onde. Une lentille convergente placée en sortie fait converger les faisceaux de sortie sur un photodétecteur qui mesure l'intensité de l'onde résultant de leur interférence¹⁰⁸.

104 A. Ymeti et al. / Biosensors and Bioelectronics 20 (2005) 1417–1421

105 A. Ymeti, et al., Nano Lett. 7 (2007), p. 394

106 M.J. Swann et al., Anal.Biochem. 329 (2004) 190.

107 Schneider et al.: Clinical Chemistry 43:91757–1763 (1997)

108 B.H. Schneider et al. : Biosensors & Bioelectronics 15 (2000) 13–22

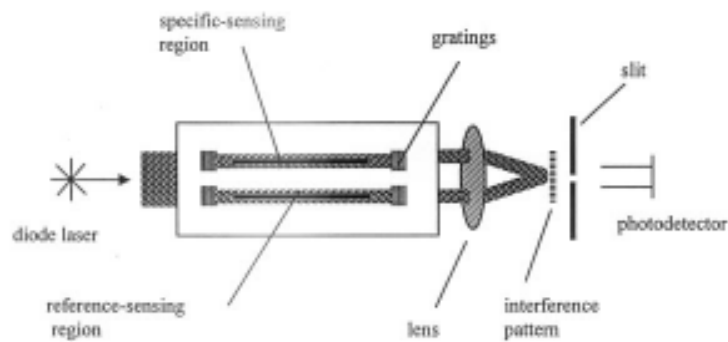


Figure 22 : schéma d'un interféromètre de Hartman¹⁰⁹

Les technologies permettant la réalisation de ces dispositifs sont celles de la microélectronique.

Ces dispositifs ont des performances similaires à l'interféromètre de Young. Par contre, l'intégration électronique et fluide est peu développée.

Des interactions anticorps/antigènes ou la détection de virus ont été démontrées^{108,109}.

d. Interféromètre rétrodiffusif

Les interféromètres précédents ont des dimensions importantes, de l'ordre du centimètre. Les interféromètres diffusifs sont globalement plus petits.

Leur principe repose sur l'exploitation d'une topographie sub longueur d'onde de surface dont chaque point modifie l'amplitude et la phase de l'onde qu'il réfléchit. Pour cela, un faisceau incident collimaté frappe une petite surface de l'échantillon à étudier et un capteur CCD ou photodiode analyse la figure d'interférence entre les ondes réfléchies (Figure 23).

Les motifs sub longueur d'onde sont générés soit par des structures poreuses (silicium poreux utilisé pour la détection d'ADN par exemple¹¹⁰) ou de PDMS¹¹¹(Figure 23) ou de verre¹¹².

Le biocapteur exploite les variations des figures d'interférence engendrées par la fixation des molécules sondes puis cibles sur la surface des motifs.

Des méthodes basées sur la diffusion de la lumière transmise permettent de connaître l'état d'une solution (diamètre d'agrégats, ...). Sur le même concept basé sur la lumière

109 Schneider et al. : Biosensors & Bioelectronics 15 (2000) 597–604

110 V.S.-Y. Lin, et al., Science 278 (1997) 840.

111 Wang, Z. .et al., J.Anal. Chem.; (Article); 2005; 77(24); 7872-7877

112 Swinney, K. et al. J.Anal. Chem.; (Accelerated Article); 2000; 72(13); 2690-2695

diffusée mais cette fois ci réfléchi, il est possible de réaliser un biocapteur sensible à l'ensemble du volume réactionnel¹¹³.

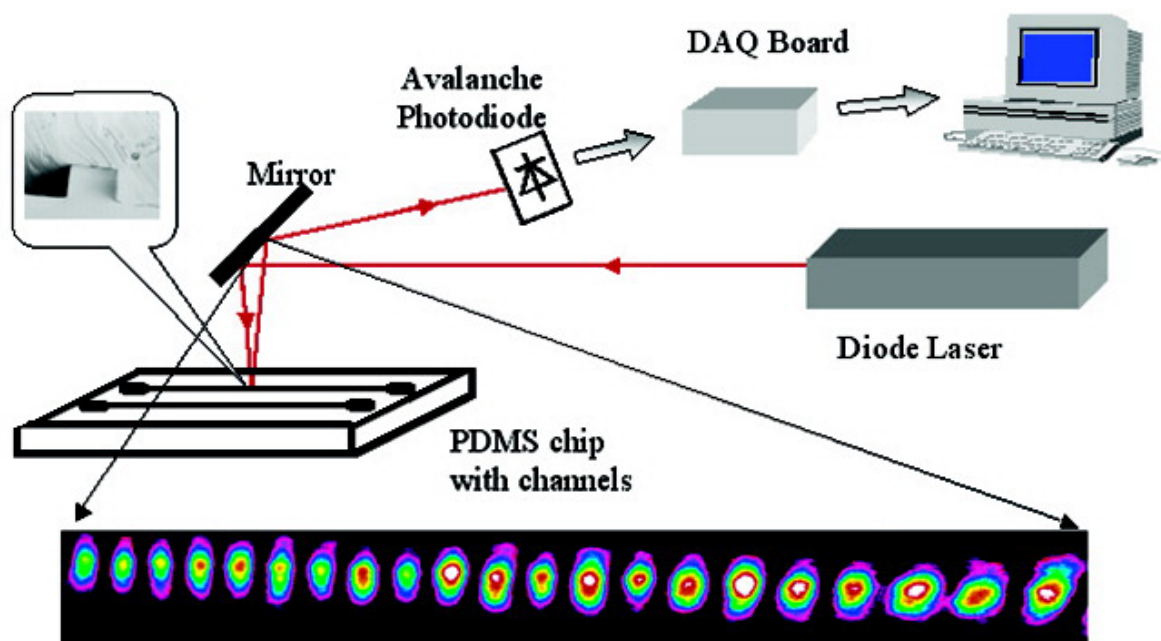


Figure 23 : schéma d'un interféromètre rétrodiffusif basé sur l'analyse de la figure d'interférence de microcanaux fluidiques en PDMS¹¹⁴

Ces dispositifs sont très sensibles et commencent à apparaître dans le commerce¹¹⁵.

Ils sont utilisés dans plusieurs applications comme la génomique¹¹⁰ ou la détection d'interaction entre protéine¹¹⁶ ou protéine/anticorps¹¹⁴.

e. Fabry pérot

Cet interféromètre est composé d'une cavité d'épaisseur L (zone rouge de la Figure 24) entourée par des miroirs de Bragg multicouches partiellement réfléchissants (superposition de couches d'indices différents dont le coefficient de réflexion, très élevé, peut être ajusté grâce au nombre de couches et à la différence des indices).

Le spectre lumineux transmis ou réfléchi par l'ensemble est composé de pics. Ils sont espacés de la même distance et leur finesse et position dépend des caractéristiques de la cavité (longueur, indice optique, absorption).

113 D.J. Bornhop, et al., Science 317 (2007) 1732.

114 Dmitry A. Markov et al., J. Am. Chem. Soc., 126 (50), 16659 -16664, 2004

115 <http://www.quadraspec.com/index.php>.

116 Zhao et al., Clin. Chem. 52 (2006) 2135.

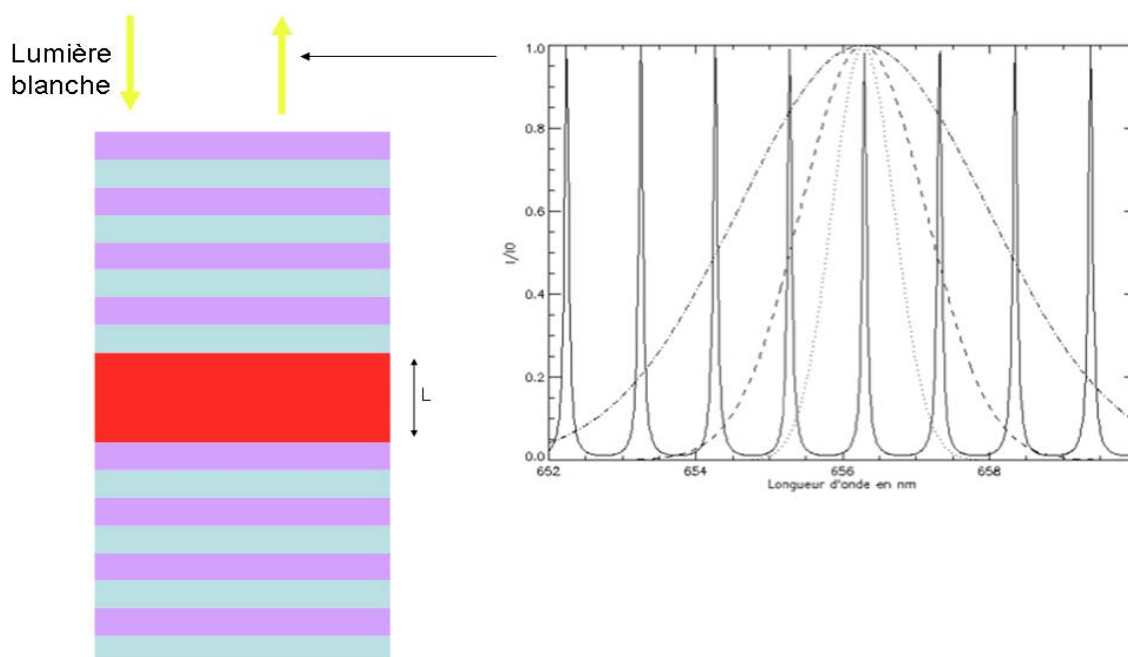


Figure 24 : schéma représentant une cavité de Fabry-Pérot éclairée par une lumière blanche et dont le spectre lumineux en réflexion est présenté

Dans le biocapteur, les biomolécules sont positionnées dans la cavité. Lors de l'interaction, l'ajout de matière modifie l'indice de la cavité ce qui engendre une modification de la résonance et donc du spectre en réflexion. Les biocapteurs sont donc basés sur l'observation du spectre en réflexion de la cavité de Fabry-Pérot.

Un grand nombre de capteur de ce type ont une cavité composée d'un matériau poreux (silicium poreux)^{117,118,119,120,121} dont l'indice optique augmente au fur et à mesure que les pores sont remplis par les biomolécules

Certains biocapteurs utilisent une cavité de Fabry-Pérot placée au bout d'une fibre optique ce qui permet une bonne portabilité du système de détection. Le dépôt de biomolécules modifie la réflectivité du miroir présent à l'extrémité et ainsi le spectre lumineux réfléchi^{122,123,124}.

Cette technique a été démontrée dans le cadre de l'hybridation de l'ADN¹²⁵ et de l'interaction anticorps/antigène¹¹⁸.

117 Michael P. Schwartz Anal. Chem., 79 (1), 327 -334, 2007

118 Dancil, K.-P. S et al., J. Am. Chem. Soc.; (Article); 1999; 121(34); 7925-7930

119 Pacholski, C et al., J. Am. Chem. Soc.; (Article); 2005; 127(33); 11636-11645

120 DeLouise et al., Anal. Chem.; (Article); 2005; 77(10); 3222-3230.

121 Janshoff, A.; Dancil, et al., J. Am. Chem. Soc.; (Article); 1998; 120(46); 12108-12116

122 Y. Zhang et al., J. Lightwave Technol. 25, 1797-1804 (2007)

123 X. Wang, et al., Appl. Phys. Lett. 89 (2006) 163901.

124 Y. Zhang, et al., Opt. Lett. 30 (2005) 1021.

125 C. Steinem et al. / Tetrahedron 60 (2004) 11259-11267

II.2.3.3. L'utilisation de la réflectométrie

Ce système de détection exploite les réflexions multiples d'un substrat composé de multicouches.

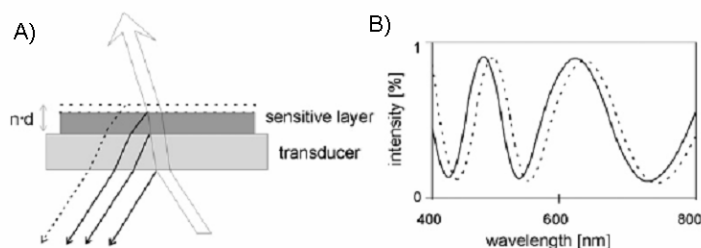


Figure 25 : A) schéma de principe d'un phénomène de réflectométrie B) principe d'un spectre obtenu avant interaction puis après interaction¹²⁶

Comme le montre la Figure 25.A, une onde incidente sur une superposition de couches d'indices optiques et d'épaisseurs différents est partiellement réfléchi par chaque interface. L'onde réfléchi par le système multicouche correspond à l'interférence d'ondes déphasées les unes par rapport aux autres. Son amplitude dépend de la longueur d'onde utilisée. Ainsi, si on éclaire le substrat avec une lumière blanche, l'interférence engendre des oscillations d'amplitude qui sont fonction de la longueur d'onde dont un exemple est présenté sur la Figure 25.B.

Pour étudier l'interaction biologique, on introduit d'abord la couche de sondes en surface supérieure. Le greffage des cibles rajoute une couche supplémentaire qui modifie le spectre $I(\lambda)$. Les biocapteurs basés sur la réflectométrie observent ces variations^{127,128}. Des études font évoluer les modèles afin qu'ils se rapprochent des mesures expérimentales¹²⁹.

Cette technique est faiblement intégrée et peu développée technologiquement.

Il existe quelques applications de la réflectométrie comme l'étude d'interactions anticorps/protéine¹²⁸ ou d'hybridation d'ADN¹²⁶.

II.2.3.4. L'utilisation de l'ellipsométrie

Les biocapteurs basés sur l'ellipsométrie sont une émanation des systèmes de mesure ellipsométriques utilisés pour la caractérisation de couches minces. Le phénomène physique consiste à éclairer leur surface par une onde monochromatique polarisée (Figure 26) et à

126 G. Proll et al. / J. Chromatogr. A 1161 (2007) 2–8

127 Bickert et al., Analytical Biochemistry 282, 200–208 (2000)

128 Pacholski et al., J. AM. CHEM. SOC. 2006, 128, 4250–4252

129 Picart et al., Journal of Chemical Physics 115, 2 (2001) 1086

détecter les modifications de la polarisation de l'onde réfléchi. Des modèles en déduisent les indices et les épaisseurs des couches constitutives du substrat.

Un biocapteur exploite ces variations de polarisation par le dépôt des sondes et des cibles. Les mesures ellipsométriques détectent l'évolution des couches biomoléculaires^{130,131,132,133,134}.

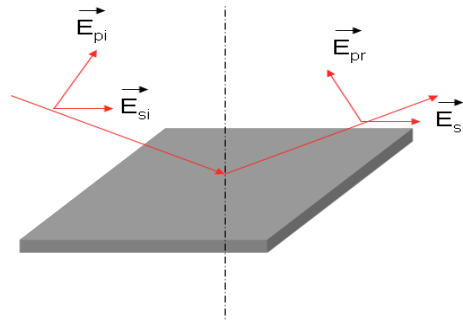


Figure 26 : schéma représentant les composantes normales et tangentes du champ électrique représentant l'onde lumineuse avant puis après interaction avec la surface

Cette technique de biodétection est difficilement intégrable et présente une certaine complexité d'interprétation limitant son application à une détection systématique à haute densité.

Cette technique est utilisée pour la détection de l'hybridation de l'ADN¹³⁵, de l'adsorption de protéines¹³⁶, ... Quelques travaux démontrent qu'il est possible d'exalter la mesure ellipsométrique en excitant des plasmons de surfaces¹³⁷.

II.2.3.5. L'utilisation de la résonance des plasmons de surface (SPR)

Le phénomène de résonance des plasmons de surface (SPR) est une excitation collective des électrons d'une couche métallique très fine (quelques nanomètres), supportée par une couche diélectrique, par une onde lumineuse (Figure 27.A). Il s'en suit une perte d'intensité de l'onde réfléchi par cette interface par propagation au sein de la couche métallique d'une onde lumineuse mais aussi d'onde évanescente à l'interface entre la couche métallique et le milieu diélectrique adjacent. La perte de lumière par propagation au sein de la couche métallique est sensible à l'état des interfaces par le biais de cette onde évanescente.

130 Gray, D.E et al., Southern, E.M., 1997.Langmuir 13, 2833–2842.

131 Ostroff, R.M.et al.1998. Clin. Chem. 44, 2031–2035.

132 G. Jin et al., physica status solidi (a) Volume 205 Issue 4, Pages 810 - 816

133 Jin, G et al., 2000.Proceedings of ISIK 2000 Workshop on Biomedical Information Engineering, June 25– 27, 2000, pp. 269– 272.

134 Y-Y. Chen International Journal of Nanotechnology Volume 4, Number 1-2 / 2007 171 - 178

135 Gökhan Demirel et al., Surface Science, Volume 602, Issue 4, 15 February 2008, Pages 952-959

136 G. Siegel et al., Biosensors and Bioelectronics, Volume 18, Issues 5-6, May 2003, Pages 635-647

137 Peter Westphal et al., Sensors and Actuators B: Chemical, Volume 84, Issues 2-3, 15 May 2002, Pages 278-282

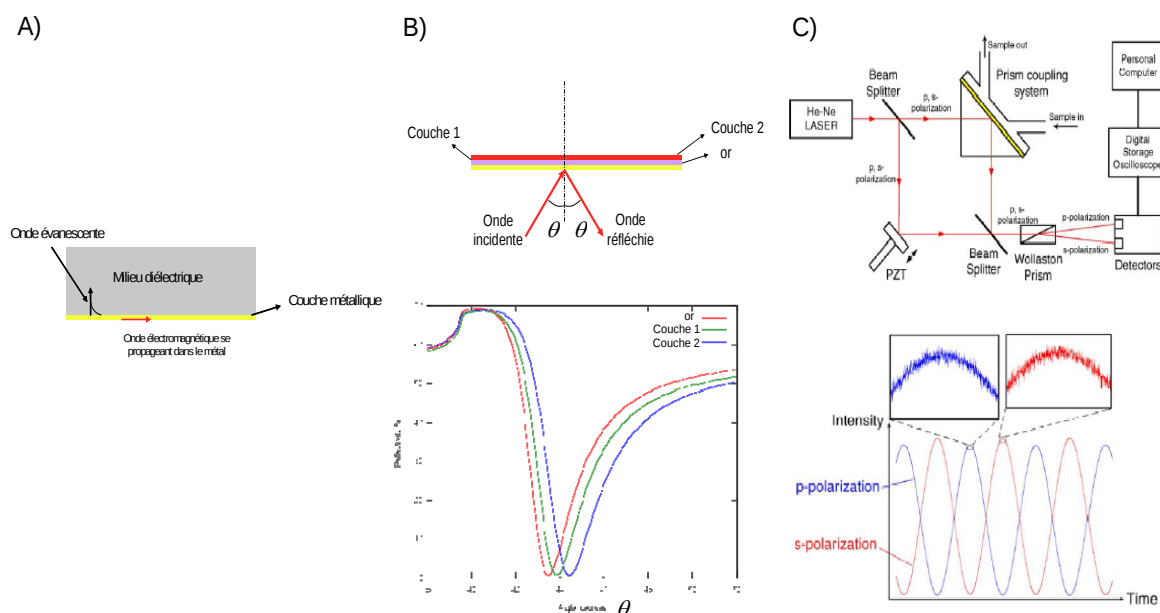


Figure 27 : A) schéma représentant le phénomène de résonance des plasmons de surface schéma de principe et exemple de biocapteur basé sur B) la mesure de la réflectivité selon l'angle d'incidence C) le changement de phase de l'onde réfléchie¹³⁸

Pour exciter la résonance plasmonique de surface, on doit injecter une onde lumineuse incidente de longueur d'onde donnée selon un angle précis. C'est pourquoi il existe divers systèmes d'excitation de la résonance. Il est possible de coupler l'onde lumineuse grâce à :

1. un prisme
2. une fibre optique
3. un réseau de diffraction
4. un guide d'onde

Chacun de ces éléments présente des avantages et des inconvénients en termes de sensibilité, de coût et de miniaturisation.

Plusieurs dispositifs de mesure des pertes par résonance des plasmons de surface peuvent être utilisés. Le premier système est basé sur la mesure de la réflectivité de l'échantillon en fonction de l'angle d'incidence de l'onde lumineuse excitatrice (Figure 27.B)^{139,140,141}. Le second système consiste à ne pas faire varier l'angle d'incidence mais plutôt la longueur d'onde^{142,143,144}. Ainsi, à la longueur d'onde de résonance, la réflectivité du signal chute (voire s'annule). Le dernier type de biocapteurs basé sur la SPR consiste à

138 W.-C. Law et al. / Biosensors and Bioelectronics 23 (2007) 627–632

139 J. Dost'alek et al. / Sensors and Actuators B 107 (2005) 154–161

140 Haes et al., J. AM. CHEM. SOC. 9 VOL. 127, NO. 7, 2005

141 M. Yao et al. / Acta Biomaterialia (2008)

142 Johnston et al., Anal. Chem. 1997, 69, 1844-1851

143 Zybin et al., Anal. Chem. 2005, 77, 2393-2399

144 Brolo et al. Langmuir, Vol. 20, No. 12, 2004

mesurer le changement de phase de l'onde réfléchi par la surface. Pour cela le faisceau lumineux incident est divisé en deux faisceaux, l'un excite la résonance des plasmons de surface, l'autre sert de référence pour mesurer le déphasage (Figure 27.B). Pour connaître le changement de phase du rayonnement réfléchi, on le fait interférer avec le faisceau lumineux de référence^{145,146}.

Le principe du biocapteur consiste à modifier les pertes par ondes évanescentes en créant au voisinage de la surface métallique une couche d'interaction biologique. Lors d'interactions biologiques, l'ajout de matière sur la surface métallique modifie le couplage SPR avec l'onde évanescente. Ainsi les biocapteurs basés sur la résonance des plasmons de surface ont une sensibilité corrélée à la longueur de propagation de l'onde évanescente dans le milieu testé.

Cette technique est très sensible tant que les événements biologiques ont lieu près de la surface métallique. C'est pourquoi la chimie de surface est déterminante dans l'efficacité de la détection. Des développements sont réalisés afin d'optimiser cette distance de sensibilité (SPR à courte ou à longue distance)¹⁴⁷.

Des systèmes basés sur la SPR sont commercialisés^{148,149} et utilisés pour étudier des interactions très diverses allant de l'interaction entre protéines¹³⁸, l'interaction anticorps/antigènes¹⁴⁰ ou l'hybridation d'ADN¹⁵⁰.

II.2.3.6. L'utilisation de guides d'ondes

Les guides d'onde sont composés d'une superposition de couches d'indices différents dont l'objectif est de confiner une onde lumineuse dans une des couches de l'empilement (souvent celle dont l'indice optique est le plus élevé). Le confinement de la lumière est dû à un fort contraste d'indice qui engendre une réflexion importante voire totale aux interfaces de la couche propagatrice (couche rouge de la Figure 28). Une onde évanescente est alors créée aux interfaces.

145 K.-H. Lee et al. / Biosensors and Bioelectronics 23 (2007) 466–472

146 S. Patskovsky et al. / Sensors and Actuators B 133 (2008) 628–631

147 Hasting et al., Optics Express, Vol. 15, Issue 26, pp. 17661-17672

148 www.biacore.com

149 www.reichertspr.com/

150 S. Peeters et al. / Biosensors and Bioelectronics 24 (2008) 72–77

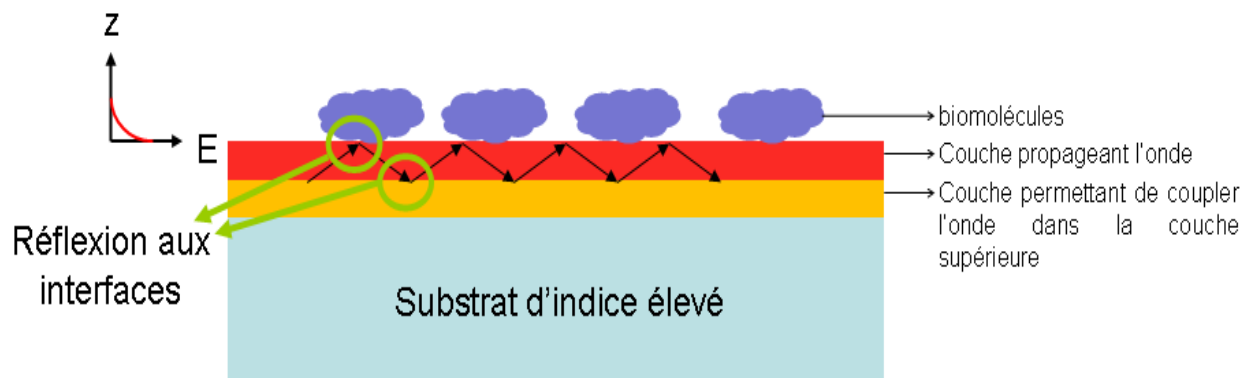


Figure 28 : schéma représentant la structure d'un guide d'onde

Afin de coupler l'onde lumineuse au sein du guide d'onde les techniques sont équivalentes à celles utilisées dans le cadre de la SPR (prisme, réseau¹⁵¹, fibre optique). Différentes structures de guides d'onde ont été démontrées : les miroirs résonnants¹⁵², les guides d'ondes à revêtement métallique^{153,154}, à symétrie inversée¹⁵⁵, etc...

Les biocapteurs basés sur des guides d'onde utilisent la dernière couche pour guider l'onde (Figure 28). L'ajout de matière biologique sur celle-ci modifie le couplage de l'onde lumineuse au sein du guide d'onde. Le dispositif de détection est basé sur la mesure de l'intensité lumineuse qui se propage.

Les guides d'onde utilisés pour la biodétection sont très sensibles et font l'objet de beaucoup de développement de leur intégration. L'inconvénient de cette technique est similaire à celui de la SPR qui est que la détection n'est sensible que dans une zone proche de la surface.

Des biocapteurs basés sur des guides d'onde et sur de l'interférométrie (Young) sont commercialisés (Analight)¹⁵⁶. Ils sont utilisés lors de la détection de cellules cancéreuses (mélanomes), de l'adsorption de protéine¹⁵¹, de l'interaction anticorps/antigènes et de la quantification de l'efficacité d'inhibiteur d'enzyme sur un substrat¹⁵².

II.2.3.7. L'utilisation d'anneaux résonnants

Cette technique récemment développée est basée sur des guides d'ondes en forme d'anneaux circulaires (Figure 29). Lorsqu'on injecte dans le guide une lumière

151 S. Grego et al. / Sensors and Actuators B 131 (2008) 347–355

152 P. E. Buckle et al., Biosensors & Bioelectronics 8 (1993) 355–363

153 N. Skivesen et al. / Sensors and Actuators B 106 (2005) 668–676

154 M. Zourob, N.J. Goddard / Biosensors and Bioelectronics 20 (2005) 1718–1727

155 Horvath et al., Optics Letters, Vol. 28 Issue 24, pp.2473–2475 (2003)

156 www.farfeildgroup.com

polychromatique, la différence de trajet optique (le déphasage) entre les ondes provenant du trajet parcouru lors de chaque tour varie selon la longueur d'onde. Il existe donc une longueur d'onde pour laquelle l'interférence de toutes les ondes est constructive : il y a donc résonance.

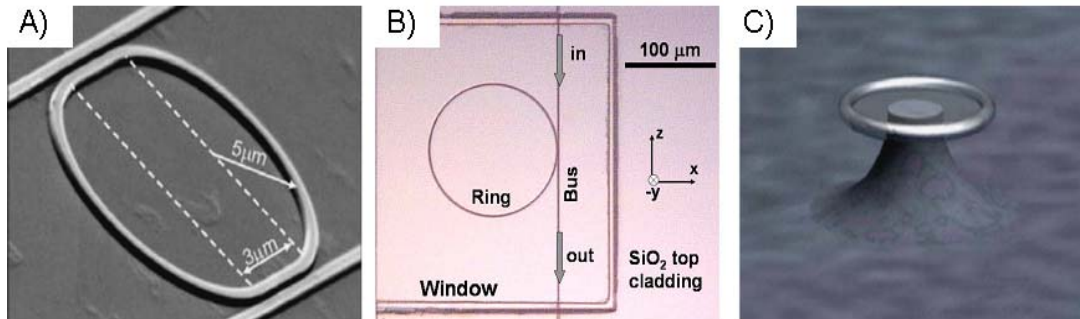


Figure 29 : A)¹⁵⁷, B)¹⁵⁸ et C)¹⁵⁹ images MEB d'anneaux résonnants

Ces structures sont réalisées à l'aide des technologies de la micro/nano électronique sur silicium.

Les biocapteurs basés sur ces anneaux résonnants observent le décalage de la longueur d'onde de résonance du biosystème provoqué par les variations du couplage à l'intérieur du guide d'onde lors du dépôt sur celui-ci des biomolécules

Le paramètre crucial permettant une bonne sensibilité est la distance parcourue par l'onde lumineuse dans le guide d'onde. De ce fait, l'intérêt de la forme en anneau par rapport à une forme linéaire est que la sensibilité du système n'est plus conditionnée par la taille (plus particulièrement la longueur) du guide d'onde mais plutôt par le nombre de tours qu'effectue la lumière au sein de l'anneau¹⁶⁰.

Certains dispositifs¹⁶¹ couplent la résonance d'un anneau métallique (or) et celle des plasmons de surface afin d'exalter la sensibilité.

II.2.3.8. L'utilisation des fibres optiques

Le dispositif classique est basé sur le caractère de guide d'onde des fibres optiques. En effet, le cœur d'une fibre permet de guider une onde lumineuse à condition qu'il y ait une

¹⁵⁷ De vos et al., Optics Express, Vol. 15, Issue 12, pp. 7610-7615

¹⁵⁸ Barrios et al., Optics Letters, Vol. 32, Issue 21, pp. 3080-3082

¹⁵⁹ Armani et al. Science 317, 783 (2007);

¹⁶⁰ Lacey et al., Optics Express, Vol. 15, Issue 23, pp. 15523-15530

¹⁶¹ Larsson, E. M et al. Nano Lett.; (Letter); 2007; 7(5); 1256-1263

réflexion totale (ou du moins très importante) sur ses interfaces. Une onde évanescente existe au niveau de cette interface (Figure 30.A). Toute perturbation sur sa gaine modifie cette onde évanescente et donc l'intensité de l'onde guidée.

Dans des dispositifs de biodétection, la fibre optique est mise en présence avec des biomolécules qui vont adhérer ou non selon l'interaction observée. La modification des propriétés optiques engendrent une variation du couplage de l'onde lumineuse au sein de la fibre. La quantité de lumière transmise à travers la fibre est modifiée et correspond à la grandeur sensible à l'interaction.

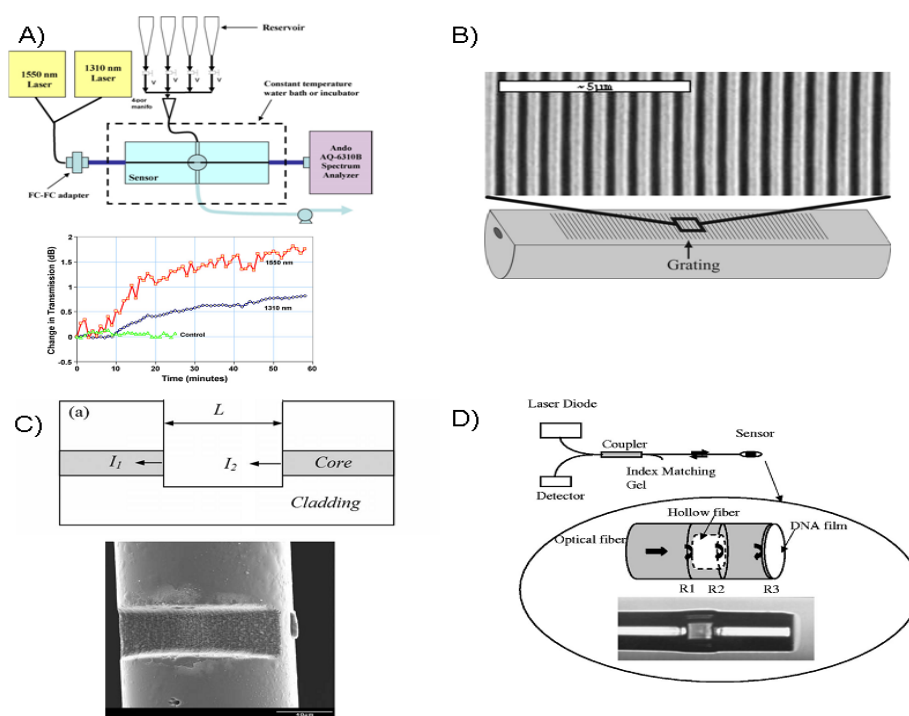


Figure 30 : A) schéma de principe et graphes d'adsorption de simple brin d'ADN avec une fibre plongée dans la solution¹⁶² B) schéma de principe et image MEB d'une cavité de Fabry-Pérot au sein de la fibre optique¹⁶³ C) schéma et image MEB d'un réseau de Bragg inséré dans une fibre optique¹⁶⁴ D) schéma du montage expérimentale d'un capteur à cavité de Fabry-Pérot positionnée au bout de la fibre¹⁶⁵

Des variantes mixtes à base de fibres optiques sont développées afin de mieux canaliser, amplifier les effets. Certains dispositifs intègrent des réseaux de Bragg dans la fibre optique (Figure 30.B)^{166,167,168}. Ces types de réseaux ont un spectre de réflexion composé de pics centrés sur des longueurs définies par la période mais aussi par les indices optiques des

162 A. Leung et al. / Sensors and Actuators B 131 (2008) 640–645

163 Wei et al., OPTICS LETTERS / Vol. 33, No. 6 / March 15, 2008

164 Lowder et al., Optics Letters, Vol. 32, Issue 17, pp. 2523-2525

165 Wang et al., Appl. Phys. Lett. 89, 163901 2006

166 Smith et al., Applied Optics, Vol. 45, Issue 8, pp. 1669-1675

167 DeLisa et al., Analytical Chemistry, Vol. 72, No. 13, July 1, 2000

168 Chrysis et al., IEEE Photonics Technology Letters, vol. 18, no. 1, January 1, 2006

différentes couches. A l'inverse, le spectre en transmission, présente des « creux » à ces longueurs d'onde. Les biocapteurs basés sur le couplage entre des réseaux de Bragg et des fibres optiques observent la modification de la longueur d'onde spécifique au réseau.

D'autres types de biocapteurs sont couplés avec des cavités de Fabry-Pérot. Le concept de ce type de capteur est identique à celui présenté en II.4.2.e. La cavité de Fabry-Pérot, sensible à la présence de biomolécules peut être positionnée soit au milieu de la fibre optique (Figure 30.C) ou à son extrémité (Figure 30.D)¹⁶⁹.

Cette technique est sensible et les dispositifs créés sont portables. Ils restent encore beaucoup de champs ouverts concernant les interactions biologiques à détecter.

Quelques applications biologiques sont étudiées comme l'interaction anticorps/antigènes et la détection de bactéries¹⁶⁷.

II.2.3.9. L'utilisation des cristaux photoniques

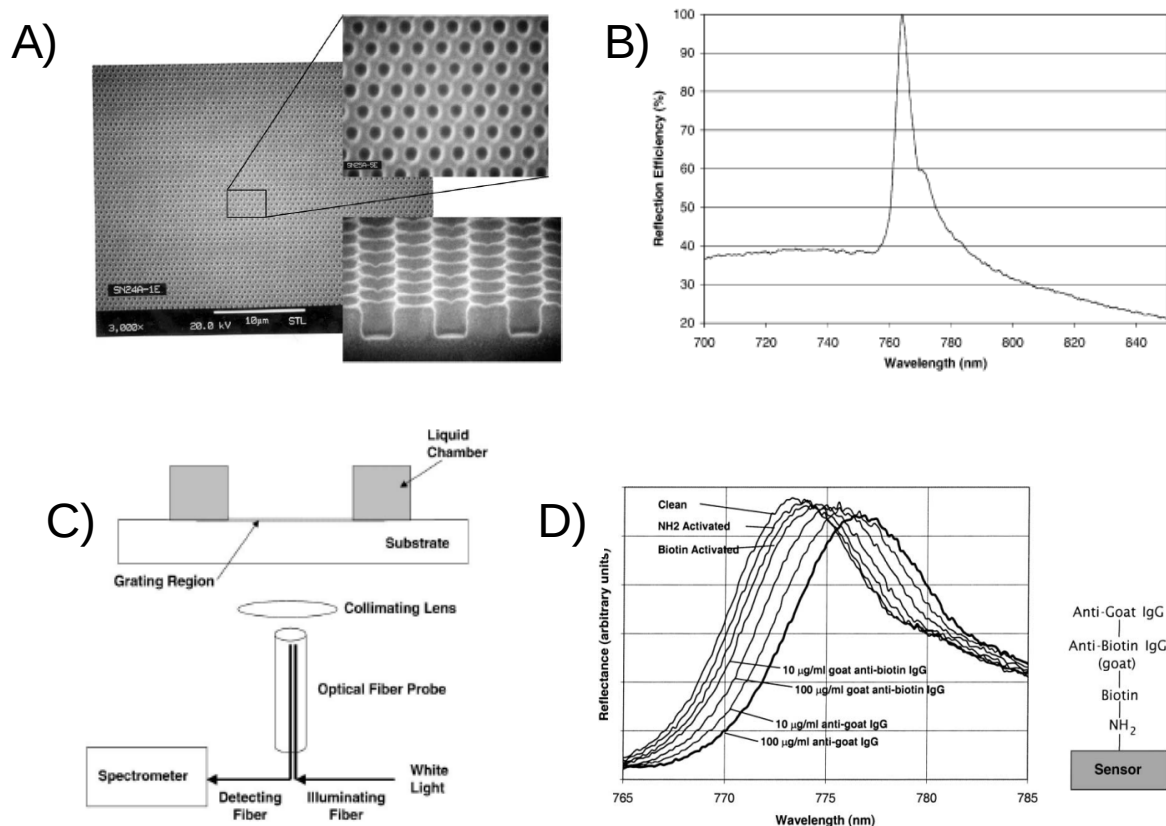


Figure 31 : A) image MEB d'un cristal photonique¹⁷⁰ B) spectre en réflexion du cristal photonique, C) dispositif expérimental permettant la mesure d'interactions biologiques D) évolution du spectre en réflexion au cours de l'interaction biologique¹⁷⁰

169 Zhang et al., Optics Letters, Vol. 30, Issue 9, pp. 1021-1023

170 Brian Cunningham et al., Sensors and Actuators B: Chemical, Volume 81, Issues 2-3, 5 January 2002, Pages 316-328

Les cristaux photoniques sont des structures périodiques à de motifs (plots, trous, ...) organisés selon une ou deux dimensions dont la période est inférieure ou proche de la longueur d'onde. Pour des longueurs d'onde particulières, les ondes lumineuses incidentes se couplent dans le cristal photonique et ainsi se propagent dans son plan. Si nous observons le spectre de réflexion d'un cristal photonique, nous remarquons un ou des « creux » à ces longueurs d'onde (Figure 31.B).

Ces dispositifs sont réalisés par des technologies Silicium (lithographie électronique) Figure 31.A.

Les biocapteurs basés sur les cristaux photoniques mesurent le décalage en longueur d'onde de ces « pics » (Figure 31.C et D)¹⁷¹ provoqués par l'adsorption de biomolécules par interaction biologique sur leur surface.

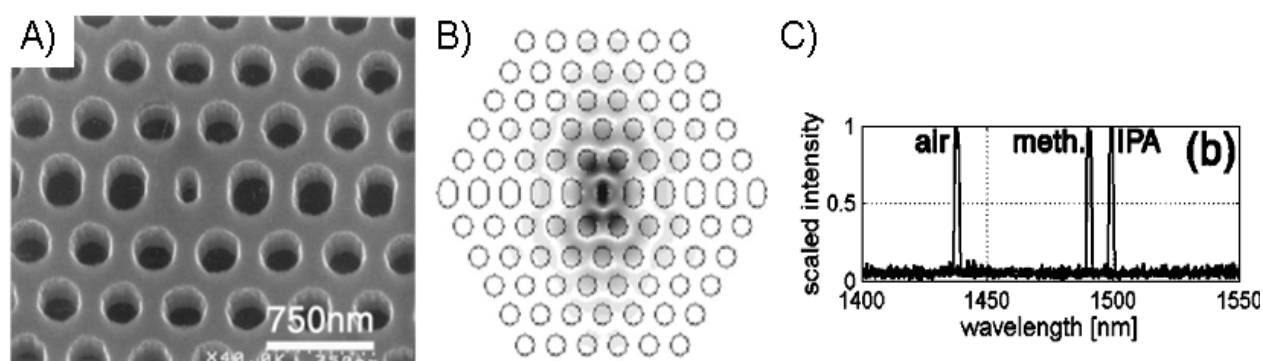


Figure 32 : A) image MEB d'un cristal photonique 2D avec un défaut au centre de l'image B) répartition simulée de l'onde électromagnétique à la surface de ce cristal photonique C) différents spectres en réflexion obtenus suivant l'indice du milieu¹⁷²

Certains dispositifs possèdent un défaut au sein de la structure périodique (Figure 32.B)¹⁷³. Il engendre un décalage de la position du pic. L'intérêt de ce type de biocapteur est que le champ électromagnétique est concentré sur le défaut (Figure 32.C) ce qui entraîne une meilleure sensibilité (Figure 32.D). Ce type de système est aussi intégré au bout d'une fibre optique¹⁷⁴ ou dans un guide d'onde¹⁷⁵ mais aussi dans des matériaux poreux (silicium poreux)^{176,177}. D'autres biodétecteurs à base de cristaux photoniques, utilisent la différence de réflectivité de ces structures selon la polarisation de la lumière incidente (s ou p) en les comparant durant l'interaction biologique¹⁷⁸.

171 P.Y. Li et al. / Sensors and Actuators B 99 (2004) 6–13

172 Loncar et al., Appl. Phys. Lett., Vol. 82, No. 26, 30 June 2003

173 Lee et al., OPTICS LETTERS / Vol. 32, No. 22 / November 15, 2007

174 Rindorf et al., Optics Express, Vol. 14, Issue 18, pp. 8224-8231

175 Skivesen et al., 19 March 2007 / Vol. 15, No. 6 / OPTICS EXPRESS 3170

176 Huimin Ouyang et al., Anal. Chem., 79 (4), 1502 -1506, 2007.

177 I.D. Block et al. / Sensors and Actuators B 120 (2006) 187–193

178 Konopsky, V. N.; Alieva, E. V. Anal. Chem.; 2007; 79(12); 4729-4735

Les avantages de cette méthode de détection résident dans sa grande sensibilité et sa miniaturisation, ce qui en fait une technique prometteuse. Par contre, il reste des développements à réaliser pour ce qui est de l'intégration fluide et des protocoles biochimiques (chimie de surface, tampon de rinçage, ...).

L'hybridation de l'ADN¹⁷⁴ ainsi que l'interaction anticorps/antigènes¹⁷⁰ sont étudiées.

II.2.3.10. L'utilisation de la spectroscopie Raman exaltée par une surface (SERS)

La spectroscopie Raman est basée sur le phénomène de diffusion Raman. Cet effet est une modification de la longueur d'onde d'un photon émis lors de l'interaction d'un photon incident avec une molécule. Cette variation provient d'une diffusion inélastique des photons, qui provoque une perte ou un gain d'énergie. Cette différence énergétique est fournie ou absorbée par des phonons, c'est-à-dire les modes de vibrations d'une molécule. Ainsi, si nous éclairons une molécule avec un rayonnement adapté en longueur d'onde, par effet Raman, nous pouvons acquérir les modes de vibrations propres de cette molécule. La spectroscopie Raman exaltée par une surface (SERS) consiste à générer localement un champ électromagnétique plus important (un point chaud) qui exalte le signal Raman.

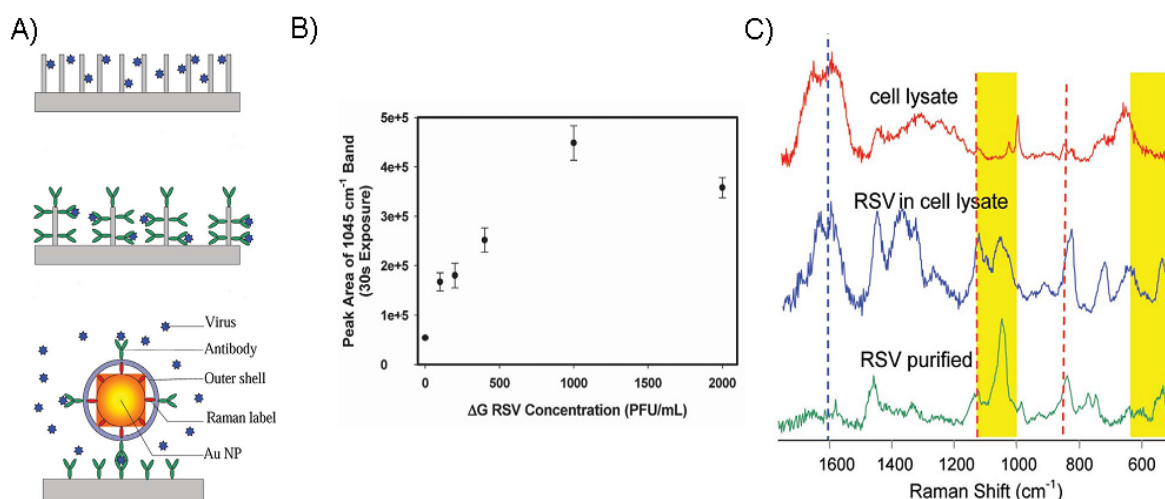


Figure 33 : A) différents exemples de surfaces nanotexturées utilisées dans des biocapteurs à effet SERS, B) évolution de l'intensité d'un des pics de la signature Raman d'un virus respiratoire (RSV) en fonction de la concentration de virus C) comparaison de différents spectre Raman¹⁷⁹

On utilise pour cela des surfaces d'or ou d'argent structurées à l'échelle nanométrique (Figure 33.A)^{180,181}.

Les biocapteurs basés sur cette technique comparent les signatures des molécules biologiques au cours de leur interaction dans les points chauds (Figure 33.B et C)^{182,183}.

Cette technique permet une acquisition de beaucoup d'informations sur les phénomènes biologiques étudiés. Par contre, sa mise en œuvre reste complexe et nécessite le développement de technologies spécifiques.

Cette méthode de détection est utilisée lors d'interaction entre protéines¹⁷⁸, de recherche de leur conformation¹⁸² ou de détection de virus¹⁷⁹.

III. Le multiplexage de la biodétection et de l'adressage : les biopuces

Les techniques de fixation d'une sonde puis de la détection de l'interaction de cette sonde avec la cible visée, décrites précédemment, sont applicables sans difficultés au format biocapteur, c'est-à-dire à l'étude de la présence ou à la mesure de la concentration d'une cible donnée en solution au cours du temps. Ce mode séquentiel qui doit être développé pour chaque cible est laborieux et long. Lorsque l'information recherchée se cantonne à la présence ou non d'une cible dans une solution, il tend à être remplacé par une détection en parallèle d'un grand nombre d'interaction cibles-sondes que permettent les systèmes de multiplexage de l'adressage de multiples sondes et de lecture en parallèle de l'accroche sur celle-ci de multiples cibles.

Ce paragraphe décrit les différentes voies de réalisation des biopuces (verrous 4 et 5) qui doivent être adaptées avec les méthodes de détection de l'accroche sonde-cible.

III.1. Les méthodes simples de réalisation des biopuces

III.1.1. Structuration par photolithographie

La méthode classique consiste à structurer une biopuce par photolithographie. Cette technique, utilisée par Affimetrix pour la réalisation de biopuce à ADN, est basée sur la

180 S. Guo, E. Wang / Journal of Colloid and Interface Science 315 (2007) 795–799

181 K. Kim et al. / Journal of Colloid and Interface Science 318 (2008) 195–201

182 Yu et al., Langmuir 2007, 23, 8659-8662

183 Shanmukh et al., Nano Lett., Vol. 6, No. 11, 2006

synthèse localisée et donc in-situ des brins d'ADN de la biopuce. L'ADN est composé d'une juxtaposition de quatre bases adénine (A), guanine (G), tyrosine (T), cytosine (C).

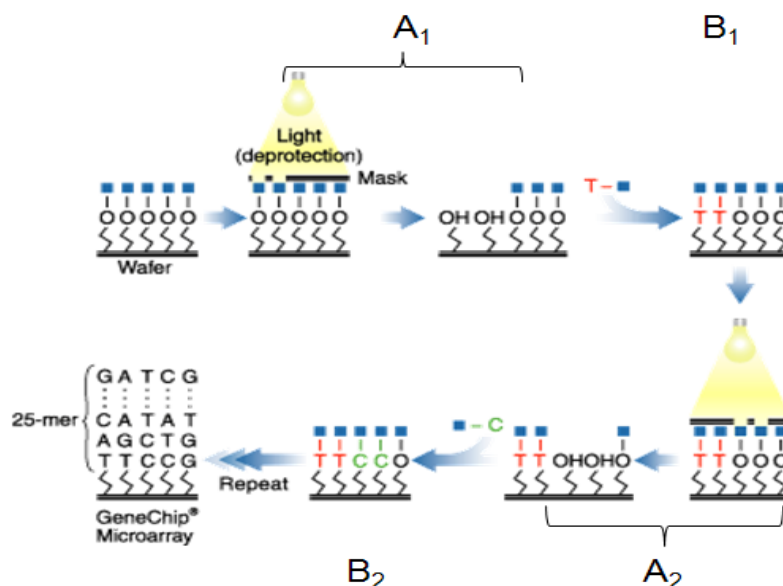


Figure 34 : schéma de principe du procédé de structuration d'une biopuce Affimetrix par photolithographie

Il est possible de créer localement un brin d'ADN en l'assemblant base par base. Pour cela, la zone du substrat, où nous souhaitons synthétiser l'ADN, est activée chimiquement, c'est-à-dire prête à réagir chimiquement, présentant des groupements hydroxyles, afin de lier une base au substrat. Cette activation est faite par illumination par un rayonnement ultraviolet localisée grâce à un masque. Ce dernier est transparent aux rayonnements UV sur les zones que nous souhaitons activer et opaque sur le reste de sa surface (étape A₁ sur la Figure 34). Cette illumination UV à travers un masque suivi de l'immersion avec la solution adéquate est une étape de photolithographie. La base, T dans l'exemple de la Figure 34, est ensuite mise en contact avec la zone activée par immersion complète dans une solution contenant la tyrosine (étape B₁). Pour réaliser l'adhésion en des points différents de la première base de chaque brin d'ADN, quatre étapes de photolithographie et donc quatre masques sont nécessaires. Pour la synthèse d'un brin d'ADN de N-mers, 4.N masques sont nécessaires ce qui engendre un coût important de fabrication de la biopuce. Par contre, la densité de molécules différentes est importante : proche de 10^6 molécules par cm^2 . Cette technique est intéressante dans le cadre d'une réalisation par synthèse in-situ des biomolécules sondes comme l'ADN mais peu judicieuse pour des protéines. Elle est le plus souvent appliquée avec des techniques de détection fluorescente.

III.1.2. Structuration par le dépôt de gouttes

Une autre technique permettant de déposer localement les biomolécules sondes sur une surface est le dépôt de gouttes. Dans cette configuration, les biomolécules sont déjà synthétisées entièrement dans une solution dont nous prélevons une goutte qui est ensuite déposée sur la surface de la biopuce. Plusieurs méthodes de dépôts de ces gouttes sont proposées.

III.1.2.1. Par aiguilles

Une des techniques permettant le dépôt de goutte est d'utiliser des aiguilles métalliques. Celles-ci ont différentes formes et une taille millimétrique (Figure 35.A). Un réservoir plus ou moins grand ainsi qu'un canal fluidique est intégré dans l'aiguille (Figure 35.C). Les aiguilles sont disposées sur un automate (Figure 35.B) de manière à ce que l'espacement entre elles corresponde à celui entre les puits d'une microplaque de titration. Le procédé de dépôt se décompose en cinq étapes :

1. remplissage des aiguilles en les plaçant dans les puits de la microplaque.
2. premiers dépôts non utiles dont l'objectif est d'évacuer les gouttes parasites créées par le mouillage de leur surface extérieure
3. dépôts suivants sur les substrats à structurer (généralement des lames de verre)
4. nettoyage des aiguilles
5. séchage du substrat

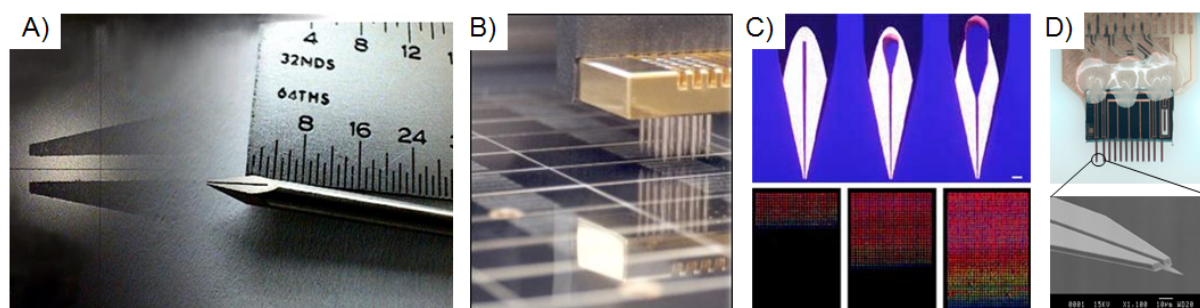


Figure 35 : A) photographie d'une aiguille utilisée pour un dépôt B) photographie d'un automate de dépôt de gouttes composé d'aiguille métalliques, C) aiguilles avec trois réservoirs différents avec la quantité de dépôts réalisés D) développement d'aiguilles nanométriques

L'étape 2 est une succession de dépôts sans remplissage entre eux. La Figure 35.C montre le nombre de dépôts qu'il est possible de réaliser avec un seul remplissage. Ces dépôts

dépendent de la taille du réservoir. Le diamètre des dépôts réalisés avec cette technique est de 50µm et leur densité inférieure à 10000 dépôts par puce. Des automates comportant des aiguilles nanométriques réalisées par des technologies silicium sont en cours de développement¹⁸⁴ pour augmenter cette densité.

La détection de l'accroche se fait généralement par marquage fluorescent des cibles.

III.1.2.2. Par jet d'encre

Cette technique s'inspire de celle utilisée dans les imprimantes couleurs. Son principe présenté sur la Figure 36 est appliqué à la réalisation in-situ d'une biopuce à ADN.

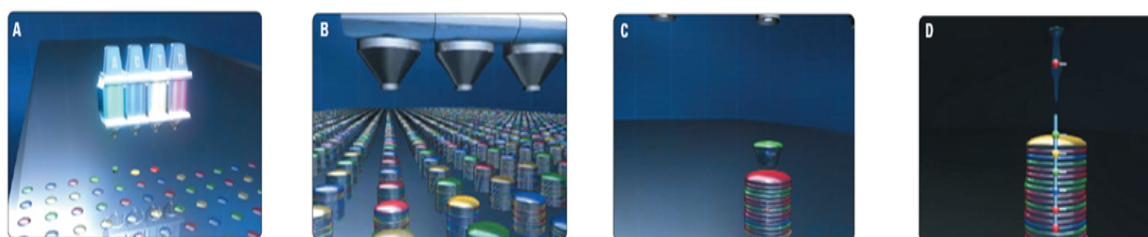


Figure 36 : schéma de principe de la réalisation d'une biopuce ADN par la technique du jet d'encre. A) dépôts de la première base des différents oligonucléotides, B) dépôts des bases suivantes C) dépôt d'une base sur un oligonucléotide représenté en D)¹⁸⁵

On place les quatre bases A,T,G,C (couleurs) dans un réservoir qui surmonte une buse (Figure 36.A). On dépose la base souhaitée sur les régions sélectionnées puis successivement la 2^{ème}, 3^{ème}, 4^{ème}, La Figure 36.A représente le premier passage permettant le dépôt de la première base d'oligonucléotides. La N^{ième} base est déposée lors du N^{ième} passage de la buse (Figure 36.B, C et D).

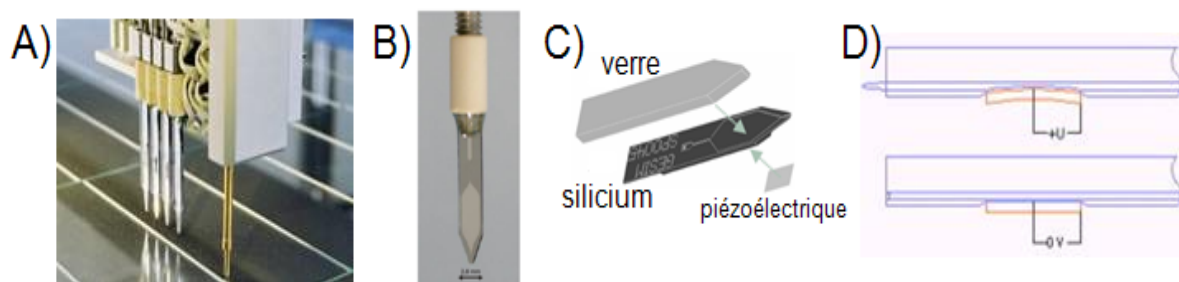


Figure 37 : A) photographie d'un automate de dépôt par jet d'encre, B) photographie d'une buse utilisée par l'automate C) schéma des différents constituants de la buse D) principe de l'activation du dépôt par application d'une tension¹⁸⁶

184 T. Leichle et al., Sensors and Actuators A, vol.132, nb. 2, pp.590-596, 2006.

185 www.agilent.com

186 www.gesim.de

La structure des buses est développée grâce aux technologies silicium (Figure 37.C). Le jet d'une goutte de la solution à déposer est réalisé par l'application d'une tension. Celle-ci engendre une déformation de la partie piézoélectrique intégrée sur la buse (Figure 37.D). La pression dans le réservoir augmente et entraîne l'évacuation d'une partie de la solution.

Des automates permettent aussi un dépôt de gouttes contenant les biomolécules déjà synthétisées (Figure 37.A).

III.1.2.3. Par un système fluide discret en PDMS

Une étude récente¹⁸⁷ propose différents dispositifs de dépôts basés sur des canaux fluidiques réalisés en PDMS. Leur principe consiste à alimenter des canaux par des réservoirs (Figure 38.A). Cinquante dépôts sont réalisés sans avoir à réalimenter les réservoirs et ont un diamètre de 100µm.

Deux autres types de systèmes sont présentés (type A et type B de la Figure 38.C). Chacun d'eux permet le dépôt de 36 biomolécules différentes. Le type A est composé de canaux verticaux remplis par la face arrière (Figure 38.C.a). La face du dispositif en contact avec le substrat est similaire à celle présentée précédemment (Figure 38.C.b). Un dispositif en SU8 de microfluidique permet de remplir chacun des canaux. Le type B est un ensemble de plots (Figure 38.C.c) remplis grâce à un ensemble de réservoirs réalisés en SU8.

Les dépôts de chacun de ces dispositifs sont réalisés en milieu liquide donc il n'y a pas d'étape de séchage intégrée dans le procédé.

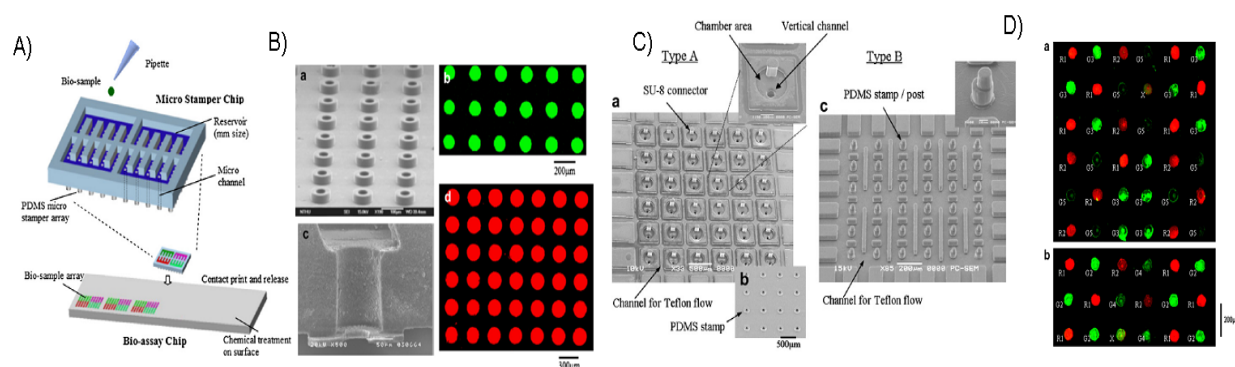


Figure 38 :A) schéma de principe, B) image MEB et résultats en fluorescence (anticorps fluorescents) d'un système de dépôt de quatre à dix biomolécules différentes C) images MEB de deux types de système permettant de déposer 36 biomolécules différentes en une seule étape¹⁸⁸. Nous observons en C.a les réservoirs du dispositif du type A et la face du dispositif qui va être en contact avec la surface du type A en C.b et du type B en C.c. D) résultats en fluorescence d'un dépôt d'anticorps fluorescents avec le dispositif de type B.

187 Ho et al., . journal of microelectromechanical systems, vol. 17, no. 2, april 2008

188 Cheng-En Ho et al., Journal of the Association for Laboratory Automation, Volume 13, Issue 4, 2008, 187-197

Dans le cadre de l'utilisation de canaux, l'étude met en évidence l'avantage du contact conforme du PDMS qui définit parfaitement les motifs du fait de l'herméticité du contact (Figure 38.B). Par contre, l'utilisation de plots engendre des dépôts moins homogènes (Figure 38.D).

Ces auteurs appliquent cette méthode au dépôt d'anticorps fluorescents. La taille des motifs obtenus est de 100µm. Pour le moment, cette technique n'est appliquée qu'à la détection par fluorescence.

III.1.3. Structuration par une microfluidique à jet continu

Une autre technique récemment proposée, appelée le dépôt par flux continu consiste à réaliser un système microfluidique dans lequel circule la solution d'intérêt. Pour cela, des entrées et des sorties pour les fluides millimétriques (Figure 39.A) sont connectés à divers niveaux de canaux fluidiques micrométriques (section carrée de 400µm de côté). L'extrémité inférieure de ces canaux est « percée » de telle façon que, lorsque le substrat rentre en contact avec le système, un dépôt apparaît au niveau de la fuite (Figure 39.B). Le dispositif développé permet de déposer 48 molécules différentes en une seule étape. L'absence de contamination entre les dépôts est démontrée et due à la réalisation du dispositif à base de PDMS qui assure une bonne étanchéité. Les dépôts sont donc des carrés de 400µm de côté espacé de 875µm ce qui conduit à une densité de 93 biomolécules différentes par cm².

Une comparaison entre cette technique (surnommée CFM) et celle de dépôt avec des aiguilles montre l'intérêt de la technique CFM. En effet, pour de faibles concentrations de protéine A déposée par CFM ou avec des aiguilles, le signal SPR de l'interaction entre la protéine A et un anticorps bovin est plus important lors de l'utilisation de la CFM (Figure 39.C). Les auteurs attribuent ce résultat à une meilleure organisation des biomolécules sondes grâce au flux mais aussi à une étape de rinçage qui permet une désorption des molécules adsorbées non spécifiquement. Ainsi, des concentrations plus faibles peuvent être utilisées ce qui engendre une réduction des coûts de fabrication de la biopuce. Enfin, en comparant la forme des motifs réalisés par CFM avec celle par aiguilles, une nette différence d'homogénéité est observée en faveur de la technique CFM (Figure 39.D).

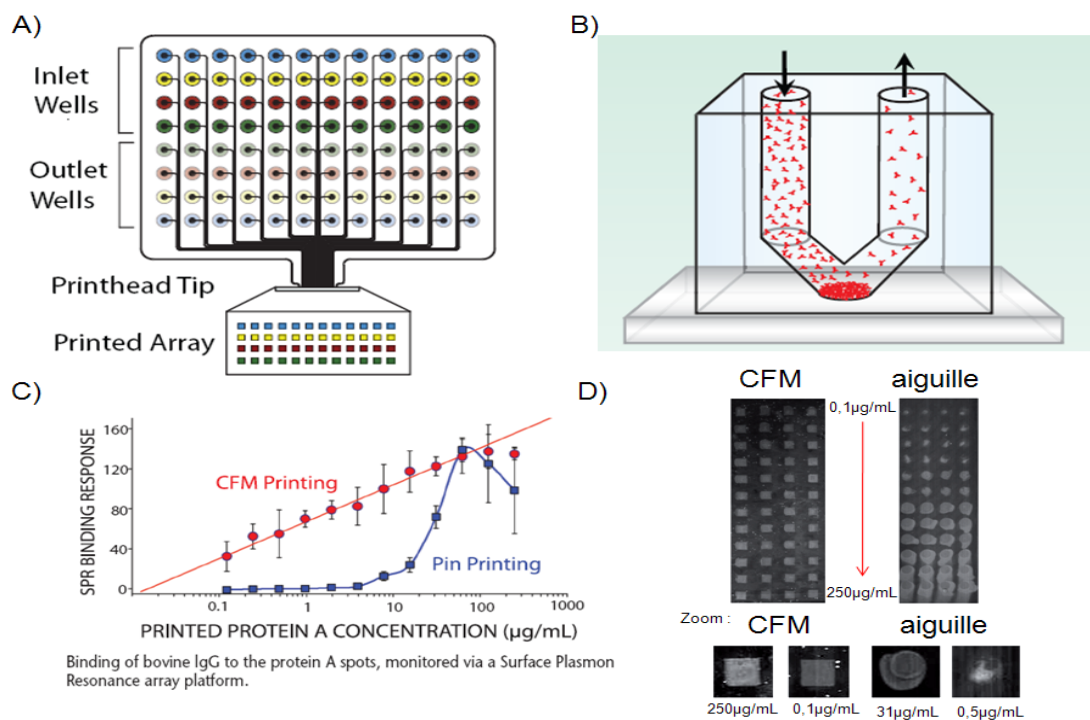


Figure 39 : A) schéma du dispositif de dépôt par flux continu B) schéma de principe du dépôt par flux continu C) comparaison entre cette technologie et celle à aiguille D) comparaison de l'homogénéité des dépôts réalisés par CFM ou par aiguilles¹⁸⁹

III.1.4. Structuration par tamponnage moléculaire

La technique du tamponnage moléculaire (*micro contact printing* : μCP) est intéressante, car peu onéreuse, pour la structuration d'une biopuce sonde. Son principe consiste à encre un tampon en PDMS dans la solution de biomolécules ou de sondes puis à l'appliquer sur le substrat.

D'ailleurs, cette technique est utilisée pour la synthèse in-situ de biopuce ADN comme par jet d'encre. De manière similaire la synthèse des oligonucléotides est réalisée base par base. Par contre la méthode de dépôt est celle du tamponnage moléculaire. Elle présente l'avantage de déposer parallèlement les premières bases identiques contrairement à la méthode par jet d'encre qui est plutôt séquentielle donc plus consommatrice en temps. Cependant l'utilisation du micro contact printing engendre la génération de quatre masques par base. Ainsi, cette méthode présente encore l'inconvénient de la technique par photolithographie qui est la fabrication d'un grand nombre de masques pour synthétiser in-situ une biopuce à ADN¹⁹⁰.

¹⁸⁹ <http://www.microfl.com/>

¹⁹⁰ PF Xiao et al., Nanotechnology 13, pp.756–762, 2002.

Des automates sont développés pour le dépôt par tamponnage biomoléculaire. L'entreprise GESIM utilise un timbre très fin en forme de membrane (Figure 40.A et B). Le dépôt s'effectue en déformant la membrane sous l'application d'une pression. Elle rentre en contact avec le substrat et transfère les biomolécules sur la surface^{191,192}(Figure 40.C). Cependant une seule biomolécule est déposée par chaque timbre.



Figure 40 : A) image du timbre utilisé pour le tamponnage moléculaire, B) automate (GESIM) de dépôt par micro contact printing, C) schéma du principe du tamponnage par une membrane soumise à une pression (0.2 bar)

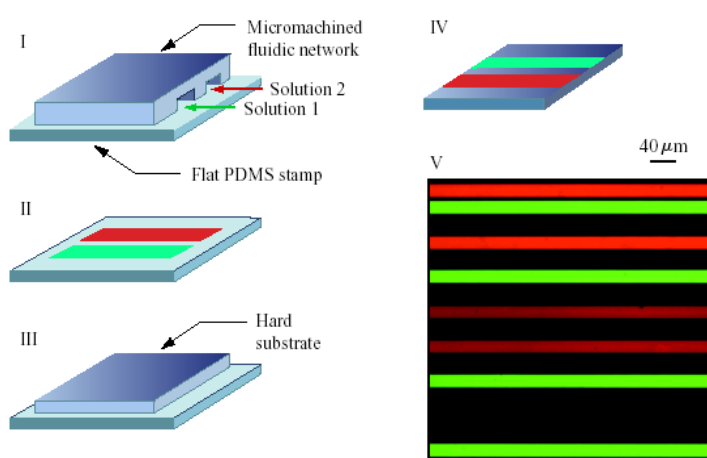


Figure 41 :I-IV) schéma de principe du protocole permettant le dépôt par tamponnage moléculaire de plusieurs biomolécules avec un seul timbre V) image en fluorescence résultant du dépôt réalisé avec le protocole détaillé dans les étapes I à IV¹⁹³

Pour remédier à ce problème B.Michel et al développe cette technique de dépôt couplée avec des systèmes microfluidiques. Elle permet de déposer plusieurs biomolécules avec un seul timbre. Pour cela, des microcanaux alimentés par les diverses biomolécules les localisent sur le timbre en PDMS plat (étapes I et II sur la Figure 41). Ensuite ce timbre est

191 Deutsche Patentanmeldung Nr. 10 2007 029 078.2 , DPA München 2007

192 http://www.gesim.de/front_content.php?idcat=139&lang=2

193 B.Michel et al., ibm j. res. & dev. vol. 45 no. 5 september 2001

mis en contact avec le substrat puis retiré (étapes III et IV sur la Figure 41). Les motifs déposés sont donc des lignes composées des différentes biomolécules injectées dans les canaux (V sur la Figure 41).

Cependant cette technique n'a pas encore été implantée et adaptée aux plateformes biopuces.

III.2. Les méthodes complexes de réalisation de biopuces

Comme nous l'avons indiqué dans l'introduction de ce paragraphe III, la méthode de réalisation d'une biopuce ne doit pas être décorrélée de celle qui détecte l'interaction.

Si une biopuce est réalisée par les techniques simples détaillées en III.1, la détection par fluorophores, interférométrie, réflectométrie, SPR, et possible comme le montrent divers travaux. Par contre la détection par guide d'onde, anneaux résonnant, fibre optique, micro poutres, cristaux photoniques, effet SERS exige l'utilisation de techniques de multiplexage spécifiques et beaucoup plus complexes. Afin d'alléger ce chapitre, nous avons réuni l'ensemble des travaux sur ces domaines en annexe I.

Nous pouvons simplement noter que ces techniques sont onéreuses car elles font souvent appel à la lithographie. La taille des motifs est grande et leur forme compliquée. On n'atteint pas à l'heure actuelle des densités d'intégration élevées.

III.3. Une solution astucieuse : le codage

Le concept de codage se développe de plus en plus. L'idée principale est de combiner la détection par fluorescence, l'accroche des cibles avec le marquage d'une multitude de sondes qui sont repérées par un code barre. Cette méthode permet de reconnaître astucieusement le type de l'interaction biologique. Ce concept se rapproche de celui du code barre qui permet de détecter la sonde (article) en identifiant son code représenté par des lignes de largeurs différentes liées à la cible (le client qui le tient) et de lui associer l'interaction (prix).

Ce concept combine la détection par fluorophore des cibles et celui du codage par fluorescence du support des sondes par boîtes quantiques. Dans le cas précis développé par illumina une bille de latex est « codée » grâce à différentes boîtes quantiques (en variant leur nature, diamètre et concentration par exemple). On greffe ensuite sur chacune de ces micro particules une sonde différente par immersion dans ces solutions et on associe donc à chaque

code un type de sonde caractérisée par son spectre de luminescence. Ces diverses microparticules isolées des solutions qui fixent les sondes sont mélangées puis réparties sur un substrat. Ce dernier est placé en contact avec la solution qui contient une cible. Il y a fixation des cibles sur les sondes adaptées. La détection du spectre de fluorescence de la cible puis du code de la sonde sur laquelle elle est fixée, identifie l'interaction.

La détection immunologique est développée avec deux boîtes quantiques¹⁹⁴. Un calcul sommaire dégage le gros avantage de cette méthode. En observant uniquement l'émission et en ayant une échelle d'intensité binaire (1 : la longueur d'onde est émise, 0 : elle ne l'est pas), le nombre de codes réalisables avec N boîtes quantiques est de 2^N . Avec une échelle d'intensité de N_v niveaux, le nombre de code est de N_v^N . Par contre, le spectre d'émission varie selon la longueur d'onde d'excitation. Ainsi, avec N_{ex} longueur d'onde d'excitation, un nombre de boîtes quantiques N et la prise en compte des niveaux d'intensité N_v , il est possible de réaliser un nombre très important de codes $N_{ex} \cdot N_v^N$.^{195,196}

Des systèmes similaires sont réalisés à base de billes micrométriques codées par des séquences d'ADN fluorescent^{197,198,199} ou par leur taille et la décroissance de leur fluorescence²⁰⁰.

Des variantes permettent de réaliser l'interaction sonde-cible en solution avant les fixations des micro billes sur un substrat ce qui confère à cette méthode un champ colossal d'application avec une cinétique d'interaction élevée.

194 Hai-Qiao et al. Journal of Colloid and Interface Science, Volume 316, Issue 2, 15 December 2007, Pages 622-627

195 Ming Zhou et al. Optics Express, Vol. 12, Issue 13, pp. 2925-2931

196 M. HAN et al., Nature Biotechnology, 19, pp.631-635, 2001

197 Jens Hrachet al. Toxicology Letters, Volume 172, Supplement 1, 7 October 2007, Page S80

198 Jian-Bing Fan, et al. Methods in Enzymology, Volume 410, 2006, Pages 57-73

199 <http://www.illumina.com>

200 Christoph Moser, Torsten Mayr, Ingo Klimant Analytica Chimica Acta, Volume 558, Issues 1-2, 3 February 2006, Pages 102-109

IV. Qualité et défauts des techniques de biodétection développées

Comme nous l'avons mentionné dans l'introduction à ce travail de doctorat, les communautés de médecins, biologistes, pharmaciens, les corps de santé, de sécurité et se préoccupant de la qualité de l'environnement recherchent des techniques de détection et d'analyse de biomolécules qui présentent sept caractères majeurs :

- non perturbante des propriétés naturelles des biomolécules donc sans marquage
- ayant une faible limite de détection, grandeur qui représente la plus petite quantité de cibles détectable par le système, c'est-à-dire générant une variation du signal significative
- très sensible. La sensibilité est définie par la dérivée de la fonction signal rapportée à la variation biologique choisie qui, comme on le verra, est très diversifiée.
- présentant des potentialités pour fonctionner en mode biocapteur et surtout en mode biopuce.
- fournissant une très grande quantité d'informations, donc à grande densité d'intégration et de détection
- rapide.
- démocratisable grâce à un coût très faible

Afin de comparer sur ces sept points les potentialités des diverses techniques de biodétection optique, présentées précédemment, nous nous sommes proposés de construire le Tableau 1 ci-dessous. Nous avons très vite constaté que l'analyse des données fournies par la littérature est difficile car les unités utilisées pour quantifier par exemple leur limite de détection des cibles sont très diverses. Ce sont soit les moles ou les grammes (la masse) pour les biomolécules, ou le CFU (colonies forming unit) pour les bactéries viables pouvant générer une colonie, ou le PFU (plaques forming units : plus petit groupe de virus pathogènes) pour les virus ou le nombre de cibles pour les cellules et les spores. De plus, ces quantités sont, soit normalisées par rapport au volume de solution dans laquelle elles se situent (L ou mL) ou à la surface du dispositif utilisée pour piéger les cibles (m^2 ou mm^2). Elles dépendent en fait des biomolécules et des champs disciplinaires auxquels sont rattachés les chercheurs qui les publient. La sensibilité est aussi exprimée en variation du signal rapporté soit aux variations de concentration, soit de masse, soit d'indice, soit d'épaisseur... Elle dépend aussi de l'espèce et est rarement donnée.

Nous remarquons que la technique la plus efficace pour la détection d'ADN est l'interférométrie (2 pM) alors que pour les virus c'est l'effet SERS (10 pfu/mL). Pour les bactéries, la résonance plasmonique de surface et les anneaux résonants sont les plus efficaces (100 cfu/mL). Enfin pour les protéines, les unités étant très variées nous comparons les techniques dont les unités sont équivalentes. Ainsi, les guides d'ondes sont le meilleur choix avec une concentration massique de 0.1 pg/mL, alors que les anneaux résonnants sont les plus efficaces pour une concentration molaire de 3 pM. Enfin, avec une concentration surfacique de 0.4 pg/mm², les cristaux photoniques sont les mieux adaptés.

<i>technique utilisée</i>	<i>interaction biologique</i>	<i>limite de détection</i>
fluorescence	ADN	-
Interférométrie	protéine protéine ADN ADN Virus bactérie	0.1ng/mL femto-mole 4ng/mL 2pM 1000pfu/mL 5.10 ⁸ cfu/mL
réflectométrie	protéine ADN	0.5μM -
ellipsométrie	protéine	0.25 ng/mm ²
Résonnance des plasmons de surface	protéine ADN bactéries	0.2nM 10pM 100cfu/mL
guide d'onde	protéine DNA cellule spore	0.1pg/mL 60μM 10 cellule/mm ² 10 ⁵ spore/mL
anneau résonnant	ADN ADN protéine protéine Virus bactérie	1pg/mL 10pM 3pM 1 pg/mm ² 1000pfu/mL 100cfu/mL
fibre optique	ADN protéine	0.1μM 0.5μg/mL
cristaux photoniques	protéine protéine protéine	0.4 pg/mm² 1 fg 0.15μM
SERS	protéine bactérie Virus	- - 100 pfu/mL

*Tableau 1 : synthèses des limites de détections des méthodes optiques sans marquage.
Les techniques appliquées à certaines bioentités dont la limite de détection n'est pas inscrite dans ce tableau, ont fait l'objet d'une démonstration de faisabilité mais pas d'étude en concentration.*

L'examen de ce tableau montre qu'il est difficile de comparer quantitativement les biodispositifs proposés entre eux du fait de cette disparité dans les unités employées.

De plus l'information recueillie est différente suivant le mode de fonctionnement. En mode biocapteur l'information recueillie est l'évolution de l'interaction au cours du temps (la cinétique de réaction) alors qu'en mode biopuce, nous nous intéressons uniquement à la comparaison entre les états initial et final.

La densité de tests réalisés correspond aux nombres d'interactions cible-sonde réalisées pour un biodispositif. Ce paramètre est primordial car il agit sur le coût de la réalisation d'un test. Pour des applications nécessitant l'étude d'un grand nombre d'interactions, cette valeur est essentielle.

Face à ces difficultés nous avons choisi de privilégier la construction d'un tableau qualitatif (*Tableau 2*). La limite de détection est qualifiée par très faible, faible, moyenne élevée.

Le sigle © signale un dispositif déjà commercialisé.

Parmi toutes ces techniques de biodétection optiques, quelques unes ont été adaptées au format biopuce qui permet de tester un grand nombre d'interactions. Ce sont la résonance des plasmons de surface, l'interférométrie, l'effet SERS, la réflectométrie, les guides d'onde, les anneaux résonnants et les cristaux photoniques. Des fiches récapitulatives présentent en annexe I le fonctionnement de ces différentes biopuces optiques sans marquage proposées par le marché.

Les densités de tests sont évaluées comme :

- faible : moins de 100 tests par dispositif
- moyenne : moins de 1000 tests par dispositif
- élevée : moins de 10000 tests par dispositif
- très élevée : supérieure à 10000 tests par dispositif

Le coût est qualifié par faible, moyen élevé. L'examen de ce deuxième tableau démontre que les systèmes proposés ne vérifient pas simultanément toutes les attentes en termes de marquage, sensibilité, format, densité, coût. C'est pourquoi notre travail s'est focalisé sur la technique de détection par diffraction proposée par quelques auteurs il y a une décennie et son couplage avec la réalisation de réseaux par la technique à bas coût de tamponnage moléculaire.

Tableau 2 : comparaison qualitative des techniques de biodétection optique

<i>Dispositifs de détection</i>	<i>Marquage</i>	<i>Limite de détection</i>	<i>Biocapteur</i>	<i>Biopuce</i>	<i>Densités des tests réalisés</i>	<i>Le coût</i>
Fluorophores	oui	Très faible	Rare / R&D	©	très élevé	faible
Quantum dots	oui	Très faible	Rare / R&D	Rare / R&D	-	-
Billes magnétiques	oui	Très faible	Rare / R&D	Rare / R&D	Faible	-
Microbalance à quartz	non	faible	©	Non	Faible	-
Micro poutre	non	Très faible	R&D	R&D	Moyenne	-
Electrodes interdigitées	non	Très faible	R&D	rare	Faible	-
Capteurs à effet de champs	non	Très faible	R&D	rare	Faible	-
fluorescence	non	faible	rare	rare	-	-
Interférométrie	non	faible	R&D	©	moyenne	élevé
Réflexométrie	non	élevée	R&D	©	Faible	élevé
Ellipsométrie	non	Moyenne	rare	rare	Faible	-
Résonance des plasmons de surface	non	Moyenne	R&D	©	moyenne	élevé
Guide d'onde	non	Faible	©	©	moyenne	élevé
Anneau résonnant	non	Faible	R&D	©	Faible	élevé
Fibre optique	non	Faible	R&D	R&D	Faible	-
Cristaux photoniques	non	Faible	R&D	©	Elevée	élevé
SERS	non	Faible	R&D	©	moyenne	élevé
Attente	non	Très faible	-	©	Elevée	faible

V. Le potentiel de la détection par diffraction couplé au tamponnage moléculaire

Le principe de la diffraction de la lumière par une structure périodique est bien connu. Un réseau à une dimension transforme, en effet, une onde plane monochromatique incidente en un faisceau réfléchi (suivant les lois classiques de la réflexion $\theta_i = \theta_r$) et en des faisceaux diffractés suivant des ordres caractérisés par des angles d'émergence différents (Figure 42). Comme l'amplitude de ces ordres dépend de ses dimensions (période p , largeur l et hauteur h des lignes), toute modification de ses paramètres par piégeage sur lui de cibles modifiera sa réponse lumineuse. Les réseaux de diffraction semblent a priori adaptés à la biodétection sans marquage.

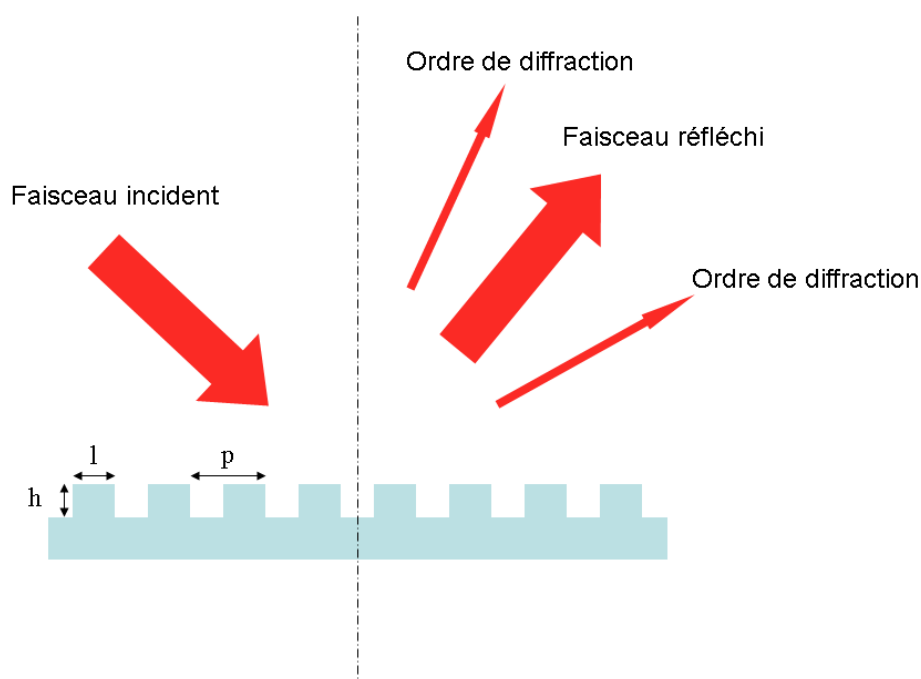


Figure 42 : principe de la diffraction par un réseau

V.1. Des travaux préliminaires sont encourageants

En 1991, Tsay et al.²⁰¹ démontrent que la diffraction permet la biodétection. Pour cela, ils transforment une couche homogène d'anticorps initialement actifs en lignes d'anticorps actifs et inactifs. L'inactivation a lieu par l'illumination avec un rayonnement ultraviolet à travers un masque (Figure 43). Un capteur sur l'ordre 1 mesure l'intensité d'un faisceau

201Y. G. Tsay, et al., CLIN.CHEM.37/9, 1502-1505 (1991)

diffracté par le réseau avant puis après interaction avec son antigène. Lorsque le réseau d'antigènes se forme, ils observent un signal de diffraction.

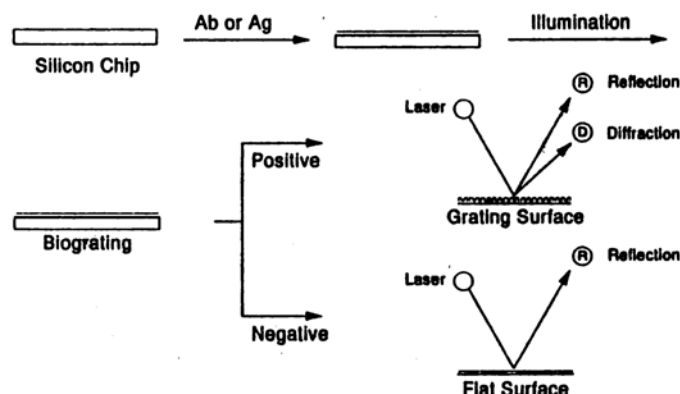


Figure 43 : principe de la biodétection optique développée par Tsay et al.²⁰¹

Comme cette technique basée sur une étape de photolithographie est coûteuse, St. John et al.²⁰², Morhard et al. et Fiori et al. proposent d'utiliser la technique tamponnage moléculaire (*micro contact printing*)²⁰³ pour réaliser les lignes de biomolécules sondes. Ils reviennent donc au principe classique d'un réseau de sondes diffractant suivi d'un piégeage sur lui de cibles.

En 2000, Morhard et al.²⁰⁴ étudient la possibilité de détecter par diffraction 10^6 bactéries *Escherichia Coli* par mL et de suivre leur cinétique d'adsorption (Figure 44.A).

En 2004, Fiori et al. proposent des capteurs basés sur la diffraction capables de détecter la cinétique de dégradation d'un réseau d'anticorps (de souris) par une enzyme, la trypsine²⁰⁵ (Figure 44.B).

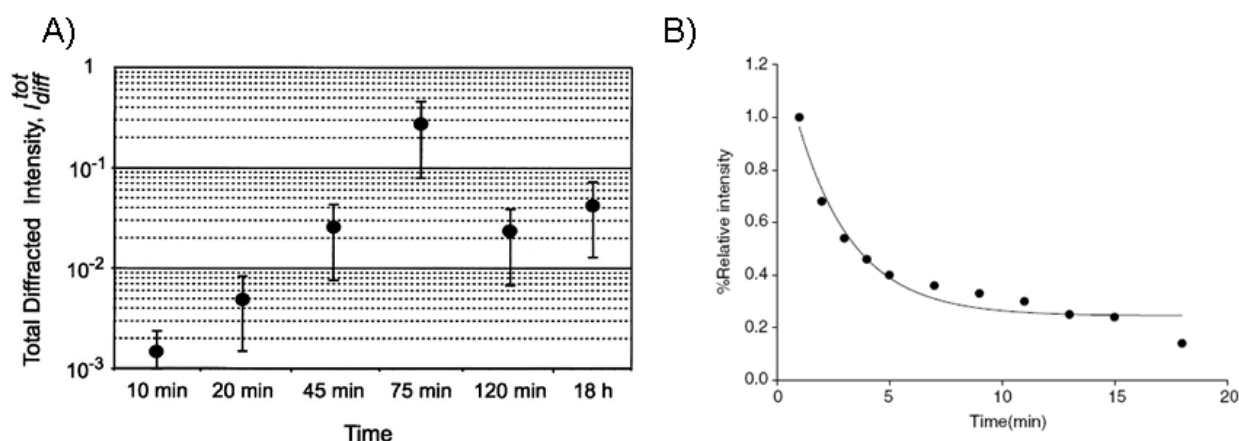


Figure 44 : évolution du signal diffractif A) lors de l'adsorption spécifique de bactéries *E.Coli* sur un réseau diffractif d'anticorps anti-*E.Coli*²⁰⁴ B) lors de l'activité enzymatique de la trypsine sur un réseau d'anticorps²⁰⁵

202 St John et al., Anal. Chem. 1998, 70, 1108-1111

203 A. Kumar et al., Appl. Phys. Lett., 63, pp. 2002-2004, 1993.

204 F. Morhard et al. Sensors and Actuators B 70(2000)232-242

205 Fiori et al., Anal Bioanal Chem. 2004 Sep;380(2):339-42. 2004

En 2005, Goh et al. démontrent qu'il est possible de détecter et de suivre en temps réel l'interaction entre des anticorps de souris et de lapins avec des sondes, composant des réseaux, des anticorps anti-souris et anti-lapin avec des concentrations en solution aussi faibles que 2.5µg/mL (Figure 45)^{206,207}.

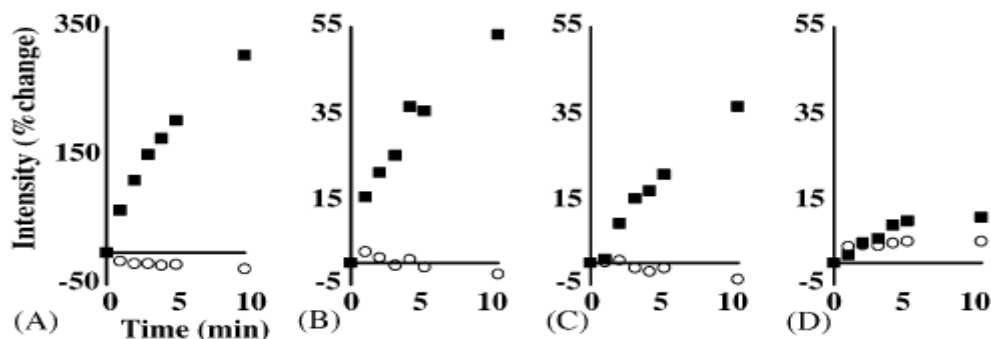


Figure 45 : évolution de signaux diffractifs suite à l'incubation d'une solution à (A) 50µg/mL, (B) 10µg/mL, (C) 5µg/mL et (D) 2.5µg/mL d'anticorps anti-souris sur le réseau d'anticorps de (■) souris et (○) lapin.²⁰⁷

Le dispositif de mesure qui assure le suivi de la cinétique est plus astucieux et plus complexe. Le réseau de biomolécules sondes est disposé sur la face inférieure d'une lame de verre qui délimite une cellule microfluidique. L'éclairement du réseau et la détection du spectre de diffraction sont réalisés avec un prisme qui permet une exaltation du signal (Figure 46.A).

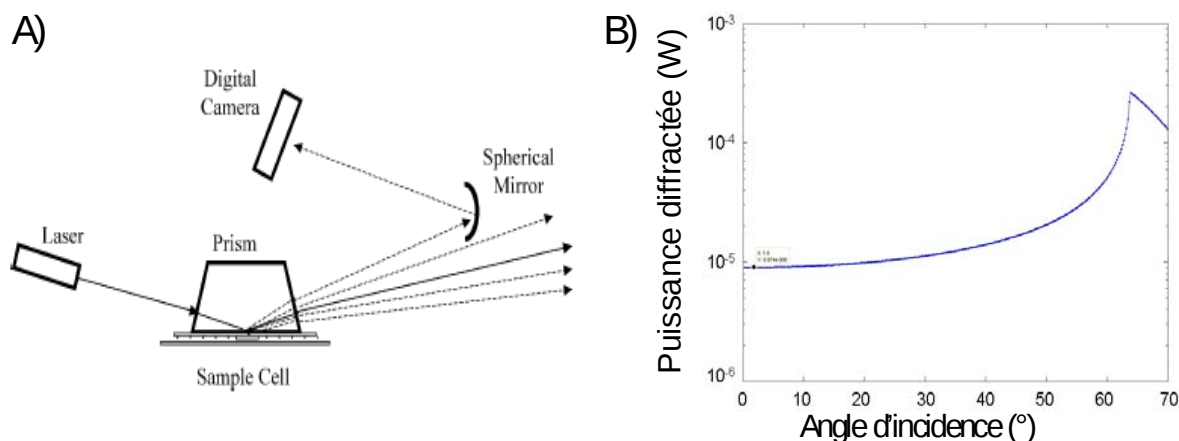


Figure 46 : A) schéma du dispositif utilisé pour exalter la diffraction du réseau biomoléculaire B) simulation d'un réseau illuminé par un faisceau (1W) sur sa face arrière avec un angle d'incidence variable (simulation réalisée avec notre modèle développé dans le chapitre II)

En effet, le maximum d'intensité lumineuse diffractée par un réseau biomoléculaire éclairé sur sa face arrière a lieu lorsque le rayonnement qui se propage dans la lame de verre fait un angle de 60° avec sa normale (Figure 46.B) car à cet angle, le rayonnement est en réflexion totale interne. Il ne peut donc pas être transmis par

206 J.B. Goh et al. / Analytical Biochemistry 313 (2003) 262–266
207 J.B. Goh et al. / Sensors and Actuators B 106 (2005) 243–248

la lame de verre et est totalement réfléchi. Comme il n'est pas possible de coupler la lumière arrivant dans l'air pour qu'elle ait une telle incidence sur la face inférieure de la lame de verre sans faire appel à un prisme, le dispositif utilise un prisme qui amène l'onde lumineuse en réflexion totale interne sur l'interface verre-réseau.

Toujours en 2005, Goh et al., pour augmenter le nombre de molécules testées, proposent d'utiliser, deux réseaux croisés et superposés l'un sur l'autre. Ainsi, les figures de diffraction de chacun des réseaux sont perpendiculaires (Figure 47). Il est donc possible de quantifier la diffraction de chaque réseau. Cette étape est réalisée au moment du tamponnage moléculaire. Les auteurs démontrent qu'il est possible de réaliser l'interaction entre deux anticorps en déposant sur le premier réseau l'anticorps sonde et sur le deuxième une molécule sonde non spécifique (par exemple de la BSA). Par cet artifice, ils acquièrent les deux signaux d'interaction spécifique et non spécifique en même temps.

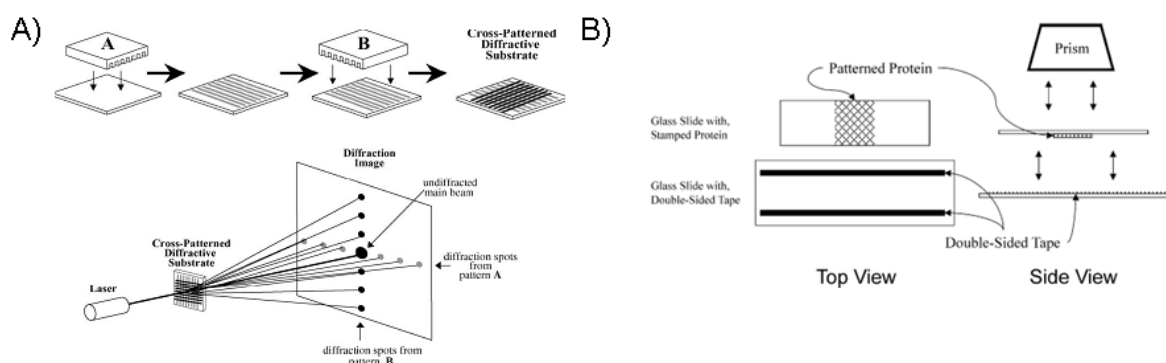


Figure 47 : A) schéma du procédé de réalisation de deux réseaux biomoléculaires perpendiculaires et superposés et la figure de diffraction résultante B) schéma du dispositif final utilisé

Ces dispositifs qui présentent encore des limites de détection élevées par rapport aux techniques sans marquage déjà développées, proches de 2.5 $\mu\text{g/mL}$ pour des interactions entre deux anticorps, sont commercialisés et utilisés sous la forme de biocapteurs pour différentes biodétections (DOTlab system²⁰⁸).

Des travaux expérimentaux montrent aussi qu'il est possible d'exalter le signal diffracté en couplant la diffraction avec des phénomènes déjà décrits comme les plasmons de surface²⁰⁹ ou les ondes de surface de Bloch²¹⁰.

Des dispositifs microfluidiques diffractants sont aussi proposés. Leur concept est de faire diffracter des canaux où ont lieu des interactions biologiques. Ces canaux se comportent

208 www.axela.com

209 Fang Yu et al., Anal. Chem., 76 (13), 3530 -3535, 2004,

210 Liscidini et al., OSA Technical Digest (CD) (Optical Society of America, 2008), paper JTuA58.

comme les lignes d'un réseau de diffraction. L'information sur l'adsorption ou non de biomolécules est effectuée par acquisition de la figure de diffraction²¹¹.

L'examen de ces travaux montre des limites de détection élevées et d'autre part aucune étude en diffraction ne propose, à ce jour et à notre connaissance, des biopuces diffractantes.

V.2. Aucun modèle de diffraction ne prépare le développement de la biodétection au format biopuce

Les phénomènes diffractifs sont théorisés depuis longtemps. La plupart des études modélise la diffraction en champs lointain qui stipule que la répartition de l'intensité lumineuse diffractée est corrélée à la transformée de Fourier au carré des motifs diffractants²¹².

En 2007, Marikkar et al. développent un modèle qui démontre que la puissance diffractée augmente avec l'épaisseur des lignes du réseau, que la variation de sensibilité est due à la variation d'indice des couches minces qui le constituent et à celle du coefficient d'absorption pour des couches épaisses (Figure 48). Il vérifie ensuite ce modèle par des expériences simples²¹³.

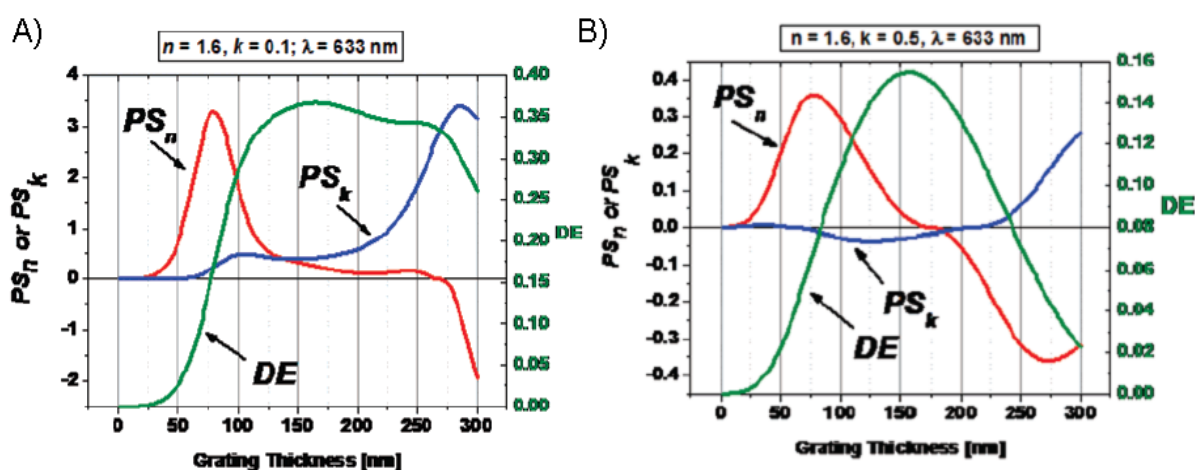


Figure 48 : simulation de la puissance diffractée (DE), de la variation de la sensibilité durant l'accroche de molécules due à une variation d'indice optique (PS_n) et celle due à une variation du coefficient d'absorption (PS_k) de réseaux électrochimique en fonction de l'épaisseur des lignes et pour deux coefficient d'absorption initiaux de A) 0.1 et B) 0.5

211 O.J.A. Schueller et al., Sensors and Actuators 78(1998)149–159

212 F. Morhard et al. Sensors and Actuators B 70(2000)232–242

213 marikkar et al., Langmuir, Vol. 23, No. 20, 2007

Il réalise des réseaux par électrochimie car il est possible de faire croître aisément l'épaisseur des lignes des réseaux avec un contrôle dimensionnel important. Pour cela, une couche passivante est déposée par tamponnage moléculaire. La croissance électrolytique a alors lieu entre les lignes déposées. Les observations expérimentales valident son modèle.

Cependant l'utilisation récente de la diffraction pour les applications biodétecteurs et biopuces mettant en jeu des biomolécules à faible variation d'indice et d'épaisseur, demandent de développer des modèles spécifiques adaptés à ce type d'application.

V.3. Le tamponnage moléculaire est la technique la plus adaptée à la réalisation de biopuces diffractantes

La technique de tamponnage moléculaire, déjà présentée, permet théoriquement de réaliser des biocapteurs et en particulier des réseaux de sondes à bas coût. Associée avec une détection optique sans marquage de la fixation des cibles par diffraction qui est aussi à bas coût, elle constitue le couple idéal qui devrait à terme proposer à la communauté un procédé de détection et d'analyse qui améliore la plupart des sept caractéristiques majeures recherchées.

Afin de montrer l'intérêt de l'approche tamponnage moléculaire pour réaliser les réseaux de sondes vis-à-vis de la biodétection nous reportons ci dessous, une étude réalisée récemment au sein du groupe NBS²¹⁴. Elle compare le signal de détection par fluorescence d'une biopuce à ADN réalisée par tamponnage moléculaire avec ceux d'une biopuce équivalente réalisée par un automate de dépôt par aiguille. Les brins d'ADN sondes sont déposés avec des concentrations variant de 0,1 μ M à 10 μ M, dans chaque cas. Le brin complémentaire fluorescent est hybridé avec une seule concentration et la fluorescence mesurée représente la quantité de brins hybridés. La Figure 49 présente les résultats obtenus où nous observons que le tamponnage moléculaire amplifie le signal d'un facteur 2 à 6. Ainsi, le tamponnage moléculaire permet de réduire la concentration en ADN sondes et donc le coût de fabrication de la biopuce à ADN.

214 C. Thibault et al, 2005, Journal of Nanobiotechnology

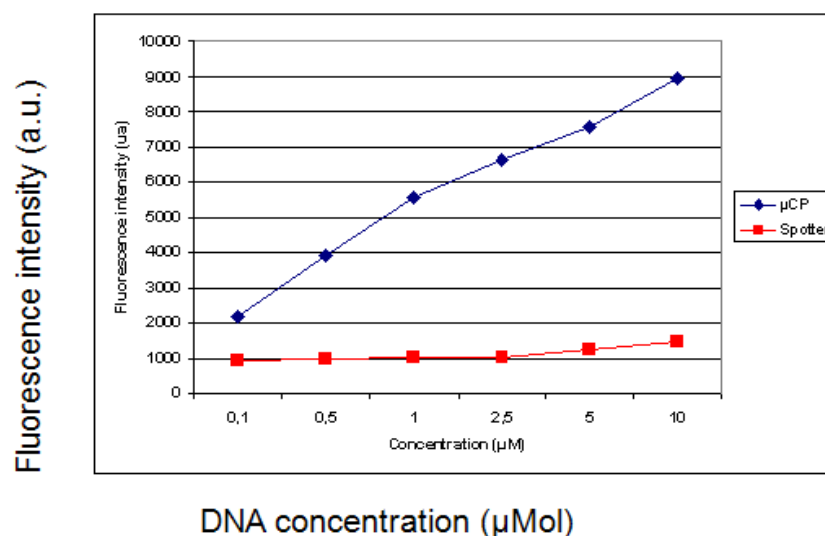


Figure 49 : intensité de fluorescence lors de l'hybridation de deux brins d'ADN complémentaires selon la concentration d'ADN sonde utilisé et pour deux techniques de dépôts différentes : le tamponnage moléculaire (μ CP) et l'automate de dépôt par aiguille (spotter)

De plus, une étude²¹⁵ démontre qu'il est possible grâce au tamponnage moléculaire, en ajustant la concentration des espèces à déposer (les sondes), de réaliser un substrat composé de biomolécules sondes permettant l'analyse d'interactions à l'échelle de la molécule unique.

L'examen des premiers travaux expérimentaux et théoriques sur la détection par diffraction de l'interaction sonde-cible démontre qu'il existe un vide à combler concernant la réalisation et l'étude de biocapteurs et surtout de biopuces sans marquage reposant sur ce phénomène physique. De plus, le couplage de cette méthode de détection avec la réalisation de réseaux diffractifs par tamponnage moléculaire ouvre une voie très prometteuse de la réalisation de biopuces et de la détection ultra-sensible de biomolécules à un coût faible.

Résumé

L'examen critique des données bibliographiques concernant les méthodes de détection et d'analyse de cibles présentes dans une solution par leur fixation sur un substrat, nous permet de dégager dans cette conclusion quelques principes :

- la nature de la cible impose par l'inventaire des forces de liaisons possibles, celle de la ou des sondes à utiliser pour l'accrocher.
- les méthodes de fixation des sondes sur un substrat sont souvent indirectes. La plupart des auteurs utilisent une chimie de surface. Celle-ci met en jeu un silane sur le substrat de silice et un thiol sur de l'or. Le rajout d'une molécule de streptavidine facilite l'accroche de sondes préalablement biotinylées.
- il existe de nombreuses techniques de détection de l'accroche sonde-cible. Les plus classiques font intervenir des marqueurs soit fluorescents soit magnétiques. Les techniques sans marquage font appel à des phénomènes physiques particuliers comme la résonance piézoélectrique, celle de micro poutres, celle des plasmons de surface, l'interférence, la réflectométrie, l'ellipsométrie,... Parmi ces dernières, on observe un gros effort sur les techniques optiques.
- quelques travaux préliminaires proposent souvent le champ de la détection sonde-cible par diffraction.
- le format des techniques sans marquage est souvent celui des biocapteurs.
- Le potentiel de la détection par diffraction semble important aux deux formats, biopuce et biocapteur, à condition de développer une technique de réalisation des réseaux de biomolécules sondes à bas coût comme le tamponnage moléculaire dont les performances semblent concluantes.

Ce travail de doctorat se fixe l'objectif général terminal de démontrer que la détection d'analytes cibles par diffraction au format biopuce est possible, performante, sans marquage, simple et basée sur des technologies à bas coût.

CHAPITRE II : ETUDE THEORIQUE DE LA DETECTION SANS MARQUAGE PAR DES BIOPUCES DIFFRACTANTES

Comme nous l'avons remarqué dans le chapitre I, consacré à la présentation de l'état de l'art, il existe un grand nombre de techniques de biodétection sans marquage. L'une d'entre elles est basée sur la détection des modifications du spectre de diffraction d'un réseau de biomolécules sondes lors de l'accroche de biomolécules cibles. Goh et al^{216,217}, Tsay et al²¹⁸ ont démontré la faisabilité de cette technique au format biocapteur. Il s'en est suivi la création de la société Axela proposant des biocapteurs diffractifs²¹⁹. L'objectif de ce doctorat est de démontrer l'adaptabilité de cette technique au format biopuce.

Pour cela, nous nous proposons de réaliser un ensemble de micro réseaux de diffraction de périodicité submicronique disposés sur un substrat. Chacun d'eux est composé de biomolécules sondes différentes (Figure 50) destinées à la détection d'une interaction spécifique A, B, C, ...

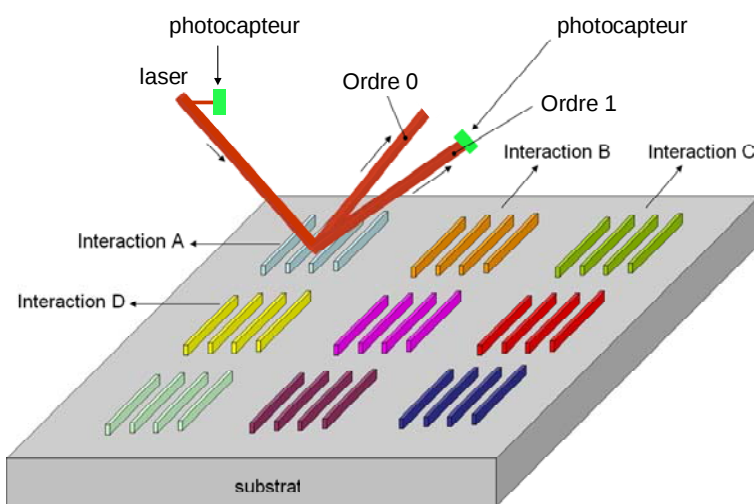


Figure 50: schéma de principe de la biopuce

La détection du type d'interaction s'effectue par la mesure des modifications du spectre de diffraction en réflexion d'un faisceau laser incident sur chaque réseau. Ce spectre résulte d'un phénomène d'interférence modulé par la diffraction. La partie interférentielle génère une dispersion de la lumière selon des directions précises qui sont appelées des ordres.

216 Goh, J. B., P. L. Tam, et al. (2003). Analytical Biochemistry 313(2): 262-266.

217 Goh, J. B., R. W. Loo, et al. (2005). Sensors and Actuators B: Chemical. 106(1): 243-248.

218 Tsay, Y., C. Lin, et al. (1991). Clin Chem 37(9): 1502-1505.

219 Axela inc. : www.axela.com

Dans la plupart des systèmes de détection optique et afin de s'affranchir des fluctuations de l'intensité du faisceau laser incident, on détecte les variations relatives de la quantité de lumière de l'ordre 1 rapportée à une fraction de la puissance incidente à l'aide de deux photodétecteurs repérés par 1 et 2 sur la Figure 50.

Pour adapter, de manière optimale, la technique de détection sans marquage du format biocapteur au format biopuce nous devons choisir pertinemment certaines variables. Le problème à résoudre est donc complexe car il comporte un grand nombre de paramètres. Certains paramètres sont maîtrisables lors de la fabrication des réseaux composés de biomolécules sondes, comme leur dimension (largeur L_1 longueur L_2), la largeur des lignes et leur épaisseur, la période. D'autres sont fixés par le montage optique de détection comme la longueur d'onde du faisceau laser utilisé et son angle d'incidence. Par contre les paramètres liés à l'interaction avec la cible sont plus difficilement contrôlables comme une augmentation par interaction biologique spécifique de l'épaisseur des lignes et/ou de leur largeur, la présence d'une interaction non spécifique avec le substrat, la superposition des deux types d'interactions spécifique et non spécifique. Le choix des paramètres « maîtrisables » doit permettre de différencier le type d'interaction spécifique et non spécifique (qui est un artefact) et de repousser ainsi les limites de cette méthode de détection sans marquage.

La voie la plus efficace pour réaliser les bons choix est d'étudier par simulation l'influence des différents paramètres sur la réponse de la biopuce. C'est l'objet de ce chapitre qui se décompose en six parties.

Tout d'abord, nous rappelons les notions élémentaires permettant de comprendre l'influence des principaux paramètres sur le spectre de diffraction en présentant la réponse classique d'un réseau de N fentes sollicité en transmission. Ensuite, nous développons un modèle analytique permettant de simuler nos réseaux de diffraction. Dans la troisième partie, nous appliquons ce modèle au cas d'une interaction spécifique idéale. Dans la quatrième partie, nous étudions l'influence des phénomènes d'interactions non spécifiques sur la réponse de la biopuce et les conditions de différenciation entre interaction spécifique et non spécifique. Dans la cinquième partie, nous évaluons le gain du signal durant l'interaction fonction des tailles des biomolécules sonde et cible. Enfin, nous complexifions le modèle afin de prendre en compte l'accroissement latéral des lignes lors de l'interaction.

I. Rappel sur la diffraction dans le cas d'un réseau en transmission

L'objet de ce paragraphe est de présenter la réponse générale d'un réseau de diffraction. Pour cela, nous considérons le cas simple du réseau composé d'un ensemble de fentes de largeur l et de période p éclairé normalement par une onde plane de longueur d'onde λ (Figure 51).

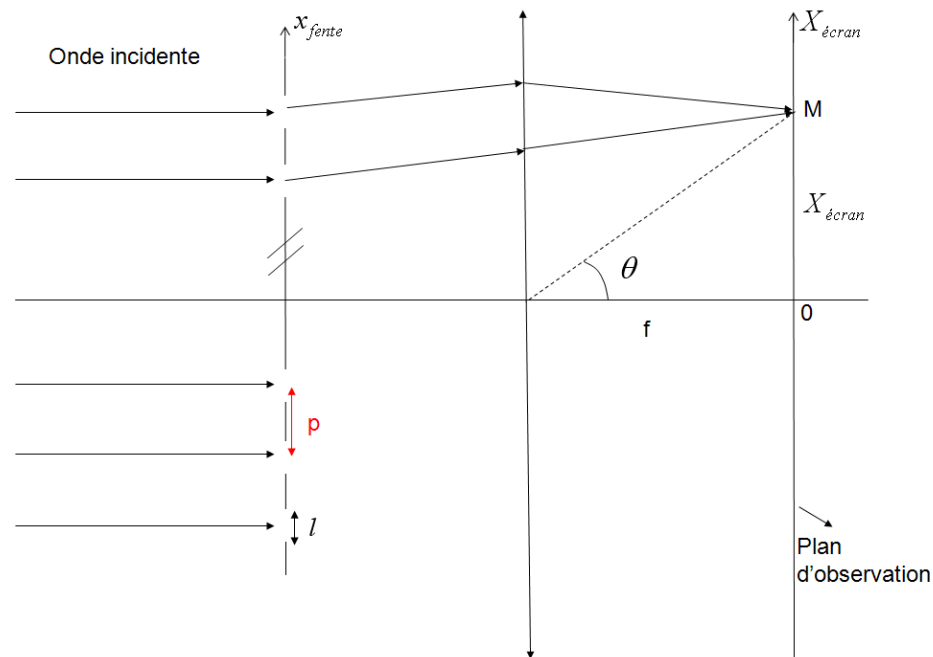


Figure 51 : schéma d'un réseau de fentes dont la figure de diffraction à l'infini est observée à une distance finie f grâce à une lentille convergente

Chaque fente peut être considérée comme une source lumineuse dont chaque point émet une onde électromagnétique sphérique (contribution de Huygens). Ainsi, au point d'observation M où nous souhaitons connaître l'intensité lumineuse, l'amplitude de l'onde lumineuse est la somme de toutes les ondes provenant des fentes sources. Les distances parcourues par les ondes partant de chaque fente et arrivant au point d'observation M étant différentes, les ondes lumineuses sont déphasées entre elles et vont alors interférer (contribution de Fresnel). L'intensité lumineuse en M est le carré du module de l'amplitude de l'onde électromagnétique résultante. Le calcul général est complexe mais il devient simple lorsqu'on considère M à l'infini. En effet, chaque onde sphérique peut être alors considérée comme une onde plane d'inclinaison différente (champ lointain).

La figure de diffraction à l'infini est observable sur un écran en réalisant son image grâce à une lentille convergente de distance focale f , dans son plan focal image (Figure 51).

L'application du principe d'Huygens-Fresnel, ajouté à l'hypothèse du champ lointain, à un réseau de fentes conduit à deux phénomènes d'interférence superposés :

1. l'interférence des ondes provenant d'une même fente appelée diffraction
2. l'interférence des ondes émises par les diverses fentes considérées comme des sources ponctuelles (très fines) nommée interférence.

Le calcul du spectre de diffraction du réseau se décompose donc en 3 étapes :

1. le calcul de la diffraction d'une fente
2. le calcul de l'interférence de N fentes considérées comme « ponctuelles »
3. la simulation du cas réel par superposition des deux phénomènes de diffraction et d'interférence

Soit une fente de largeur l finie, lorsque la lumière de longueur d'onde λ la traverse (Figure 52), elle est diffractée. A l'infini, cette diffraction provient de la somme continue de l'amplitude des ondes, émises par les divers points de la fente source et déphasées par une différence de trajet optique. L'amplitude complexe $\bar{A}$ résultante en M est obtenue par une intégration dans l'espace de l'amplitude a des ondes incidentes exprimées en représentation complexe (équation [1]).

$$\bar{A} = a \int_{-\frac{l}{2}}^{\frac{l}{2}} e^{\frac{2i\pi}{\lambda} x_{fente} \sin(\theta)} dx_{fente} \quad [1]$$

Où $\sin(\theta) = \frac{X_{écran}}{f}$.

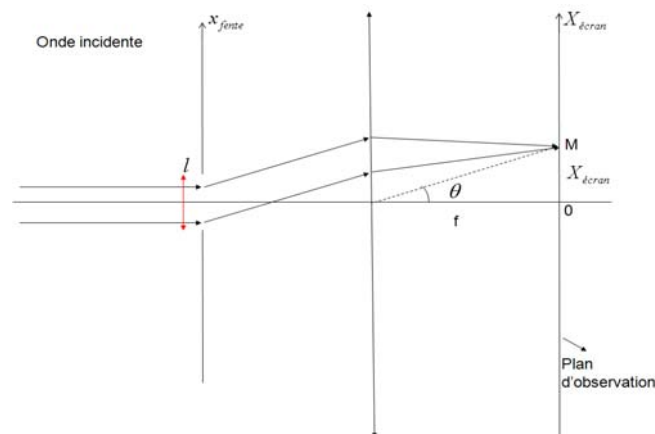


Figure 52 : schéma d'une fente dont la figure de diffraction à l'infini est imagée à une distance finie f grâce à une lentille convergente

L'intensité lumineuse en un point M de l'écran d'observation repéré par l'angle θ s'écrit :

$$I = a^2 \frac{\sin^2 u}{u^2} \text{ avec } u = \frac{\pi \times l \times \sin(\theta)}{\lambda}$$

Le tracé de cette intensité en fonction de la position du point M (Figure 53) sur l'écran repéré par θ nous permet d'analyser cette dispersion de la lumière par une fente en un lobe principal de largeur $\frac{2\lambda}{l}$ suivi de lobes secondaires de faible intensité. Ainsi, plus la fente est fine, plus le lobe principal est étalé et la lumière dispersée (et donc diffractée).

$$l_3 > l_2 > l_1$$

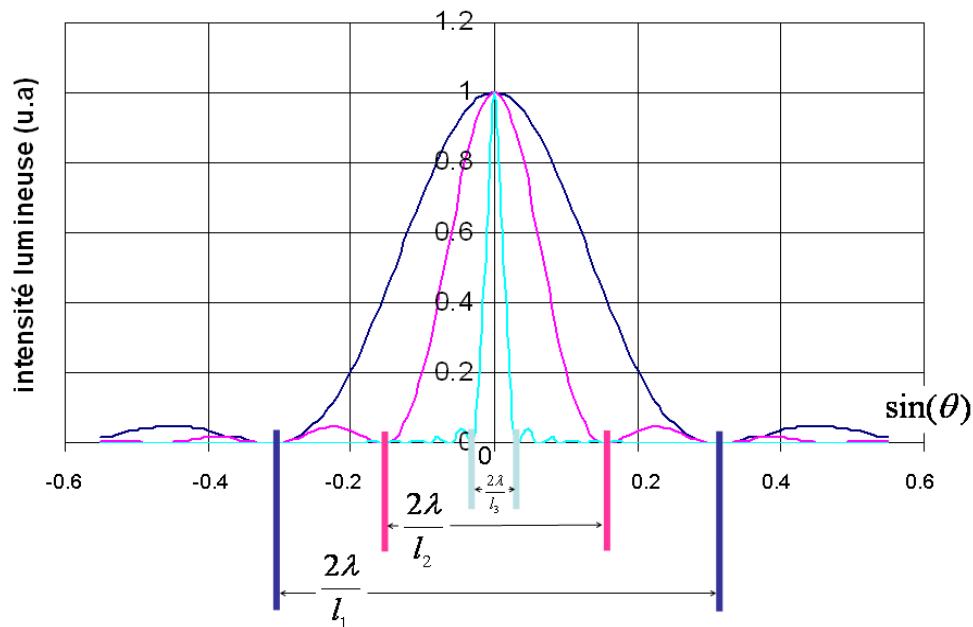


Figure 53: répartition de l'intensité lumineuse pour différentes largeurs de fentes en fonction de la position M sur l'écran repérée par $\sin(\theta)$

Traisons le deuxième cas (idéal), d'un ensemble de N fentes sources infiniment fines espacées de la distance p (la période Figure 51). L'interférence est la somme d'ondes provenant de ces diverses sources ponctuelles. Le calcul de l'amplitude résultante A au point d'observation est ici la somme discrète des contributions de toutes les fentes sources. Chaque onde émanant d'une fente est déphasée de ϕ par rapport à la fente centrale. Il est possible d'exprimer ce déphasage selon les données du système comme :

$$\phi = \frac{2\pi}{\lambda} \times p \times \sin(\theta)$$

En représentation exponentielle, l'amplitude $\overline{A}$ résultante de toutes les ondes provenant des N fentes en M s'écrit :

$$\overline{A} = a[1 + e^{-j\phi} + \dots + e^{-j(N-1)\phi}]$$

On en déduit l'intensité par :

$$I = |\overline{A}|^2$$

soit,

$$I = a^2 \frac{\sin^2(\frac{N\phi}{2})}{\sin^2(\frac{\phi}{2})}$$

La Figure 54 est un exemple de figure d'interférence pour N fentes. Les variations de l'intensité en fonction de la position du point M présentent des pics principaux de même intensité et espacés les uns les autres de la même quantité : $\frac{\lambda}{p}$. Ces pics principaux sont appelés des ordres d'interférence. Leur lobe principal a une largeur de $\frac{\lambda}{Np}$. Si on remarque que la largeur du réseau L est égale à Np alors on en déduit que les lobes principaux ont des largeurs inversement proportionnelles à la taille du réseau. Plus le réseau est grand, plus les pics sont fins.

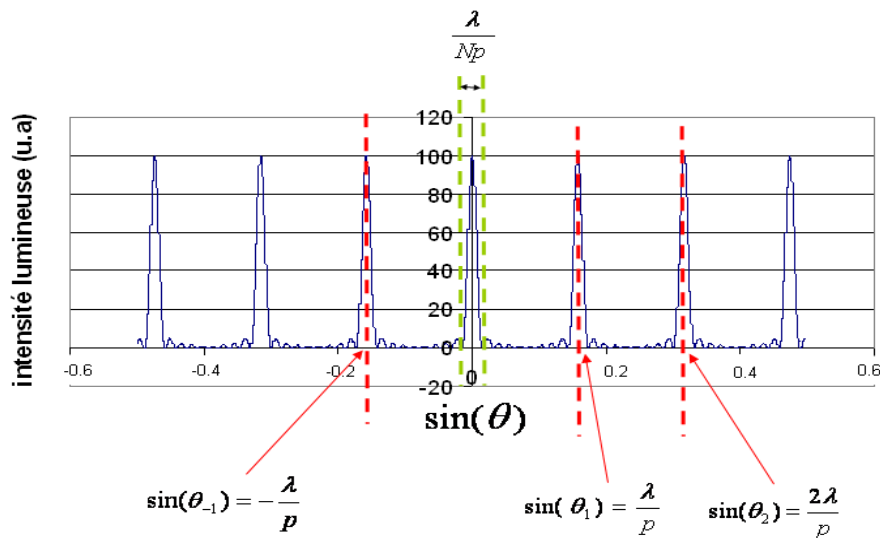


Figure 54 : figure d'interférence pour N fentes

La situation réelle qui correspond à un réseau de N fente de dimension finie est la superposition de ces deux phénomènes. Le terme de diffraction doit être multiplié par celui d'interférence pour donner l'intensité en M d'un réseau réel de diffraction :

Terme de diffraction Terme d'interférence

$$I = \alpha^2 \frac{\sin^2 u}{u^2} \times \frac{\sin^2\left(\frac{N\phi}{2}\right)}{\sin^2\left(\frac{\phi}{2}\right)}$$

avec $u = \frac{\pi \times l \times \sin(\theta)}{\lambda}$ et $\phi = \frac{2\pi}{\lambda} \times p \times \sin(\theta)$.

Ainsi, la diffraction module la figure d'interférence (exemple : Figure 55). Nous pouvons remarquer que du fait de la modulation les pics d'interférence les plus excentrés sont complètement éteints. Les positions des pics principaux d'interférence ne sont pas modifiées par la diffraction.

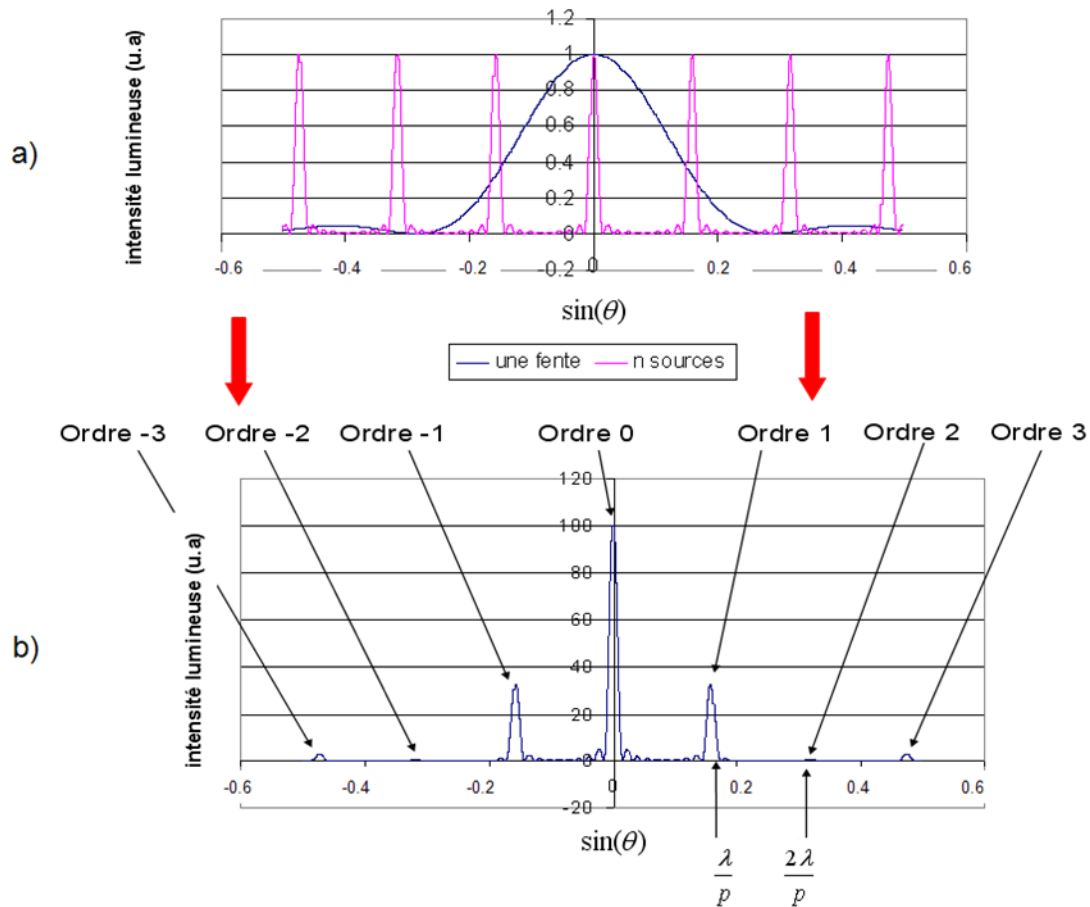


Figure 55: répartition de l'intensité lumineuse d'un réseau en tenant compte de la diffraction et de l'interférence entre fentes

- a. superposition des phénomènes de diffraction et d'interférence
- b. variation de l'intensité résultante sur l'écran d'observation

Les montages expérimentaux qui permettent l'acquisition fine de ces spectres d'intensité sont sophistiqués et coûteux. Pour un système à bas coût, l'acquisition des spectres de diffraction est réalisée uniquement par deux photodétecteurs, de taille finie.

Dans un système de biopuce, un photocapteur doit intégrer l'ordre 1 et l'autre prélève une partie du signal incident. Tout d'abord, il est important de dimensionner le capteur de l'ordre 1 de manière à ce qu'il collecte un maximum de la puissance diffractée sur l'ordre 1. En d'autres termes, sa dimension doit intégrer le lobe principal associé à l'ordre 1 suivant :

$$\int_{-\frac{\lambda}{Np}}^{\frac{\lambda}{Np}} I(\sin(\theta)) d\sin(\theta) = P_1$$

Cette intégrale est appelée la puissance reçue sur ce photocapteur P_1 . Dans le but de s'affranchir des phénomènes liés aux fluctuations du faisceau laser incident, il est aussi important de construire la grandeur puissance relative comme le rapport de la puissance mesurée par le capteur placé sur l'ordre 1 P_1 et celui prélevant une partie du signal incident

$$P_i : \frac{P_1}{P_i}.$$

Enfin, dans l'hypothèse d'une modification par interaction de la transmission des fentes, cette interaction peut être quantifiée en définissant la grandeur gain G comme :

$$G = \frac{\left(\frac{P_1}{P_i}\right)_{\text{après}} - \left(\frac{P_1}{P_i}\right)_{\text{avant}}}{\left(\frac{P_1}{P_i}\right)_{\text{avant}}}.$$

Elle représente la variation relative du signal avant puis après interaction et quantifie le phénomène qui engendre la diminution de la transmission des fentes.

En résumé de cette partie, il est important de noter que :

1. l'intensité émanant du réseau de diffraction est la résultante de phénomènes d'interférence et de diffraction
2. la répartition de l'intensité est composée de pics principaux appelés ordres et repérés sur l'écran par la relation :

$$\sin(\theta_k) = \frac{k\lambda}{p} \text{ où } k \text{ est le « numéro » de l'ordre}$$

A λ fixée, ces ordres seront d'autant plus séparés que la période p sera grande.

3. la largeur des ordres est inversement proportionnelle à la taille du réseau
4. la largeur des fentes module l'amplitude des ordres

Sur cet exemple nous nous sommes attachés à présenter le phénomène d'interférence de N fentes réelles de largeur finie. Nous avons aussi souligné que les tracés des variations globales d'intensité en fonction de θ sont coûteuses en temps d'acquisition et qu'il vaut mieux leur substituer la mesure de la puissance diffractée P_1 ou de $\frac{P_1}{P_i}$ afin de s'affranchir des fluctuations du faisceau laser incident.

Plusieurs conditions doivent être réunies afin de réaliser un système de détection optimisé. Tout d'abord, le dispositif de mesure doit être construit expérimentalement avec un bruit très faible pour que les variations de $\frac{P_1}{P_i}$ par interaction biologique puissent être détectées. Ensuite, un choix judicieux des paramètres maîtrisables doit être effectué afin que le gain G du système permette de chiffrer et de différencier les phénomènes d'interaction biologique. Le modèle analytique développé dans le cas d'une biopuce sollicitée en réflexion présenté ci-dessous suit cette démarche : calcul de l'intensité, puis de P_1 , puis de $\frac{P_1}{P_i}$ et enfin du gain G.

II. Un modèle analytique simple d'un réseau en réflexion

Le cas précédent (N fentes) était simple à modéliser car le dispositif divisait une source étendue incidente en un ensemble de fentes sources de même amplitude (pas d'atténuation) et de même phase. Entre les fentes sources, il n'y avait pas de lumière émise et l'interférence provenait uniquement des différences de trajets optiques entre les sources et le point d'observation.

Par contre, le réseau que nous souhaitons modéliser, représenté sur la Figure 50 et la Figure 56, éclairé par réflexion est plus complexe car les lignes émettent de la lumière, ainsi que l'espace entre les lignes (« les creux »). L'amplitude des ondes émises par chaque point est déphasée par rapport à l'onde incidente par la traversée des milieux et des interfaces ainsi que par les différences de chemins optiques (équivalentes à celles du paragraphe précédent). Il existe donc un déphasage entre les lignes et les creux qui influence l'amplitude diffractée en M par le réseau qui se superpose au phénomène d'interférence étudié au paragraphe précédent.

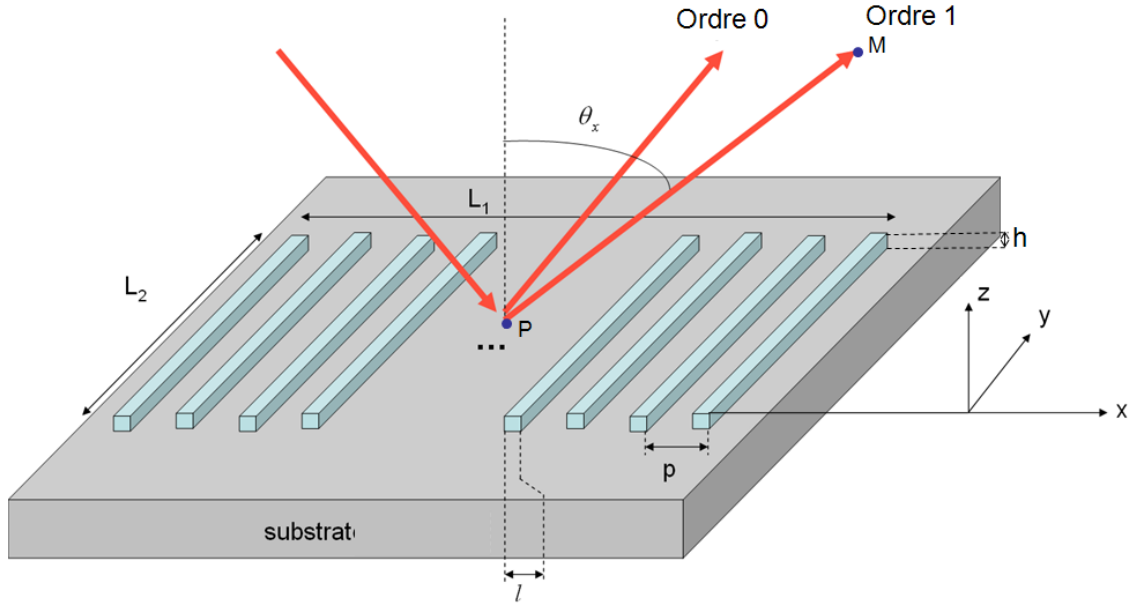


Figure 56: schéma du réseau à modéliser et définissant les différentes grandeurs géométriques introduite dans le modèle

Afin de prendre en compte tous ces phénomènes, nous développons un modèle analytique générique. Pour cela, nous nous plaçons dans le formalisme de l'optique de Fourier.

Il est basé sur l'approximation de Fraunhofer (ou champ lointain). Chaque point P du réseau, illuminé par un laser d'intensité I_i et de longueur d'onde λ , émet, juste au niveau de la surface supérieure du réseau, une onde électromagnétique dont l'amplitude dépend de ses coordonnées x et y, soit: $\Psi_{0+}(x, y)$.

L'intensité résultante $I_\theta(u, v)$ à une distance $PM = r_m(X, Y, Z)$ entre le réseau et le point d'observation M est :

$$I(u, v) = I_i \left| \frac{1}{\lambda r_m} TF(\Psi_{0+}(x, y)) \right|^2$$

u : fréquence spatiale selon l'axe x où $u = \frac{\sin(\theta_x)}{\lambda}$

v : fréquence spatiale selon l'axe y où $v = \frac{\sin(\theta_y)}{\lambda}$

TF : transformée de Fourier

Cette équation traduit le fait que tout le réseau émet de la lumière (les lignes comme les creux). L'intensité résultante en un point M d'un écran repéré par OX et OY est la somme des ondes émises par chaque ligne et chaque creux. L'utilisation d'une transformée de Fourier signifie que la somme est réalisée en considérant que les ondes lumineuses sont planes. Ceci est en accord avec l'hypothèse de travail qui postule que le point d'observation est éloigné du réseau (hypothèse de champ lointain ou approximation de Fraunhofer).

II.1. Amplitude $\Psi_{0+}(x, y)$ émise par chaque point du réseau

Par souci de simplification, le modèle est développé dans le cadre d'une onde d'incidence normale à la surface. Comme nous l'avons vu, il est nécessaire d'exprimer mathématiquement la répartition spatiale de l'amplitude lumineuse à la surface du réseau : $\Psi_{0+}(x, y)$. Cette répartition dépend d'une part de l'amplitude lumineuse émise par les lignes que nous noterons $\bar{A}$ et d'autre part de celle entre les lignes ($\bar{B}$, nommé 'creux') (Figure 57). Précisons au lecteur que $\bar{A}$ et $\bar{B}$ sont des coefficients complexes dont l'amplitude représente la proportion de lumière émise et la phase traduit le déphasage de cette onde par rapport à l'onde incidente.

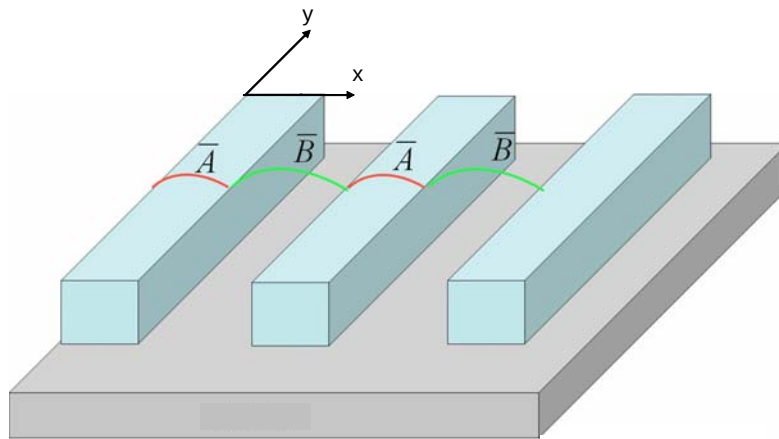


Figure 57: amplitudes émises par les lignes et les creux

De manière plus détaillée, $\bar{A}$ et $\bar{B}$, les réponses lumineuses des lignes et creux sont calculées par la méthode des matrices de transfert [²²⁰]. Cette méthode permet de connaître les coefficients de réflexion et de transmission d'une superposition de couches caractérisées par leur épaisseur et leur indice optique. Son intérêt majeur est que les réflexions multiples sont

²²⁰ OPTICS (second edition) Eugene HECHT, ADDISON-WESLEY publishing group, chapter 9

prises en compte. De plus, l'indice est considéré comme complexe afin de prendre en compte l'absorption de l'onde lumineuse par chaque couche.

Comme cette méthode est basée sur le bilan du trajet d'une onde électromagnétique traversant les différentes couches, à chaque interface, les ondes de mode TE n'ont pas le même comportement que les ondes de mode TM. Les modes TE et TM sont donc calculés de manière différente.

Il est important de noter que deux contributions interviennent sur les valeurs de $\bar{A}$ et $\bar{B}$. Elles sont à prendre en compte pour comprendre la réponse d'un empilement de couches : l'une est surfacique et l'autre volumique. En effet, la différence d'indices à une interface (entre n_0 et n_1 de la Figure 58) engendre une réflexion et une transmission de l'onde lumineuse dont les coefficients (de réflexion et de transmission) dépendent de cette différence d'indice. Ainsi le premier phénomène, surfacique, agit sur l'amplitude de $\bar{A}$ et $\bar{B}$.

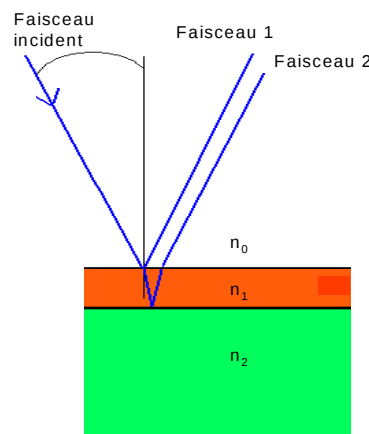


Figure 58 : schéma représentant la réponse optique d'un empilement de couches d'indice optique et d'épaisseur différents.

Le second, volumique, est dû aux réflexions multiples (c'est le cas entre les faisceaux 1 et 2 de la Figure 58). Cette différence de trajets optiques des faisceaux émergents, caractérisée par la partie réelle de l'indice optique, entraîne une contribution de ce phénomène volumique aussi bien sur l'amplitude que sur la phase de $\bar{A}$ et $\bar{B}$. La partie imaginaire de l'indice (l'absorption) a une influence sur l'amplitude de $\bar{A}$ et $\bar{B}$.

Le résultat d'un tel calcul de $\bar{A}$ et $\bar{B}$ par les matrices de transfert est présenté sur la Figure 60. Les cas simulés sont des réseaux de dendrimères d'épaisseurs variables d'indice 1.5, déposés sur un substrat de verre (indice 1.45) placés dans l'air (indice optique : 1).

Nous pouvons remarquer que l'amplitude de l'onde émise par les lignes augmente avec l'épaisseur de dendrimères pour atteindre un maximum vers les épaisseurs de 100nm. Ce phénomène ne peut pas être imputable aux interfaces présentes puisqu'elles ne fluctuent pas. Par contre, le déphasage des ondes provenant des réflexions multiples au sein des lignes varie fortement avec l'épaisseur. Ainsi, nous imputons cette variation à un phénomène de réflexion multiple au travers des lignes. Ceci est équivalent aux interférences rencontrées dans un système tel que le coin d'air. La phase des lignes varie de manière non monotone pour la même raison : les réflexions multiples. Ceci peut être comparé aux creux qui subissent peu de modifications d'amplitude. En effet, nous avons considéré un indice du milieu égal à 1 ne permettant pas la présence de réflexions multiples. Ainsi, on constate que l'amplitude des creux est constante selon l'épaisseur des dendrimères.

Par contre, la phase décroît linéairement avec l'épaisseur de dendrimères. Cette décroissance est due au fait que la référence des phases est le faisceau incident arrivant sur le « haut » des lignes. Enfin, nous constatons que la différence des amplitudes complexes des lignes et des creux a un module croissant avec l'épaisseur de dendrimères et une phase qui décroît. Le signal diffracté ayant une tendance identique que ce module (détaillé dans les paragraphes suivants), nous en déduisons que la puissance diffractée P_1 augmente avec l'épaisseur de dendrimères.

Cette première simulation démontre que nous avons intérêt pour obtenir un contraste d'émission entre les lignes et les creux important, au niveau de sa surface supérieure, à avoir des épaisseurs de dendrimères élevés. En résumé, ce calcul transforme le réseau réel en un réseau plan émettant des amplitudes complexes $\bar{A}$ et $\bar{B}$ (Figure 59).

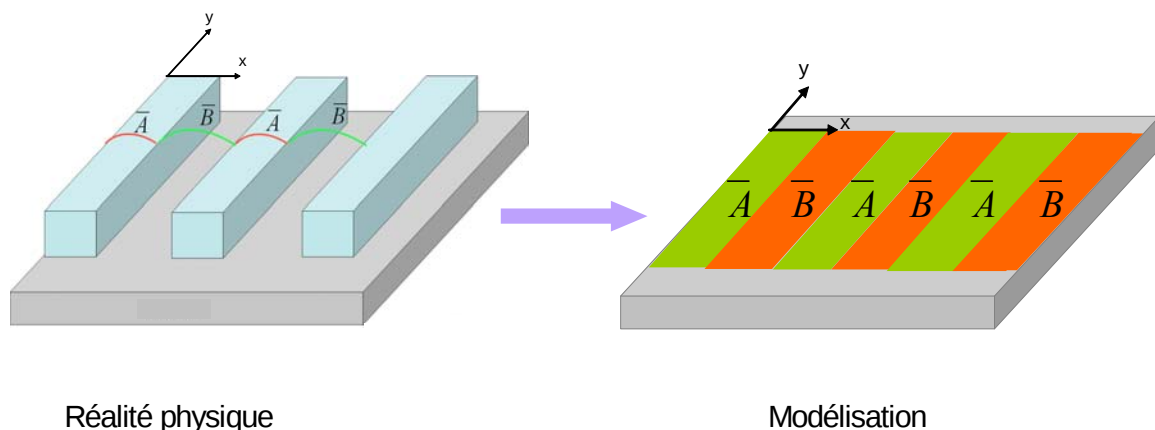


Figure 59 : schéma du réseau 2D émettant des ondes d'amplitudes $\bar{A}$ et $\bar{B}$

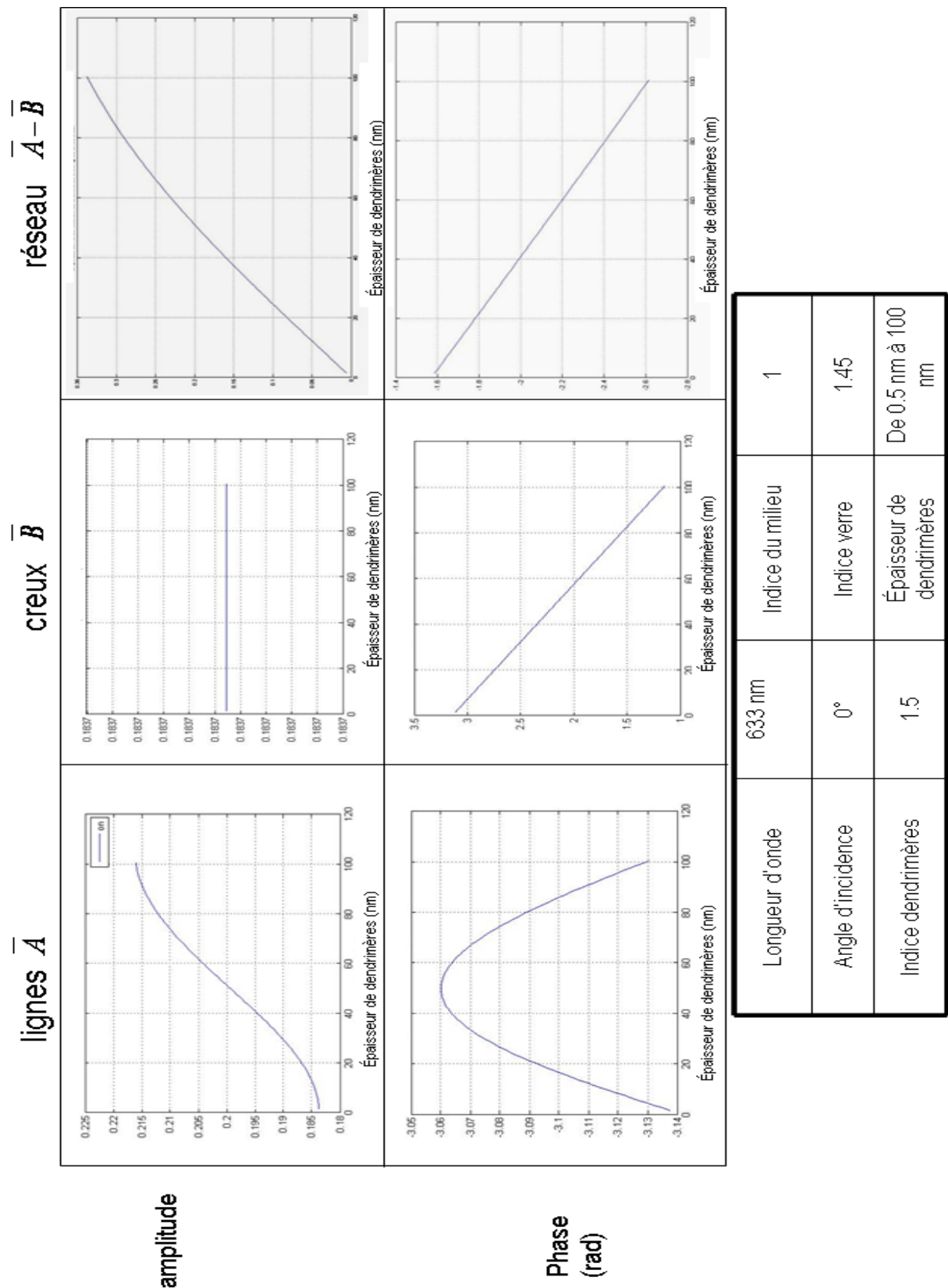


Figure 60 : calcul de l'amplitude et de la phase de l'onde résultante émise par les lignes, puis les creux dans le cadre d'un réseau de dendrimères (d'épaisseur variable) déposés sur un substrat de verre. La dernière colonne représente la différence entre la phase et l'amplitude des ondes provenant des lignes et celles des creux sur le plan $x0y$ supérieur du réseau (Figure 57).

Ayant déterminé $\bar{A}$ et $\bar{B}$ le réseau diffractif peut être assimilé à une surface plane qui émet à sa surface une onde dont l'amplitude lumineuse (complexe) $\Psi_{0+}(x, y)$ dépend des coordonnées x et y du point d'émission :

$$\Psi_{0+x}(x, y) = \begin{cases} \bar{A} & -L_1/2 < kp < x < kp + l < L_1/2 & \text{et} & |y| < L_2 \\ & k \in \mathbb{N} \\ \bar{B} & -L_1/2 < kp + l < x < (k+1)p < L_1/2 & \text{et} & |y| < L_2 \\ 0 & x < -L_1/2 \quad \text{ou} \quad L_1/2 < x & \text{et} & |y| > L_2 \end{cases}$$

Comme x et y sont des variables indépendantes, nous les traitons séparément. Dans ce cas, nous avons :

$$\Psi_{0+}(x, y) = \Psi_{0+x}(x) \times \Psi_{0+y}(y)$$

Nous allons donc traiter dans un premier cas, la partie dépendante de x : $\Psi_{0+x}(x, y)$. L'écriture sous une forme mathématique, permettant un traitement aisé de la transformée de Fourier, est ici nécessaire. Pour cela nous considérons que le réseau est la somme de l'émission des creux sur l'ensemble de la surface du réseau ($\bar{B}$ constant sur L_1) et des lignes émettant la différence entre les lignes et les creux ($\bar{A} - \bar{B}$). Cela donne :

$$\Psi_{0+x}(x) = \left\{ \bar{B} \Pi_x(L_1) + (\bar{A} - \bar{B}) \times [\Pi_x(l) \otimes \sum_k \delta(x - kp)] \times \Pi_x(L_1) \right\}$$

$\Psi_{0+x}(x)$ résulte de la contribution du substrat émettant $\bar{B}$ sur tout le réseau et est traduit dans l'expression par le produit de $\bar{B}$ avec la fonction porte dont la largeur est celle du réseau $\Pi_x(L_1)$ à laquelle se superposent les lignes discrètes émettant $\bar{A} - \bar{B}$ sur une largeur l (modélisée par $\Pi_x(l)$) et cela sur la largeur du réseau (modélisée par $\Pi_x(L_1)$) (voir partie supérieure de la Figure 61)

Par analogie, pour l'axe y , nous avons : $\Psi_{0+y}(y) = \Pi_y(L_2)$

L'astuce de calcul utilisée ici est que la différence entre $\bar{A}$ et $\bar{B}$ est à l'origine du réseau. En d'autres termes, elle « fabrique » le réseau.

II.2. Calcul de l'intensité diffractée

Le calcul par la transformée de Fourier de l'intensité diffractée est synthétisé sur le bas de la Figure 61. Les règles clés sont les suivantes :

1. la transformée de Fourier d'une fonction porte de paramètre L est un sinus cardinal dont le lobe principal a une largeur de $2/L$
2. la transformée de Fourier d'un peigne de fonction de Dirac de période p est un autre peigne mais de période $1/p$
3. suite à la transformée de Fourier, l'opérateur 'multiplier' ($\times$) devient un produit de convolution ($\otimes$)
4. suite à la transformée de Fourier, un produit de convolution ($\otimes$) devient l'opérateur 'multiplier' ($\times$)
5. lors de la transformée de Fourier l'opérateur 'multiplier' reste inchangé si les opérandes sont composés de variables indépendantes

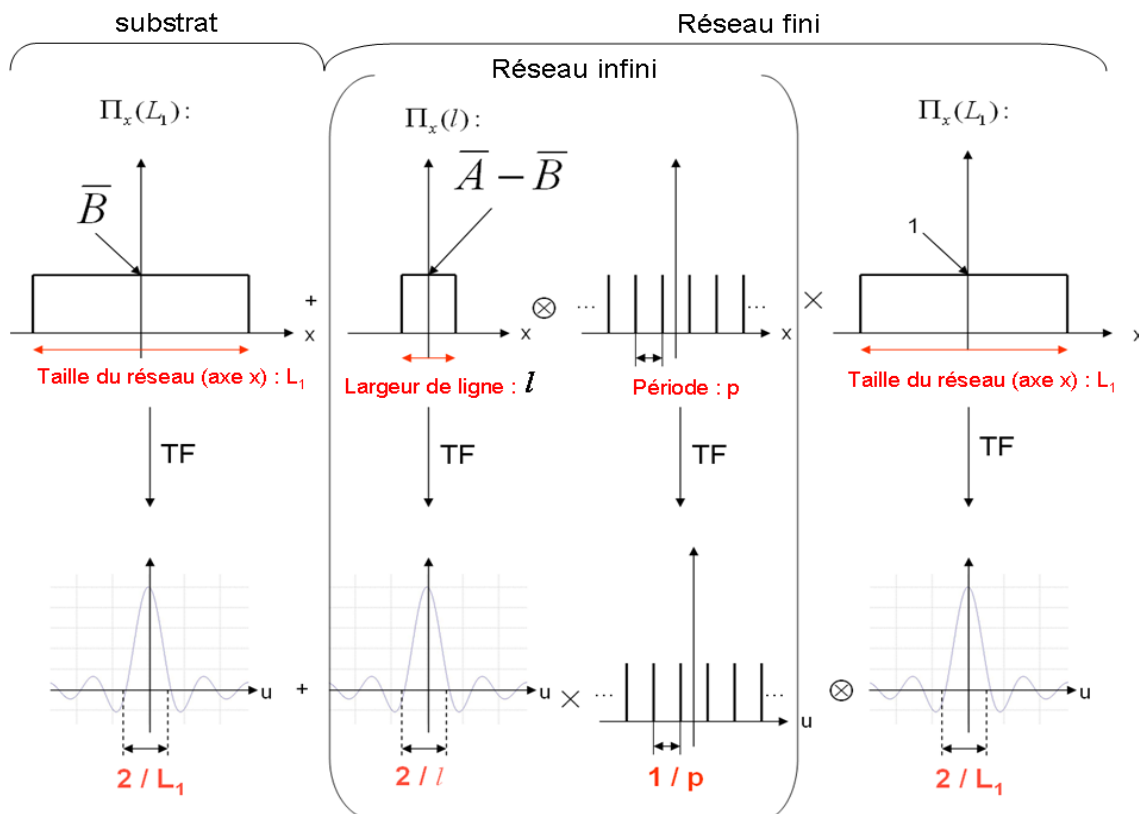


Figure 61 : schéma expliquant la démarche utilisée pour calculer l'intensité émise par un réseau dont les lignes ont une largeur l , la période est p la taille du réseau selon l'axe x est L_1 et selon y L_2 . TF désigne la transformée de Fourier

Etant donné que x et y sont des variables indépendantes, nous avons :

$$TF(\Psi_{0+}(x, y)) = TF(\Psi_{0+x}(x, y)) \times TF(\Psi_{0+y}(x, y))$$

$$\text{d'où,} \quad \Rightarrow I_{\theta}(u, v) = I_i \left| \frac{1}{\lambda r_m} TF(\Psi_{0+x}(x, y)) \times TF(\Psi_{0+y}(x, y)) \right|^2$$

L'expression finale de l'intensité diffractée en M repéré par $u = \frac{\sin(\theta_x)}{\lambda}$ et $v = \frac{\sin(\theta_y)}{\lambda}$ s'écrit alors :

$$I(u, v) = \frac{I_i}{(\lambda r_m)^2} \left| \bar{B} L_1 \sin c(\pi L_1 u) + \left(\frac{L_1}{p} \right) [(\bar{A} - \bar{B}) \sum_{k \neq 0} \sin c(\pi k \frac{L_1}{p}) \sin c(\pi L_1 (u - \frac{k}{p}))] \right|^2 \times L_2^2 \sin^2 c(\pi L_2 v)$$

Le terme $\bar{B} L_1 \sin c(\pi L_1 u)$ représente la réflexion du laser sur le substrat.

Du fait du module au carré, de nombreux termes croisés interviennent et rendent le développement de cette expression complexe. Ces termes représentent l'influence d'un ordre sur l'autre. Nous prendrons l'hypothèse d'un pas faible et adapté pour que les ordres soient suffisamment éloignés les uns des autres et donc pour négliger les termes croisés.

Ainsi, l'intensité peut être simplifiée et écrite sous une forme qui sépare la contribution de chaque ordre : (équation [1])

$$I(u, v) = \frac{I_i}{(\lambda r_m)^2} \left\{ \underbrace{\bar{B} L_1 \sin c(\pi L_1 u)}_{\text{Réflexion du laser sur le substrat}} + \underbrace{\frac{L_1}{p} (\bar{A} - \bar{B}) \sin c(\pi L_1 u)}_{\text{Ordre 0}} + \underbrace{\left(\frac{L_1}{p} \right)^2 |\bar{A} - \bar{B}|^2 \sum_{k \neq 0} \sin^2 c(\pi k \frac{L_1}{p}) \sin^2 c(\pi L_1 (u - \frac{k}{p}))}_{\text{Ordres } > 0} \right\} \times L_2^2 \sin^2 c(\pi L_2 v)$$

La figure 62 représente un exemple de répartition de l'intensité en fonction de l'angle d'observation pour un réseau de période $p = 1\mu\text{m}$ et de largeur $l = 100\mu\text{m}$.

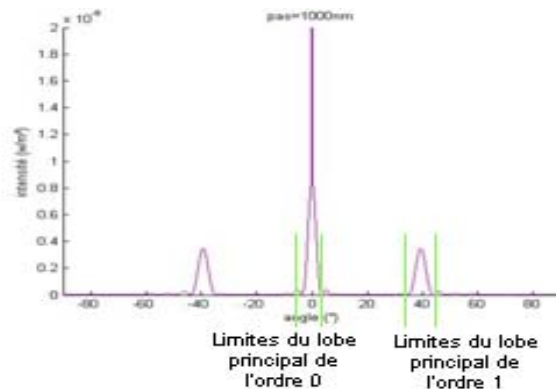


Figure 62 : simulation représentant la répartition de l'intensité lumineuse pour un réseau de période $1\mu\text{m}$ et de largeur $400\mu\text{m}$. Cette figure permet de visualiser l'hypothèse de travail sur les capteurs.

En pratique un photocapteur a une surface finie. Il intègre donc suivant sa taille et donc sa distance par rapport au réseau, une partie d'un ordre, un ordre, ou plusieurs. Comme la largeur du lobe principal d'un ordre est inversement proportionnelle à la taille du réseau, plus on réduit la taille des réseaux, plus la lumière se disperse et la puissance collectée sur le capteur est faible. Si sa taille et sa position sont adaptées pour intégrer l'ordre 1, nous avons :

$$\int_{\text{surface du photocapteur}} L \sin^2(\pi L u) du = 1$$

L'expression précédente (équation [1]) fait apparaître la contribution à l'intensité de l'ordre 1 suivante :

$$I_{\text{ordre 1}}(u, v) = \frac{I_i}{(\lambda r_m)^2} \left\{ \left(\frac{L L_1}{p} \right)^2 \left[|\overline{A} - \overline{B}|^2 \sin^2\left(\pi l \frac{1}{p}\right) \sin^2\left(\pi L_1 \left(u - \frac{1}{p}\right)\right) \right] \times L_2^2 \sin^2(\pi L_2 v) \right\}$$

Cette expression permet de calculer la puissance reçue sur un photocapteur qui intègre complètement cet ordre (calcul complet en annexe II) :

$$P_1 = I_i L_1 L_2 \left(\frac{1}{p} \right)^2 \left| l (\overline{A} - \overline{B}) \sin^2\left(\pi l \frac{1}{p}\right) \right|^2 \cos(\theta_1) \text{ avec } \cos(\theta_1) = \cos\left(\arcsin\left(\frac{\lambda}{p}\right)\right)$$

Comparée à la puissance reçue par le photocapteur récupérant une partie de la puissance incidente :

$$P_i = \alpha S_{\text{faisceau laser}} I_i$$

où $S_{\text{faisceau laser}}$ est la surface du faisceau laser (proche de 1.5mm² dans notre cas)

Ces deux puissances permettent de calculer le rapport $\frac{P_1}{P_i}$ qui présente l'avantage d'être indépendant des fluctuations du laser :

$$\frac{P_1}{P_i} = \frac{L_1 L_2}{S_{\text{faisceau laser}}} \left(\frac{1}{p} \right)^2 \left| l (\overline{A} - \overline{B}) \sin^2\left(\pi l \frac{1}{p}\right) \right|^2 \cos(\theta_1)$$

Il est à noter que si l'on réduit la taille du réseau ($L_1 L_2$), cette puissance relative diminue ce qui montre que pour détecter des interactions au format biopuce nous devons développer un montage de diffraction sensible. On note par contre que l'influence de p et l est plus complexe et demande une étude approfondie.

Durant une interaction ce rapport va évoluer. La largeur, la période, la taille du réseau (l, p, L_1) ne vont pas fluctuer. Ce ne sont que $\overline{A}$ et $\overline{B}$ qui fluctuent et sont responsables de la variation de $\frac{P_1}{P_i}$.

Ce modèle nous permet aussi de définir un gain G comme :

$$G = \frac{\left(\frac{P_1}{P_i}\right)_{end} - \left(\frac{P_1}{P_i}\right)_{initial}}{\left(\frac{P_1}{P_i}\right)_{initial}} = \frac{\left[|\overline{A} - \overline{B}|\right]_{end}^2 - \left[|\overline{A} - \overline{B}|\right]_{initial}^2}{\left[|\overline{A} - \overline{B}|\right]_{initial}^2}$$

Il est important de noter que ce gain dépend de la différence d'émission entre les lignes et les creux : $|\overline{A} - \overline{B}|$ avant et après l'interaction. C'est donc le paramètre essentiel qui détecte l'interaction. De plus, si nous considérons que les lignes représentent l'interaction spécifique ($\overline{A}$) et les creux l'interaction non spécifique ($\overline{B}$), la mesure effectuée par le capteur positionné sur l'ordre 1 compare la différence entre ces deux interactions. Ce point est un des atouts de cette technique.

Dans ce paragraphe nous avons présenté les principes du modèle analytique que nous avons développé et qui permet théoriquement de prévoir l'évolution de l'intensité diffractée par un réseau lors de modifications de sa géométrie par interaction spécifique cible/sonde ou non spécifique.

Comme nous le verrons dans le paragraphe III, ce modèle permet de définir les paramètres « maîtrisables » les mieux adaptés à la détection d'interactions spécifiques sans marqueur.

Il nous a aussi permis de proposer deux grandeurs relatives mieux adaptées pour caractériser la détection par un photocapteur qui intègre l'ordre d'interférence 1.

-le rapport entre la puissance récupérée sur l'ordre 1 et la puissance incidente qui s'affranchit des fluctuations du laser (la source). Nous devons rechercher les conditions expérimentales permettant de le rendre maximal ou du moins mesurable avant toute étude.

-le gain du signal G qui est le paramètre qui détecte l'interaction spécifique et qui compare la différence d'interaction de la cible avec la sonde et le substrat.

Ces deux rapports seront la base de l'analyse qui suit en donnant des valeurs précises aux différentes variables.

Dans le paragraphe III, nous nous attacherons à étudier l'influence des différents paramètres contrôlables, « maîtrisables » des réseaux sur les mesures de $\frac{P_1}{P_i}$ et la détection G de l'interaction sondes-cibles.

III. Simulation de la réponse d'un réseau dans le cadre d'une interaction spécifique idéale

Notre modèle est appliqué ici en considérant que l'interaction spécifique est idéale : elle se produit par empilement des molécules cibles sur les molécules sondes. Contrairement à ce qui se fait habituellement, nous considérerons que cet empilement est composé avant l'interaction d'une chimie de surface recouverte des molécules sondes (figure 63 à gauche). Après interaction une couche supplémentaire de molécules cible est venue s'y rajouter (figure 63 à droite).

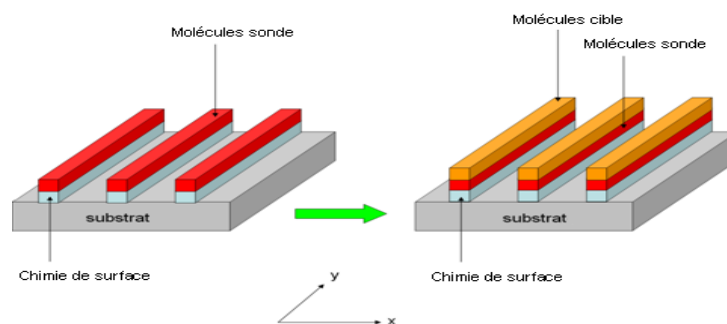


Figure 63 : Schéma représentant une interaction idéale : une couche supplémentaire composée des molécules cible se rajoute à la couche de la chimie de surface et des molécules sonde.

Etudions les variations de puissance relative entre les deux situations : avant puis après l'interaction. L'onde incidente provient d'un laser HeNe (de longueur d'onde 633 nm) et en mode TE, son angle d'incidence est normal au substrat. Ces paramètres sont fixés pour la suite de l'étude car ils correspondent aux valeurs utilisées dans notre dispositif. Nous pouvons remarquer que ces trois variables ont une influence complexe sur la puissance diffractée mais faible sur notre paramètre essentiel qui est le gain sur le signal G .

III.1. Etude de l'influence des autres paramètres « maîtrisables » sur la puissance diffractée avant interaction spécifique

III.1.1. Influence de la largeur des lignes et de la période du réseau

Dans un premier temps, nous avons étudié l'influence de la largeur des lignes (variant de 0 jusqu'à 1100 nm) et de la période du réseau (variant de 800 nm à 1200nm) sur le rapport de puissance diffractée $\frac{P_1}{P_i}$ (Figure 64).

Pour faciliter la lecture de ce document et ne pas le surcharger, chaque figure sera accompagnée d'un tableau précisant les paramètres utilisés dans la simulation.

Comme on pourrait s'y attendre, lorsque les lignes sont de plus en plus fines, la puissance diffractée tend à s'annuler. Cette situation correspond, en effet, au cas extrême où le réseau composé de lignes inexistantes ne diffracte plus. La diffraction du réseau disparaît aussi lorsque la largeur des lignes devient proche de la période. Il est normal qu'il n'y ait plus de diffraction lorsque les lignes du réseau tendent à se rejoindre. Par contre, la puissance diffractée est maximale lorsque le rapport entre la largeur des lignes et la période est proche de 0.5 et ceci quelque soit la période. Ainsi, le critère pour augmenter la puissance diffractée est de faire tendre le rapport entre la largeur des lignes et la période vers 0.5.

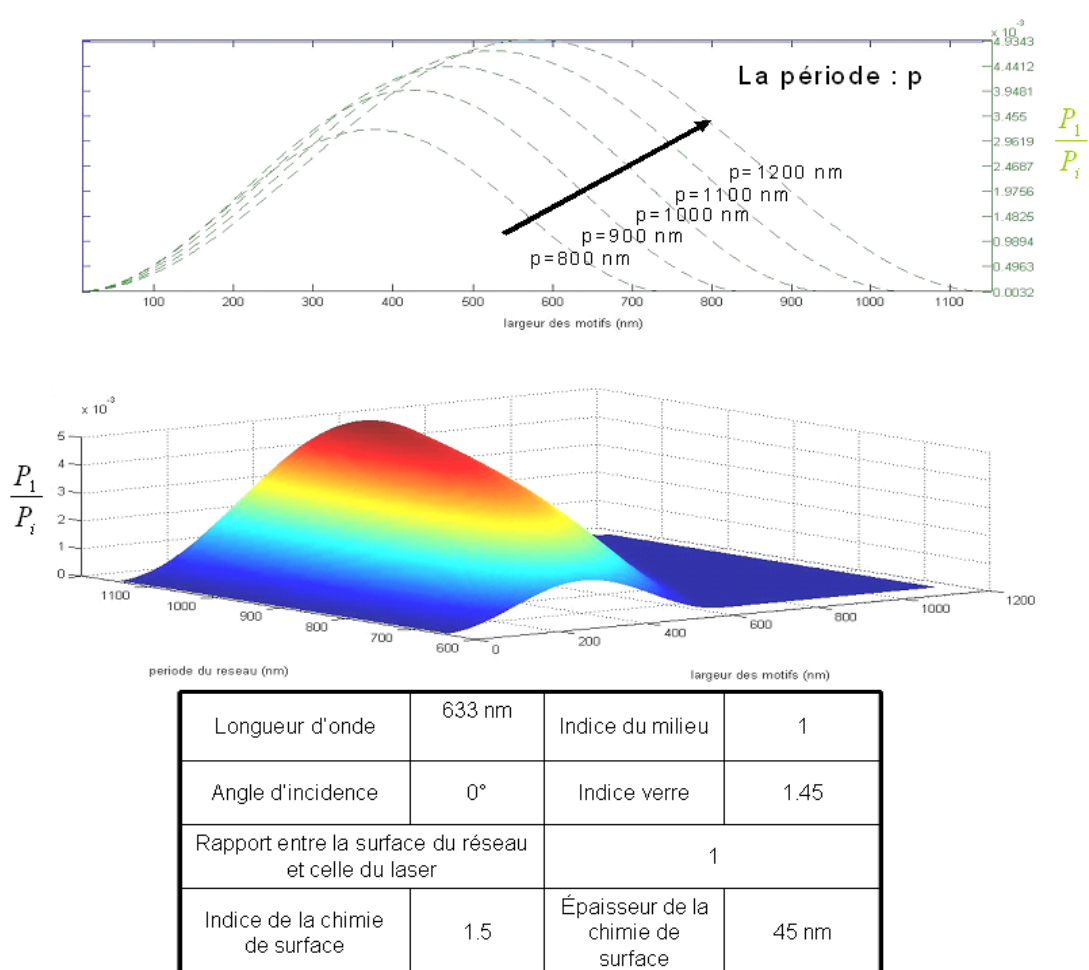


Figure 64 : rapport $\frac{P_1}{P_i}$ de puissances diffractées pour des largeurs de ligne et des périodes différentes image en haut : puissance diffractée en fonction de la largeur des lignes pour 5 valeurs de période. Image en bas : vue en 3D de la puissance diffractée en fonction de la largeur des lignes et de la période

Pour une largeur de ligne donnée, lorsque la période diminue pour tendre vers la longueur d'onde, la puissance de l'ordre 1 chute. Cela se comprend par le fait que plus la période diminue, plus l'angle de sortie de l'ordre 1 tend vers 90° (l'ordre 1 sort tangent au substrat) et va ainsi disparaître. Il est à noter que le formalisme que nous utilisons ne permet pas de modéliser le couplage entre une onde lumineuse incidente et un réseau sub longueur d'onde (dans ce cas la méthode des matrices de transfert doit être alors utilisée uniquement).

Cette étude démontre que pour obtenir un maximum de puissance diffractée et détecter aisément les signaux, il faut utiliser des réseaux dont le pas est proche du double de la largeur des lignes.

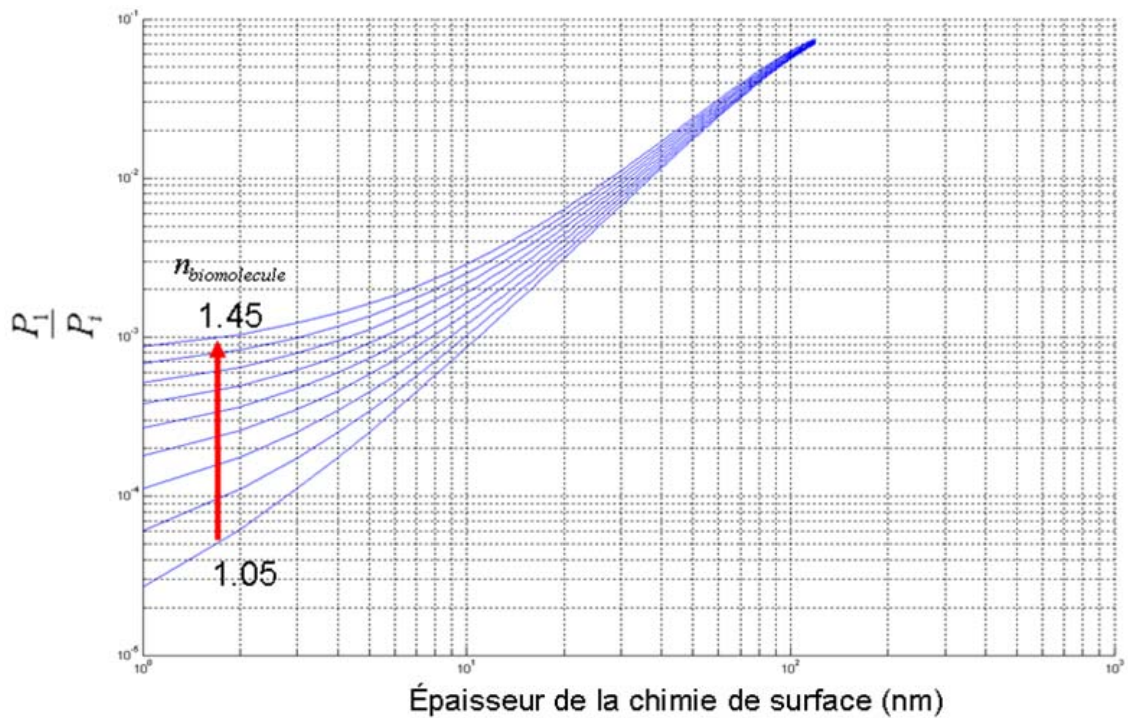
III.1.2. Influence de l'épaisseur de la chimie de surface (dendrimères, streptavidine, ...)

Nous avons retenu pour cette étude des lignes de largeur 500 nm au pas de 1000 nm correspondant à un maximum de $\frac{P_1}{P_i}$ (Figure 64). La Figure 65 présente les variations de ce rapport pour un réseau de lignes composées d'une chimie de surface permettant l'accroche des biomolécules (des dendrimères d'épaisseur variable et d'indice 1.5) et recouvertes de molécules sondes d'indice $n_{\text{biomolécule}}$ sur un substrat de verre (indice : 1.45).

On observe que la puissance diffractée $\frac{P_1}{P_i}$ augmente avec l'épaisseur de la chimie de surface et l'indice des biomolécules sondes. L'influence de l'indice des biomolécules sonde s'atténue aux fortes épaisseurs de chimie de surface.

Cette étude montre qu'il est indispensable d'utiliser des épaisseurs importantes de la chimie de surface surtout lorsque l'indice des biomolécules sonde est faible. Elle nous indique la voie pour obtenir des rapports $\frac{P_1}{P_i}$ mesurables dont les variations relatives pourront être exploitées pour détecter des interactions.

L'origine de cette puissance diffractée (contraste de phase ou d'amplitude entre les lignes et les creux) a été étudiée et est présentée à l'Annexe III.



Longueur d'onde	633 nm	Indice du milieu	1
Angle d'incidence	0°	Indice verre	1.45
Indice de la chimie de surface	1.5	Épaisseur de la chimie de surface	De 0.5 nm à 120 nm
Rapport entre la surface du réseau et celle du laser	1		
Épaisseur des molécules sondes	10 nm	Indice des molécules sondes	De 1.05 à 1.45

Figure 65: puissance diffractée en fonction de l'épaisseur de chimie de surface pour des indices optiques différents de biomolécules sondes

III.2. Etude du gain du signal lors d'une interaction sonde/cible

Après avoir étudié l'influence de la largeur des lignes, du pas et de la chimie de surface sur la puissance mesurée à l'ordre 1, nous nous proposons de simuler ici l'influence de l'épaisseur de la chimie de surface (exemple : dendrimères, streptavidine, ...) et de l'indice des biomolécules sur les variations de cette puissance au cours de l'interaction et toujours à

$\frac{l}{p} = 0.5$. Cette variation est quantifiée par le gain du signal G de notre système de détection.

Pour cela nous avons considéré que l'épaisseur des molécules cibles et sondes est de 10 nm (taille proche de celle d'un anticorps (Figure 66)). De plus, nous avons choisi un indice des molécules sondes identique à celui des molécules cibles (exemple : interaction anticorps / anticorps).

Dans un premier temps, nous observons que le gain de notre système tend à diminuer avec l'épaisseur de dendrimères, quelque soit l'indice des molécules cible et sonde. Ceci se comprend par le fait que la perturbation engendrée par l'interaction (surépaisseur composée de molécules cibles) devient de plus en plus faible lorsque l'épaisseur de la chimie de surface augmente.

Ensuite, nous constatons que l'indice des molécules augmente le gain. On comprend ici aussi que la perturbation engendrée est d'autant plus importante que leur indice optique est élevé.

Nous constatons enfin que nous pouvons atteindre des gains de 20% à 100% pour des épaisseurs de chimie de surface de 10 nm à 20 nm.

Comme pour la puissance diffractée, l'origine du gain a été étudiée et est présentée à l'Annexe IV.

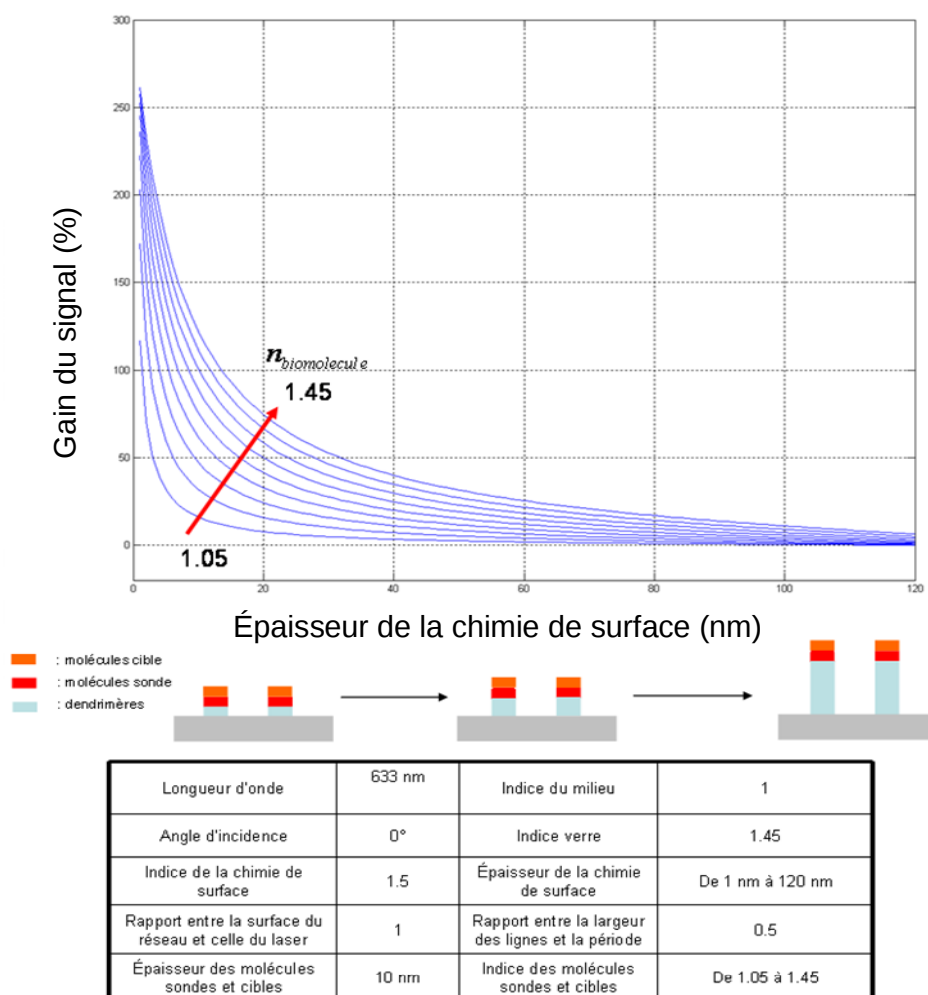


Figure 66 : variation du rapport entre l'ordre 1 et une fraction de la puissance incidente durant l'interaction en fonction de l'épaisseur de dendrimères pour différents indices de molécules cible.

Ces premières simulations nous permettent d'orienter les choix des paramètres maîtrisables :

- **A longueur d'onde, incidence (normale) et taille de réseaux fixées, il est important de choisir un pas de réseau élevé et une largeur des lignes égales à la moitié de ce pas, pour obtenir des signaux associés au pic de diffraction de l'ordre 1 de forte amplitude.**
- **Par contre, le choix de la chimie de surface est plus délicat. Il doit résulter du compromis entre une puissance diffractée importante qui amènerait à augmenter l'épaisseur de la chimie de surface et un gain du signal lors de la détection qui est maximal pour des épaisseurs faibles.**
- **Enfin, plus les indices des molécules cibles et sondes sont élevés meilleure est la détection.**

Les valeurs numériques des puissances relatives ($10^{-2} < \frac{P_1}{P_i} < 10^{-4}$) et du gain obtenues, nous permettent aussi d'affirmer que la détection de l'interaction entre une molécule sonde et une molécule cible par diffraction est accessible. Les études détaillant l'origine de la puissance diffractée et du gain démontrent au lecteur qu'il est possible de réaliser une véritable ingénierie de la détection par le choix des matériaux composant les lignes et les creux. En effet, certains matériaux présentent des propriétés de forte variation d'indice ou d'absorption suivant leur environnement (chimique, lumineux, électrique, magnétique, ...). Ainsi, il peut être imaginé l'utilisation de couches « actives » qui amplifieraient le gain par des variations d'indices de la couche d'accroche.

IV. Etude d'artefacts : les cas d'intervention d'une interaction non spécifique

Jusqu'à présent nous avons considéré que l'interaction est spécifique c'est-à-dire que le greffage des molécules cibles a lieu uniquement sur les lignes. Or, pour de multiples raisons (dénaturation de la molécule cible, mauvais choix de la molécule sonde, imperfection de la chimie de surface, ...), il peut arriver que l'interaction spécifique soit superposée ou pas à une interaction non spécifique, c'est-à-dire que le dépôt ait lieu dans l'intervalle entre les lignes du réseau (les creux). Nous allons donc étudier la réponse d'une biopuce diffractante

dans deux cas de non spécificité d'interaction. Le premier concerne la superposition de l'interaction spécifique sur les lignes avec un dépôt non spécifique dans les creux. Le second cas concerne une interaction non spécifique par dépôt unique dans les creux.

IV.1. Les biomolécules cibles se déposent sur les lignes et les creux

Ce cas, schématisé sur la Figure 67, signifie que l'interaction a bien eu lieu mais qu'une interaction non spécifique existe entre les molécules cible et les creux. Ces derniers sont composés soit du substrat, soit d'une chimie de surface que l'on aurait souhaité non adhésive.

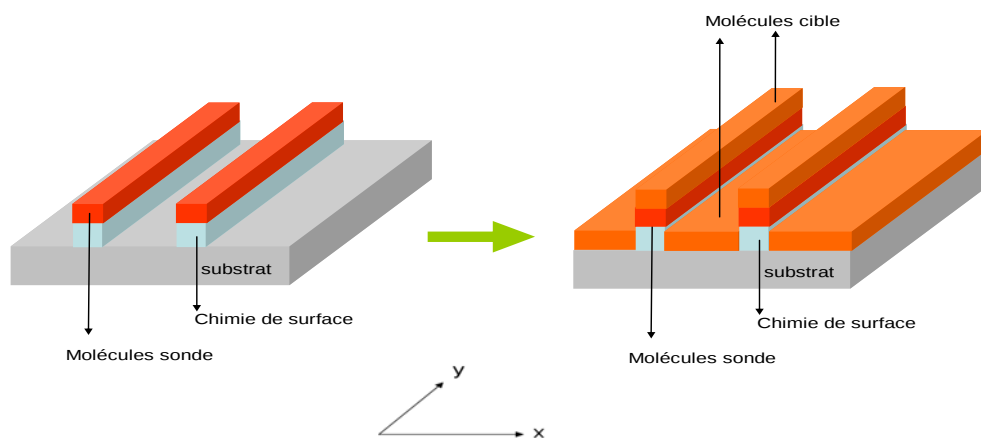
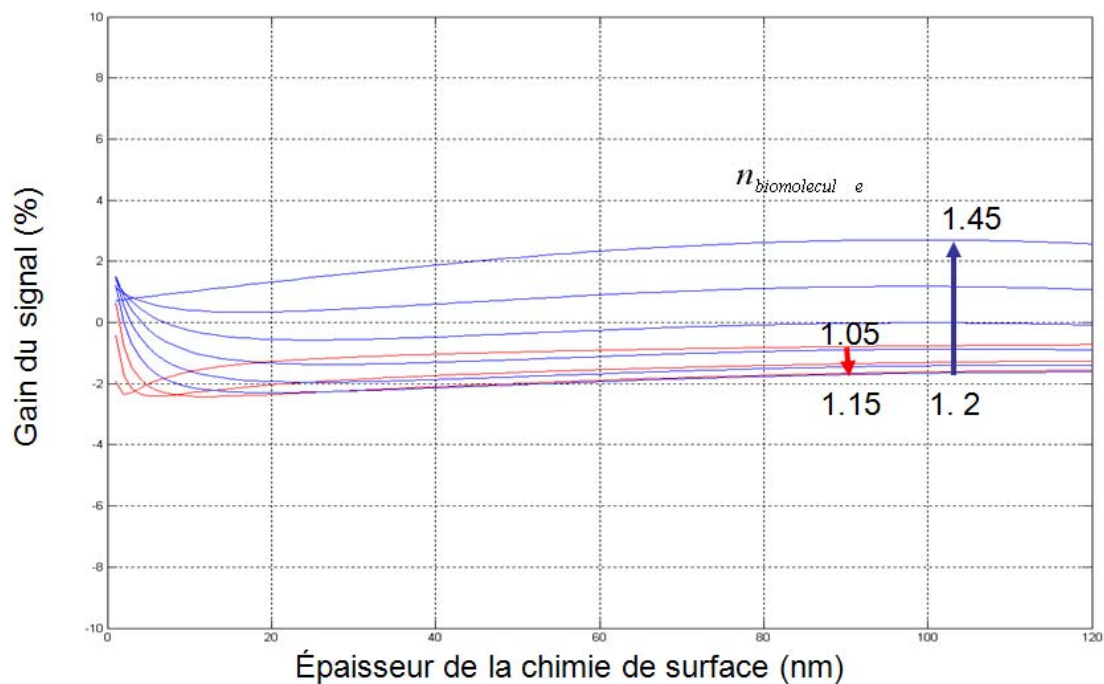


Figure 67 : schéma représentant une interaction spécifique entre les lignes et les biomolécules superposée à une interaction non spécifique ayant lieu entre les molécules cible et les creux du réseau

Lorsque cette situation est étudiée (Figure 68), on remarque une très faible valeur du gain de la biopuce et ceci quelque soit l'épaisseur de dendrimères (+/- 2% de variation au cours de l'interaction) et l'indice des biomolécules. Il y a une forte probabilité que ce gain soit inférieur ou du même ordre de grandeur que l'erreur de mesure de la puissance de l'ordre 1. Ainsi, on peut considérer que ce cas n'engendre pas de variation du signal de diffraction au cours de l'interaction.

Ce résultat est évident car l'émission des ondes lumineuses provenant des lignes est compensée (car opposée) par celle des creux.



Longueur d'onde	633 nm	Indice du milieu	1
Angle d'incidence	0°	Indice verre	1.45
Indice de la chimie de surface	1.5	Épaisseur de la chimie de surface	De 0.5 nm à 120 nm
Rapport entre la surface du réseau et celle du laser	1		
Épaisseur des molécules sondes et cibles	10 nm	Indice des molécules sondes et cibles	De 1.05 à 1.45

Figure 68 : Evolution du gain G du système diffractif lors de la superposition d'une interaction spécifique avec une interaction non spécifique entre les molécules cibles et les molécules sondes des lignes et les creux en fonction de l'épaisseur de la chimie de surface pour différents indices des biomolécules

Une superposition d'une interaction spécifique et non spécifique est non détectable par diffraction.

IV.2. Les biomolécules cibles se déposent dans les creux

Dans cette configuration, l'interaction spécifique souhaitée n'a pas eu lieu. Seule une interaction non spécifique a seulement lieu dans les creux (Figure 69). Les creux ont tendance à être comblés et le réseau tend à disparaître.

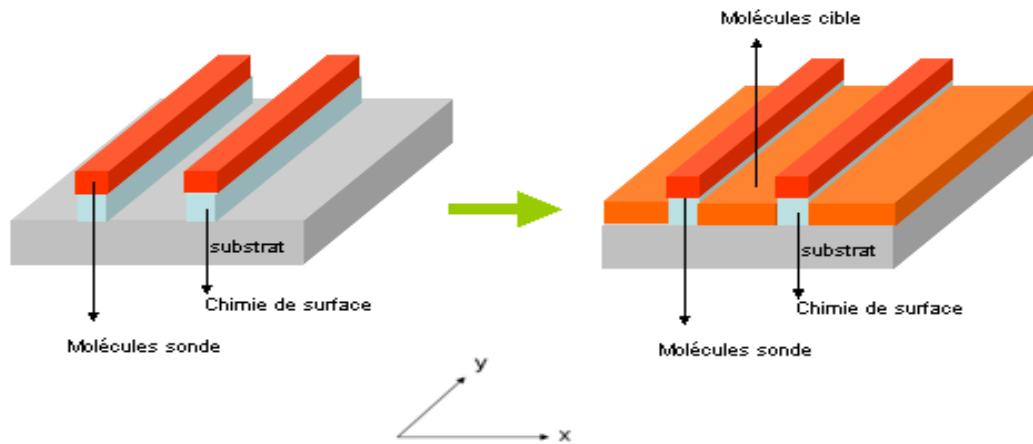
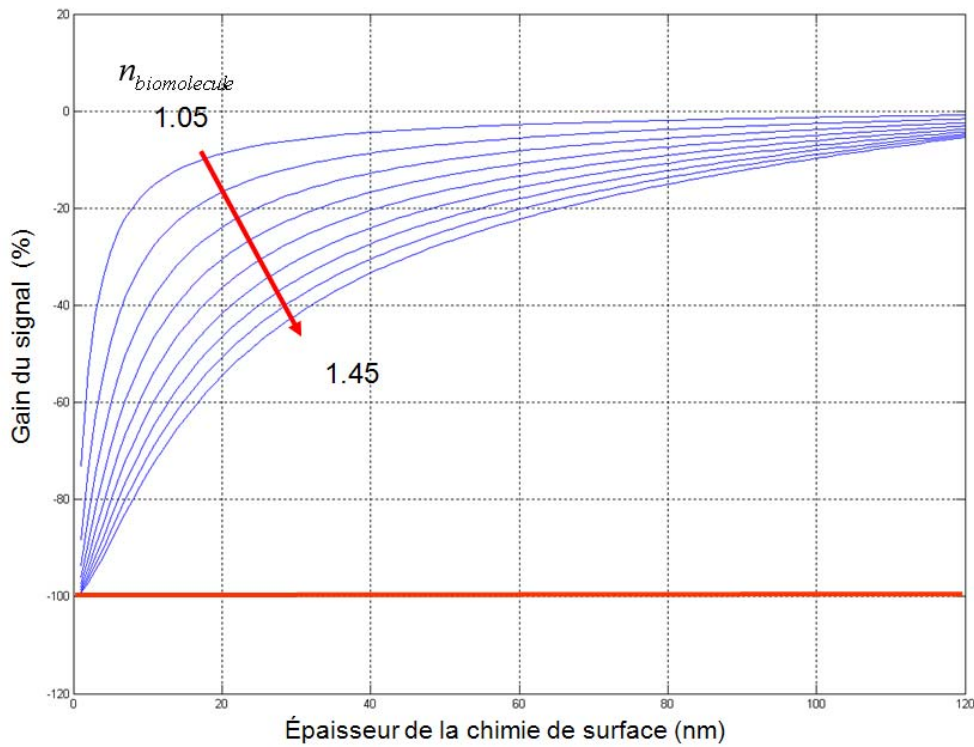


Figure 69 : schéma représentant une interaction non spécifique qui a lieu uniquement entre les molécules cible et les creux du réseau

Toujours pour $\frac{l}{p} = 0.5$ et $p = 1000nm$, on remarque que le gain G , pour de faibles valeurs d'épaisseur de la chimie de surface, est proche de -100% (Figure 70). Etant donné la définition du gain $G = \frac{\left(\frac{P_1}{P_i}\right)_{end} - \left(\frac{P_1}{P_i}\right)_{initial}}{\left(\frac{P_1}{P_i}\right)_{initial}}$, lorsque la puissance diffractée après

interaction est nulle, le gain est de -100% (ligne rouge sur la Figure 69). En outre, on constate que le gain tend vers 0% lorsque la couche de la chimie de surface croît. Dans ce cas, l'influence du dépôt non spécifique dans les creux, fixée à 10 nm, est moins importante comparée à celle des lignes qui augmente avec l'épaisseur de la chimie de surface. L'indice des biomolécules ne fait qu'atténuer l'inflexion de la courbe lorsqu'il augmente.

En résumé, la technique permet de détecter aussi bien une interaction non spécifique ($G < 0$) qu'une interaction spécifique ($G > 0$) et ceci pour de faibles épaisseurs de la chimie de surface. Le cas où les deux interactions se superposent n'est pas détectable. L'interaction non spécifique seule est d'autant mieux détectable que l'épaisseur de la chimie de surface est faible et l'indice des biomolécules élevé.



Longueur d'onde	633 nm	Indice du milieu	1
Angle d'incidence	0°	Indice verre	1.45
Indice de la chimie de surface	1.5	Épaisseur de la chimie de surface	De 0.5 nm à 120 nm
Rapport entre la surface du réseau et celle du laser	1		
Épaisseur des molécules sondes et cibles	10 nm	Indice des molécules sondes et cibles	De 1.05 à 1.45

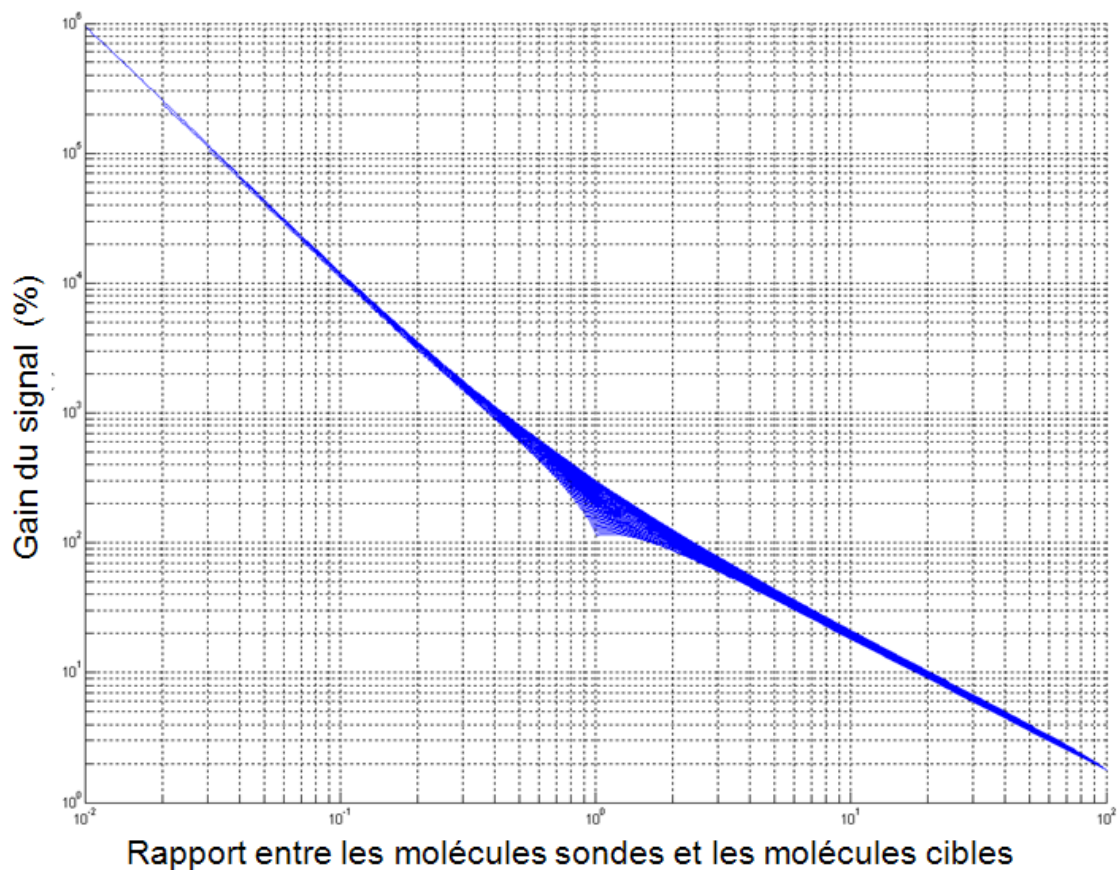
Figure 70 : gain G du système diffractif lors d'une interaction non spécifique entre les molécules cible et les molécules sondes des lignes

V. Influence de la taille de la molécule sonde par rapport à celle de la molécule cible

Nous avons constaté au paragraphe 2 Figure 66 que le gain G de la biopuce était le plus important lorsque la couche composée de la chimie de surface était la plus fine possible.

Nous étudions donc ici plus spécifiquement le cas limite idéal où cette chimie de surface des lignes (la couche de dendrimères ou de streptavidine) n'est pas utile pour fixer les molécules sondes cibles et est donc inexistante. La variation du gain est étudiée en fonction du rapport entre la taille de la molécule sonde et celle de la molécule cible sur la Figure 71,

toujours dans le cas où $\frac{l}{p} = 0.5$ et $p = 1000nm$.



Longueur d'onde	633 nm	Indice du milieu	1
Angle d'incidence	0°	Indice verre	1.45
Indice de la chimie de surface	1.5	Épaisseur de la chimie de surface	0 nm
Rapport entre la surface du réseau et celle du laser		1	
Épaisseur des molécules sondes et cibles	De 0.5 à 100 nm	Indice des molécules sondes et cibles	1.3

Figure 71 : gain G du système en fonction du rapport entre la taille des molécules sonde et la taille des molécules cible

Pour cela nous avons supposé que la taille de molécules était corrélée avec l'épaisseur de sa couche déposée sur le substrat de cette même molécule.

Nous constatons que le gain G diminue avec ce rapport. Plus la molécule sonde est petite vis-à-vis de la molécule cible, meilleur est le gain G . Il peut atteindre 10^4 , 10^5 , $10^6\%$. Ce comportement est l'opposé de celui de la puissance diffractée car nous avons montré dans un calcul non présenté ici que plus la molécule sonde est petite plus la puissance diffractée

$\left(\frac{P_1}{P_i}\right)_{avant}$ est faible.

On remarque d'autre part que des rapports inférieurs à l'unité (taille de la molécule sonde inférieure à celle de la molécule cible) conduisent à des gains très importants.

Ainsi, le choix de la molécule sonde et plus particulièrement de sa taille, vis-à-vis de la molécule cible est un paramètre à optimiser afin de permettre la détection de la puissance à l'ordre 1 tout en conduisant à un grand gain G . Nous devons privilégier des tailles de molécules sondes les plus faibles possibles.

VI. Complexification du modèle : l'interaction entraîne une croissance latérale des lignes

Jusqu'à présent, nous avons considéré que le dépôt ne se réalise que verticalement. Or, il nous a semblé intéressant de considérer le cas où le dépôt engendrerait, en plus d'un dépôt vertical, un élargissement des lignes (de la taille des molécules cibles). Nous avons considéré que les molécules sondes se fixent aussi latéralement aux lignes composées de la chimie d'accroche (Figure 72).

Cette configuration émane de l'utilisation des dendrimères comme chimie de surface et qui permettent par leur structure en arborescence l'accroche latérale. En effet, un grand nombre de sites permettant l'accroche des molécules sondes est disponible sur un dendrimère (un dendrimère de génération 4 présente 64 sites d'accroche).

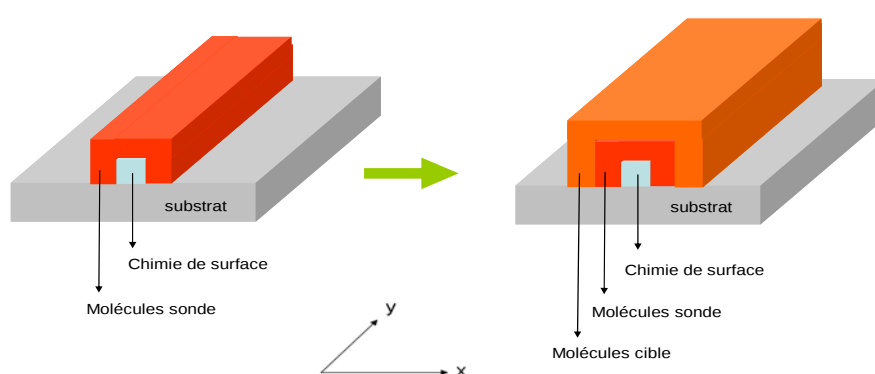


Figure 72 : schéma représentant l'effet de l'interaction avec élargissement des lignes. Une couche supplémentaire composée des molécules cible se rajoute à la couche de la chimie de surface et des molécules sonde verticalement et latéralement.

Afin de modéliser cet élargissement, il faut rajouter au modèle précédent deux empilements de couches pour chaque côté d'une ligne que l'on nommera $\bar{C}$ (entourées en vert sur la Figure 73).

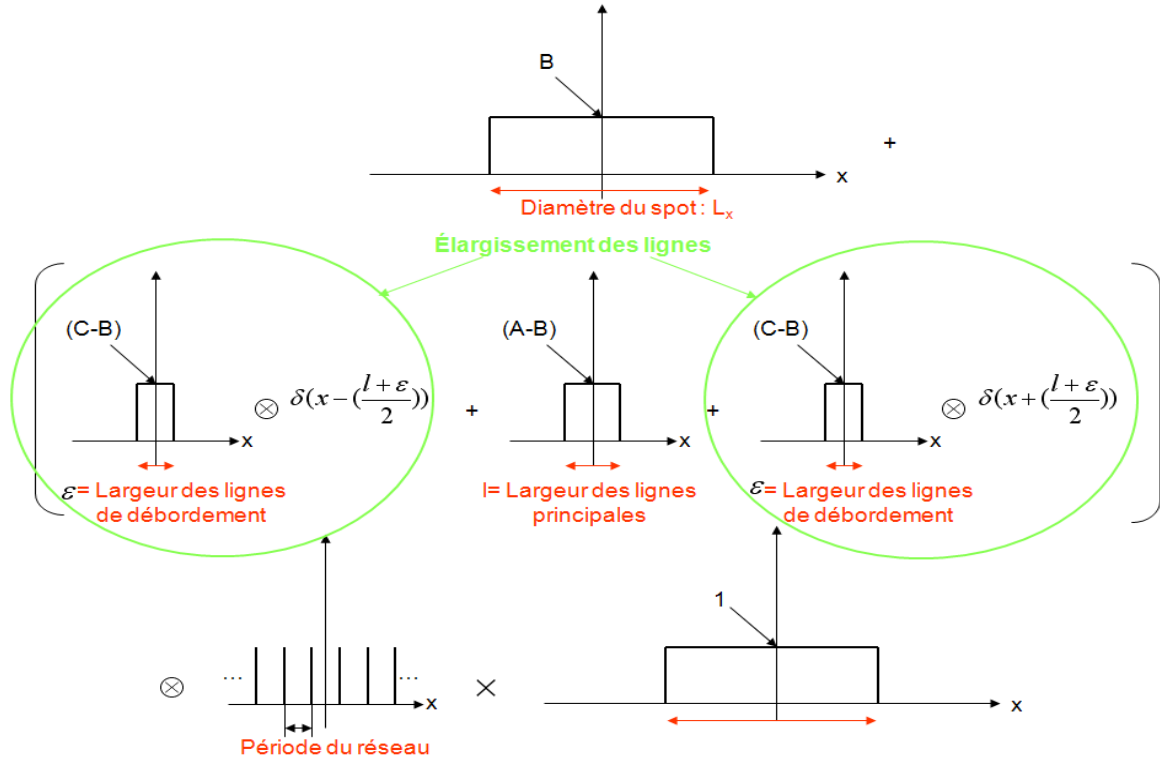


Figure 73 : représentation schématique permettant la modélisation de l'élargissement des lignes durant l'interaction

La démarche est exactement la même qu'au paragraphe 2.1. Elle permet de trouver le rapport entre la puissance de l'ordre 1 et la puissance incidente par

$$\frac{P_1}{P_i} = \frac{L_1 L_2}{S_{laser}} \left(\frac{1}{p} \right)^2 \left| l(\bar{A} - \bar{B}) \sin c\left(\pi l \frac{1}{p}\right) + 2\varepsilon(\bar{C} - \bar{B}) \cos\left(\frac{\pi(l + \varepsilon)}{p}\right) \sin c\left(\pi \varepsilon \frac{1}{p}\right) \right|^2 \cos(\theta_1)$$

où ε est le demi-élargissement d'une ligne.

On remarque que la modélisation de cet élargissement amène le terme supplémentaire:

$$2\varepsilon(\bar{C} - \bar{B}) \cos\left(\frac{\pi(l + \varepsilon)}{p}\right) \sin c\left(\pi \varepsilon \frac{1}{p}\right) \quad [2]$$

qui est déterminé, en plus de $\bar{A}$ et $\bar{B}$ par l'émission de l'empilement des couches représentant la surépaisseur $\bar{C}$. De plus, on remarque que le terme de [2] $\cos\left(\frac{\pi(l + \varepsilon)}{p}\right)$

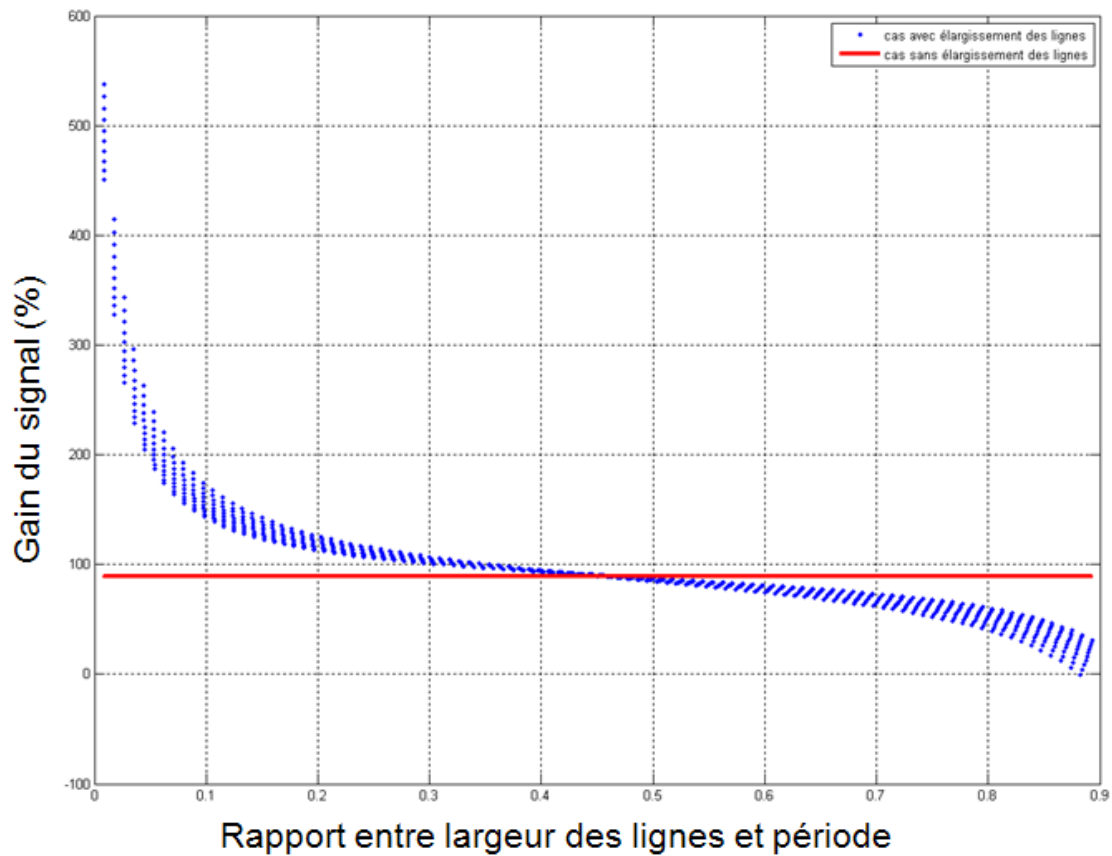
traduit l'influence de l'élargissement vis-à-vis du rapport $\frac{l}{p}$.

Le calcul de l'évolution du gain G pour des valeurs de ε croissantes en fonction de $\frac{l}{p}$ à chimie de surface fixée est présenté sur la Figure 74. Nous observons tout d'abord que le gain est maximal pour des rapports $\frac{l}{p}$ faibles. Ce résultat est logique car une augmentation de 10 nm d'une largeur de ligne de 10nm engendre une variation de largeur de 100% alors que la même augmentation sur une largeur de ligne de 500nm engendre une augmentation de 2%. Ainsi, lorsqu'on est proche d'un rapport $\frac{l}{p}$ de 0.5, le gain est équivalent à celui du cas sans élargissement (ligne rouge sur la Figure 74). Lorsqu'on augmente ensuite ce rapport, le gain chute et peut être négatif. Ceci est dû au fait que pour des largeurs importantes, les creux du réseau sont proches d'être comblés. Ainsi, la puissance diffractée diminue et le gain devient négatif.

Nous avons de plus tracé les variations du gain en fonction de l'épaisseur de dendrimères pour différents indices optiques des biomolécules (Figure 75) dans le cas d'un réseau de rapport largeur/période de 0.1 pour différents indices de biomolécules (situation représentée par la flèche rouge sur la Figure 75).

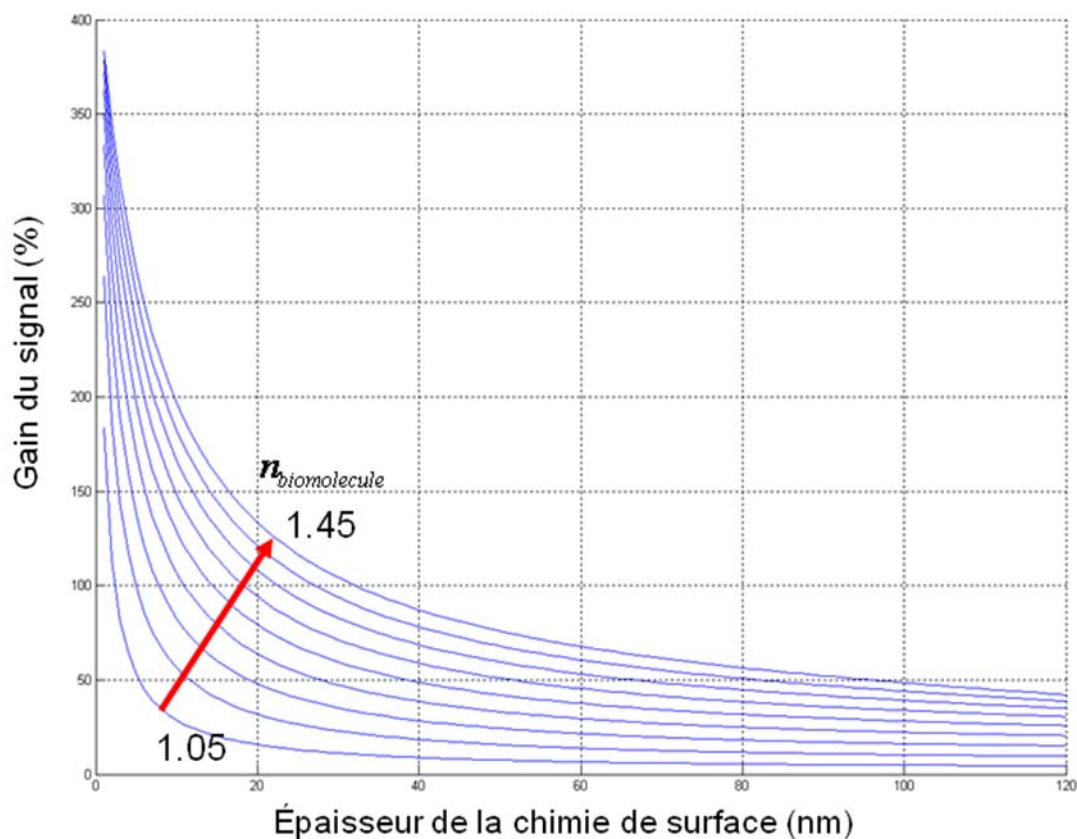
Nous observons des tendances comparables au cas d'une interaction spécifique sans élargissement mais avec des valeurs de gain plus importantes. Cette différence s'explique par le fait que l'augmentation des couches superposées et l'élargissement des lignes sont deux phénomènes qui tendent à augmenter le gain et sont donc additifs.

En résumé, un dépôt spécifique vertical et horizontal sur les lignes, entraîne un plus grand gain comparé au cas où il n'est que vertical. Ceci est vrai pour un rapport entre la largeur des lignes et la période inférieur à 0.5.



Longueur d'onde	633 nm	Indice du milieu	1
Angle d'incidence	0°	Indice verre	1.45
Indice de la chimie de surface	1.5	Épaisseur de la chimie de surface	14 nm
Rapport entre la surface du réseau et celle du laser	1	Rapport entre la largeur des lignes et la période	De 0.01 à 0.85
Épaisseur des molécules sondes et cibles	10 nm	Indice des molécules sondes et cibles	1.35

Figure 74 : Evolution du gain G du système de détection diffractif en fonction du rapport entre la largeur des lignes et la période du réseau. En bleu : cas avec élargissement des lignes, en rouge : cas sans élargissement.



Longueur d'onde	633 nm	Indice du milieu	1
Angle d'incidence	0	Indice verre	1.45
Indice de la chimie de surface	1.5	Épaisseur de la chimie de surface	De 0.5 nm à 120 nm
Rapport entre la surface du réseau et celle du laser	1	Rapport entre la largeur des lignes et la période	0.1
Épaisseur des molécules sondes et cibles	10 nm	Indice des molécules sondes et cibles	De 1.05 à 1.45

Figure 75 : gain G de la biopuce dans le cadre d'un élargissement des lignes en fonction de l'épaisseur de la chimie de surface et pour différents indices de biomolécules.

VII. Les états « bio-logiques » et physiques de la biopuce diffractante

Nous avons noté dans les paragraphes 3 et 4 que la détection par diffraction peut être la résultante de deux phénomènes parallèles. Le premier est l'interaction spécifique entre les molécules cibles et les molécules sondes. Le deuxième correspond à l'interaction des molécules cibles avec la matière qui compose les creux (le substrat ou une chimie de surface

particulière). Ainsi, suite à une interaction sonde/cible, la biopuce peut présenter 4 états (cf. Tableau 3)

état de la biopuce	Interaction molécules cible / ligne	Interaction molécules cible / creux
1-1	oui	oui
1-0	oui	non
0-1	non	oui
0-0	non	non

Tableau 3 : les quatre états biologiques possibles de la biopuce diffractante après interaction.

Le report des tracés de l'évolution du gain G de la biopuce en fonction de l'épaisseur de la chimie de surface dans les 4 situations modélisées précédemment (Figure 76), nous permet de remarquer que les deux états 1-1 et 0-0 ne peuvent pas être discriminés. Ainsi, nous pouvons distinguer trois états physiques de la biopuce après interaction sonde/cible. Ces courbes montrent qu'il est plus aisé de les distinguer par leur différent gain pour de faibles épaisseurs de dendrimères :

- états 1-1 et 0-0 : G proche de 0
- état 1-0 : G très grand et positif
- état 0-1 : G négatif

Ces courbes démontrent que nous avons intérêt à ne pas utiliser de chimie de surface ou à défaut à ne l'utiliser que lorsque les molécules sondes sont de taille trop faible pour être détectées. Cette chimie de surface devra être dans ce cas de faible épaisseur.

Dans les biopuces conventionnelles (fluorescentes par exemple), il n'existe que deux états de la biopuce : il y a eu dépôt (état 1) ou non (état0) sur la surface composée de molécules sonde. Il est alors nécessaire de réaliser avec cette technique des tests dits « négatifs » afin de vérifier la spécificité de l'interaction. Ces deuxièmes tests sont effectués sans les molécules sondes. Ainsi, deux expériences sont à réaliser alors que la biopuce diffractante permet en une seule mesure de différencier les interactions spécifiques et non spécifiques. Nous remarquons aussi que l'interaction spécifique conduisant à un élargissement des lignes est la plus efficace.

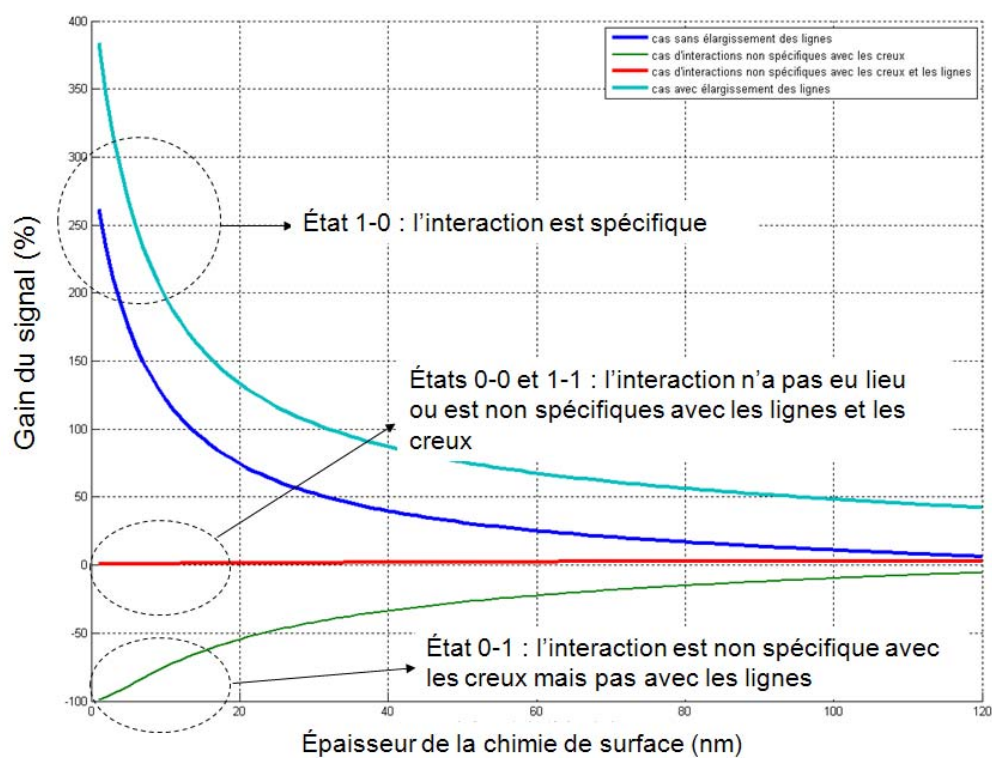


Figure 76 : gain G de la biopuce en fonction de l'épaisseur de dendrimères. 3 états d'interaction peuvent être mis en évidence.

Résumé :

1. Nous avons développé un modèle analytique général qui nous a permis d'optimiser les différents paramètres maîtrisables d'une biopuce diffractante sollicitée en réflexion. Ses résultats présentés en partie dans les paragraphes précédents sont résumés dans le tableau suivant :

<i>Cas simulé</i>	<i>Lorsque les paramètres ci-dessous augmentent :</i>	<i>La tendance sur la puissance diffractée à l'ordre 1 est :</i>	<i>La tendance sur le gain G est :</i>
Une interaction spécifique sur les lignes (cas 1-0)	Largeur du réseau	croissante	Sans influence
	Rapport largeur des lignes / période	croissante de 0 à 0.5 décroissante de 0.5 à 1 (a)	Sans influence
	Epaisseur de la chimie de surface	croissante	décroissante (tend vers 0) (b)
	Rapport entre les molécules cibles et sondes	-	Croissante (c)
	Indice des biomolécules	croissante	croissante
Une interaction spécifique sur les lignes avec élargissement	Epaisseur de la chimie de surface	Croissante (non montrée)	Décroissante (b)
	Indice des biomolécules	Croissante (non montrée)	croissante
	Rapport entre la largeur des lignes / période	croissante de 0 à 0.5 et décroissante de 0.5 à 1 (a)	décroissante
Une interaction non spécifique sur les creux (cas 0-1)	Indice des biomolécules	-	négative et décroissante
	Epaisseur de la chimie de surface	croissante (non montrée)	Négative et croissante (tend vers 0) (b)
Une interaction non spécifique sur les creux et spécifique sur les lignes (cas 1-1)	Epaisseur de la chimie de surface	croissante (non montrée)	Sans influence
	Indice des biomolécules	-	Sans influence

L'examen de ce tableau donne la démarche qualitative à suivre pour conduire une expérience de détection par diffraction d'une interaction entre une molécule sonde et une molécule cible. Nous avons intérêt à choisir :

- des dimensions de réseau importantes pour obtenir un signal $\frac{P_1}{P_i}$ détectable.
- Un rapport entre la largeur des lignes et la période inférieur et proche de 0.5 d'après les remarques (a)
- Une épaisseur de chimie de surface faible (b)
- un rapport entre les tailles des molécules cibles et sondes élevé (c) et donc choisir des molécules sondes de taille faible par rapport à celle des molécules cibles à détecter.

2. Cette première expérience permet d'exploiter l'intérêt de la biopuce diffractante. En effet, nous avons mis en évidence qu'elle distingue en une mesure trois états essentiels d'interaction biologique (interaction spécifique, non spécifique et aucune interaction couplée avec une interaction spécifique et non spécifique).

3. L'interaction biologique spécifique étant identifiée par l'analyse à 3 états, deux diagrammes en croix permettent ensuite d'optimiser le choix du rapport $\frac{l}{p}$ et de l'épaisseur de la chimie de surface à utiliser.

La Figure 77 présente l'optimisation du rapport $\frac{l}{p}$. La Figure 77(b) qui donne les variations

du gain G en fonction de $\frac{P_1}{P_i}$ démontre que pour maximiser G (400% dans notre cas) pour un

rapport $\frac{P_1}{P_i}$ mesurable avec un montage permettant de détecter une puissance relative de 10^{-4}

nous devons choisir un rapport $\frac{l}{p}$ de 0,15 (trajets en pointillé vert). Cette figure permet aussi

une analyse plus globale. Partant des caractéristiques du montage expérimental de diffraction donnant la limite inférieure de $\frac{P_1}{P_i}$, ce tracé nous permet d'éliminer les domaines de variations

de $\frac{l}{p}$ non adaptés et de choisir la valeur toujours inférieure à 0,5 conduisant à G la plus élevée.

Elle nous permet enfin de remarquer que la valeur de $\frac{l}{p}=0,5$ est un bon compromis expérimental : une puissance élevée associée à un bon gain (300%).

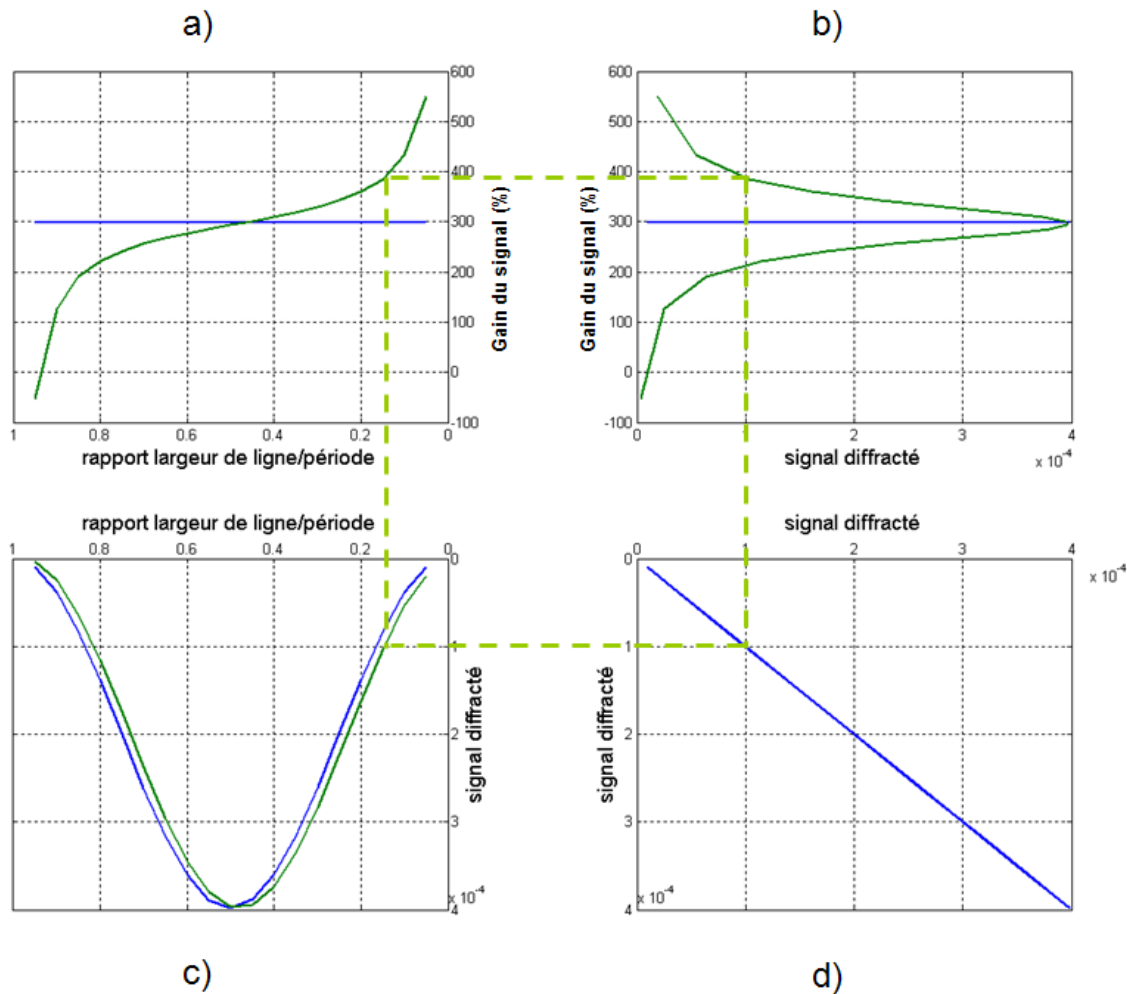


Figure 77 : synthèse des graphes permettant le choix du rapport entre la largeur des lignes et la période $\frac{l}{p}$.

- En bleu : cas d'une interaction n'entraînant pas de surépaisseur
- En vert : cas d'une interaction entraînant une surépaisseur

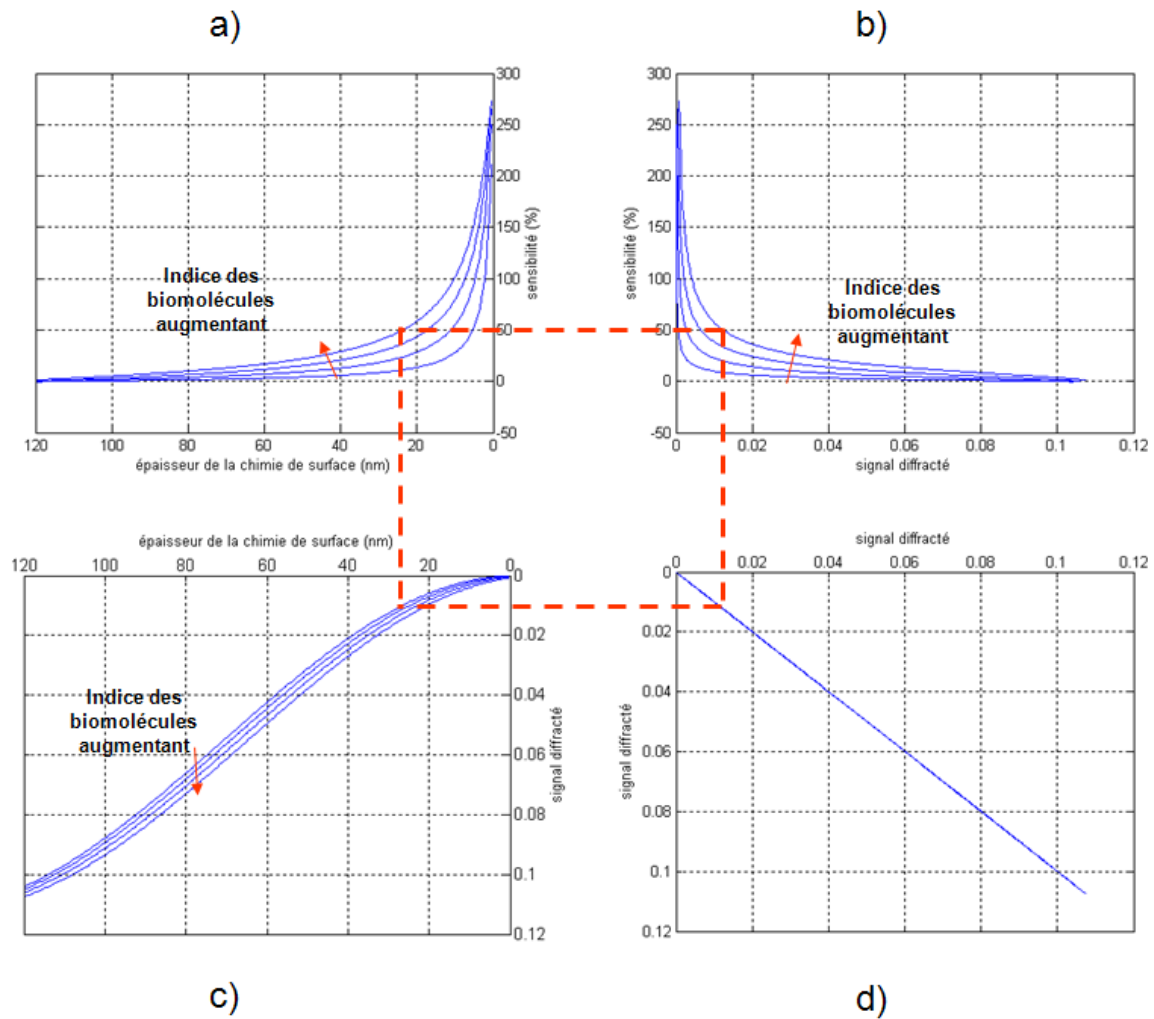


Figure 78 : synthèse des graphes permettant le choix de l'épaisseur de la chimie de surface

La Figure 78 nous permet d'optimiser l'épaisseur de la chimie de surface et de comprendre l'importance de l'indice des biomolécules qui la composent. La Figure 78(b) démontre que l'obtention d'un grand gain G n'est possible qu'à condition de pouvoir détecter des signaux faibles. Elle montre de plus que ce grand gain G ne peut être obtenu que par une chimie de surface de faible épaisseur et des indices des biomolécules élevés.

Cette figure permet aussi une analyse globale. Les caractéristiques du montage expérimental $\frac{P_1}{P_i} > 1.2 \times 10^{-2}$ (pointillés) déterminent le gain maximal qu'il permet d'atteindre fixent l'épaisseur de la chimie de surface la plus adaptée à la détection (25nm).

Nous venons de démontrer que la simulation est essentielle pour étudier à peu de frais toutes les situations et définir ainsi les choix qualitatifs des paramètres maîtrisables.

CHAPITRE III : DEVELOPPEMENT DE TECHNIQUES EXPERIMENTALES GENERIQUES

Les résultats numériques obtenus au chapitre II démontrent qu'il est théoriquement possible de détecter ou de suivre l'association entre une molécule sonde et une molécule cible par la technique sans marquage des réseaux de diffraction à condition de choisir judicieusement leurs paramètres. La suite de ce travail de doctorat est de vérifier expérimentalement ces prévisions. Pour cela nous devons disposer de réseaux diffractifs de sondes et d'un montage de diffraction adapté à l'étude de l'association sonde-cible au format d'une biopuce. Nous avons donc tout naturellement été conduits à utiliser d'une part la technique de tamponnage moléculaire appelé *micro contact printing* (μ CP) pour la réalisation de réseaux moléculaires (chimiques ou biochimiques de sondes) et d'autre part à construire un montage de diffraction qui mesure de manière automatique le rapport $\frac{P_1}{P_i}$ représentant le signal relatif de diffraction défini au chapitre II. Ce montage est ensuite adapté à l'étude des biopuces diffractantes. La description détaillée de ces deux développements techniques mais aussi celle de la stratégie à adopter lors de l'acquisition des signaux font l'objet de ce chapitre.

I. Mise au point du procédé de réalisation de réseaux de molécules (chimiques ou biologiques) par micro contact printing

La technique générique de μ CP est retenue pour sa simplicité de mise en œuvre et son bas coût. Son principe, présenté sur la Figure 79 est celui du tampon encreur. Il comprend les quatre étapes qui sont décrites par la suite :

1. La réalisation d'un moule généralement en silicium (réutilisable)
2. Le moulage sur celui-ci d'un timbre en élastomère (PDMS)
3. L'encreage de ce timbre par les molécules chimiques ou les biomolécules sondes
4. L'impression du timbre c'est-à-dire le transfert des molécules chimiques ou biologiques sur le substrat

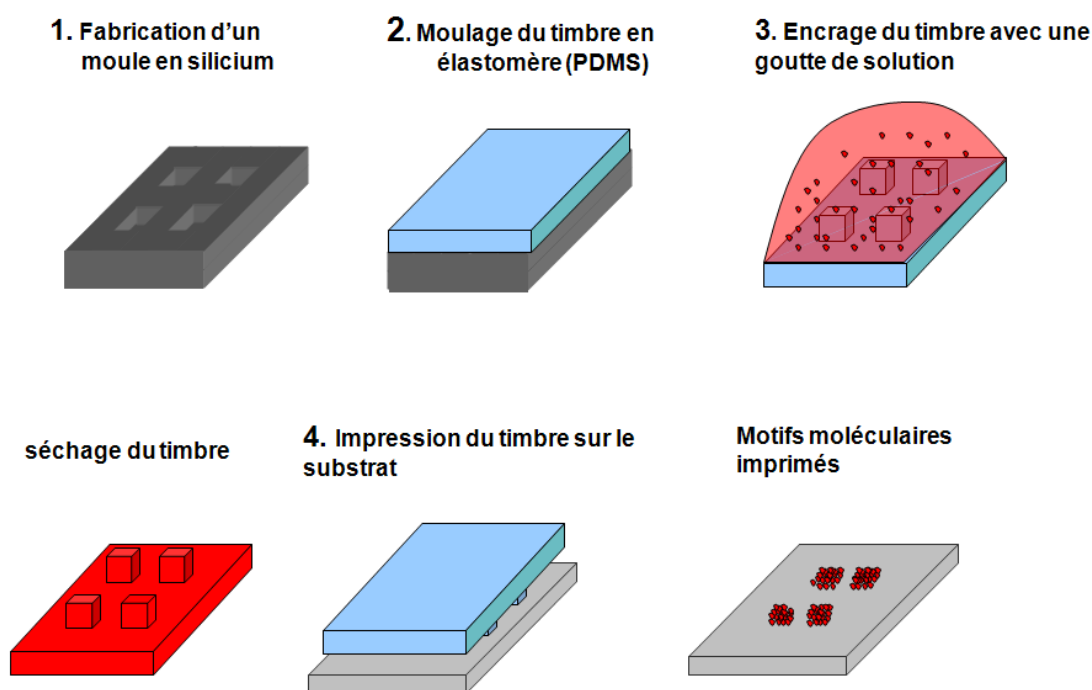


Figure 79 : schéma représentant les différentes étapes du micro contact printing (μ CP)

I.1. Le moule

La première étape d'un procédé de dépôt par micro contact printing (μ CP) consiste à réaliser un moule en silicium réutilisable. Cette étape repose sur la technologie performante mais onéreuse de lithographie électronique (*electronic beam lithography* : *EBL*). Un wafer en silicium est recouvert d'une couche de résine PMMA, d'épaisseur de 150 nm dont la

solubilité dans le mélange de solvants MIBK/IPA est augmentée sous l'effet d'irradiations électroniques.

Nous « insolons », à l'aide du masqueur électronique du LAAS (RAITH 150), des réseaux de diffraction sur cette résine puis dissolvons ces zones dans le solvant. Ensuite par gravure ionique réactive (RIE) nous obtenons le moule par transfert de ces motifs nanométriques dans le silicium. Comme la résine possède une vitesse de gravure légèrement inférieure à celle du silicium, il est possible de graver une épaisseur de Si de 270 nm en partant d'une épaisseur initiale de résine de 150nm. Le moule est obtenu après élimination complète de la résine.

A titre d'exemple, nous présentons l'application de ce procédé à la réalisation de réseaux de diffraction de $400\mu\text{m}$ par $400\mu\text{m}$, composés de lignes, dont le pas est $1\mu\text{m}$ et leur largeur soit de 440nm (Figure 80.A) soit de 740 nm (Figure 80.B). La mesure de la profondeur de gravure est obtenue en inclinant les substrats de 30° lors de l'observation par MEB. Sur les figures C et D, nous mesurons la projection de la hauteur des flancs de gravure. Nous obtenons la profondeur des motifs en la divisant par $\sin(30^\circ)=0,5$. Nous évaluons cette profondeur entre 260 nm et 280 nm.

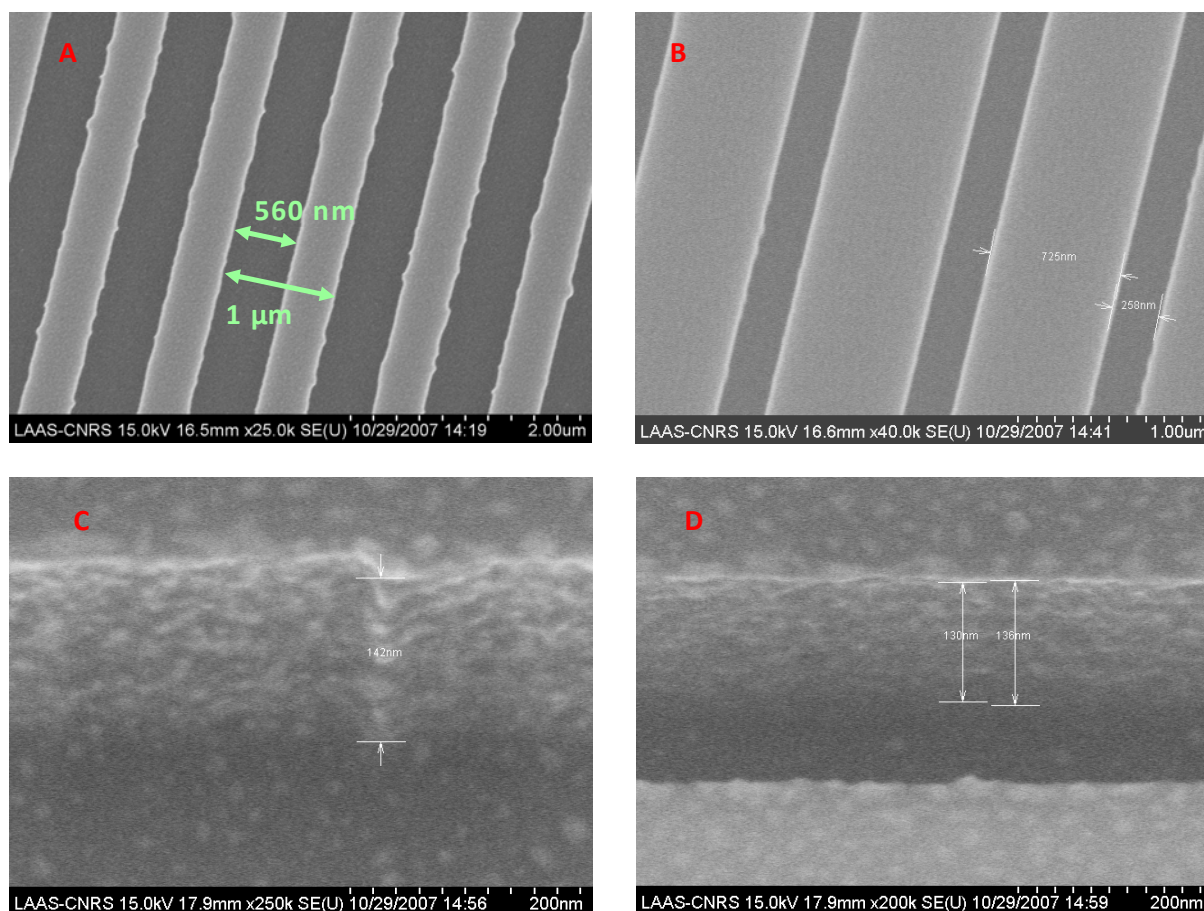


Figure 80 : images réalisées au MEB des moules en silicium de réseaux composés de lignes espacées de $1\mu\text{m}$ et de largeur (pour les creux) : A) 440nm B) 740nm. Les images des flancs de gravure C) et D) sont réalisées avec une inclinaison du substrat de 30° .

Nous venons de montrer que ce procédé permet donc de réaliser des moules de réseaux de diffraction bien définis, à largeurs de lignes nanométriques et dont la **profondeur maximale** est définie par l'épaisseur initiale de résine. La durée de gravure RIE est le paramètre permettant d'accéder aux épaisseurs plus faibles.

I.2. Le timbre en PDMS

Après réalisation du moule nanométrique, nous l'avons traité chimiquement de manière antiadhésive (protocole de silanisation OTS : octadecyltrichlorosilane par voie liquide). L'étape suivante consiste à étaler une couche de PDMS sur les moules ainsi réalisés puis à la réticuler dans une étuve à 100°C pendant 4h. Après réticulation ce timbre est décollé puis observé. La Figure 81.A est une image AFM en 3D du timbre de diffraction correspondant au moule présenté en Figure 80.B. Nous constatons sur la Figure 81.B que la hauteur des lignes (250 nm) correspond à la profondeur de gravure. La largeur des lignes est plus difficilement mesurable à cause de l'artefact de convolution entre la surface et la forme de la pointe. De même, sur la Figure 81.C nous observons la bonne reproductibilité entre le moule de la Figure 80.A et le timbre obtenu.

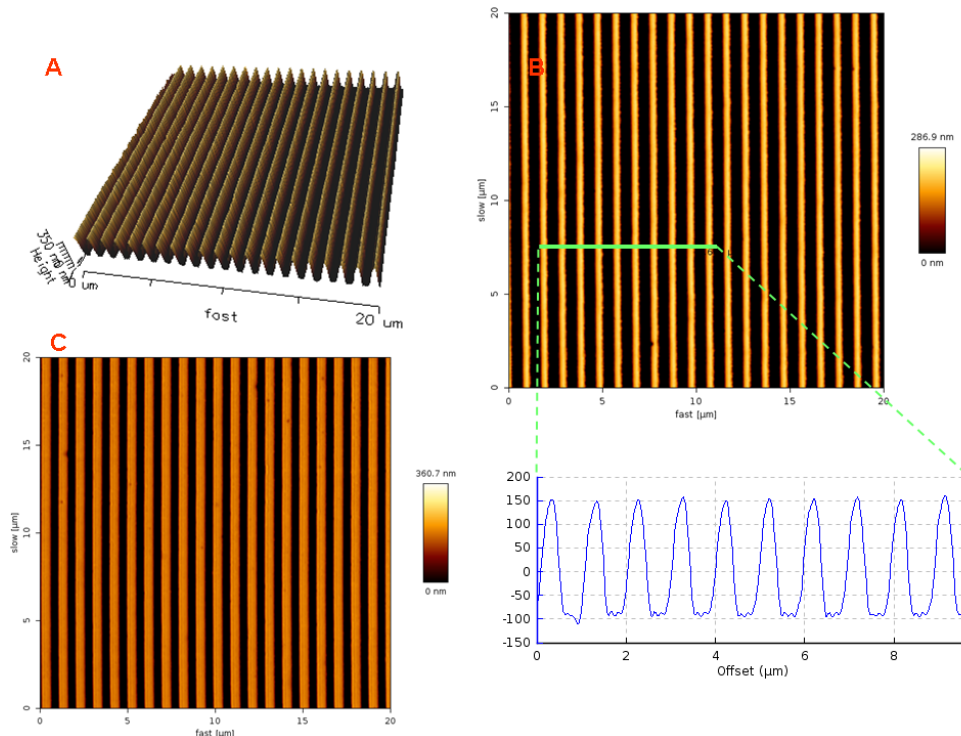


Figure 81 : image AFM des timbres réalisées à partir des moules présentés précédemment. A) vue en 3D d'un réseau de lignes de pas 1μm et de largeur 270 nm dont une vue en coupe est présentée en B). C) image en topographie d'un réseau de lignes de largeur 560nm et de pas 1μm

Remarque : Le rapport optimum entre la hauteur des lignes des timbres et leur largeur $\frac{h}{l}$ doit être d'après la littérature supérieur à 1 pour éviter le contact de toute sa surface lors de l'impression (c'est-à-dire l'impression des lignes et des creux sur le substrat). Le timbre de la Figure 81.C avec un rapport $\frac{h}{l} = \frac{1}{2}$ n'a donc pas a priori la géométrie idéale.

I.3. L'encrage du timbre

Classiquement, l'étape d'encrage débute par dépôt sur le timbre d'une goutte de la solution contenant les molécules (étape 3 de la Figure 79) suivi de son séchage. Cette technique très simple est adaptée pour des solutions aqueuses. En effet, l'eau n'infiltrant pas dans le PDMS, il n'y a aucune déformation du timbre sous l'effet du solvant. Or pour réaliser certains encrages il est nécessaire d'utiliser des solvants pour lesquels le PDMS a une grande affinité, et qui peuvent détériorer la structure moulée (éthanol, trichloroéthylène, ...). C'est pourquoi il est important d'adapter la technique de tamponnage moléculaire à l'utilisation de tels solvants. Pour cela, nous nous sommes inspirés de la technique d'encrage par contact avec un tampon encreur en PDMS imbibé de la molécule à déposer²²¹.

Cette technique réduit en effet l'influence du solvant sur le PDMS. Nous l'avons nommé micro contact printing couplé à un tampon encreur (blotting pad : μ CP-BP). Le protocole de réalisation est basé sur l'utilisation d'un tampon encreur (ici du papier whatman) séché avant mise en contact avec le timbre. La Figure 82 présente l'application de ce protocole à la réalisation d'une chimie de surface par dépôt de molécules d'OTS sur une lame de verre. Nous choisissons cette molécule afin de démontrer les potentialités apportées par cette technique car le dépôt d'OTS présente deux difficultés majeures :

1. Les molécules d'OTS polymérisent rapidement sous l'effet de l'humidité ambiante
2. L'un de leur solvant est le trichloroéthylène

Le protocole débute par la préparation du tampon encreur. Pour cela, le papier whatman est imbibé d'une solution à 10% en volume d'OTS dans du trichloroéthylène. Nous attendons 5 min pour permettre la diffusion de cette solution dans ce buvard. Cette étape est réalisée sous un cristallisateur afin que le solvant sature l'atmosphère et ainsi limite l'humidité

221Libiouille, et al. Langmuir 1999, 15, 300-304

responsable de la polymérisation non souhaitée. Ensuite le tampon encreur est séché par un flux d'azote pendant 1 min pour assurer l'évaporation de la quasi-totalité du solvant responsable de la détérioration du timbre. Le timbre est alors amené en contact avec ce tampon encreur pendant 5 min. Les étapes suivantes sont similaires au procédé classique. Ainsi, le timbre séché (nous nous assurons alors d'avoir réduit la présence de solvant au minimum) est tamponné sur le substrat qui est ici une lame de verre traitée au plasma O_2 (800W, 1000mL/min, 5min).

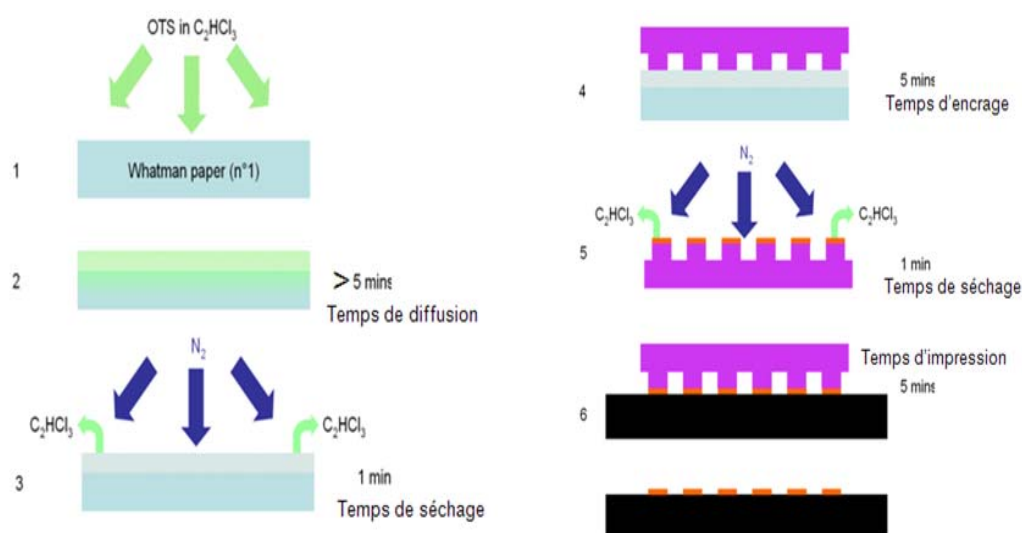


Figure 82 : protocole du dépôt d'OTS par micro contact printing couplé à un tampon encreur (μ CP-BP)

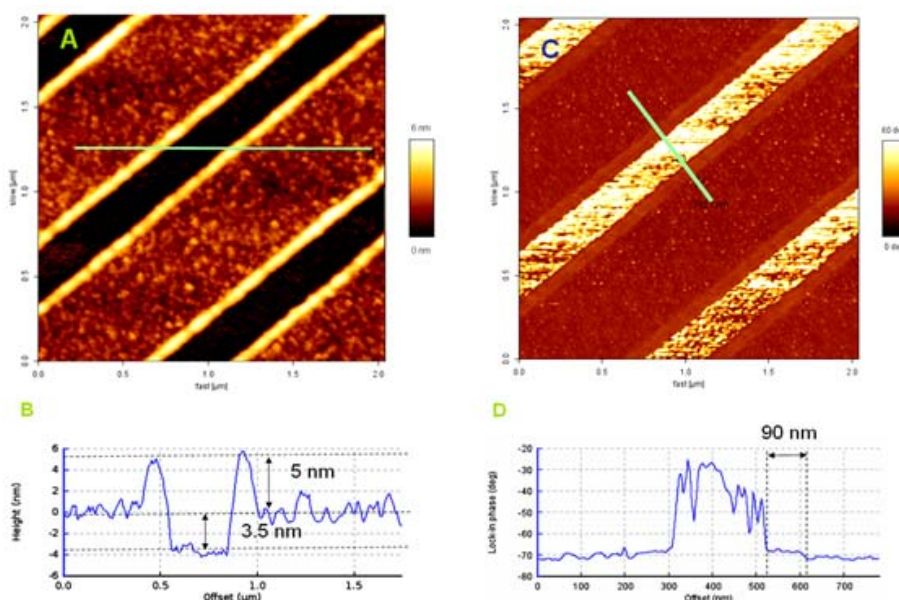


Figure 83 : dépôt de molécules d'OTS sur une lame de verre selon un réseau grâce à un timbre composé de lignes de largeur 260 nm caractérisé à l'AFM en mode tapping. A) image AFM de la topographie B) profil de la section en topographie C) image AFM de la phase D) profil de la section en phase de C.

Nous appliquons ce protocole au dépôt de molécules d'OTS en utilisant les deux timbres comportant les motifs de diffraction présentés précédemment. Nous constatons un dépôt conforme aux motifs (largeur de ligne 260nm sur la Figure 83 et 560nm sur la Figure 84). Cependant ces lignes sont bordées d'une surépaisseur de 5nm qui s'étend sur 90 nm voire 100 nm (Figure 83.D, Figure 84.D).

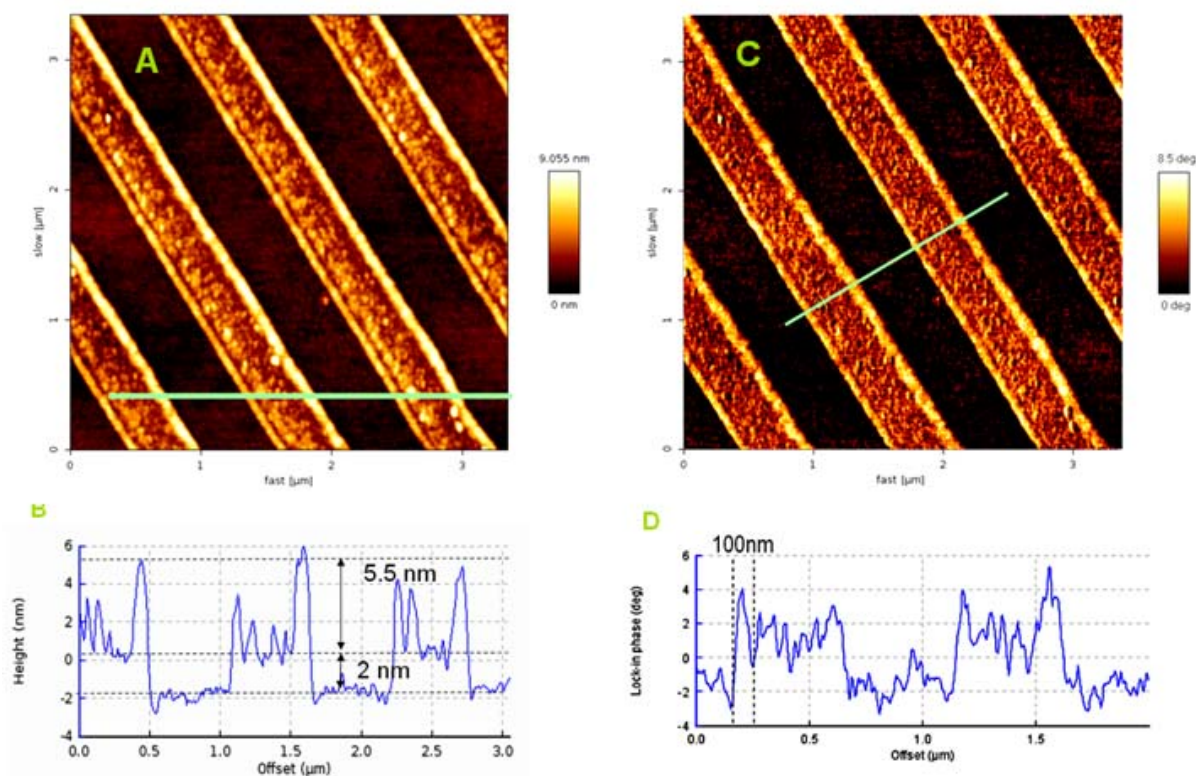


Figure 84 : dépôt de molécules d'OTS sur une lame de verre selon un réseau avec le timbre composé de lignes de largeur 560 nm caractérisé à l'AFM en mode tapping. A) image AFM de la topographie B) profil de la section définie en A C) image AFM de la phase D) profil de la section en phase définie en C.

Cette surépaisseur semble être due au transfert de molécules d'OTS présentes sur les flancs des motifs. De plus, nous observons que l'épaisseur de la couche d'OTS déposée au centre des motifs est de 2.5 nm et donc proche de celle de la taille d'une molécule d'OTS. Enfin, l'absence de molécules d'OTS entre les lignes démontre que le timbre de 560 nm ne s'effondre pas lors du dépôt contrairement à nos craintes. Donc ce timbre sera utilisé par la suite.

En résumé, nous proposons une technique d'encrage des timbres efficace, qui peut contrôler le transfert de couches mono moléculaires avec une résolution nanométrique, molécules qui peuvent être en suspension dans n'importe quel solvant.

I.4. Le dépôt de biomolécules par micro contact printing classique (μ CP)

Nous démontrons aussi la possibilité de déposer des biomolécules sondes selon des motifs de diffraction par micro contact printing avec la technique d'encrage classique. Pour cela, nous choisissons des molécules de streptavidine. Une goutte d'une solution de streptavidine dans du PBS à 20 μ g/mL est déposée sur le timbre. Au bout de 2 min, la goutte est chassée par un flux d'azote et le timbre séché. Enfin la streptavidine est transférée par dépôt du timbre sans pression durant 2 min sur une lame de verre traitée chimiquement (présentant le groupe chimique époxyde). Sur la Figure 85 nous observons une bonne reproduction des motifs du timbre sur la surface. De plus, la hauteur des lignes est en moyenne de 5 nm et représente la taille d'une molécule de streptavidine.

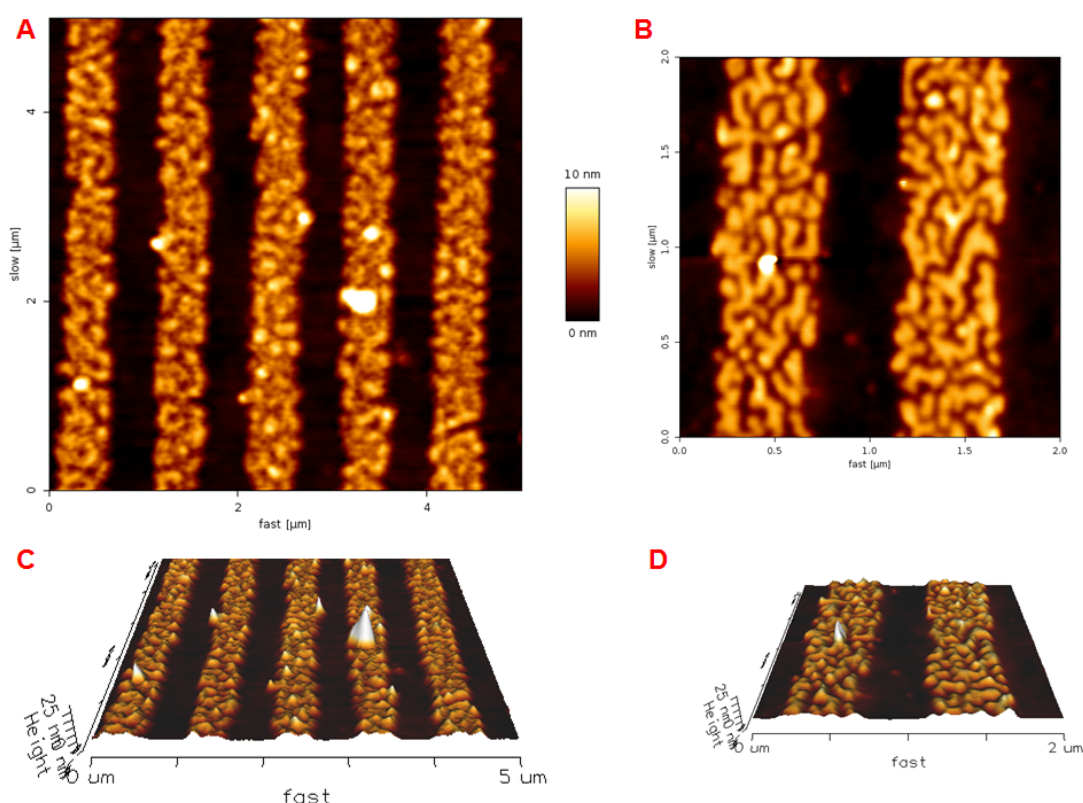


Figure 85 : image AFM d'un réseau de lignes de 550 nm au pas de 1 μ m réalisé par micro contact printing. A) image topographique, B) zoom topographique, C) image en 3D de A), D) image en 3D de ce zoom topographique

En résumé, nous maîtrisons deux techniques de micro contact printing de réseaux de diffraction de chimie de surface ou de molécules sondes sur une lame de verre qui contrôlent les épaisseurs déposées dont l'une d'elles permet de s'affranchir des difficultés générées par l'utilisation de solvants non aqueux.

II. Construction d'un montage de diffraction

Nous avons conçu puis construit le dispositif schématisé sur la Figure 86. Il est composé d'un laser HeNe (1) délivrant une puissance de 5mW à $\lambda = 633nm$ répartie sur une ouverture circulaire de diamètre proche de 1 mm en faisceau gaussien. Ce faisceau laser est divisé par une lame semi réfléchissante (2) en deux parties : 10% de la puissance laser est transmise vers le photodétecteur* P_i (3) alors que les 90% réfléchis éclairent le réseau de diffraction (4). Un deuxième photodétecteur P_1 (5) récupère la puissance réfléchie à l'ordre 1 (qui se situe pour un réseau de pas $1\mu m$ à environ 40° de la normale).

Ces deux photodétecteurs permettent d'acquérir en temps réel le rapport indépendant des fluctuations du laser $\frac{P_1}{P_i}$.

Au-delà des capteurs, les signaux lumineux sont transmis par des fibres optiques pour rendre plus aisé l'agencement des différentes parties du montage. Une fibre bifurquée (9) envoie grâce à l'obturateur soit P_i soit P_1 vers le spectromètre.

Cet obturateur optique sélectionne successivement le faisceau (P_i ou P_1) qu'il injecte sur le spectromètre. Il est commandé par un logiciel d'acquisition des données (8) spécifique que nous avons conçu.

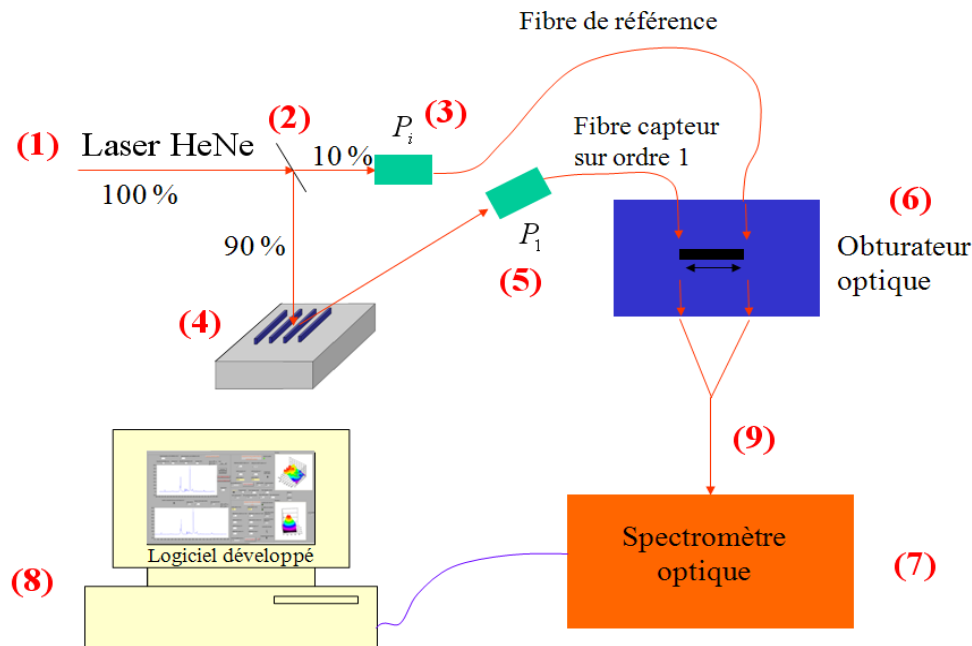


Figure 86 : principe du montage expérimental d'étude de la diffraction

* Dans la suite, on appelle photodétecteur l'extrémité de la fibre collectée qui couplée avec le monochromateur réagit comme un photodétecteur

La partie optique composée du laser HeNe, du réseau de diffraction et de la récupération des signaux par les fibres optiques de référence et de l'ordre 1 est présentée sur la Figure 87.

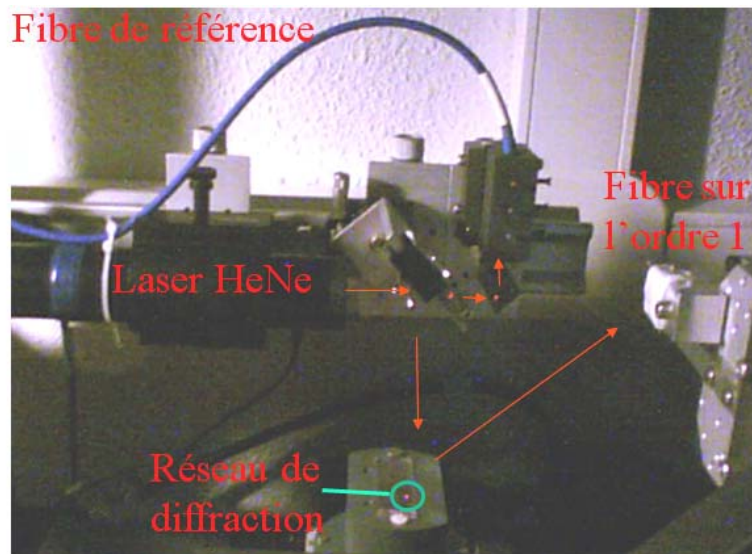


Figure 87 : photographie du montage expérimental de diffraction. Le trajet du faisceau laser lors de la détection est représenté par des flèches rouges

La description ci-dessous détaille les choix et les réglages des divers éléments qui composent ce banc de diffraction.

II.1. La récupération fibrée des signaux lumineux de référence et de l'ordre 1

Comme le détaillent la Figure 86 puis la Figure 88, le faisceau incident délivré par le laser, est séparé en deux par une lame semi-réfléchissante. 90% du signal éclaire le réseau et les 10% restants sont orientés vers un miroir qui réfléchit cette puissance lumineuse vers la fibre de référence. Un agencement particulier réduit ici le fond continu dû à la quantité de lumière diffusée. En effet, la lumière arrivant sur la fibre de référence est en partie réfléchi et diffusée dans l'espace. Pour minimiser cette diffusion, le faisceau lumineux rentre dans une cavité qui fixe et décale la fibre. La lumière qui est alors diffusée, est contenue dans une faible zone contrôlée de l'espace qui n'est pas orientée vers la fibre qui collecte l'ordre 1 (zone verte de la Figure 88). Ainsi, le bruit sur la mesure de l'ordre 1 est minimisé.

L'ensemble du système composé de la source, de la lame-semi réfléchissante et de la fibre de référence (capteur P_i) est placé sur une potence. La lame semi réfléchissante ainsi que le miroir amenant une fraction de la lumière incidente sur la fibre de référence ont un degré de liberté en rotation. Nous ajoutons à cet ensemble un

miroir permettant d'adresser le faisceau incident sur le capteur P_i dont la position permet de réduire l'encombrement du dispositif. De plus, l'alignement préalable de l'ensemble du système permet sa meilleure calibration. Grâce à ces degrés de libertés nous réalisons d'abord l'alignement de ce premier sous ensemble source. Nous positionnons tout d'abord la lame semi réfléchissante de manière à ce que le faisceau incident soit perpendiculaire à la surface du réseau. Ensuite nous tournons le miroir de manière à orienter le maximum de lumière vers la fibre de référence. Ce réglage n'est plus modifié afin de conserver autant que possible une mesure de P_i constante et d'accéder le cas échéant aux fluctuations de la puissance du laser incident.

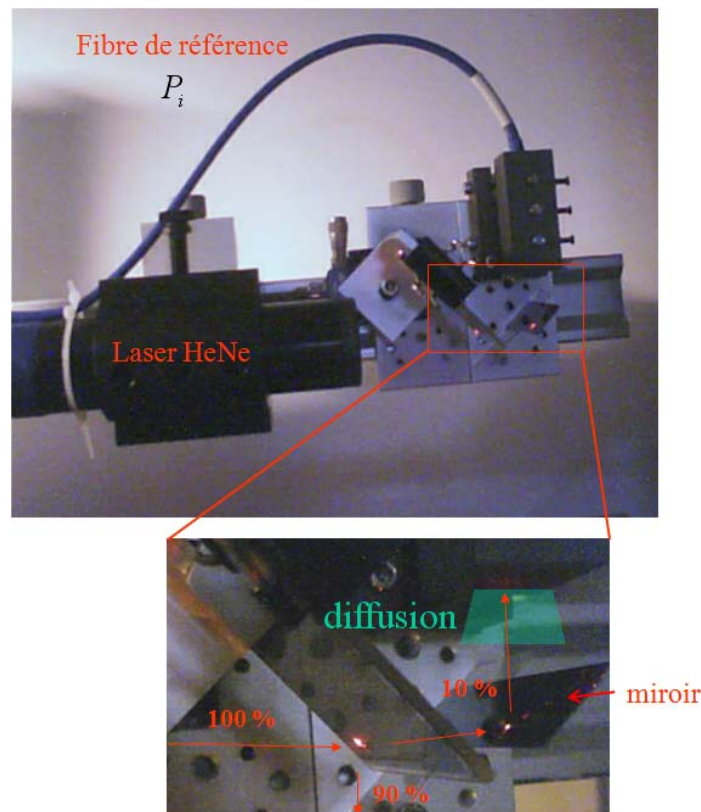


Figure 88 : photographies du sous ensemble « source » du dispositif. Le laser HeNe, la lame semi-réfléchissante

II.2. La mesure de la puissance lumineuse collectée par chaque fibre

Le deuxième sous ensemble détermine les puissances collectées. Il se compose des deux fibres optiques, de l'obturateur optique, de la fibre bifurquée et du spectromètre.

L'obturateur optique comporte un « cache » coupant la lumière provenant de la fibre que l'on ne souhaite pas diriger vers le monochromateur. Ainsi, la position 1 de la Figure 89 empêche la lumière issue de la fibre positionnée sur l'ordre 1 d'être transmise vers la fibre bifurquée au profit du signal optique provenant de la fibre de référence. Le signal récupéré en position 1 est celui de référence. De même, celui transmis en position 2 provient de l'ordre 1.

NB : cet obturateur fonctionne selon deux modes. Dans le premier mode, il peut être commandé manuellement par le biais d'un curseur. Le second mode permet de le commander grâce à un signal TTL (0V = position 1 ; 5V = position 2). Ainsi, il nous est possible de l'interfacer électroniquement et de choisir le signal mesuré.

La mesure de la puissance lumineuse est réalisée par un spectromètre optique (QE65000 de ocean optics). Il comprend une fente d'entrée qui collimate le faisceau incident vers un réseau de diffraction dont la réponse spatiale est analysée par une barrette CCD. Comme l'angle du faisceau diffracté dépend de sa longueur d'onde chaque cellule de la barrette CCD collecte une longueur d'onde. L'avantage de l'utilisation d'un spectromètre est qu'il permet de ne sélectionner qu'une seule longueur d'onde et donc d'éliminer le bruit provenant de sources lumineuses parasites. Pour réaliser une analogie avec l'électronique, le spectromètre se comporte comme un passe-bande centré sur la longueur d'onde choisie (633nm).

Une cellule de la barrette CCD compte le nombre de photons qui l'illuminent. Ce nombre de photons est converti en nombre de coups mais la relation n'est pas unitaire. Un photon n'est pas égal à un coup. Un coup est proportionnel à une quantité de photons reçus. Le fabricant nous donne une gamme dans laquelle se situe la proportion (22 photons/coup pour le visible). Sa résolution pour une longueur d'onde de 633nm est donc de $6.6 \cdot 10^{-18}$ J. Le nombre de coups est ensuite converti numériquement par un convertisseur analogique/numérique de 16 bits. De ce fait, la valeur mesurée est comprise entre 0 et 65536.

En pratique le comptage des coups est réalisé durant un temps appelé temps d'intégration. Cette grandeur est donc proportionnelle à la puissance du faisceau incident. Ainsi, il est important de noter que lorsque nous discuterons des mesures provenant d'une fibre, la valeur discutée sera un nombre de coups divisé par le temps d'intégration.

NB : si le nombre de coups engendre un nombre supérieur à 65536, le spectromètre sature. De ce fait, la saturation du spectromètre est éliminée, en diminuant le temps d'intégration.

Enfin, un des atouts de ce spectromètre est son système de refroidissement. En effet, grâce à une cellule Peltier sa température est régulée autour de -20°C avec une bonne précision (+/- 0,1°C). Cette température diminue le bruit électronique sur la mesure des cellules de la barrette de CCD. Ainsi, le bruit moyen (RMS) se retrouvant sur la mesure optique est de +/- 3 coups (3 coups en 1s donnent $P_1 = 2 \cdot 10^{-17}$ W). Notre mesure sera valide à 10% près si la quantité de photons diffractés convertie en coups est supérieure à 30 coups (30 coups en 1s donnent $P_1 = 2 \cdot 10^{-16}$ W).

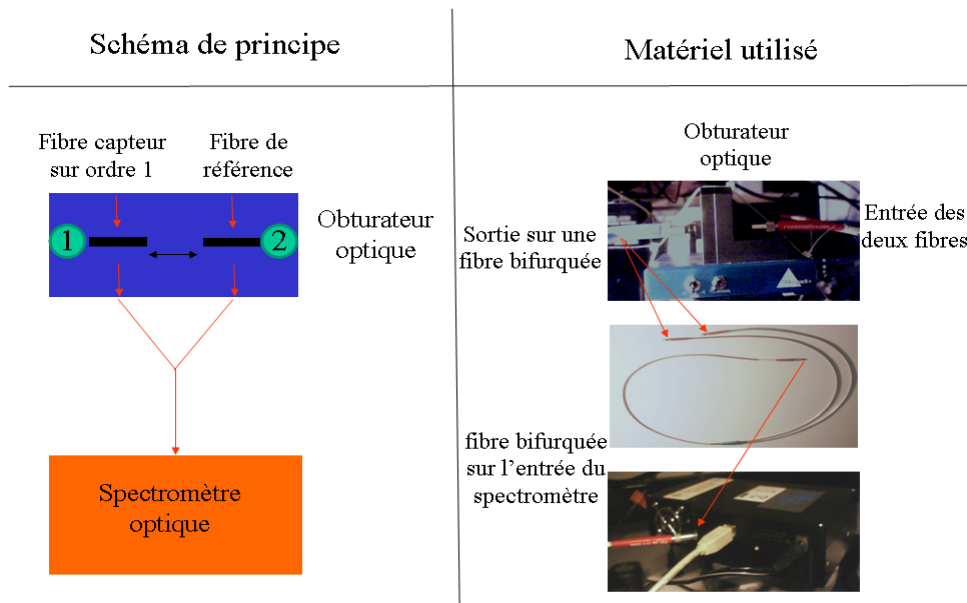


Figure 89 : schéma de principe et le matériel utilisé pour l'acquisition des signaux provenant de l'ordre 1 et du laser.

II.3. Le support du substrat

Notre application est tournée vers les biopuces. Le substrat utilisé est le plus souvent une lame de verre. C'est pourquoi nous développons un système permettant l'accueil et la fixation d'une lame de verre standard (27mm*56mm) (Figure 90). Une empreinte permet une bonne reproductibilité du positionnement de la lame de verre et des vis assurant son bon maintien sur le porte-substrat.

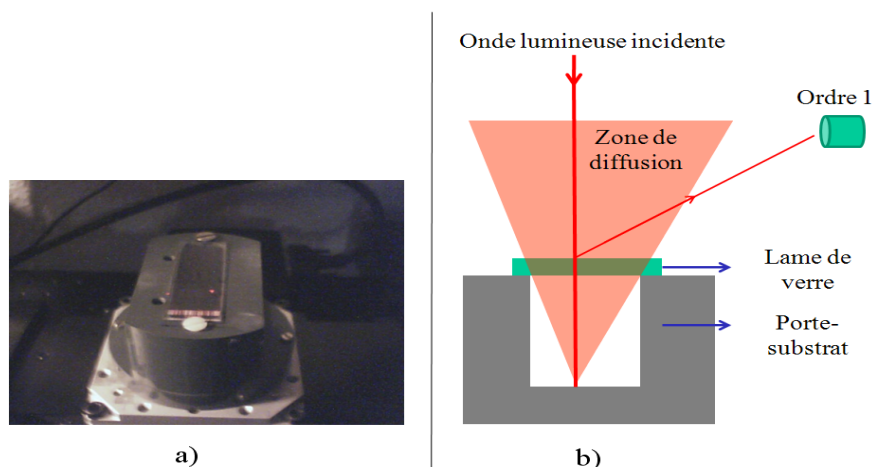
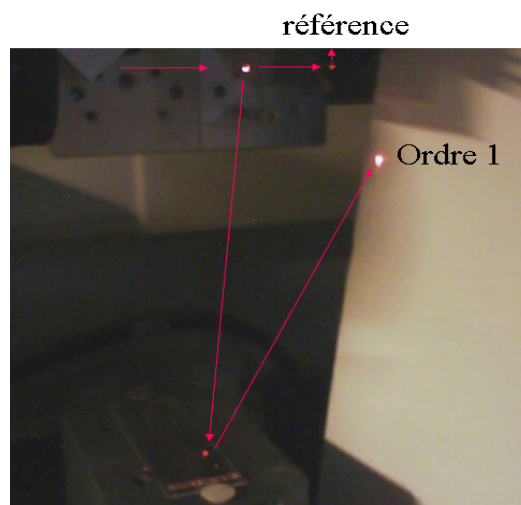


Figure 90 :a) dispositif de fixation de la lame de verre permettant de diminuer le bruit lumineux parasite dû à la réflexion du faisceau laser sur le porte échantillon. Le faisceau laser incident est le point rouge. B) schéma du porte-substrat composé du trajet réalisé par le faisceau lumineux et de la zone de diffusion.

De plus, comme le verre a un fort coefficient de transmission de la lumière le faisceau incident traverse la lame en ne perdant que peu de puissance. Lors de sa réflexion par le support de cette lame, il est réfléchi mais diffuse aussi dans l'espace. Cette diffusion peut être à l'origine d'un bruit parasite superposé à l'ordre 1 (qui ne peut pas être filtré par le spectromètre car sa longueur d'onde est identique à celle détectée). Afin d'éliminer cette diffusion, nous réalisons un « fossé » dans le porte-substrat, sous la lame de verre. Ce fossé est recouvert d'un ruban adhésif noir absorbant une grande proportion de la lumière incidente. Grâce à ces deux précautions, la lumière diffusée est limitée ce qui minimise le bruit.

II.4. Vérification qualitative du fonctionnement du montage

Nos premières observations macroscopique de l'ordre 1 de diffraction d'un réseau de dendrimères ($400\mu\text{m} \times 400\mu\text{m}$, pas : $1\mu\text{m}$, largeur : 540 nm , hauteur des lignes : 120 nm) sur un écran, nous permettent d'affirmer qu'un tel montage est adapté à l'étude de biopuces diffractantes (Figure 91).



*Figure 91 : diffraction d'un réseau de dendrimères
($400\mu\text{m} \times 400\mu\text{m}$, lignes de 780 nm au pas de $1\mu\text{m}$)*

II.5. Les perspectives ouvertes par un tel dispositif expérimental

Nous avons tout d'abord utilisé un laser HeNe (633 nm) comme source lumineuse puis testé d'autres solutions. En effet, notre capteur est un spectromètre sensible dans la gamme du visible (400 nm à 800 nm). Ainsi, la source peut avoir une longueur différente dans cette gamme. Dans ce but, l'éclairement à une longueur d'onde variable grâce à une source large

bande suivi d'un monochromateur et d'une fibre optique est en cours d'étude. La condition sine qua non est la faible divergence du faisceau incident. En effet, cette divergence angulaire se retrouve sur l'ordre 1 et le disperse dans l'espace.

Les difficultés de ce dispositif résident dans :

- 1-la puissance émise en sortie de la fibre optique qui est faible
- 2-l'émission lumineuse qui doit être collimatée sur quelques mm²

Le premier point peut être résolu avec une source composée d'une lampe à vapeur de mercure qui présente des « pics » d'intensité lumineuse pour des longueurs d'ondes très précises.

Le second point est plus problématique. En effet, nous souhaitons collimater le faisceau lumineux en sortie de fibre sur une faible surface en ne perdant que peu de puissance. Nous testons un grand nombre de collimateurs standards mais aussi faits sur mesure. Leur principe de fonctionnement est similaire : une lentille est placée en sortie de la source. Nous constatons une réduction de la divergence mais la section du faisceau est encore trop importante (proche de 1 cm²).

L'intérêt de l'utilisation d'une source de longueur d'onde ajustable est de pouvoir sonder la réponse à des longueurs d'onde adaptées aux propriétés optiques des molécules diffractantes (biologiques mais aussi chimiques).

En conclusion, actuellement notre dispositif optique est composé d'une source lumineuse (laser HeNe) dont une faible proportion du rayonnement est injectée sur une fibre de référence par le biais d'une lame semi réfléchissante et d'un miroir. La majorité du rayonnement illumine un réseau de diffraction qui engendre des ordres de diffraction. Sur l'ordre 1, nous positionnons une fibre optique. Ces signaux optiques sont envoyés vers un obturateur optique. Celui-ci transmet successivement l'un des signaux vers un monochromateur qui enregistre successivement les puissances P_i et P_1 , et permet de construire la grandeur relative $\frac{P_1}{P_i}$ recherchée qui est indépendante des fluctuations d'intensité de la source incidente.

III. Automatisation de la biodétection par diffraction

Comme nous l'avons indiqué précédemment notre dispositif de biodétection doit fonctionner en mode biocapteur et surtout en mode biopuce.

L'information recherchée dans un mode biocapteur est l'évolution d'une seule interaction au cours du temps alors qu'en mode biopuce nous nous intéressons multitudes de variations entre des états initiaux et finaux. Notre dispositif doit donc permettre de suivre avec une grande sensibilité l'évolution au cours du temps du signal d'interaction en fonctionnement biocapteur et d'autre part les deux états avant et après interaction d'une multitude de capteurs répartis spatialement pour le mode biopuce.

Afin de rendre le dispositif convivial pour l'expérimentateur nous avons automatisé toutes ses tâches. Leur principe est décrit dans ce paragraphe. Les détails de cet important travail sont présentés en annexe V

III.1. Automatisation générale

Le logiciel développé permet :

- d'enregistrer en début d'expérience le bruit sombre détecté par le spectromètre en l'absence d'éclairement. Il se décompose en une composante continue (proche de 2170 coups) et d'un bruit « blanc » aléatoire, typique d'un bruit électronique indépendant du temps d'intégration. Cette acquisition permet de supprimer cette composante continue lors de toutes les mesures.
- d'ajuster en permanence le temps d'intégration grâce à un module de gestion dynamique pour que la mesure soit au minimum de 30 coups (soit 10 fois supérieure au bruit du spectromètre) et ne soit pas saturé (c'est-à-dire inférieure à 63366 coups). Il augmente ou réduit pour cela le temps d'intégration entre deux valeurs plafond et plancher (voir annexe V).
- de n'enregistrer qu'un seul signal stabilisé et donc de définir le nombre de mesures à réaliser N_a avant de stocker un ou plusieurs acquisitions.

III.2. Procédure d'automatisation pour un mode de fonctionnement biocapteur

L'utilisateur positionne le substrat (lame de verre, silicium, ...) qui supporte le réseau sur le porte-substrat. Ce porte substrat est déplacé à l'aide de platines de translation motorisées commandées par le logiciel du fournisseur (Newport Microcontrol) pour faire apparaître un signal de diffraction. En mode biocapteur le réseau est généralement grand par rapport à la taille du faisceau laser. Il suffit donc d'optimiser la position de la fibre sur l'ordre 1. Nous positionnons d'abord approximativement la fibre collimatée sur l'ordre 1 de diffraction à l'aide de deux platines de translation motorisées qui la supportent. Ces deux platines permettent ensuite de sonder un plan que nous nommerons YZ (plan vert sur la Figure 92). Pour cela, l'utilisateur définit un déplacement matriciel qui permet de réaliser une topographie optique autour de cet ordre 1.

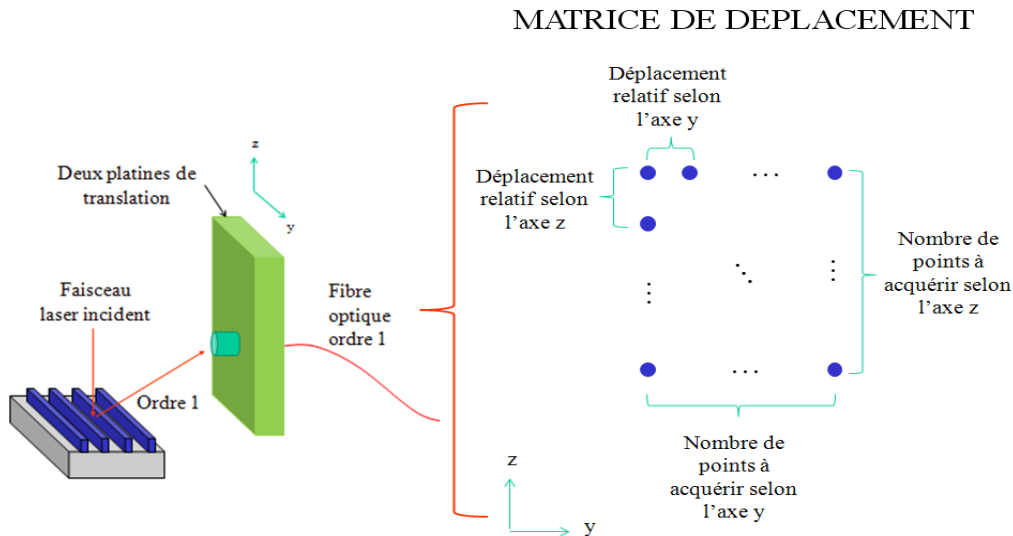


Figure 92 : schéma représentant l'optimisation de la position de la fibre optique placée sur l'ordre 1. Le plan vert représente le plan de déplacement de la fibre dans lequel on cherche la position optimale pour l'ordre 1 grâce à une matrice de déplacement définie par l'utilisateur.

Le déroulement de l'acquisition d'un point de mesure est le suivant :

1. positionnement de la fibre sur la position sondée de la matrice de déplacement
2. position de l'obturateur optique afin de transmettre le signal de la fibre de l'ordre 1 au spectromètre et mesure de la puissance diffractée (P_1)
3. position de l'obturateur optique pour mesurer la puissance du signal de référence (P_i)
4. rapport des deux signaux : $\frac{P_1}{P_i}$

Dans notre cas, le laser HeNe est stable à $\pm 10\%$ sur une période longue (1h) et à $\pm 5\%$ sur une durée de 15 min. Afin de réduire le temps de l'acquisition totale de la topographie, il est possible de ne réaliser les étapes 4 et 5 qu'une seule fois (au début de l'acquisition). Le temps de mesure d'une acquisition, ne pouvant pas dépasser 13s, est donc négligeable en comparaison des temps de fluctuations de la puissance.

Après avoir réalisé l'acquisition d'une première topographie optique de l'ordre 1, la position du maximum dans cette zone est détectée. La fibre est ensuite centrée automatiquement sur ce point. L'utilisateur a alors le choix de recommencer ou non l'alignement sur l'ordre 1 s'il estime qu'il n'est pas idéal. Ses moyens de contrôle de la qualité du maximum sont l'image en 3D de la topographie mais aussi un « facteur de qualité » du pic de diffraction représenté par le rapport entre le maximum détecté et l'équivalent d'un bruit de fond (exemple sur la Figure 93).

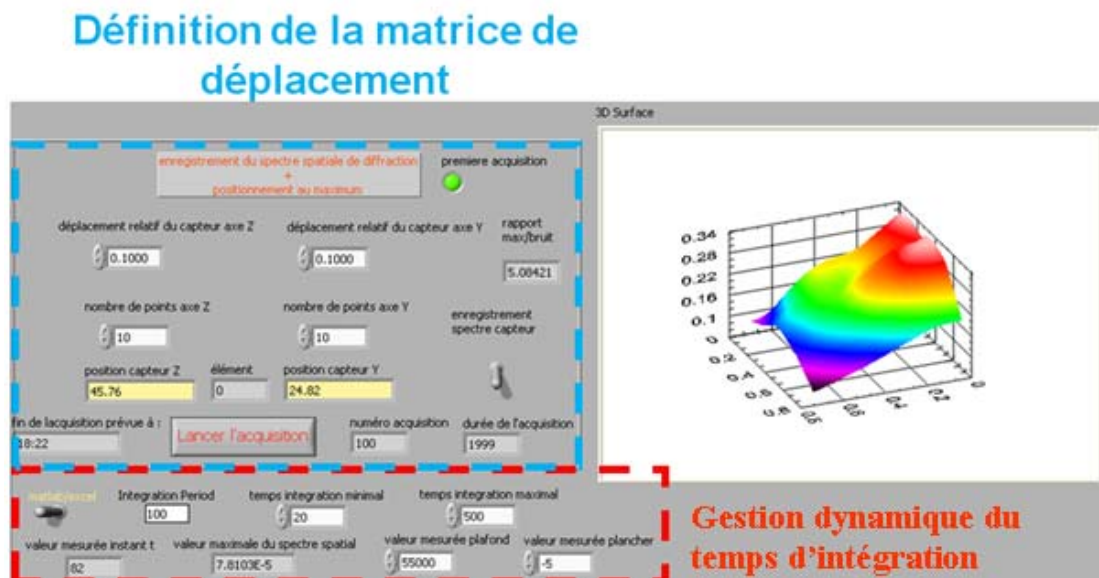


Figure 93 : partie du logiciel permettant d'optimiser la position de la fibre optique placée sur l'ordre 1 et de configurer le suivi dynamique du temps d'intégration.

Ce bruit de fond est une moyenne des 5 % des points les plus faibles.

III.3. Vers une détection en mode biopuce - recherche de la position optimale de chaque réseau

En mode biopuce, la taille du réseau est très petite. Il faut donc rechercher la position optimale de la fibre collectant l'ordre 1 comme précédemment mais aussi celle de chaque réseau par rapport au laser.

III.3.1. Principe du positionnement du réseau

Pour positionner un réseau par rapport au faisceau laser, nous utilisons une démarche similaire au positionnement de la fibre sur l'ordre 1. Deux platines de translation (de la même gamme que précédemment, course de 100 mm et de 50 mm) permettent de déplacer le substrat qui supporte les réseaux suivant les coordonnées xy (plan vert de la Figure 94).

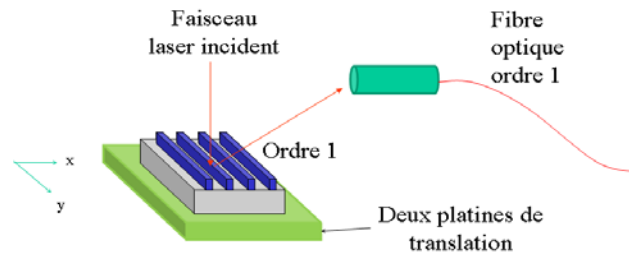


Figure 94 : schéma de principe de l'optimisation de la position du substrat vis-à-vis du laser.

Le plan vert représente le plan dans lequel le réseau se déplace.

Comme pour l'alignement sur l'ordre 1, l'utilisateur définit deux matrices de déplacement. La première aligne le réseau vis-à-vis du. La deuxième donne la position des différents réseaux (Figure 95).

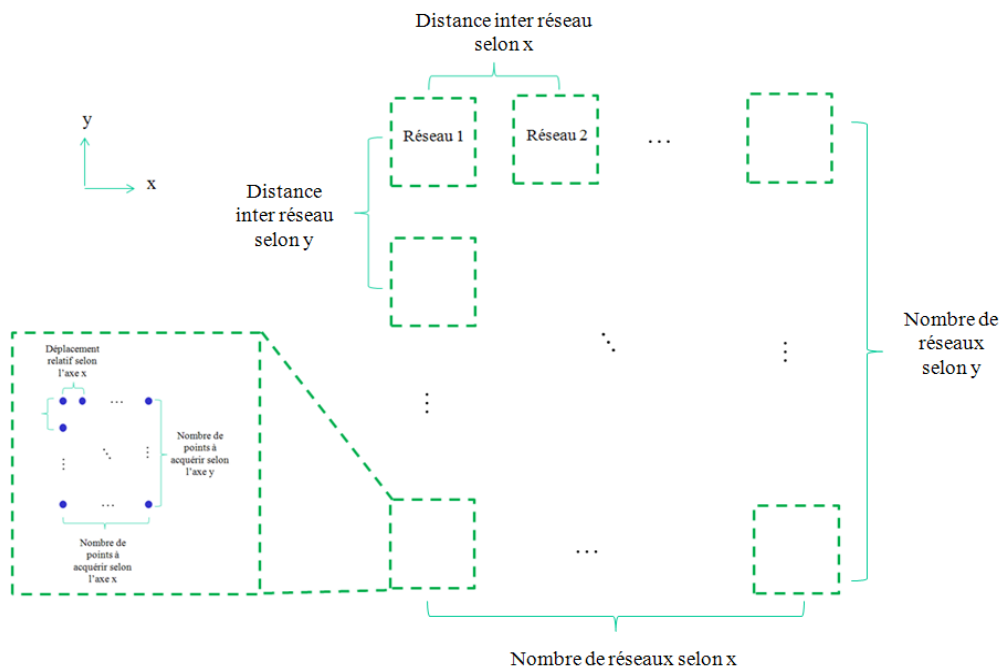


Figure 95 : matrices des différents réseaux à localiser par la biopuce, définie par l'utilisateur. Pour localiser la position optimale de chaque réseau, une matrice permettant la cartographie du signal de diffraction est définie et utilisée pour chaque réseau.

Les paramètres définis par l'utilisateur sont (Figure 96) :
pour la biopuce :

- les distances entre deux réseaux suivant les axes x et y
- le nombre de réseaux suivant les axes x et y

pour un même réseau :

- les distances entre deux points d'observation d'un même réseau suivant les axes x et y
- le nombre de points d'observation suivant les axes x et y

III.3.2. Centrage d'un réseau

Une première cartographie de l'ordre 1 en fonction de la position du réseau vis-à-vis du laser suivant la première matrice (Figure 96) présente un maximum.

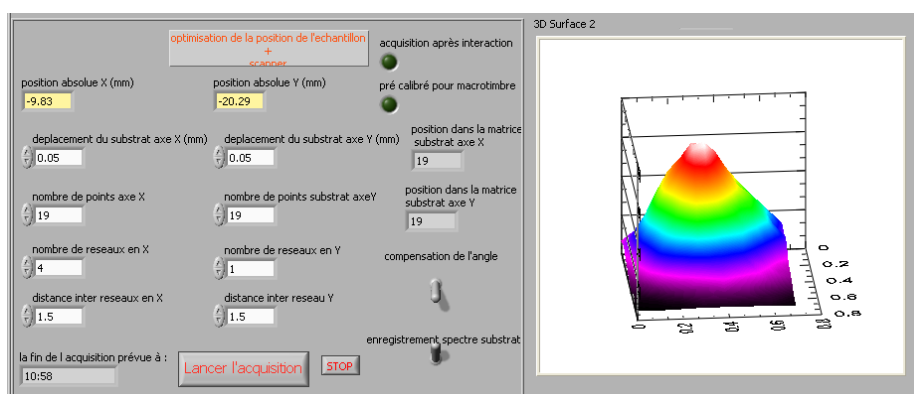


Figure 96 : partie de l'interface permettant la recherche des positions optimales des réseaux biomoléculaires.

Le réseau est alors positionné sur la position correspondant à ce maximum. Mais ce déplacement du réseau lors de cette première cartographie décale la position du maximum de l'ordre 1. Il faut donc corriger à nouveau la position de la fibre à l'ordre 1 suivant la méthode présentée en II.2. Pour réduire la durée des positionnements du réseau puis de la fibre, deux stratégies astucieuses sont développées en annexe V.

III.3.3. Recherche de la réponse d'une biopuce (plusieurs réseaux)

Pour trouver la position de chaque réseau et de l'ordre 1 pour l'ensemble des réseaux, nous supposons qu'ils sont disposés suivant la deuxième matrice. Mais du fait d'une erreur de positionnement de la lame de verre ou d'un problème lors de l'étape d'impression au cours du

micro contact printing, les réseaux peuvent ne pas être parfaitement positionnés sur les positions définies par la matrice. Ce problème impose une rotation et/ou une translation de la matrice réelle par rapport à cette matrice théorique. que nous devons compenser grâce à des observations expérimentales. Pour cela, la détection de la position du maximum du premier réseau permet de compenser l'erreur en translation (Figure 97) et l'acquisition de la position d'un deuxième réseau permet de corriger l'angle pour les réseaux suivants.

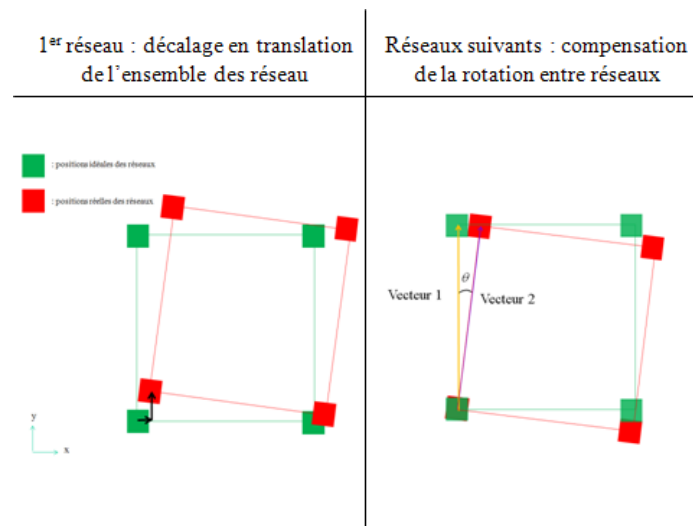


Figure 97 : schéma de la recherche dynamique des réseaux de diffraction. Le premier réseau détecté permet de compenser un décalage en translation. La compensation angulaire (rotation du substrat ou distorsion dans les réseaux) est réalisée grâce aux réseaux suivants.

III.4. Acquisition du signal de diffraction en temps réel (mode multi biocapteurs)

Après avoir trouvé les coordonnées des différents réseaux sondes et la position optimale de leur ordre 1 de diffraction, il est possible de suivre $\frac{P_1}{P_i}$ en temps réel lors de l'accroche d'une cible sur ces sondes. Lorsque l'acquisition est lancée, les platines de translation positionnent un réseau ainsi que la fibre de l'ordre 1 aux positions trouvées précédemment. L'acquisition des signaux est réalisée ainsi que l'instant t de mesure, et affichée sur le graphe de la Figure 98. Puis la même démarche est réitérée pour le réseau suivant et ainsi de suite.

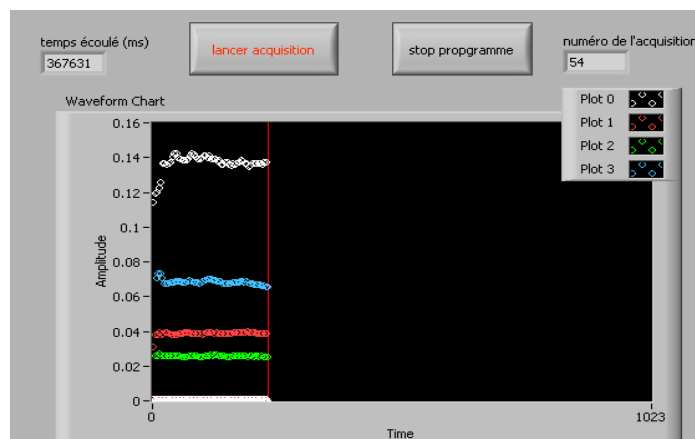


Figure 98 : partie du logiciel permettant de suivre en temps réelle l'évolution du signal de diffraction.

Plusieurs paramètres d'acquisition doivent être judicieusement ajustés par l'utilisateur.

Ce sont :

- le temps d'intégration pour chaque réseau
- le nombre de points de mesure à moyenner pour chaque réseau
- le nombre d'acquisition à éliminer avant de retenir les mesures réalisées (N_a) pour s'affranchir des problèmes de rémanence des capteurs CCD lorsqu'on change de réseau
- le choix entre la mesure de la fraction de la puissance incidente (P_i) pour chaque réseau (CR) ou après avoir sondé l'ensemble des réseaux (ER)

Nous avons réalisé des tests permettant de connaître l'influence de chacun de ces facteurs. Pour cela nous avons sondé successivement au cours du temps une matrice de $2 \times 3 = 6$ réseaux de streptavidine théoriquement identiques et avons fait varier ces différents paramètres d'acquisition.

La Figure 99 présente la moyenne des mesures réalisées pour chaque condition d'acquisition et pour les 6 réseaux. Nous constatons que les différentes conditions n'influent que très faiblement sur la valeur mesurée à l'exception de la situation où l'on réduit le temps d'acquisition à 75 ms et l'acquisition d'une seule valeur (moyenne = 1), dans ce cas nous remarquons une diminution non négligeable des valeurs mesurées. Nous attribuons ce phénomène à la discrétisation de la valeur mesurée du fait d'une valeur de temps d'intégration trop faible. Pour s'en convaincre, il suffit d'observer que pour un temps d'intégration de 75

ms additionnée d'une moyenne sur deux mesures (moyenne = 2), la valeur du signal retrouve son niveau initial (7^{ème} configuration).

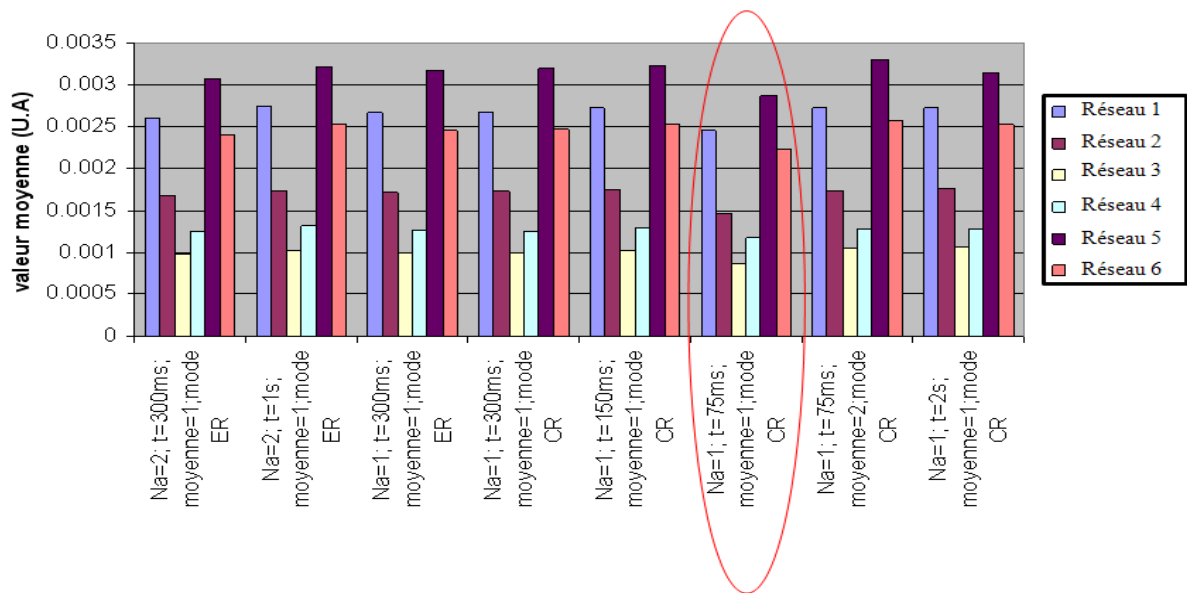


Figure 99 : valeur moyenne pour chacun des 6 réseaux pour différentes conditions d'acquisition

Ensuite nous nous sommes attachés à observer la qualité du signal produit. Pour cela, nous comparons le rapport entre le bruit (écart type) et le signal (moyenne des mesures) (Figure 100). Nous observons que le bruit est principalement de +/- 2%. Cependant certaines conditions l'exaltent. Le temps d'intégration de 75 ms engendre un bruit important : +/-14% lorsqu'une seule valeur est mesurée et de +/-4% lorsque deux valeurs sont mesurée.

Si l'on compare deux cas :

1. la mesure est réalisée avec un temps d'intégration t_1 et une moyenne sur N mesures (cas 1)
2. la mesure est réalisée avec un temps d'intégration $N.t_1$ et une moyenne sur 1 mesure (cas 2)

Nous en concluons que :

- le temps d'intégration doit être suffisamment grand
- la mesure moyenne (dans le temps) dans le cas 1 équivaut à celle du cas 2.

Ainsi, il vaut mieux augmenter le temps d'intégration que le nombre de mesures à moyenner car le rapport du bruit sur le signal est plus important dans le cas 1 que dans le cas 2.

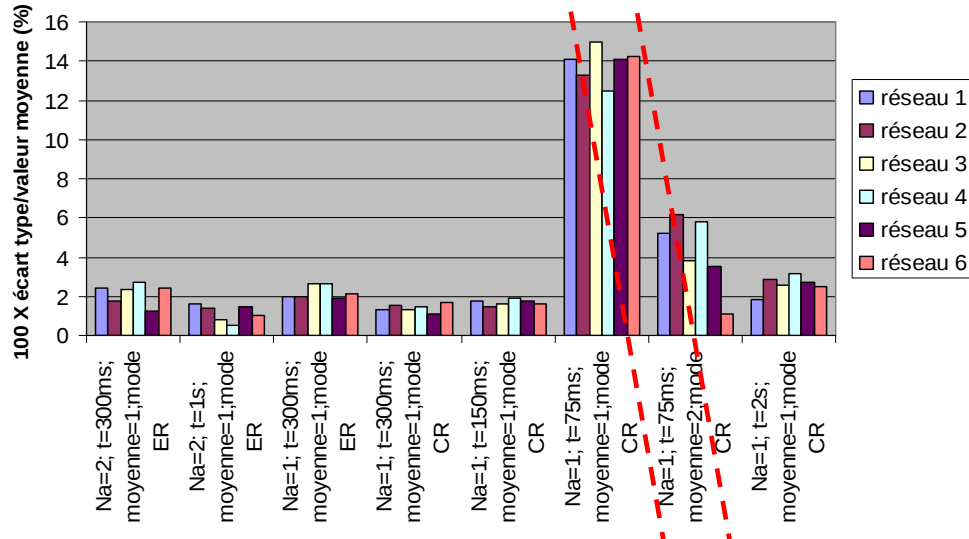


Figure 100 : rapport entre l'écart type et la valeur moyenne pour différentes conditions d'acquisition

Enfin, nous devons prendre en compte le temps entre deux acquisitions d'un même réseau. Dans notre cas, nous avons 6 réseaux différents et ce temps entre deux acquisitions est le temps nécessaire pour sonder l'ensemble des réseaux. La durée d'acquisition d'un réseau est la somme de deux temps :

1. le temps de positionnement inhérent aux platines de translation (proche de 2.2 s) et pratiquement incompressible dans notre cas
2. le temps d'acquisition de la mesure de l'ordre 1 et/ou de la référence (incluant le nombre Na de mesures non prises en compte).

La Figure 101 présente le temps entre deux acquisitions d'un même réseau selon les différents paramètres. Certains paramètres tels qu'un temps d'intégration élevé couplé avec une normalisation du signal pour chaque réseau, engendrent un temps d'acquisition trop important (dernière configuration). Ainsi, dans l'ensemble des tests que nous réalisons, le meilleurs compromis entre le temps d'acquisition et le rapport entre le bruit et le signal est un temps d'intégration de 300 ms sur la première mesure (Na=1), avec une normalisation en fin de l'acquisition de l'ensemble du réseau (mode ER).

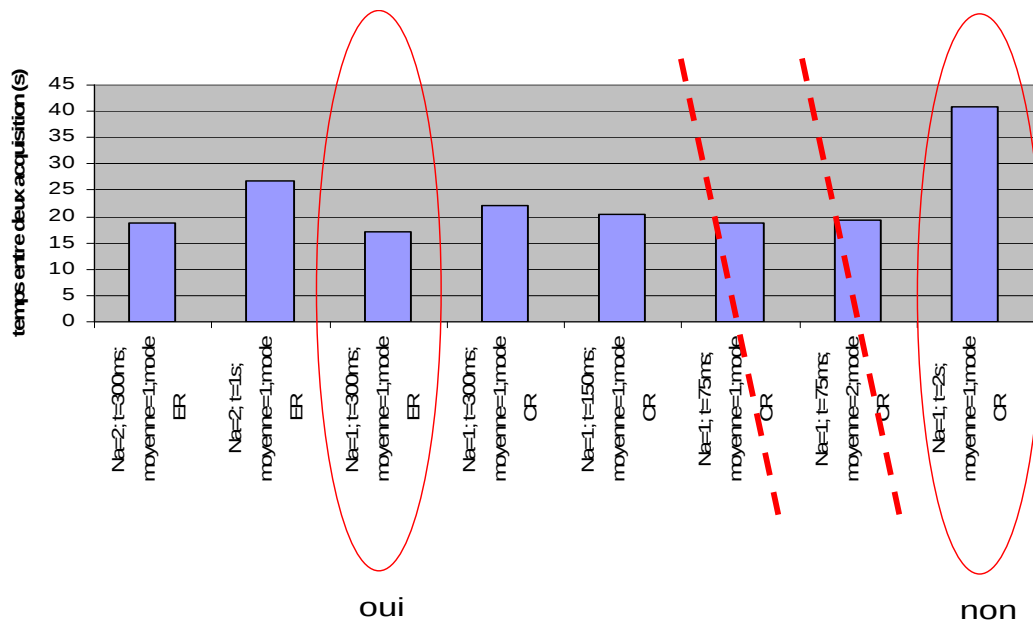


Figure 101 : temps entre deux acquisitions pour différentes conditions d'acquisition

En conclusion :

- le temps d'intégration doit être suffisamment grand (supérieur ou égal à 300ms)
- pour un temps d'acquisition donné, il vaut mieux augmenter le temps d'intégration que le nombre de mesures à moyenner
- le mode ER semble un bon compromis entre une bonne qualité du signal et un temps d'acquisition peu excessif
- le nombre d'acquisition non prises en compte n'intervient pratiquement pas dans cet exemple mais devra l'être lors de forte différence d'émission de réseaux sur un même substrat

Résumé :

Ce travail de développement de techniques génériques nous permet de disposer :

1. d'un procédé technologique permettant de générer des timbres en PDMS avec une résolution nanométrique
2. d'une technique de réalisation de réseaux diffractifs de chimie de surface ou biomoléculaires sondes avec des résolutions nanométriques. Le micro contact printing assisté par un tampon encreur (μ CP-BP) est adapté l'encrage avec des molécules placées dans des solvants agressifs vis-à-vis du timbre de PDMS
3. d'un banc de diffraction versatile permettant la mesure du signal diffractif en mode biocapteur (au cours du temps) ou biopuce
4. d'un banc de diffraction automatisé qui permet de fonctionner en mode multi-biocapteurs
5. de méthodes d'optimisation de cette technique de détection par diffraction en mode biopuce, biocapteur ou multi-biocapteurs.
6. de données sur l'influence de chaque paramètre d'acquisition sur le temps et la précision de l'acquisition (temps d'intégration, nombre de mesures à moyenner, nombre de mesure avant prise en compte de la valeur, normalisation de chaque réseau ou de l'ensemble,...)

De premier essais, réalisant des réseaux diffractifs de streptavidine mais aussi de chimie de surface de $400\mu\text{m} \times 400\mu\text{m}$ composés de lignes de 560nm, au pas de $1\mu\text{m}$.

CHAPITRE IV : LA DETECTION BIOLOGIQUE PAR DIFFRACTION

L'objet de ce chapitre est de démontrer qu'il est en pratique possible de détecter par diffraction, donc sans marqueur, les interactions biologiques. Il repose d'une part sur les simulations développées précédemment qui sont la source de nos choix et de nos interprétations et sur les techniques expérimentales génériques présentées dans le chapitre III.

Nous avons choisi de faire cette démonstration à partir de deux interactions biologiques qui intéressent notre équipe et nos contacts industriels. La première est la détection de l'interaction entre la protéine A et l'anticorps qui la reconnaît. La seconde concerne le criblage pharmaceutique qui met en jeu l'interaction entre un peptide phosphorylé et un anticorps qui reconnaît la phosphorylation.

Ce chapitre est organisé suivant la démarche que doit suivre l'expérimentateur qui souhaite détecter une interaction biologique. La première partie décrit l'intérêt des événements biochimiques étudiés, les structures et les interactions des molécules mises en jeu, la deuxième précise le choix d'une chimie de surface adaptée à la fixation des sondes sur le substrat. La troisième détaille la méthode de fixation de ces biomolécules sur cette chimie de surface. Les deux derniers paragraphes présentent l'étude successive des deux interactions et leur interprétation en s'inspirant de notre expérience en simulation.

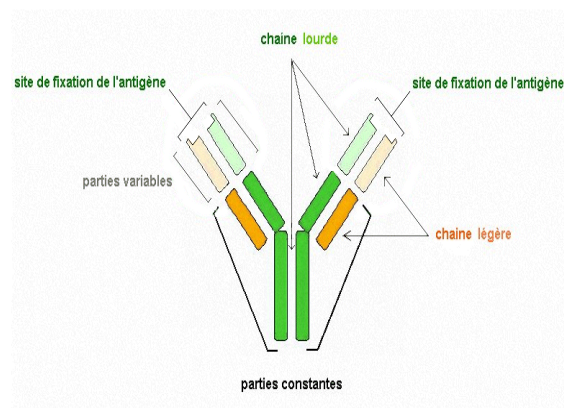
I. Descriptions des deux configurations biochimiques étudiées

I.1. L'interaction protéine/anticorps

Ce premier cas est un cas d'école. Il consiste à étudier l'interaction entre la sonde : la protéine A et un anticorps cible complémentaire. Nous avons choisi la protéine A (43 kDa) qui est un constituant de la paroi cellulaire de la bactérie staphylocoque doré et l'anticorps de type IgG1 (150 kDa) qui reconnaît cette protéine produit à partir d'une souris (fourni par sigma Aldrich). La Figure 102 présente ces deux éléments.



a)



b)

Figure 102 : a) image d'une protéine A b) d'un anticorps

La protéine A a une forme complexe. L'anticorps est schématisé en forme de « Y » (Figure 102.b). Sa structure est conceptuellement séparée en deux parties :

1. une partie variable spécifique de l'antigène à détecter ou site de fixation
2. une partie constante spécifique de l'organisme générateur de ces anticorps composée d'une chaîne légère et d'une chaîne lourde

Les parties variables sont celles qui vont permettre de reconnaître spécifiquement la protéine mais aussi un peptide ou un anticorps. La partie constante est fonction de l'organisme qui a sécrété cet anticorps. Ainsi, si un anticorps A reconnaît spécifiquement un anticorps B provenant d'une chèvre, l'interaction entre les deux anticorps se fera entre les parties variables de l'anticorps A et la partie constante de l'anticorps B.

Dans notre cas, nous allons utiliser la protéine A comme sonde (fixée sur le substrat) et l'anticorps sera la molécule cible. L'interaction entre ces deux biomolécules n'est pas seulement constituée d'interaction anticorps/antigène. En effet, la partie variable de l'anticorps va interagir avec la protéine A. Une interaction supplémentaire de la partie

constante de l'anticorps avec la protéine A est aussi présente²²² et dépend donc de l'origine de l'anticorps. Une étude présente l'interaction entre la protéine A et des anticorps provenant de différents animaux²²³. Elle démontre que l'interaction dépend du type d'anticorps. En effet, il est possible de les classer en quatre catégories : IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄ qui diffèrent par la configuration de leurs chaînes légères. L'étude montre que la partie constante des anticorps de type IgG₁ ne réagit que très faiblement avec la protéine A. C'est pourquoi nous avons choisi ces anticorps IgG₁. L'interaction avec les parties constantes sera ici faible. Nous étudierons donc dans ce cas l'interaction entre la sonde (protéine A) et les parties variables de la cible (anticorps IgG₁)

I.2. Le criblage pharmaceutique

Le criblage pharmaceutique a l'objectif principal de tester l'efficacité d'un grand nombre de molécules qui, après validation clinique, seront le ou les principes actifs de traitements médicaux.

Après discussion avec des biochimistes travaillant dans ce domaine, il s'est avéré intéressant d'adapter un protocole de criblage sans marquage au format biopuce. L'objectif de ce protocole est de tester l'efficacité d'inhibition de l'activité d'une enzyme : la kinase, vis-à-vis de son substrat, dans notre cas un peptide dit src. Sans inhibiteur et en présence d'ATP (AdénosineTriPhosphate) en solution, la kinase engendre une phosphorylation de peptides-src disposés sur une surface (Figure 103).

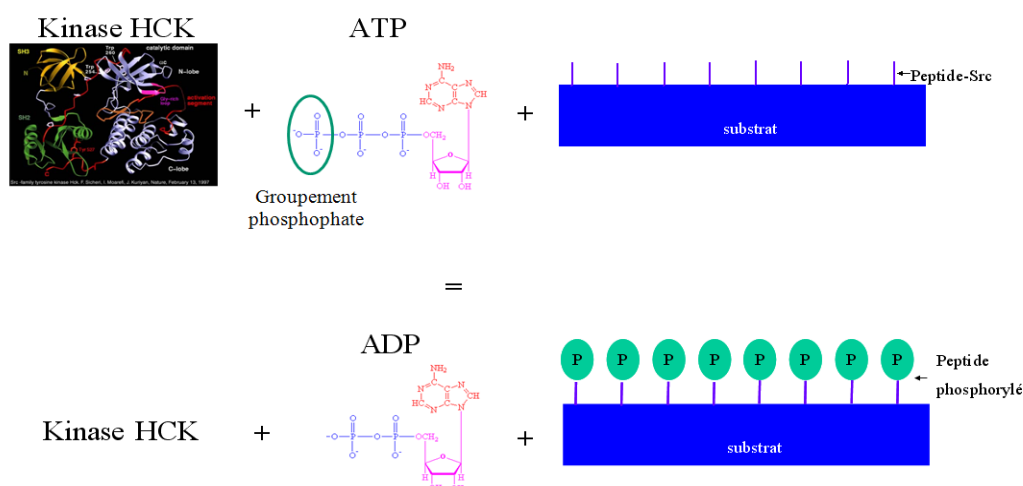


Figure 103 : schéma représentant la phosphorylation d'un peptide déposé sur un substrat sous les effets conjugués d'une enzyme (la kinase) et de l'ATP

²²² Graille M, (2000). *Proc Natl Acad Sci U S A*. **97**, 5399-5404.

²²³ Richman et al. 128 (5): 2300. *J Immunol*

Une phosphorylation signifie que l'un des groupements phosphate PO_3 présent sur l'ATP est transféré au peptide : il va ainsi être phosphorylé (Figure 103). Son mécanisme est le suivant : l'ATP se fixe sur la kinase qui interagit ensuite avec le peptide. Le groupement phosphate est alors transféré grâce à la kinase. La kinase « catalyse » le transfert du groupement phosphate de l'ATP vers le peptide : la phosphorylation.

Par contre, si l'on rajoute une molécule inhibitrice dans la solution, cette réaction de phosphorylation ne peut pas avoir lieu ou avoir lieu partiellement (Figure 104). L'efficacité de l'inhibition réside dans le fait que l'inhibiteur (qui ne présente pas de groupement phosphate) va prendre la place de l'ATP sur la kinase et ainsi empêcher le transfert du groupement phosphate et donc la phosphorylation.

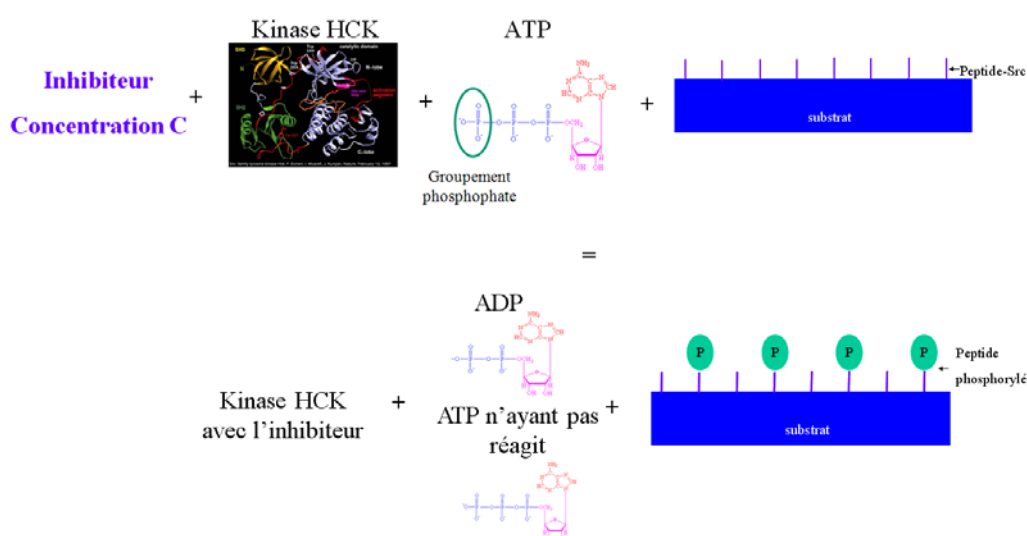


Figure 104 : schéma représentant la phosphorylation partielle des peptides présents sur la surface sous l'effet d'un inhibiteur de la kinase

Il est important de pouvoir tester un grand nombre de molécules afin de diminuer le coût de recherche de tels principes actifs. Or actuellement, la méthode de détection, et plus particulièrement de quantification, de l'efficacité des inhibiteurs est basée sur du marquage ultérieur par fluorescence (Figure 105).

Après la phosphorylation partielle de la Figure 104, le substrat est immergé dans une solution contenant un anticorps reconnaissant spécifiquement les groupes phosphates. Un deuxième anticorps marqué en fluorescence et reconnaissant ce premier, permet ensuite de quantifier le degré de phosphorylation du substrat. On en déduit alors l'efficacité de l'inhibiteur. La comparaison entre cette technique traditionnelle et la détection par diffraction démontre que cette dernière présente ici un grand intérêt car elle permet de supprimer cette

étape de marquage, longue, couteuse et d'ouvrir un large champ de recherche de principes actifs.

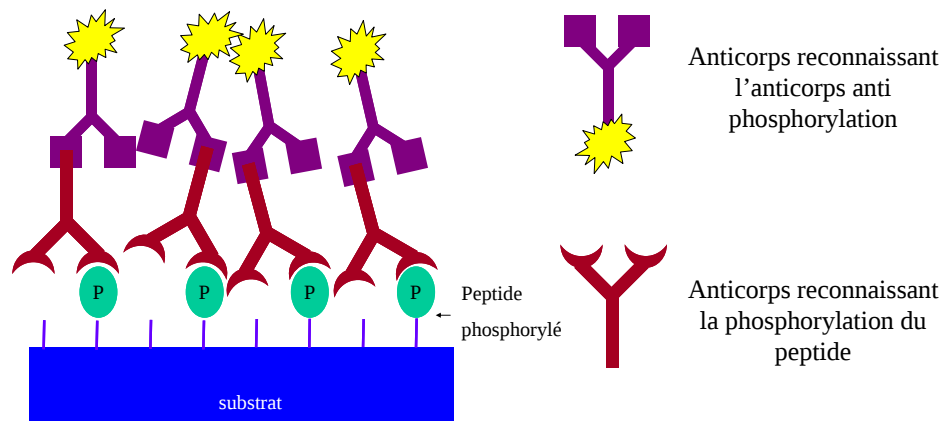


Figure 105 : méthode actuelle de détection et de quantification de la phosphorylation du substrat

II. La chimie de surface retenue

II.1. Choix de la chimie de surface

Ce choix repose sur l'interaction forte qui existe entre la streptavidine et la biotine ainsi que sur la possibilité de fonctionnaliser avec de la biotine la protéine A et le peptide src.

Notre choix de chimie de surface s'est donc porté sur la fixation de streptavidine sur des lames de verre fonctionnalisées avec un silane présentant un groupement époxyde puisque nos molécules sondes biotinylées, la protéine A et le peptide-src, s'y fixent aisément.

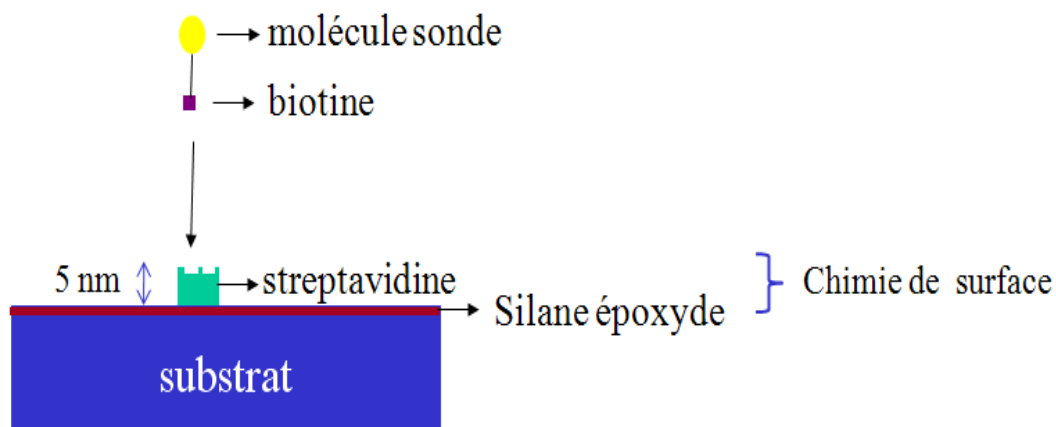


Figure 106 : schéma représentant la chimie de surface permettant la fixation des molécules sondes

II.2. Configuration du montage expérimental

Afin de pouvoir observer les signaux de diffraction en temps réel, nous avons réalisé le dispositif expérimental de la Figure 107.

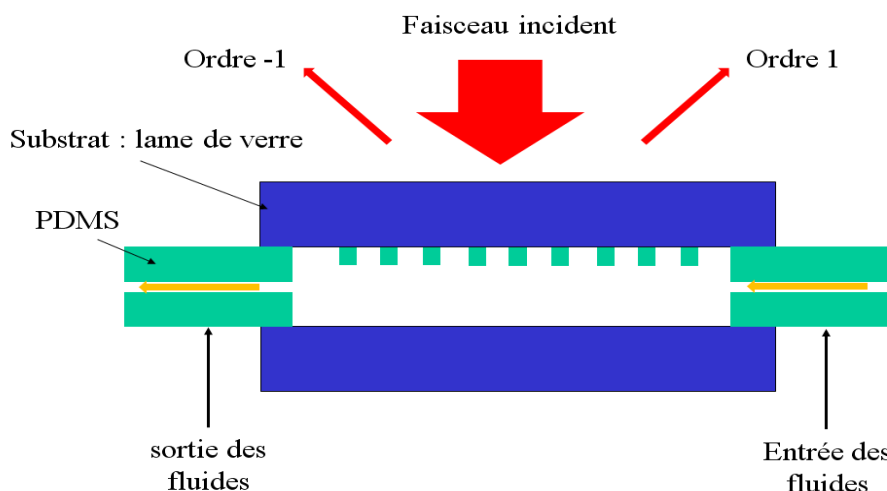


Figure 107 : schéma représentant la configuration du montage expérimental permettant de faire circuler des fluides sur le réseau tout en mesurant la puissance diffractée.

L'observation est toujours réalisée en réflexion mais le faisceau incident illumine le réseau par sa face arrière. La seule condition permettant l'utilisation de cette configuration est la transparence du substrat (lamelle de verre, lame de verre, ...). Il présente l'avantage d'intégrer une cellule fluide en PDMS qui permet d'amener les fluides réactifs sur le réseau ou de le sécher sans avoir à manipuler le substrat. Cette cellule est fermée sur sa partie supérieure par la lamelle de verre support des sondes et en bas par une lame de verre sans motifs. Ainsi il nous est possible de mesurer les variations d'intensité diffractée au cours du temps. Ce dispositif permet de plus une meilleure stabilité du signal lors du passage de fluides, intègre un fonctionnement en biocapteur et prépare les détections sans marquage en mode biopuce ou multi-biocapteurs (la position des réseaux par rapport au laser et au système de détection reste fixe après une première calibration).

II.3. Etude de la désorption de la streptavidine

La couche ou le réseau (voir suite) de streptavidine destinée à accrocher les sondes biotinylées doit être stable. Pour vérifier sa stabilité nous avons réalisé un réseau de

streptavidine de $400\mu\text{m}$ par $400\mu\text{m}$ de pas $1\mu\text{m}$ la largeur 560nm par microcontact printing et suivi l'évolution de son spectre de diffraction au cours de rinçage successifs.

Nous avons rincé ce réseau de streptavidine en injectant un débit de PBS dans la cellule fluïdique et ceci à trois reprises (début repérés par 1,2,3 sur la Figure 108) et pendant des durées cumulatives différentes.

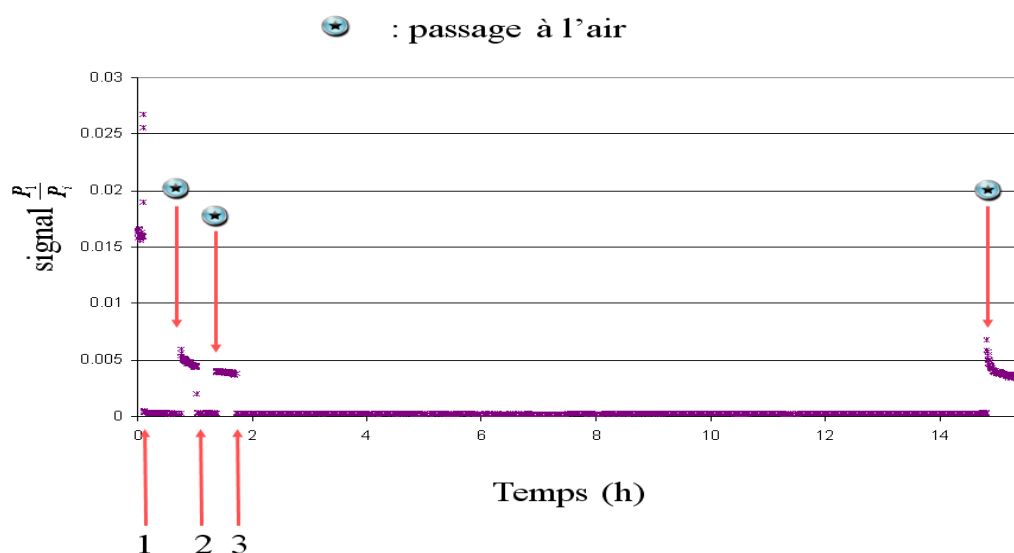


Figure 108 : graphique représentant le signal mesuré par la système de biopuce diffractante. Ce signal émane d'un réseau de streptavidine ($400\mu\text{m} \times 400\mu\text{m}$, largeur de ligne 500nm , pas $1\mu\text{m}$) déposé sur une lame de verre et rincé par du PBS IX.

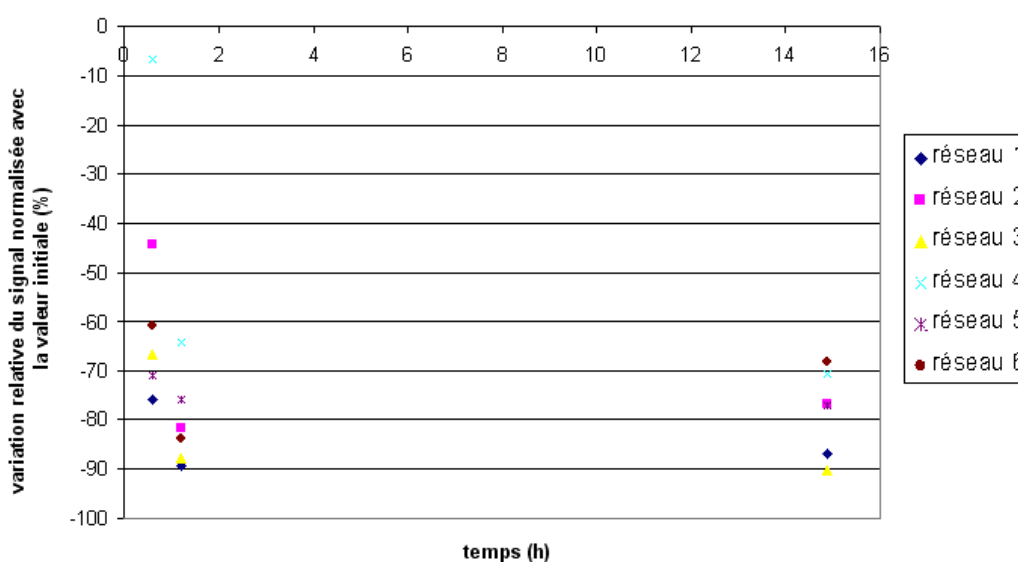


Figure 109 : variation du signal due à la désorption de la streptavidine. Les ratios sont normalisés par rapport à la valeur mesurée sans rinçage.

La Figure 109 compare les variations relatives des signaux à la suite de chaque rinçage des 6 réseaux. La mesure est faite après injection d'air afin d'arrêter la désorption à un instant donné et ainsi réaliser une moyenne sur plusieurs mesures mais aussi réduire le rapport signal sur bruit. En effet, en milieu liquide, le signal est très atténué et le rapport signal sur bruit important. Nous constatons que la durée minimale du rinçage permettant d'avoir un signal diffractif stable est de 1h 20 min.

II.4. Détermination de l'indice optique de la streptavidine

Comme nous l'avons constaté dans le chapitre II, la connaissance du paramètre indice de la chimie de surface est important. Cet indice est souvent inconnu. Afin de démontrer l'application de ce dispositif expérimental type cellule micro fluïdique à la détermination des indices de biomolécules inconnues nous présentons ci-dessous son application à la streptavidine.

En effet, la comparaison du signal de diffraction d'un réseau de streptavidine stabilisé à l'air et en milieu liquide (PBS 1X) permet de remonter à l'indice de la streptavidine. Comme nous l'avons montré, la diffraction d'un réseau émane d'une différence d'émission par ses lignes et par ses creux. Cette différence d'émission est corrélée à la différence d'indice optique. Ainsi, lorsqu'un réseau est composé de lignes d'indice 1.5, le contraste d'indice est de 0.5 lorsque le milieu est de l'air. Par contre, dans de l'eau (indice 1.33), le contraste n'est plus que de 0.17 (Figure 110). Donc, dans un milieu liquide le réseau diffracte moins qu'à l'air. Ce constat nous assure de l'intérêt du mode biopuce (donc à l'air) de la biodétection par diffraction.

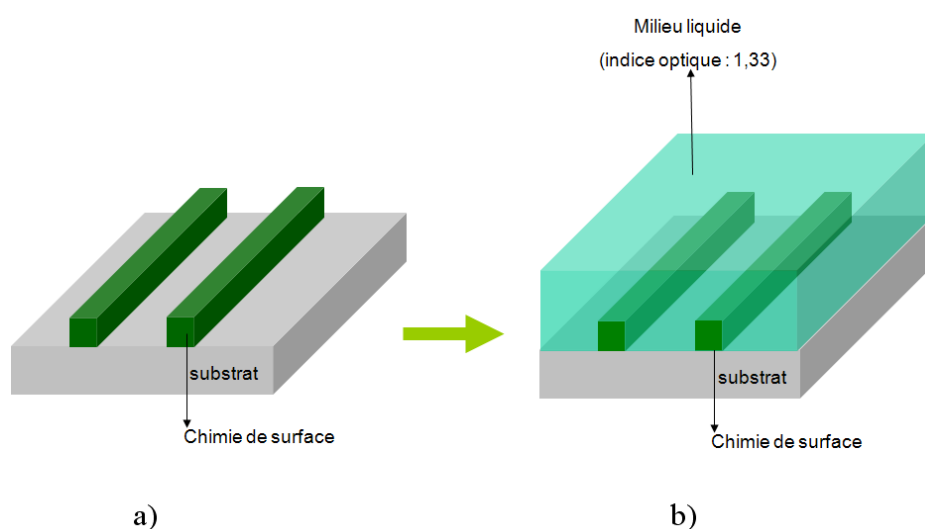


Figure 110 : schéma représentant un réseau a) à l'air b) en milieu liquide

Nous avons simulé un réseau de lignes dont la hauteur varie ainsi que l'indice et dans deux milieux différents : l'air et l'eau. Nous avons fait le rapport entre les deux signaux afin d'établir le facteur de réduction engendré par le changement d'indice du milieu ce que nous avons reporté sur la Figure 111 pour différentes épaisseurs et différents indices optiques de lignes. Les courbes bleues représentent les cas où l'indice des lignes est inférieur à l'indice du milieu liquide et les courbes rouges représentent la situation inverse. La différence d'indice entre les molécules des lignes et le milieu est entre deux courbes (rouges ou bleues) de 0.02.

Nous remarquons que pour une différence d'indice nulle, le rapport tend vers 0 car le réseau en milieu liquide ne diffracte plus. De plus, nous constatons que ce rapport est pratiquement indépendant de la hauteur des lignes. Ses variations pour de faibles contrastes d'indices démontrent qu'il est possible de déterminer par diffraction de réseaux de biomolécules leur indice.

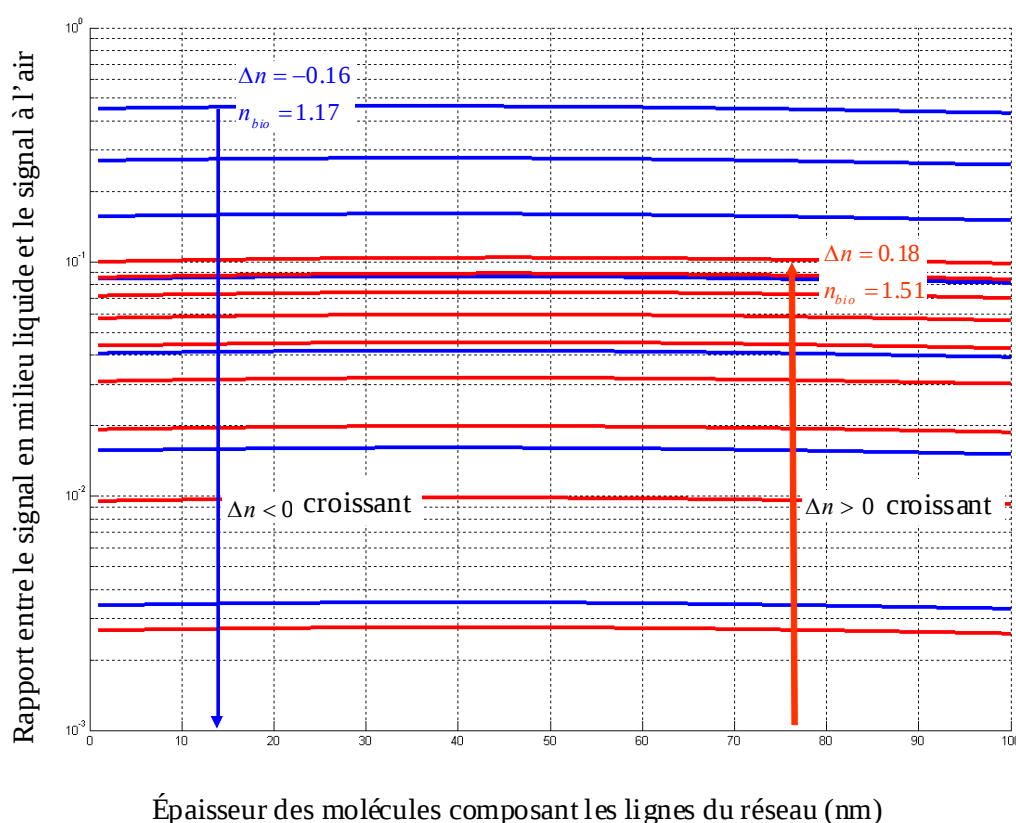


Figure 111 : effet du changement d'indice du milieu selon l'épaisseur des lignes du réseau. Les courbes bleues représentent une différence d'indice optique négatif entre celui du milieu liquide (1,33) et celui des molécules du réseau. Les courbes rouges représentent une différence positive. L'écart d'indice entre chaque courbe est de 0,02.

Pour le calculer, nous quantifions le rapport entre le signal du réseau de streptavidine en milieu liquide et celui à l'air pour chacun des 6 réseaux testés. Ce signal est obtenu après le dernier rinçage afin de s'assurer de la stabilité des molécules sur la surface. Nous avons en moyenne un rapport de $2.7 \cdot 10^{-2}$ avec un écart type de 12%.

La Figure 111 nous donne alors deux valeurs possibles :

- soit 1.28 (± 0.005) : la différence d'indice avec le milieu liquide est négative : -0.05
- soit 1.4 (± 0.01) : la différence d'indice avec le milieu liquide est positive : -0.07

Une mesure semblable dans un troisième milieu nous permettrait de faire ce choix. En ce qui nous concerne, nous nous sommes basés sur une publication récente²²⁴ qui, par le biais d'un interféromètre composé de deux guides d'onde, mesure l'indice de la streptavidine qui l'évalue à 1.41. Ainsi, de nos deux valeurs nous retenons la valeur de 1.4 (± 0.01). Dans la suite, lors de simulation nous adopterons cette valeur comme indice optique de la streptavidine.

Après avoir étudié la chimie de surface de notre biopuce nous allons maintenant rechercher la meilleure méthode pour réaliser le réseau de biomolécules sondes.

III. Place du tamponnage moléculaire dans le procédé

Pour cela, nous avons deux possibilités (Figure 112) :

1. soit la streptavidine est déposée par μ CP puis les molécules sondes incubées
2. soit la streptavidine est déposée uniformément sur le substrat et nous déposons par μ CP les molécules sondes afin de générer le réseau de diffraction

²²⁴ Graham H. Cross et al., *Biosensors and Bioelectronics*, Volume 19, Issue 4, 2003, Pages 383-390

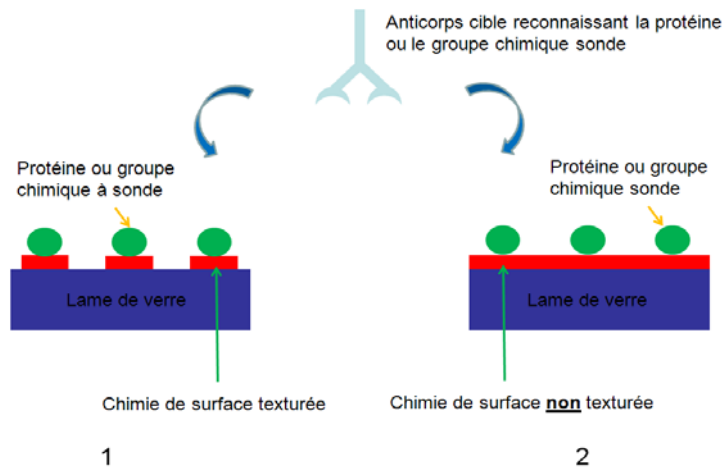


Figure 112 : schéma représentant les deux configurations possibles :

1) la chimie de surface est texturée par le biais du μ CP

2) la chimie de surface est uniforme

Toujours dans notre démarche de réaliser une biopuce à bas coût, nous nous sommes procurés des lames commerciales fonctionnalisées uniformément avec de la streptavidine. Nous avons étudié préalablement à la voie 2 de la Figure 112, leur rugosité par AFM (Figure 113).

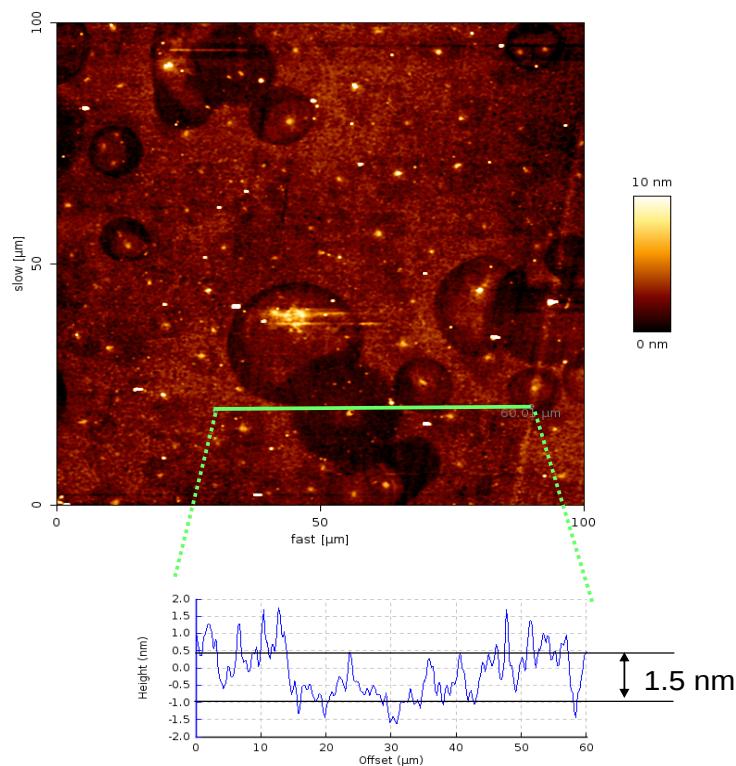


Figure 113 : image AFM et vue en coupe d'une lame de streptavidine commerciale

Sur des zones de $100\mu\text{m} \times 100\mu\text{m}$, proches de la taille de nos réseaux de diffraction, nous observons des zones circulaires qui présentent une différence de topologie de 1.5 nm et des agrégats de l'ordre de 4 nm.

Comme cette rugosité importante risque d'être préjudiciable pour le bon fonctionnement des biopuces nous avons écarté cette solution et retenu la première. Nous avons acheté des lames de verre commerciales et les avons fonctionnalisés afin qu'elles présentent le groupement chimique époxyde (grâce à une silanisation en milieu liquide) de manière à fixer la streptavidine (Il existe des lames déjà fonctionnalisées disponibles dans le commerce). Puis nous y avons déposé par tamponnage moléculaire un réseau de diffraction de streptavidine (voie 1 de la Figure 112).

IV. Application à la détection d'interactions entre une protéine ou un peptide et son anticorps complémentaire

Notre objectif est maintenant d'appliquer cette chimie de surface à la réalisation de réseaux de molécules sondes puis à la détection biologique dans le cadre des deux exemples cités précédemment.

IV.1. Détection de l'interaction entre la protéine A et son anticorps complémentaire

Dans ce paragraphe, nous appliquons cette technologie biopuce à la détection de l'interaction entre la protéine A (la sonde) et son anticorps complémentaire (la cible).

IV.1.1. Etude de l'interaction non spécifique entre la cible (l'anticorps anti-protéine A) et le réseau de streptavidine

Avant l'étude de toute interaction spécifique, il est important de s'assurer qu'il n'existe pas d'interaction non spécifique entre la cible à détecter et le réseau sans la molécule sonde (chimie de surface + substrat).

Etant donné la présence d'une fonctionnalisation époxyde sur la surface des creux et le grand nombre de fonction amines présentes sur l'anticorps cible, nous devons nous attendre à observer une interaction entre les creux et les anticorps car nous savons que la fonction

chimique époxyde interagit fortement avec la fonction amine. Pour vérifier cela, nous réalisons l'expérience dite de 'contrôle négatif' présentée sur la Figure 114.

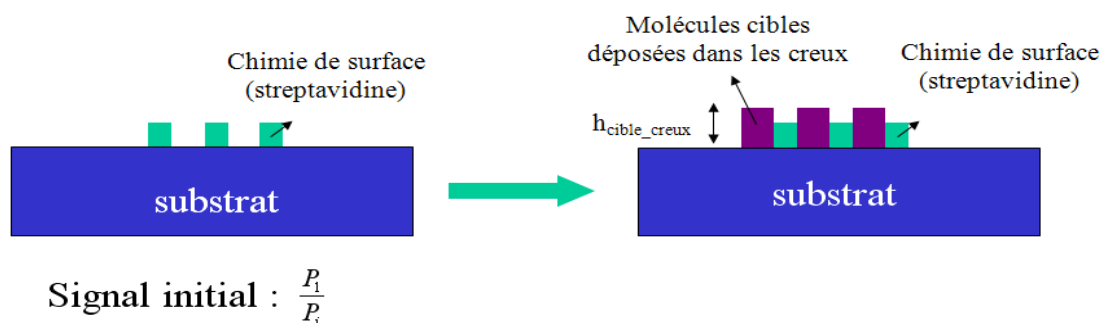


Figure 114 : schéma représentant l'expérience de contrôle négatif de l'interaction entre la protéine A et son anticorps complémentaire

Elle consiste à procéder sans les molécules sondes. Nous avons tamponné par μ CP 6 réseaux de streptavidine (400 μ m par 400 μ m, pas 1 μ m, largeur des lignes 500nm) sur une lame époxyde puis placé cette lame dans la cellule fluïdique au contact de diverses solutions.

L'évolution du signal en milieu liquide lors du rinçage de la streptavidine puis de l'injection des anticorps est présentée sur la Figure 115 pour le réseau numéro 5. Cette courbe démontre que nous pouvons suivre in situ la désorption de la streptavidine (courbe verte) mais aussi l'interaction des anticorps avec les creux du réseau (courbe bleue). Nous constatons la présence d'un bruit en milieu liquide de +/-15% alors qu'à l'air le bruit du signal est de +/-3%. Il est à noter que certaines zones ont un bruit plus important du fait des paramètres d'acquisition, le signal est discrétisé (entre 1h et 2h, et entre 23 et 24h).

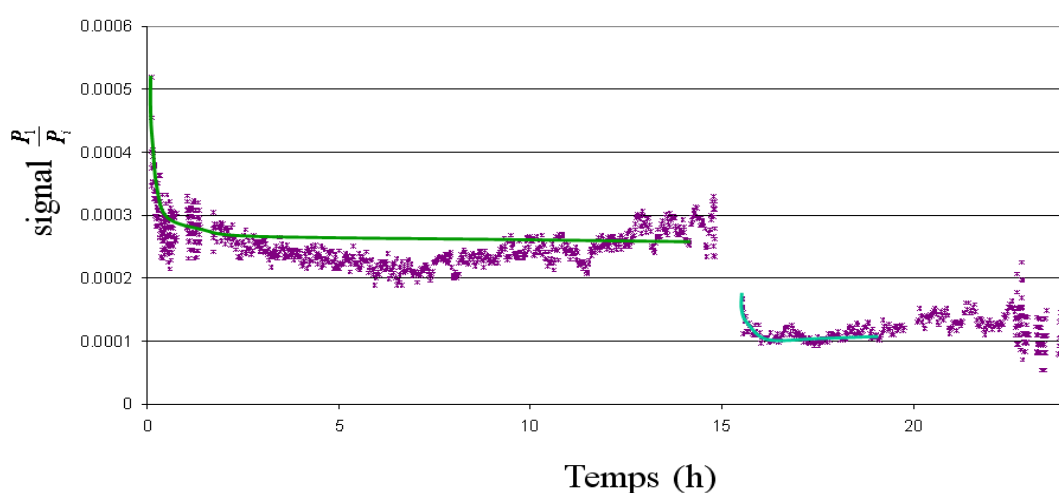


Figure 115 : évolution en fonction du temps du signal de diffraction lorsque le signal est en milieu liquide. En vert, une interpolation de la désorption de la streptavidine est représentée. L'interpolation de l'interaction non spécifique est représentée en bleue.

Cependant afin d'amplifier le signal (et donc augmenter le rapport signal sur bruit) mais aussi de se rapprocher de l'application biopuce nous préférons privilégier un passage à l'air. Cette procédure prépare la méthode de biodétection où le format final est une lame dont on mesure les propriétés de diffraction à l'air.

Sur la Figure 116, nous reportons l'évolution du signal de diffraction lors de différentes étapes de rinçage et d'injection des anticorps en fonction du temps.

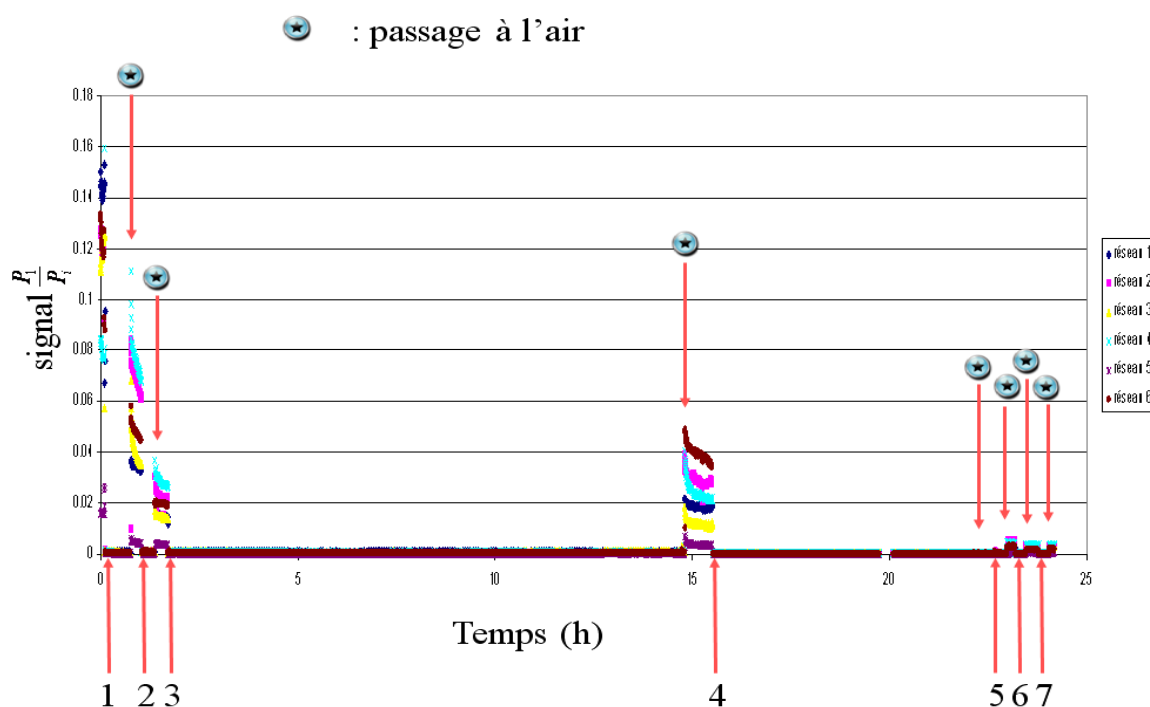


Figure 116 : signaux mesurés au cours du temps composés de passage à l'air à chaque étape du protocole

Les différentes étapes sont :

1. 1^{er} rinçage de réseau de streptavidine au PBS
2. 2nd rinçage de réseau de streptavidine au PBS
3. 3^{ème} rinçage de réseau de streptavidine au PBS
4. injection des anticorps (80µg/mL) pendant 7h
5. 1^{er} rinçage de réseau de streptavidine au PBS
6. 2nd rinçage de réseau de streptavidine au PBS
7. 3^{ème} rinçage de réseau de streptavidine au PBS

Nous constatons que chaque réseau ne délivre pas le même signal de diffraction. Nous observons par les étapes 1,2,3 l'évolution des réseaux de streptavidine déjà signalée et sa stabilisation après l'étape 3. L'injection d'anticorps à l'étape 4 modifie le spectre de

diffraction. Mais comme le montrent les étapes 5,6,7, ces réseaux ne sont pas dans une configuration stable dans l'état suivant l'étape 4.

La Figure 117 présente l'effet du rinçage des anticorps après leur incubation. Nous remarquons que G est bien négatif et le signe d'une interaction non spécifique et qu'il augmente très rapidement puis se stabilise. 12 min à 30 min suffisent à enlever une partie importante de l'interaction non spécifique.

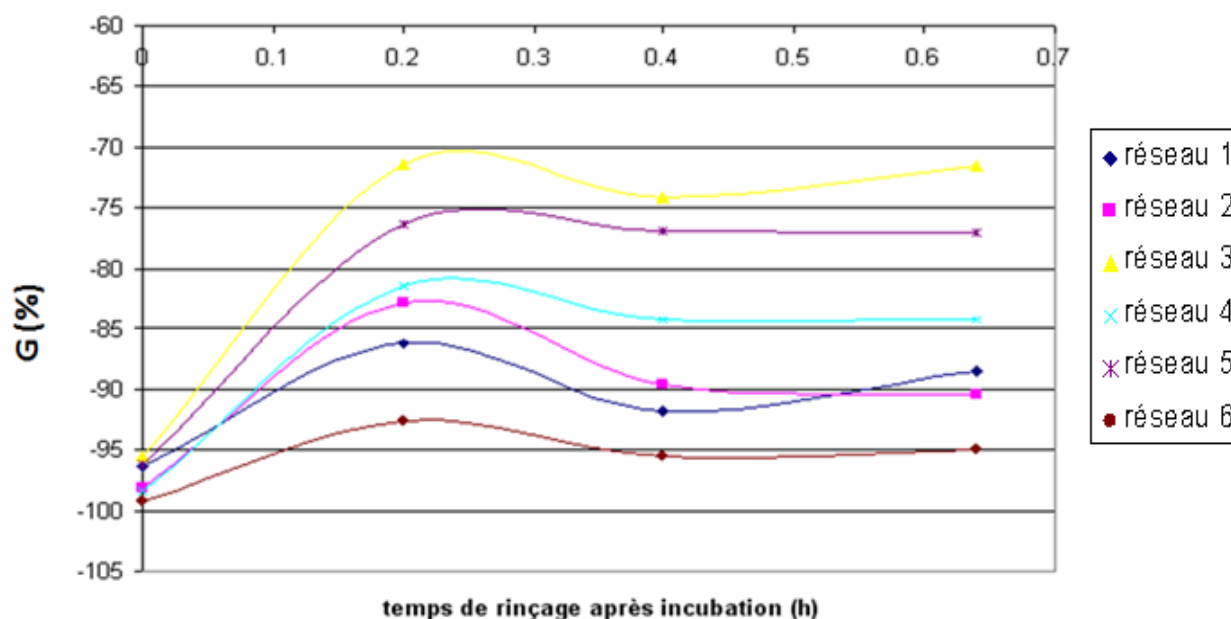


Figure 117 : variation du signal selon le temps de rinçage après incubation des anticorps pour chaque réseau.

La Figure 118 analyse l'influence du type de réseau (car ils sont très différents). Pour chaque réseau, nous traçons l'écart relatif entre le signal après incubation puis rinçage au PBS (au passage à l'air après l'étape 7) et celui juste avant incubation des anticorps (passage à l'air avant l'étape 4). De plus, nous reportons pour comparaison le signal initial, c'est-à-dire avant l'injection des anticorps. Nous remarquons que G est compris entre -75% et -95%.

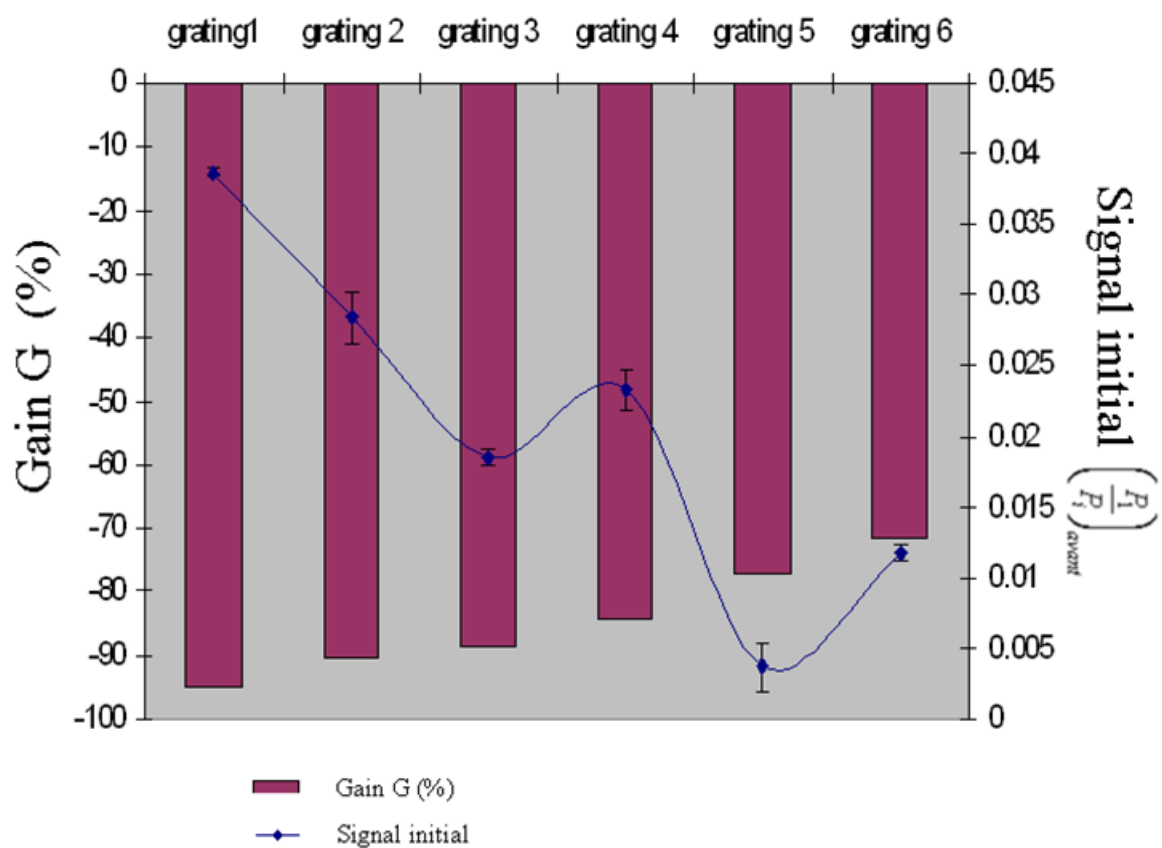


Figure 118 : graphe représentant le gain du signal G (en violet) et le signal initial (en bleu) lors de l'expérience de contrôle réalisée sans la protéine A pour chaque réseau sondé.

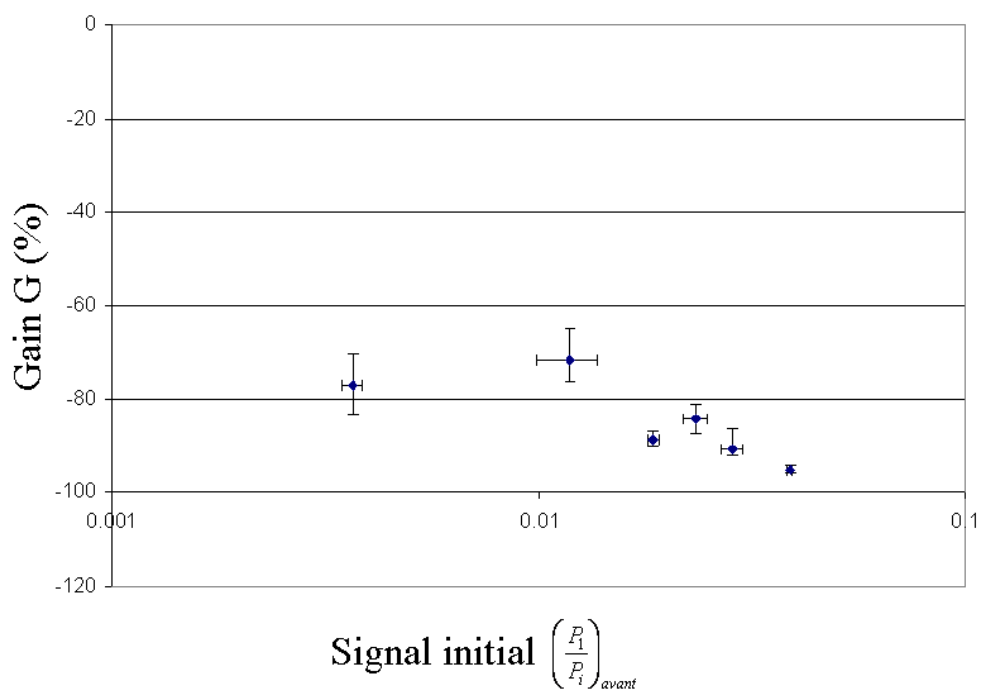


Figure 119 : gain du signal G durant l'interaction de contrôle négatif de la protéine A

De plus, nous observons une corrélation entre le gain G et le signal initial, qui est confirmée sur la Figure 119 où l'on a tracé G en fonction du signal initial. Plus le signal initial de diffraction du réseau est important avant interaction, plus G est négatif, c'est-à-dire que le signal diminue voire même « s'éteint » durant l'interaction.

Afin d'expliquer cette tendance nous avons calculé $\left(\frac{P_1}{P_i}\right)_{initial}$ et G pour un réseau composé de streptavidine de hauteur variable et d'anticorps dans les creux. Nous considérons un indice optique de la streptavidine de 1.4 et une hauteur variable. C'est cette hauteur qui est à l'origine de la variation du signal initial. Pour l'anticorps, nous avons pris un indice équivalent à celui de la streptavidine et des hauteurs variables. Le résultat est présenté sur la Figure 120.

Nous obtenons un ensemble de courbes similaires $G\left(\frac{P_1}{P_i}\right)_{initial}$ qui présentent une phase décroissante suivie d'une phase croissante. Leur minimum de -100% correspond au cas où l'épaisseur d'anticorps présents dans les creux est égale à celle des lignes de streptavidine : le réseau s'éteint complètement.

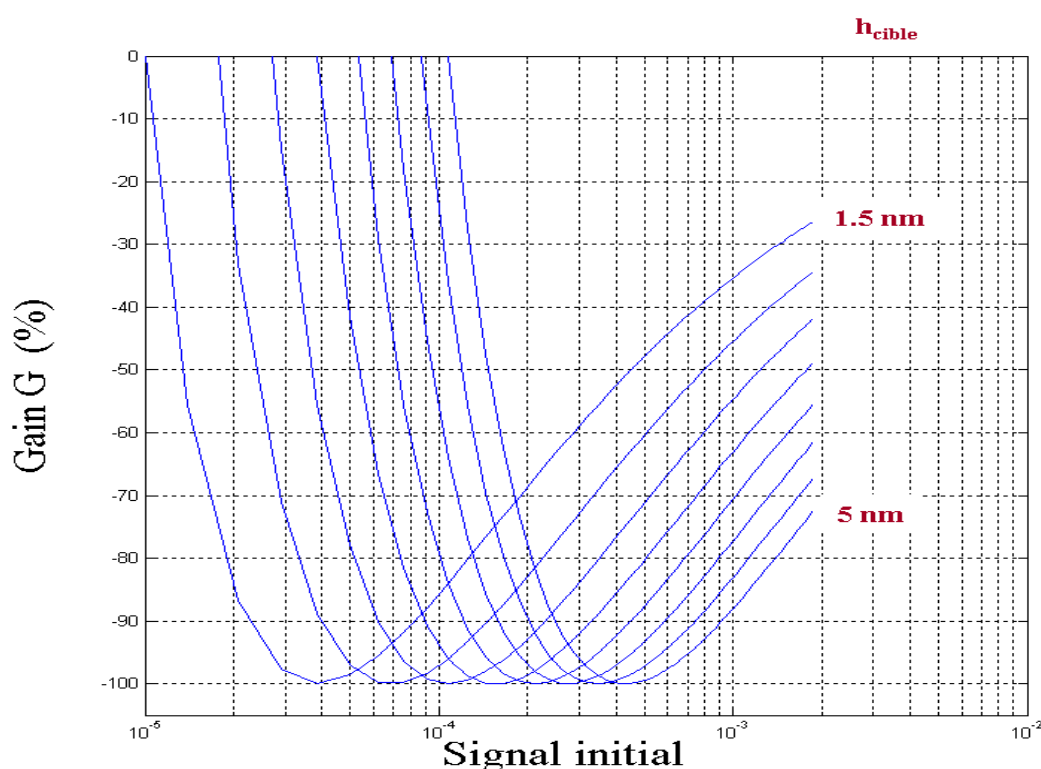


Figure 120 : simulation du gain G durant l'interaction de contrôle négatif pour différentes épaisseurs de molécules cibles déposées dans les creux

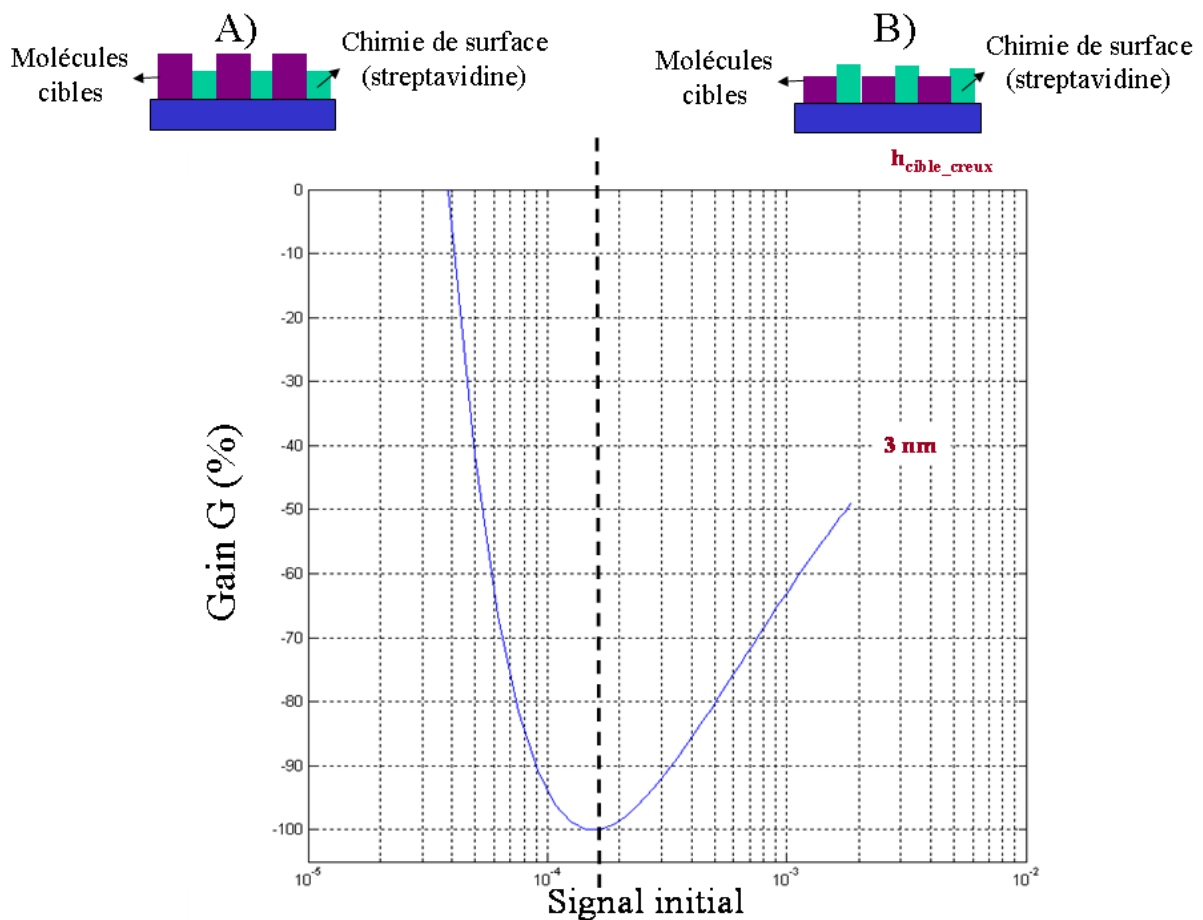


Figure 121 : simulation du gain G durant l'interaction de contrôle négatif pour une épaisseur de 3 nm de molécules cibles déposées dans les creux

Comme le montre la Figure 121, la phase décroissante représente la situation où l'épaisseur d'anticorps est supérieure à celle de streptavidine. Par contre, la phase montante représente le cas où l'épaisseur de streptavidine est supérieure à celle des anticorps. Du fait de la décroissance des points expérimentaux sur la Figure 119, nous pouvons en déduire que l'épaisseur d'anticorps est plus importante que celles des lignes de streptavidine.

En résumé, lors de l'expérience d'interaction non spécifique, l'anticorps comble les creux et se retrouve après rinçage à une hauteur supérieure à celle des lignes du réseau initial de streptavidine suivant la partie A de la Figure 121.

IV.1.2. Mécanisme de désorption des anticorps (cibles) lors d'interaction non spécifique

La conclusion précédente couplée avec les résultats de désorption des anticorps de la Figure 117 nous permet de proposer un mécanisme de désorption lors du rinçage après incubation. En effet, nous constatons qu'après incubation et sans rinçage le réseau est éteint. Ainsi, si l'on considère l'indice des anticorps proche de celui de la streptavidine, les anticorps recouvrent tout le réseau et ce dernier n'existe plus (Figure 122). Lors du rinçage le réseau se remet à diffracter, le contraste entre les lignes et les creux augmente. Des anticorps ont donc été enlevés soit sur les lignes et dans ce cas la hauteur des lignes est plus faible que celle des creux, soit sur les creux et ce sont alors les creux qui ont une épaisseur plus faible. Etant donné la conclusion associée à l'étude de la de la Figure 121 qui stipule que la hauteur finale des creux est supérieure à celle des lignes, nous en déduisons que les anticorps se retirent des lignes. Ce résultat est d'autant plus cohérent qu'aucune interaction forte entre la streptavidine et ces anticorps n'est connue.

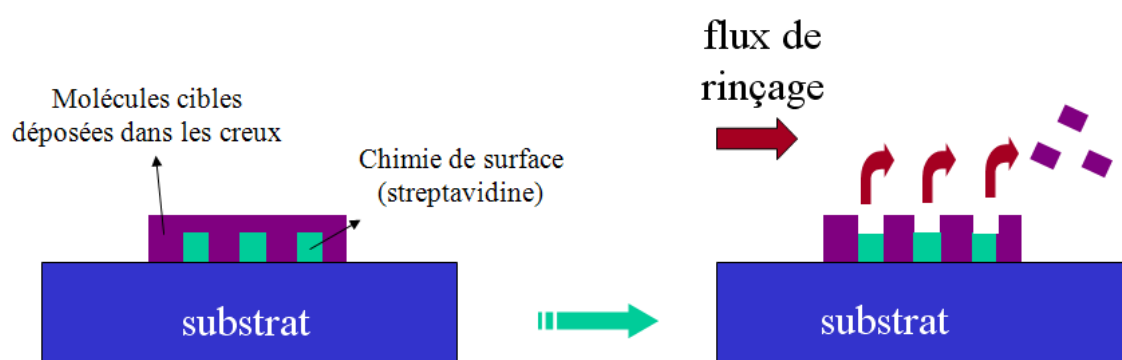


Figure 122 : schéma représentant l'effet du rinçage lors de l'expérience de contrôle négatif de l'interaction entre la protéine A et son anticorps complémentaire.

IV.1.3 Mesure des hauteurs

Pour la suite de l'étude, il est important de connaître la hauteur de la couche d'anticorps déposée sur les creux. Pour cela, nous devons calculer la hauteur des lignes de streptavidine puis la différence d'épaisseur entre ces lignes et celle des cibles déposées dans les creux. Nous supposons comme précédemment que l'indice des anticorps est proche de celui de la streptavidine. Nous simulons le cas d'un réseau de lignes dont l'indice optique est de 1.4 (celui de la streptavidine). La Figure 123 représente cette simulation, c'est-à-dire le

signal diffracté (à un facteur de proportionnalité près dû au montage expérimental) en fonction de la hauteur des lignes.

Nous vérifions par AFM que la hauteur des lignes de streptavidine sans rinçage est de 5nm. A la suite de nos trois rinçages, nous observons que le signal de diffraction diminue d'un facteur 5.6. La Figure 123 nous permet d'en déduire la hauteur de la couche résiduelle moyenne de streptavidine. Le signal pour une hauteur de 5nm est de 4.10^{-4} (u.a). Diminué d'un facteur 5.6 le signal est de 0.710^{-4} ce qui équivaut à une hauteur de 2.1nm. Ainsi, la hauteur résiduelle de streptavidine est de 2.1nm.

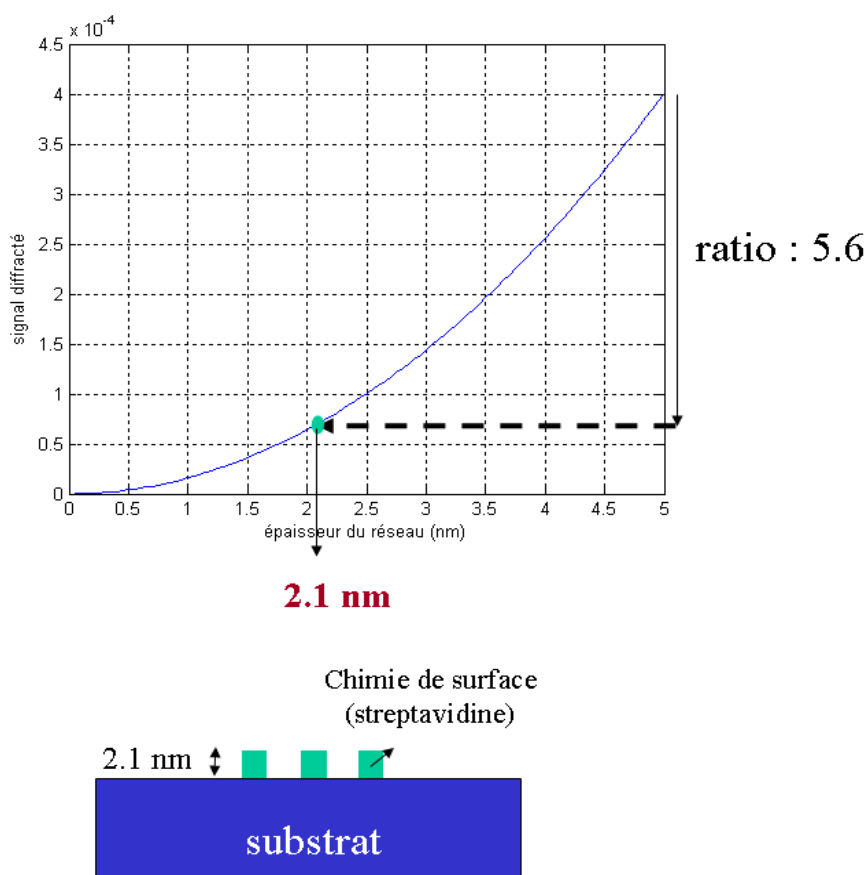


Figure 123 : simulation et schéma permettant de déduire l'épaisseur de streptavidine après rinçage.

Calculons maintenant la différence d'épaisseur entre les lignes et les creux. Pour cela, nous mesurons (Figure 116) le rapport entre le signal pour une épaisseur de 5nm de streptavidine non rincée (étape 4) et celui après incubation et rinçage des anticorps (étape 7) qui est de 42 (moyenne sur les 6 réseaux). La Figure 124 donne alors une surépaisseur moyenne de 0.7nm. Nous en déduisons donc que l'épaisseur d'anticorps dans les creux est de 2.8 nm mais aussi que notre système de détection peut mesurer un réseau de $400\mu\text{m} \times 400\mu\text{m}$ composé de lignes d'indice 1.4, de hauteur 0.7 nm de largeur 560 nm et de pas 1 μm .

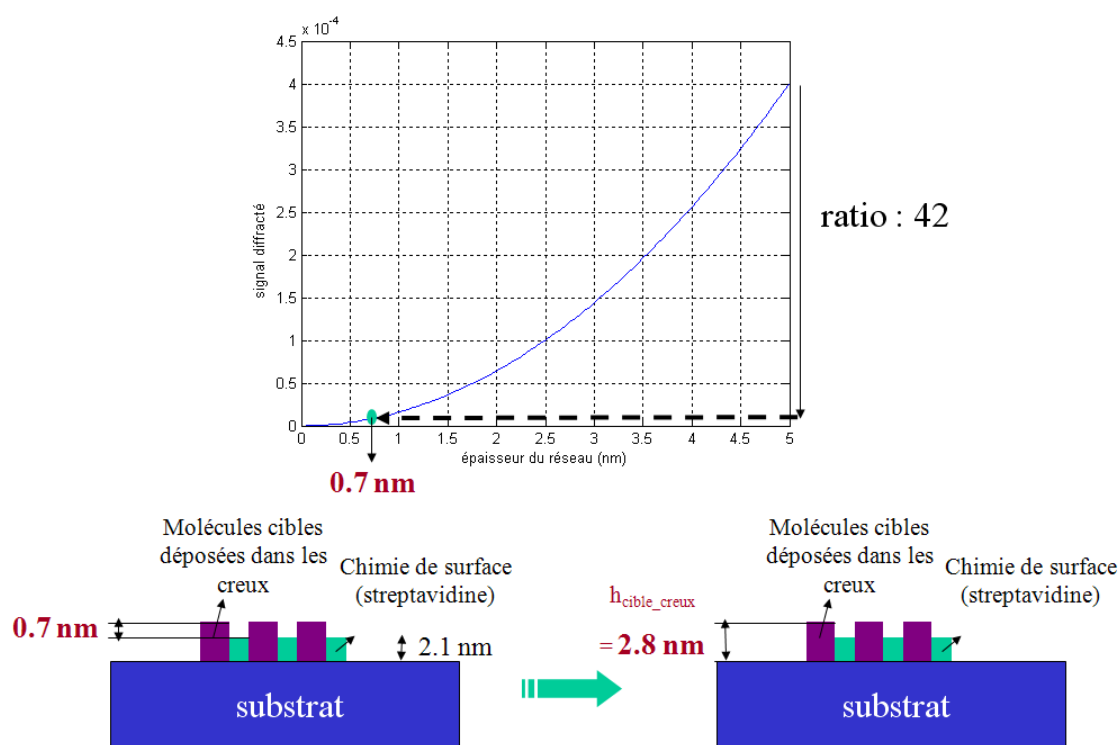


Figure 124 : simulation et schéma permettant de déduire l'épaisseur de streptavidine après rinçage.

En résumé, à cause de la présence d'une interaction non spécifique, il apparaît dans les creux du réseau de streptavidine une épaisseur de cible de 2.8nm qui modifie le réseau initial.

IV.1.4. Étude de l'interaction spécifique entre la protéine A et son anticorps complémentaire

L'étape suivante consiste à étudier l'interaction spécifique entre la protéine A biotinylée et l'anticorps correspondant, en présence d'une interaction non spécifique entre l'anticorps et les creux du substrat. Pour cela, nous rinçons le réseau de streptavidine, incubons la protéine A (60µg/mL durant 45 min) puis utilisons le même protocole que lors du contrôle négatif.

Comme précédemment, nous synthétisons nos résultats expérimentaux sur le graphique de la Figure 125 composé du signal initial et du gain G durant l'interaction pour chaque réseau (4 dans ce cas). Le signal initial est prélevé juste avant l'injection des anticorps.

Nous constatons que, contrairement au contrôle négatif le signal augmente lorsque l'épaisseur de streptavidine décroît (représenté par l'amplitude du signal initial). L'ordre de

grandeur de G est important : entre 200% et 1000 %. Cette tendance est vérifiée sur le graphique de la *Figure 126*. Plus le signal initial est important c'est-à-dire la hauteur des lignes de streptavidine grande, plus G est faible. Signalons au lecteur que les barres d'incertitude sur le signal initial et G sont calculées avec les valeurs maximales et minimales mesurées.

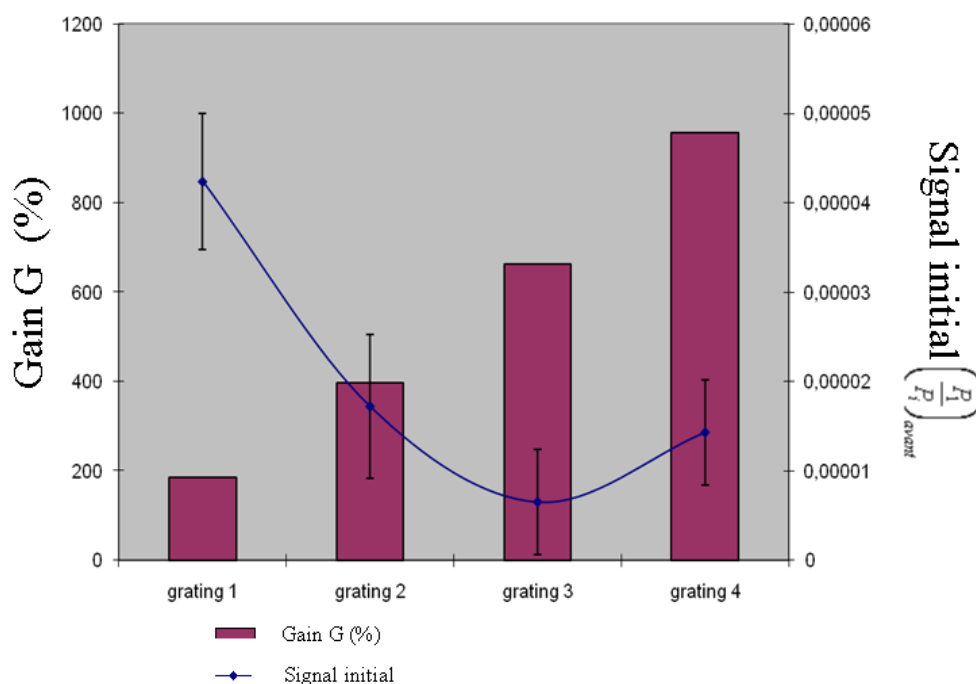


Figure 125 : gain G du signal durant la détection ainsi que le signal avant l'interaction entre la protéine A et l'anticorps complémentaire pour chaque réseau

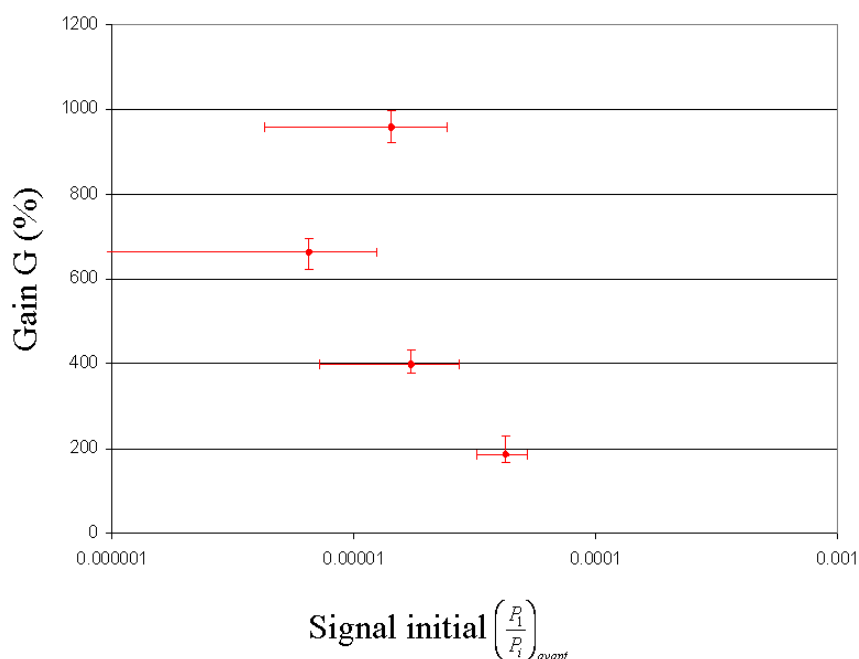


Figure 126 : gain G du signal durant l'interaction entre la protéine A et l'anticorps complémentaire en fonction du signal avant interaction

Afin de comprendre l'origine de cette tendance expérimentale, nous avons réalisé des simulations d'une interaction présentant à la fois une interaction non spécifique de la cible dans les creux et spécifique sur les lignes (Figure 127).

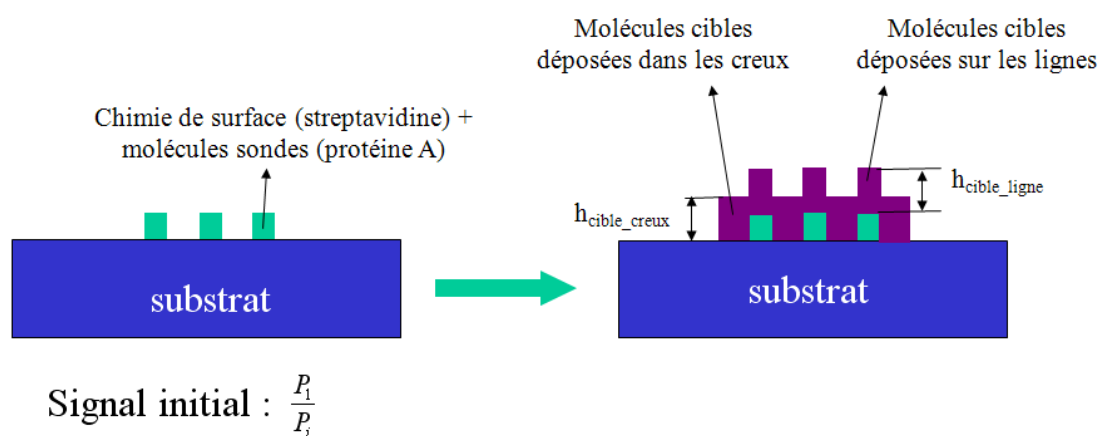


Figure 127 : schéma représentant la configuration simulée

Nos hypothèses sont : un indice des biomolécules de 1.4, une hauteur d'anticorps dans les creux de 2.8 nm et une épaisseur d'anticorps sur les lignes indépendante de l'épaisseur initiale de streptavidine. C'est pourquoi nous avons tracé le gain du signal G en fonction du signal initial pour différentes épaisseurs d'anticorps déposés sur les lignes (Figure 128). Nous observons une décroissance des courbes ce qui est en accord avec nos résultats. Les valeurs expérimentales de G nous permettent d'estimer l'épaisseur de la couche d'anticorps sur les lignes à 8 nm. Cette valeur est cohérente avec celles mesurées sur des couches d'anticorps réalisées par micro contact printing.

Nous interprétons ce résultat par le fait que la concentration en anticorps est élevée entraînant une saturation des sites pouvant interagir. Ainsi, quel que soit le nombre de protéines A pouvant interagir l'épaisseur d'anticorps sera constante. Les valeurs obtenues d'épaisseur d'anticorps déposés sur les lignes sont cohérentes avec des épaisseurs mesurées par AFM de dépôt d'anticorps réalisé par μ CP.

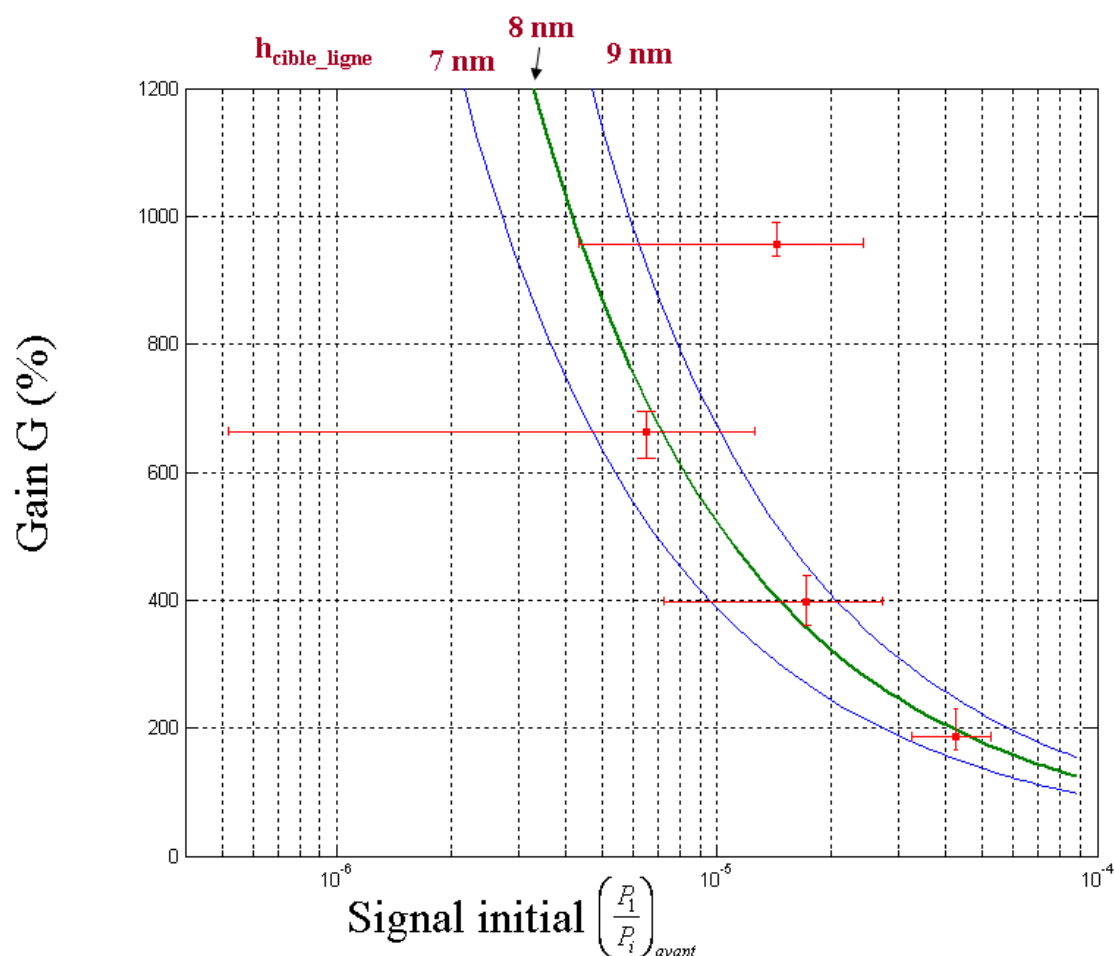


Figure 128 : gain G simulé (ligne bleue) et expérimental (points verts) en fonction du signal initial durant l'interaction entre la protéine A et son anticorps complémentaire. Les courbes théoriques sont tracées selon l'épaisseur de la couche d'anticorps déposés sur les lignes

En conclusion, nous démontrons qu'il est possible de détecter une interaction entre une protéine (la protéine A) et son anticorps correspondant, dans une situation complexe où les deux types d'interactions spécifique et non spécifique se superposent et conduisent à la structure présentée sur la Figure 127. Lorsque les deux espèces sont en présence, le signal est positif et diminue lorsque l'épaisseur de streptavidine augmente. Lorsque la molécule sonde (la protéine A) n'est pas utilisée, le signal est négatif et diminue quand l'épaisseur de streptavidine augmente. De plus en comparant les données expérimentales à des situations simulées, nous avons évalué l'épaisseur du dépôt dans les creux, comparé son épaisseur avec celle des lignes et acquis de l'information sur les phénomènes biologiques. En effet, nous avons montré grâce à la tendance du gain G en fonction du signal initial, que l'interaction est à saturation.

IV.2. Vers le criblage pharmaceutique par diffraction : détection de l'interaction entre le peptide phosphorylé/ anticorps antiphosphorylation

Notre deuxième application concerne l'étude de l'interaction entre un peptide phosphorylé et un anticorps reconnaissant un site de phosphorylation qui est à la base du criblage pharmaceutique. Notre démarche est identique à celle de l'interaction entre la protéine A et son anticorps complémentaire.

La configuration fluide est identique, ainsi que les rinçages de la streptavidine et des anticorps après incubation. La concentration en anticorps est plus faible que dans le cas de l'interaction avec la protéine A et est de 10µg/mL.

IV.2.1. Étude de l'interaction non spécifique (ou contrôle négatif)

Six réseaux composés de lignes de streptavidine sont mis en contact avec la solution d'anticorps cibles reconnaissant la phosphorylation. Le gain G du signal et le signal initial (avant incubation des anticorps) pour chaque réseau réalisé est présentée sur la Figure 129. Nous constatons que les différentes variations relatives sont négatives et comprises entre -25% et -75%. La corrélation semble proche de celle décrite dans l'exemple précédent et est confirmée sur la Figure 130.

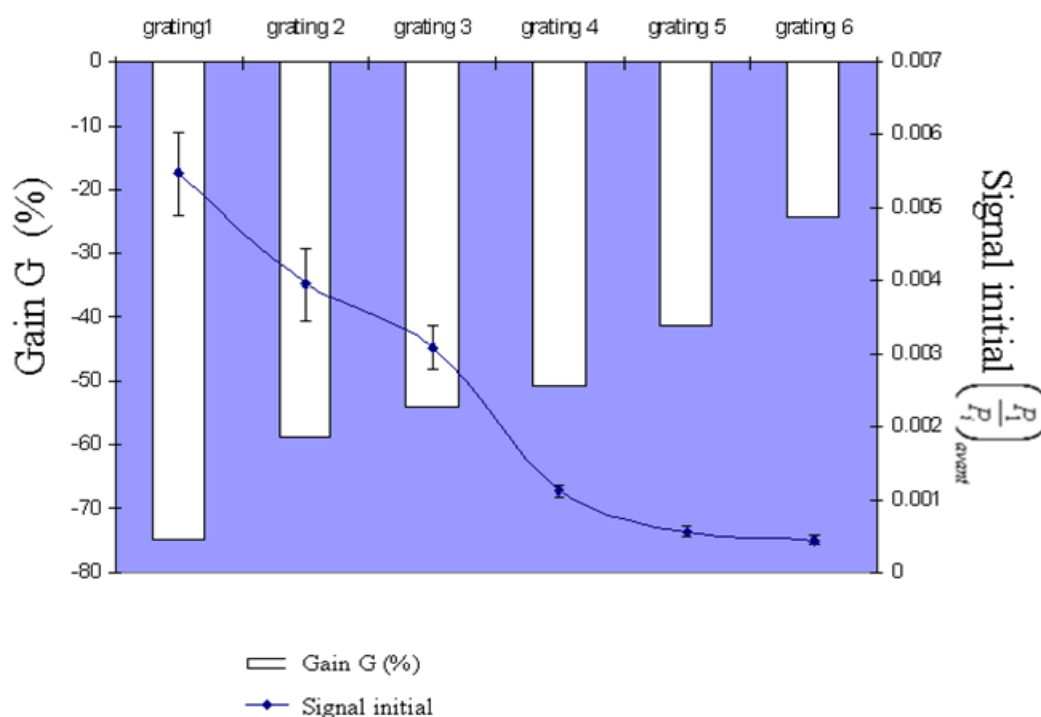


Figure 129 : expérience de contrôle réalisée sans les peptides phosphorylés

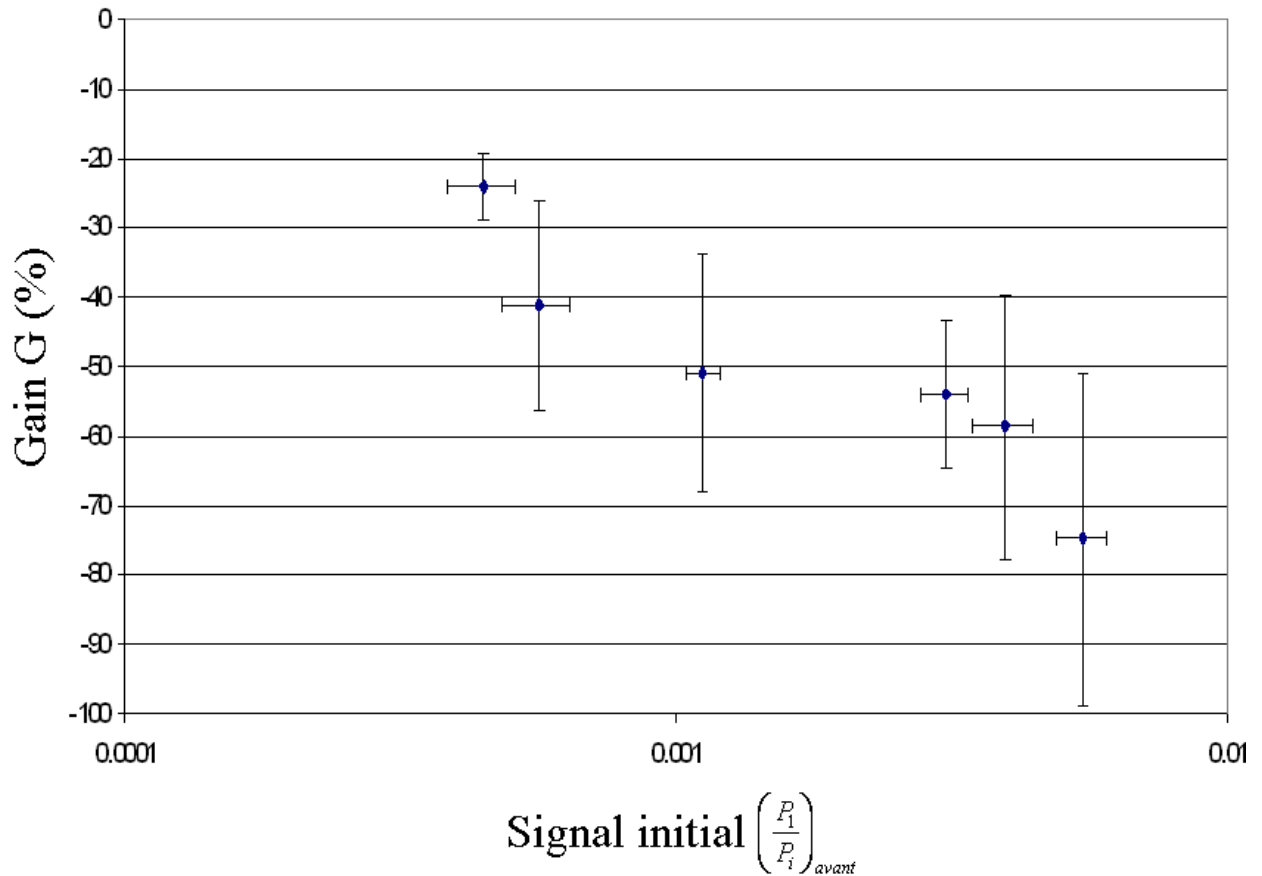


Figure 130 : graphique représentant le gain G en fonction du signal avant interaction.

En effet, plus le signal initial est important, plus le signal s'éteint (G tend vers -100%). Ainsi, nous sommes dans une situation identique à celle du contrôle négatif de l'expérience de la protéine A interprétée par une épaisseur d'anticorps déposée dans les creux supérieure à la hauteur des lignes de streptavidine (voir Figure 121).

Nous avons cherché à connaître l'épaisseur d'anticorps dans les creux afin de pouvoir simuler la suite des expériences. Encore une fois, nous nous sommes placés dans les mêmes conditions que pour la protéine A. C'est-à-dire que nous avons supposé que l'indice optique est identique pour toutes les biomolécules. Puis nous avons utilisé la même simulation d'un réseau de streptavidine de hauteur variable présentée sur la Figure 123. Le rapport entre le signal sans rinçage de la streptavidine et celui après rinçage est de 5,2. Nous en avons déduit que l'épaisseur résiduelle de streptavidine est de 2,2nm (proche de la valeur trouvée dans l'expérience précédente). De même, nous avons calculé une différence d'épaisseur finale entre les lignes et les creux de 1.5nm ce qui nous a permis de déduire une épaisseur d'anticorps présents dans les creux de 3.7nm. L'ensemble de ce raisonnement est synthétisé sur la Figure 131.

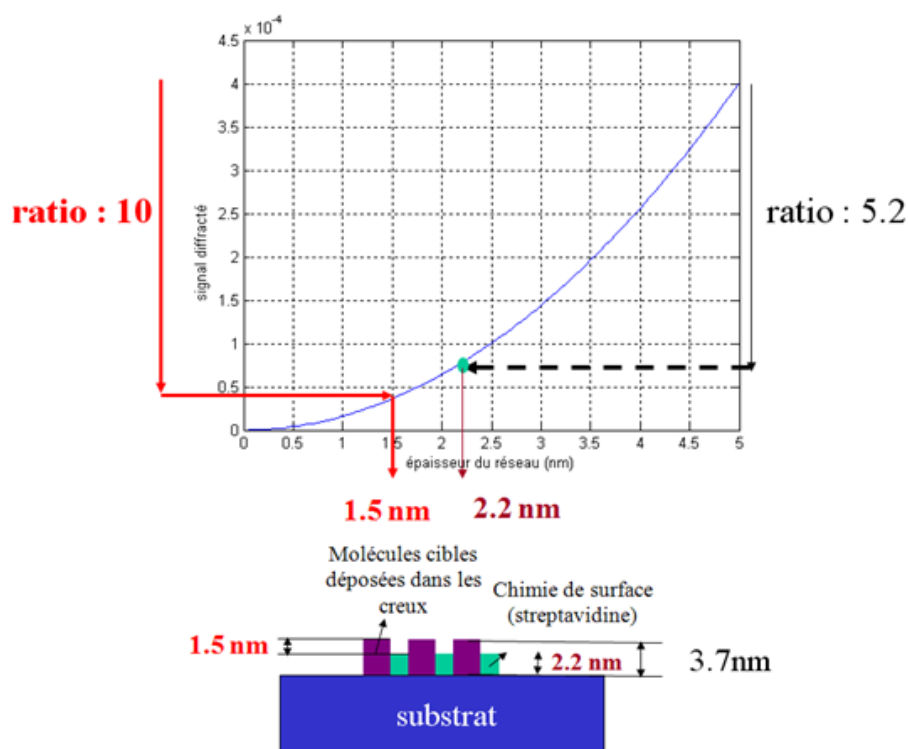


Figure 131 : schéma permettant de calculer l'épaisseur de streptavidine résiduelle (en noir, la différence d'épaisseur entre les lignes et les creux (en rouge) et donc l'épaisseur d'anticorps présent dans les creux.

La présence d'une interaction non spécifique entre la cible et le substrat conduit au réseau de la Figure 131 composé de lignes de streptavidine de hauteur 2.2nm séparées par des lignes d'anticorps de hauteur 3.7nm.

IV.2.2. Étude de l'interaction spécifique

Dans un second temps, nous avons réalisé l'interaction entre les peptides phosphorylés et biotinylés sondes fixés préalablement sur la surface par le réseau de lignes de streptavidine et l'anticorps cible reconnaissant la phosphorylation. Pour cela, nous avons utilisé le même protocole que l'interaction entre la protéine A et son anticorps complémentaire. Seuls trois paramètres ont été modifiés :

- La concentration de peptides phosphorylés est de 1nM
- Le temps d'incubation des peptides est de 1h
- La concentration en anticorps est de 10µg/mL

Le gain G et les signaux initiaux après chaque étape importante et pour chaque réseau sont reportés sur la Figure 132.

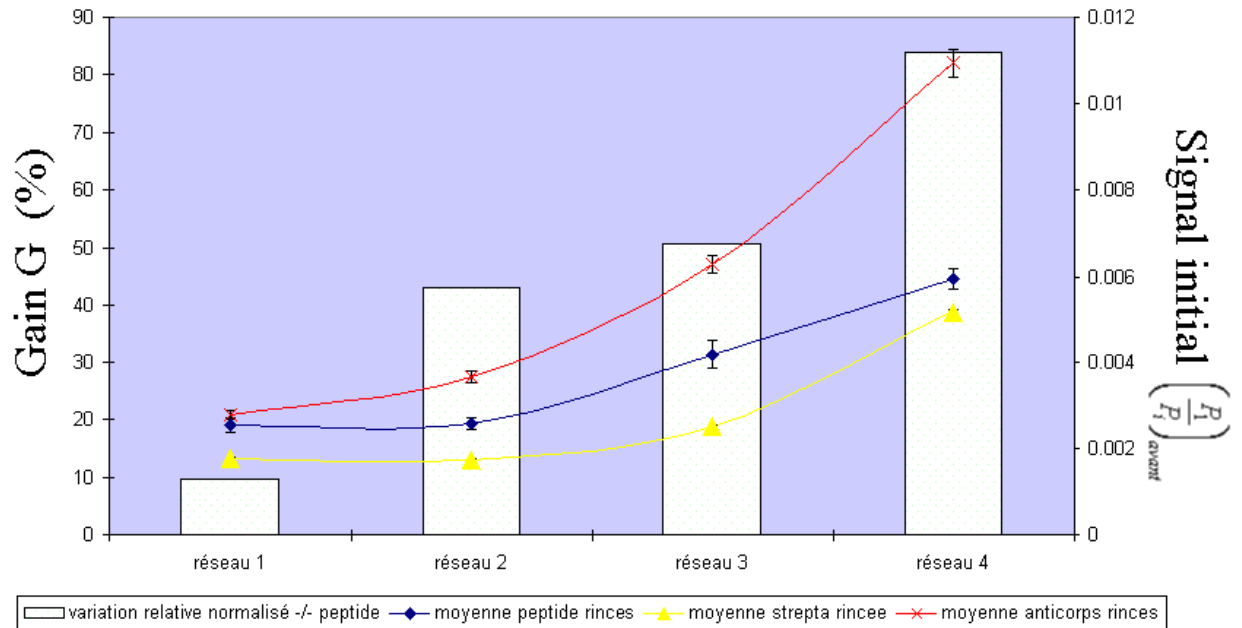


Figure 132 : gain G du signal durant la détection ainsi que le signal avant l'interaction entre le peptide phosphorylé et l'anticorps complémentaire pour chaque réseau

Nous constatons tout d'abord que G est plus faible que dans le cas de l'interaction de la protéine A : entre 10% et 85%. De plus, le signal initial de chaque réseau constitué de streptavidine (courbe jaune) augmente au fur et à mesure de l'injection de la sonde (courbe bleue) puis de la cible (courbe rouge). Enfin, nous remarquons une forte corrélation entre le signal initial (celui des peptides rincés) et G . Cette donnée est confirmée par le graphe de la Figure 133 représentant G en fonction de ce signal initial.

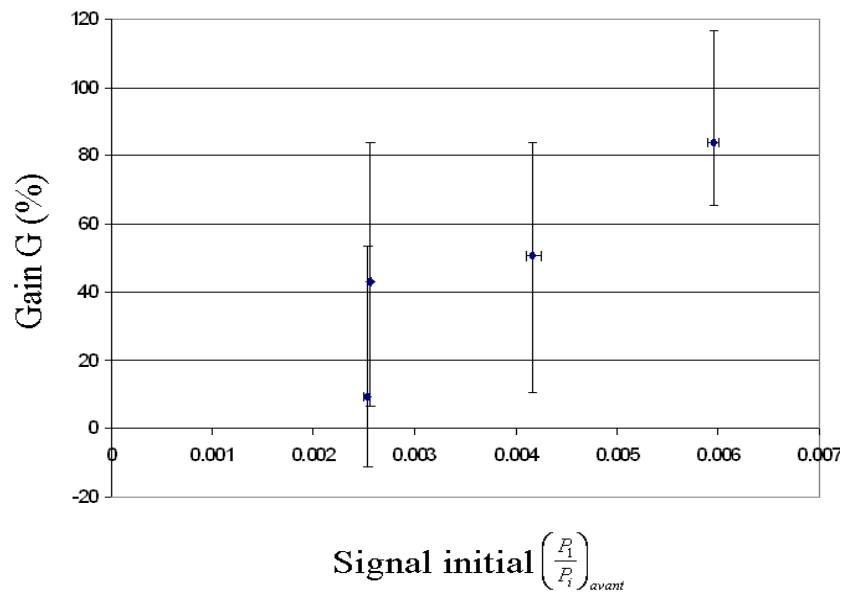


Figure 133 : gain G du signal durant l'interaction entre les peptides phosphorylés et leur anticorps complémentaire en fonction du signal avant interaction.

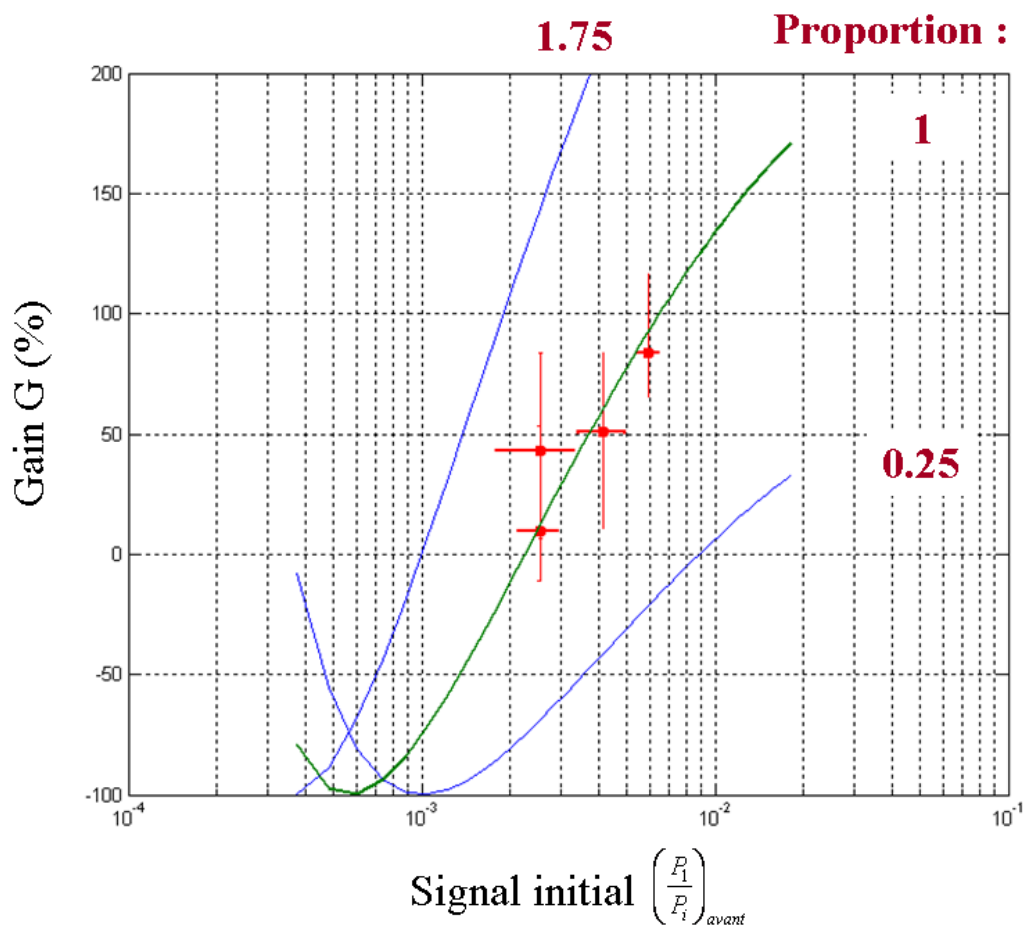


Figure 134 : gain G simulé (ligne bleue) et expérimental (points rouges) du signal en fonction du signal initial durant l'interaction entre les peptides et leur anticorps complémentaire. Les courbes théoriques sont tracées selon la proportion entre l'épaisseur de la couche composée de la molécule d'accroche (streptavidine) et du peptide phosphorylé et celle de l'anticorps.

Cette corrélation est l'inverse de celle observée dans l'interaction de la protéine A. En effet, le gain G augmente avec le signal initial. Afin d'expliquer l'origine de cette tendance, nous avons effectué des simulations. Nous supposons que la hauteur d'anticorps déposée sur les lignes est proportionnelle à la hauteur des lignes du réseau avant interaction. L'épaisseur d'anticorps présents dans les creux est considérée constante et égale à 3.5nm. Nous avons donc tracé le gain G en fonction du signal initial pour différentes proportions entre l'épaisseur d'anticorps déposés et l'épaisseur initiale des lignes (Figure 134).

Le report de nos points expérimentaux obtenus sur nos quatre réseaux nous permet d'en déduire le facteur de proportionnalité de 1. C'est-à-dire que l'épaisseur d'anticorps présents sur les lignes est égale à celle des lignes avant interaction.

Nous avons cherché à connaître les épaisseurs de chaque composant du réseau. Pour cela, nous avons à nouveau utilisé la simulation d'un réseau de lignes d'indice optique 1.4 et de hauteur variable. Nous avons calculé l'épaisseur moyenne de streptavidine et de peptides déposés en comparant les signaux entre chaque étape (Figure 135).

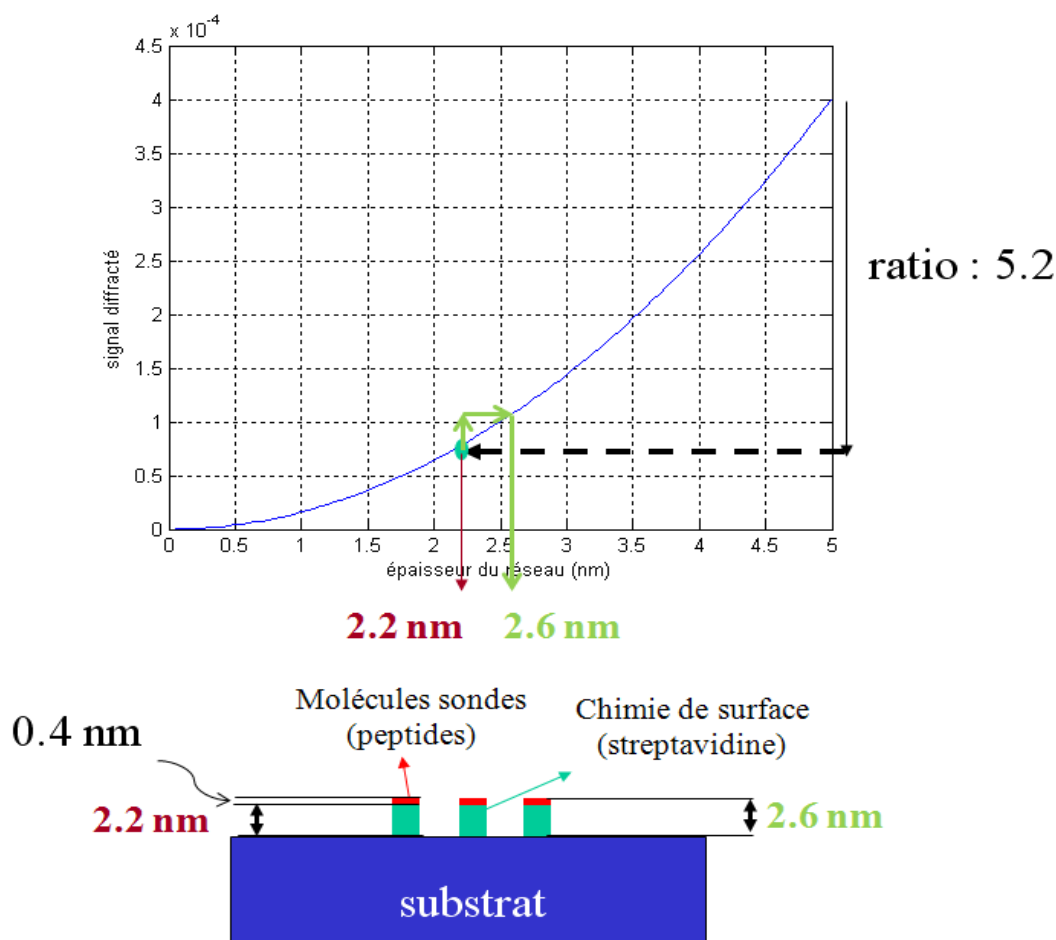


Figure 135 : simulation utilisée pour calculer les épaisseurs de streptavidine résiduelle et de peptides.

Comme le rapport moyen est de 5.2 entre le signal de diffraction de la streptavidine non rincée et celle rincée, son épaisseur est de 2.2 nm. Le rapport moyen entre celui des peptides et celui de la streptavidine résiduelle est de 1.43 (cf. Figure 132). Le signal diffracté de 0.75 devient alors de 1.06 (flèche verte), nous en déduisons une épaisseur totale de 2.6 nm et une épaisseur de peptides de 0,4nm.

Compte tenu du facteur de proportion de 1 trouvé lors de la simulation présentée sur la Figure 134, nous en déduisons une épaisseur totale des lignes (streptavidine + peptides+anticorps) de 5.2 nm. L'épaisseur des anticorps dans les creux étant de 3.7 nm, nous en déduisons que la différence de hauteur entre les lignes et les creux est de 1.5nm. Nous

avons mesuré par AFM une différence de hauteur moyenne de 2 nm (Figure 136). La différence entre notre interprétation des résultats expérimentaux à partir de simulation et la mesure par AFM peut être attribuée au choix de l'indice optique de 1.4 pour chaque composant du réseau. Elle peut aussi être due à des différences d'épaisseur, car notre mesure AFM de 2nm est entachée d'une incertitude importante, comme nous le constatons sur l'image de la Figure 136 qui met en évidence une forte rugosité des lignes mais aussi des creux.

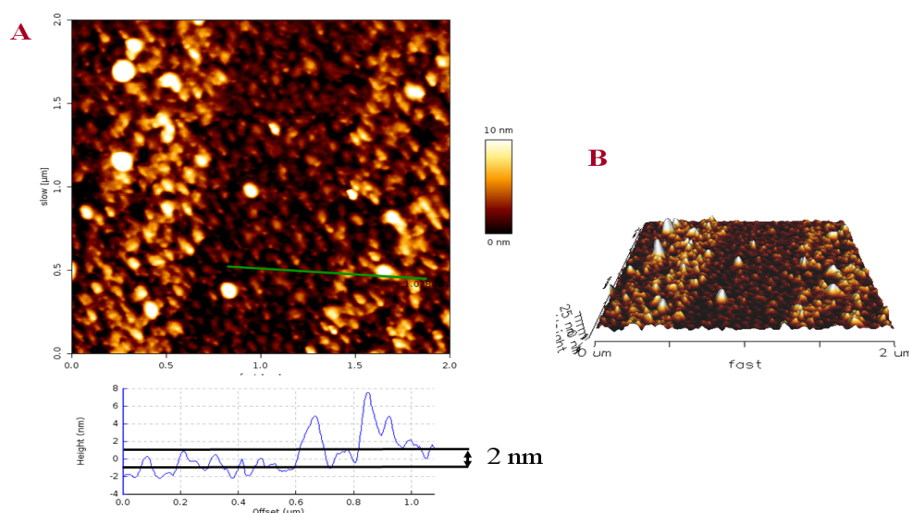


Figure 136 : image AFM du réseau après interaction entre les peptides phosphorylés et leurs anticorps complémentaires

Nous venons de démontrer que l'exploitation des résultats expérimentaux de diffraction obtenus sur un ensemble de réseaux couplé avec l'expérience acquise en simulation de la diffraction nous permet de traiter des situations complexes. Cette démarche permet de proposer un schéma de réseau décrivant le comportement en diffraction qui résulte d'une interaction non spécifique (avec les creux de la cible) schéma, qui sera à la base de l'étude de l'interaction spécifique recherchée. L'exploitation des résultats obtenus sur plusieurs réseaux au cours de l'interaction spécifique par la même méthode de couplage simulation expérience nous conduit ensuite à proposer le schéma final et cohérent du réseau résultant de cette interaction spécifique de la Figure 137.B.

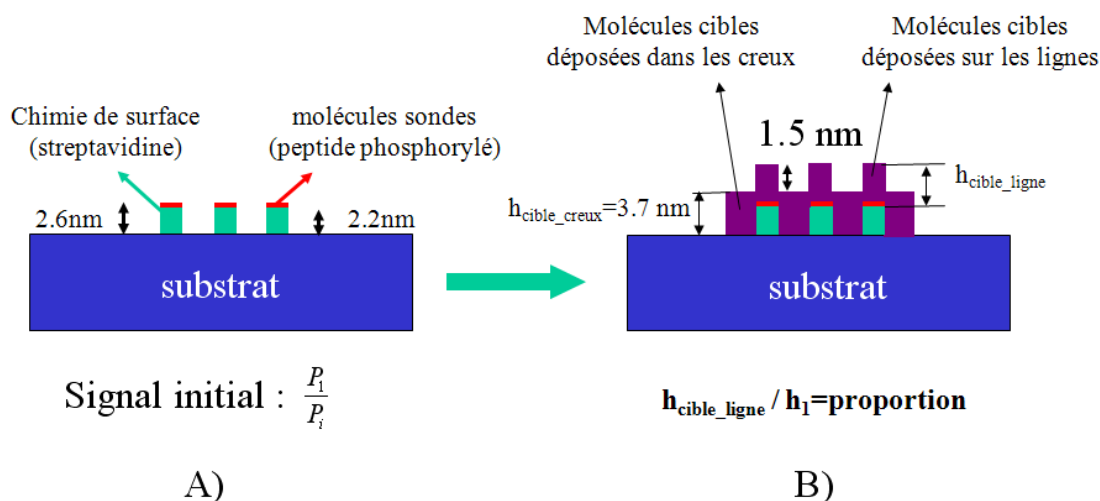


Figure 137 : schéma synthétisant l'ensemble des épaisseurs déduites des expériences et simulations de diffractions. A) avant incubation des anticorps B) après incubation des anticorps

V. Situation du travail par rapport à l'état de l'art

Des équipes²²⁵ ont utilisé un modèle permettant de quantifier la puissance diffractée lors de la croissance d'un réseau par électrochimie. Les creux des lignes sont passivés et le réseau ne peut que croître en épaisseur. D'autres équipes ont appliqué ce système à la détection d'une interaction entre deux anticorps avec une analyse phénoménologique. Les creux des ces réseaux sont passivés à l'aide d'une biomolécules (la BSA). Leur limite de détection d'un anticorps proche de 2.5µg/mL.

Ces travaux n'ont pas fait l'objet d'une étude de la limite de détection en concentration des anticorps cibles. Nous constatons que les variations mesurées ont des ordres de grandeur voisins de ceux obtenus par les équipes citées précédemment. Avec ces performances, nous détectons une concentration de peptides phosphorylés de 10ng/mL.

La non passivation des creux permet de mettre en évidence l'état 0-1 de la biopuce qui correspond à une adsorption des biomolécules dans les creux. De plus, nous démontrons la bonne corrélation entre notre modèle dans les deux situations complexes.

Ainsi, la phase d'étude théorique du comportement d'une biopuce diffractante, nous permet de faire ressortir trois états d'interactions biochimiques non utilisés jusqu'à présents et de démontrer la quantité importante d'information que nous pouvons retirer d'une expérience de diffraction.

²²⁵ marikkar et al., Langmuir, Vol. 23, No. 20, 2007

Résumé

Dans ce chapitre, nous démontrons qu'il est possible de détecter par diffraction et donc sans marquage deux interactions biologiques :

- Celle d'un cas d'école entre la protéine A et un anticorps la reconnaissant spécifiquement
- Celle qui pourrait être à la base d'un protocole de criblage pharmaceutique entre un peptide phosphorylé et un anticorps reconnaissant la phosphorylation

Pour cela, nous développons une chimie de surface basée sur un dépôt en réseau de diffraction de streptavidine par tamponnage moléculaire sur des lames présentant le groupe chimique époxyde. Les spectres de diffraction de ces réseaux démontrent que l'épaisseur de streptavidine varie d'un réseau à un autre ce qui est un atout qui donne une information sur les événements biochimiques qui se déroulent sur les réseaux. Pour chacune des interactions, nous réalisons des tests négatifs consistant à étudier s'il existe une interaction entre le réseau de streptavidine et la biomolécule cible.

Nous démontrons que l'analyse sur plusieurs réseaux à hauteur de ligne de streptavidine différente est très utile conformément aux simulations. Le contrôle négatif expérimental engendre un gain G du signal négatif alors que l'interaction biologique engendre gain G positif.

Ce chapitre montre de plus que l'interprétation fine de ces deux situations demande de maîtriser la simulation d'un réseau complexe. Notre expérience dans ce domaine nous conduit à proposer dans chaque cas un schéma de réseau chiffré qui décrit le comportement expérimental. Enfin ce travail dégage quatre avantages de la détection biologique basée sur la diffraction. Ils peuvent être résumés ainsi :

1. La tendance et le signe entre le gain G du signal et le signal permet lors du contrôle négatif de savoir s'il existe un dépôt préalable de la cible dans les creux et si ce dépôt est supérieur à celui des lignes (situation 0-1 du chapitre II)
2. Cette même tendance entre le gain G du signal et le signal initial permet d'acquérir de l'information sur l'interaction biologique (saturée ou non)
3. Le système permet de détecter des couches biologiques d'épaisseur proche de 0.4 nm (cas des peptides phosphorylés) sans avoir recours à des marqueurs fluorescents.
4. Il est possible de quantifier les différentes épaisseurs de molécules biologiques déposées dans des situations complexes, mélange des cas 0-1 et 1-0 du chapitre II.

Les perspectives concernant ces deux interactions consistent à :

1. mesurer le gain G pour des concentrations plus faibles
2. optimiser l'épaisseur de streptavidine afin de rechercher gain G maximal
3. pour l'interaction du criblage pharmaceutique réaliser des interactions avec des peptides non phosphorylés (autres tests négatifs), puis avec des peptides phosphorylés partiellement (en jouant sur la concentration de kinase et d'ATP) et enfin réaliser des interactions en incluant dans le protocole la présence d'un inhibiteur.

Ces études sont en cours.

CHAPITRE V : DEVELOPPEMENT DU TAMPONNAGE MOLECULAIRE MULTIPLEXE

Dans les chapitres précédents, nous démontrons l'intérêt du tamponnage moléculaire (ou micro contact printing) pour réaliser des réseaux de diffraction de molécules sondes, réseaux destinés à la détection d'une seule interaction biologique. A ce stade du travail, il est important de noter que cette procédure séquentielle est longue et ne permet pas d'envisager son développement dans les domaines d'application où un grand nombre d'interactions moléculaires doivent être testées. Ces applications sont du type criblage pharmaceutique, génomique ou diagnostique. Pour être compétitif dans ces domaines par rapport aux techniques de dépôts présentées dans le chapitre I (par aiguilles, jets d'encre, ...) nous devons développer un procédé de tamponnage moléculaire multiplexé (TMM) déposant en une seule étape à partir de plaques de titration industrielles et en utilisant qu'un seul timbre, un ensemble de biomolécule sondes sur un substrat. Ce procédé est appelé par la suite le multiplexage.

Dans une première partie de ce chapitre, nous présentons le procédé de tamponnage moléculaire multiplexé et sa validation. Ensuite nous démontrons que son outil de base, le macrotimbre permet d'atteindre une résolution allant du millimètre au nanomètre en une seule étape. Enfin, nous automatisons ce procédé en l'intégrant dans la plateforme biopuce diffractante.

I. Le procédé de tamponnage moléculaire multiplexé (TMM)

I.1. Principe

Notre objectif est de déposer par tamponnage moléculaire sur une lame de verre une multitude de molécules sondes différentes organisées en réseaux de diffraction. L'idéal est de prélever ces molécules dans une plaque de titration dense de 1536 puits afin d'être compatible avec les applications biologiques.

Le procédé retenu comprend tout d'abord les étapes de réalisation d'un macrotimbre (Figure 138) :

- de tenue mécanique suffisante pour qu'il soit intégrable dans une plateforme
- comportant des plots de diamètre voisin de 1 mm et de pas de 2.25mm adaptés au diamètre et au pas des puits de la plaque de titration
- supportant à l'extrémité de chaque plot un ou plusieurs réseaux de diffraction (chaque plot se comporte alors comme le timbre de PDMS cf. chapitre III)
- permettant un prélèvement dans chaque puits

La réduction du flambage du plot au cours du tamponnage moléculaire recommande une hauteur proche de son diamètre soit 1mm. Comme la profondeur d'un puits est de 5mm, si l'on veut pouvoir utiliser de faibles volumes de solutions, la hauteur des plots doit être plus importante. Nous choisissons donc une hauteur de 1.5mm afin de remplir les réservoirs avec un volume de solution de 10 μ L.

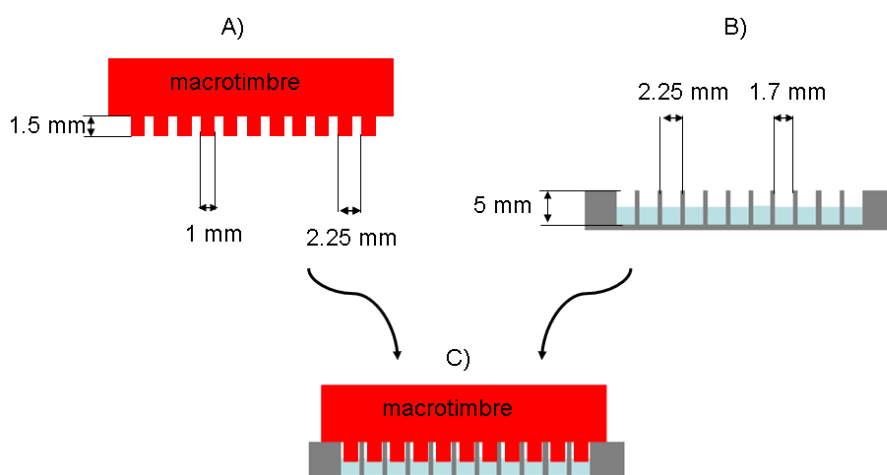


Figure 138 : schéma A) du macrotimbre, B) de la microplaque de titration, C) du mécanisme d'encrage

Quatre étapes complètent le procédé :

- l'encrage par immersion des plots dans les puits
- le séchage du macrotimbre
- l'impression du support par tamponnage moléculaire
- le nettoyage du macrotimbre avant toute nouvelle utilisation (car il est avantageux de réutiliser le macrotimbre un grand nombre de fois)

I.2. Le macrotimbre

C'est un timbre en PDMS composé de plots millimétrique (diamètre 1 mm, hauteur 1.5 mm) dont la surface inférieure est texturée par des motifs micrométriques mais pourrait comporter des motifs nanométriques.

Son procédé de réalisation est similaire à celui d'un timbre classique. Son originalité réside dans la complexité du moulage qui doit structurer des plots mais aussi leurs motifs surfaciques. Le moulage du macrotimbre (4) est détaillé sur la Figure 139.

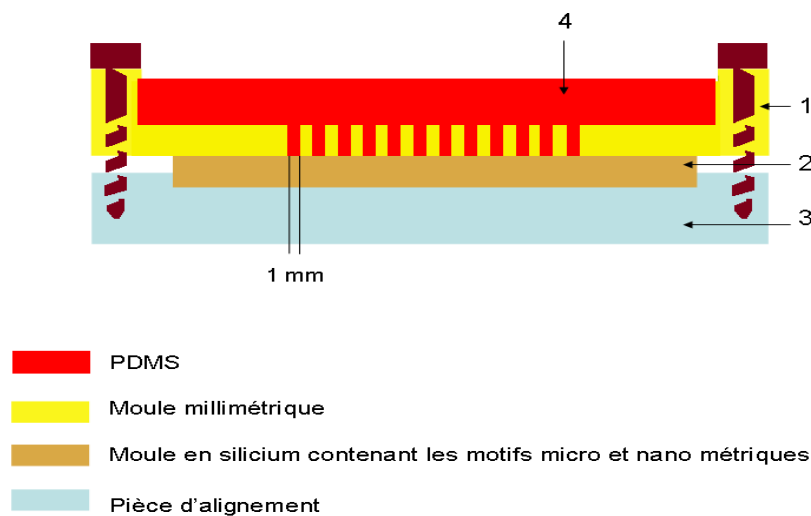


Figure 139 : schéma représentant le dispositif de moulage d'un macrotimbre

Il est constitué d'une « grille » métallique en duralumin (1) dont les dimensions sont celles des plots qui permet de définir les plots millimétriques. Un wafer de silicium (2) comportant les motifs micrométriques et nanométriques réalisés respectivement par photolithographie et lithographie électronique placé sous cette grille structure les motifs. L'alignement de l'ensemble est réalisé par l'intermédiaire d'une de centrage de ce wafer de silicium (3). Dès que l'ensemble du moule est fixé, nous coulons du PDMS sur le moule sur une épaisseur supérieure à 5mm. Afin de pouvoir manipuler aisément le macrotimbre, nous

rajoutons, si nécessaire, deux morceaux de lame de verre placés verticalement (sur leur tranche) sur la partie supérieure (au-dessus des plots). Nous éliminons les bulles présentes grâce à un dessiccateur sous vide et enfin nous le réticulons pendant 6h à 110°C. La grille composée de trous de 1 mm de diamètre rend plus difficile l'évaporation des solvants et impose une réticulation plus longue. Après cette réticulation, le démoulage du macrotimbre est réalisé prudemment en commençant par retirer le moule en Silicium. Ensuite à l'aide d'une pince, nous séparons le macrotimbre de son moule.

Nous avons réalisé deux versions du macrotimbre. L'une permet de déposer des biomolécules sur 3 lames de verre simultanément (Figure 140.B), l'autre peut déposer sur une lame (Figure 140.C). La dimension de chaque macrotimbre varie donc entre 4.8 cm * 5.6 cm et 5.5cm * 7.6cm. Nous constatons que l'on peut déposer plusieurs centaines de biomolécules en une seule étape. Dans ce cas, la densité des plots, dont celle des biomolécules différentes est de 20 biomolécules différentes par cm² et est plutôt faible.

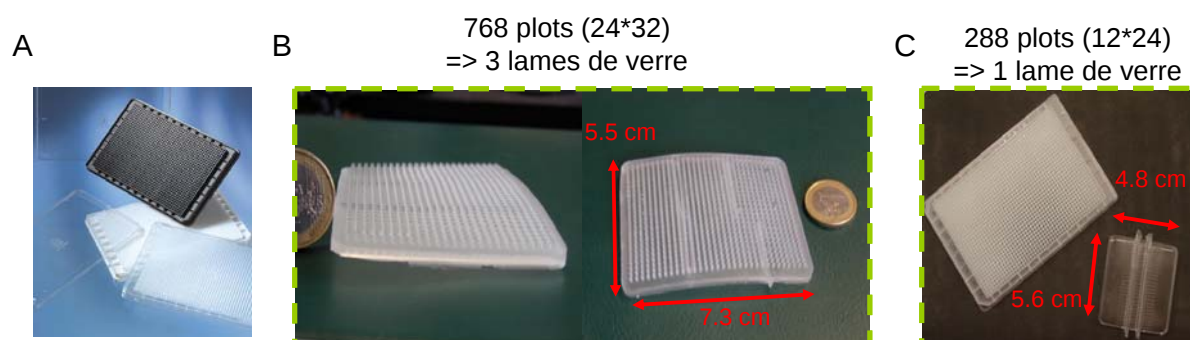


Figure 140 : photographies A) de plaques de titration composées de 1536 puits B) d'une version du macrotimbre permettant le dépôt sur 3 lames de verre simultanément C) d'une plaque de titration et d'un macrotimbre permettant le dépôt sur une lame de verre

I.3. Optimisation des étapes d'encrage, séchage, impression pour applications biologiques

Les étapes d'encrage, de séchage et d'impression du timbre semblent à première vue délicate dans le cas du multiplexage et doivent être optimisées afin d'éviter les contaminations réciproques entre les molécules biologiques déposées par chaque plot.

Les causes possibles entraînant une molécule biologique sur un autre plot peuvent être :

- l'encrage. Un débordement des molécules contenues dans les puits lors du prélèvement par les plots
- le séchage amenant la goutte sur un autre plot

- la diffusion superficielle naturelle des biomolécules

Moyennant les quelques précautions détaillées ci-dessous ces étapes ne semblent pas trop critiques.

- nous ajustons le volume à 12µL afin d'éviter tout débordement de solution d'un puit à un autre
- le séchage est réalisé perpendiculairement à la surface du plot. Ainsi, les gouttes de solution sèchent sur la surface du plot

Nous avons rempli les puits de la microplaque par une alternance d'oligonucléotides composés de 20 mers marqués avec un fluorophore (cyanine) vert ou rouge mais aussi avec la solution tampon. Un macrotimbre, dont la surface des plots n'est pas texturée dans ce cas précis, est encre avec la microplaque (5 min) puis séché à l'air comprimé durant 1 min et enfin déposé sur une lame de verre (2 min). La Figure 141.A montre l'image de fluorescence d'un dépôt réalisé avec un tel macrotimbre. Nous ne constatons qualitativement aucune contamination d'un plot à un autre. Pour mieux préciser ce résultat, nous quantifions les fluorescences rouge et verte (Figure 141.B) des spots rouges, verts et du tampon.

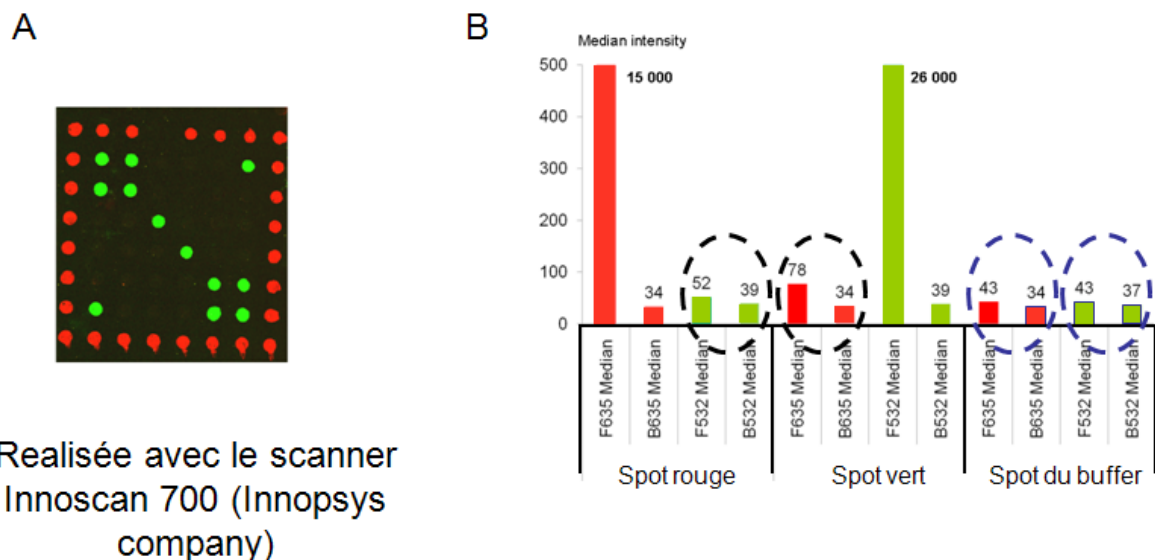


Figure 141 : A) image de fluorescence permettant de contrôler la présence de contamination, B) quantification de la fluorescence rouge et verte des spots de A). F635 et F532 désigne respectivement la fluorescence rouge et verte dans les spots. Par contre B635 et B532 désigne la fluorescence autour des spots. Cette dernière mesure représente la fluorescence de la lame de verre donc le « bruit de fond ».

Nous constatons sur la Figure 141.B que les signaux de l'éventuelle contamination des spots rouges par les verts et des spots verts par les rouges (cercles en pointillés noirs) correspondent à la fluorescence du tampon (cercles en pointillés bleus). Nous en déduisons qu'aucune contamination n'a lieu durant ce procédé de dépôt et qu'étant donné la rapidité du procédé, la diffusion en surface des biomolécules n'a lieu que sur des distances faibles. Afin de garantir l'élimination de ce problème nous nous sommes attachés à réduire le temps d'encre et d'impression.

I.4. Nettoyage pour une réutilisation du macrotimbre

La réutilisation du macrotimbre dépend de l'efficacité de son nettoyage. Pour cela, nous avons testé plusieurs protocoles : l'immersion dans différents solvants en présence d'ultrasons et le tamponnage sacrificiel successif. Le tamponnage sacrificiel, c'est-à-dire le dépôt successif sur une lame sacrificielle semble très efficace.

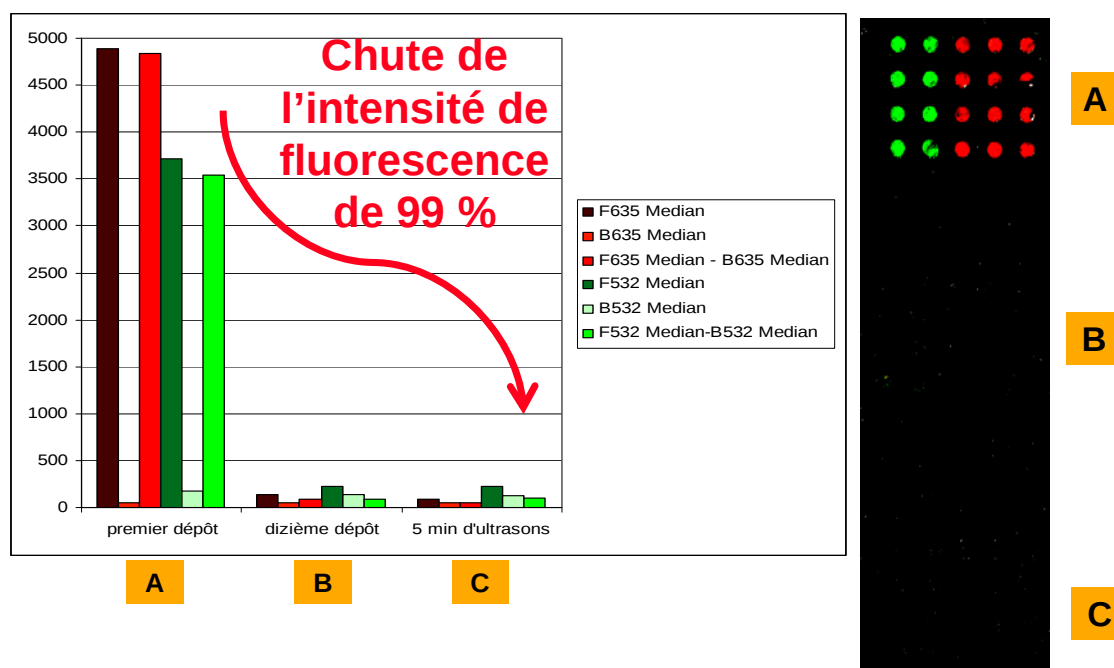


Figure 142 : image et graphique de quantification des molécules fluorescences (oligonucléotides 20-mer) rouge et verte déposées A) sans nettoyage B) après 10 dépôts successifs C) puis après 10mins de bain à ultrasons dans de l'eau

Deux solutions contenant des oligonucléotides marqués en fluorescence verte et rouge sont disposées dans les puits d'une plaque de titration.

Un premier dépôt est réalisé en encrent le macrotimbre avec cet ensemble de puits (Figure 142.A). Le temps d'encre est de 1 min suivi d'une étape de séchage à l'air

comprimé durant 1 min puis du tamponnage du macrotimbre sur la lame de verre durant 30s. Huit dépôts sont ensuite réalisés sur une surface de verre inutilisée au cours desquels il y a eu transfert des biomolécules et donc diminution de la quantité d'oligonucléotides présents sur le timbre. Le dixième dépôt est réalisé sur la même lame que le premier (Figure 142.B). La quantification de la fluorescence montre que le signal est diminué de 98% pour les deux encrages 1 et 10. Le macrotimbre est ensuite nettoyé dans une cuve à eau agitée par des ultrasons. Nous constatons que l'intensité du signal de fluorescence rouge chute de 99%.

Ces premiers résultats obtenus sur cette étape de nettoyage indispensable pour la réutilisation du macrotimbre sont encourageants. L'augmentation du nombre de dépôts sacrificiels ajouté à un passage dans un bain d'ultrasons composé d'un solvant plus agressif vis à vis des molécules déposées semble être une des voies les plus prometteuses.

II. Une technologie couplant une résolution millimétrique à une résolution nanométrique

Après avoir présenté le procédé de tamponnage multiplexé de manière globale c'est-à-dire la fabrication du macrotimbre et les étapes d'encrage, séchage, impression minimisant les risques de contamination et enfin le nettoyage du macrotimbre, le tout sans motifs, nous étudions ici la texturation de la surface des plots. Pour cela, nous réalisons un moule en Silicium par photolithographie pour les motifs micrométriques et par lithographie électronique pour les motifs nanométriques.

La première difficulté qui apparaît résulte de l'impossibilité de réaliser une étanchéité parfaite entre le wafer de silicium (2) et la pièce mécanique (1) (Figure 139). Une membrane de PDMS fine ($<100\mu\text{m}$) se forme lors du moulage entre la grille métallique et le wafer en silicium. Mais lors du démoulage, les contraintes engendrées découpent et suppriment cette membrane tout en créant quelques défauts structurels mais aussi d'alignements étudiés ci dessous.

II.1. Etude de l'alignement des motifs sur les plots et la rugosité de leurs bords

Pour mettre en évidence les limites dimensionnelles du centrage du motif sur les plots nous réalisons une mire (motif en croix sur le silicium) dont la distance entre deux traits est de

100 μ m (Figure 143). Cette mire est donc transférée sur la surface des plots du macrotimbre et observée sur la Figure 143. Nous mesurons dans un premier temps un décalage de 50 μ m entre le centre de la mire et le centre du plot. Ce décalage est dû au défaut d'alignement mécanique entre le wafer et la grille métallique. Ensuite, nous constatons une rugosité des flancs des plots de l'ordre de 50 μ m due à la découpe de la membrane fine de PDMS. Ainsi, il est important de retenir que pour déposer avec le macrotimbre selon des motifs il faut accepter avec notre dispositif de moulage un décalage de 50 μ m et une rugosité des flancs des plots d'amplitude 50 μ m.

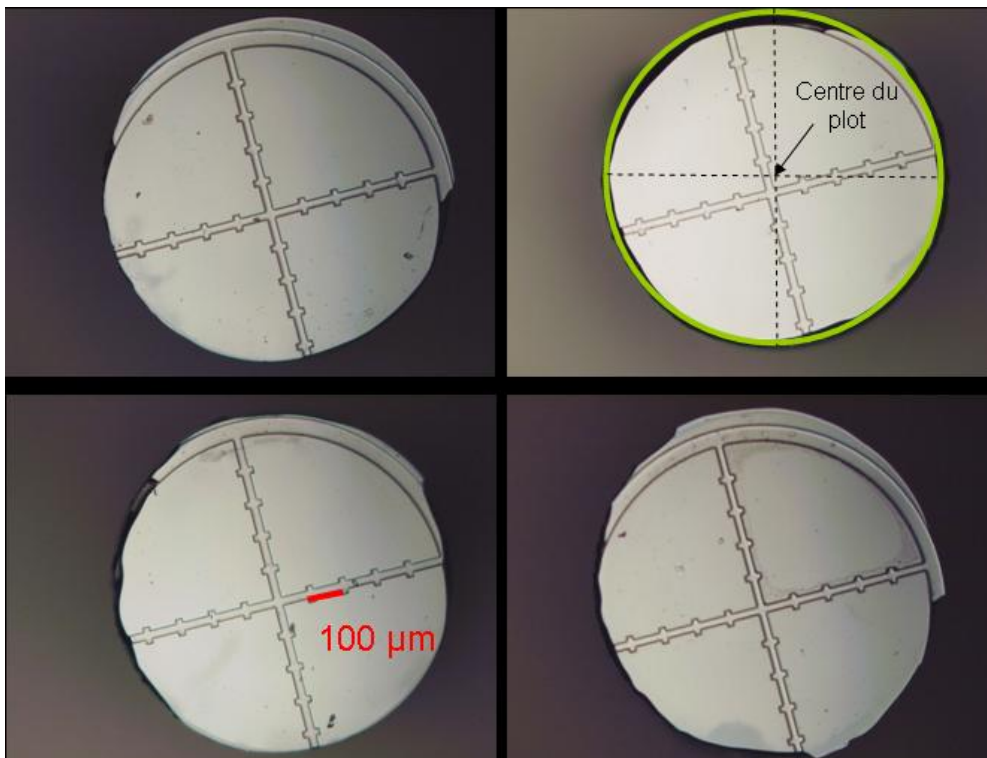


Figure 143 : image prise au microscope optique de la surface des plots du macrotimbre après démoulage

II.2. Réalisation de motifs micrométriques

Nous réalisons ensuite différents motifs micrométriques. La Figure 144 présente certains d'entre eux. L'image est réalisée après avoir retiré le wafer de silicium contenant les motifs mais avant démoulage du macrotimbre. Nous constatons le défaut d'alignement mais aussi la présence de la membrane de PDMS responsable de la rugosité des flancs des plots à la découpe. De plus, nous observons qu'il est possible de générer des motifs micrométriques sur chaque plot comme des carrés de 10 μ m de côté avec un espacement de 20 μ m.

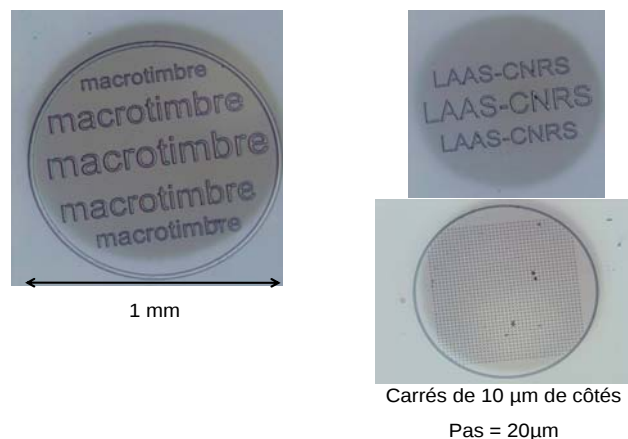


Figure 144 : images prises au microscope optique de la surface des plots avant des moulages de la grille métallique

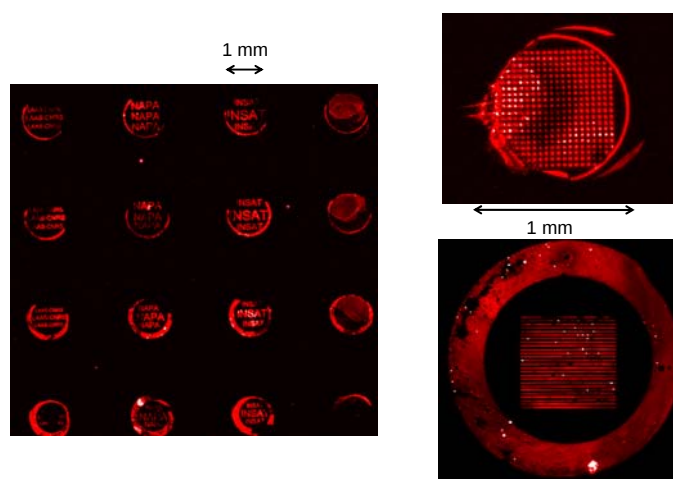


Figure 145 : dépôt réalisés grâce au macrotimbre de molécules fluorescentes (Cy5)

Après avoir effectué un dépôt de molécules fluorescentes avec un macrotimbre présentant des micromotifs nous les étudions. La Figure 145 présente quelques exemples de motifs de molécules fluorescentes sur une lame de verre. Nous observons une bonne corrélation entre le timbre et les motifs. Les inhomogénéités que nous observons sont principalement dues à des défauts d'encrage. En effet, des bulles d'air sont emprisonnées lors de l'encrage entre la surface des plots et le liquide.

II.3. Réalisation de motifs nanométriques

Après avoir montré qu'il est possible de texturer la surface des plots de PDMS à l'échelle micrométrique nous étudions ici sont extrapolation à des motifs nanométriques. La réalisation des motifs sur le moule est la lithographie électronique et nos motifs

nanométriques sont donc pour notre application des lignes. Le réseau gravé sur le wafer de silicium est représenté sur la Figure 146. Il est composé de lignes de 570 nm au pas de 1 μm .

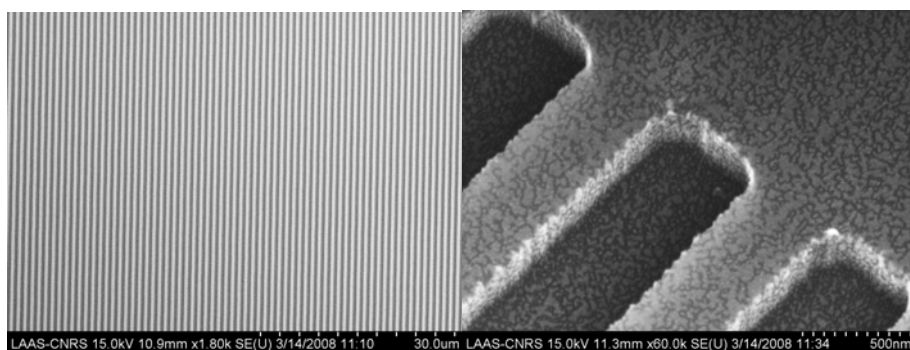


Figure 146 : image réalisée au MEB des réseaux de diffraction réalisés par lithographie électronique et gravure d'un substrat de silicium

Nous réalisons ensuite un macrotimbre comportant ces motifs. Le macrotimbre nous permet de réaliser un dépôt d'anticorps marqué par fluorescence (FITC). La Figure 147.A est une image de fluorescence du dépôt. Il est possible de voir le réseau et de deviner les lignes sur le zoom. Afin de s'en convaincre nous réalisons une image AFM de ce réseau (Figure 147.B). Nous constatons une bonne corrélation avec le moule utilisé et présenté sur la Figure 146.

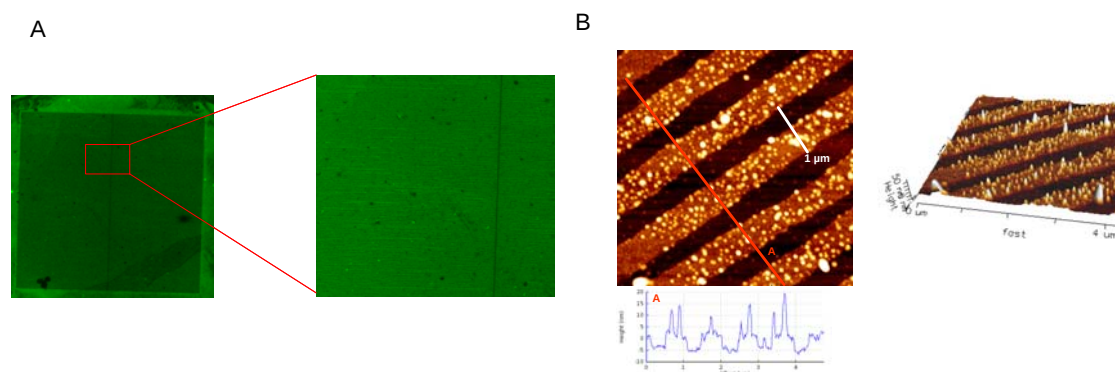


Figure 147 : A) image en fluorescence d'un réseau de lignes d'anticorps imprimées grâce au macrotimbre, B) image AFM de ce réseau de lignes

Résumé

1. le macrotimbre est un outil qui intègre les échelles centimétrique et nanométrique (Figure 148) par sa dimension centimétrique, par ses plots millimétriques, par ses motifs de tailles micro à nanométriques

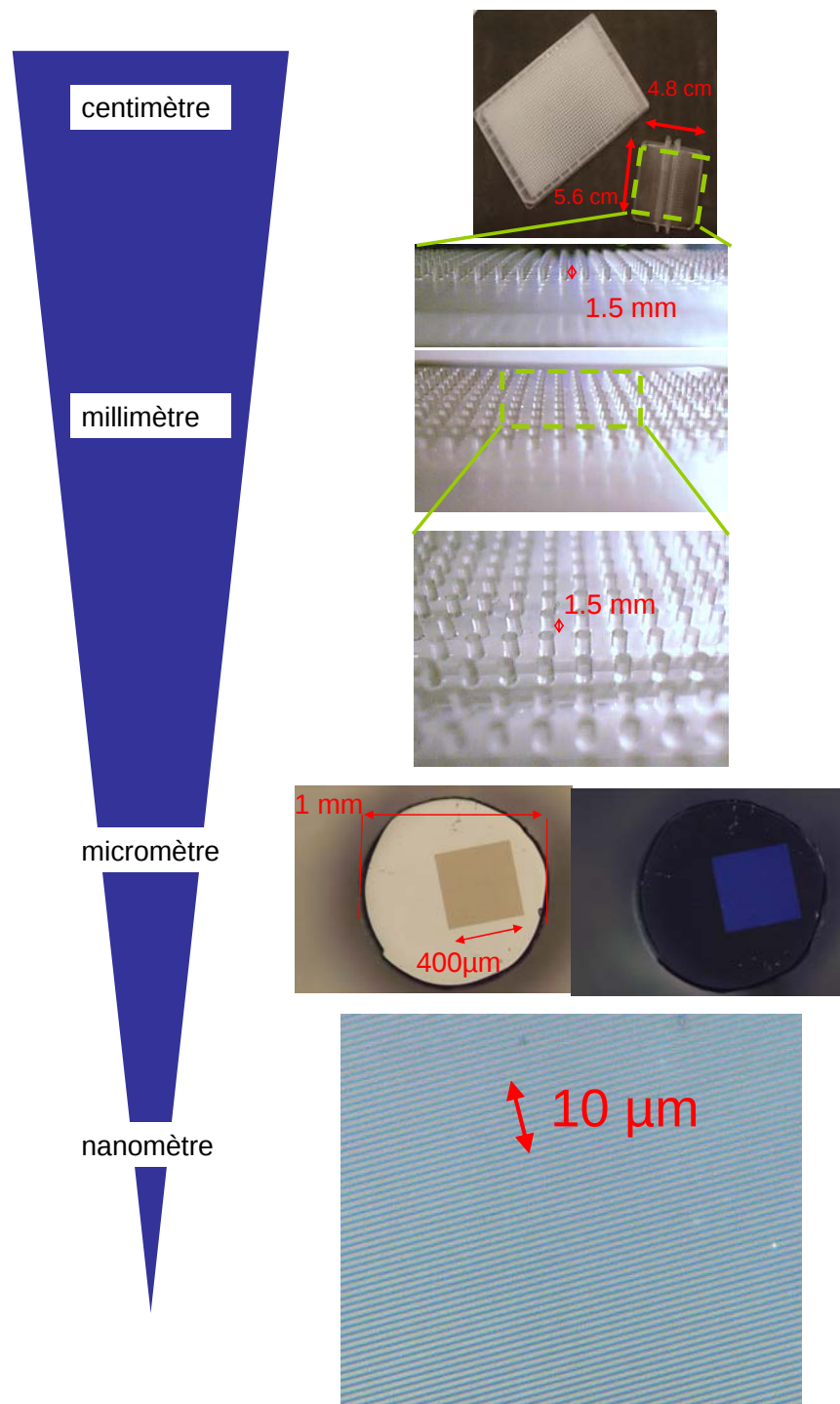


Figure 148 : schéma détaillant les différents niveaux de résolution du macrotimbre

2. l'application du macrotimbre à la réalisation de réseaux est riche de renseignements.
Nous constatons que le réseau formé sur le plot est plan en champ sombre par la diffraction des rayons incidents rasants. Il n'y a pas de défauts car le moindre défaut dans le réseau est alors très facilement détectable. Le réseau est de couleur bleu sur l'ensemble de sa surface signifiant que le démoulage s'est parfaitement déroulé. Ceci est confirmé sur la dernière image où l'on peut observer des lignes continues et équidistantes composant le réseau.
3. le macrotimbre apporte le multiplexage à condition de bien piloter toutes les étapes d'encre séchage, tamponnage, et nettoyage pour une réutilisation

III. Intégration du macrotimbre dans la plateforme biopuce diffractante

Après avoir présenté le concept du macrotimbre, sa fabrication et ses possibilités en termes de qualité et de résolution des dépôts (micro et nanométrique), il nous a paru indispensable de l'intégrer dans la plateforme biopuce diffractante.

L'intérêt de cette intégration est d'effectuer toutes les étapes (dépôts des sondes, détection des cibles) sur un même dispositif et sans l'intervention d'un manipulateur. Une bonne conception mécanique du système permettra de réaliser des tests reproductibles en un minimum de temps car il ne nécessitera qu'un seul repérage des réseaux.

A notre plateforme biopuce, initialement composée de 4 platines de translation : deux pour la fibre de l'ordre 1 (a) et deux pour la position du substrat (b), nous rajoutons une seule platine de translation (c), pour positionner la plaque de titration mais aussi une arrivée d'azote et ainsi intégrer le dépôt par macrotimbre.

Pour cela, nous fixons tout d'abord le macrotimbre aux deux platines (a) permettant de sonder le plan Oyz (celui de la fibre de l'ordre 1). Ceci est réalisé par une pièce d'interface liée à une équerre fixée aux platines, qui centre le macrotimbre et lui laisse un degré de liberté au déplacement du macrotimbre, une translation selon l'axe z (voir suite). Nous l'appellerons la pièce d'interface avec le macrotimbre (Figure 149).

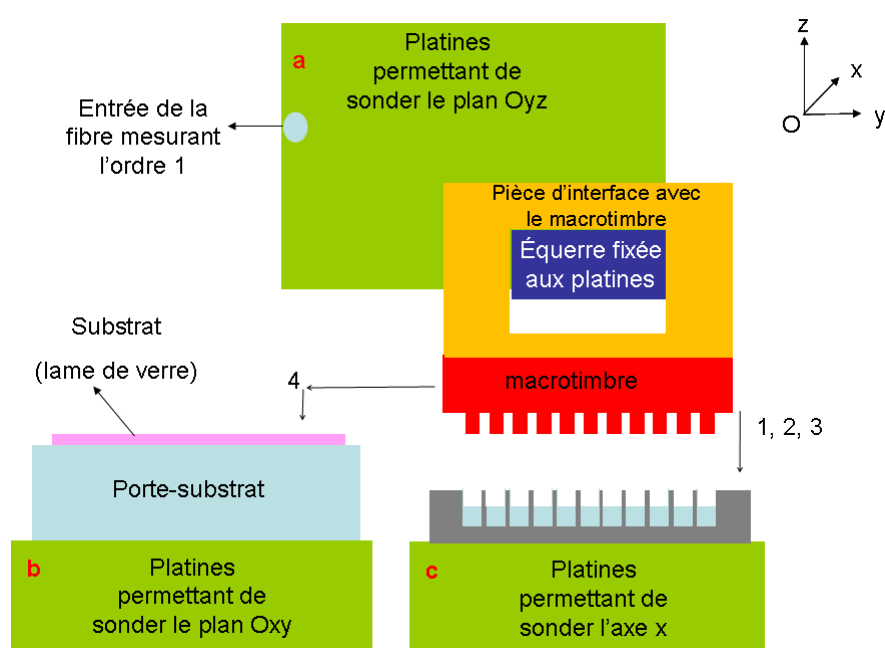


Figure 149 : schéma décrivant l'intégration du procédé de dépôt par macrotimbre dans la plateforme biopuce diffractante

Le système de tamponnage moléculaire multiplexé fonctionne selon deux modes. Le premier permet de réaliser les étapes d'encrage (1), de rinçage (2) et de séchage (3) (Figure 150). Le deuxième correspond à l'étape de tamponnage (4). Ces différentes étapes sont décrites ci-dessous.

- l'encrage du macrotimbre.

La platine (c) positionne la plaque de titration puis le macrotimbre descend dans ses puits avec une vitesse définie par l'utilisateur. Afin d'éliminer la présence de bulles d'air entre le liquide et la surface des plots un mouvement oscillant vertical est introduit. Ainsi, chaque plot sort puis rentre alternativement dans la solution pendant le temps d'encrage choisi par l'utilisateur.

- le rinçage du macrotimbre.

Pour certaines molécules biologiques (anticorps) et selon leur concentration, il peut être intéressant de rincer le timbre après encrage. Grâce à ses mouvements suivant Oxyz le macrotimbre est positionné dans des puits de la microplaque solidaire de la platine (c) contenant la solution tampon (PBS).

- le séchage.

Le macrotimbre est ensuite positionné en face d'une arrivée d'azote qui permet son séchage avec un flux perpendiculaire à sa surface et durant le temps défini par l'utilisateur. Afin de sécher complètement le timbre, l'ensemble des plots est présenté en face du flux grâce à un mouvement horizontal du timbre dans le plan Oxy grâce aux platines (a) et (c).

La platine de translation motorisée que nous avons rajouté permet d'amener soit la microplaque de titration soit l'arrivée d'azote selon l'étape mise en œuvre. Elle est donc essentielle pour les étapes 1,2,3.

- le tamponnage.

A l'aide des platines (a) et (c), le macrotimbre est déposé délicatement sur le substrat sans exercer de pression. Grâce à la pièce d'interface qui supporte librement le macrotimbre et le centre, la seule force exercée est le poids du timbre. En effet, la platine de translation descend plus bas que la position où le macrotimbre touche la surface d'une quantité : $\Delta z_{\text{dépôt}}$ définie par l'utilisateur. Lorsque $\Delta z_{\text{dépôt}} > 0$, la platine de translation n'exerce aucune force. Nous

constatons sur la Figure 151 l'écart entre la pièce d'interface et l'équerre pour un $\Delta z_{\text{dépôt}} = 2\text{mm}$ La vitesse de descente du macrotimbre est aussi définie par l'utilisateur.

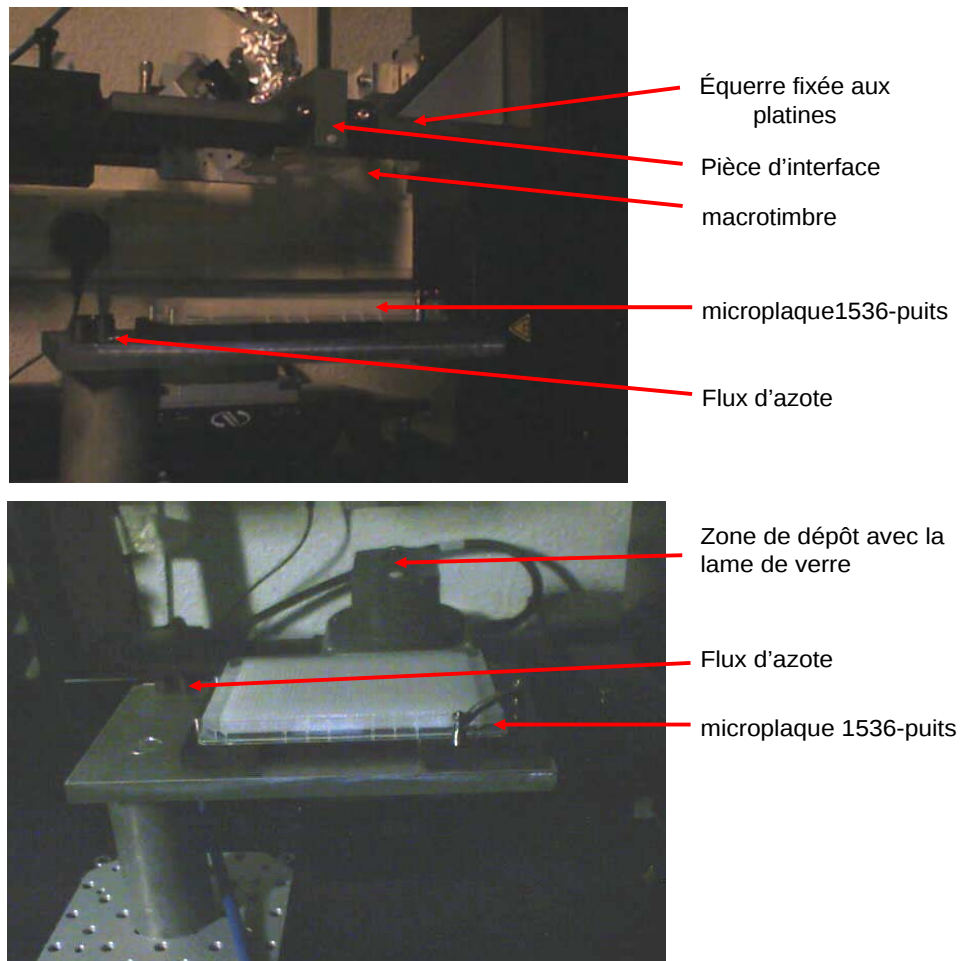


Figure 150 : photographies des composants permettant le dépôt par macrotimbre dans la plateforme biopuce

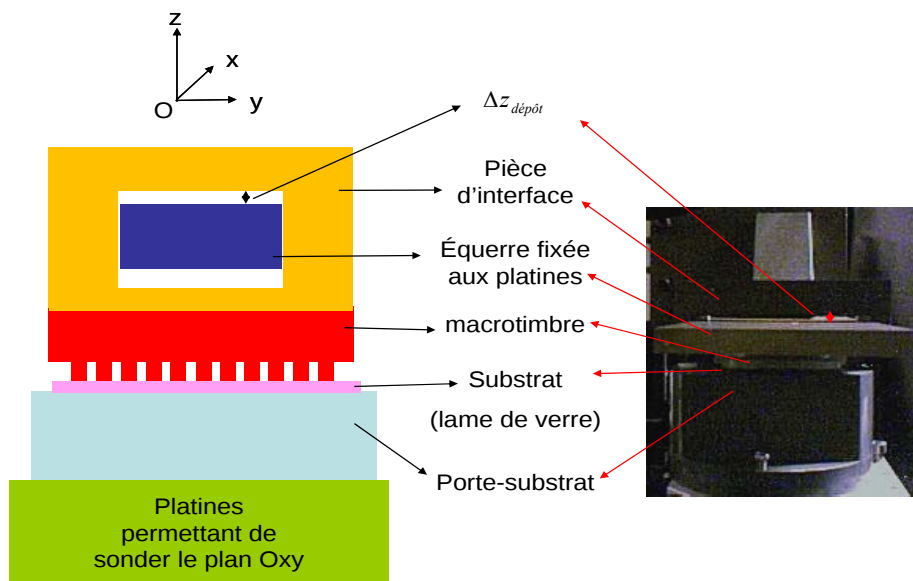


Figure 151 : schéma et photographie correspondante représentant la phase de tamponnage

Il est à noter que la microplaque est fixée sur le plateau de la platine de translation par une pièce noire utilisée avec des robots de dépôts classiques ceci afin d'utiliser le savoir-faire des plateformes plus conventionnelles.

Afin de tester cette plateforme, nous réalisons des dépôts de molécules fluorescentes (Cy3) à l'aide d'un macrotimbre composé de carré de 600 μ m de côté. Comme la hauteur des motifs est de 50 μ m, nous pouvons craindre un écrasement élastique des motifs qui peut conduire à un contact entre les creux des motifs et le substrat. Or, nous constatons qu'aucun effondrement n'a lieu (Figure 152).

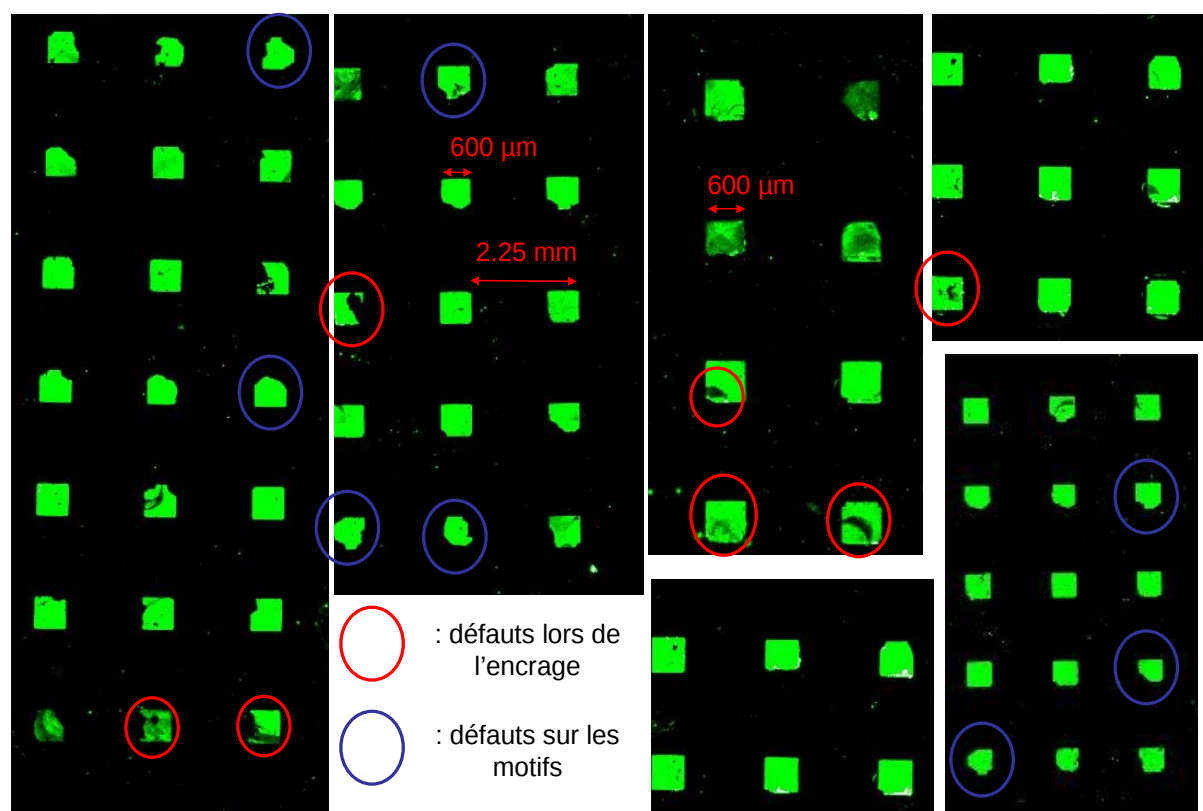


Figure 152 : différentes images de fluorescence de dépôts réalisés par la partie dépôt de la plateforme biopuce.

De plus, il y a une bonne corrélation entre les dimensions et positions des motifs et les dépôts. Certains défauts sont dus à des problèmes d'encreage. D'autres ont pour origine le motif.

Après avoir vérifié que les motifs ne s'effondrent pas, nous optimisons les paramètres de la méthode. Un grand nombre de variables sont à définir par l'utilisateur. Nous étudions leurs effets sur la qualité des dépôts.

- Effet de la durée de tamponnage

Nous étudions quel est l'effet du temps de tamponnage (contact entre le substrat et le macrotimbre) sur la quantité de molécules transférées. Pour cela nous quantifions la fluorescence des dépôts en fonction du temps de tamponnage (Figure 153.A). Nous remarquons que pour un temps inférieur à 20 s le dépôt augmente avec le temps de tamponnage puis se stabilise autour d'une fluorescence de 3000 u.a.

- Effet de la vitesse de descente du macrotimbre

L'effet de la vitesse de descente du macrotimbre sur le signal de fluorescence est analysé sur la Figure 153.B. Le signal décroît avec la vitesse de descente du macrotimbre ce qui signifie que le dépôt est plus important si le macrotimbre arrive lentement sur la surface. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'avec une vitesse de descente faible nous laissons le temps au PDMS pour épouser la surface et ainsi transférer un plus grand nombre de molécules.

- Effet de la durée de séchage

Enfin, nous étudions le temps minimal de séchage. Pour cela nous avons fait varier le temps de séchage de 0s à 60s (Figure 153.C). Nous remarquons que pour un temps inférieur à 20s, le signal de fluorescence est très important ainsi que l'écart type sur les mesures. Ceci est représentatif du dépôt de goutte et donc d'un séchage insuffisant.

En conclusion, nous montrons que :

- 1. le temps de tamponnage doit être suffisant (>20s pour des molécules de Cy3)**
- 2. la vitesse de descente du timbre lors du tamponnage doit être faible**
- 3. le temps de séchage doit être supérieur à 20s.**

D'autres paramètres sont en cours d'investigation tels que le temps d'encrage, la vitesse de descente et de montée du timbre lors de l'encrage, le temps de rinçage, ...

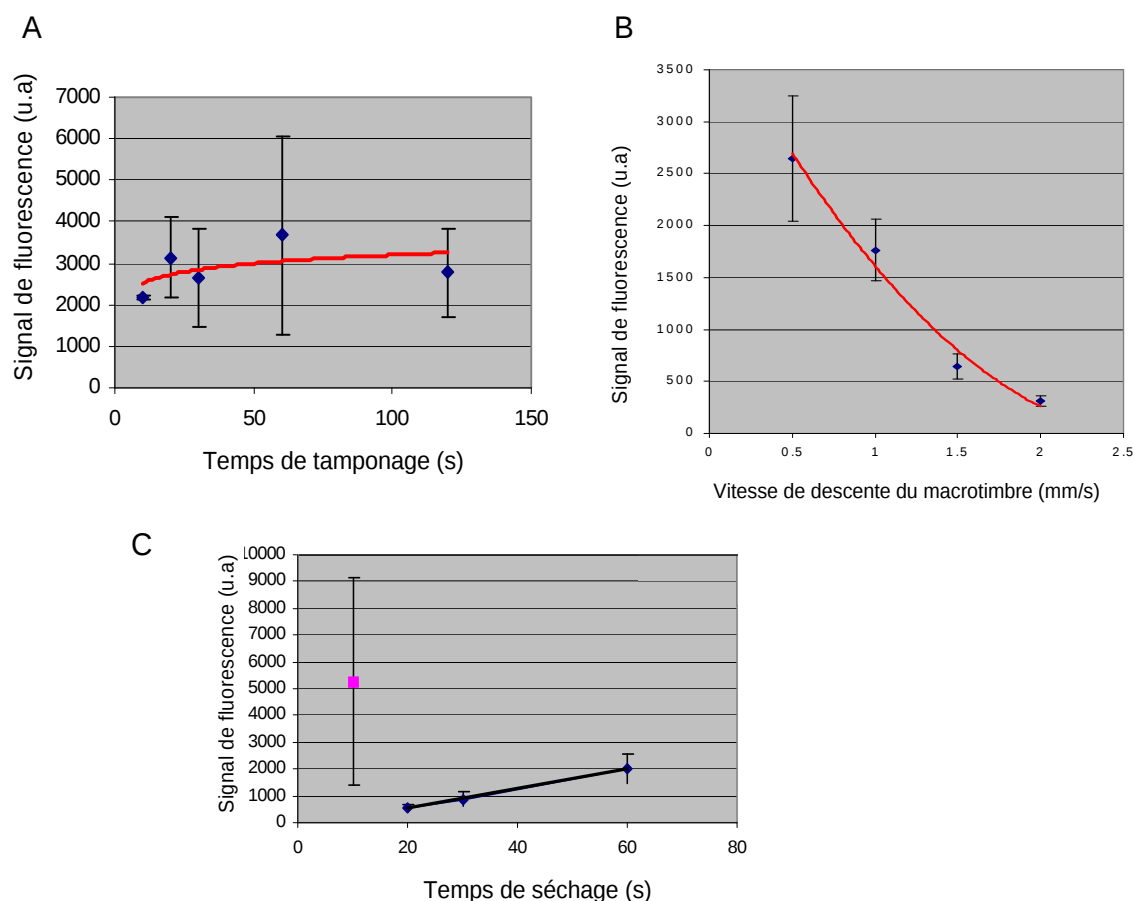


Figure 153 : graphiques représentant le signal de fluorescence de dépôts réalisés à l'aide du macrotimbre automatiquement en fonction A) du temps de tamponnage B) de la vitesse de descente du macrotimbre C) du temps de séchage

Enfin, nous démontrons la possibilité de réaliser des « multi dépôts ». Pour cela des dépôts sont réalisés en des positions différentes sur le substrat. Elles sont choisies par l'utilisateur sous la forme d'une matrice. Celle-ci est définie par son nombre de lignes et de colonnes, la distance entre deux lignes et celle entre deux colonnes. Cette matrice positionne le substrat aux positions choisies pour chaque dépôt. Par contre, les déplacements du macrotimbre sont les mêmes entre deux dépôts. En utilisant le macrotimbre donnant les dépôts de la Figure 152 nous réalisons le dépôt multiplexé de la Figure 154 défini par une matrice 2X2 dont l'espacement entre deux lignes et celui entre deux colonnes est de 1.125 mm. Cette distance correspond à la moitié de l'espacement entre deux plots. Entre chaque dépôt, il est possible d'effectuer ou non un nouvel encrage.

Dans cette expérience nous ne réalisons pas d'encrage entre chaque dépôt. Les numéros représentent l'ordre dans lequel les tamponnages ont eu lieu. Nous remarquons que les espacements entre les dépôts sont respectés. De plus, les défauts sur les timbres sont

reproduits pour chaque dépôt. Enfin, nous observons la décroissance de la fluorescence lorsque le nombre de tamponnage augmente.

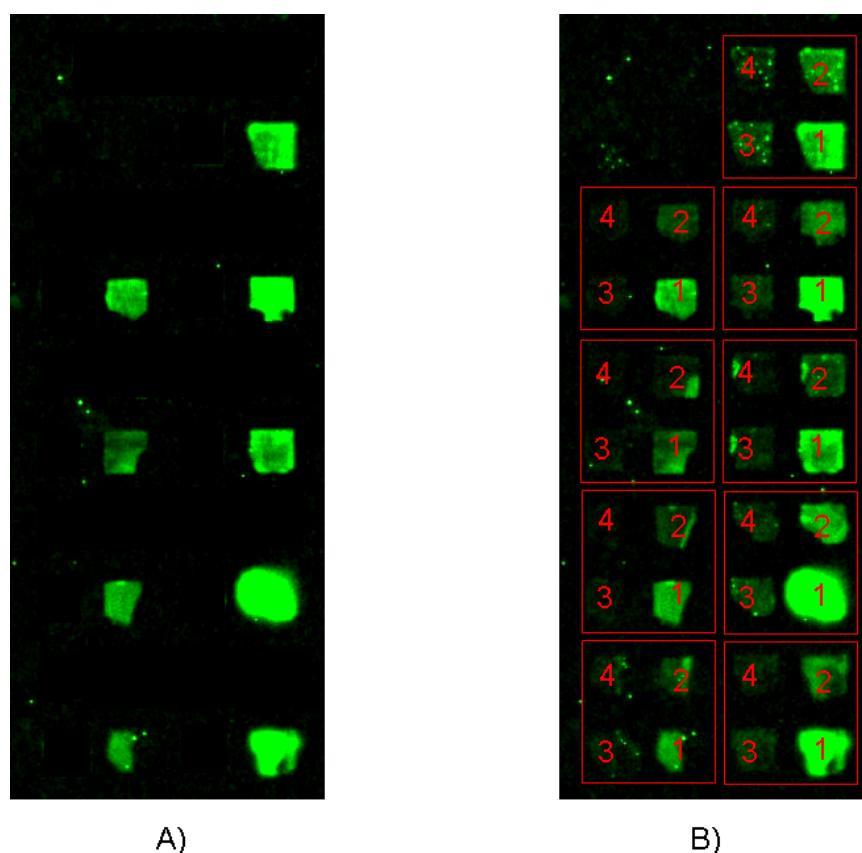


Figure 154 : A) image de fluorescence traitée pour ne faire apparaître que le premier dépôt d'un « multi » dépôt automatique sans réencrage selon une matrice 2*2 et d'espacement entre les lignes et les colonnes de 1.125 mm, B) image finale du multi dépôt

Cette Figure 154 nous permet d'observer que ce dispositif de multi dépôts permet d'augmenter la densité de molécules déposées. En effet, dans notre exemple nous l'avons multiplié par quatre et, grâce à ce procédé la densité de biomolécules différentes passe de 20 (Figure 154.A) à 80 biomolécules (Figure 154.B) par cm^2 , si le macrotimbre est encré avec des molécules différentes entre chaque dépôt. Or il faut absolument éviter de contaminer les solutions par des molécules déjà présentes sur la surface des plots. C'est pourquoi le nettoyage du macrotimbre est primordial et reste encore à optimiser puis à intégrer dans la plateforme biopuce. Des études sont en cours de développement pour définir la densité maximale qu'il est possible d'atteindre avec un tel dispositif. Elle est conditionnée par la précision des déplacements mécaniques générés par les platines de translation. Leur précision étant proche de $1\mu\text{m}$, nous avons bon espoir sur celle du positionnement des dépôts.

Un dépôt réalisé par le macrotimbre sans déplacement du substrat est un procédé parallèle alors que le multi-dépôt, utilisant des mouvements successifs donc séquentiels, est qualifié de semi-parallèle.

Les perspectives de cet outil, le macrotimbre, sont aussi son adaptation à des robots de dépôt existants ainsi qu'à des détecteurs par diffraction. Pour cela, nous avons conçu la pièce d'interface avec le macrotimbre, suffisamment générique pour être intégrée dans des robots de plateformes biopuces conventionnelles.

Résumé

En résumé, ce chapitre développe la technique de multiplexage par tamponnage moléculaire qui ouvre des applications de nos travaux en criblage pharmaceutique, génomique ou diagnostique. Cette technique repose d'une part sur la conception d'un macrotimbre centimétrique qui supporte des plots millimétriques sur la surface desquels nous structurons des motifs nanométriques. Elle est aussi basée sur les dimensions de ce macrotimbre qui peut prélever 1536 molécules sondes différentes dans une plaque de titration biologique à haute densité.

Elle repose enfin sur l'intégration de ce macrotimbre dans une plateforme automatisée de dépôt des sondes puis d'analyse des couplages sondes/cibles qui est dans notre cas la plateforme biopuce diffractante.

Nous présentons, dans ce chapitre, de premiers résultats qui démontrent ses potentialités sur les plans :

- du séchage de cette encre
- de la qualité de l'impression
- de la non contamination des molécules entre elles
- de la réutilisation du timbre
- de l'accroissement de la densité des dépôts de sondes

Ces travaux préliminaires doivent persuader le lecteur de l'intérêt industriel du développement du macrotimbre automatisé couplé avec l'analyse par biopuce diffractive.

CHAPITRE VI : PERSPECTIVES

Ce doctorat ouvre de nombreuses perspectives. Il permet tout d'abord à l'équipe NanoBioSystèmes de disposer d'une méthode de simulation de la diffraction par un réseau quelconque qui oriente par la grandeur gain G , le choix des divers paramètres les mieux adaptés à la détection d'une interaction biologique donnée au format biocapteur ou de multiples interactions au format biopuce. Cette simulation fournit de plus le support pour toutes les interprétations.

Ce travail délivre aussi trois outils expérimentaux implantés sur une plateforme dite diffractante. Il s'agit d'un montage de diffraction opérationnel, d'un macrotimbre adapté aux plaques de titration 1536 puits et d'un dispositif d'encrage et de tamponnage moléculaire automatisé.

Le nombre de thématiques d'études de l'interaction sonde-cible ainsi ouvertes est important et nous citerons la détection de protéines, d'anticorps, d'antigènes, ainsi que le criblage pharmaceutique... Sur ce dernier point, les travaux préliminaires d'inhibition de la phosphorylation des peptides par des enzymes devront être poursuivis en collaboration avec le laboratoire Pierre Fabre-CNRS. Pour cela, une étude de la variation du gain selon les concentrations en peptides phosphorylés et en anticorps devra être menée afin de calibrer le système de détection. Ensuite, une étude du gain G en fonction de la concentration d'un inhibiteur C_i devra être réalisée. C'est à ce stade du développement pharmaceutique qu'une grandeur émanant de la courbe $G=f(C_i)$ quantifie l'efficacité d'un inhibiteur et donc d'un principe actif.

L'avantage de la méthode est indéniable. Elle a un faible coût, la détection est optique, elle n'a pas recours au marquage, elle s'applique au format biocapteur adapté à l'étude des cinétiques d'interaction et au format biopuce qui permet une analyse fine et parallèle de multiples interactions.

L'ensemble expérimental ainsi construit, très adapté au format biopuce, est déjà un outil de diagnostic intéressant qui peut encore évoluer d'une part par une nouvelle conception de l'accroche des biomolécules sur le substrat ainsi que d'analyse des données et d'autre part par l'augmentation du nombre de tests et donc de la densité des réseaux. Nous développons ci-dessous nos réflexions et nos calculs qui ouvrent des perspectives dans ces deux voies.

I. Vers de nouvelles méthodes de diagnostic basées sur la diffraction

La détection de protéines spécifiques ayant perdu leur fonctionnalité est la méthode de diagnostic de maladie comme le cancer. La mesure de leur concentration renseigne sur l'état d'évolution de l'affection. Actuellement ces protéines sont identifiées et quantifiées par des méthodes très complexes, délicates et coûteuses. Nous citons le cas du test ELISA. Pour cela, des anticorps, dits de capture, les reconnaissant spécifiquement sont produits par des procédés biotechnologiques et fixés sur un substrat. Une interaction spécifique entre ces protéines et les anticorps a lieu. La détection repose sur l'utilisation d'un second anticorps souvent fluorescent, qualifiés de traceur, reconnaissant lui aussi les protéines.

Le couplage de trois technologies innovantes est proposé pour simplifier cette méthode complexe de diagnostic :

1. l'utilisation de polymères à empreintes moléculaires (MIP) qui s'affranchit de toutes les étapes mettant en jeu les anticorps de capture
2. le développement de la détection par des biopuces diffractantes supprimant le marquage de l'anticorps traceur
3. l'emploi des techniques de dépouillement basées sur le principe d'apprentissage de machine (*machine learning*) adaptées à l'exploitation d'un grand nombre de données.

Nous détaillons ci-dessous l'intérêt de cette nouvelle approche.

I.1. L'utilisation de polymères à empreintes moléculaires

Comme nous l'avons présenté au chapitre I, de premiers travaux montrent que l'utilisation de MIP qui sont des polymères épousant naturellement la forme des protéines à détecter, simplifie la procédure de biodiagnostic. Une première étape consiste à préparer la biopuce en réalisant une empreinte suivant un réseau de lignes de ces protéines (Figure 155). La deuxième est l'incubation des protéines sur cette biopuce (Figure 156). Seules les protéines dont l'empreinte moléculaire est présente sur la surface s'y accrochent, et sont donc détectables par diffraction (Figure 156).

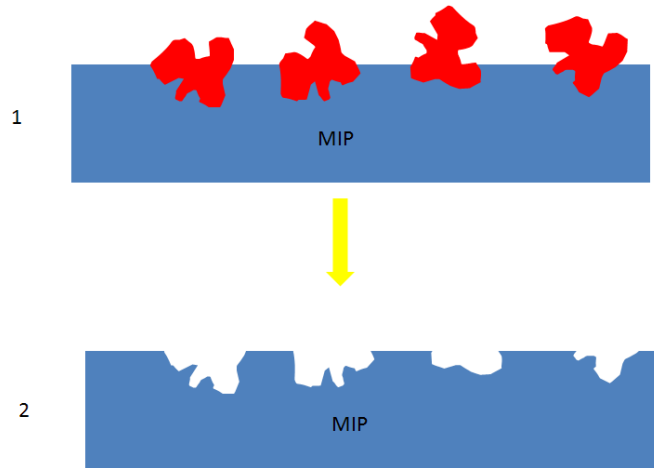


Figure 155 : schéma représentant les deux étapes permettant de créer des empreintes moléculaires (de la protéine rouge)

Etape 1 : mise en contact des protéines avec le MIP

Etape 2 : suppression des protéines afin de ne laisser que leurs empreintes

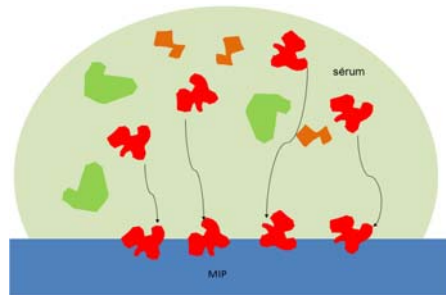


Figure 156 : schéma représentant l'interaction entre une protéine présente dans un sérum et son empreinte réalisée dans un MIP

I.2. Simulation de la détection par diffraction basée sur l'utilisation de MIP

La simulation de la détection en mode biopuce est similaire à celle présentée dans le chapitre II. Nous calculons le signal diffractif avant l'interaction biologique $\left(\frac{P_1}{P_i}\right)_{avant}$ puis

après piégeage dans les empreintes $\left(\frac{P_1}{P_i}\right)_{après}$. Nous en déduisons la quantité représentative de

la détection et du dosage $G = \frac{\left(\frac{P_1}{P_i}\right)_{après} - \left(\frac{P_1}{P_i}\right)_{avant}}{\left(\frac{P_1}{P_i}\right)_{avant}}$ que nous nommons le gain relatif des signaux

normalisé.

Nous étudions dans un premier temps, le cas d'un MIP réalisant une empreinte surfacique. La Figure 157 représente les trois configurations qui peuvent être utilisées. La première est la réalisation des empreintes moléculaires sur le haut des lignes, la seconde sur le haut des lignes mais aussi dans les creux et la troisième correspond à la localisation des empreintes dans les creux.

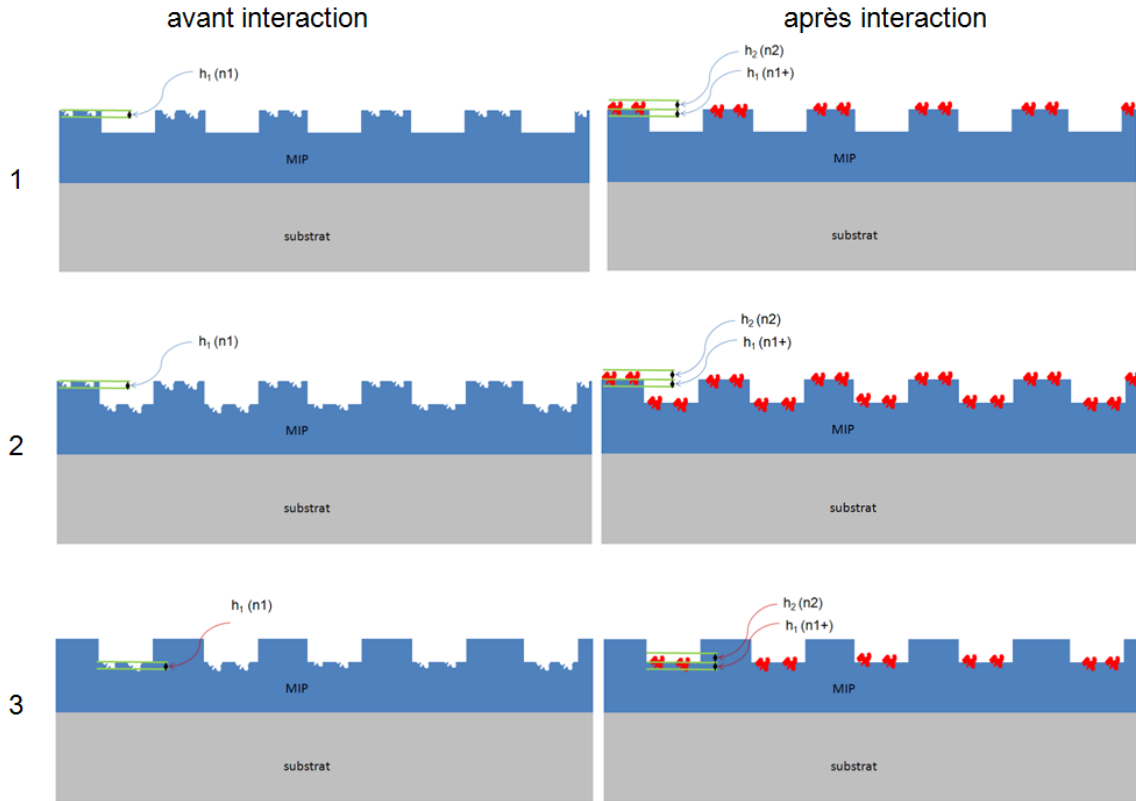


Figure 157 : schémas représentant les différentes étapes de la biodétection par diffraction couplée avec un MIP

Les calculs développés dans le chapitre II montrent que la puissance initiale diffractée d'un réseau $\left(\frac{P_1}{P_i}\right)_{avant}$ est corrélée au rapport entre la largeur et la période des lignes $\frac{l}{p}$ et maximale pour $\frac{l}{p} = 0.5$. Ils démontrent aussi que le gain G dépend de la hauteur des lignes du MIP et du type de remplissage : sur les lignes, sur les creux, sur les lignes et les creux (Figure 157). Afin de déterminer la hauteur optimale des lignes à donner au réseau composé du MIP dans chaque configuration puis de choisir la mieux adaptée, nous utilisons ici notre modèle pour calculer dans chaque cas le gain G qui en découle.

Dans tous les cas nous choisissons une hauteur des empreintes h_1 et une surépaisseur due aux biomolécules piégées h_2 de 2.5nm et un indice du MIP massif (n_{MIP}) de 1.47²²⁶. La couche des biomolécules piégées dans leur milieu est caractérisée par un indice effectif n_2 de 1.4. Nous associons à la zone du MIP comprenant les empreintes un indice effectif n_1 avant fixation des biomolécules et n_{1+} après, ce qui nous permet de définir la différence d'indice Δn avant puis après interaction : $n_{1+} - n_1 = 2.\Delta n$. Nous supposons que la moyenne entre n_{1+} et n_1 correspond à l'indice du MIP massif ce qui donne $\frac{n_{1+} + n_1}{2} = n_{MIP}$. Nous faisons ce choix car nous considérons que le MIP composé des empreintes vides de toutes molécules n_1 a un indice inférieur à celui du MIP massif. De même, lorsque les lacunes sont remplies par des biomolécules nous considérons que l'indice n_{1+} est plus élevé que n_{MIP} . La longueur d'onde est conservée à 633 nm.

La Figure 158 représente les variations du gain G et de la puissance diffractée avant interaction dans le cas 1 décrit sur la Figure 157 en fonction de l'épaisseur initiales des lignes h_0 et pour différents Δn .

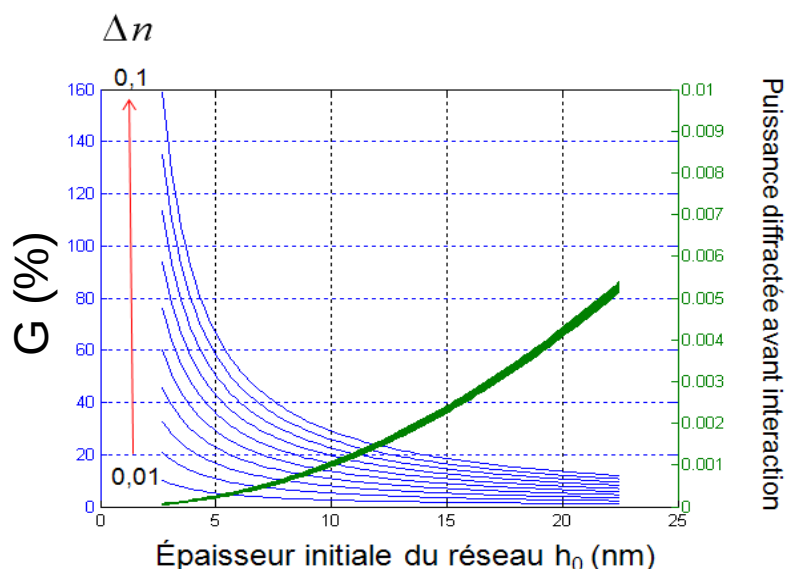


Figure 158 : variations du gain (G) et de la puissance diffractée initiale pour différents Δn et pour le cas 1 de la Figure 157

Nous observons une variation du gain de 10% à 160% qui est toujours maximale pour les faibles épaisseurs. Ce gain est d'autant plus élevé que la différence d'indices Δn est importante. Nous remarquons, comme dans le chapitre II, que G est d'autant plus important

que le signal et la différence d'indice sont faibles. Plus le montage expérimental détectera des signaux faibles plus la limite de détection sera faible. Comme nous pouvions nous y attendre, la puissance diffractée initiale est faible lorsque l'épaisseur initiale du réseau l'est.

Nous avons donc intérêt à utiliser des épaisseurs initiales de MIP h_0 faibles et vraisemblablement inférieure à celle utilisé dans le modèle présenté qui commence obligatoirement à une épaisseur initiale $h_0=2.5\text{nm}$. C'est pourquoi nous étudions le cas extrême où l'épaisseur initiale des lignes h_0 est nulle. La Figure 159 présente les variations du gain G et du signal initial dans cette situation extrême et pour différents Δn . Nous constatons que plus la différence d'indice de la zone du MIP composé des empreintes moléculaires est faibles, plus G est important et la puissance diffractée initiale faible. Le gain devient ici colossal de $10^5\%$ à $10^6\%$ pour des Δn de quelques %. Nous déduisons de cette simulation que l'origine des variations de G provient de la surépaisseur de la protéine présente dans le milieu (h_2) et non de celle présente dans le MIP (h_1).

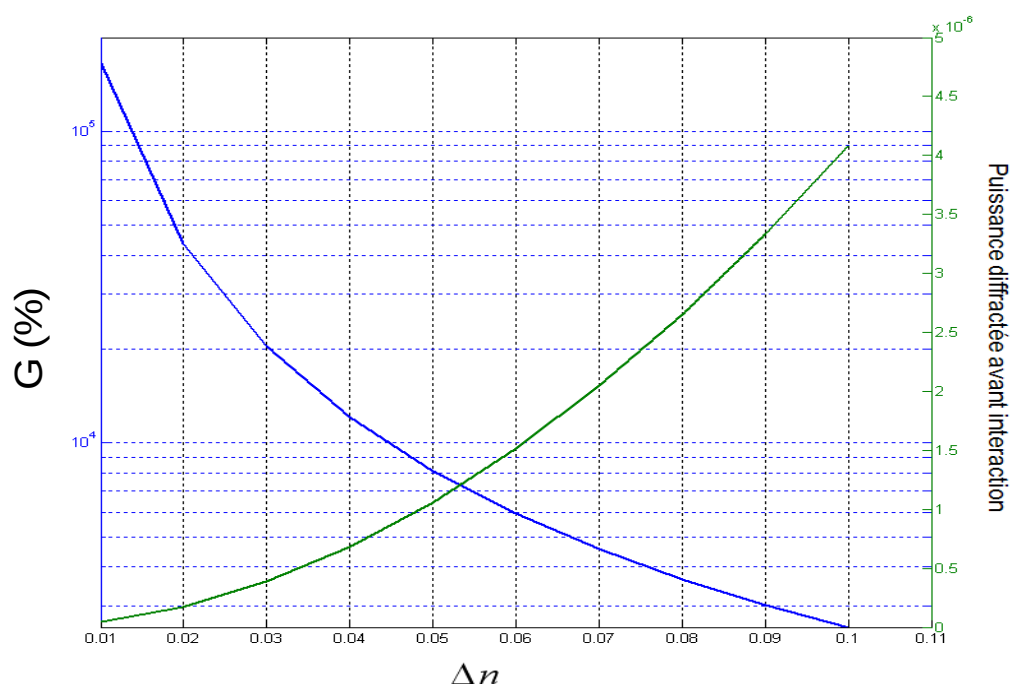


Figure 159 : variations du gain (G) et de la puissance diffractée initiale en fonction de Δn et pour une hauteur initiale des lignes nulle ($h_0=0$) et pour le cas 1 de la Figure 157

Nous étudions ensuite le cas 2 où la surface des lignes et celle des creux est structurée par l'empreinte des biomolécules. La Figure 160 montre les variations de G et de la puissance diffractée initiale en fonction de l'épaisseur initiale des lignes h_0 et pour différents Δn . Contrairement au cas 1, le gain G est négatif.

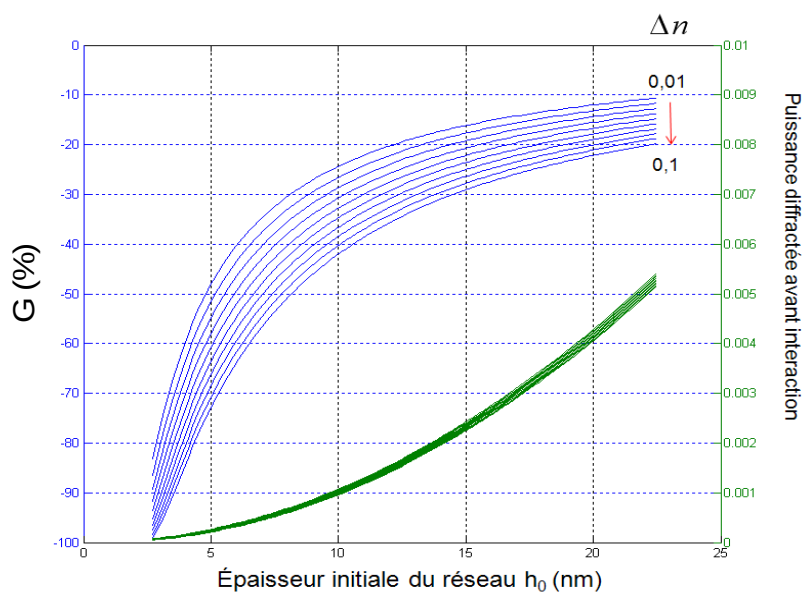


Figure 160 : variations du gain (G) et de la puissance diffractée initiale en fonction de h_0 pour différents Δn dans le cas 2 défini sur la Figure 157

Nous simulons le cas 3 de remplissage des creux. La tendance est similaire à celle du cas 2 : le gain G est négatif. De plus, nous constatons que lorsque l'épaisseur de lignes se rapproche de 2.5nm, ce gain G augmente (cercle rouge sur la Figure 161). Or le cas où l'épaisseur est nulle correspond au cas présenté sur la Figure 159. Ainsi, cette configuration débute comme le cas 1 puis finit comme le cas 2.

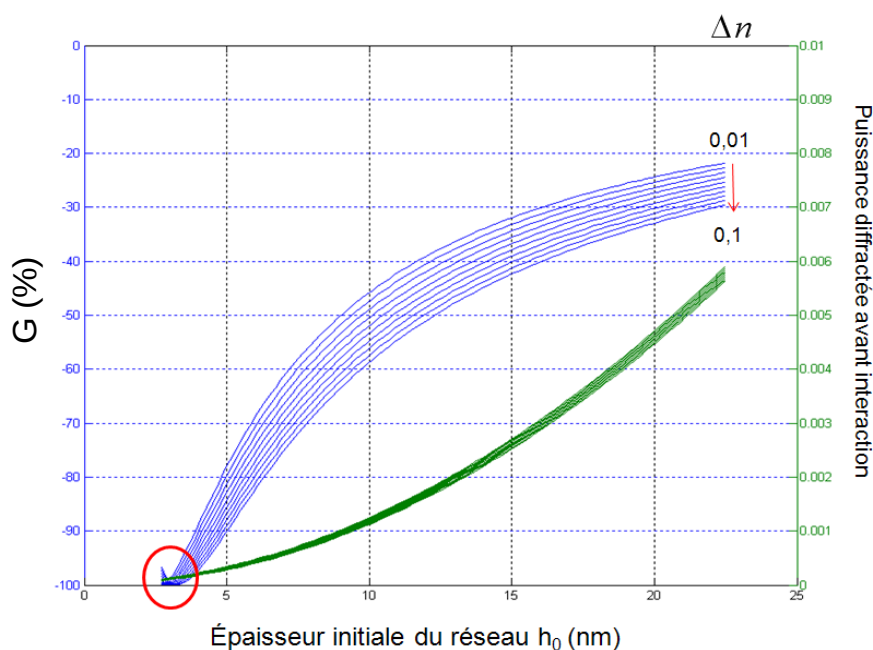


Figure 161 : variations du gain (G) et de la puissance diffractée initiale en fonction de h_0 pour différents Δn dans le cas 3 défini sur la Figure 157

La comparaison des résultats obtenus grâce à ces différentes simulations, nous conduit à affiner le cas 1, qui correspond aux empreintes faites sur les lignes. Dans ce cas 1, nous étudions l'influence du rapport entre la partie de la biomolécule cible dans le MIP (h_1) et la partie qui déborde à l'extérieur (h_2) pour $h_0=0$. La Figure 162 présente les variations de G et de la puissance diffractée en fonction de la différence d'indices Δn pour différents rapports $\frac{h_2}{h_1}$ allant de 1 à 10. Nous observons que plus ce rapport est important, plus G augmente ce qui confirme l'interprétation déjà avancée : l'épaisseur de la couche de la protéine qui déborde à l'extérieur du MIP contrôle les variations de G . Il est à signaler que l'épaisseur h_1 n'a pratiquement aucun effet sur le gain G , le paramètre clef est le rapport $\frac{h_2}{h_1}$.

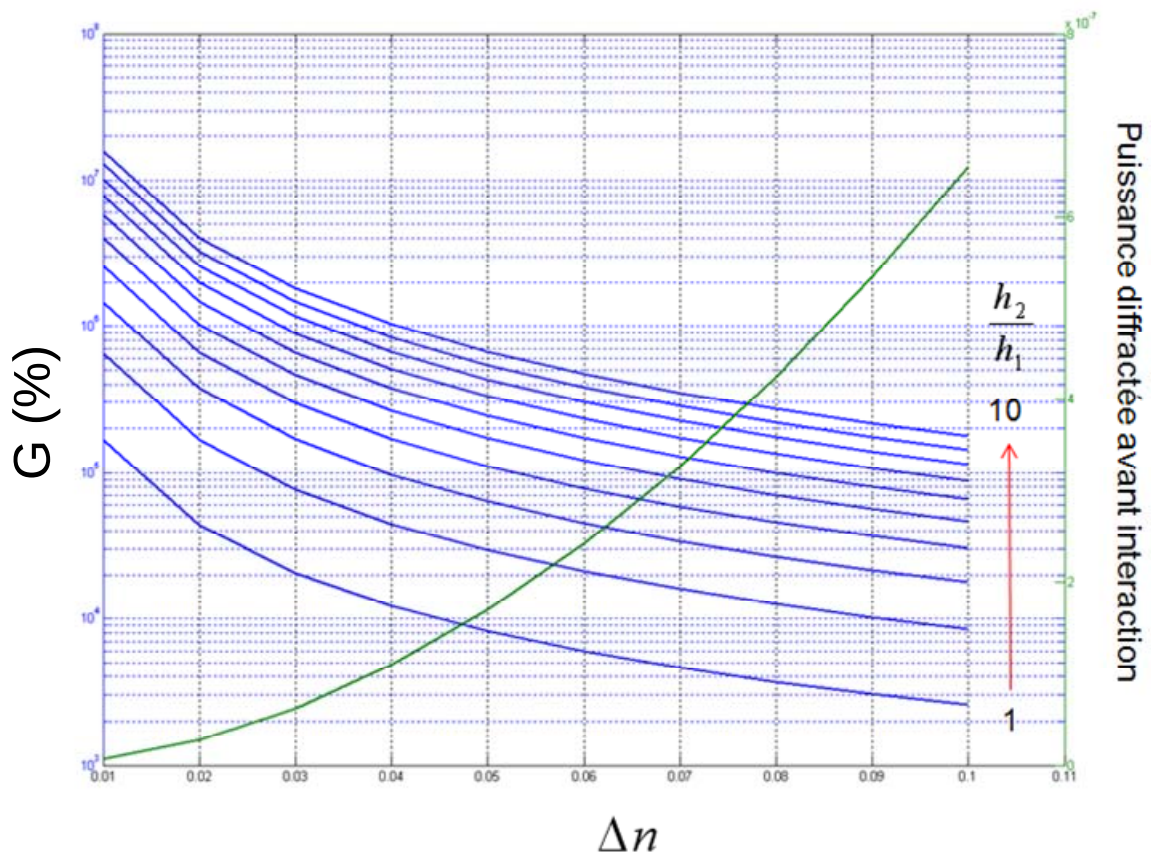


Figure 162 : variations du gain (G) et de la puissance diffractée initiale en fonction de Δn et pour une hauteur initiale des lignes nulle ($h_0=0$), pour le cas 1 de la Figure 157, une hauteur $h_1=1\text{nm}$ et un rapport allant $\frac{h_2}{h_1}$ de 1 à 10

Cette étude définit la configuration idéale de diagnostic en utilisant des biopuces à base de MIP :

- un montage de diffraction sensible
- une épaisseur initiale des MIP très faible
- la réalisation des empreintes sur les lignes

Comme certains MIP sont adaptés au piégeage volumique par des empreintes elles aussi volumiques, nous présentons ici de premières simulations obtenues sur ces phénomènes. Pour cela, nous considérons que l'interaction biologique engendre par le remplissage des cavités une variation de l'indice effectif du MIP (Figure 163.A). La Figure 163.B donne les variations de G et de la puissance diffractée initiale en fonction de l'épaisseur initiale des lignes du réseau h_0 pour différentes augmentations de l'indice Δn . Nous observons ici des variations importantes de G et de $\left(\frac{P_1}{P_i}\right)_{avant}$. Lorsque la puissance diffractée initiale tend à s'annuler G devient très grand. Inversement, lorsque la puissance diffractée est maximale G tend vers zéro. Nous déduisons de ces simulations que le diagnostic en utilisant des interactions volumiques ne peut se faire qu'en sélectionnant certaines gammes d'épaisseurs de lignes du réseau, de 0nm à 50nm et de 250nm à 300nm (délimitées en jaune sur la Figure 163).

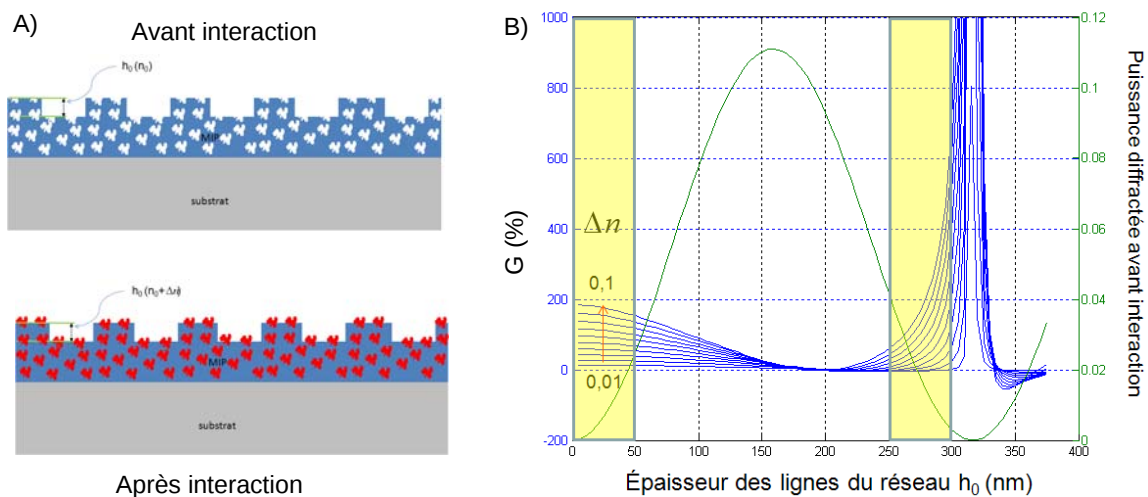


Figure 163 : B) variations du gain (G) et de la puissance diffractée initiale en fonction de l'épaisseur des lignes du réseau h_0 pour différents Δn dans le cas du piégeage volumique présenté dans A)

En résumé, cette simulation démontre que les réseaux de diffraction à base de MIP à piégeage par empreinte superficielle ou volumique sont adaptés au diagnostic. Les lignes du réseau doivent avoir une épaisseur la plus faible possible sur lesquelles sont intégrées les empreintes dans le premier cas. Dans le second cas, certaines épaisseurs particulières devront être retenues. On peut aussi remarquer qu'une utilisation du macrotimbre peut adresser localement des biomolécules dont les empreintes vont être réalisées dans le MIP. Le support composé du MIP avec les empreintes est alors multiplexé et génère une biopuce innovante.

I.3. Une nouvelle approche du diagnostic : l'utilisation des concepts d'apprentissage des machines (*machine-learning*)

Actuellement, le diagnostic est à échelle humaine. Il est effectué par le médecin qui traite les différentes données collectées à partir d'une analyse selon son expérience et celles de ses confrères, de la connaissance de l'histoire et de l'état psychologique du patient. Son diagnostic intègre aussi des informations sociologiques tel que l'âge, le sexe, la zone géographique, les épidémies en cours.

Le développement des biopuces de diagnostic et d'analyse qui va fournir un très grand nombre d'information impulse une autre approche de la médecine calqué sur les concepts de *machine-learning*. Ils permettent de traiter le nombre important de signaux provenant de la biopuce. L'intelligence artificielle appliquée aux thématiques de la biologie (la bioinformatique) devrait en effet permettre de traiter l'ensemble des interactions biologiques afin de déterminer les corrélations avec les symptômes d'une pathologie.

Ce nouveau traitement des données ne se base que sur des données physiologiques quantifiées. Les informations sociologiques du patient ne serait alors utilisées qu'afin de corroborer un diagnostic ou de pousser à une plus grande investigation.

Ces puissants outils de diagnostic ouvrent le nouveau champ d'exploitation de systèmes de détection à très forte densité.

II. Vers la conception de systèmes de biodétection globaux basés sur la diffraction

L'ensemble expérimental de détection présenté dans les chapitres précédents est conçu pour sonder séquentiellement les réseaux présents sur une biopuce. Ces réseaux sont de $400\mu\text{m} \times 400\mu\text{m}$ et le diamètre du faisceau laser utilisé pour la détection est de 1mm (Figure 164.A). La densité d'une telle biopuce ne peut pas dépasser 10^2 interactions par cm^2 .

Nous démontrons dans ce paragraphe qu'il est possible de concevoir des biopuces à très haute densité fonctionnant aussi sur le principe de la diffraction et permettant d'analyser très rapidement un nombre important d'interactions biologiques.

Une première démarche pour augmenter cette densité sur le substrat est d'une part de réduire la taille des réseaux de diffraction pour pouvoir les rapprocher et d'autre part de réduire la taille du faisceau laser incident de sondage. Mais la réduction de la taille du faisceau laser, tout en conservant une collimation du faisceau est difficile à obtenir.

Une deuxième démarche consiste à augmenter la densité des réseaux de diffraction sur le substrat tout en conservant un faisceau laser incident toujours large. On sonde alors en parallèle plusieurs de ces réseaux (Figure 164.B).

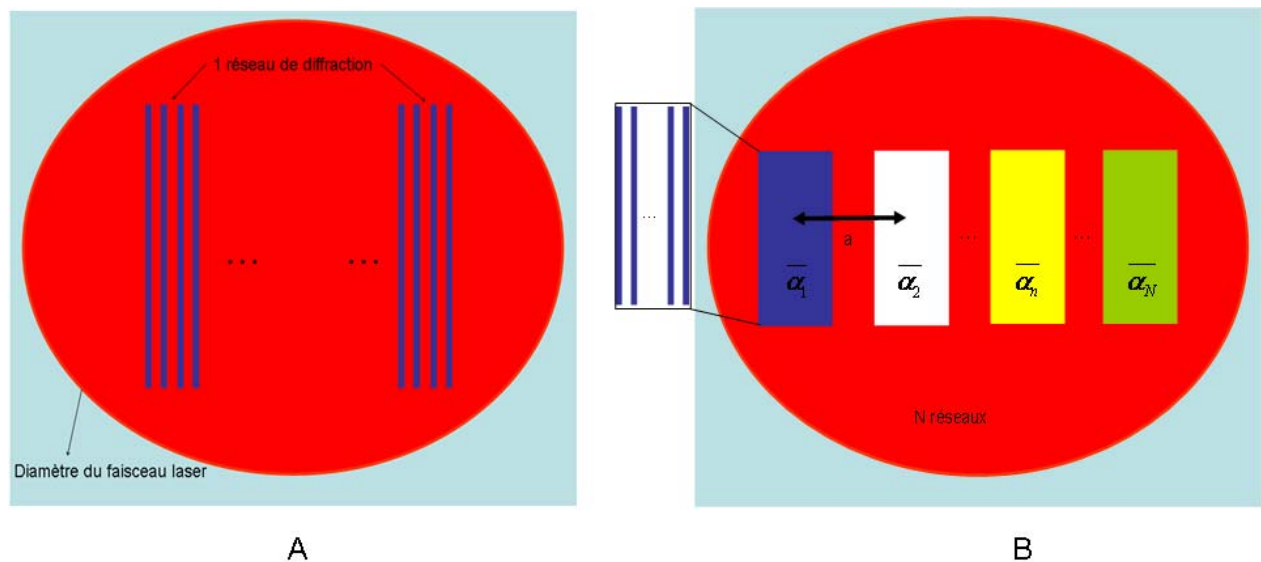


Figure 164 : A) système actuellement utilisé permettant de sonder un seul réseau de diffraction, B) système proposé permettant de sonder plusieurs réseaux

Ces divers réseaux illuminés par le même faisceau, diffractent à l'ordre 1 dans la même direction. Comme la diffraction engendre une dispersion de la lumière dans l'espace, ces rayonnements vont interférer entre eux. Le signal diffractif mesuré est alors complexe.

Nous proposons par la suite deux voies pour déduire de ce signal le spectre de diffraction émis par chaque réseau.

II.1. Méthode basée sur la déconvolution du signal diffractif

Expérimentalement cette méthode combine d'une part un balayage du faisceau laser sur la surface de la biopuce avec un enregistrement simultané de l'intensité de la lumière de l'ordre 1 grâce à un capteur de grande surface placé sur cet ordre. Cette configuration est donc très proche de celle utilisée lors de ce doctorat.

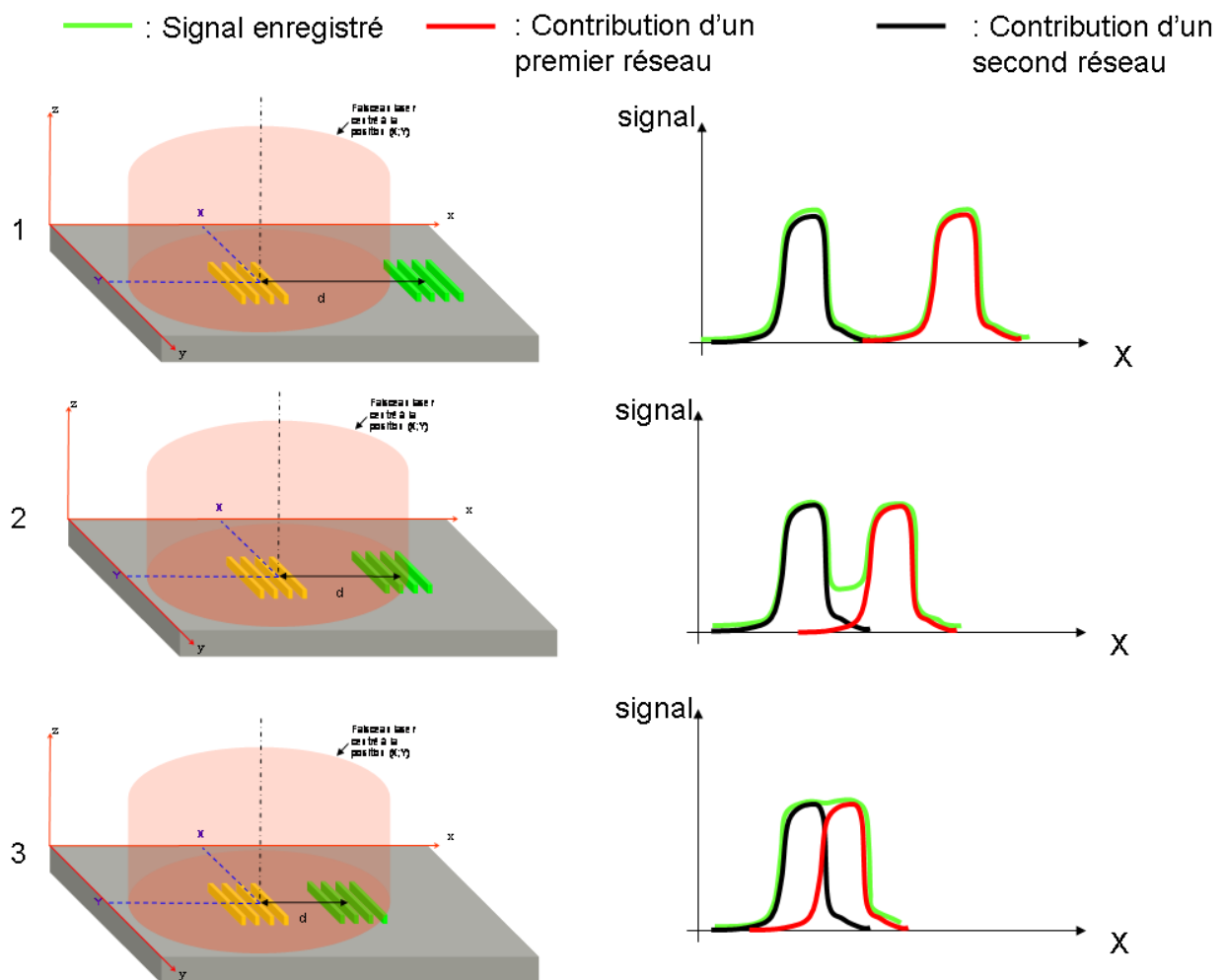


Figure 165 : schémas représentant deux réseaux illuminés par un faisceaux laser placé à (X, Y) et graphes schématisés du signal enregistré lors du balayage du laser en X , pour trois distances différentes d entre les réseaux.

Pour simplifier, nous raisonnons à une dimension selon Ox . Lors de l'illumination simultanée de plusieurs réseaux par le faisceau laser, le signal obtenu est la somme des contributions lumineuses de chaque réseau. Lorsque la distance d entre ces réseaux est

supérieure au diamètre du faisceau laser Φ , le capteur reçoit principalement la diffraction de chaque réseau lors du déplacement selon Ox du laser sur le substrat (courbe verte du cas 1 de la Figure 165) car ils sont séparés. Lorsque d devient voisin du diamètre du laser (cas 2), le signal enregistré permet encore une discrétisation des contributions de chaque réseau. Par contre dans le cas 3 où d est inférieur à Φ , il n'est plus possible de séparer le signal provenant de chaque réseau. Nous devons alors rechercher une méthode permettant de séparer chaque signal émis.

Pour un seul réseau, en accord avec le principe de Huygens-Fresnel, l'émission à l'ordre 1 lors du balayage du faisceau laser est la somme de l'ensemble des points émettant à l'ordre 1 (ligne 1 colonnes 1 et 2 du tableau 4).

Le faisceau laser est repéré par sa position X . Le profil d'émission à la surface du substrat est la résultante d'un éclairage du réseau par une partie du faisceau laser. Il peut être modélisé par la multiplication du profil du laser par une fonction porte dont la taille est celle du réseau et d'amplitude α (ligne 1 colonne 2 du tableau 4). Le signal à l'ordre 1 qui résulte de la diffraction sous cet éclairage, est la somme sur la surface du substrat de l'ensemble des points éclairés émettant à l'ordre 1. Il dépend de la position du point x par rapport au centre du laser, donc de $(x - X)$ et s'écrit :

$$S_{1\text{réseau}}(X) = \int_{\text{surface du substrat}} \alpha \Pi(L) \times F(x - X) dx \quad [1]$$

Où x est la variable d'intégration sur la surface du substrat (ici considérée comme unidirectionnelle), $\alpha \Pi(L)$ représente l'émission du réseau et $F(x - X)$ est la pondération de l'émission par le profil du laser.

Lorsque plusieurs réseaux sont illuminés (ligne 2 colonnes 1 et 2 du tableau 4), le signal est la somme sur l'ensemble des réseaux, ce qui donne l'équation [2].

$$S_{\text{final}}(X) = \int_{\text{surface du substrat}} \sum_i \alpha_i \Pi(L) \otimes \delta(x - a_i) \times F(x - X) dx = \int_{\text{surface du substrat}} P(x) \times F(x - X) dx \quad [2]$$

Où $\sum_i \alpha_i \Pi(L) \otimes \delta(x - a_i) = P(x)$ est le profil d'émission de l'ensemble des réseaux, donc le profil recherché.

$$[1] \text{ peut s'écrire comme : } S_{1\text{réseau}}(X) = (\alpha \Pi(L) \otimes F)(X) \quad [3]$$

$$\text{De même pour [2] : } S_{\text{final}}(X) = (P \otimes F)(X) \quad [4]$$

L'acquisition des deux signaux $S_{final}(X)$ et $S_{1réseau}(X)$ permet moyennant un traitement mathématique de trouver l'émission $P(x)$ de chaque point du substrat. En effet, nous réalisons la transformée de Fourier des deux fonctions [3] et [4], et nous obtenons:

$$TF(S_{final}) = TF(P) \times TF(F)$$

$$TF(S_{1réseau}) = TF(\alpha \Pi(L)) \times TF(F)$$

Leur rapport donne :

$$\frac{TF(S_{final})}{TF(S_{1réseau})} \times TF(\alpha \Pi(L)) = TF(P)$$

Or, $TF(\alpha \Pi(L)) = \alpha \sin c(\pi L \tilde{x})$ où $\tilde{x}$ représente la variable dans l'espace fréquentiel.

Ce qui amène :

$$\frac{TF(S_{final})}{TF(S_{1réseau})} \times \alpha \sin c(\pi L \tilde{x}) = TF(P)$$

Par le biais de la transformée de Fourier inverse (TF^{-1}), nous obtenons alors :

$$P(X) = TF^{-1} \left[\frac{TF(S_{final})}{TF(S_{1réseau})} \times \alpha \sin c(\pi L \tilde{x}) \right]. \quad [5]$$

Cette relation démontre bien que si nous connaissons la dimension des réseaux L et la réponse d'un réseau dit de calibration (par exemple un réseau en silicium), nous pouvons en déduire la réponse de chaque point d'un substrat comportant N réseaux biomoléculaires, et donc le spectre émis par chaque réseau. Nous observons, de plus, que cette réponse est indépendante de la fonction F représentant l'effet de la forme et donc de la taille du faisceau laser incident.. Les transformées de Fourier des signaux ainsi que la transformée inverse présente dans l'équation [5] peuvent être réalisées numériquement par l'algorithme de transformée de Fourier rapide dit FFT. Nous pouvons remarquer, de plus, que le terme de proportionnalité α qui dépend du réseau de calibration utilisé s'élimine lors du calcul du gain. En effet, nous avons **avant** interaction :

$$P_i(X) = TF^{-1} \left[\frac{TF(S_{final})}{TF(S_{1réseau})} \times \alpha \sin c(\pi L \tilde{x}) \right] = \alpha \times TF^{-1} \left[\frac{TF(S_{final})}{TF(S_{1réseau})} \times \sin c(\pi L \tilde{x}) \right] = \alpha \times f_i(X)$$

avec $f_i(X) = TF^{-1} \left[\frac{TF(S_{final})}{TF(S_{1réseau})} \times \sin c(\pi L \tilde{x}) \right]$ et **après** interaction :

$$P_f(X) = \alpha \times f_f(X)$$

Le gain $G(X)$ sur le substrat s'écrit alors :

$$G(X) = \frac{P_f(X) - P_i(X)}{P_i(X)} = \frac{f_f(X) - f_i(X)}{f_i(X)}$$

Nous observons bien que $G(X)$ est indépendant de α donc du réseau de calibration utilisé.

Comme la cartographie du signal est réalisée suivant les deux dimensions, X et Y , l'équation [5] doit être généralisée pour un faisceau laser repéré dans le plan par (X, Y) . Nous obtenons [6].

$$P(x, y) = TF^{-1} \left[\frac{TF(S_{final})}{TF(S_{réseau})} \times \alpha \sin c(\pi L_1 \tilde{x}) \sin c(\pi L_2 \tilde{y}) \right] \quad [6]$$

où $\tilde{x}$ et $\tilde{y}$ représentent les variables dans l'espace fréquentiel.

Ainsi, il est possible de calculer l'émission de chaque réseau en déconvoluant numériquement la cartographie réalisée. Cette déconvolution est équivalente à celle réalisée par des logiciels de déconvolution d'image AFM. En effet, ce moyen de caractérisation demande d'enlever la convolution de la pointe lors de l'imagerie. Il reste alors à interpréter les signaux afin de détecter la présence des réseaux. Cette étape est équivalente à celle réalisée par les scanners de fluorescence lorsqu'ils mesurent l'intensité de différents spots positionnés sur une matrice.

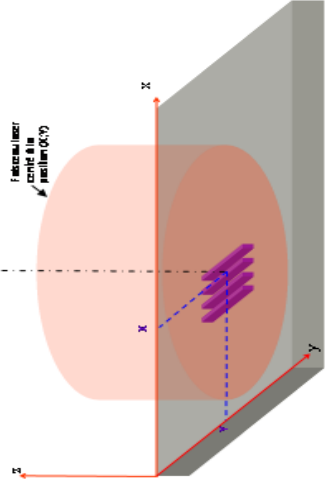
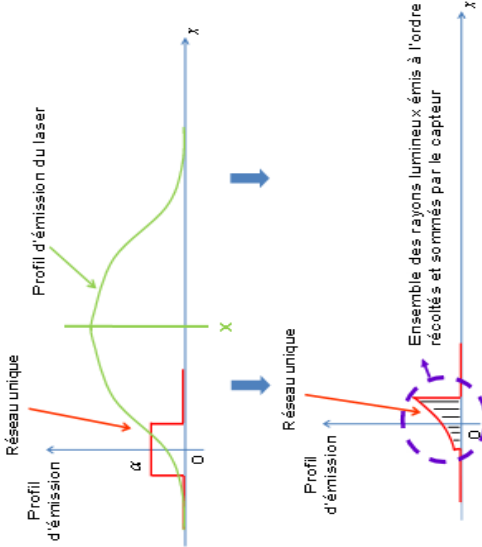
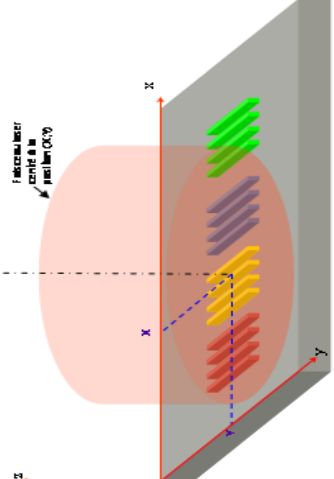
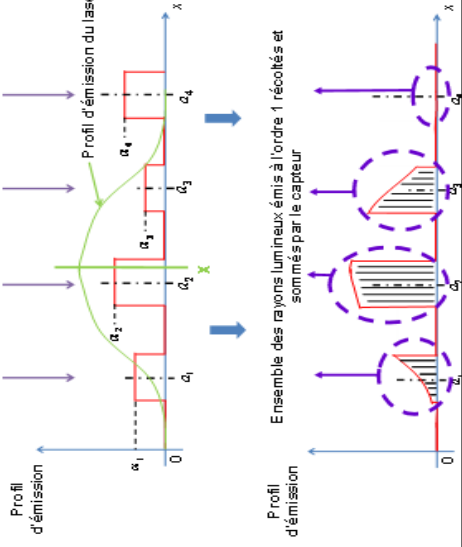
cas	Description géométrique	Description graphique	Description analytique
1 réseau			Profil d'éclairement du laser $S_{\text{réseau}}(X) = \int \alpha \Pi(L) \times F(x - X) dx$ Profil d'émission d'un réseau unique
N réseaux			Profil d'éclairement du laser $S_{\text{grat}}(X) = \int \sum_i \alpha_i \Pi(L) \otimes \delta(x - a_i) \times F(x - X) dx$ Profil d'émission de N réseaux $S_{\text{grat}}(X) = \int F(x) \times F(x - X) dx$ avec $F(x) = \sum_i \alpha_i \Pi(L) \otimes \delta(x - a_i)$ le profil d'émission de l'ensemble des réseaux

tableau 4 : tableau regroupant les descriptions géométrique, graphique et analytique dans le cadre de l'illumination par le laser d'un puits de N réseaux.

II.2. Méthode basée sur l'exploitation des phénomènes d'interférence entre réseaux

II.2.1. Principe

La seconde solution que nous proposons consiste à réaliser une cartographie fine, ponctuelle du signal autour de l'ordre 1 avec plusieurs petits capteurs pour une position du faisceau laser incident donnée. Technologiquement, cet ensemble de capteurs peut être une barrette CCD positionnée à l'ordre 1 (Figure 166).

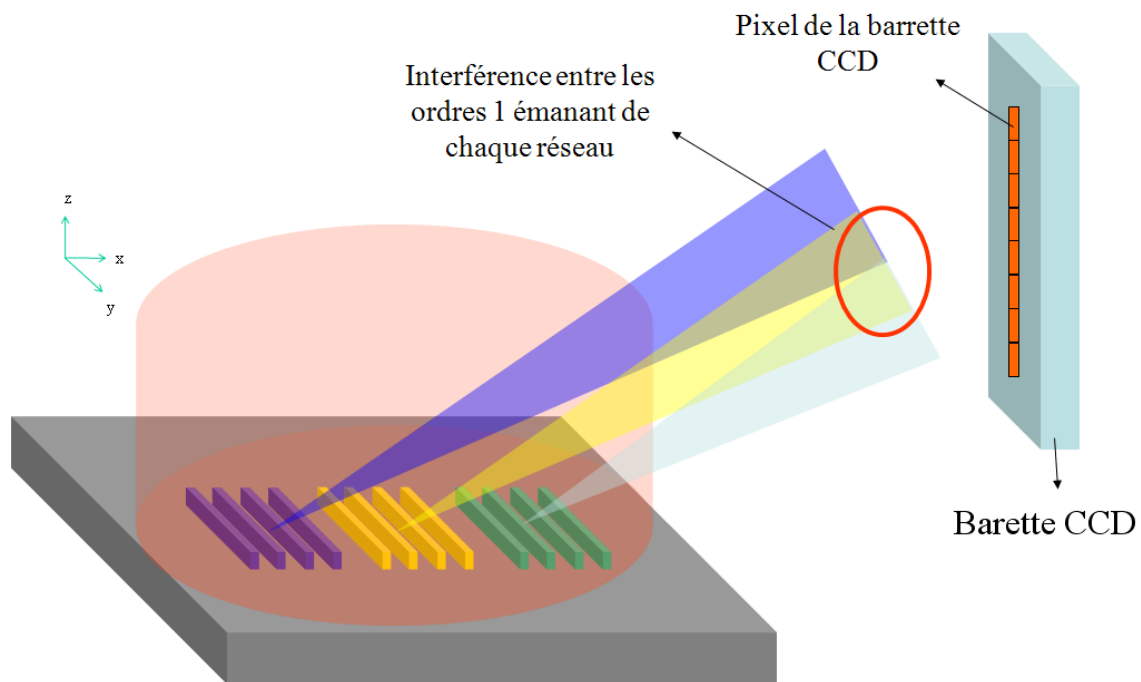


Figure 166 : schéma du dispositif de diffraction basé sur une détection de l'ordre 1 par une barrette CCD

Les ondes émises à l'ordre 1 par les réseaux illuminés simultanément par le laser en position donnée, vont interférer entre eux (Figure 166). Le système peut être modélisé en assimilant chaque réseau à une fente si on ne réduit que la largeur des réseaux. Le spectre de diffraction de l'ensemble des réseaux est alors celui de fentes espacées de la même distance a et émettant des intensités différentes.

II.2.2. Etude du cas simple de deux réseaux éclairés simultanément

La Figure 167 présente à titre d'exemple le principe de la détection d'une interaction en éclairant avec un même laser deux réseaux.

Un seul réseau émet à l'ordre 1 le signal de diffraction correspondant à la courbe verte (diffraction d'une fente). Deux réseaux identiques à ce premier émettant la même quantité de lumière mais espacés de a interfèrent et donnent le spectre d'interférence à l'ordre 1 (courbe bleue) avec une intensité qui varie en cosinus carré de la différence de marche le tout modulé par la diffraction d'un réseau unique (courbe verte) à l'ordre 1 (interférence de deux fentes d'Young).

Deux réseaux identiques au premier mais ne diffractant pas de manière identique (80% pour le premier / 20% pour l'autre) interfèrent suivant la courbe rouge comprise entre la verte et la bleue.

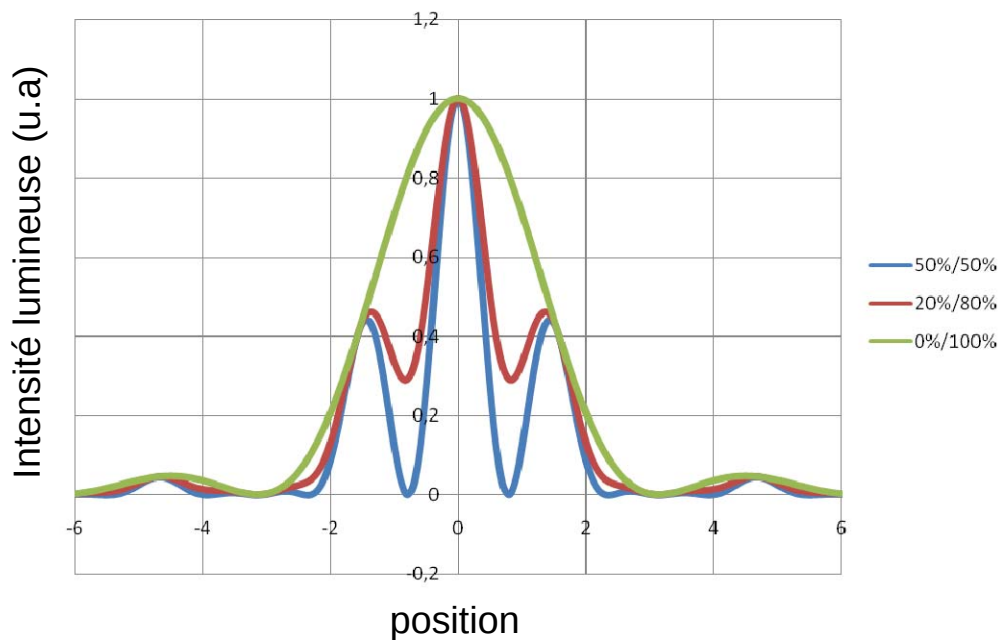


Figure 167 : exemple de simulation représentant la répartition de la lumière à l'ordre 1 pour deux réseaux qui interfèrent entre eux. La courbe bleue correspond au cas où les deux réseaux émettent de manière identique, la courbe rouge le cas où l'un des réseaux émet 4 fois plus que l'autre et la courbe verte le cas où un seul réseau diffracte.

Si l'un de ces deux réseaux est destiné par exemple à la détection de l'interaction entre la protéine A avec son anticorps complémentaire et le second au contrôle négatif, lors de l'interaction, le signal va se transformer de la courbe bleue en la courbe rouge voire verte étant donné que le réseau négatif s'éteint pratiquement. Cet exemple simple nous montre qu'il est possible d'acquérir l'information concernant l'émission de chaque réseau par ce procédé de détection. Le profil d'interférence entre réseaux varie en fonction des interactions qui ont lieu sur chacun d'eux.

II.2.3. Généralisation à N réseaux de diffraction éclairés simultanément

Pour étudier les potentialités de cette méthode sur le plan du diagnostic à partir de biopuces à haute densité, ce cas simple de deux réseaux doit être généralisé à N réseaux. Pour cela, nous modélisons le signal de diffraction émanant de N réseaux en utilisant la démarche présentée dans le chapitre 2.

Tout d'abord, nous exprimons la fonction représentant l'émission lumineuse à la surface de l'échantillon. Comme dans le chapitre 2, elle se décompose en deux fonctions :

$$\Psi_{Nr\acute{e}seaux}(x, y) = \Psi_{Nr\acute{e}seaux_y}(y) \times \Psi_{Nr\acute{e}seaux_x}(x)$$

Dans le cas d'une densification des réseaux suivant x à longueur suivant oy inchangée,

$$\Psi_{Nr\acute{e}seaux_y}(y) = \Psi_{1r\acute{e}seau_y}(y) = \Pi_y(L_2)$$

D'après le chapitre 2, nous savons que :

$$\Psi_{1r\acute{e}seau_x}(x) = \left\{ \bar{B}\Pi_x(L_1) + (\bar{A} - \bar{B}) \times [\Pi_x(l) \otimes \sum_k \delta(x - kp)] \times \Pi_x(L_1) \right\}$$

Si $\bar{\alpha}_m = (\bar{A}_m - \bar{B}_m)$ représente l'amplitude émise par chaque réseau alors

$$\Psi_{Nr\acute{e}seau_x}(x) = \sum_{m=1}^N \left[\left\{ \bar{B}_m \Pi_x(L_1) + \bar{\alpha}_m \times [\Pi_x(l) \otimes \sum_k \delta(x - kp)] \times \Pi_x(L_1) \right\} \otimes \delta(x - m \times a) \right]$$

où $\delta(x - m \times a)$ représente la fonction de Dirac à la position $m \times a$.

La convolution avec des pics de Dirac permet de décrire la position des réseaux. Nous rappelons que :

$$I(u, v) = I_i \left| \frac{1}{\lambda r_m} TF(\Psi_{0+}(x, y)) \right|^2$$

Il nous faut alors calculer la transformée de Fourier de $\Psi_{Nr\acute{e}seau_x}(x)$: $TF(\Psi_{Nr\acute{e}seau_x}(x))$. En effet, l'utilisation d'une barrette CCD permet d'acquérir les signaux émanant de la périodicité selon x. Nous avons :

$$TF(\Psi_{Nr\acute{e}seau_x}(x)) = \sum_{m=1}^N \left[\left\{ \bar{B}_m L_1 \sin c(\pi L_1 u) + \bar{\alpha}_m \times \left(\frac{L_1}{p} \right) \left[\sum_{k \geq 0} \sin c(\pi l \frac{k}{p}) \sin c(\pi L_1 (u - \frac{k}{p})) \right] \right\} \times \exp(i 2 \pi u m \times a) \right]$$

L'équation est proche de celle calculée au chapitre 2 à l'exception de la somme sur les différents réseaux dont le terme de déphasage entre chacun d'eux est $\exp(i 2 \pi u m \times a)$. Pour

connaître l'intensité que nous mesurons, nous calculons le module au carré de la transformée de Fourier précédente, ce qui donne :

$$|TF(\Psi_{Nréseau_x}(x))|^2 = \left| \sum_{m=1}^N \left[\left\{ \overline{B_m} L_1 \sin c(\pi L_1 u) + \overline{\alpha_m} \times \left(\frac{LL_1}{p} \right) \left[\sum_{k \geq 0} \sin c(\pi l \frac{k}{P}) \sin c(\pi L_1 (u - \frac{k}{P})) \right] \right\} \times \exp(i 2 \pi u m \times a) \right] \right|^2$$

Si nous considérons uniquement l'acquisition proche de l'ordre 1, alors nous avons :

$$|TF(\Psi_{Nréseau_x}(x))|^2 = \left(\frac{LL_1}{p} \right)^2 \left| \sum_{m=1}^N \left[\overline{\alpha_m} \times \exp(i 2 \pi u m \times a) \times \left[\sin c(\pi l \frac{1}{P}) \sin c(\pi L_1 (u - \frac{1}{P})) \right] \right] \right|^2$$

qui peut s'écrire comme :

$$|TF(\Psi_{Nréseau_x}(x))|^2 = \left(\frac{LL_1}{p} \times \left[\sin c(\pi l \frac{1}{P}) \sin c(\pi L_1 (u - \frac{1}{P})) \right] \right)^2 \left| \sum_{m=1}^N \left[\overline{\alpha_m} \times \exp(i 2 \pi u m \times a) \right] \right|^2$$

Diffraction d'un réseau
Interférence entre chaque réseau

Nous remarquons la présence du terme d'interférence entre chaque réseau modulé par celui de la diffraction d'un réseau. Nous retrouvons les mêmes conclusions que dans notre exemple avec deux réseaux.

Le terme d'interférence peut être réécrit comme :

$$\left| \sum_{m=1}^N \left[\overline{\alpha_m} \times \exp(i 2 \pi u m \times a) \right] \right|^2 = \sum_{m, m'=1}^N \left[\alpha_m \alpha_{m'} \times \exp(i (2 \pi u (m - m') \times a + \varphi_m - \varphi_{m'})) \right]$$

ce qui donne un module au carré :

$$I(u) \propto |TF(\Psi_{Nréseau_x}(x))|^2 = \left(\frac{LL_1}{p} \times \left[\sin c(\pi l \frac{1}{P}) \sin c(\pi L_1 (u - \frac{1}{P})) \right] \right)^2 \sum_{m, m'=1}^N \left[\alpha_m \alpha_{m'} \times \exp(i (2 \pi u (m - m') \times a + \varphi_m - \varphi_{m'})) \right]$$

Afin de traiter aisément cette équation complexe, nous réalisons la transformée de Fourier de l'intensité lumineuse.

$$TF(I(u)) = f(X) =$$

$$\left(\frac{LL_1}{p} \times \sin c(\pi l \frac{1}{P}) \right)^2 TF([\sin c(\pi L_1 (u - \frac{1}{P}))]^2) \otimes \sum_{m, m'=1}^N \left[\alpha_m \alpha_{m'} \exp(i (\varphi_m - \varphi_{m'})) \times \delta(X - (m - m') \times a) \right]$$

Le terme $TF([\sin c(\pi L_1(u - \frac{1}{P}))]^2)$ donne une fonction triangle centrée à la position 0 et de

largeur L_1 (Figure 168.A). Le terme $\sum_{m,m'=1}^N [\alpha_m \alpha_{m'} \exp((\varphi_m - \varphi_{m'}) \times \delta(X - (m - m') \times a))]$ correspond

à un ensemble de pics de Dirac d'amplitude variable (Figure 168.B).

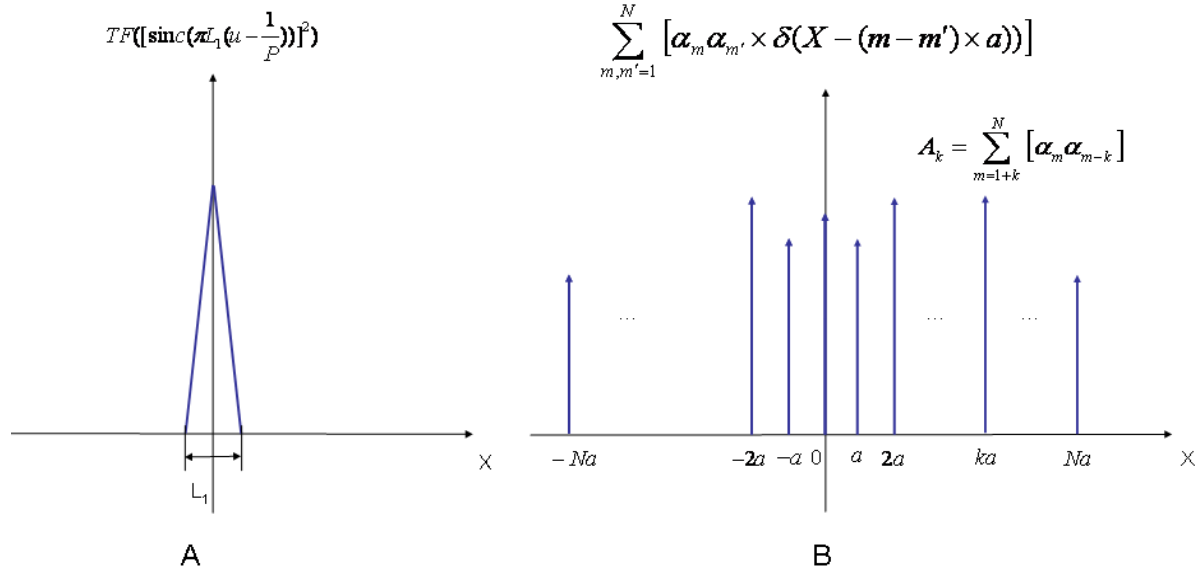


Figure 168 : schéma représentant la transformée de Fourier : A) du terme de diffraction d'un réseau B) de terme d'interférence des différents réseaux

La convolution de ces deux termes conduit à un élargissement des pics de Dirac avec la transformée de Fourier de la diffraction d'un réseau (Figure 169). Nous constatons que la figure est symétrique par rapport à l'axe des ordonnées. De plus, le nombre de pics pour des abscisses positives ou nulles est N (N étant le nombre de réseaux).

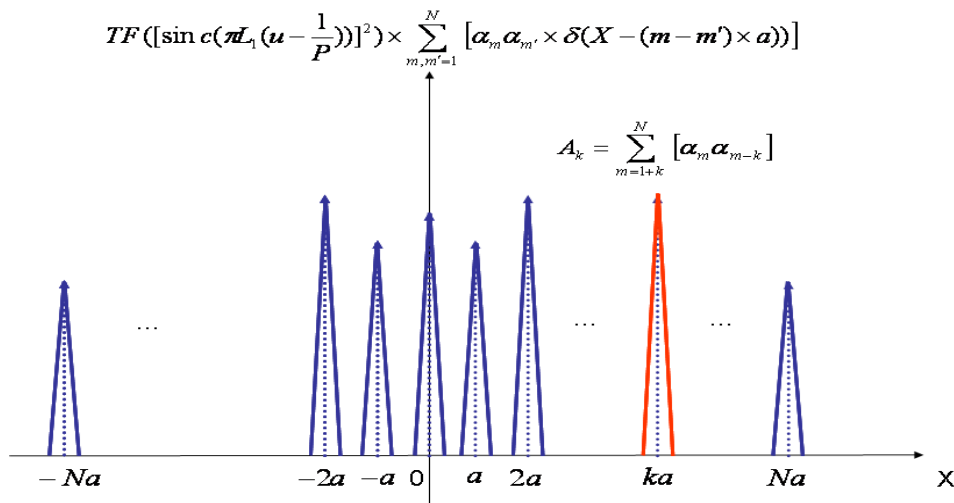


Figure 169 : schéma représentant la transformée de Fourier de l'intensité mesurée à l'ordre l lorsque plusieurs réseaux diffractent

Nous avons donc N pics et donc N valeur d'amplitude de ces pics. Le $k^{\text{ième}}$ pic (en rouge sur la Figure 169) a une amplitude A_k que nous pouvons exprimer sous la forme :

$$A_k = \sum_{m=1+k}^N [\alpha_m \alpha_{m-k}] \quad [1].$$

Ainsi, après l'acquisition du profil de l'ordre 1 puis traitement de Fourier de ce signal, nous en déduisons l'ensemble de leurs amplitudes A_k qui sont reliées aux émissions des réseaux α_m par la relation [1]. Ces équations associées à chaque pic (chaque k), sont composées des N coefficients α_m . Comme nous avons N pics, nous avons donc N équations avec N inconnues, c'est-à-dire l'émission à l'ordre 1 de chaque réseau. Un traitement mathématique en déduit alors les valeurs α_m qui caractérisent les différentes interactions qui ont lieu sur chacun d'eux.

II.3. Comparatif des deux méthodes

La première méthode nécessite d'associer à une cartographie très précise du déplacement du laser un signal de diffraction. La distance entre deux déplacements du laser doit être inférieure à la distance entre deux réseaux (Figure 170). Ceci implique un grand nombre de points d'acquisition et donc une durée de diagnostic très importante. Par contre, sa mise en place est simple car elle est très proche du fonctionnement d'un scanner de fluorescence.

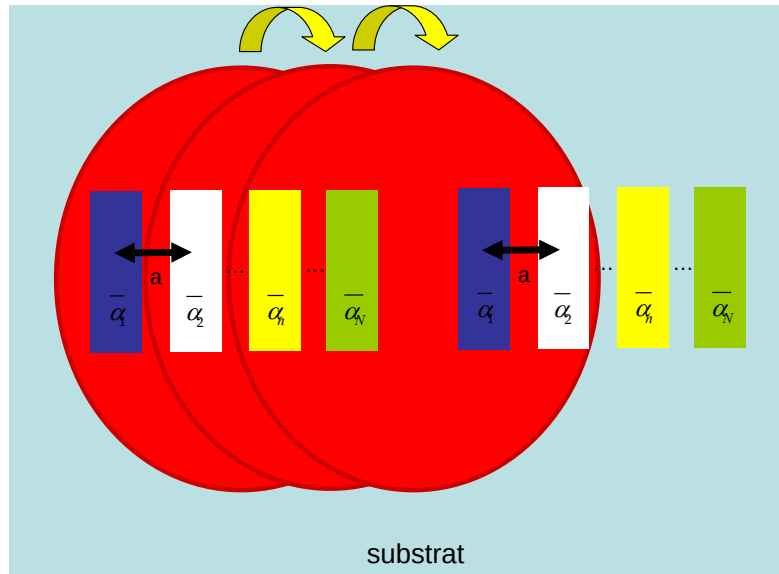


Figure 170 : schéma représentant la configuration entre trois points de mesure de la méthode basée sur la déconvolution

La seconde méthode, basée sur l'acquisition du spectre d'interférence à l'ordre 1 entre différents réseaux présente l'avantage de ne nécessiter qu'un point de positionnement du laser pour un grand nombre de réseaux. Ainsi, le temps d'acquisition est plus court. En contrepartie, le système demande d'acquérir l'ensemble du spectre grâce à la barrette CCD. Plus la barrette sera sensible (nombre de photons par coup), avec un bruit sombre et électronique faible et dense (distance entre chaque pixel faible), plus ce temps sera réduit.

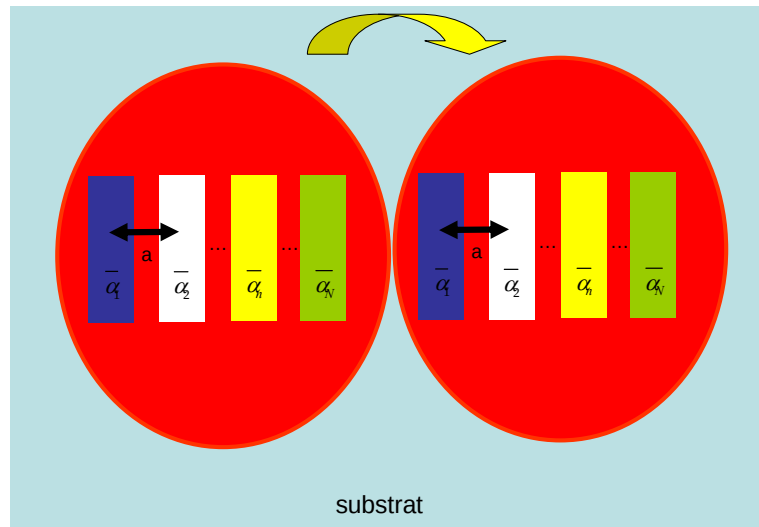


Figure 171 : schéma représentant la configuration entre deux points de mesure de la méthode basée sur la reconnaissance de l'interférence entre réseaux

Résumé

Les perspectives de cette technique de biodétection peuvent être résumées en quatre parties.

1. La poursuite, l'amélioration des travaux expérimentaux déjà engagés
2. le couplage de ce système de biodétection avec un matériau prometteur pour des applications biologiques que sont les polymères à empreinte moléculaire (MIP). Nous avons montré que la réponse du système varie selon la nature du MIP (volumique ou surfacique) qui prend alors le rôle de molécules sonde.
3. Le développement de méthodes de biodiagnostic basées sur des concepts d'analyse d'un grand nombre de données : le *machine learning*
4. L'augmentation de la densité des réseaux grâce à une analyse globale de la somme de leur puissance diffractée ou de la forme du spectre associée à des méthodes de déconvolution. Nous sommes persuadés que ces dernières méthodes ouvrent la voie du codage.

CONCLUSION

Le début de ce travail de doctorat identifie les cinq verrous à franchir pour proposer *in fine* des techniques de multi détection sans marquage sensibles et à bas coût visant à contribuer à améliorer la santé de l'homme (*la grande tâche*) déclinée en analyse, diagnostic et soins. Ces verrous sont :

1. la fixation de sondes sur un substrat
2. le piégeage de cibles sur celles-ci
3. une technique de détection de leur interaction sans marquage sensible
4. la réalisation de biopuces multisondes
5. la détection de l'interaction sonde-cible au format biopuce

Un premier chapitre fait l'inventaire des travaux de biodétection sans marquage publiés, utilisant principalement l'optique. Il dégage le potentiel supplémentaire qu'apporte le couplage entre la technique de tamponnage moléculaire avec la diffraction pour atteindre ces objectifs. Le tamponnage moléculaire permet de réaliser à bas coût des réseaux de sondes sur un substrat et la diffraction détecte l'interaction biologique.

L'absence dans la littérature de simulation de l'influence des paramètres maîtrisables par l'expérimentateur, comme la géométrie des réseaux, sur les spectres de diffraction, nous conduit dans un chapitre II à développer un modèle. Il introduit deux grandeurs relatives caractéristiques :

- la puissance diffractée à l'ordre 1 par le réseau rapportée à la puissance incidente qui donne une indication sur les limites de détection des montages expérimentaux à concevoir pour être sensibles
- le gain en puissance G lors d'une interaction qui chiffre le potentiel de la technique de biodétection par diffraction.

Plusieurs simulations évaluant l'influence des paramètres maîtrisables des réseaux conduisent à orienter nos choix expérimentaux :

- la biodétection par diffraction au format biopuce par des réseaux de $400\mu\text{m} \times 400\mu\text{m}$ est possible avec un banc de diffraction élaboré.
- la largeur des lignes des réseaux doit pour cela être inférieure mais proche de la moitié du pas

- L'épaisseur de la chimie de surface utilisée pour accrocher les sondes doit être réduite le plus possible
- la biodétection par diffraction est un modèle à 3 états qui présente l'avantage d'identifier nettement par le signe et la valeur du gain mesuré le type d'interaction qui est soit une interaction spécifique, soit une interaction non spécifique, soit le couplage de ces deux types sans avoir recours à des tests préalables de contrôle négatif que demandent la plupart des autres techniques.

Ce travail théorique nous conduit à développer, dans le chapitre III, la technique de tamponnage moléculaire avec une variante qui s'affranchit des problèmes posés par l'utilisation de solvants non aqueux, en réalisant l'encrage par un buvard imbibé des biomolécules. Nous réalisons des réseaux de chimie de surface (OTS) ou de streptavidine de qualité et à bas coût dont les dimensions sont voisines des conditions idéales (pas de 1µm, largeur des lignes 550 nm).

Le montage conçu et construit pour détecter les interactions par diffraction au format biocapteur et biopuce y est ensuite décrit. Son automatisation dans le but de diminuer la limite de détection (par mesure d'un maximum d'intensité diffracté) mais aussi de sonder de multiples réseaux sur une biopuce est aussi présentée.

Ensuite, dans le but de démontrer l'intérêt de notre approche, ces techniques expérimentales sont appliquées à deux interactions biochimiques dans le chapitre IV. La première est le cas d'école de la reconnaissance de la protéine A par un anticorps. La seconde propose une application au criblage pharmaceutique : un peptide est plus ou moins phosphorylé par une enzyme (la kinase) selon la présence d'un inhibiteur ; un anticorps reconnaissant la phosphorylation permet de détecter par diffraction l'efficacité de l'inhibiteur qui est le principe actif recherché.

Le premier cas nous permet de tester le type d'ingénierie : fonctionnalisation de la surface de verre par un silane, dépôt sur lui de réseaux de streptavidine par tamponnage moléculaire, exploitation de l'interaction biotine-streptavidine pour fixer un anticorps reconnaissant la protéine A.

Le deuxième cas applique la même démarche pour réaliser des réseaux de sondes de peptides phosphorylés.

Dans les deux situations, la fixation des cibles d'anticorps est détectée par diffraction. Nous interprétons les résultats par un mode d'adsorption complexe qui est identifié grâce à la

maîtrise des simulations. Ces résultats présentent déjà des performances. Il est possible de détecter par diffraction des épaisseurs de streptavidine de 2.2 nm et de peptides de 0.4 nm ce qui représente 8pg de peptides. Notre limite de détection est évaluée au pg et comparable à celle des autres techniques de détection.

Ce chapitre démontre qu'il est indispensable de disposer, en diffraction, d'un modèle de simulation générique, flexible, adaptable à toutes les situations.

L'ensemble de ces premiers travaux apporte une contribution au franchissement des trois premiers verrous. Le chapitre V ouvre une nouvelle voie pour franchir les deux derniers. Nous y présentons le multiplexage du dépôt de biomolécules sondes grâce à un timbre composé de plots millimétriques dont la taille et l'organisation est adaptée aux plaques de titration des biochimistes. Ces plots ont leur extrémité structurée en réseaux. Un automate, intégré au montage de diffraction et conçu par nos soins, prélève grâce à ce timbre les biomolécules sondes dans les plaques de titration puis les dépose sur un substrat. Celui-ci est prévu pour augmenter, par un décalage du timbre par rapport au substrat, la densité des biomolécules déposées. De premiers essais utilisant des marqueurs fluorescents valident la technique.

Au terme de ce travail, nous disposons d'une plateforme biopuce diffractante, sensible, intégrant toutes les étapes de fabrication de réseaux de sondes à bas coût, réalisant le piégeage des cibles dans une cellule microfluidique et détectant les interactions par diffraction.

Ce doctorat ouvre aussi de nombreuses perspectives. Les premières se situent dans la continuité des travaux amorcés sur les plans de la réalisation de réseaux de diffraction par un tamponnage moléculaire reproductible et sur la détection d'interactions sondes cibles multiples sans marquage. Les suivants sont la recherche de molécules inhibitrices de la phosphorylation et le développement de biopuces diffractantes.

Une réflexion à plus long terme conduite dans le chapitre VI encourage :

- le développement de méthodes d'analyse et de diagnostic mettant en jeu des substrats à base de polymères à empreintes moléculaire (MIP) qui supprimeraient à terme l'utilisation de molécules sondes pour fixer les cibles.
- une nouvelle approche du diagnostic, qui exploite ingénieusement et objectivement un grand nombre de données, calquée sur le concept d'apprentissage des machines (*machine-learning*)

- une conduite d’analyse globale de la diffraction de plusieurs réseaux qui ouvre les voies de la densification des biopuces diffractives et de l’analyse par code barre

Pour conclure, nous tenons à replacer ces travaux de doctorat dans le contexte scientifique et sociétal. Ils proposent un développement technologique important démontrant la faisabilité de la détection par diffraction. Ils ouvrent des applications directes, de diagnostic et de criblage pharmaceutique, à bas coût et donc conformes à notre souci de démocratisation. Ils démontrent encore ici que l’utilisation des nanotechnologies en biologie tire les avancées en terme de soins et d’évolution des connaissances (Figure 172).

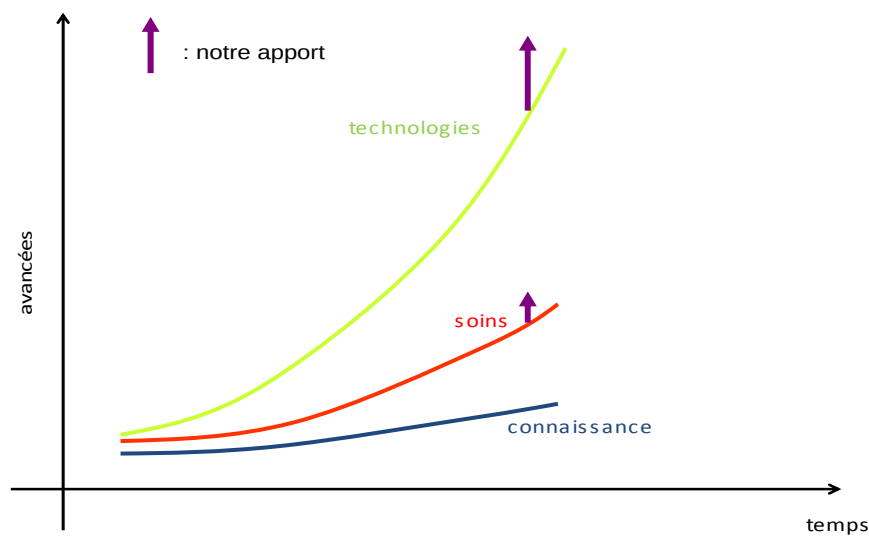


Figure 172 : schéma représentant les avancées des technologies, des soins, de la connaissance dans le domaine de la santé en fonction du temps. La flèche violette représente notre apport dans ce contexte scientifique.

Nous espérons ainsi avoir participé modestement à l’évolution de la grande tâche santé en développant des outils contribuant à réduire la lenteur des accomplissements.

PUBLICATIONS REALISEES AU COURS DE CES TRAVAUX

Brevets :

2008 : " Procédé de recherche d'au moins un analyte dans un milieu susceptible de le contenir" Jean-Christophe CAU, Hélène LALO, Jean-Pierre PEYRADE, Christophe VIEU, Childerick SEVERAC ; ref : 15788FR, numéro de dépôt : 08 56107

2007 : "Procédé et dépôt simultané d'un ensemble de motifs sur un substrat par un macro timbre" Jean-Christophe CAU, Hélène LALO, Jean-Pierre PEYRADE, Christophe VIEU, Christophe THIBAUT, Childerick SEVERAC ; ref : 16536, numéro de dépôt : 20070057543

Articles:

"Label-free optical biodetection based on diffractive molecular nanopatterns"

Jean-Christophe Cau, Hélène LALO , Emmanuelle TREVISIOL, Jean-Pierre PEYRADE-, Christophe VIEU

Microelectronic Engineering (soumis)

"Controlled Assembly of untreated Bacteria using soft-lithography"

Aline Cerf, Jean-Christophe CAU, Christophe VIEU

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces

"Chemical engineering of Silicon oxide surfaces using Micro-Contact printing for localizing adsorption events of nanoparticles, dendrimers and bacteria. "

Jean-Christophe Cau , Aline Cerf , Christophe Thibault , Childéric Séverac , Jean-Pierre Peyrade-and Christophe Vieu, *Microelectronic Engineering*, 10 February 2008

Oral:

2008 : 2nd label-free protein array workshop, Paris, France
MRS 2008 spring meeting (oratrice : LALO Hélène)

Posters:

2008 : AMT Advances in Microarray Technology, Barcelona, Spain
X Linz Winter Workshop, Linz, Austria
Nanobio Europe 08, Barcelona, Spain
MNE 2008, Athènes, Grèce
NNT 08, Kyoto, Japon

2007: MNE07 : Micro and Nano Engineering, Copenhagen, Denmark
Materials Today Asia 2007, Beijing, China

2006: JMC 10 (10th condensed matter symposium) Toulouse France

LES NANOTECHNOLOGIES DANS LA SOCIETE

Ce chapitre est non scientifique. Il présente mes réflexions sur les implications sociétales concernant les recherches présentées dans ce manuscrit, dont la thématique générale est les nanobiotechnologies. Pour cela, nous exposons tout d'abord les problèmes liés aux applications directes des avancées réalisées en biodétection sensible. Dans un second temps, nous détaillons nos réflexions sur l'éthique des nanobiotechnologies. Enfin, suite à ces réflexions, nous présentons les actions menées, plus particulièrement en termes de formation aux nanotechnologies.

I. les problèmes posés par les systèmes sensibles démocratisés

Au cours de ce travail de recherche, nous avons développé un système sensible à bas coût afin qu'il soit accessible au plus grand nombre. C'est ce que nous nommons la démocratisation de la technologie. Cet aspect engendre quelques interrogations quand à l'application de ces systèmes.

I.1. Le diagnostic précoce

Tout d'abord, la définition du mot diagnostic est : « la détermination d'une maladie, d'un état d'après ses symptômes et l'examen clinique du patient » (Petit Robert 2008). C'est donc une « photographie » à l'instant **présent** de l'état d'un patient. Comme nous l'avons indiqué lors de la mise en contexte et de la présentation des perspectives de nos recherches, l'une des applications est le diagnostic précoce des maladies. En effet, plus une maladie est diagnostiquée tôt, plus la probabilité de guérison est importante.

Nous ne pouvons qu'être enthousiastes à l'idée d'apporter notre aide à la bonne santé d'une population. L'interrogation concernant le diagnostic est le comportement des patients vis-à-vis de la connaissance précoce d'une maladie. Nous pouvons imaginer des réactions exacerbées allant du déni au stress. Ainsi, ce type d'avancées doit être accompagné d'une évolution du rapport entre le malade et son médecin où celui-ci doit informer mais aussi relativiser.

Ce problème n'est pas une émanation récente des nanotechnologies mais plutôt une interrogation ancienne sur le rapport entre le malade et son médecin.

I.2. Le pronostic

Comme précédemment, nous définissons ce mot comme : « le jugement que porte un médecin, après le diagnostic, sur la durée, le déroulement et l'issue d'une maladie » (Petit Robert 2008). A la différence du diagnostic qui se concentre sur l'état présent, le pronostic se veut une vision d'un futur. Il y a donc pour chaque scénario médical développé une probabilité de réalisation. La thématique de la biodétection rentre dans la problématique du pronostic lorsque l'application touche à la génomique. En effet, elle consiste à déterminer selon les gènes d'un patient quelle est la corrélation avec un état maladif ou non, le phénotype. Les maladies génétiques n'ont pas toutes une probabilité de déclenchement de 100%. Cela dépend de l'environnement dans lequel évolue le patient : est ce qu'il est en présence de produit chimique déclencheur, de rayonnement ionisant, de stress... ? Par exemple, une étude montre que l'agressivité chez les enfants a une origine génétique à 50% et environnementale (l'éducation) à 50%²²⁷. Ces études sont souvent discutées car elles font appel à des statistiques sur des échantillons avec un nombre de personnes faible. Par contre, leurs conclusions peuvent susciter des interrogations vis-à-vis de parents lorsqu'elle touche au comportement d'enfant comme dans l'exemple cité, ou de personnes qui apprennent qu'elles ont une probabilité non négligeable de déclencher une maladie. Il peut y avoir un apport de ces technologies dans le sens où l'origine d'une maladie est identifiée est donc plus facilement traitée, mais aussi une dérive dans le sens de perturbations des relations intrafamiliales (rejet d'enfants dans notre exemple), ou psychologiques du patient. Nous retrouvons le problème cité dans le thème du diagnostic concernant la connaissance précoce d'une maladie et la relation patient/médecin. Ceci est d'autant plus vrai que dans le cas du pronostic, il y a aucune certitude mais plutôt des probabilités.

I.3. L'eugénisme

Le terme eugénisme provient du grec : *eu* (« bien ») et *gennân* (« engendrer »), ce qui signifie littéralement « bien naître ». Le concept d'eugénisme, développé principalement par

²²⁷ <http://www.uqam.ca/entrevues/2007/e2007-001.htm>

F.Galton, consiste à considérer que le mécanisme de sélection naturelle est affaibli par des comportements humanistes visant à s'occuper des personnes présentant des déficiences. Ainsi, il préconise une mise en place de systèmes permettant une compensation et un retour à une sélection.

La plus connue d'entre elles, est celle des nouveau-nés. En effet, nous pouvons citer le cas de Sparte qui, dans l'Antiquité, sélectionnait ses nouveau-nés qui étaient considérés comme malades ou faibles. Le but des spartiates était de ne sélectionner que les « forts ». Actuellement, des tests ADN sont prélevés sur des fœtus afin de dépister des maladies génétiques graves et laisser le choix aux parents de garder ou non leur enfant. Nous pouvons alors nous poser la question de l'apport des technologies de biodétection sensibles et démocratisées sur ces tests. Une dérive eugéniste peut apparaître par les progrès technologiques dans le sens où si la cartographie génétique du fœtus, facilitée par ces technologies, ne convient pas aux parents (sexe, couleurs des yeux, ...) alors ceux-ci auraient la possibilité de ne pas mettre un terme à la grossesse.

I.4. Les libertés individuelles

Nous avons remarqué lors de la présentation des problèmes liés au pronostic que ceux-ci sont principalement liés aux relations patient/médecin. Il y a donc une information intime sur le patient qui est partagée avec le médecin. Or, nous pouvons nous demander quelles seraient les conséquences d'une divulgation de ces informations à des tiers. Nous pouvons citer comme exemple : les banques lors d'un prêt, les assurances,... Ainsi des problèmes de libertés individuelles concernant la divulgation d'un état de santé présent et futur sont soulevés. De plus, la démocratisation des systèmes de biodétection et donc leur possible facilité d'accès peuvent amener des dérives concernant l'embauche. Un recruteur pourrait demander à un futur employé de se soumettre à un test génétique qui serait une cause de refus d'embauche.

De tous ces exemples, nous observons que beaucoup de problèmes surgissent suite à de possible dérives. De plus, nous remarquons que dans la plupart des situations, les dérives sont dues à un manque de distinction entre guérir et améliorer l'humain. La guérison est un mécanisme qui cherche à permettre au corps humain à retrouver son état naturel perfectible. L'amélioration tend à dépasser cet état naturel selon des critères postulés par l'homme qui sont relatifs à une période de l'histoire, un contexte sociétal précis et donc fluctuant.

On peut alors se demander : « et le chercheur dans tout cela, quel est son rôle, quel éthique ? »

II l'éthique des nano(bio)technologie

Après avoir soulevé certains problèmes éthiques provenant de l'application des technologies développées, nous nous proposons de traiter la question de l'éthique. Pour cela, nous présenterons quelle démarche éthique peut être proposée aux chercheurs travaillant sur ce domaine.

II.1. La démarche scientifique

Il est communément admis que l'approche technique des nanotechnologies est en réalité double. En effet, ces deux méthodologies scientifiques sont nommées top-down ou bottom-up et sont historiquement reliées respectivement à la physique pour la première et à la chimie pour la seconde. Top-down signifie : « de haut en bas » et consiste à partir d'un système macroscopique pour le réduire jusqu'à l'échelle nanométrique. A contrario, bottom-up traduit par « de bas en haut » consiste à assembler des objets nanométriques voire sub nanométriques (des atomes) afin de générer des objets macroscopiques. Dans chacun de ces systèmes, l'échelle nanométrique permet de faire ressortir des propriétés physiques intéressantes pour des applications. Cette classification est intéressante mais très catégorique. En effet, le tamponnage moléculaire présenté dans ces travaux de doctorat utilise une approche top-down lors de la réalisation du timbre de PDMS (nous partons d'un wafer de silicium qui est structuré, sculpté à l'échelle nanométrique) et une approche bottom-up lors du tamponnage.

Certains scientifiques se font l'écho d'une révolution des nanotechnologies. Leur analyse est la suivante. Les systèmes provenant de l'approche top-down ont une résolution de plus en plus réduite qui atteint la dimension des assemblages générés par l'approche bottom-up. Ces deux approches convergent, ainsi que les disciplines scientifiques qui les soutiennent. Ces disciplines sont alors considérées comme :

1. les biotechnologies : le vivant se structure à l'échelle nanométrique (bottom-up)
2. les sciences de l'information et de la communication (top-down)

3. les sciences cognitives : les neurosciences et l'intelligence artificielle ont des postulats proches de ceux du vivant²²⁸

Cette convergence, représentée sur la est alors qualifiée de NBIC (NanoBioInfoCognitive).

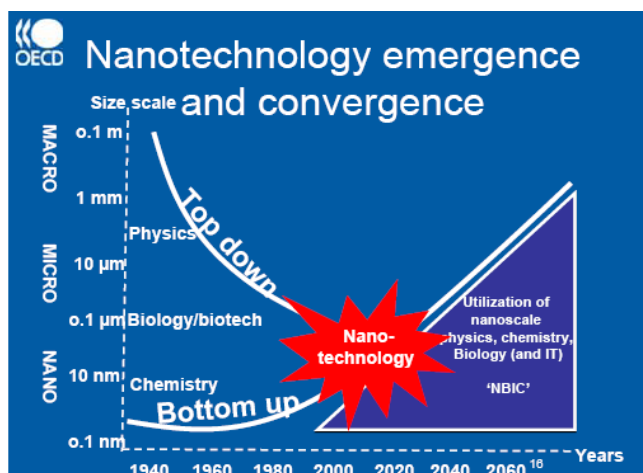


Figure 173 : schéma représentant la convergence NBIC par les dimensions des structures réalisées avec les deux approches top-down et bottom-up (source OCDE).

Il est à noter que les approches convergent mais que les applications divergent et donc les champs d'études des disciplines respectives.

Un courant de pensée lobbyiste s'est développé sous le nom de transhumanisme²²⁹. Il postule que la convergence NBIC amènera des progrès techniques sur l'homme qui va passer à une nouvelle étape de l'évolution nommé le post-humain. Les prochains systèmes technologiques doivent devenir anthropomorphique c'est-à-dire s'inscrivant dans la nature même de l'homme. Cette mouvance est très proche de milieu politique puisque M.Roco, l'un de ses fondateurs, est à l'initiative du rapport pour l'initiative NNI américaine. Ce courant de pensée s'inscrit dans la notion cybernétique qui efface la frontière entre le naturel et l'artificiel. L'idée des transhumanistes n'est plus d'améliorer l'homme par l'éducation ou la structure de la société (l'humanisme) mais par la technique. Elle ne servirait plus alors à guérir mais plutôt à améliorer l'homme. Ceci pose des problèmes éthiques majeurs de liberté individuel du post-humain de part sa dépendance à la technologie mais aussi d'accès à la technologie créant alors une sélection non plus naturelle (Darwin) mais plutôt artificielle.²³⁰

Pour ma part, je me classe éthiquement dans les humanistes progressistes. Je pense que le progrès scientifique au lieu de priver des libertés individuelles en rendant dépendant de la technologie doit au contraire en créer.

²²⁸ p13 avis enjeux éthiques des nanosciences et nanotechnologies COMETS 12/10/2006

²²⁹ www.transhumanism.org

²³⁰ http://www.vivantinfo.com/uploads/media/Nanotechnologies_transhumanisme.pdf

II.2. La gouvernance scientifique

Après avoir soulevé le problème de la convergence NBIC, nous présentons ici quelques idées sur la gouvernance scientifique donnant le cadre technique et sociétal dans lequel doit évoluer un chercheur.

- Les rapports entre scientifiques

La question de la gouvernance entre scientifique revient à se demander quelle doit être la charte de bonne conduite des scientifiques. Des code de conduite sont développés par plusieurs institution publiques ou privées telles que : BASF corp., le récent (février 2008)code européen de recherche et développement²³¹, le « nanodialog » allemand²³², le « Responsible Nano Code » anglais²³³,

Il est important que les scientifiques soient d'accord sur des terminologies, des méthodes de recherches permettant à chaque pays de se développer sans mettre en danger les populations d'un point de vue sanitaire et environnementale mais aussi sociale. En effet, les signaux envoyés à une population lorsque les scientifiques ne sont pas d'accord sont négatifs et entraînent une peur de la technologie (*Figure 174*).



Figure 174 : dessin représentant les divisions de la communauté scientifique sur un problème de société ayant un impact direct sur la population. Traduction : « La communauté scientifique est divisée. Certains disent que c'est dangereux, d'autres non. »

²³¹ http://ec.europa.eu/research/science-society/document_library/pdf_06/nanocode-recommendation-pe0894c08424_fr.pdf

²³² <http://www.bmu.de/english/nanotechnology/nanodialog/doc/40549.php>

²³³ <http://www.responsiblenanocode.org/>

- Les rapports entre scientifiques et politiques

Le financement de la recherche est en majorité public. C'est donc le politique qui finance le chercheur. Doit-il s'ingérer dans le choix thématiques du scientifique ? Si oui dans quelle mesure et sur quelle base ?

L'économie peut être un des facteurs d'intervention. Nous le voyons très nettement lorsque le gouvernement américain crée la NNI, il oriente les recherches vers la thématiques des nanotechnologies avec pour raisons le développement économique du pays.

L'éthique est aussi un autre facteur à prendre en compte. Nous le constatons par exemple par les lois sur la bioéthique qui interdit le clonage reproductif et thérapeutique.

Le politique est un représentant du peuple qui doit gérer une ville, une région, une nation. Il est un intermédiaire entre le citoyen et le scientifique. C'est pourquoi nous allons plutôt nous attacher à présenter les rapports entre le citoyen et le chercheur en incluant le rôle du politique.

- Les rapports avec les citoyens

Les nanotechnologies et leur application ont pour vocation d'être utiles aux citoyens. Il doit donc pouvoir se déterminer vis-à-vis d'une technologie et de ses apports. C'est pourquoi le rapport entre le scientifique et le citoyen est primordiale. Nous pouvons alors proposer quel plus pertinemment le rôle du chercheur dans la société en lui rajoutant à sa fonction de développement de connaissance et de technologies, un transfert de son savoir à la population. Ce transfert peut avoir plusieurs formes allant de la vulgarisation afin de ne présenter que les principes généraux d'une thématique à la formation. Ainsi, le paragraphe 1 de ce chapitre rentre dans cette démarche où différentes populations de la société sont sensibilisées voire formées aux nanotechnologies.

Nous remarquons de plus en plus au sein de la société que le scientifique est considéré comme un expert qui affirme si une technologie est bonne ou pas. Certains en profitent car cette posture permet une flatterie de l'égo et une exaltation d'une supériorité intellectuelle. D'autres s'inscrivent dans une démarche d'alerte du citoyen en informant, e vulgarisant. Cette démarche s'inscrit dans une vision démocratique du rapport entre le scientifique et le citoyen dans le sens propre du terme où le peuple a le pouvoir de décider de sa destinée. Citons le cas de l'appel aux scientifiques fait par le MURS (Mouvement Universel de la Responsabilité

Scientifique) ou de « nanojury »²³⁴ en Angleterre. Deux approches fortes intéressantes sont abordées simultanément : top-down où le pouvoir politique suscite l'avis du peuple sur des sujets qu'il choisit et bottom-up où c'est le peuple qui se saisit d'un domaine et le propose au pouvoir en place. Le terme qualificatif est alors de démarche mutualiste dans le sens où chacun apporte une sensibilité, une approche des problèmes posés par les nanotechnologies.

L'un des initiateurs du mouvement transhumaniste, à l'origine du rapport lançant aux Etats-Unis l'initiative NNI décrites précédemment, s'est affiché récemment pour une approche exclusivement bottom-up²³⁵. Les créateurs des « nanojury » font valoir le fait que l'approche purement bottom-up peut conduire le pouvoir politique à ne pas suivre les avis de jury citoyen.

Nous pouvons nous demander encore : où se place le scientifique dans ce type de « nanojury » ? Dans le jury ou en-dehors ? Le problème est identique à celui des historiens. En effet, un historien est dans l'histoire dans le sens où il est influencé par le cours des choses. De même, pour le scientifique, il peut être considéré comme un expert en sachant qu'il est dans une mouvance, une métaphysique consciente ou non et donc que son discours est biaisé. De plus, le scientifique est aussi un citoyen qui a un droit de participation à ce type d'initiative.

Je pense que ce type de « nanojury » serait intéressant en France en y ajoutant quelques précautions. La première d'entre elles est la place du scientifique qui doit être considéré comme un éclairage de la situation et des perspectives scientifiques. La seconde concerne le réel caractère mutualiste qui préconise non seulement une part proactive²³⁶ des citoyens mais aussi du pouvoir politique.

Je pense enfin que le projet transhumaniste doit être présenté sous différents éclairages à la population sous forme de nanojury ou initiatives équivalentes entraînant un positionnement politique. En effet, le problème soulevé est proche de celui des OGM (organismes génétiquement modifiés) qui mènent une dépendance technologique des agriculteurs à un monopôle privé. Le débat entre citoyens et politiques n'a pas été structuré et amène à des mouvements radicaux.

Finalement, pour qu'un débat public puisse s'instaurer, il convient d'éduquer correctement ses participants, dans notre cas des citoyens. Ces débats relatifs à des choix technologiques et donc à des choix de société nécessitent donc en amont de revitaliser

²³⁴ www.nanojury.org.uk

²³⁵ Global Governance of Converging Technologies, MC Roco, J. Nanoparticle Research (2007)

²³⁶ <http://www.cnrs.fr/fr/presentation/ethique/comets/index.htm>

l'éducation et la culture scientifique des citoyens. Former les jeunes lycéens devient dès lors un besoin crucial. Au cours de ma thèse, je me suis donc investi dans ce type de projet visant à exposer les nanotechnologies à un public de lycéens de Terminale S.

III. la formation aux nanotechnologies : le projet « nano au lycée »

Dans ce paragraphe, nous montrons le travail réalisé concernant la formation, l'éducation aux nanotechnologies et plus généralement la recherche.

La formation du citoyen aux nanotechnologies est une condition sine qua none de son interaction avec les scientifiques. C'est pourquoi le projet « nano au lycée », débuté en 2006, se veut être une formation de lycéens de Terminales Scientifique aux nanotechnologies appliquées à la biologie. Il rassemble des professeurs du lycée Saint-Sernin de Toulouse, des chercheurs (doctorants, post-doctorants, chercheurs, ...) du groupe NanoBioSystèmes du laboratoire LAAS-CNRS et du GRIDIFE²³⁷.

Le premier enjeu de ce projet est de présenter à ces lycéens, les disciplines scientifiques sous un aspect nouveau et attractif pour mobiliser leur intérêt dans ce secteur. Les Nanotechnologies, domaine scientifique en plein essor, apparaissent comme un support adéquat permettant de répondre à cet objectif. Le second enjeu est de contribuer à la féminisation des carrières scientifiques. De plus, la variété et le dynamisme du pôle de recherche Toulousain associés à divers secteurs d'applications des Nanotechnologies (Pôle de compétitivité, Cancer-Bio-Santé, Aéronautique-Espace, Cancéropole) fondent le choix de cette thématique.

Les élèves participant à ce projet peuvent observer et mener des expériences à l'échelle moléculaire, comprendre les propriétés nouvelles de la matière liées à cette réduction des dimensions dans le but d'applications spécifiques, impliquant les outils mathématiques, physiques et chimiques ainsi que la biologie. L'interdisciplinarité est un des fondements de ce projet qui a mobilisé la collaboration des enseignants de mathématiques, de physique-chimie et de biologie dans un premier temps, rejoints par les enseignants d'anglais et de philosophie. Les publications scientifiques majoritairement en langue anglaise ont offert la possibilité aux enseignants de cette langue de participer à l'expérimentation. Il en est de même des enseignants de philosophie qui soutiennent une réflexion sur les questions éthiques posées par l'essor des Nanotechnologies.

²³⁷ Groupe de Recherche Interdisciplinaire en Didactique pour le Français en Education, IUFM de Toulouse

Ce nouveau savoir que l'on souhaite transmettre aux élèves doit s'intégrer avec les savoirs scolaires existants et enseignés en Terminale Scientifique et ce, dans les disciplines impliquées dans le projet. Le thème retenu se rapporte au domaine d'étude du groupe NBS soit « les Nanotechnologies et la santé », plus précisément l'étude de nano systèmes pour le diagnostic médical et la réalisation de tests de dépistage sérologique. Pour cela, nous nous basons sur la thématique des travaux de ce doctorat : la nanodétection biologique sans marquage par diffraction. Ce choix est motivé par plusieurs impératifs :

- présenter les Nanotechnologies sous l'angle d'une réalisation concrète, dans la mesure où ils apparaissent souvent comme un domaine vaste, mal défini et abstrait,
- immerger les lycéens dans le laboratoire de recherche pendant une journée en s'appuyant sur une séance de travaux pratiques guidés par les doctorants et post-doctorants sur leur propre thématique de recherche,
- mobiliser des concepts scientifiques inscrits au programme de la terminale S sur le thème des Nanotechnologies : références à la physique (diffraction), à la chimie (matériaux polymères), à la biologie (reconnaissance antigène anticorps) et aux mathématiques (étude du signal issu du détecteur).

Etant donné mes travaux de simulation et d'étude de la biodétection par diffraction, présentée dans ce manuscrit, je me suis attaché à créer les cours de physique et de mathématiques. J'ai donc réalisé un travail de transposition didactique de mon sujet de doctorat afin de former ces lycéens aux nanobiotechnologies par le biais de cours et travaux pratiques au laboratoire.

Ces travaux pratiques (TP) mis en place dans le cadre du lycée St Sernin ont également servi de base à la mise en place de TP pour une école d'été Européenne PANAMA²³⁸, dans le cadre du projet Européen NAPA²³⁹ et d'un atelier de formation du CNRS sur les nanotechnologies destinés aux ingénieurs et Techniciens du CNRS²⁴⁰²⁴¹.

Pour résumer, nous avons montré dans ce paragraphe qu'une réflexion sur les implications et le contexte sociétal de nos recherches est nécessaire. Il en découle une nécessaire formation du citoyen à ces technologies ce qui nous a amené à participer au projet « nano au lycée ».

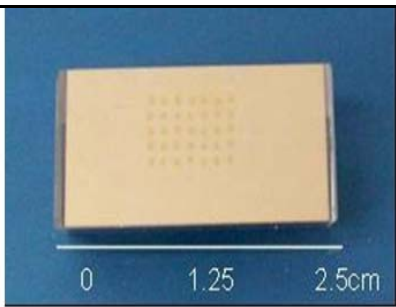
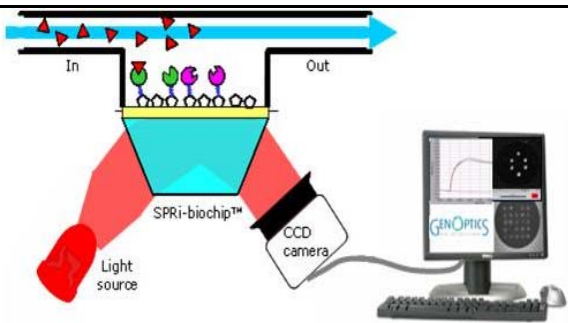
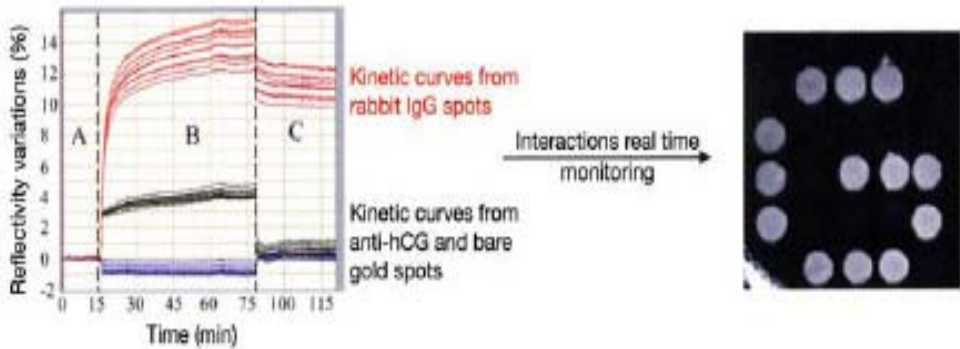
²³⁸ <http://www.phantomsnet.net/DocsHand/Panama%20Summer%20Schools.pdf>

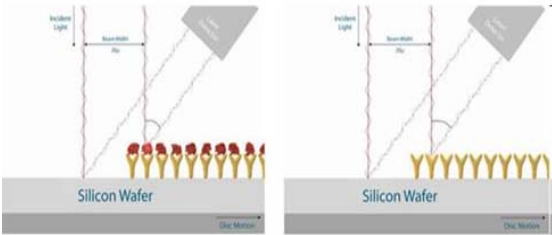
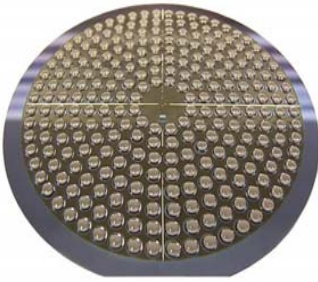
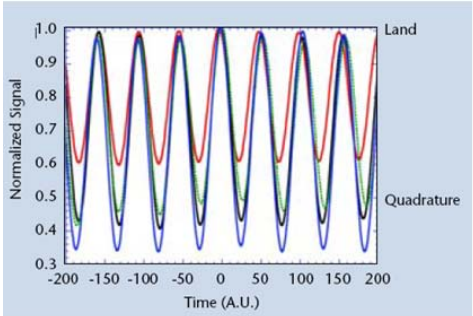
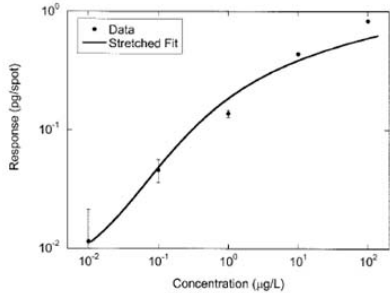
²³⁹ <http://www.phantomsnet.net/napa/index.php>

²⁴⁰ <http://www.laas.fr/laas/files/NANO/Atelier-des-Nanotechnologies-2007.mp4>

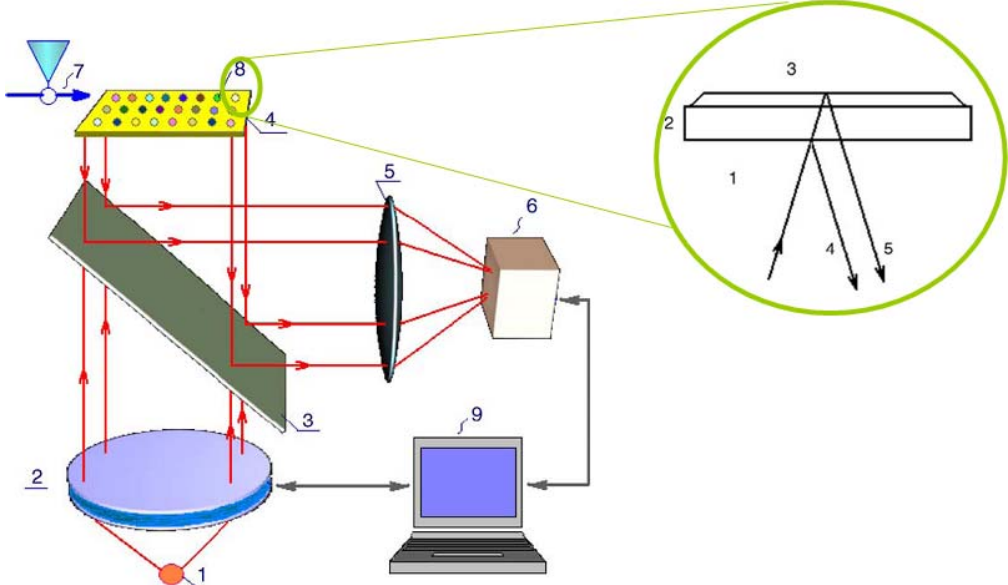
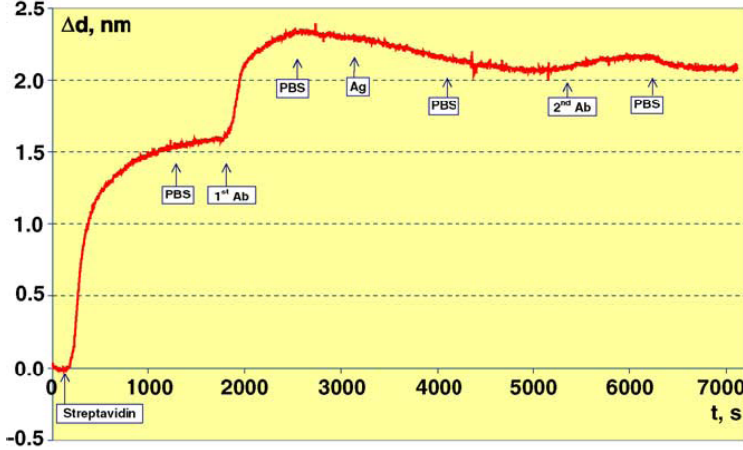
²⁴¹ <http://www.laas.fr/Atelier-Nano-2007>

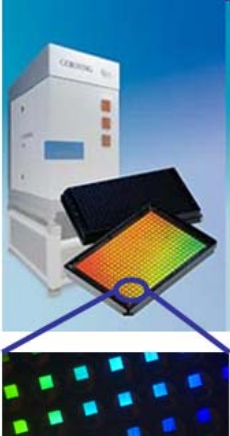
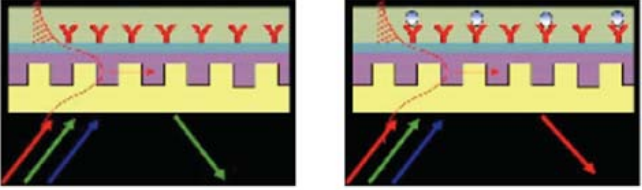
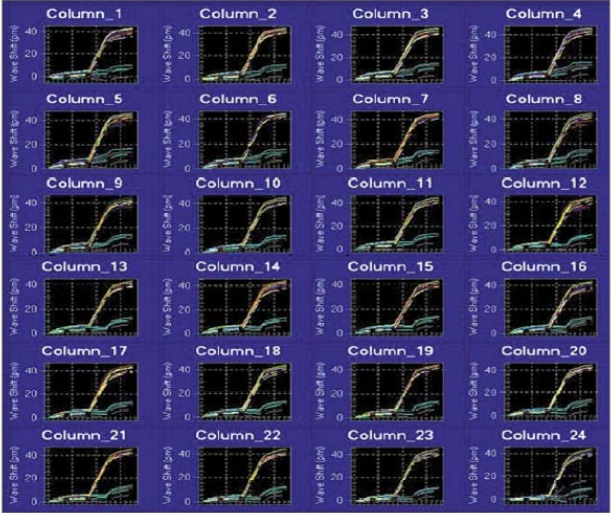
ANNEXE I : Fiches détaillant les biopuces optiques sans marquage existantes

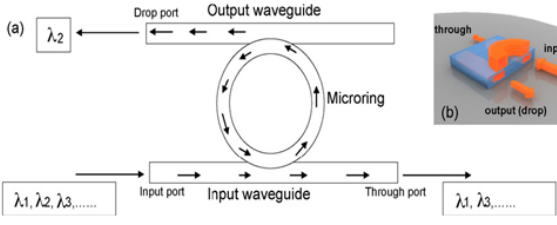
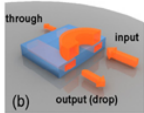
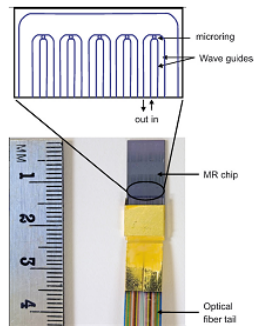
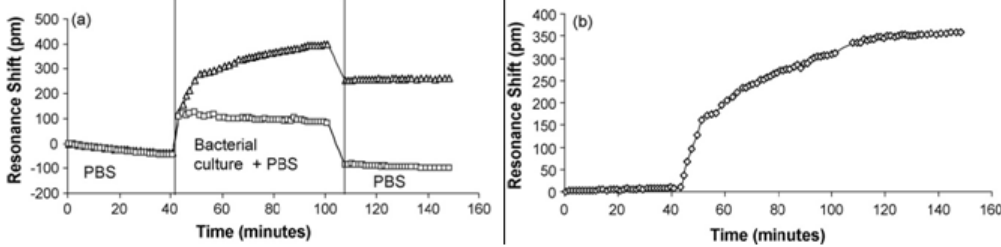
système	Imagerie de la résonance des plasmons de surface (SPRi)
dispositif	  Puce utilisée pour l'imagerie SPR Dispositif utilisé
Résultats type	
commentaires	L'imagerie de la résonance plasmon de surface est une technique versatile qui permet d'étudier un grand nombre d'interactions biologiques différentes en temps réel (mode biocapteur) ou non (mode biopuce)
références	www.genoptics-spr.com P. Lecaruyer et al. / Analytica Chimica Acta 573–574 (2006) 333–340

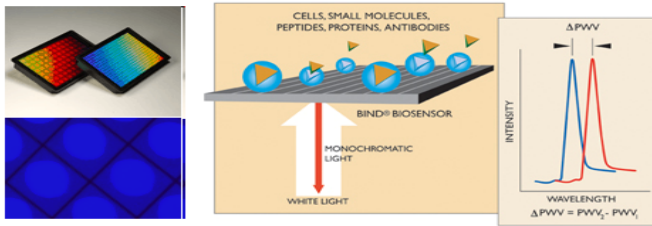
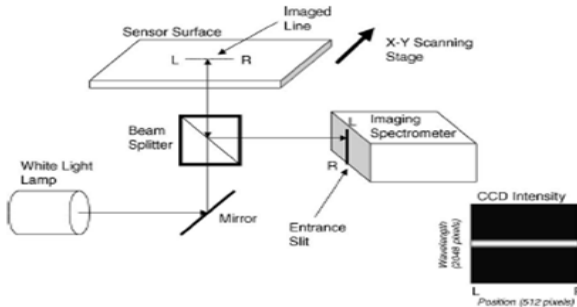
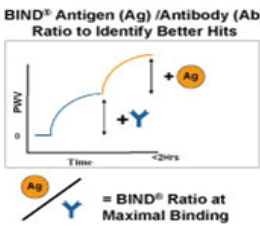
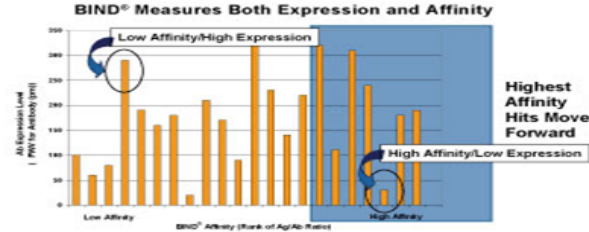
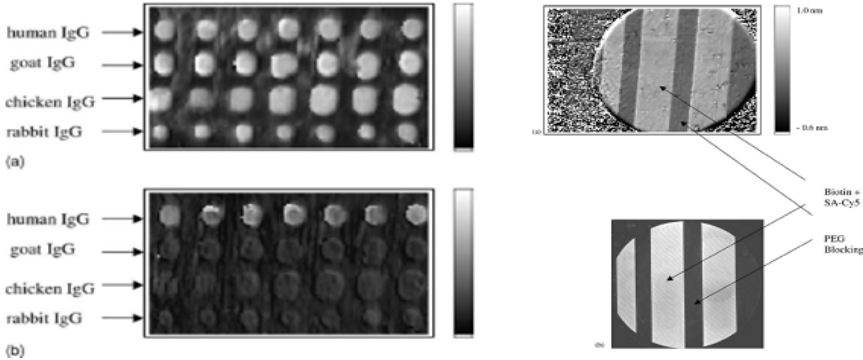
système	Le bioCD : une détection rotative biologique au format d'un disque (SDI™)
dispositif	  Principe de la détection Disque composé de puits
Résultats type	  Signal mesuré au cours du temps en rotation Réponse du biodétecteur dans la cas d'une interaction anticorps/antigène pour différentes concentrations
commentaires	Ce détecteur est basé sur l'interférence entre un dépôt de biomolécules et le substrat.
références	http://www.quadraspec.com Nolte et al., Optics & Photonics News October 2004 Zhao et al. <i>Clinical Chemistry</i> 52, No. 11, 2006 2139

système	L'imagerie par effet SERS
dispositif	
Résultats type	
commentaires	Un spectre Raman est réalisé pour chaque point sollicité. Le résultat est un ensemble de courbe. Il est ensuite possible de visualiser une image d'intensité de certains pics représentatifs de biomolécules
références	A.E. Grow et al. / Journal of Microbiological Methods 53 (2003) 221–233

systeme	L'imagerie par réflectométrie : le système picoscope
dispositif	
Résultats type	
commentaires	Les biomolécules à détecter sont sur une simple lame de microscope (8). Une image en réflectométrie de la lame est réalisée grâce à une cavité de Fabry-Pérot dont la longueur est ajustable (2).
références	<i>P.I. Nikitin et al. / Sensors and Actuators B 111–112 (2005) 500–504</i>

système	La détection dans des microplaques par résonance d'un guide d'onde : EPIC®	
dispositif		 Sans ajout d'analyte Avec ajout d'analyte => Décalage de la longueur d'onde de résonance
Résultats type		
commentaires	Les guides d'onde résonants sont intégrés dans les puits. Cette technique permet d'acquérir des signaux aussi bien en mode biocapteur qu'en mode biopuce.	
références	http://www.corning.com/lifesciences/us-canada/en/epicsystem/index.asp M. Wu et al. / FEBS Letters 580 (2006) 5681–5689	

système	L'intégration d'anneaux résonnants dans une biopuce
dispositif	 (a)  (b)  Principe de fonctionnement des anneaux résonnants Intégration des ces anneaux dans un format biopuce
Résultats type	 (a) (b)
commentaires	Ce système est miniaturisé et sensible
références	<i>A. Ramachandran et al. / Biosensors and Bioelectronics 23 (2008) 939–944</i>

systeme	La détection dans des microplaques et imagerie par cristaux photoniques
dispositif	BIND system ® : intégration de cristaux photoniques dans des microplaques  Imagerie : 
Résultats type	BIND system ® :  Imagerie :  
commentaires	Le dispositif BIND se rapproche du système Epic® alors que l'imagerie est plus proche du système de détection SPRI
références	http://www.srubiosystems.com/ P.Y. Li et al. / <i>Sensors and Actuators B</i> 99 (2004) 6–13 <i>IEEE SENSORS JOURNAL, VOL. 6, NO. 6, DECEMBER 2006</i>

ANNEXE II : Calcul complet de la puissance diffractée sur l'ordre 1

Nous savons que :

$$I_{ordre1}(u, v) = \frac{I_i}{(\lambda r_m)^2} \left\{ \left(\frac{LL_1}{p} \right)^2 [|\overline{A} - \overline{B}|^2 \sin^2(\pi l \frac{1}{P}) \sin^2(\pi L_1(u - \frac{1}{P}))] \right\} \times L_2^2 \sin^2(\pi L_2 v)$$

La puissance reçue par le capteur s'écrit rigoureusement :

$$P_1 = \int_{surface_capteur} I(u, v) \overrightarrow{dS} \cdot \frac{\overrightarrow{k}}{\|\overrightarrow{k}\|} \quad [1]$$

Nous allons donc chercher à exprimer $\overrightarrow{dS} \cdot \frac{\overrightarrow{k}}{\|\overrightarrow{k}\|}$. Pour cela, nous nous basons sur la Figure 175

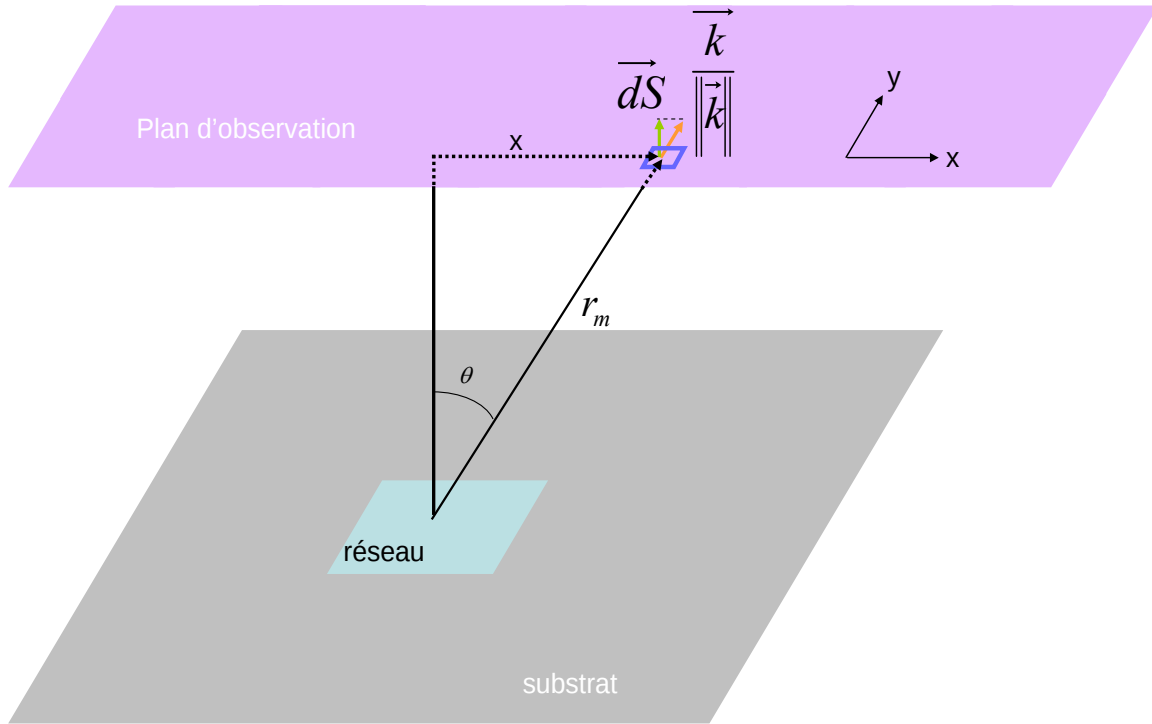


Figure 175 : schéma représentant les vecteurs utilisés dans le calcul de la puissance reçue par le capteur

Nous savons que :

$$u\lambda = \sin(\theta)$$

et géométriquement

$$\sin(\theta) = \frac{x}{r_m}$$

ainsi,

$$x = \lambda r_m u \quad [1]$$

De même,

$$y = \lambda r_m v \quad [2]$$

Etant donné que le réseau n'a qu'une seule dimension, nous considérerons que le vecteur $\frac{\vec{k}}{\|\vec{k}\|}$

n'a de composantes que suivant l'axe des x.

Ainsi,

$$\vec{dS} \cdot \frac{\vec{k}}{\|\vec{k}\|} = dS \cos(\theta)$$

Or, $dS = dx \times dy$.

D'après [1] et [2], nous avons :

$$dx = \lambda r_m du$$

$$dy = \lambda r_m dv$$

$$\text{Ainsi, } dS = (\lambda r_m)^2 dudv$$

Donc, $\vec{dS} \cdot \frac{\vec{k}}{\|\vec{k}\|}$ devient $(\lambda r_m)^2 \cos(\theta) dudv$ et lorsque nous injectons cette équation dans [1],

nous avons :

$$P_1 = (\lambda r_m)^2 \int_{\text{surface}_{\text{capteur}}} I(u, v) \cos(\theta) dudv$$

Or,

$$I_{\text{ordre1}}(u, v) = \frac{I_i}{(\lambda r_m)^2} \left\{ \left(\frac{LL_1}{p} \right)^2 [|\overline{A} - \overline{B}|^2 \sin^2(\pi l \frac{1}{P}) \sin^2(\pi L_1(u - \frac{1}{P}))] \right\} \times L_2^2 \sin^2(\pi L_2 v)$$

Donc,

$$P_1 = \int_{surface_capteur} \left\{ \left(\frac{LL_1}{P} \right)^2 \left[|\overline{A} - \overline{B}|^2 \sin^2 \left(\pi L \frac{1}{P} \right) \sin^2 \left(\pi L_1 \left(u - \frac{1}{P} \right) \right) \right] \right\} \times L_2^2 \sin^2(\pi L_2 v) \cos(\theta) dudv$$

Nous considérerons que θ varie peu lors de l'intégration sur l'ordre 1.

$$P_1 = \left(\frac{LL_1}{P} \right)^2 L_2^2 |\overline{A} - \overline{B}|^2 \sin^2 \left(\pi L \frac{1}{P} \right) \cos(\theta) \int_{surface_capteur} \sin^2 \left(\pi L_1 \left(u - \frac{1}{P} \right) \right) \times \sin^2(\pi L_2 v) dudv$$

comme $\int_{dimension_selon_x_capteur} L \sin^2(\pi Lu) du = 1$ et $\int_{dimension_selon_y_capteur} L \sin^2(\pi Lv) dv = 1$, nous avons :

$$P_1 = \left(\frac{LL_1}{P} \right)^2 L_2^2 |\overline{A} - \overline{B}|^2 \sin^2 \left(\pi L \frac{1}{P} \right) \cos(\theta)$$

ANNEXE III : Etude de l'origine de la puissance diffractée

Dans la plupart des cas, deux qualificatifs sont associés aux réseaux. On parle de réseau à contraste de phase lorsqu'aucun relief n'est présent. Ainsi, le réseau introduit seulement une différence de phase entre les ondes lumineuses émises par les lignes et les creux (Figure 176.a). De même, un réseau est dit à contraste d'amplitude si le réseau induit une différence d'amplitude entre les ondes émises par les lignes et les creux (Figure 176.b).

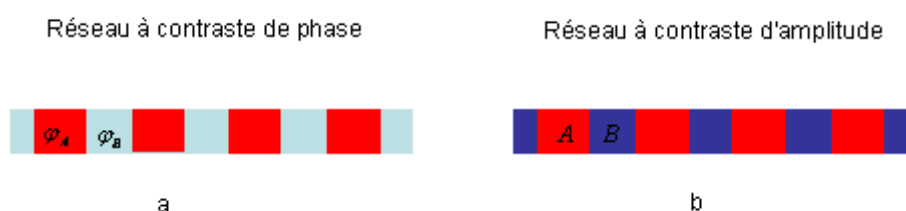


Figure 176 les deux types de réseaux.

- a. un réseau à contraste de phase : une différence de phase existe entre les lignes et les creux
- b. un réseau à contraste d'amplitude : une différence d'amplitude existe entre les lignes et les creux

Prenons le cas où le réseau est composé d'un même matériau réfléchissant texturé en ligne (Figure 177.a). Les phénomènes de diffraction et d'interférence ont lieu car l'onde 2 est en retard (donc il y a un déphasage) par rapport à l'onde 1 au niveau du plan supérieur π . Les amplitudes de ces 2 ondes lumineuses sont identiques. Ainsi, le réseau est un réseau à contraste de phase.

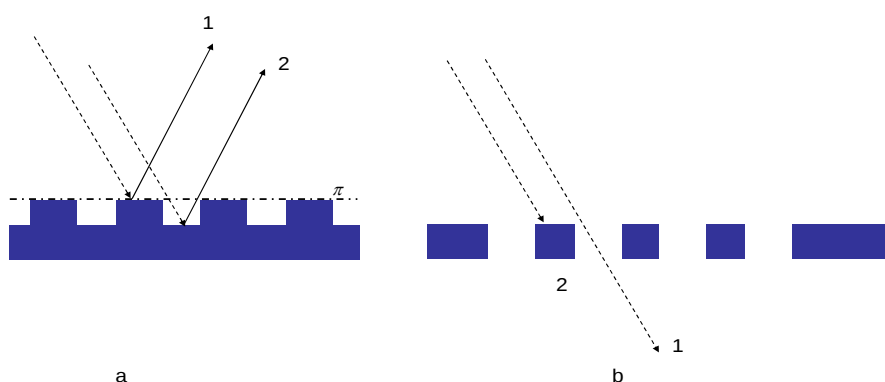


Figure 177 : exemples de réseaux à contraste :

- a. de phase (en réflexion)
- b. d'amplitude (en transmission)

Un autre cas consiste à considérer des fentes dans un matériau opaque (Figure 177.b). Les phénomènes de diffraction et d'interférence sont dus à la différence d'amplitudes entre les deux ondes 1 et 2 sortant de la face inférieure.

Comme nous l'avons déjà mentionné, dans notre cas, les différences de phase et d'amplitude interviennent. Pour analyser les contributions, écrivons l'émission des lignes ($\bar{A}$) et des creux ($\bar{B}$) sous forme d'exponentielle complexe :

$$\begin{aligned}\bar{A} &= A \exp(i\varphi_A) \\ \bar{B} &= B \exp(i\varphi_B)\end{aligned}$$

De plus, nous définissons le déphasage $\Delta\varphi$ et la différence d'amplitude $\Delta\alpha$ comme :

$$\begin{aligned}\Delta\varphi &= \varphi_A - \varphi_B \\ \Delta\alpha &= A - B\end{aligned}$$

Nous avons exprimé précédemment le rapport des puissances de l'ordre 1 et du faisceau incident comme :

$$\frac{P_1}{P_i} = \frac{L_1 L_2}{S_{\text{faisceau laser}}} \left(\frac{1}{p} \right)^2 \left| l(\bar{A} - \bar{B}) \sin c \left(\pi l \frac{1}{p} \right) \right|^2 \cos(\theta_1) \text{ avec } \cos(\theta_1) = \cos(\arcsin(\frac{\lambda}{p}))$$

Il est possible de réécrire cette équation suivant :

$\frac{P_1}{P_i} = f(L_1, L_2, S_{\text{laser}}, l, p) \times |(\bar{A} - \bar{B})|^2$ où $f(L_1, L_2, S_{\text{laser}}, l, p)$ est une fonction dépendante uniquement de la largeur des lignes et de la période qui n'affecte donc pas les variables $\bar{A}$ et $\bar{B}$.

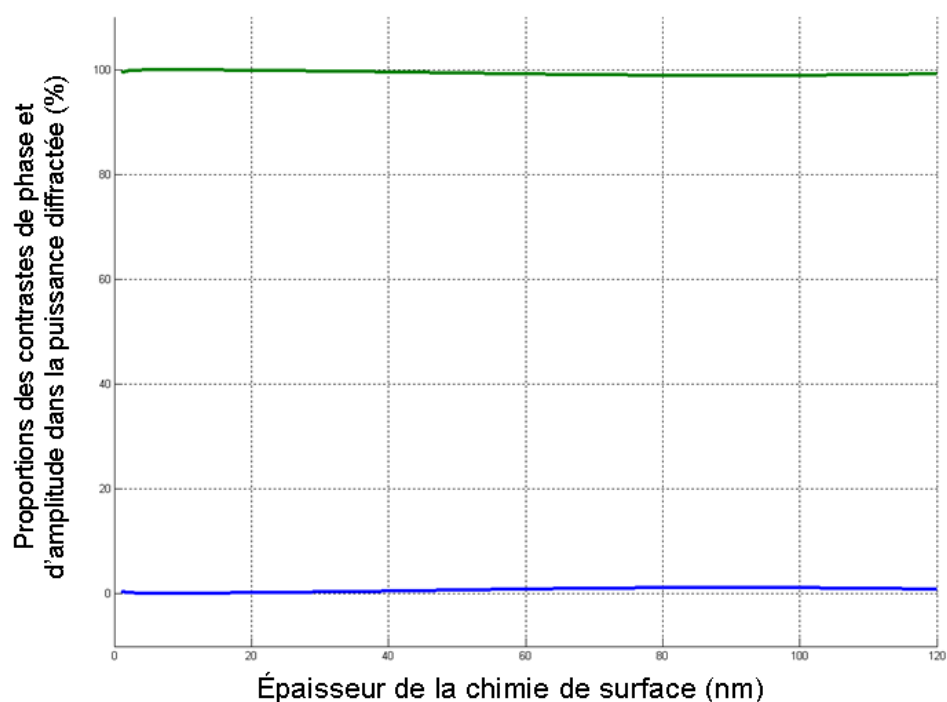
Nous avons alors :

$$\frac{P_1}{P_i} = f(L_1, L_2, S_{\text{laser}}, l, p) \times \left[(A - B)^2 + 2AB(1 - \cos(\Delta\varphi)) \right]$$

Etant donné qu'un réseau de phase a une puissance diffractée de la forme : $P_{\Delta\varphi} = 2AB(1 - \cos(\Delta\varphi))$ et un réseau d'amplitude : $P_{\Delta\alpha} = (A - B)^2$. Nous identifions alors la puissance diffractée de notre réseau comme la somme de ces 2 puissances diffractées d'amplitude et de phase.

$$\frac{P_1}{P_i} = f(L_1, L_2, S_{\text{laser}}, l, p) \times [P_{\Delta\alpha} + P_{\Delta\varphi}]$$

Par le calcul, nous pouvons en déduire les proportions dues aux contrastes de phase et d'amplitude du réseau simulé en 3.1.b composé d'une chimie de surface et de molécules sondes (Figure 178).



Longueur d'onde	633 nm	Indice du milieu	1
Angle d'incidence	0°	Indice verre	1.45
Indice de la chimie de surface	1.5	Épaisseur de la chimie de surface	De 0.5 nm à 120 nm
Rapport entre la surface du réseau et celle du laser	1		
Épaisseur des molécules sondes	10 nm	Indice des molécules sondes	De 1.05 à 1.45

Figure 178 : proportion de la puissance diffractée provenant d'une différence de phase (vert) et d'une différence d'amplitude (bleu) entre les lignes et les creux en fonction de l'épaisseur de dendrimères pour différents indice optique de biomolécules

Nous remarquons que la quasi-totalité de la puissance diffractée provient du contraste de phase ce qui s'explique par la faible émission des lignes. L'indice optique a un effet négligeable sur cette répartition d'influence entre les deux contrastes.

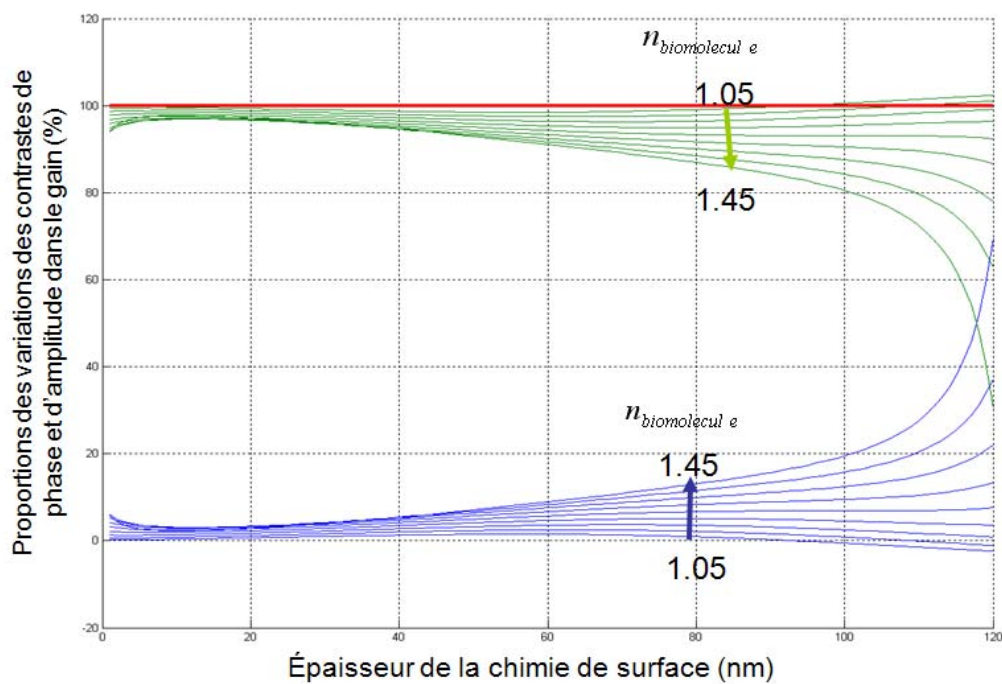
ANNEXE IV : Origines du gain

De même que pour la puissance diffractée, il est possible de déduire l'origine du gain. La question posée est donc : dans l'accroissement de puissance diffractée quelle est l'influence de la variation du contraste de phase et de celui d'amplitude ?

Pour répondre à cette question, il faut exprimer le gain absolu $\Delta\left(\frac{P_1}{P_i}\right)$ en fonction des contributions des réseaux d'amplitude et de phase. Ainsi, on peut écrire :

$$\begin{aligned}\Delta\left(\frac{P_1}{P_i}\right) &= \left[\left(\frac{P_1}{P_i}\right)_{end} - \left(\frac{P_1}{P_i}\right)_{initial} \right] \\ \Delta\left(\frac{P_1}{P_i}\right) &= f(L_1, L_2, S_{laser}, l, p) \times \left[\left[(\overline{A} - \overline{B})^2 \right]_{end} - \left[(\overline{A} - \overline{B})^2 \right]_{initial} \right] \\ \Delta\left(\frac{P_1}{P_i}\right) &= f(L_1, L_2, S_{laser}, l, p) \times \left[(P_{\Delta\alpha})_{end} - (P_{\Delta\alpha})_{initial} + (P_{\Delta\varphi})_{end} - (P_{\Delta\varphi})_{initial} \right] \\ \Delta\left(\frac{P_1}{P_i}\right) &= f(L_1, L_2, S_{laser}, l, p) \times [\Delta P_{\Delta\alpha} + \Delta P_{\Delta\varphi}] \\ \text{D'où, } G &= \frac{\Delta\left(\frac{P_1}{P_i}\right)}{\left(\frac{P_1}{P_i}\right)_{initiale}} = \frac{f(L_1, L_2, S_{laser}, l, p)}{\left(\frac{P_1}{P_i}\right)_{initiale}} \times [\Delta P_{\Delta\alpha} + \Delta P_{\Delta\varphi}]\end{aligned}$$

Où $\Delta P_{\Delta\varphi} = (P_{\Delta\varphi})_{end} - (P_{\Delta\varphi})_{initial}$ représente l'influence du réseau de phase et $\Delta P_{\Delta\alpha} = (P_{\Delta\alpha})_{end} - (P_{\Delta\alpha})_{initial}$ celui d'amplitude. En utilisant cette équation, il nous est possible de tracer, en termes de proportion du gain final, l'influence du contraste de phase et celui d'amplitude (Figure 179).



Longueur d'onde	633 nm	Indice du milieu	1
Angle d'incidence	0°	Indice verre	1.45
Indice de la chimie de surface	1.5	Épaisseur de la chimie de surface	De 0.5 nm à 120 nm
Rapport entre la surface du réseau et celle du laser	1		
Épaisseur des molécules sondes et cibles	10 nm	Indice des molécules sondes et cibles	De 1.05 à 1.45

Figure 179: origine du gain du système en fonction de l'épaisseur de dendrimères pour différents indices optiques des molécules sonde et cible. En bleu : influence du contraste d'amplitude. En vert : influence du contraste de phase

Nous constatons que la variation du contraste de phase est à l'origine de la majeure partie du gain. Ceci est d'autant plus vrai que l'épaisseur de dendrimères est faible. L'indice optique tend à infléchir cette tendance. Nous remarquons que pour des épaisseurs de dendrimères importantes (>115 nm), la tendance peut s'inverser.

ANNEXE V : Détails sur l'automatisation de la biodétection par diffraction

I. Calibration du spectromètre

Il est possible d'observer le nombre de coups que le spectromètre mesure grâce au logiciel fourni par le fabricant (logiciel spectrasuite de ocean optics).

Après une première étape permettant un positionnement peu précis de l'ensemble du dispositif, il est nécessaire d'affiner les différents paramètres. Pour cela, nous avons développé un logiciel permettant une interface entre l'utilisateur et l'ensemble de dispositif. Il est conçu dans l'optique que les utilisateurs soient des biologistes. La QCM étant un outil déjà développé pour des biologistes, nous nous sommes inspirés de l'ergonomie de son logiciel. Le notre est développé grâce au langage graphique labview.

La première opération à réaliser est la suppression du spectre sombre. En effet, si on n'injecte aucune quantité de lumière sur le spectromètre celui-ci détecte un spectre (Figure 180). Ce spectre est dû au bruit électronique présent sur les cellules de la barrette CCD. Il est composé d'une composante continue (proche de 2170 coups) et d'un bruit « blanc » typique d'un bruit électronique. Ce spectre est indépendant du temps d'intégration car il ne représente pas une quantité de lumière mesurée. Ainsi, l'interface génère un message demandant à l'utilisateur de positionner l'obturateur sur une position ne laissant passer aucune quantité de lumière (troisième position non présentée dans le paragraphe 1.1.b). Nous avons alors programmé le logiciel pour que soient réalisés l'acquisition de ce spectre et son enregistrement.

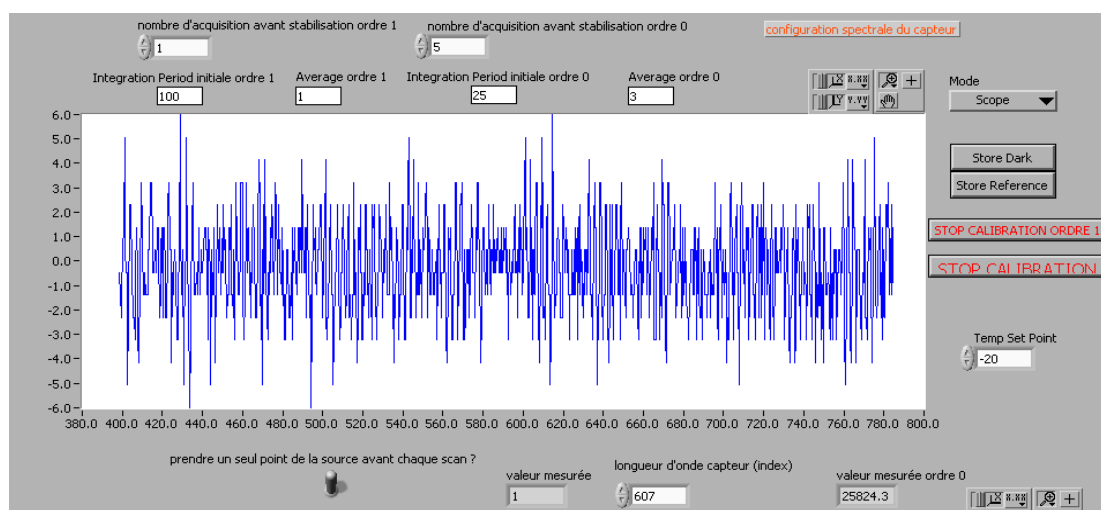


Figure 180 : bruit sombre du spectromètre

Il est important de noter que c'est la composante continue que l'on supprime, le bruit « blanc » ne peut pas être soustrait car son comportement est aléatoire. De ce fait, le maximum de quantité de lumière récupérable n'est plus 65536 coups mais plutôt proche de 63366 coups. Etant donné la très faible variation de la composante continue, il est donné à l'utilisateur la possibilité de soustraire ce spectre préenregistré.

La seconde opération consiste à définir les paramètres d'acquisition du spectromètre pour chacun des signaux. En effet, pour chacun d'eux il est possible de donner un temps d'intégration mais aussi un nombre de mesures à effectuer et à moyenner. Ainsi, nous avons programmé le logiciel (Figure 181) de telle sorte que l'ordre 1 puis le signal de référence soient injectés grâce à l'obturateur et que l'utilisateur définisse les paramètres permettant une bonne acquisition des signaux. Les critères à retenir pour réaliser une acquisition des signaux convenable sont :

1. La mesure réalisée à longueur d'onde donnée doit être au minimum de 30 coups (10 fois supérieur au bruit du spectromètre). Pour cela, il est proposé d'agir sur le temps d'intégration.
2. Cette mesure ne doit pas saturer (réduire si nécessaire le temps d'intégration).
3. Stabiliser au maximum le signal en moyennant un nombre suffisant de mesures.

L'utilisateur peut observer la valeur mesurée par le spectromètre, à une longueur qu'il définit, graphiquement ou numériquement.

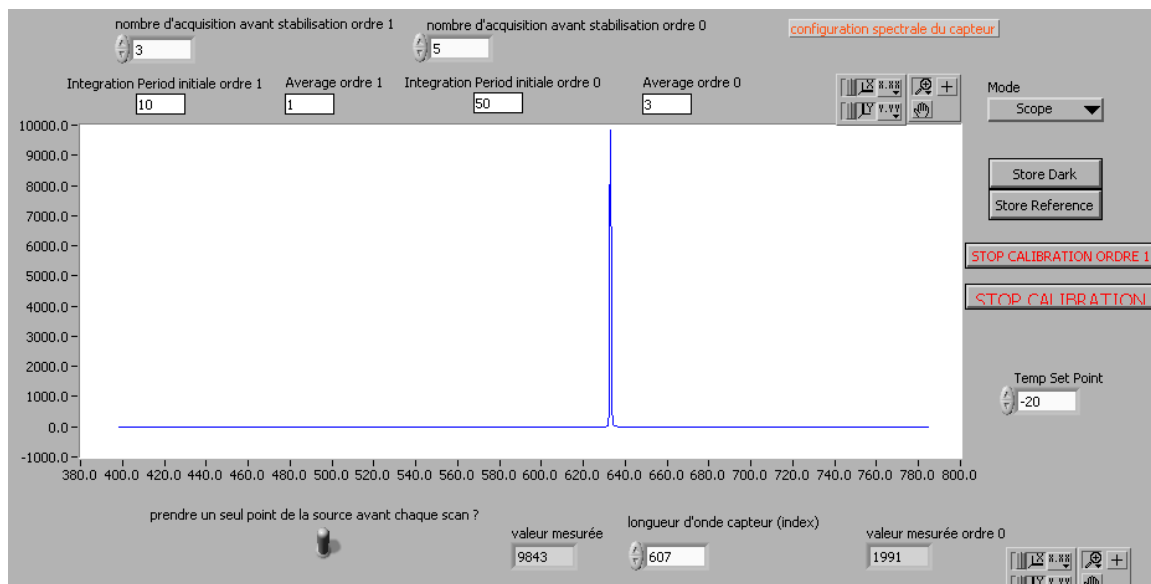


Figure 181 : partie de l'interface de la biopuce diffractante permettant de définir la configuration de l'acquisition du spectromètre optique pour le signal de référence et celui de l'ordre 1.

Nous avons observé au cours de nos différents tests que lorsque le spectromètre doit basculer d'un temps d'intégration faible (exemple 10ms) à un temps plus important (par exemple 100ms) mais aussi dans le sens inverse, le signal mesuré se stabilise au bout de quelques acquisitions. Nous attribuons ce phénomène au caractère capacitif des cellules de la barrette CCD. Pour remédier à ce problème, l'utilisateur définit un nombre d'acquisition à réaliser mais à ne pas prendre en compte. Ainsi, avant de réaliser la mesure, nous attendons que le signal se stabilise.

A la suite de ces différentes étapes, les paramètres permettant l'acquisition par le spectromètre sont définis. Les étapes suivantes vont permettre d'affiner les positions des différents éléments du dispositif.

II. Critère de bon alignement de la fibre sur l'ordre 1 et suivi dynamique du temps d'intégration

Le critère permettant de décider si l'alignement n'a pas été correctement réalisé, est la présence d'un maximum sur les extrémités de la topographie (premier alignement de la Figure 182).

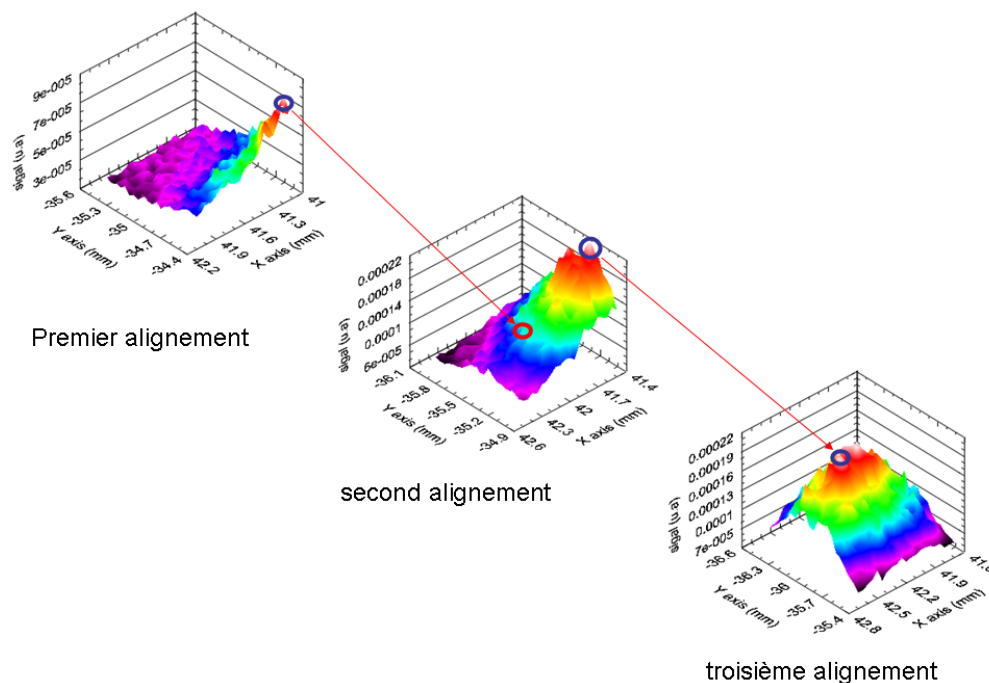


Figure 182 : évolution de la topographie optique de l'ordre 1 en fonction de différentes itérations.

Dans ce cas, la position du maximum de l'ordre 1 est en dehors de la zone sondée. L'utilisateur décide donc de réitérer l'alignement sans modification de la matrice de déplacement mais en sachant que la fibre est centrée sur le maximum détecté. A la fin de ces alignements la fibre est positionnée à la position du nouveau maximum trouvé. Un troisième alignement peut s'avérer nécessaire pour converger vers le maximum. Il est bien entendu possible pour l'utilisateur de modifier la matrice de déplacement entre chaque alignement. Le nombre de points sondés peut être un des paramètres important à augmenter afin d'élargir la zone étudiée.

Le temps d'intégration a été défini pour une position très approximative de la fibre optique sur l'ordre 1. Lors de l'alignement, la valeur mesurée va augmenter lorsque la fibre va s'approcher du point optimal. Il est alors probable que le spectromètre, ayant un temps d'intégration t_i donné, va saturer (la valeur mesurée en nombre de coups sera de 61366). Pour palier à ce problème nous avons intégré dans le logiciel un module de gestion dynamique du temps d'intégration (Figure 183). La méthode utilisée consiste à comparer la valeur mesurée à une gamme de valeurs définies par l'utilisateur et composée d'une valeur plancher et d'une valeur plafond. Si la valeur mesurée est dans cette gamme, le temps d'intégration n'est pas modifié (cas 1 de la Figure 183). Si la mesure est supérieure à la valeur plafond (cas 3 de la Figure 183), le temps d'intégration est divisé par deux. Un temps d'intégration minimal est cependant défini par l'utilisateur afin de donner une limite lors de cette réduction de t_i . De même, l'utilisateur a défini la valeur « plancher » au-dessous de laquelle le temps d'intégration est multiplié par deux, ainsi qu'un temps d'intégration maximal. Celui-ci permet de limiter le temps d'acquisition qui pourrait devenir très important.

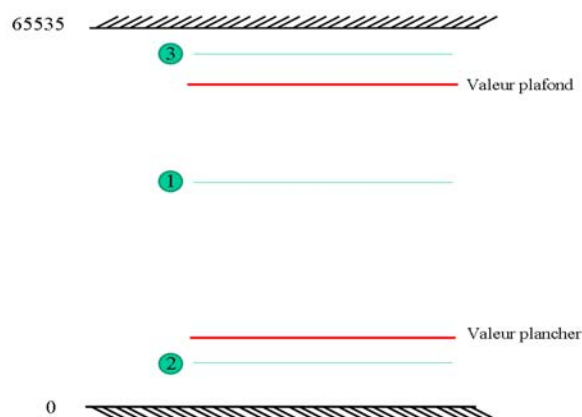


Figure 183 : schéma de principe du suivi dynamique du temps d'intégration du spectromètre

III. Les différentes stratégies d'alignement du laser sur le substrat et de la fibre sur l'ordre 1

Un déplacement selon l'axe Oy : Δy engendre une translation de l'ordre 1 selon l'axe Oy de $\Delta y_{\text{capteur}} = \Delta y$. De même, une différence entre les positions réelle et idéale selon l'axe de Ox : Δx déplace l'ordre 1 selon l'axe Oz de la quantité : $\Delta z_{\text{capteur}} = -\tan(60^\circ) \times \Delta x = -1.7 \times \Delta x$ (Figure 184).

Afin de positionner correctement le réseau, la stratégie la plus rigoureuse consiste à réaliser pour chaque point du réseau une recherche de l'ordre 1. Ceci implique que si l'on souhaite acquérir la topographie d'un réseau selon une matrice de N_c colonnes et N_l lignes et sonder l'ordre 1 selon une matrice de N_{c1} colonnes et N_{l1} lignes le nombre total d'acquisition est de $N_c \times N_l \times N_{c1} \times N_{l1}$. Si nous considérons que $N_c = N_l = N_{c1} = N_{l1} = N$ le nombre total d'acquisition pour chaque réseau est de N^4 . Ainsi, le nombre d'acquisition devient très important et est du fait très consommateur de temps. Afin de diminuer ce temps d'acquisition, deux principales stratégies s'offrent à nous.

La première d'entre elles consiste à sonder la topographie d'un réseau non pas selon une matrice de N_c colonnes et N_l lignes mais selon une colonne de N_l points puis une ligne de N_c points. Cette stratégie permet de réduire le nombre de points acquis à $2N^3$.

La seconde stratégie peut se décomposer en trois phases. Tout d'abord, une acquisition de l'ordre 1 pour le réseau est réalisée (N^2 mesures). Ensuite, une cartographie dont la variable est la position du substrat et enfin une nouvelle cartographie de l'ordre 1. Le nombre d'acquisitions réalisées devient alors de $3N^2$ et permet une convergence plus rapide des différentes positions des éléments du système.

Chacune de ces stratégies doit être réitérée afin d'affiner le positionnement en diminuant les distances entre deux points d'acquisition.

Notre logiciel propose les deux stratégies.

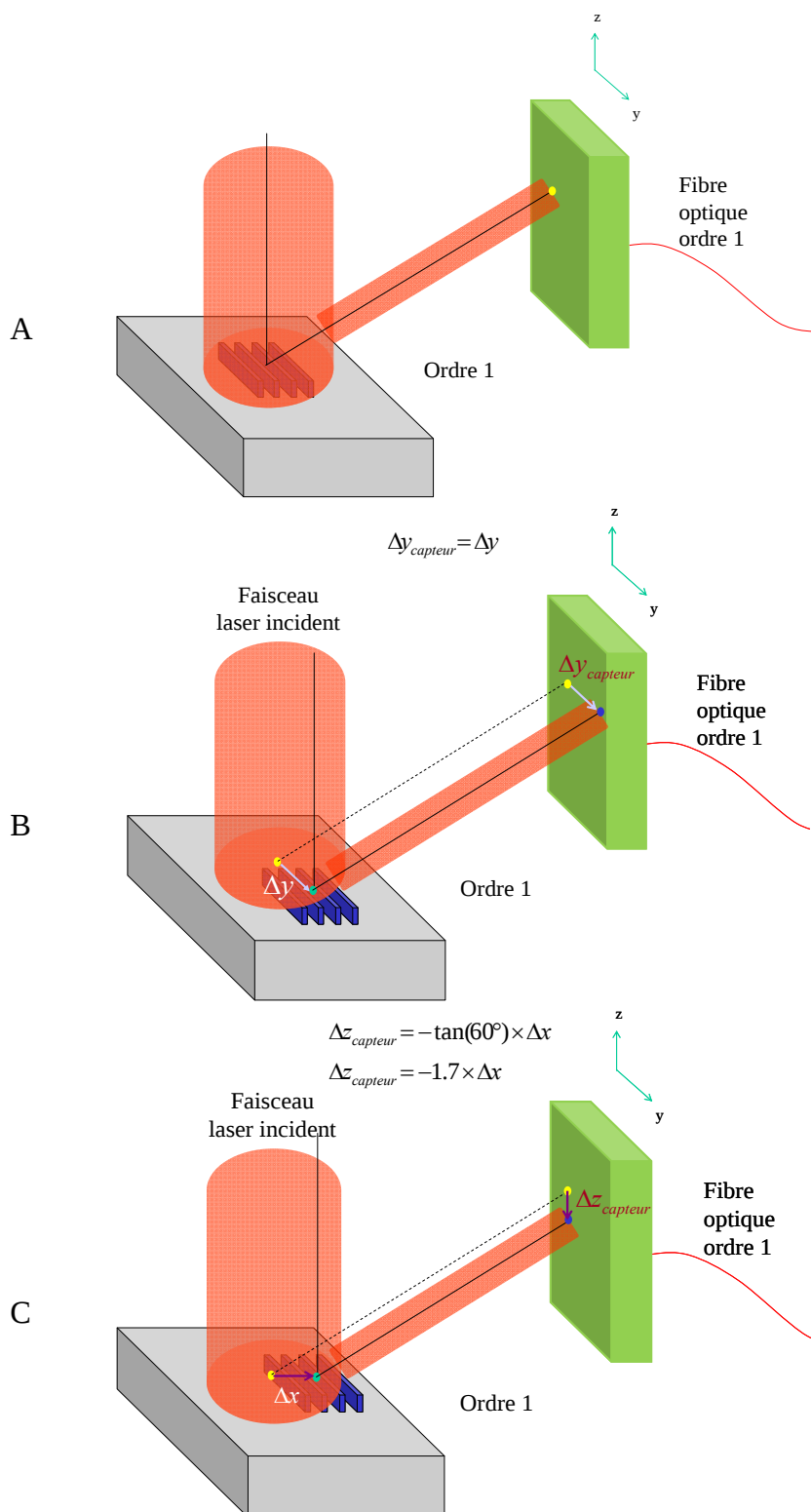


Figure 184 : influence de la position du substrat vis-à-vis du faisceau laser sur la position de l'ordre 1 lorsqu'il est parfaitement aligné (A), lorsqu'un décalage a lieu suivant l'axe des y (B) et des x (C).