



HAL
open science

Étude de la résistance aux conditions spatiales d'une biopuce dédiée à la détection de molécules organiques sur les corps du Système solaire

A. Le Postollec

► **To cite this version:**

A. Le Postollec. Étude de la résistance aux conditions spatiales d'une biopuce dédiée à la détection de molécules organiques sur les corps du Système solaire. Astrophysique [astro-ph]. Université Sciences et Technologies - Bordeaux I, 2008. Français. NNT: . tel-00376846

HAL Id: tel-00376846

<https://theses.hal.science/tel-00376846>

Submitted on 20 Apr 2009

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.

N° d'ordre : 3674

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 1

Laboratoire d'Astrophysique de Bordeaux (UMR 5804)

École Doctorale des Sciences Physiques et de l'Ingénieur

par **Aurélie LE POSTOLLEC**

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR

Spécialité : Astrophysique

Étude de la résistance aux conditions spatiales d'une biopuce dédiée à la détection de molécules organiques sur les corps du Système solaire

Soutenue le 25 novembre 2008

Après avis de : Jean-Pierre Lebreton Chercheur, ESA Rapporteurs
François Raulin Pr., Univ. Paris 12

devant la commission d'examen formée de :

Jean-Pierre Lebreton	Chercheur, ESA	Rapporteur
François Raulin	Professeur, Univ. Paris 12	Rapporteur
Michel Dobrijevic	Maître de Conférences, Univ. Bordeaux I	Directeur de thèse
Sébastien Incerti	Chargé de Recherche, Univ. Bordeaux I	Examineur
Marie-Christine Maurel	Professeur, Univ. Paris VI	Examineur
Philippe Moretto	Professeur, Univ. Bordeaux I	Examineur
Jean-Rodolphe Puiggali	Professeur, Univ. Bordeaux I	Examineur
Odile Trambouze	Chargé de Recherche, Univ. Montpellier II	Examineur

Membre invité : Michel Viso, Responsable Exobiologie, CNES

Résumé

Outils miniaturisés, polyvalents et sensibles, les biopuces constituent un type d'instrument très prometteur pour la recherche de vie dans le Système solaire. Elles peuvent en effet détecter une grande variété de molécules organiques, ainsi que des bactéries, avec un haut degré de spécificité et de sensibilité. Les biopuces sont actuellement très usitées dans les domaines médical et environnemental, mais aucun instrument à base de biopuce n'a encore été conçu dans le cadre d'une mission spatiale. Pour adapter un tel instrument à ce nouvel environnement, il est nécessaire d'effectuer une étude approfondie de l'impact des contraintes spatiales sur l'ensemble de ses composants.

Cette thèse s'insère dans le projet BiOMAS (Biochip for Organic Matter Analysis in Space), financé par le CNES, qui vise à développer une biopuce dédiée au spatial. Le principal objectif de la thèse est d'évaluer la résistance des composants de cette biopuce face aux diverses contraintes spatiales.

Dans un premier temps, nous avons étudié la résistance de la lame de la biopuce, c'est-à-dire le support solide de l'instrument. Plusieurs types de matériaux (verre, thermoplastiques, élastomère) ont été comparés en termes de dégazage, résistance aux solvants organiques et comportement thermique et mécanique, afin d'identifier celui qui répond le mieux au cahier des charges que nous avons établi. Parmi les différents candidats testés, le CycloOléfine Copolymère (COC) s'impose comme le meilleur matériau pour la réalisation d'une biopuce spatiale.

Dans un second temps, des études de résistance aux contraintes spatiales ont été menées pour la première fois sur des anticorps (qui servent de sondes de reconnaissance dans les biopuces). L'objectif est de déterminer l'évolution de leur comportement lors de cycles thermiques et sous divers types d'irradiations. Nous avons mis en place un outil de simulation performant, sur la base de l'outil Geant 4 du CERN, qui nous a permis de déterminer le type de particules ainsi que les gammes d'énergies pertinentes pour les expériences d'irradiation. Deux campagnes d'irradiation ont été menées sur la plateforme AIFIRA du CENBG à Bordeaux. Nous avons notamment démontré la bonne résistance des anticorps face à des flux de neutrons de faibles énergies.

Ce travail de thèse, fortement pluridisciplinaire, a nécessité la mise en place de nombreuses collaborations complémentaires entre des planétologues, des biochimistes, des physiciens nucléaires et des experts en matériaux. Les résultats que nous avons obtenus sont d'une importance capitale pour la réalisation d'une biopuce spatiale opérationnelle et fiable.

Abstract

Miniaturized, versatile and sensitive tools, biochips are a new kind of instrument which is very promising to search for life in the Solar System. They can detect a wide range of organic molecules, and also bacteria, with a high degree of specificity and sensitivity. Biochips are actually very used for medical and environmental purposes but instruments based on biochip have not been designed yet for a space mission. To adapt a biochip to the space environment, it is necessary to study carefully the space constraints effects on its components.

This thesis makes part of the BiOMAS (Biochip for Organic Matter Analysis in Space) project, funded by the french space agency (CNES), which aims to develop a biochip dedicated to space. The main objective of the thesis work consists in evaluating the resistance of the biochip components to several space constraints.

First, we have studied the resistance of the biochip slide, *i.e.* the solid support of the instrument. Several kinds of materials (glass, thermoplastics, elastomer) have been compared, in terms of outgassing behaviour, resistance to organic solvents and thermal and mechanical behaviour, to identify the one which gives the best answers to the specifications we have established. Among tested candidates, the CycloOlefin Copolymer (COC) appears as the best material to realize a space biochip.

Secondly, resistance studies to space constraints were driven, for the first time, on antibodies (which play the role of recognition probes on biochips). The objective was to determine how they react to thermal cycles and particles irradiations. We have developed a powerful simulation tool, based on the Geant 4 tool, which allowed us to determine particles kinds and energy ranges relevant for irradiation experiments. Two irradiation series were performed on the AIFIRA facility at CENBG in Bordeaux. We have demonstrated the good resistance of antibodies when submitted to low energy neutrons.

A multidisciplinary approach based on complementary collaborations between planetary scientists, biochemists, nuclear physicians and material experts allowed us to obtain important results for the forthcoming creation of an efficient and reliable space biochip.

Remerciements

Mes tous premiers remerciements sont destinés au "noyau dur" de l'équipe BiOMAS : Odile, Gaëlle et Michel. Quel plaisir de pouvoir intégrer cette équipe de choc où règnent bonne humeur, vivacité d'esprit, communication et échanges scientifiques de qualité ! Je n'aurais pas pu rêver meilleurs partenaires pour me lancer dans cette grande aventure qu'est le projet BiOMAS.

La galanterie voudrait que je commence par les filles mais je vais faire une petite entorse et m'attacher tout d'abord à remercier le représentant masculin de cette équipe. Michel Dobrijevic a endossé la très lourde tâche de directeur de thèse pendant ces trois années. Il a su me fournir à la fois une grande liberté et un soutien inconditionnel, deux éléments qui sont assurément la clé de l'aboutissement de cette thèse mais aussi la clé de voûte d'une collaboration efficace et agréable qui je l'espère est appelée à durer très longtemps. Merci Michel pour tout ce que tu m'as apporté pendant cette formidable aventure de trois ans : cette thèse te doit beaucoup ! Tes qualités humaines et scientifiques sont pour moi un exemple. Merci pour ta bonne humeur, merci pour ton esprit critique toujours affuté, merci pour tes conseils avisés, merci pour ta disponibilité sans faille, merci pour ta maîtrise du second degré sans pareille, merci pour tes moments de pure folie, merci pour ton honnêteté, merci pour la confiance que tu m'as toujours accordée et surtout merci pour m'avoir offert une thèse exceptionnelle, une vraie aventure de vie pleine de rebondissements et de grands moments. Tu es un chercheur génial et un encadrant hors pair, je crois que c'est assez rare pour être signalé. Un grand merci, chef !

Odile Vandenaabeele-Trambouze est la responsable du projet BiOMAS. Je crois que pour moi le premier trait de caractère d'Odile c'est son côté nature : elle est avenante, toujours souriante, très attentionnée, honnête et entière. Des qualités humaines qui font du travail avec elle un véritable plaisir. Je voudrais avant tout te remercier pour tout ce que tu m'as appris sur la biochimie : tu as toujours pris le temps d'expliquer, de simplifier, de clarifier tous tes propos et, au sein d'un projet pluridisciplinaire tel que le notre, c'était une chance inestimable. Que de réunions d'équipe où mon petit cerveau a fumé pour essayer de comprendre les tests ELISA et le fonctionnement des anticorps ! Mais tes qualités pédagogiques, ta patience et ta bonne humeur m'ont ouvert les portes d'un monde qui m'était inconnu et ces réunions restent gravées dans mon esprit comme des grands moments de ma thèse. Merci pour ta nature joyeuse, merci pour tes blagues et ton rire, merci pour ton savoir vivre, merci d'avoir toujours répondu présent, merci pour tout ce que tu m'a appris et tout ce que tu as apporté à cette thèse dont le caractère pluridisciplinaire te doit énormément. De nouvelles expériences nous attendent ensemble et je m'en réjouis d'avance.

Enfin, au tour de Gaëlle Coussot qui a intégré l'équipe BiOMAS en même temps que moi, en tant que post-doctorante ce qui faisait d'elle un peu ma grande sœur dans

l'équipe : merci collègue ! Gaëlle, c'est la vitalité même : entrain, motivation, précision et rigueur scientifique... autant d'éléments qui la caractérisent, sans oublier un grand cœur. Nous avons avancé dans ce projet ensemble, nous avons combiné nos approches, nous avons affronté les difficultés et savouré les bons moments ensemble et je tenais à te remercier pour ton soutien, pour ta force d'avancer, pour ta fiabilité (j'ai toujours pu me fier à toi les yeux fermés), pour ta réactivité et bien sûr pour ta gentillesse. Je suis heureuse pour toi que tous tes efforts aient payé car tu le mérites et j'espère qu'on pourra très vite retravailler ensemble.

J'ai eu la chance de réaliser ma thèse au sein du Laboratoire d'Astrophysique de Bordeaux et je tiens donc maintenant à adresser tous mes remerciements à toutes les personnes que j'ai cotoyées pendant ces trois ans et qui ont contribué, chacune à leur manière, à l'aboutissement de mon travail dans les meilleures conditions.

Tout d'abord, un grand merci à toute l'équipe Planétologie qui m'a accueillie. C'est une équipe soudée et dynamique au sein de laquelle il fait bon travailler. Merci Françoise, Sylvia, Jean, Bertrand, Philippe, Michel et Thibault, pour l'ambiance chaleureuse qui règne parmi vous. Une dédicace toute particulière pour mes collègues du bureau B105, Sylvia et Thibault, où j'ai passé des moments exceptionnels. Un récital des meilleurs épisodes a d'ailleurs vu le jour au bout de ces trois ans, immortalisant, entre autres, les "dents en inox" de Sylvia et les erreurs téléphoniques de Thibault...

Je voudrais aussi souligner le travail formidable que réalise le Service Administration/Gestion de la Recherche, en particulier Cécile et Annick qui ont toujours été aux petits soins et très efficaces vis à vis de mes demandes. Vous gardez toujours le sourire alors que nous l'aurions souvent perdu depuis longtemps à votre place : merci les filles !

Merci à Nadège, Sylvie et Jean-Pierre du Service Informatique qui sont toujours là pour résoudre les soucis techniques... même si l'on n'a rien pu faire pour sauver les données contenues dans mon ordinateur (qui a rendu l'âme quatre jours avant ma soutenance...).

Un grand merci au personnel de l'atelier mécanique qui m'a été d'une grande aide pour réaliser mes expériences d'irradiation. Vous avez su trouver les solutions dans des temps records et sans vous nous n'aurions pas pu mener à bien nos essais dans les délais impartis : bravo et surtout merci pour tout ! C'est une grande chance de vous avoir au sein du laboratoire et de savoir que l'on peut compter sur vous.

Merci aussi au personnel du laboratoire d'électronique qui m'a fourni le matériel nécessaire aux essais de cyclage thermique : un pan de ma thèse a porté ses fruits grâce à vous et je vous en suis très reconnaissante.

Je tiens à faire une petite dédicace particulière à Nathalie qui a été ma marraine de thèse et qui a pris le temps de jouer ce rôle avec sérieux.

Merci aussi à Marie-Paule, bibliothécaire géniale, efficace et toujours souriante.

Enfin, je n'oublie pas mes collègues thésards, post-docs et autres intermittents de la Recherche du laboratoire. Merci à vous les amis pour tous les bons moments que nous avons passés ensemble pendant ces trois années. Merci Matthieu, Erwan, Marc, Pascal, Arnaud, Gégé, Alberto et Thibault pour les parties de tarot endiablées, les barbecues mémorables, les séances de guitare, les soirées au Frog et les sorties à la plage... sans tout

ça, mes trois ans de thèse n'auraient pas eu la même saveur...

Je ne peux malheureusement pas nommer tout le monde ici, mais je vous remercie tous pour les bons moments que nous avons passés ensemble et je l'espère les bons moments futurs qui nous attendent.

Ma thèse a la particularité d'être largement pluridisciplinaire ce qui m'a amenée à collaborer avec des personnes d'horizons très différents.

Mes premiers remerciements vont au CENBG et plus particulièrement à l'équipe Interface Physique-Biologie au sein de laquelle j'ai passé beaucoup de temps.

Merci à Philippe Moretto de m'avoir accueillie dans cette équipe et de nous avoir fait profiter de ses précieuses compétences en matière d'irradiation sur la plateforme AIFIRA.

Un immense merci à Sébastien Incerti qui a été en quelque sorte un co-encadrant de thèse officieux. Il a le mérite de m'avoir initiée à Geant4 et autant dire que c'était presque mission impossible ! Merci Sébastien pour ta gentillesse, ta patience, ta bonne humeur, ta réactivité, ta rigueur, ton côté sarcastique et ton goût pour les voyages. J'ai passé d'excellents moments en ta compagnie. J'ai réalisé grâce à toi des choses dont je me croyais totalement incapable, tu m'as fait confiance et m'as toujours poussée en avant et je t'en suis infiniment reconnaissante. Tu m'as en outre donné l'opportunité de participer à plusieurs colloques en ta compagnie et j'en garde de très bons souvenirs... alors, à quand notre prochain déplacement ensemble ?

Grâce à cette collaboration avec le CENBG, j'ai pu faire la connaissance de la communauté internationale Geant4. Je tiens à remercier l'ensemble des personnes que j'ai rencontrées avec lesquelles j'ai pu apprendre, débattre, collaborer et faire avancer mon projet. Un merci tout particulier à Laurent Desorgher, Giovanni Santin et Petteri Nieminen qui ont été d'une aide précieuse.

Je tiens aussi à remercier le LGM²B et surtout François-Xavier Kromm et Michel Dumon qui ont largement contribué à l'étude thermique et mécanique des supports de biopuce.

Un grand merci au CNES pour les financements qu'il nous a accordés et grâce auxquels nous avons pu mener à bien l'ensemble de cette étude. Merci au CNES Toulouse et en particulier à Pascale Chazalnoël, Pascale Guigue et André Debus pour leur soutien ainsi qu'à Delphine Faye qui a contribué à la réalisation des essais de dégazage.

Merci à ceux qui m'ont aidé à réaliser divers essais et manipulations : Mickaël Baqué, stagiaire montpellierain formidable avec lequel j'espère pouvoir retravailler très vite, son encadrante Isabelle Desvignes, et Guillaume Ameline que j'ai eu le plaisir de co-encadrer pendant ses trois mois de stage au LGM²B.

Je voudrais également remercier la Région Aquitaine qui m'a octroyée une bourse de thèse sans laquelle je n'aurais pas pu participer à ce beau projet.

Un grand merci à mes deux rapporteurs de thèse, François Raulin et Jean-Pierre Lebreton, ainsi qu'à l'ensemble de mon jury de thèse pour leurs remarques pertinentes et

constructives qui m'ont permis d'améliorer ce manuscrit.

Enfin, mes derniers remerciements (et certainement les plus émouvants pour moi) vont à toute ma famille.

Maman, Papa, merci pour tout ! Si j'ai réussi à aller au bout de mes études et au bout de ce travail de thèse, c'est avant tout à vous que je le dois. Vous êtes des parents formidables et j'ai une chance inouïe de vous avoir. Vous avez toujours été à mes côtés, vous m'avez toujours soutenue, encouragée, motivée, vous m'avez toujours fait confiance et j'ai puisé en vous une grande partie du courage nécessaire à de si longues études. Merci pour cette joie de vivre et cette bonté qui vous caractérisent si bien et qui sont pour moi des exemples que je m'efforce de suivre. Vous êtes géniaux !

Merci frerot pour les repas improvisés quand tu te trouvais près de Floirac et surtout merci pour m'avoir fait si souvent rire... peut être un jour cerneras-tu ce que j'ai bien pu faire pendant trois ans dans cet observatoire... ;-) En tout cas, ne change rien, je t'adore comme tu es.

Merci à mes mémés pour leur soutien inconditionnel.

Merci à Ludovic, Hayette, Iliana, Iliès et Jade pour m'avoir hébergée à maintes reprises lors de mes déplacements à Montpellier et m'avoir fait passer de très bonnes soirées.

Merci à Jean, Guillaume et Marlène pour leur soutien et leur bonne humeur. Merci à Inge pour avoir relu et corrigé la totalité de ce manuscrit, c'était vraiment très gentil.

Et pour terminer par le meilleur, merci à toi Thibault. Tu as contribué à cette thèse sur les deux plans, professionnel et personnel. À la fois collègue de bureau, confident, ami et mari, tu as coiffé, pendant ces trois années, plusieurs casquettes qui m'ont toutes énormément apporté et ont changé ma vie pour ne la rendre que meilleure. Merci pour ton soutien sans faille dans cette grande aventure qu'est la thèse : tu as toujours été là pour moi. Merci pour tes conseils avisés, merci pour ta patience (notamment pour m'apprendre à utiliser LaTeX), merci de m'avoir orientée vers le CENBG et la simulation numérique (même s'il y a bien dû y avoir certains moments où je t'ai détesté pour ça...), sans ton aide précieuse mes travaux ne seraient sûrement pas allés aussi loin. Sur un plan plus personnel, merci pour tout ce que tu m'apportes au quotidien, merci pour la confiance que tu m'accordes, merci pour tous les sourires que tu fais naître, merci pour tous les espoirs et tout le courage que tu me donnes. C'est un vrai bonheur de vivre à tes côtés. Ensemble, nous sommes plus forts que tout le reste... l'avenir ne peut que nous sourire !

MERCI À TOUS !

Table des matières

Résumé	i
Abstract	iii
Remerciements	v
INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
I La recherche de vie dans le Système solaire	5
Introduction de la première partie	7
1 La recherche de signatures de la vie dans le Système solaire	9
1.1 Que faut-il chercher?	9
1.2 Où chercher dans le Système solaire?	11
1.2.1 La zone habitable	11
1.2.2 Mars	13
1.2.3 Europe	14
1.2.4 Titan	15
1.2.5 Encelade	16
2 La recherche <i>in situ</i> de signatures de vie : missions et techniques	19
2.1 Les missions passées	19
2.2 Les missions à venir	21
3 Un instrument d'analyse prometteur : la biopuce	27
3.1 Qu'est-ce qu'une biopuce?	27
3.2 Les étapes de la réalisation	27
3.3 Intérêt de cet instrument pour le spatial	29
3.4 Description du fonctionnement <i>in situ</i>	30
3.5 Quelques choix stratégiques pour une biopuce spatiale	31
Conclusion de la première partie	33

II Le projet BiOMAS : développer une biopuce adaptée au spatial	35
Introduction de la deuxième partie	37
1 Le concept du projet	39
1.1 L'objectif : démontrer la faisabilité d'une biopuce pour le spatial	39
1.2 Le contexte international	40
1.3 Notre stratégie : une approche originale	41
1.4 Un projet pluridisciplinaire	41
2 Comment aborder l'aspect "spatialisation" dans ce projet ?	43
2.1 La conception d'un instrument pour une mission spatiale : un ensemble de contraintes fortes	43
2.1.1 Un environnement inhospitalier	43
2.1.2 Des contraintes techniques spécifiques aux missions spatiales	47
2.1.3 Des contraintes de conception propres aux instruments spatiaux . .	49
2.2 Définition d'un cahier des charges "matériau"	50
2.2.1 Cahier des charges analytique	50
2.2.2 Cahier des charges des contraintes spatiales	51
2.2.3 Conclusion	52
2.3 Mise en place d'un plan d'essais pour l'étude du comportement des ligands	52
Conclusion de la deuxième partie	55
III Explorer la résistance des composants de la biopuce pour contraindre le développement global	57
Introduction de la troisième partie	59
1 Quel support pour une biopuce "spatiale" ?	61
1.1 Une présélection sur critères "chimiques"	61
1.2 Étude comparative des comportements en dégazage	62
1.2.1 Le principe de dégazage	62
1.2.2 Les normes spatiales	63
1.2.3 Nos objectifs	63
1.2.4 Les procédures d'essais	64
1.2.5 Les résultats	65
1.2.6 Conclusions	66
1.3 Sélection selon la résistance aux solvants d'extraction	69
1.3.1 Les solvants d'extraction d'intérêt	69
1.3.2 Les protocoles d'essais	70
1.3.3 Les critères de comparaison	70
1.3.4 Les résultats	71
1.3.5 Conclusions	72
1.4 Étude comparative des comportements thermiques et mécaniques	72
1.4.1 Mise en place d'un cahier des charges thermomécanique	72

1.4.2	Présentation des essais sélectionnés	74
1.4.3	Résultats	78
1.4.4	Conclusions	84
1.5	Conclusions	84
2	Quelles sont les limites de résistance des anticorps en tant qu'outils de reconnaissance d'un instrument spatial ?	91
2.1	Les anticorps : des ligands aux intérêts multiples	91
2.1.1	Présentation générale	91
2.1.2	Les avantages des anticorps en tant que ligands	91
2.2	La dénaturation des anticorps : un processus complexe	93
2.3	Étude des effets des variations thermiques sur la structure de l'anticorps - BiOMAS-ARTheC	94
2.3.1	Le contexte	94
2.3.2	Le protocole d'essai	95
2.3.3	La mise en lumière d'un problème amont : la lyophilisation	100
2.3.4	Les résultats	101
2.3.5	Conclusions et perspectives	103
2.4	Étude de l'impact des radiations cosmiques sur les capacités de reconnaissance de l'anticorps - BiOMAS-ARCoR	104
2.4.1	La simulation numérique, une étape incontournable	104
2.4.2	Des irradiations sous faisceau : une première évaluation de l'effet du rayonnement cosmique sur les ligands	106
2.4.3	Conclusions et perspectives	113
	Conclusion de la troisième partie	115
	CONCLUSION GÉNÉRALE	119
	Bibliographie	123
	Acronymes	129
	Annexe A	i
	Annexe B	xxv
	Annexe C	xliii

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Détecter des traces de vie extraterrestre, présente ou passée, est l'un des grands défis des agences spatiales. Une telle découverte serait une véritable révolution pour l'Homme qui ne cesse de s'interroger sur son origine, sa raison d'être, son unicité, etc. Sommes-nous seuls ou existe-t-il une autre forme de vie ailleurs dans notre Système solaire, ou même plus loin ? Comment la vie a-t-elle émergé ? Est-elle apparue sur d'autres planètes ? N'a-t-elle pu se maintenir que dans l'environnement privilégié de la Terre ? Dans cette quête d'une vie extraterrestre se trouvent certainement quelques réponses à nos interrogations. Les Hommes déploient donc des trésors d'ingéniosité et d'imagination, consacrent des heures de réflexion et de calcul, dépensent des sommes colossales et utilisent le meilleur de la technologie pour tenter de découvrir un signe, une preuve, que quelque part au-delà de notre atmosphère existe une trace d'une vie, quelle qu'elle soit.

Mais que devons-nous chercher ? Nous ne connaissons qu'un seul modèle de ce que l'on appelle "vivant", c'est le nôtre. Comment alors définir cette propriété avec si peu d'exemples ? Quelles sont les caractéristiques propres à la vie ? Comment être sûrs que nous ne passons pas à côté d'une forme de vie différente simplement par manque d'ouverture d'esprit ? Définir des "marqueurs de vie" est donc une tâche ardue sur laquelle plane toujours des incertitudes.

Une autre difficulté consiste à choisir les sites d'exploration : même si l'on se restreint à notre Système solaire, le champ d'investigation est très vaste. Nos techniques actuelles ne nous permettent de fouiller que quelques mètres carrés, voire kilomètres carrés, des surfaces planétaires mais pas plus. Il faut donc cibler de manière judicieuse les corps que nous souhaitons étudier et les régions géographiques les plus intéressantes qu'ils présentent. Là encore, nous ne pouvons être que partiels en nous appuyant sur les hypothèses que nous faisons quant aux conditions nécessaires à l'apparition et au maintien de la vie : nous recherchons en tout premier lieu de l'eau liquide.

Les Hommes ont marché sur la Lune mais, pour le moment, ils ne sont pas encore allés plus loin. Donc, dans l'attente des futures missions habitées vers Mars, et plus loin, les fouilles, les échantillonnages et les analyses sont laissés aux bons soins des robots. Les agences spatiales conçoivent des missions robotisées de plus en plus performantes dirigées vers divers corps de notre système planétaire, et tout particulièrement vers la planète rouge notre voisine, afin de percer les mystères qu'ils recèlent. À ce jour, la preuve formelle d'une vie extraterrestre, même très primitive, n'a pas encore été apportée, mais les futurs instruments embarqués, de mieux en mieux conçus grâce aux leçons des échecs passés, découvriront peut être prochainement des traces de vie présente ou passée...

Les agences spatiales montrent un vif intérêt pour un nouvel instrument en cours de développement : les biopuces. Outil miniaturisé largement usité dans le domaine médical,

la biopuce affiche un grand potentiel pour la recherche exobiologique. Elle pourrait permettre de rechercher plusieurs centaines, voire milliers, de molécules à partir d'un seul et même échantillon (de sol martien par exemple). Sa sensibilité très élevée ouvre de nouvelles perspectives quant à la découverte de biomarqueurs extraterrestres. Cependant, il faut en tout premier lieu s'assurer que la réalisation d'une biopuce "spatiale" est plausible. Cette biopuce devra supporter des contraintes particulières et atteindre des objectifs qui sont loin de ceux que l'on attend d'elle lors de son utilisation habituelle sur Terre. Un lourd travail d'adaptation et de redéfinition de sa conception doit être mené. C'est le défi que s'est lancé notre équipe au travers du projet intitulé BiOMAS : Biochip for Organic Matter Analysis in Space.

BiOMAS est avant tout un projet pluridisciplinaire original où se croisent divers domaines d'expertise : chimie, biochimie, physique nucléaire, planétologie, génie des matériaux, mécanique, etc. L'objectif est de démontrer la faisabilité d'une biopuce pour le domaine spatial afin de concevoir un outil fiable, robuste et performant.

Mon travail au sein de l'équipe porte sur la spatialisation de l'instrument et plus particulièrement sur l'étude de sa résistance face à l'ensemble des contraintes spatiales. La présentation de ce travail peut être scindée en deux grandes parties : la première concerne le support solide de la biopuce et la seconde s'intéresse aux éléments biologiques qui permettent la détection, appelés ligands.

Quel matériau choisir pour la lame de la biopuce ? Voilà une question à la base de la conception ! Plusieurs types de matériaux sont envisageables et accessibles sur le marché : des verres, des thermoplastiques, des élastomères. Trois critères nous sont apparus pertinents pour élaborer une première base de comparaison : le comportement en dégazage, la résistance aux solvants organiques et les caractéristiques thermiques et mécaniques. En ce qui concerne les ligands, nous avons choisi d'étudier leur comportement face à deux contraintes typiques d'une mission interplanétaire : les variations thermiques et les radiations cosmiques. Nos ligands, préférentiellement des anticorps, supporteront-ils ces contraintes ? Conserveront-ils intacte leur capacité de reconnaissance des molécules cibles ? Devons-nous envisager des dispositifs de protection adéquats pour assurer un fonctionnement optimal à la biopuce ? Autant de questions auxquelles nous tentons d'apporter des premières réponses grâce à deux sous-projets : BiOMAS-ARTheC (Antibody Resistance to Thermal Cycles), qui étudie la résistance d'anticorps face à divers cycles thermiques, et BiOMAS-ARCoR (Antibody Resistance to Cosmic Radiation), qui s'intéresse au comportement des anticorps sous irradiation.

La problématique d'une recherche de vie ailleurs dans notre Système solaire est abordée dans la première partie. La question de la détermination de marqueurs de vie ainsi que la description de sites d'exploration d'intérêt font l'objet du premier chapitre. Le deuxième chapitre, plus technique, s'intéresse aux moyens d'exploration *in situ* à travers la présentation de missions spatiales et d'instruments embarqués. Le troisième et dernier chapitre décrit l'outil "biopuce", sa conception, son fonctionnement, ses avantages et les solutions de développement envisageables pour en faire un instrument spatialisé.

Dans la deuxième partie, nous nous penchons sur le projet BiOMAS. Le premier chapitre offre une présentation de ses objectifs, de ses particularités, et de la stratégie adoptée. Le chapitre 2 aborde l'aspect qui touche plus particulièrement au sujet de ma thèse : la spatialisation et les contraintes qu'elle suppose.

La troisième et dernière partie présente les campagnes d'essais mises au point et réalisées pour étudier le comportement des composants de la biopuce face à diverses contraintes. Un premier chapitre se pose la question du "choix du support" : quel matériau est le meilleur candidat parmi ceux qui sont actuellement à notre disposition ? Le cas de la résistance des anticorps, ligands d'intérêt pour une biopuce spatiale, est traité dans le second chapitre. Les essais menés pour déterminer leur comportement sous irradiation et sous sollicitation thermique y sont décrits et analysés.

Première partie

La recherche de vie dans le Système solaire

Introduction de la première partie

L'une des grandes préoccupations de l'Homme est de savoir s'il est seul dans l'Univers. La vie n'est-elle apparue que sur Terre ? Les exobiologistes essaient de déterminer si la vie existe ou a existé ailleurs, dans notre Système solaire, dans un premier temps, et au-delà. Le premier problème auquel on se heurte sur cette thématique, c'est la définition de la vie. Comment caractériser la vie ? Quelles sont les preuves qui signent la présence du vivant ? Nous n'avons qu'un seul exemple à notre disposition, le nôtre. Il est donc difficile de présenter une définition objective et univoque de ce que l'on peut appeler le monde vivant. Ainsi, la première grande question à se poser dans cette exploration extraterrestre est : que devons-nous chercher ?

La deuxième grande question concerne le lieu des investigations : où devons-nous chercher ? L'espace de recherche à notre disposition est immense et nos moyens ne nous permettent d'en explorer qu'une infime parcelle. Aussi faut-il tenter de cibler les zones que l'on considère comme les plus propices à l'apparition et le maintien d'une forme de vie. Quelles sont les conditions climatiques, géologiques, etc., qui semblent les plus adéquates à l'émergence du vivant ? Quels sites nous paraissent les plus prometteurs ? La notion de zone habitable et l'importance de l'eau liquide tiennent un rôle de premier rang pour répondre à ces questions.

Nous nous sommes posés les questions du "quoi ?" et du "où ?", il reste donc naturellement la question du "comment ?". Quels sont donc les moyens à notre disposition pour explorer notre système solaire et tenter de déterminer si les corps qui nous entourent présentent des traces d'une vie, présente ou passée ? De nombreuses missions, en particulier planétaires, ont étudié les conditions régnant sur les planètes du Système solaire. Certaines ont clairement affiché leur objectif de découvrir des traces de matière organique, mais à l'heure actuelle, aucune preuve irréfutable d'une présence de vie "extraterrestre" n'a pu être apportée. Les missions passées nous ont appris beaucoup et nous en tirons les enseignements pour améliorer la conception des futures missions et affiner leurs objectifs dans l'espoir de ramener la preuve irréfutable que la vie a su se développer loin des conditions particulières de notre Terre. Les instruments, de plus en plus fiables et précis ouvrent de nouvelles perspectives dans cette quête de la matière organique.

Un instrument prometteur, récemment préconisé par les agences spatiales, est la biopuce. Instrument miniaturisé et sensible, elle pourrait permettre la détection d'un large panel de molécules à partir d'un échantillon unique. Cependant, cet outil, essentiellement utilisé dans le domaine médical pour le moment, nécessite plusieurs adaptations pour répondre aux attentes d'une mission spatiale affichant des objectifs exobiologiques.

Le premier chapitre a pour but de poser la problématique d'une recherche de signatures de vie dans notre Système solaire. Il tente de mettre l'accent sur les difficultés que cela im-

pose. Le second chapitre s'intéresse plus particulièrement à l'exploration *in situ* des corps de notre système : il fait la liste des missions robotiques passées et à venir en accordant un intérêt particulier aux instruments et dispositifs expérimentaux à caractère exobiologique. Le troisième et dernier chapitre de cette partie présente l'instrument biopuce en détaillant les étapes classiques de conception, le fonctionnement pour une analyse sur terrain, les avantages et les adaptations nécessaires pour une utilisation dans le domaine spatial.

Chapitre 1

La recherche de signatures de la vie dans le Système solaire

1.1 Que faut-il chercher ?

Définir la vie, voilà une question très complexe, et délicate, à laquelle chacun peut apporter ses propres réponses mais dont personne ne peut prétendre connaître LA réponse, c'est-à-dire LA définition universelle et univoque. Décréter que ceci ou cela est "vivant" constitue avant tout un acte subjectif. Comment définir la notion de vie dans son ensemble alors que nous n'en connaissons qu'un exemple, la vie terrestre ? Nous n'avons pas la prétention d'apporter une réponse à cette grande question qui a toujours préoccupé les Hommes mais nous tâchons de faire le point des différents débats qu'elle soulève tout en répondant à la question qui nous concerne : que devons-nous aller chercher sur les corps du Système solaire ? Que pouvons-nous considérer comme des signatures d'une vie, présente ou passée, dans l'état actuel de notre connaissance du vivant ? Rechercher des traces de vie constitue, certes, un grand défi technique et technologique mais encore faut-il savoir définir quelles preuves signent la présence du vivant de manière incontestable. C'est donc aussi un défi scientifique.

La question s'avère d'autant plus ardue que l'on peut formuler une réponse à plusieurs niveaux : philosophique, biologique, mécanique, thermodynamique... En ce qui concerne l'exploration planétaire, il importe de fournir une définition assez précise pour orienter les recherches des engins mécaniques que nous envoyons tout en évitant de fournir une définition trop restrictive qui pourrait nous faire passer à côté d'une forme de vie que nous n'aurions pas imaginée. C'est dans ce compromis que réside toute la difficulté de l'exercice.

La communauté des spécialistes en exobiologie s'accorde pour définir certaines caractéristiques comme propres à la notion de vie telle qu'on la conçoit. On peut citer quatre caractéristiques principales qui sont : (1) un système ouvert qui a besoin d'ingrédients et d'énergie, (2) une chimie tétravalente dans un solvant, de préférence une chimie carbonée (qui induit la notion de chiralité) et l'eau en tant que solvant (car elle apporte des liaisons hydrogènes), (3) la capacité de reproduction qui permet la survie et la prolifération, et enfin (4) la faculté d'évolution (par mutation par exemple) qui permet la biodiversité et la capacité à s'adapter aux conditions environnementales.

Une propriété intéressante du vivant tient à la notion d'homochiralité directement liée à la tétravalence du carbone (cf. figure 1.1). Même si le phénomène ne s'explique pas encore

de manière claire, on constate que des molécules du vivant, contrairement à ce que l'on observe dans la nature, ne présentent pas un mélange racémique : elles présentent, pour une même molécule, une préférence soit pour la forme D (Dextrogyre) soit pour la forme L (Lévoxyre). On peut alors considérer que cette proportion déséquilibrée entre les deux conformations peut constituer un biomarqueur.

Une autre caractéristique, c'est l'unité que présente la vie malgré une grande diversité

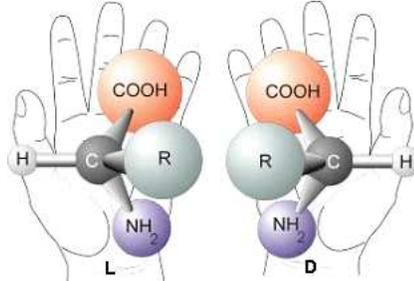


Figure 1.1: Illustration de la chiralité d'une molécule carbonée

à l'échelle macromoléculaire : en effet, bien que présente sous des formes très diverses, la vie est avant tout constituée de cellules, éléments unificateurs de toutes les espèces, et, ces cellules sont un "assemblage" de protéines et d'acides nucléiques. Les protéines sont constituées d'acides aminés et les acides nucléiques de nucléotides. Ainsi peut-on définir un point commun à l'ensemble du monde vivant terrestre : il est bâti à partir des mêmes "briques" élémentaires.

Enfin, le déséquilibre isotopique peut être évoqué comme une caractéristique propre au monde vivant : c'est ainsi que de nombreuses expériences visent à mesurer, dans des échantillons de matière extraterrestre, des rapports isotopiques du carbone, de l'oxygène, etc (Van Zuilen, 2007; Summons et al., 2007; Blake, 2002; Sims et al., 2000).

Mais, au-delà des constatations que nous pouvons faire en observant la vie telle quelle se trouve autour de nous, une importante question reste toutefois en suspens : comment la vie est-elle apparue sur Terre? Est-elle née d'un ensemble de réactions chimiques dans des conditions particulières? Est-elle due à l'apport de matière extra-terrestre par les météorites? Existait-il une "soupe", c'est-à-dire un mélange primordial à partir duquel la vie a pu émerger en présence d'eau et d'énergie? L'origine de la vie, ainsi que son évolution, alimentent encore de nos jours de nombreux débats. Les missions d'exploration se trouvent au cœur de cette controverse : elles permettent d'envisager des corps à un stade d'évolution moins avancé que notre planète qui pourraient par exemple regrouper les conditions primordiales de la Terre au moment où la vie est apparue. À nous alors d'essayer de définir ces conditions pour espérer les reconnaître si nous nous trouvons en leur présence...

S'il y a toutes ces interrogations, il y a également la réalité du terrain et la réalité technique : pour concevoir une mission d'exploration, il faut fixer des objectifs, choisir des instruments, définir des protocoles d'analyses, des seuils de détection, des schémas d'interprétation. Quelle est donc la stratégie à adopter? Quelle méthodologie peut nous permettre d'apporter des réponses pertinentes face au défi de la recherche de traces de vie passée ou présente sur un autre corps de notre Système? Que devons-nous chercher

et comment ?

Plusieurs types de biomarqueurs peuvent être considérés : des marqueurs organiques, des marqueurs structuraux et des indices d'évolution et/ou d'altération du milieu. Il ressort des derniers consortiums réunissant divers experts sur la question, qu'il est de toute évidence nécessaire de combiner plusieurs analyses. Une seule analyse peut être équivoque alors qu'on peut espérer qu'un ensemble d'analyses qui convergent vers un même résultat apportera un élément fiable, replacé dans son contexte et dont l'interprétation ne sera pas ambiguë. Connaître le contexte environnemental, géologique, etc., de l'échantillon constitue aussi un élément important pour comprendre et interpréter les résultats que fournit chaque analyse. Enfin, et surtout, comme notre conception de la vie est nécessairement gauchie, puisque nous n'avons pas d'autre exemple que le nôtre, il faut à la fois rechercher des familles de molécules, des populations, en même temps que des cibles, des signatures précises : cette complémentarité entre cible large et cible précise permet un balayage d'un très vaste panel de molécules nécessaire à une recherche de forme de vie quelle qu'elle soit. Plusieurs tableaux de biomarqueurs ont été dressés pour fournir des cibles concrètes aux agences spatiales. Un extrait d'un de ces tableaux, issu de Parnell et al. (2007) est présenté figure 1.2. Parmi les biomarqueurs organiques non ambigus, on peut citer : le profil de distribution des alcanes, les hopanes, les stéranes, les sucres, certaines macromolécules (protéines, oligonucléotides) et l'homochiralité des acides aminés.

Cependant, on se heurte alors à un problème d'échelle : où rechercher des biomarqueurs microscopiques dans l'immensité de notre Système solaire ? Il faut donc, dans un premier temps, essayer de déterminer judicieusement les endroits les plus propices à une exploration.

1.2 Où chercher dans le Système solaire ?

1.2.1 La zone habitable

Les scientifiques ont tenté de définir une zone où les conditions qui permettraient à une vie (telle qu'on la connaît) d'exister seraient réunies : c'est ce que l'on appelle la zone habitable. Autour de chaque étoile, il existe un domaine où les conditions physiques, en particulier de température, sont compatibles avec l'existence d'une vie semblable à la notre, c'est-à-dire une vie nécessitant de l'eau liquide. Cette zone est délimitée par une température inférieure en deçà de laquelle il ne peut exister que de la glace, et une température supérieure au-dessus de laquelle on considère la planète trop chaude pour abriter la vie. A partir de cette définition, on constate que la recherche de vie se réduit dans un premier temps à rechercher une zone où l'eau peut exister à l'état liquide. Dans le cas du Système solaire, cette zone, qui s'étend de 0,95 A.U. à 1,37 A.U. (Kasting et al., 1993), n'englobe que la Terre (cf. figure 1.3).

Cependant, la distance par rapport à l'étoile, le Soleil dans notre cas, n'est pas le seul critère pour définir la zone d'habitabilité. D'autres éléments tels que la présence d'une autre source d'énergie, l'effet de serre, l'albédo, mais aussi le stade d'évolution de l'étoile peuvent modifier, déplacer, ou élargir la zone. En effet, la température de surface d'un corps dépend en premier lieu du flux solaire, mais il ne faut pas oublier de considérer aussi la quantité de chaleur qui est perdue dans l'espace par rayonnement thermique : la

TABLE 2. SELECTION OF TARGET BIOMARKERS, THEIR LEVEL OF PRIORITY, AND BIOLOGICAL SIGNIFICANCE

Target category no.	Priority	Biomarker	Molecular type	Polar molecule	Biological significance
<i>Extant</i>					
1	A	ATP	Phosphate	Yes	Energy
2	A	Phosphoenolpyruvate	Phosphate	Yes	Energy
3	B	Acetyl phosphate	Phosphate	Yes	Energy
4	C	cyclic AMP	Phosphate	Yes	Signalling
5	A	Generic pyrimidine base	Nucleobase	Yes	Information
6	A	Generic purine base	Nucleobase	Yes	Information
7	A	DNA	Nucleobase	Yes	Information
8	A	Nicotinamide (generic NAD, NADP)	Vitamin	Yes	Electron transfer
9	C	Flavin (isoalloxazine ring)	Vitamin	Yes	Electron transfer
10	C	Fe-S centers	Redox center	Yes	Electron transfer
11	C	Quinones	Electron transport	No	Electron transfer
12	B	Generic carotenoid	Pigment	No	Light harvest
13	C	Phycocyanin	Pigment	No	Light harvest
14	C	Thioesters	Ester	Yes	Energy
15	A	Generic extant porphyrin	Porphyrin	No	Electron transfer
16	B	Chaperones	Protein	Yes	Stress protein
17	A	ATP Synthase	Protein	Yes	Enzyme
18	A	Phytane	Hydrocarbon	No	Archaeal lipid
19	A	Fatty acids (1 or 2)	Carboxylic acid	Weakly	Lipid (18 bio, 19 not)
20	A	Teichoic acid	Amino acid + phosphate polymer	Yes	Gram-positive wall
21	A	LPS	Macromolecule	Yes	Gram-negative wall
22	B	Ectoine	Compatible solute	Yes	Osmotic protectant
23	C	Trehalose	Compatible solute	Yes	Osmotic protectant
24	B	Squalene	Hydrocarbon	No	Lipid biosynthesis (isoprenoid precursor)
25	C	Diploptene	Hopanoid	No	Bacterial membrane
26	B	Melanoidins	Macromolecule	No	Sugar degradation
<i>Sediment/cell extracts:</i>					
27	C	1. Acid mine drainage	Multiple	Some	Whole cells
28	C	2. Methanogens	Multiple	Some	Whole cells
29	C	3. Cyanobacteria	Multiple	Some	Whole cells
30	C	4. Mars energy users	Multiple	Some	Whole cells
31	C	5. Extract/abiotic mix	Multiple	Some	Whole cells
<i>Fossil</i>					
32	A	Generic isoprenoid	Hydrocarbon	No	Chlorophyll, quinones, archeal membranes
33	A	Pristane	Hydrocarbon	No	Chlorophyll, quinones, archeal membranes
18	A	Phytane	Hydrocarbon	No	Chlorophyll, quinones, archeal membranes
34	A	β,β -carotane	Hydrocarbon	No	Fossil carotenoids
35	C	Tetramethyl benzenes	Hydrocarbon	No	Fossil carotenoids
36	C	Tetramethyl cyclohexanes	Hydrocarbon	No	Fossil carotenoids
37	C	Squalene	Hydrocarbon	No	Membranes (prokaryotes)
38	A	Generic ABC terpane	Hydrocarbon	No	Membranes (prokaryotes)
39	A	Generic hopane	Hydrocarbon	No	Membranes (prokaryotes)
40	C	Gammacerane	Hydrocarbon	No	Membranes (prokaryotes)
41	B	Generic diasterane	Hydrocarbon	No	Membranes (eukaryotes and prokaryotes)

Figure 1.2: Extrait d'un tableau établi par Parnell et al. (2007) dressant une liste de biomarqueurs intéressants dans le cadre d'une recherche de vie dans notre Système solaire. Un niveau de priorité est attribué à chaque cible.

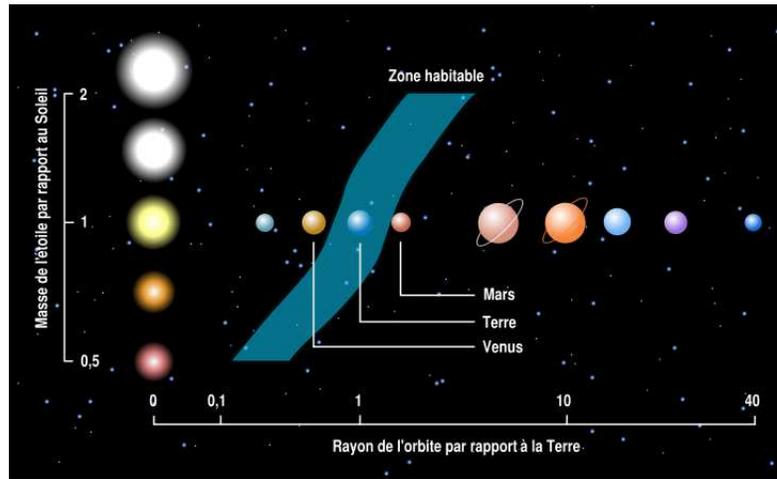


Figure 1.3: Zone habitable en fonction de la taille de l'étoile. Seule la Terre entre dans la zone habitable du Soleil (*Source : Observatoire Paris-Meudon*).

présence ou non d'une atmosphère s'avère être un paramètre essentiel. En ce qui concerne les satellites de nos planètes géantes, on peut aussi considérer que les effets de marées engendrées sont des sources d'énergies considérables qui entraînent une activité géologique importante pouvant contrebalancer l'éloignement par rapport au Soleil. De plus, la zone d'habitabilité n'est pas fixe dans le temps, elle est intimement liée au cycle d'évolution de l'étoile considérée. Dans le cas du Soleil par exemple, la zone habitable se retrouvera fortement éloignée lorsqu'il grossira et rentrera dans sa phase de géante rouge : la Terre sera alors englobée dans la zone de trop forte chaleur et n'appartiendra plus au domaine habitable.

Nous allons faire le point sur quelques corps du Système solaire que l'on estime comme dignes d'intérêt d'un point de vue exobiologique.

1.2.2 Mars

Mars, planète tellurique la plus éloignée du Soleil, constitue l'un des objets les plus prometteurs du Système solaire sur le plan de l'exobiologie. La planète rouge qui attise la curiosité des Hommes depuis fort longtemps, a révélé certains de ces secrets au cours des toutes dernières missions spatiales. En retraçant un peu mieux sa géologie, les scientifiques ont appris beaucoup sur son histoire. Il s'avère ainsi que Mars présentait très probablement de l'eau pérenne en surface à ses débuts, alors même que sa dynamo interne était active et son atmosphère plus dense. Elle a donc pu voir la vie émerger à sa surface alors que les conditions étaient plus clémentes. Des preuves de la présence de l'eau par le passé ont été apportées récemment grâce à l'instrument OMEGA de la mission Mars Express, qui a détecté la présence de minéraux hydratés (cf. figure 1.4) dans certaines zones du globe martien (Bibring et al., 2006).

La calotte de glace du pôle Nord, véritables archives de l'histoire climatique de Mars, intrigue aussi les exobiologistes : on peut imaginer que des traces de vie se sont retrouvées emprisonnées dans ces glaces éternelles et témoigneraient d'une activité biologique passée. La mission Odyssey, quant à elle, a permis d'établir une carte de flux de neutrons qui

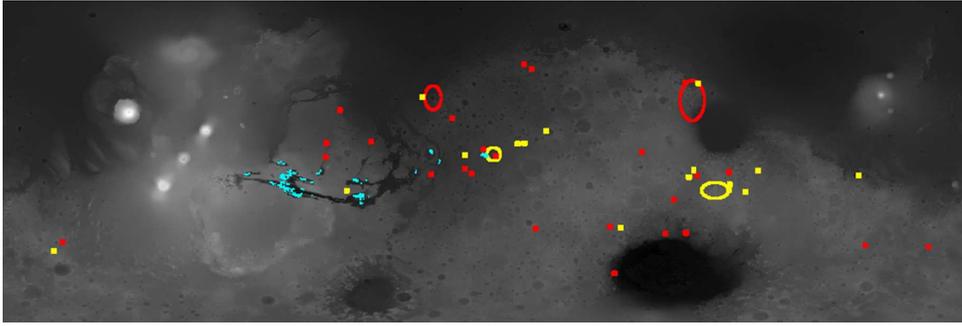


Figure 1.4: Répartition des minéraux hydratés à la surface de Mars. On distingue les phyllosilicates en rouge, les sulfates en bleu et les zones concentrant d'autres types de minéraux hydratés sont représentées en jaune (Bibring et al., 2006).

donne l'abondance en glace d'eau dans le premier mètre du sol martien (Mitrofanov et al., 2002). Ces mesures ont été réalisées à l'aide du détecteur de neutrons couplé au spectromètre gamma embarqué à bord de la sonde. Les mesures effectuées révèlent d'importantes quantités de glace dans le sous-sol martien, avec, en particulier, des concentrations supérieures à 70% au delà de 60° de latitude (cf. figure 1.5). Nous savons donc que de l'eau est encore présente sur Mars mais, en raison des basses températures qui règnent à sa surface, cette eau se retrouve surtout sous forme solide. Il se pourrait donc qu'il existe quelques "niches" où nous pourrions la découvrir sous forme liquide.

Mars conserve, dans tous les cas, un statut d'objet de prime intérêt exobiologique pour les agences spatiales. Malgré les conditions plutôt inhospitalières qui règnent actuellement à sa surface - radiations cosmiques intenses, atmosphère très ténue, nombreux éléments oxydants,...- l'espoir de découvrir une forme de vie primitive à l'abri dans le sous-sol reste vif.

1.2.3 Europe

Europe, le plus petit satellite galiléen de Jupiter avec un rayon légèrement inférieur à celui de la Lune, présente une surface glacée tout à fait particulière. À partir des données obtenues avec les sondes Voyager et Galileo, des modèles ont montré que la structure d'Europe pouvait être une structure différenciée (Anderson et al., 1998) avec un cœur métallique dense, un manteau de roche et une croûte de glace d'eau (cf. figure 1.6). Plusieurs travaux tendent à démontrer qu'un océan d'eau liquide pourrait se trouver sous cette couche de glace (voire par exemple Chyba and Phillips (2002)). Le modèle élaboré récemment par Melosh et al. (2004) propose même des estimations d'épaisseurs, fixant la couche de glace à 15 km d'épaisseur au-dessus d'un océan de 100 km de profondeur. Si la présence de cet océan liquide en subsurface est confirmée, on comprend l'intérêt tout particulier que porte la communauté des exobiologistes à ce petit satellite galiléen. Europe semble présenter, qui plus est, une surface géologiquement jeune qui pourrait attester d'une activité interne encore importante : témoigne de cette activité géologique l'absence de cratères d'impacts en surface qui, on le suppose, ont été "nivelés" par des mouvements de matière. Les nombreux cracks situés à la surface d'Europe pourraient d'ailleurs s'expliquer par la remontée de matériel liquide plus chaud qui se solidifie à la surface (à une température de -150°C environ). Un autre élément qui plaide également

Global Distribution of Water on Mars

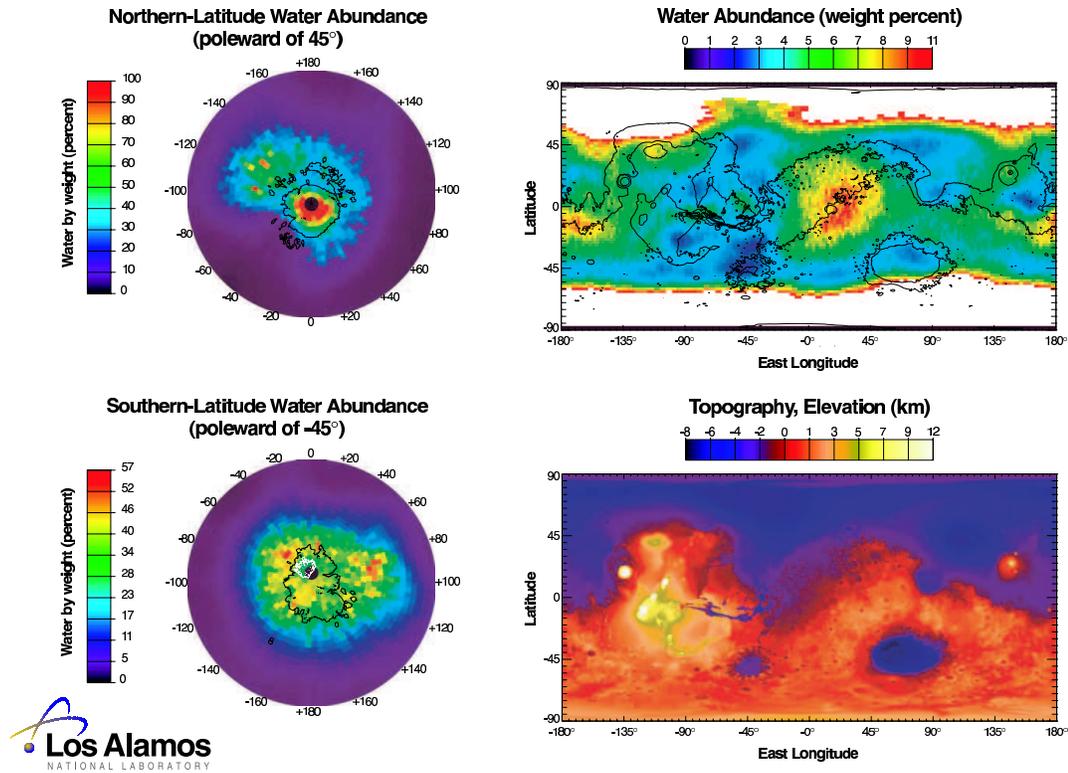


Figure 1.5: Répartition de la glace d'eau à la surface de Mars (*Source : Los Alamos National Laboratory*)

pour l'hypothèse de l'émergence d'une vie sur Europe, c'est le fait que les satellites du système de Jupiter sont certainement constitués en grande majorité de matière carbonée apportée par des météorites (Kargel et al., 2000).

Si les différents scénarios élaborés par les scientifiques à partir des images et des mesures de densité, gravité, activité magnétique, etc., se révèlent exacts, Europe présenterait donc toutes les conditions nécessaires pour qu'une vie ait pu émerger à certains endroits de cet océan : eau liquide, matière carbonée, énergie, conditions de températures autorisant la vie. Des calculs de biomasse potentielle et plusieurs réflexions sur les quantités de matières organiques présentes dans cet océan ont déjà été menées (Raulin, 2005; Reynolds et al., 1983). C'est dire le grand intérêt qu'on porte à ce corps dont on espère qu'il nous permettra de mieux comprendre la vie, son origine et son développement.

1.2.4 Titan

Titan, le plus gros satellite de Saturne, est situé à environ 9,5 U.A. de notre Soleil. On peut se demander quel intérêt cet objet peut représenter sur le plan exobiologique. Or il s'avère que, malgré des températures beaucoup plus basses que sur notre planète, et malgré une absence d'eau liquide de façon permanente à sa surface, Titan présente de très nombreuses analogies avec la Terre, et plus précisément avec ce que l'on imagine

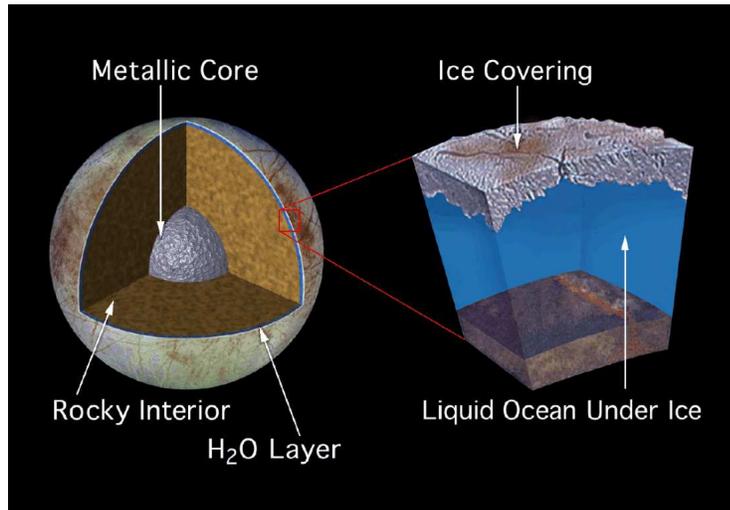


Figure 1.6: Structure interne supposée d'Europe (*Source : NASA, Jet Propulsion Laboratory*)

comme la "Terre prébiotique". En effet, grâce aux sondes Voyager et plus récemment grâce à la mission Cassini Huygens, ce gros satellite a dévoilé des caractéristiques très intéressantes pour les exobiologistes. Tout d'abord, Titan est le seul satellite à posséder une atmosphère dense constituée en majorité d'azote (Niemann et al., 2005), tout comme celle de la Terre. Outre l'azote, cette atmosphère renferme du méthane et de l'hydrogène (Courtin et al., 1995), ce qui fait d'elle une des meilleures atmosphères prébiotiques. Le méthane sur Titan semble d'ailleurs jouer le même rôle que l'eau sur la Terre, même si l'on ne comprend pas encore complètement le cycle complexe qu'il présente (Raulin, 2007). La présence de lacs de méthane et éthane à sa surface a récemment été confirmée (Stofan et al., 2007; Brown et al., 2008), et c'est un élément de comparaison supplémentaire avec la Terre : Titan et la Terre sont, dans l'état actuel nos connaissances, les deux seuls corps du Système solaire à posséder des étendues de liquide à leur surface (cf. figure 1.7). On suppose d'ailleurs qu'il existe un océan d'eau liquide mélangée à de l'ammoniac dans la subsurface. Cet hypothétique océan serait alors compatible avec le développement de la vie sur Titan (Fortes, 2000).

Pour toutes ces raisons, Titan possède un véritable potentiel exobiologique : il présente en effet une chimie organique complexe, une surface variée (montagnes, lacs, dunes,...), et il renferme peut être une grande quantité d'eau liquide. Autant dire que, même si l'on ne découvre aucune preuve de vie, on peut, dans tous les cas, espérer apprendre beaucoup sur l'origine de la vie sur Terre, car ce satellite semble s'apparenter beaucoup à ce qu'était notre Terre avant que la vie n'y émerge.

1.2.5 Encelade

Encelade, satellite de Saturne, fait partie des cibles exobiologiques récentes. Petit corps d'environ 500 km de diamètre, Encelade présente, au niveau de sa région polaire sud, des jets de matière très importants. Ces geysers, constitués de vapeur d'eau et de composés organiques (cf. figure 1.8), suscitent de nombreuses questions quant à la structure et à la dynamique interne de ce satellite. Des observations de l'hémisphère sud ont mis en



Figure 1.7: Comparaison entre un lac sur Titan (à gauche) et le Lac Supérieur (à droite)

évidence une surface jeune et l'existence d'une activité tectonique récente (Porco et al., 2006). Certaines hypothèses faites pour expliquer ces importants dégazages concluent à la présence d'eau liquide à l'interface entre un coeur rocheux et un manteau de glace (Parkinson et al., 2008). L'ensemble de ces éléments positionnent Encelade comme l'un des objets les plus intéressants pour rechercher une forme de vie présente (Parkinson et al., 2007; McKay et al., 2008).

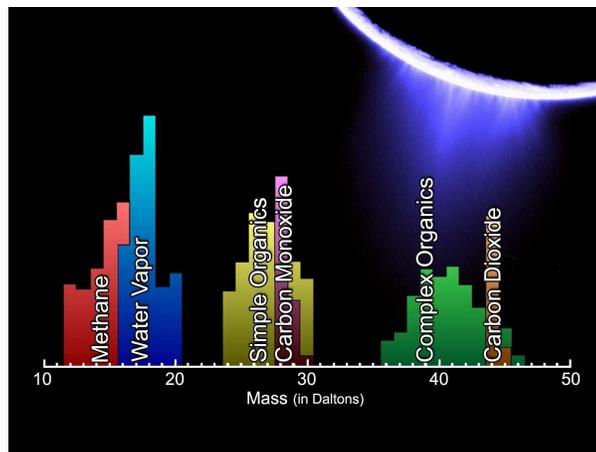


Figure 1.8: Composition des geysers dans l'hémisphère sud d'Encelade (Source : NASA / Jet Propulsion Laboratory / Space Science Institute)

Après ce petit tour d'horizon des deux premières grandes questions qui préoccupent les exobiologistes : que devons nous chercher ? et où devons nous chercher ? , il convient de s'intéresser à une troisième question : comment devons nous chercher ? Le chapitre suivant va donc présenter les moyens de recherche *in situ* qui sont à notre disposition en s'attardant plus particulièrement sur les techniques mises aux points pour les missions passées et à venir.

Chapitre 2

La recherche *in situ* de signatures de vie : missions et techniques

Depuis l'avènement de l'astronautique et le développement de technologies de plus en plus pointues, l'Homme tente d'envoyer des engins aux quatre coins du Système solaire pour mieux le connaître et le comprendre. Un des grands objectifs de ces missions spatiales, parmi tant d'autres, consiste à répondre à cette grande question : y-a-t-il ou y-a-t-il eu de la vie, même à un stade très primaire, ailleurs dans notre Système solaire? L'une des méthodes adoptées pour répondre à cette question consiste à envoyer des engins sur les corps d'intérêt exobiologique afin de rechercher directement *in situ* les signatures d'une vie organique. Les missions, passées et à venir, embarquent des instruments de plus en plus sophistiqués et originaux dans l'espoir d'apporter la preuve formelle d'une vie extraterrestre.

2.1 Les missions passées

La majorité des missions passées de recherche de vie *in situ* se sont intéressées, pour des raisons techniques mais aussi scientifiques, à la planète rouge, notre voisine.

Les toutes premières missions comportant un objectif exobiologique clairement affiché étaient les missions Viking. Lancées toutes deux en 1975, elles ont permis l'analyse de deux sites situés dans deux régions différentes du globe martien : Chryse Planitia pour Viking Lander 1 et Utopia Planitia pour Viking Lander 2. Grâce à un bras articulé, les deux sondes ont pu prélever des échantillons de sol martien afin de les soumettre à l'analyse de trois types d'instruments destinés à détecter la présence de vie organique (cf. figure 2.1). La première expérience nommée "Pyrolytic Release", avait pour objectif de mettre en évidence une assimilation de CO₂ par des organismes autotrophes contenus dans les échantillons de sol, c'est-à-dire mettre en évidence une vie utilisant la photosynthèse biologique. Les résultats obtenus à partir de plusieurs essais ne conduisent malheureusement pas à une conclusion univoque.

"Gas exchange", le second instrument, devait permettre la détection de gaz rejetés par des micro-organismes. Le principe consistait à mettre un échantillon de sol en contact avec une solution nutritive et analyser les gaz se dégageant alors de cet échantillon à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse (CPG-SM).

Là encore, les résultats sont ambigus : les gaz produits semblent ne pas pouvoir provenir d'une activité biologique.

Enfin, la troisième expérience, "Label Released", très similaire à la précédente, consistait à suivre le dégagement de CO_2 (produit par l'échantillon) dont les atomes de carbone contenus dans le liquide nutritif étaient radioactifs. Une fois de plus, les résultats sont sujets à controverse et animent encore de nos jours de nombreux débats.

Comme on le voit, ces trois expériences n'ont pas apporté de manière univoque la preuve d'une présence d'organismes vivants dans le sol martien. Même si certains scientifiques ont pu voir dans certains résultats d'expériences la mise en évidence d'une vie martienne, il s'avère que les phénomènes constatés peuvent aussi bien être attribués à des réactions "non-biologiques". En dehors de ces trois expériences, le sol martien a été analysé par un CPG-SM afin d'identifier les composés qu'il renfermait. Cette composition a démontré une absence marquée de composés organiques. L'instrument, calibré pour avoir une sensibilité de l'ordre de 10^{-9} g de C par g d'échantillon, n'a détecté aucune molécule.

Il faut cependant souligner que tous les échantillons analysés provenaient de la surface de Mars, laquelle est continuellement bombardée par le rayonnement solaire et le rayonnement galactique. L'espoir de découvrir de la matière organique sur Mars réside donc dans la constatation évidente que la subsurface est plus propice au développement et à la survie d'organismes dans la mesure où elle est protégée des rayonnements.

Ainsi, les missions Viking, bien que très riches en informations par ailleurs, n'ont pas réussi à lever le mystère sur la présence ou non de vie sur Mars.

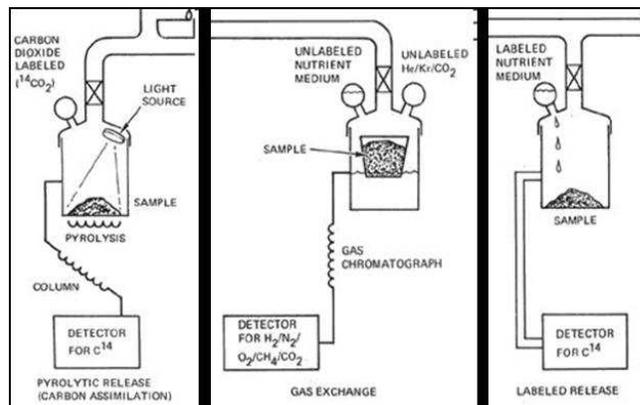


Figure 2.1: Schémas exposant les principes de fonctionnement des trois instruments d'exobiologie embarqués à bord des sondes Viking : Pyrolytic Release, Gas exchange et Label Released (*Source : www.nirgal.net*)

Quelque peu découragée par ces résultats peu convaincants, l'agence spatiale américaine va laisser en suspens les missions à caractère purement exobiologique pour privilégier des missions utilisant des instruments plus orientés sur des études météorologiques et géologiques. Certes, découvrir de l'eau et démontrer la présence de conditions favorables à l'émergence d'une vie resteront en filigrane dans les objectifs des diverses missions d'exploration de la surface de Mars, mais ce n'est que depuis peu qu'on élabore à nouveau des missions clairement identifiées comme étant à vocation exobiologique (cf. paragraphe 2.2). On peut tout de même citer les missions Pathfinder Sojourner et Mars Exploration Rover

(MER) qui, même si elles ne recherchaient pas des signes de vie sur Mars, ont apporté de nombreuses informations quant aux conditions environnementales présentes à la surface et donc directement liées à la notion d'habitabilité de la planète.

Une mission européenne a toutefois abordé cette grande question de la vie sur Mars en affichant clairement son ambition de découvrir pour la première fois des traces de vie martienne : l'atterrisseur Beagle2 de la mission Mars Express. Beagle2 avait à son bord divers capteurs exobiologiques conçus pour détecter des signatures de vie martienne telles que la présence d'eau, de matière carbonée ou de méthane (Sims et al., 2000). Cette sonde, qui a été lancée de Baïkonour en 2003, a malheureusement vu son atterrisseur s'écraser à la surface de Mars pour des raisons qui restent obscures. Seul son orbiteur a pu mener à bien sa mission.

2.2 Les missions à venir

Découvrir des traces de vie présente ou passée sur d'autres corps du Système solaire s'inscrit de nouveau parmi les grands challenges que souhaitent relever les agences spatiales. Plusieurs missions allant dans ce sens sont à l'étude pour les années à venir. Mars reste l'objectif premier car il constitue le corps le plus facilement accessible pour découvrir des premières traces d'une vie extraterrestre. Cependant, suite à la réussite de la sonde Cassini Huygens, de nouvelles missions émergent avec, pour objectifs, des corps bien plus lointains (tels que Titan ou Europe).

La mission Phoenix (cf. figure 2.2) est la première mission du programme "Scout" de la NASA. La sonde s'est posée sur Mars en mai 2008 et les communications avec la Terre se sont arrêtées le 2 novembre 2008. L'un des objectifs de cette mission consiste à étudier si la vie peut, ou a pu, émerger dans le sol polaire martien en évaluant son habitabilité et en recherchant des signatures de vie organique à l'interface entre le sol et la glace (Smith and Phoenix Science Team, 2007). Doté d'un bras foreur, l'engin va pouvoir creuser des tranchées de 50 cm de profondeur et analyser des échantillons martiens inédits. Phoenix n'est pas conçu pour détecter des organismes vivants mais possède tout de même un microscope à force atomique capable d'observer des objets de l'ordre d'une centaine de microns, comme par exemple une bactérie. La mission a été réalisée avant tout dans le but d'apporter des réponses sur l'habitabilité de la planète... la détection directe de l'existence du vivant sur la planète serait un "bonus" inespéré.

Une autre mission américaine à destination de Mars est planifiée pour un lancement durant l'année 2009 : Mars Science Laboratory (MSL) (Vasavada and MSL Science Team, 2007). Cette mission fait suite au succès des rovers Spirit et Opportunity et elle sera constituée d'un rover d'une dimension bien supérieure à ces deux derniers (cf. figure 2.3). Mars Science Laboratory sera chargé de prélever des échantillons de sol et sous-sol afin de tenter de détecter des composés organiques ou des conditions environnementales qui auraient permis l'émergence de la vie sur Mars. Une des caractéristiques principales du rover sera sa grande mobilité. La mission telle que définie pour le moment, prévoit une durée de fonctionnement de 2 ans (soit 1 année martienne) à la surface de la planète avec

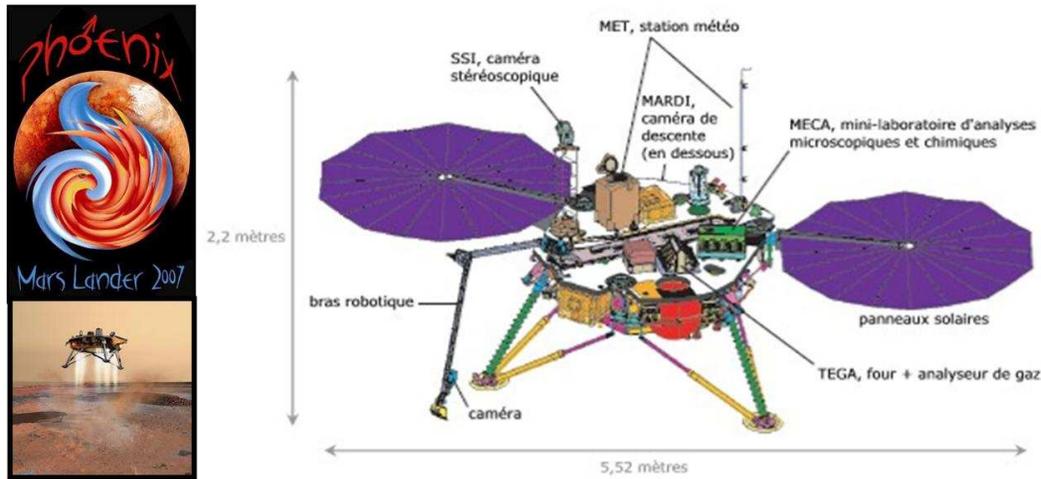


Figure 2.2: Schéma de la sonde Phoenix présentant les différents instruments à son bord (à droite), accompagné du logo de la mission et d'une vue d'artiste de l'atterrisseur se posant à la surface de Mars (à gauche)

un déplacement minimum de 50 km au cours de l'exploration. Ceci permettra d'étudier plusieurs sites afin de multiplier les occasions d'effectuer des analyses positives et riches en informations.

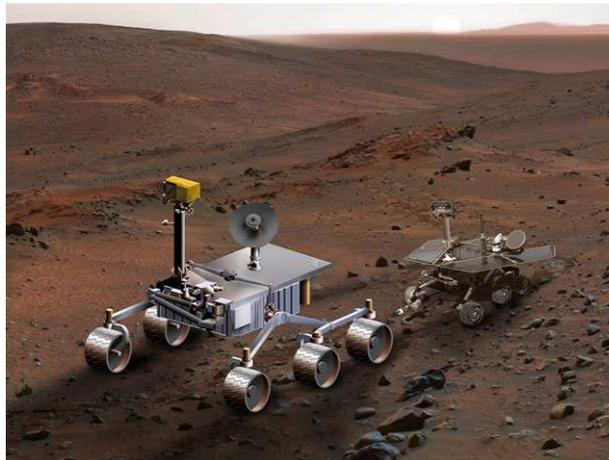


Figure 2.3: Vue d'artiste du rover MSL comparé à l'un des rovers MER

L'agence spatiale européenne s'intéresse elle aussi à la planète Mars. Dans le cadre de son programme Aurora (programme d'exploration du Système solaire), elle prévoit le lancement d'une mission baptisée "ExoMars" pour 2013 (cf. figure 2.4) qui comprendra (Vago et al., 2008) :

- un rover dont la plateforme d'instruments à vocation "exobiologique", dénommée "Pasteur", aura pour mission de rechercher des traces de vie présente ou passée dans le sous-sol martien
- un atterrisseur muni de la plateforme "Humboldt" contenant un ensemble d'instru-

ments géophysiques et environnementaux qui permettront d'étudier l'habitabilité de la planète et de définir de manière précise les dangers qu'elle présente pour une future mission habitée.

Dans les premiers instruments sélectionnés pour former la plateforme "Pasteur", figurent :

- un microscope IR pour examiner les échantillons collectés et caractériser leur structure et leur composition,
- un diffractomètre à rayons X pour déterminer leur composition minéralogique précise,
- un instrument Raman-LIBS (Laser-Induced Breakdown Spectroscopy) pour définir leur géochimie,
- un CPG-SM pour tenter de détecter des molécules organiques et effectuer des analyses atmosphériques,
- et un instrument dénommé "Life Marker Chip" (LMC) (Laan et al., 2006) qui est un instrument à base de biopuce à anticorps.

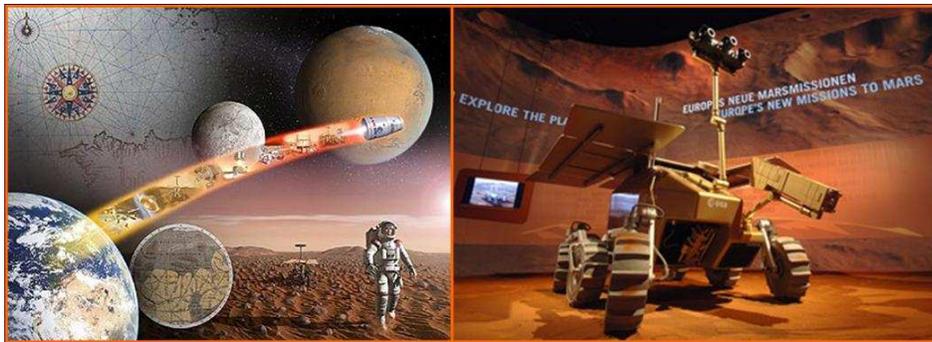


Figure 2.4: Composition artistique pour la promotion du programme Aurora (à gauche) et une impression d'artiste du rover Pasteur de la mission ExoMars (à droite)

Les agences spatiales internationales unissent leurs efforts pour préparer des missions d'exploration ambitieuses vers les planètes géantes et leurs satellites. On peut notamment s'attarder sur deux missions qui sont en concurrence pour les années à venir : Titan Saturn System Mission (TSSM) et Europa Jupiter System Mission (EJSM).

TSSM est une mission très ambitieuse qui résulte de la fusion de la mission TandEM (Titan and Enceladus Mission) de l'ESA avec la mission Titan Explorer de la NASA. TSSM affiche trois objectifs principaux :

- explorer Titan afin de déterminer ses similitudes et différences avec la Terre,
- mieux comprendre la chimie organique se déroulant sur Titan,
- explorer Encelade et la magnétosphère de Saturne.

Le potentiel exobiologique de ces corps du Système solaire sera donc étudié attentivement grâce à l'utilisation de trois types d'engins : un orbiteur, une montgolfière (cf. figure 2.5) et un atterrisseur. La montgolfière et l'atterrisseur sont tout particulièrement destinés à l'exploration en profondeur de l'atmosphère et la surface de Titan.

La mission EJSM est l'évolution à l'échelle internationale de la mission Laplace étudiée par l'ESA dans le cadre de son programme Cosmic Vision 2015-2025. Elle a pour objectif de réaliser une étude approfondie d'Europe et du système de Jupiter en accordant une



Figure 2.5: Vue d'artiste de la montgolfière de la mission TSSM sur Titan

importance toute particulière à la question de l'habitabilité. La surface de glace d'Europe donne lieu à de nombreuses théories quant à sa structure interne qui pourrait renfermer un océan liquide... et qui dit eau, dit possibilité de vie (Prieto-Ballesteros et al., 2008). Cette mission se propose donc d'aller étudier la structure de ce satellite de plus près. Pour ce faire, elle sera certainement dotée de trois orbiteurs : un orbiteur pour Europe (JEO) (cf. figure 2.6) conçu par la NASA, un orbiteur destiné à la planète Jupiter (JPO) réalisé par l'ESA, et un orbiteur de la JAXA (agence spatiale japonaise) pour étudier la magnétosphère de Jupiter (JMO).



Figure 2.6: Une vue d'artiste de l'orbiteur JEO prévu pour la mission EISM

L'ensemble de ces missions nous permettra peut-être de répondre dans le quart de siècle à venir à la grande interrogation : y-a-t-il ou non de la vie quelque part ailleurs dans notre Système solaire ? Toutes s'appuient sur des technologies de plus en plus pointues et de plus en plus fiables. Les techniques d'atterrissage ne cessent de s'améliorer, notamment avec les récents succès des sondes américaines, et la connaissance que nous avons du Système solaire ne cesse de s'enrichir grâce aux différentes missions d'exploration qui voient le jour. Les missions passées nous aident à mieux définir ce que doivent être nos objectifs, ce que nous pouvons espérer découvrir et où faire nos recherches. Ainsi, les missions futures disposeront d'instruments conçus jusque dans les moindres détails pour donner des réponses univoques afin de ne pas renouveler les résultats décevants apportés par les sondes Viking. Les échantillons seront analysés par divers instruments ce qui permettra de confirmer les résultats via plusieurs aspects convergents.

Toutes ces missions ne sont, pour l'instant, que des missions robotiques, mais les agences spatiales envisagent de plus en plus sérieusement la préparation de nouvelles missions habitées où l'Homme pourrait apporter son discernement quant aux échantillons à analyser et ainsi faire franchir un nouveau pas à l'exploration planétaire. En attendant le passage à cette étape supérieure, de nouveaux instruments toujours plus sensibles et miniaturisés sont en cours de développement, tels que les biopuces dont la conception et le fonctionnement sont longuement détaillés dans le chapitre suivant.

Chapitre 3

Un instrument d'analyse prometteur : la biopuce

3.1 Qu'est-ce qu'une biopuce ?

Mon travail s'articule autour du développement d'un outil appelé biopuce. Comme son nom le suggère, une biopuce est un instrument miniaturisé et sensible qui permet la détection d'un grand nombre de molécules cibles grâce à l'utilisation de sondes biologiques. Ces sondes, aussi appelées ligands, sont immobilisées sur un support solide, en verre, en silicium ou en plastique, dont les dimensions maximales correspondent globalement à celles d'une lame de microscope. Des centaines, voire des milliers, de ligands différents peuvent être fixés sous forme de petits îlots sur une seule biopuce, chaque îlot (ou "spot") ayant pour cible une molécule ou une famille de molécules particulière. Cette technique permet ainsi d'identifier un vaste panel de molécules en une seule analyse et avec un seul et même outil.

Les premières biopuces développées ont été les biopuces à ADN. Elles permettent d'étudier l'expression des ARN messagers cibles et ont notamment permis de décrypter l'ensemble du génome humain. Elles sont massivement utilisées dans le domaine du diagnostic médical et constituent des outils essentiels pour l'identification de maladies génétiques et l'établissement de signatures moléculaires caractéristiques de certains types de tumeurs.

Parallèlement au développement de ces puces centrées sur notre génome, un autre type de biopuce a vu le jour : les biopuces à protéines. L'analyse protéomique peut notamment fournir des informations précieuses complémentaires à celles obtenues par les puces à ADN. Ce nouveau type de biopuce ouvre aussi de grandes perspectives dans d'autres domaines tels que l'environnement ou l'exploration spatiale qui nous intéresse ici.

3.2 Les étapes de la réalisation

On peut schématiser la conception d'une biopuce autour de 4 étapes clés récapitulées dans le schéma figure 3.1 :

1. le choix du type de ligands,
2. le choix du type de fixation du ligand sur le support, ce que l'on appelle le greffage,

3. la sélection du mode de dépôt,
4. le choix du mode de détection.

La réalisation d'un tel instrument forme un tout et il faut souligner que les choix faits pour une étape se répercutent inévitablement sur les étapes suivantes. Il faut donc penser la conception de la biopuce dans son ensemble et toujours conserver une vue globale de l'instrument.

1. Le type de ligand doit être choisi en fonction de l'utilisation prévue de la biopuce. Ce sont les "détecteurs" de l'outil, ils sont donc directement liés à la nature des molécules cibles visées. Parmi les ligands les plus courants, on peut citer l'ADN, les aptamères et les anticorps. Chaque ligand a sa structure propre et la réalisation d'une biopuce demande, pour chacun, des adaptations prenant en compte les caractéristiques particulières qu'il présente.

2. La liaison du ligand sur le support peut se faire soit par diffusion, soit par adsorption, soit par affinité, soit par liaison covalente. La mise en place d'une interface peut aussi être envisagée car, en fonction de sa nature, elle peut présenter divers intérêts selon le cas étudié et permettre par exemple un gain de stabilité du ligand ou une augmentation de sensibilité de l'instrument. Le choix du mode de greffage conditionne alors le choix du type de support et la sélection de l'interface (le cas échéant). Le degré de stabilité de la liaison, l'orientation du ligand (aléatoire ou orientée), le seuil de sensibilité sont autant d'éléments qui guident le choix et conduisent à la mise en place de tel ou tel mode de fixation.

3. Le dépôt des ligands sur la surface choisie est une étape délicate qui peut être réalisée selon diverses méthodes directement liées à l'appareillage. L'objectif est de déposer de très petits volumes, inférieurs à 100 nL, espacés de manière régulière afin de former une sorte de grille de ligands ou chaque dépôt va détecter un type de molécule. Ce système permet de détecter un grand nombre de molécules différentes sur une petite surface. Pour assurer un meilleur contrôle des résultats, on réalise ce que l'on appelle des "replicate" c'est-à-dire que l'on dépose le même type de ligand plusieurs fois. L'homogénéité des spots, c'est-à-dire des "îlots" de solution de ligands, constitue un critère très important dans la sélection de l'appareillage. La réalisation de ces spots peut se faire par contact direct avec le support en utilisant de fines aiguilles creuses ou pleines, ou par dépôt de très fines gouttelettes par projection ou microcapillarité. Une attention toute particulière doit être apportée à la sélection du tampon, de la "matrice" dans laquelle se trouve le ligand pour le dépôt : elle est le garant de sa stabilité au cours de l'opération.

4. Plusieurs modes de détection existent pour déterminer si le complexe ligand/cible s'est formé ou non. La méthode la plus utilisée à l'heure actuelle consiste en une détection de fluorescence : le ligand est marqué avec une sonde fluorescente qui émet un signal sous excitation laser lorsqu'il y a reconnaissance de la cible. Le marquage radioactif ou la chimioluminescence peuvent aussi être utilisés pour les biopuces mais présentent l'inconvénient d'un manque de sensibilité. Enfin, un nouveau système de détection basé sur un système optique a été développé : la résonance des plasmons de surface ou SPR

(Surface Plasmon Resonance). Cette technique consiste à mesurer la variation de l'indice de réfraction du support quand la cible se fixe au ligand (Vandenabeele-Trambouze et al., 2005). Elle présente deux avantages principaux : le temps de préparation est réduit car il n'y a pas de marquage des ligands, et l'analyse est très rapide et peut donc être effectuée en temps réel.

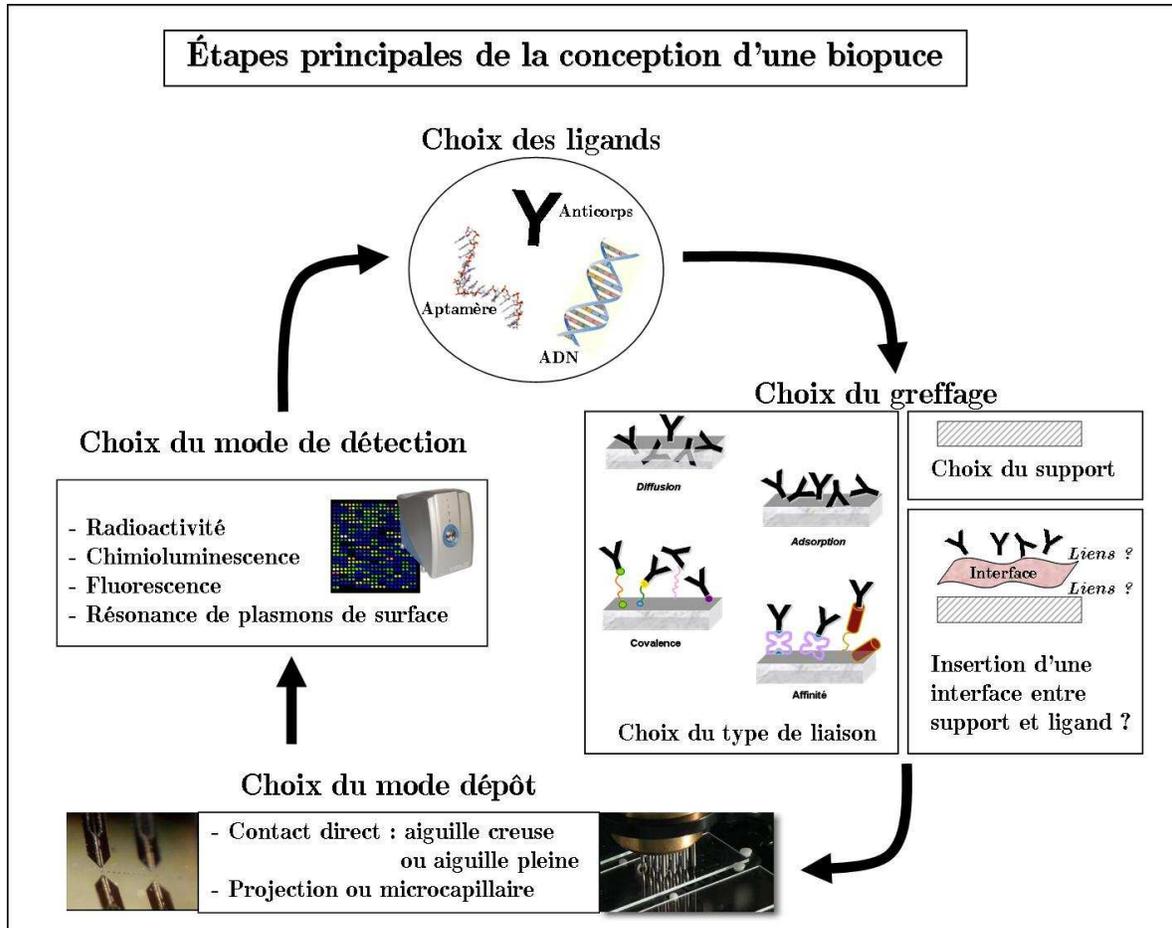


Figure 3.1: Étapes principales de la réalisation d'une biopuce

3.3 Intérêt de cet instrument pour le spatial

Les biopuces n'ont encore jamais été utilisées dans le domaine spatial, mais leur utilisation dans ce domaine revêt plusieurs intérêts. Tout d'abord, la biopuce est un instrument extrêmement miniaturisé, léger et peu volumineux. Il permet d'analyser une grande quantité de molécules, aux propriétés très variées, à partir d'un seul échantillon et en une seule et unique analyse. Il offre ainsi un gain de temps et de matière tout en produisant une analyse très complète. Les qualités de sensibilité et de spécificité propres aux ligands, tout particulièrement pour les anticorps, placent les biopuces au rang des instruments les plus efficaces pour une détection de molécules en quantités très faibles au sein d'un échantillon complexe. La très haute sensibilité de ce détecteur est un atout considérable pour

la recherche de molécules organiques extraterrestres car celles-ci peuvent n'être présentes qu'à l'état de traces, voire d'ultra-traces. La haute spécificité minimise les risques de faux résultats et d'ambiguïté sur la nature de la molécule détectée.

Il est donc assez facile de comprendre l'intérêt que portent les agences spatiales à ce petit instrument en plein essor dans les domaines médicaux et environnementaux.

3.4 Description du fonctionnement *in situ*

Pour fonctionner, lors d'une mission d'exploration sur Mars par exemple, la biopuce aura dans un premier temps besoin d'un échantillon. Cet échantillon doit se présenter sous forme liquide. Pour analyser un fragment de sol, il faut donc prélever un échantillon solide, le broyer finement, puis extraire les molécules qu'il contient à l'aide d'un solvant aqueux ou organique. Le solvant est ensuite récupéré et filtré pour être mis en contact avec la biopuce. Le contact entre la solution et les différents "spots" peut avoir lieu dans une chambre à échantillon. Le principe est simple : la biopuce et la solution sont enfermés dans une sorte de boîtier et un mouvement est appliqué au liquide de manière à le faire passer sur l'ensemble des spots. Si des molécules cibles sont contenues dans la solution, elles se retrouvent alors liées aux ligands qui leur correspondent lorsqu'elles passent sur le spot concerné. À la fin de cette phase d'incubation, la solution est vidée et la biopuce lavée. On procède alors à la détection : les spots qui renvoient un signal attestent de la présence de telle ou telle molécule (ou famille de molécules) dans l'échantillon de départ. Le schéma figure 3.2 récapitule ce processus de fonctionnement.

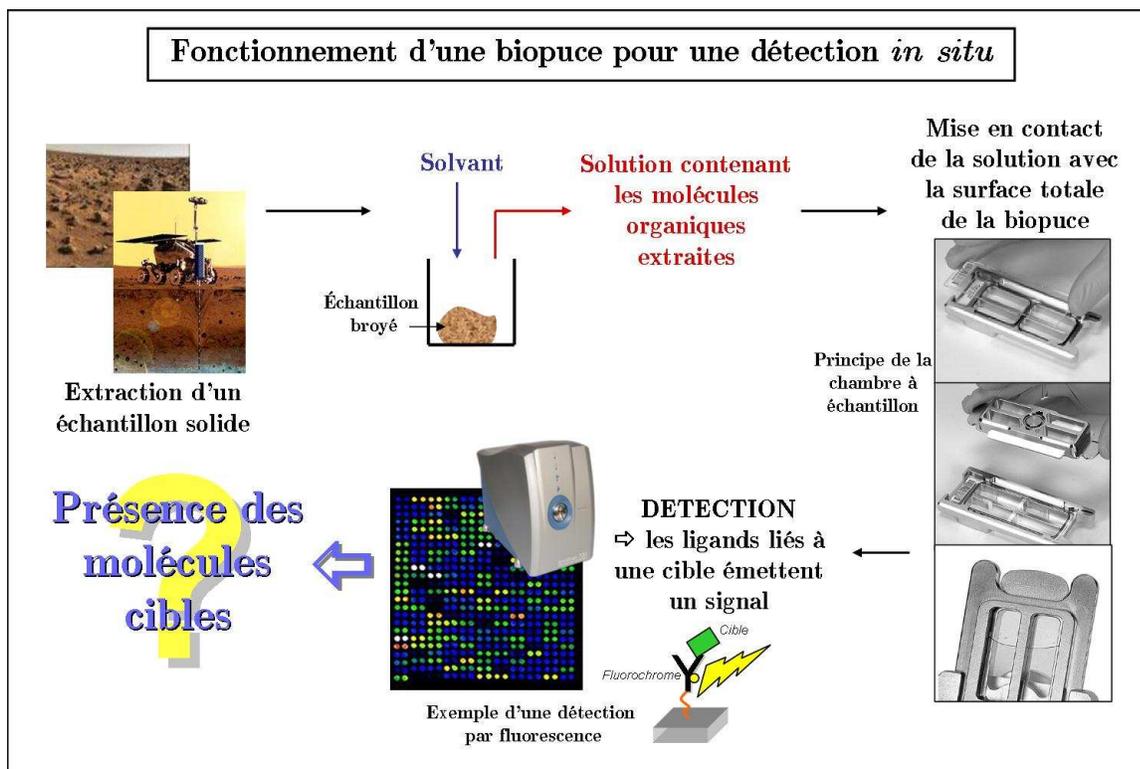


Figure 3.2: Fonctionnement d'une biopuce analysant un extrait de roche lors d'une mission d'exploration d'un corps du Système solaire tel que Mars par exemple

3.5 Quelques choix stratégiques pour une biopuce spatiale

Pour réaliser une biopuce spatiale qui va devoir faire face à un ensemble de contraintes, notamment environnementales, très rudes, plusieurs choix stratégiques de conception semblent judicieux à nos yeux.

Comme nous l'avons présenté au chapitre 1, le panel de molécules cibles pour une recherche de traces de vie est très large. Dans ce contexte, une biopuce mixte présenterait un avantage incontestable. On entend par biopuce "mixte", la réalisation d'une biopuce regroupant sur un même support deux types de ligands différents. On peut imaginer l'utilisation d'un ligand fonctionnant en milieu aqueux associé à un ligand permettant l'analyse de molécules extraites en milieu organique. Tirer partie de cette complémentarité entre certains ligands tels que les anticorps et les aptamères, ou encore les anticorps et les MIPs (Molecular Imprinted Polymers) tel que suggéré dans Sims et al. (2005), offre un réel potentiel pour élargir au maximum la diversité des molécules détectables par une seule et même biopuce.

L'interface entre le support et les ligands doit être choisie de manière à assurer une excellente stabilité et reproductibilité. Elle peut aussi contribuer à l'augmentation de la sensibilité et à la diminution des risques de contamination si elle possède une action antimicrobienne, comme par exemple des dendrimères dérivés de la lysine (DGL) développés à l'IBMM de Montpellier (Brevet WO/2006/114528).

La fixation des ligands sur l'interface peut être optimisée pour obtenir une rentabilité maximale et par là même une sensibilité maximale pour chaque spot. Une fixation orientée s'impose bien sûr comme la meilleure solution : ce type de fixation permet de s'assurer que chaque ligand présentera son site de reconnaissance aux cibles potentielles qui pourront y accéder facilement. Ainsi, on évite une perte d'efficacité de reconnaissance observée avec des fixations aléatoires qui voient une partie de leurs ligands se coller au support diminuant les chances de former des complexes ligands/cibles.

La nature des liaisons support/interface et interface/ligands joue un rôle dans la robustesse du dispositif. Pour supporter les voyages spatiaux, la biopuce a besoin de liaisons fortes entre ces différents constituants. Il existe 4 types de liaisons : liaison covalente, adsorption, affinité et diffusion. Parmi les combinaisons possibles, le modèle privilégiant des liaisons covalentes, donc des liaisons fortes, semble le plus adéquat. C'est un modèle stable, robuste et reproductible qui s'avère par conséquent adapté aux exigences de conception d'une biopuce à vocation spatiale.

Enfin, la détection par fluorescence est une technique bien maîtrisée, qui a fait ses preuves. Elle semble donc la plus indiquée dans ce contexte. Cependant, elle nécessite la miniaturisation du détecteur qui, en l'état actuel, n'est pas spatialisable. Les nouvelles techniques de détection ne sont donc pas à écarter complètement car elles peuvent se révéler intéressantes si leur fiabilité est confirmée.

L'ensemble de ces réflexions et la mise en évidence de ces choix stratégiques sont le fruit des premiers travaux engagés par notre équipe dans le cadre du projet de biopuce spatiale BiOMAS (Biochip for Organic Matter Analysis in Space), qui est décrit dans la partie suivante.

Conclusion de la première partie

La vie est un concept difficile à définir. Les constatations faites par rapport à notre exemple du vivant font ressortir quelques caractéristiques intéressantes qui pourraient nous aider à discerner des signes de vie extraterrestre. On note, en particulier, les propriétés d'homochiralité et de déséquilibre isotopique qui peuvent distinguer sur Terre le monde vivant du monde inerte. Outre la définition de la vie, son origine soulève aussi de nombreuses interrogations : un solvant, tel que l'eau, et une chimie tétravalente, à l'image de notre chimie carbonée, semblent des ingrédients nécessaires à son émergence et à son développement.

Les zones de notre Système solaire qui pourraient abriter de l'eau liquide sont donc étudiées attentivement par les exobiologistes : elles entrent dans ce que l'on définit comme la zone habitable. Quatre corps sont tout particulièrement placés au centre des attentions : Mars, sur laquelle de l'eau pérenne était très probablement présente à ses débuts, Europe, qui renferme peut-être un océan dans sa subsurface, Titan, qui présente une chimie complexe et possède des lacs d'hydrocarbures à sa surface, et Encelade, dont les geysers constitués d'eau et de composés oxygénés suscitent bien des interrogations.

Les diverses missions robotiques, passées et à venir, tentent de percer les mystères de ces corps en espérant découvrir des traces d'une vie, présente ou passée. Les instruments à leur bord, qui se veulent de plus en plus performants et sensibles, recherchent des marqueurs organiques, structuraux et d'évolution, qui permettraient d'apporter la preuve irréfutable de l'existence d'un monde vivant, ailleurs dans le Système solaire.

Un nouvel instrument, actuellement très utilisé dans le domaine médical, suscite de plus en plus l'intérêt des agences spatiales : les biopuces. Dispositif miniaturisé et extrêmement sensible, une biopuce conçue pour le spatial offrirait un potentiel de détection très puissant. Cet instrument permet en effet de détecter jusqu'à plusieurs milliers de molécules, aux propriétés différentes, en une seule et même analyse. Notre équipe s'est donc penchée sur les qualités de la biopuce et tente d'optimiser sa conception pour produire un instrument fiable et robuste face aux contraintes et aux enjeux analytiques d'une mission spatiale.

Deuxième partie

Le projet BiOMAS : développer une
biopuce adaptée au spatial

Introduction de la deuxième partie

Le projet BiOMAS (Biochip for Organic Matter Analysis in Space) a vu le jour à l'automne 2005 grâce à un financement de 3 ans accordé par le Centre National d'Études Spatiales (CNES). Il vise à développer une biopuce adaptée à une mission spatiale, en démontrant, dans un premier temps, que cet instrument peut être utilisé dans ce contexte particulier. Le projet s'appuie en premier lieu sur une collaboration établie de longue date entre un membre du LAB (Laboratoire d'Astrophysique de Bordeaux), Michel Dobrijevic, et un membre de l'IBMM (Institut des Biomolécules Max Mousseron) de Montpellier, Odile Vandenberghe Trambouze. Leur expertise reconnue en matière de détection de petites molécules dans la matière extraterrestre, à l'aide d'anticorps, représente une base solide à partir de laquelle a émergé ce projet de biopuce spatiale.

L'objectif scientifique principal qui motive le développement de cette biopuce est la découverte de vie, présente ou passée, ailleurs dans le Système solaire. Développer un outil ultra-sensible, capable de détecter des molécules et familles de molécules aux propriétés variées à partir d'un échantillon unique, constitue le défi que relève l'équipe de BiOMAS à travers ce projet.

Projet lancé par une équipe modeste, BiOMAS compte aujourd'hui de nombreux partenaires. Son envergure pluridisciplinaire a favorisé la mise en place de plusieurs collaborations et la prise de contact avec divers industriels. À ce jour, chimistes, biochimistes, planétologues, physiciens nucléaires, experts en matériaux, travaillent de concert pour faire avancer le projet dans les meilleures conditions.

L'analyse de la résistance de la biopuce face au processus de spatialisation, qui est le sujet de ma recherche, a demandé la mise en place de deux stratégies d'étude.

La première concerne le support de la biopuce. Elle a consisté à élaborer un cahier des charges regroupant les divers critères que doit satisfaire le matériau. Ce cahier des charges s'avérait être un élément indispensable à la sélection argumentée d'un matériau adapté à la réalisation d'une biopuce "spatiale". Il a constitué un guide pour la mise en place de plusieurs campagnes d'essais.

La seconde stratégie a porté sur les éléments biologiques de la biopuce. Il n'était alors pas question de sélection mais plutôt d'une définition des conditions de fonctionnement aux limites des ligands nécessaires à la reconnaissance des molécules cibles. Cette étude est née de la constatation d'un manque flagrant de données sur le sujet.

Concevoir un instrument capable de résister à l'ensemble des contraintes d'une mission spatiale constitue un véritable challenge. Un grand nombre de ces contraintes pèsent sur les différentes étapes du développement et les deux stratégies évoquées précédemment constituent des atouts indispensables pour mettre au point un instrument réellement adapté à une spatialisation. L'objectif premier est d'assurer une fiabilité et une robustesse optimale face aux conditions extrêmes dans lesquelles il devra évoluer. Le second objectif est de

fournir des éléments permettant de mieux définir les limites et les contraintes d'utilisation de ce type d'instrument. Il faut noter en effet que plusieurs équipes proposent de concevoir des instruments à base de biopuce (notamment pour ExoMars).

Le premier chapitre de cette partie a pour objectif de présenter le projet BiOMAS dans son ensemble et ses particularités. Le second chapitre s'intéresse plus particulièrement aux contraintes de spatialisation d'une biopuce qui concernent la partie du travail qui m'incombait durant la thèse.

Chapitre 1

Le concept du projet

Dans le cadre de la recherche de signatures de vie extraterrestre, les agences spatiales internationales recommandent l'utilisation d'instruments d'analyse à base de biopuces. Plusieurs projets de ce type ont donc vu le jour ces dernières années afin de développer un outil adapté à une utilisation spatiale, dans l'optique d'une future mission exobiologique. Notre projet BiOMAS s'inscrit dans ce contexte en proposant toutefois une approche quelque peu différente de celle adoptée par les projets internationaux qui émergent actuellement.

1.1 L'objectif : démontrer la faisabilité d'une biopuce pour le spatial

La première étape du projet BiOMAS est de démontrer la faisabilité d'une biopuce pour le spatial. Comme nous l'avons dit précédemment (cf. partie I section 3) , la biopuce est un instrument complexe qui demande d'être adapté à la fois à l'environnement très contraignant d'une mission spatiale et aux objectifs de recherche de molécules variées à l'état de traces. L'objectif clairement affiché du CNES, pour le financement octroyé sur 3 ans, était donc de démontrer que cet instrument était adaptable aux objectifs d'une mission exobiologique.

L'instrument développé doit répondre à des objectifs très différents de ceux affichés pour les analyses médicales pour lesquelles il est actuellement utilisé. Même s'il s'appuie sur ses qualités intrinsèques d'outil miniaturisé aux analyses sensibles et reproductibles, il doit dans notre cas permettre une détection à l'état d'ultratrace et donc atteindre une sensibilité limite encore supérieure. Il doit, qui plus est, s'adapter à la détection de molécules très diverses, y compris les molécules de très faible poids moléculaire, lesquelles n'entrent actuellement pas dans le panel de molécules détectables, de manière sensible, par cette méthode. Un des plus grands challenges dans la conception d'une biopuce "spatiale" consiste à réunir sur un même outil des molécules de reconnaissance (des ligands) qui vont permettre de rechercher à la fois des traces de vie présente, des traces de vie passées et des marqueurs d'évolution chimique. Un important travail de réflexion est à mener pour déterminer l'ensemble des cibles d'intérêt d'un tel projet. Contrairement aux biopuces de diagnostic médical, nous ne savons pas exactement ce que nous recherchons, ni ce que nous sommes susceptibles de détecter : il faut donc fournir un instrument robuste permettant l'analyse simultanée d'une gamme variée de composés, de nature très différente

(hydrosolubles, hydrophobes, de faible et haut poids moléculaire, etc). L'accent doit être mis sur la fiabilité des mesures effectuées pour nous assurer que lors de la détection nous serons en mesure de déterminer sans ambiguïté la molécule détectée et, bien sûr, écarter tout faux-signal dû à une contamination terrestre.

Cependant, les qualités analytiques d'un instrument ne suffisent pas à elles seules à assurer sa faisabilité dans le cadre spatial. Il faut aussi démontrer sa robustesse face à diverses contraintes extrêmes spécifiquement liées au contexte d'une mission hors des conditions clémentes de la Terre. C'est sur cette constatation que s'ancre mon travail : comment développer une biopuce optimisée pour une utilisation spatiale ? Comment conjuguer contraintes environnementales et contraintes analytiques pour réaliser un instrument adapté à sa fonction ? Ce travail passe à la fois par la recherche de matériaux adéquats mais aussi par l'étude des résistances des éléments biologiques, car il s'agit de déterminer le "design" nécessaire et suffisant de l'ensemble protecteur dans lequel notre biopuce pourra fonctionner efficacement.

À travers cette démonstration de faisabilité, le projet BiOMAS a donc deux objectifs étroitement liés :

- développer les potentialités analytiques de l'instrument pour répondre aux objectifs d'ordre exobiologique,
- déterminer les limites de fonctionnement en environnement spatial afin de définir un design optimum et pointer les faiblesses qui demanderont une attention particulière lors de la réalisation du prototype final (en incluant les éléments annexes tels que le module de préparation de l'échantillon, le détecteur de fluorescence, etc).

1.2 Le contexte international

Aucun instrument à base de biopuce n'a encore été utilisé pour une mission spatiale à ce jour. Cependant, les agences spatiales se tournent de plus en plus vers cette technique et envisagent de les intégrer aux instruments embarqués lors des prochaines missions exobiologiques. Ainsi, l'ESA a sélectionné un instrument de réserve nommé "Life Marker Chip" pour la plateforme "Pasteur" du rover ExoMars. De ce fait, plusieurs projets internationaux de développement d'une biopuce à vocation spatiale ont vu le jour.

L'instrument SOLID, pour "Signs Of Life Detector", utilise des anticorps pour détecter des bactéries par méthode ELISA (Parro et al., 2005). Il propose un support en verre et une détection par fluorescence. Un prototype de cet instrument a été breveté et subit à présent divers essais avec des analogues de sol martien tel que le Rio Tinto en Espagne.

MILDI, "Mars Immunoassay Life Detection Instrument", se propose de détecter 10 molécules biologiques (ADN, L-glutamate, PAH, Chaperonin 60, β -galactosidase, peptidoglycan, staphylococcus, lipopolysaccharide, escherichia coli et mycoplasma) à l'aide d'anticorps (Steele et al., 2001a,b; Maule and Steele, 2004). Le système de détection utilise aussi la méthode de fluorescence. Le support, quant à lui, consiste en une lame de verre de 3 mm² recouverte d'une couche de nitrocellulose de 15 μ m.

Le projet SMILE, "Specific Molecular Identification of Life Experiment", envisage la combinaison de deux types de ligands que sont les anticorps et les polymères à empreinte moléculaire pour permettre la recherche de molécules variées : biomarqueurs organiques, molécules chirales, molécules organiques d'origine non-biologique (Sims et al., 2005). Le

principe de biopuce réutilisable a été retenu. Le support de la biopuce est recouvert d'une couche d'environ 50 nm d'or afin de permettre une détection par SPR (Surface Plasmon Resonance) qui consiste à mesurer les variations d'indice de réfraction de la surface dues à la formation du complexe ligand/cible.

On peut noter que tous ces projets, dont l'état d'avancement reste bien imprécis au travers des diverses publications, préconisent l'utilisation d'anticorps en tant que molécules de reconnaissance, ce qui souligne l'intérêt de ces molécules dans ce contexte. Mais on constate que dans les divers articles publiés, les études traitant de la résistance des instruments aux conditions spatiales sont peu nombreuses : ce point, qui n'est souvent même pas abordé, reste donc flou, ce qui démontre le manque de données concernant cet aspect. Les travaux entrepris dans cette thèse permettent de commencer à combler ce manque et intéressent donc l'ensemble de la communauté investie dans cette problématique.

1.3 Notre stratégie : une approche originale

Compte tenu des contraintes identifiées pour l'utilisation d'une biopuce dans les conditions d'une mission spatiale, et aux vues des avancements des projets internationaux consacrés aux instruments utilisant cette technique, deux stratégies pouvaient être envisagées.

- La première consistait à utiliser une biopuce commerciale afin de développer un prototype spatialisable pour l'adapter ensuite aux objectifs analytiques de la mission.
- La seconde était de développer un nouveau type de biopuce dont tous les éléments auraient été optimisés par rapport à un ensemble de contraintes propres à une utilisation pour une mission exobiologique.

Nous avons opté pour cette deuxième approche, À la différence des projets internationaux déjà en cours qui développent leurs instruments majoritairement selon le premier schéma, nous avons opté pour la seconde approche. Certes le positionnement de notre étude sur le long terme présente un inconvénient alors que des projets concurrents à base de biopuce semblent déjà bien avancés. Mais l'avantage de notre stratégie est qu'elle assure le développement d'un instrument réellement adapté à sa fonction et par conséquent fiable et performant.

1.4 Un projet pluridisciplinaire

Une des difficultés inhérentes à la stratégie que nous avons choisie, c'est que nous devons développer les aspects analytiques et de contraintes spatiales en synergie. Pour réaliser un nouvel instrument adapté à sa fonction, les différents acteurs doivent travailler de concert pour assurer une unité et une logique à l'avancement du projet. Et comme le projet BiOMAS allie à la fois des aspects spatiaux et des aspects chimiques et biochimiques, un important nombre de partenaires se trouvent impliqués.

Les aspects chimiques concernant les interfaces support/ligand, les propriétés analytiques de la biopuce (stabilité, sensibilité, reproductibilité) sont développés par l'Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM) de Montpellier. L'équipe possède une solide expertise sur l'utilisation d'anticorps en tant que détecteurs de petites molécules.

Les aspects biochimiques, dont notamment la production d'anticorps spécifiques au projet, sont réalisés au PIOM (Physique des Interactions Ondes-Matière) à Bordeaux.

Les aspects spatiaux comprenant les données planétologiques et l'ensemble des études sur les contraintes spatiales sont gérées par le Laboratoire d'Astrophysique de Bordeaux (LAB).

Plusieurs collaborations ont vu le jour sur différents points de spatialisation :

- l'ensemble des études de résistance aux radiations cosmiques est réalisé avec l'équipe Interface Physique Biologie du CENBG (Centre d'Etudes Nucléaires de Bordeaux Gradignan) dont l'expertise sur la question est très précieuse. Simulation numérique et essais sous faisceau sont deux apports de poids pour l'avancée du projet.
- les aspects de résistance mécanique et thermique des matériaux sont traités en collaboration avec le Laboratoire Génie Mécanique et Matériaux de Bordeaux (LGM²B).

Ainsi les compétences de chacun contribuent au développement concerté de la biopuce au sein d'un projet largement pluridisciplinaire.

Chapitre 2

Comment aborder l'aspect "spatialisation" dans ce projet ?

2.1 La conception d'un instrument pour une mission spatiale : un ensemble de contraintes fortes

Concevoir un instrument pour le spatial n'est pas chose aisée. Des contraintes fortes pèsent sur son design. Loin de l'environnement protecteur de notre planète, il doit faire face à un ensemble de conditions extrêmes qui peuvent porter atteinte à son bon fonctionnement. Et, avant même d'atteindre l'espace, il doit répondre à un ensemble de critères, souvent sévères, propres à la préparation de toute spatialisation.

2.1.1 Un environnement inhospitalier

Au fil des observations et études du Système solaire, la particularité des conditions regroupées sur notre planète est apparue de manière claire et indiscutable. Il faut donc tenir compte du fait que tout dispositif envoyé loin de cet environnement privilégié sera soumis à des contraintes nouvelles souvent délétères ou tout du moins source d'une altération certaine de son bon fonctionnement. L'environnement interplanétaire, tout comme l'environnement de certains objets tels que Mars ou Titan, apparaît sous un jour plutôt inhospitalier face aux conditions terrestres qui bénéficient de la protection de l'atmosphère et d'une dynamique interne capables de nous assurer à la fois des variations de température relativement faibles, des rayonnements cosmiques très fortement atténués, une gravité et une pression adéquates.

Ainsi, le milieu interplanétaire soumet les instruments spatiaux à un ensemble de contraintes fortes que sont : le vide, la microgravité, des fluctuations thermiques extrêmes et des rayonnements divers. S'y ajoutent, à proximité de la Terre, les problèmes créés par la présence d'oxygène atomique qui érode les matériaux des surfaces externes, et la présence d'une multitude de débris et micrométéorites susceptibles d'entrer en collision avec l'appareil spatial.

Les principales contraintes du milieu interplanétaire

Une des premières caractéristiques de l'environnement spatial, c'est le vide poussé correspondant à une pression de l'ordre de 10^{-14} Pa, c'est-à-dire bien inférieure à celle que l'on peut obtenir en laboratoire. Le vide interplanétaire a plusieurs conséquences sur nos activités et en particulier sur l'aspect thermique. L'absence de gaz provoque l'absence de convection et de conduction gazeuse. Les échanges thermiques des instruments spatiaux ne peuvent donc avoir lieu que par conduction dans les structures et par échanges radiatifs entre les surfaces, ce qui est moins efficace. Le vide est aussi à l'origine du phénomène de dégazage des matériaux responsable des problèmes de contamination de surfaces. Dans le cadre du développement d'une biopuce "spatiale" cette contrainte de dégazage devra être étudiée pour vérifier le comportement du support après ce phénomène et surtout pour s'assurer que la contamination induite ne provoquera ni la destruction des ligands, ni l'apparition de faux signal (reconnaissance par les anticorps d'une molécule dégazée).

La microgravité est une autre contrainte du milieu interplanétaire susceptible de poser des problèmes sur un plan biologique et mécanique. Les impacts biologiques et notamment physiologiques sur les astronautes ne sont pas répertoriés de manière exhaustive, cependant on sait que la gravité peut avoir une importance dans le bon déroulement des processus biologiques de notre organisme. Le risque pour une biopuce se situe surtout au niveau de la reconnaissance ligand/cible. Il faut vérifier que la formation du complexe peut bien avoir lieu en conditions de faible gravité.

Le milieu interplanétaire impose aux engins spatiaux des températures extrêmes qui peuvent varier brutalement en fonction notamment de la position de l'instrument par rapport au soleil. Au sein d'un engin spatial, l'amplitude des variations peut être atténuée par l'utilisation de protections thermiques via des matériaux isolants. Cependant, il reste à fixer, dans le cas d'une biopuce, quelle amplitude ne pourra être dépassée, quitte à envisager l'utilisation d'une enceinte contrôlée thermiquement. En effet, ces conditions thermiques extrêmes posent plusieurs questions quant à la viabilité des anticorps, la création de contraintes dans les matériaux pouvant entraîner une modification de géométrie dommageable pour la qualité de la détection, et bien sûr le transport et l'utilisation de liquides.

Les engins spatiaux sont soumis à un ensemble de rayonnements plus ou moins dangereux selon leur nature.

Les rayonnements infrarouges sont d'origine solaire ou terrestre et n'ont que des effets thermiques. Ils ne présentent aucun danger pour un instrument à biopuce qui sera intégré au sein d'une structure métallique et donc protégé de ces rayonnements. On peut avancer les mêmes arguments pour le rayonnement visible qui ne présente pas non plus de danger direct pour la biopuce.

La majorité des flux ultraviolets sont d'origine solaire. Ces rayonnements sont particulièrement néfastes pour les matériaux des surfaces extérieures, car ils rompent les liaisons de certaines molécules. Une fois encore, ils produisent des effets qui ne concernent pas l'instrument biopuce qui se trouvera protégé à l'intérieur de l'engin d'exploration.

Le dernier type de rayonnement, et non le moindre, concerne les radiations cosmiques qu'elles soient d'origine galactique ou solaire.

Focus sur les radiations cosmiques

Les radiations apparaissent comme l'une des contraintes clés dans la conception d'un dispositif spatial. En effet, l'espace est continuellement balayé par des flux de particules chargées qui interagissent avec la matière qu'ils rencontrent. Ces particules constituent particulièrement un danger pour les dispositifs électroniques et les éléments biologiques. À l'heure où l'on envisage de plus en plus sérieusement des missions interplanétaires habitées, la question de la radiobiologie est au coeur des préoccupations et des débats. Dans le cas d'une biopuce, la principale inquiétude concerne la survie des anticorps.

Deux principales sources de radiations. Les deux sources majeures de radiations dans l'espace interplanétaire sont les rayons cosmiques galactiques (Galactic Cosmic Rays : GCR) et les particules énergétiques solaires (Solar Energetic Particles : SEP). Ces rayonnements diffèrent par leur origine, leur nature, leur énergie et leur répartition dans le temps et l'espace.

Le Soleil intervient dans l'environnement radiatif spatial par l'intermédiaire du vent solaire qu'il émet et des éruptions solaires qui peuvent se produire. Ce flux de particules qui s'échappe du Soleil est directement lié à l'activité solaire. Il faut savoir que le Soleil a une activité périodique selon un cycle de 11 ans : chaque cycle peut se diviser en une période de 7 ans d'activité intense et une période de 4 ans d'activité moindre. Ce cycle influe donc directement sur l'intensité des rayonnements.

Le vent solaire est un flux de matière chaude qui s'échappe continuellement de la couronne solaire. Il constitue un plasma peu dense mais très rapide qui se compose principalement de protons et de particules alpha. Les éruptions solaires sont des émissions sporadiques de particules solaires très énergétiques (principalement des protons) qui peuvent durer de quelques heures à quelques jours. Elles sont très dangereuses pour les hommes et les instruments et malheureusement complètement imprévisibles.

Les SEP sont donc constituées de protons à plus de 98%, de particules alpha et d'un très faible nombre d'ions lourds, et interviennent de manière temporaire et discontinue dans l'irradiation des instruments spatiaux. On peut noter que l'énergie de ces particules décroît avec leur distance au Soleil.

Le rayonnement cosmique galactique est un rayonnement continu dont l'origine, encore assez mal connue, se situe hors du Système solaire. On suppose que ces rayons sont produits dans notre Galaxie et que le mécanisme d'accélération des particules pourrait provenir des ondes de choc créées par l'explosion des supernovae (Axford et al., 1977; Krymskii, 1977; Hörandel, 2008). Ces rayons, qui sont en fait des flots de particules, se composent majoritairement de protons ($\sim 90\%$), de particules alpha ($\sim 8\%$) et d'ions lourds ($\sim 2\%$). Ces ions lourds, bien qu'en faible quantité, peuvent être très dangereux pour les véhicules spatiaux. Communément appelés HZE (high charge and high energy ions), leur charge est supérieure ou égale à 3 et ils représentent les particules les plus énergétiques du rayonnement, atteignant parfois des énergies de l'ordre de 10^{20} eV.

L'intensité du rayonnement galactique est inversement proportionnelle à l'activité solaire : en période de forte activité solaire, le vent solaire est plus fort ainsi que les champs magnétiques qui le transportent, et par conséquent le flux de rayons cosmiques est atténué.

Intéraction des particules avec la matière. Lorsqu'elles pénètrent dans la matière, les particules interagissent avec celle-ci de plusieurs manières. L'interaction de la particule

peut avoir lieu soit avec le noyau de l'atome, soit avec le cortège électronique. Le phénomène le plus observé est celui de l'ionisation des atomes du milieu : les particules incidentes perdent progressivement leur énergie en la transférant aux électrons de la matière qu'elles traversent. Dans certains cas cependant, les particules sont tellement énergétiques qu'elles peuvent déplacer des atomes par collision voire générer des réactions nucléaires.

Dans le cas d'une ionisation directe, la particule chargée transmet une partie de son énergie au milieu sous forme d'énergie cinétique transportée par des électrons arrachés à leurs atomes. La particule incidente perd donc son énergie progressivement tout au long de son parcours. Lorsqu'on s'intéresse à la quantité d'énergie perdue par unité de parcours de la particule, et transférée au milieu, on parle de Transfert d'Énergie Linéique (TEL) ; celle-ci s'exprime classiquement en $\text{keV}/\mu\text{m}$. Les phénomènes induisant l'ionisation du matériau cible contribuent à ce que l'on appelle le dépôt de dose cumulée. Celle-ci résulte de la somme des TEL de chaque particule élémentaire ayant interagi avec le matériau considéré. La dose n'a donc de sens que pour un matériau défini car les TEL dépendent directement de la nature du matériau. Elle correspond à la quantité d'énergie déposée par unité de masse. Elle s'exprime en Gray ($1 \text{ Gy} = 1 \text{ J/kg}$) ou en rad ($100 \text{ rad} = 1 \text{ Gy}$).

La connaissance des fluences et des énergies des particules incidentes constitue des paramètres essentiels à la détermination des TEL et par conséquent de la dose déposée. La fluence correspond au nombre de particules reçues par unité de surface. Elle s'exprime en part.cm^{-2} et s'obtient en intégrant le flux sur le temps d'irradiation considéré.

Les ions lourds contribuent à l'essentiel de la dose déposée dans les engins spatiaux. En effet, comme nous l'avons expliqué précédemment, la dose est proportionnelle à l'énergie déposée. Or, l'énergie déposée dépend du carré de la charge de la particule déposant l'énergie. Ainsi, même si les ions lourds sont les moins nombreux, leur impact en termes d'irradiation est d'une importance capitale dans l'étude des dégradations engendrées sur les structures. Il y a, cependant, un petit bémol en ce qui concerne les relations entre dépôt de dose et dégradations engendrées sur le matériel biologique. En effet, en ce qui concerne les molécules, les cellules, l'ADN, etc, certaines études tendent à montrer que les faibles doses peuvent être aussi très destructrices (Prise, 2006). De ce fait, dans le cas du développement d'une biopuce pour le spatial, on ne peut restreindre la gamme d'énergie et de particules à considérer, car il est impossible de préjuger de leur pouvoir destructeur sur les ligands.

L'environnement de quelques corps d'intérêt exobiologique

Nous venons de décrire en particulier les dangers de l'environnement interplanétaire mais il est à noter que de nombreux corps d'intérêt exobiologique présentent des conditions tout aussi inhospitalières pour une biopuce. On retrouve les mêmes contraintes de températures extrêmes, microgravité, pression faible ou, au contraire, très élevée, et bien sûr radiations.

Mars, Europe, Titan et Encelade font partie des principaux objets d'intérêt pour la recherche de vie dans le Système solaire (cf. partie I paragraphe 1.2). On peut établir un tableau succinct des contraintes auxquelles sont exposés les instruments sur ces corps en comparaison avec les conditions terrestres (cf. tableau 2.1). La distance du corps par rapport à la Terre implique des durées de voyage plus ou moins longues et par conséquent

des durées de fonctionnement des instruments plus ou moins longues. Les plages de températures sont souvent très larges et situées à des températures très faibles. Pression et gravité sont très inférieures à celles constatées sur Terre, exception faite pour Titan qui possède une atmosphère très dense et par conséquent une pression atmosphérique élevée à sa surface. Enfin, les compositions atmosphériques sont très différentes de la composition de l'atmosphère terrestre actuelle.

	Terre	Mars	Europe	Titan	Encelade
Distance au soleil	1 U.A.	1,5 U.A.	5 U.A.	10 U.A.	10 U.A.
Temp. extrêmes	-89°C - + 58°C	- 130°C - +30°C	-	-	-
Temp. moyenne	+14°C	-60°C	-140°C à -180°C	-180°C	-200°C
Gravité	9,8 m/s ²	3,7 m/s ²	1,3 m/s ²	1,35 m/s ²	0,11m/s ²
Pression atmosphérique	1 bar	6 - 7 mbars	10 ⁻¹¹ bar	1,5 bar	-
Composition atmosphérique	N ₂ (78%), O ₂ (21%), Ar (0,9%)	CO ₂ (95,3%), N ₂ (2,7%), Ar (1,6%)	atmosphère très ténue de O ₂	N ₂ , CH ₄	Vapeur d'eau majoritaire

Table 2.1: Tableau comparatif des conditions sur Mars, Europe, Titan et Encelade, par rapport à celles présentes sur Terre (Grady, 2003; Cassidy et al., 2007; Bierhaus et al., 2006; Raulin et al., 1997)

2.1.2 Des contraintes techniques spécifiques aux missions spatiales

Préparer une mission spatiale est un projet soumis à de nombreuses contraintes. Tout dispositif destiné à être envoyé dans l'espace doit suivre un circuit pré-établi avant d'arriver dans l'espace : de sa conception, en passant par son stockage, son intégration à l'engin spatial, le décollage et ensuite la trajectoire spécifique à la mission définie, il subit un ensemble de conditions pour lesquelles il doit conserver son intégrité et son bon fonctionnement.

Il faut savoir tout d'abord que les temps de stockage des différents éléments d'un même engin sont souvent très longs. L'instrument doit être transporté sur le lieu où il sera intégré à l'ensemble de la sonde, et le temps de stockage avant son intégration effective peut durer plusieurs mois voire années ; sans compter qu'il peut être intégré à un sous-ensemble, puis de nouveau transporté pour que le sous-ensemble soit intégré à un dispositif plus grand et ainsi de suite jusqu'à l'intégration complète de tous les dispositifs à l'engin final avant lancement. Le temps de stockage entre la fin de l'intégration et le lancement peut aussi être conséquent et souvent parsemé de diverses batteries de tests. Ainsi, l'ensemble de ces étapes au sol contraint les instruments à une durée de vie largement supérieure à celle nécessaire pour la phase active de la mission.

Selon le volume et le poids de l'engin à spatialiser, un type de lanceur est choisi (Ariane 5, Soyouz,...). De ce lanceur dépend alors une autre série de contraintes pour les différents instruments, notamment en termes de vibrations, chocs, accélérations et bruits au décollage. Le décollage constitue l'une des phases les plus contraignantes d'un point de vue

mécanique à cause de la violence des efforts qui sont en jeu. Les matériaux et les modes de fixations doivent être choisis de manière adéquate afin d'éviter d'éventuels dégâts ou fissurations sous l'effet des vibrations engendrées.

Certaines missions d'exploration planétaire incluent un atterrisseur afin de permettre des analyses *in situ*. Dans le cadre de ces missions, une contrainte mécanique supplémentaire fait son apparition étant donné la violence du choc lors de l'atterrissage. Même si les techniques pour se poser évoluent, ces atterrissages restent violents et les chocs durant cette phase constituent souvent les contraintes limites de la mission en termes mécaniques. La figure 2.1 décrit la séquence d'atterrissage mise au point pour les rovers américains Spirit et Opportunity. Aux vues des distances et des temps indiqués, on peut se faire une idée des chocs impliqués lors des divers rebonds des airbags sur le sol martien. Le contact avec le sol martien provoque une décélération de l'ordre de 3 g amortie par les airbags.

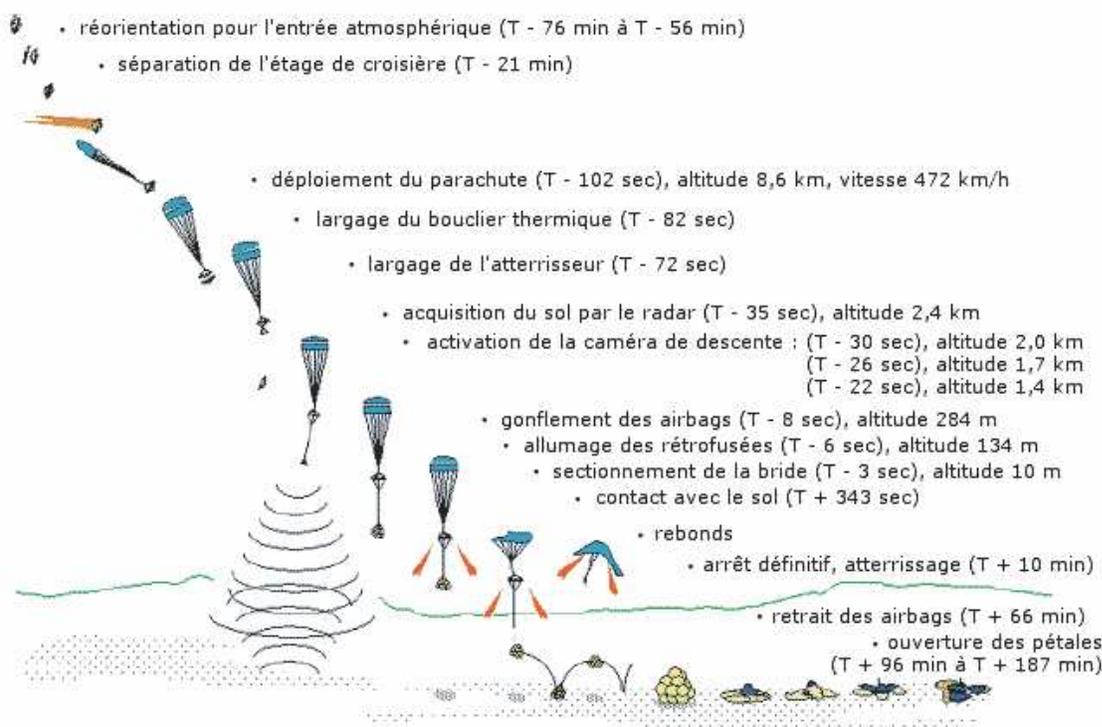


Figure 2.1: Séquence d'atterrissage suivie par les rovers américains Spirit et Opportunity pour se poser sur Mars (©NASA/JPL/Labrot)

Enfin, une contrainte propre à la préparation d'un engin spatial consiste à éviter toute contamination terrestre de l'engin, en particulier si un contact direct avec un autre corps du Système solaire est envisagé. Une grande propreté des instruments permet dans un premier lieu d'aider à leur bon fonctionnement. Pour les missions d'exploration *in situ*, l'Homme se doit, de son côté, de protéger les endroits qu'il visite de toute contamination susceptible d'engendrer une modification de l'équilibre environnemental établi. Ainsi d'importantes procédures de stérilisation sont mises en place lors de la phase d'intégration des systèmes spatiaux, avant de procéder au lancement. Dans le cas de l'utilisation d'une biopuce, cette étape de stérilisation pose un problème évident car elle implique la

destruction des ligands. Il faudra donc convenir d'une méthode nouvelle pour assurer la "propreté" de la biopuce avant lancement, les méthodes actuelles n'étant pas du tout en adéquation avec l'utilisation de tels dispositifs.

2.1.3 Des contraintes de conception propres aux instruments spatiaux

Plusieurs particularités régissent la conception d'instruments destinés au domaine spatial.

La première est liée aux contraintes imposées par les lanceurs : la charge envoyée dans l'espace est limitée en poids et en volume. Les instruments spatiaux se doivent d'optimiser au maximum ces deux caractéristiques : on assiste donc à une course à la miniaturisation. La priorité est donnée, dans la mesure du possible, aux matériaux légers, sous couvert qu'ils restent performants face aux autres contraintes : il faut donc faire des compromis !

L'énergie constitue l'une des principales préoccupations en ce qui concerne le fonctionnement d'un engin spatial. Lanceur, satellite, rover, station spatiale, scaphandre, tous les dispositifs spatiaux ont besoin d'énergie pour fonctionner. Cette énergie peut être embarquée directement sous forme chimique et thermique, stockée dans les batteries, les piles et les carburants. On peut même faire appel à de petites sources radioactives pour les missions les plus lointaines. Cependant, ce stockage induit de nombreux problèmes en termes de masse et volume. Ainsi, l'une des solutions "palliatives" consiste en l'utilisation de panneaux solaires qui, grâce à des cellules photovoltaïques, convertissent une partie du flux solaire incident en puissance électrique. On comprend ainsi que l'énergie disponible par instrument reste très limitée. Il faut en outre avoir conscience que cette énergie, embarquée ou produite, reste à partager entre les divers instruments, et la consommation doit donc être lissée au maximum pour éviter des pics de demande trop forte auxquels les sources disponibles ne pourront répondre. Par conséquent, la consommation énergétique la plus faible possible constitue une contrainte forte dans la conception de tout dispositif spatial.

L'automatisation de tous les fonctionnements s'avère indispensable dans l'espace : tout dispositif doit fonctionner en autonomie de manière entièrement robotisée. Ce paramètre demande souvent de gros efforts d'adaptation pour des dispositifs couramment utilisés sur Terre. Il faut définir des séquences logiques d'utilisation et découper le fonctionnement en phases successives parfaitement coordonnées. Mécanique de précision, électronique, robotique, prennent alors toute leur importance dans le processus de conception.

Enfin, une dernière contrainte, et non la moindre, concerne la fiabilité des instruments. Une fois envoyé dans l'espace, il n'y a plus d'intervention humaine possible, et aucune maintenance. Pour certains instruments, il est vrai, des consignes de correction peuvent être envoyées à l'engin depuis la Terre, mais un objectif pour tout développement d'instrument spatial consiste à atteindre la plus grande fiabilité possible. Pannes et avaries sont à proscrire. L'instrument doit prouver, à travers de multiples tests qu'il fonctionnera une fois à destination et c'est, à n'en pas douter, son objectif premier. Un instrument léger, petit, peu gourmand en énergie, n'a pas sa place dans un projet spatial s'il ne fonctionne qu'une fois sur deux...

2.2 Définition d'un cahier des charges "matériau"

Suite à la mise en lumière de l'ensemble des contraintes pesant sur la réalisation d'un instrument spatial, et en accord avec les paramètres analytiques de fonctionnement d'une biopuce, un cahier des charges a été mis en place afin de diriger les développements et tests à mettre en œuvre sur le matériau support de notre biopuce. L'objectif était de définir les critères de sélection du matériau le plus adéquat pour la réalisation d'une biopuce "spatiale".

2.2.1 Cahier des charges analytique

Pour une bonne détection des molécules cibles avec la biopuce, un certain nombre de conditions sont à remplir par le support. En effet, pour que le détecteur puisse faire une lecture efficace des résultats, le support doit notamment conserver un état de surface, une géométrie et des propriétés optiques stables au cours de la mission.

La qualité de la détection dépend en partie de la focalisation du détecteur sur la surface de la lame de biopuce. Il faut donc que la distance entre la lame et le détecteur reste relativement stable, aux adaptations de l'autofocus près. Les variations de géométrie, notamment induites par les phénomènes de dilatation thermique, ne doivent pas excéder quelques dizaines de microns en épaisseur. Un peu plus de latitude est permise en ce qui concerne les caractéristiques de largeur et longueur du support, le déplacement horizontal des spots étant moins contraignant pour la qualité de la lecture et l'interprétation des résultats (variations de l'ordre du millimètre acceptables). La lame doit aussi rester lisse et plane afin d'obtenir une détection homogène sur son ensemble : tous les puits analysés doivent apparaître avec la même netteté. Les variations de planéité ne doivent pas excéder $5\mu\text{m}$. Les valeurs avancées sont bien évidemment des estimations faites à partir de différentes fiches techniques de détecteurs actuellement sur le marché. Les limites exactes de fluctuations seront à définir lorsqu'un prototype de détecteur spatialisable sera disponible.

Les propriétés optiques du support jouent aussi un rôle dans la qualité de la lecture des spots et sur l'interprétation des résultats qui en est faite. L'indice de réfraction ainsi que le niveau d'autofluorescence du matériau doivent rester stables pour assurer une bonne lecture des signaux de fluorescence émis par les complexes ligands/cibles formés. Si le bruit créé par l'autofluorescence du matériau est trop important, les signaux émis par les anticorps se retrouvent noyés dans ce bruit de fond, ce qui dégrade l'interprétation des résultats.

Le matériau ne doit bien évidemment pas être (ou devenir) poreux pour éviter toute absorption de molécules dans la lame. Si tel était le cas, la biopuce perdrait en sensibilité de détection : soit des ligands entreraient dans le matériau et ne seraient plus disponibles pour la détection, soit une partie des molécules cibles disparaîtrait dans le matériau et ne pourrait être reconnue par les ligands.

La lame doit donc, en particulier, résister aux différents solvants, aqueux ou organiques, qui pourront être utilisés pour l'extraction des molécules organiques ciblées et qui seront répandus sur la biopuce.

La lyophilisation de la biopuce étant envisagée comme un type de conditionnement adéquat pour une mission spatiale, le support devra résister à ce traitement.

Enfin, le matériau choisi devra permettre une fonctionnalisation de sa surface, c'est-à-dire qu'il pourra être traité de telle sorte que sa surface présente des groupes chimiques permettant le développement de la chimie de greffage de nos ligands.

L'ensemble de ces conditions a été regroupé dans le tableau Figure 2.2. Pour chaque critère, un niveau de tolérance a été proposé dont le degré de flexibilité est souvent conditionné par des considérations techniques et pratiques concernant la mise en œuvre de la détection. Des exemples de propriétés du matériau sont proposés pour l'étude de chaque critère.

CRITÈRE	NIVEAU	PROPRIÉTÉS DU MATÉRIAU À ÉTUDIER	DEGRÉ DE FLEXIBILITÉ DU NIVEAU
État de surface	Plan (au 5µm près) Lisse	Planéité Rugosité	Résolution du scanner (confocal): 5µm
Géométrie	Hauteur = 1mm ± 0.04 mm Largeur = 25 mm ± 1mm Longueur = 75 mm ± 1mm	Dilatation/contraction thermique Caractéristiques thermogravimétriques	Format classique de lame de microscope
Propriétés optiques	Stables	Indice de réfraction	/
Autofluorescence	Faible (préférence pour les supports non autofluorescents)	Dépend du système de détection	Sonde FITC: Maximum absorption 490 nm Maximum fluorescence 520 nm Sonde Cy5: Maximum absorption 649 nm Maximum fluorescence 670 nm
Porosité	Non poreux	Tests absorptions de molécules fluorescentes	Aucune, les molécules ne doivent pas être absorbées à l'intérieur du matériau
Résistance aux conditions d'extraction (Insolubilité)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ dans H₂O ▪ et/ ou dans des mélanges Méthanol/Chloroforme ▪ et/ou des mélanges Acétone/Hexane 	Insolubilité du matériau	Dépend du temps de contact échantillons/matériau (variable de 1 à 24h)
Résistance à la lyophilisation	Haute	Cycles de stockage au froid	/
Fonctionnalisation	Dépend du greffage envisagé (covalent ou par adsorption)		Possibilité de le fonctionnaliser (NH ₂ , CHO, groupement époxy...)

Figure 2.2: Cahier des charges concernant les contraintes analytiques pesant sur le support de biopuce

2.2.2 Cahier des charges des contraintes spatiales

Le matériau choisi pour le support devra supporter l'ensemble des contraintes répertoriées au paragraphe 2.1 : cycles thermiques, radiations, vide et vibrations. De même que pour le cahier des charges analytique, les différents critères ont été regroupés dans le tableau figure 2.3. Pour chacun d'eux, un niveau a été défini sur la base d'une mission martienne. Les valeurs avancées sont celles qui ont été déterminées par l'ESA pour l'instrument "Life Marker Chip" (ESA, 2005). Des indications sur les propriétés du matériau soumis à une investigation sont listées et un degré de flexibilité pour chaque niveau est proposé afin de conserver une certaine souplesse dans le choix de ce matériau de support.

CRITÈRE	NIVEAU	PROPRIÉTÉS DU MATÉRIAU À ÉTUDIER	DEGRÉ DE FLEXIBILITÉ DU NIVEAU
Durée de vie	5 ans ¹ minimum	<ul style="list-style-type: none"> Vieillessement physique Vieillessement chimique 	Non flexible
Résistance thermique	-70°C à +70°C ¹	<ul style="list-style-type: none"> Température de transition vitreuse Températures max et min d'utilisation Comportement en cyclage thermique 	Légèrement flexible si boîtier de protection + système de régulation thermique
Dégazage (vide + température)	<i>Quantité</i> : la + faible possible RML < 1% ; CVCM < 0,01% ² <i>Nature</i> : pas d'éléments oxydants, pas de modification du pH	<ul style="list-style-type: none"> Propriétés de dégazage → essais normalisés Absorption/désorption d'humidité Comportement sous vide 	<i>Quantité</i> : légèrement flexible mais doit rester faible <i>Nature</i> : non flexible Remarque : flexibilité si boîtier de protection sous pression → peu de dégazage
Résistance aux vibrations	Pas de fissures Faible propagation des fissures	<ul style="list-style-type: none"> Ductilité Ténacité Résistance mécanique générale 	<ul style="list-style-type: none"> Fissures > 5µm : non flexible Fissures < 5µm : légèrement flexible Fissures < 1µm : flexible
Résistance aux radiations	25 Gy ³ (derrière un blindage de 4 mm d'aluminium) ¹	<ul style="list-style-type: none"> Tenue à l'irradiation Dépôt de dose 	Flexible si boîtier de protection

¹ Source : *Preliminary Requirements and specifications, Life Marker Chip*, ESA, référence TEC-MMG/2005/941, 15/06/2005

² Essai de dégazage normalisé : *Thermal vacuum outgassing test for the screening of space materials*, ECSS-Q-70-02A,
RML = Recovered Mass Loss = Total Mass Loss – Water Vapor Recovered
CVCM = Collected Volatile Condensable Material

³ Gy = Gray : unité utilisée pour quantifier la dose absorbée. Dose absorbée = quantité d'énergie communiquée à la matière par unité de masse.

Figure 2.3: Cahier des charges du matériau support listant les critères liés à l'environnement spatial

2.2.3 Conclusion

Le cahier des charges global, dont une version anglaise a été établie, a constitué une base de discussion lors des prises de contact avec les industriels qui proposent de développer de nouveaux supports de biopuce. L'étude sur la faisabilité de supports en nouveaux matériaux thermoplastiques chez Greiner Bio-One a été guidée par ce document. Les lenteurs administratives et les études de marché que demande un industriel avant de se lancer dans un projet de recherche sur le moulage de nouveaux supports, font que la coopération avec cet industriel a progressé lentement jusqu'à présent. Cependant, les bonnes relations instaurées laissent augurer une collaboration plus active dans un avenir proche.

2.3 Mise en place d'un plan d'essais pour l'étude du comportement des ligands

À la différence du matériau du support, les ligands s'imposent comme des constituants indispensables en l'état, puisqu'ils ne peuvent être remplacés par d'autres éléments plus facilement spatialisables. Il faut donc s'attacher à comprendre leur fonctionnement et leur comportement en environnement spatial afin de déterminer leurs faiblesses ainsi que les conditions limites à ne pas dépasser. Ce sont ces ligands qui à leur tour vont imposer des contraintes sur la conception du dispositif final : faut-il un blindage contre les radiations ? selon quel design ? faut-il prévoir un boîtier pressurisé ? une régulation thermique est-elle nécessaire ? sur quelle gamme de température ? etc... Les réponses à toutes ces questions sont étroitement liées à la détermination des conditions limites de fonctionnement des ligands.

Les conditions thermiques et les radiations cosmiques nous sont apparues comme les contraintes les plus fortes pour les molécules de reconnaissance envisagées. C'est pourquoi nous avons orienté les essais sur ces deux contraintes.

Une série de sollicitations en cyclage thermique a été programmée pour tester à la fois la résistance des anticorps et d'une sonde fluorescente.

Pour les radiations, il a été décidé dans un premier temps de définir précisément le type de particules et les gammes d'énergie entrant en jeu dans le cas d'une mission de type martien. Ainsi, le recours à la modélisation numérique des interactions particules cosmiques/matière, s'est imposé comme une étape préalable intéressante avant la mise en place de divers essais sous faisceau. Une complémentarité informatique/expérience présente plusieurs avantages : les demandes de temps de faisceau sont argumentées et ciblées, l'ensemble des paramètres est testé et validé, et les confrontations modèle/réalité fournissent parfois des informations supplémentaires. Cette stratégie réfléchie et rigoureuse s'inscrit parfaitement dans l'esprit du développement d'un projet à envergure spatiale.

De ce plan d'essais divisé en deux grandes campagnes distinctes sont nés deux sous-projets intitulés :

- BiOMAS - ARTheC (Biochip for Organic Matter Analysis in Space - Antibody Resistance to Thermal Cycles) qui regroupe tous les essais de résistance thermique,
- BiOMAS - ARCoR (Biochip for Organic Matter Analysis in Space - Antibody Resistance to Cosmic Radiation) qui regroupe l'ensemble des études menées sur le thème des radiations.

La mise en œuvre et les résultats de ces deux sous-projets sont décrits dans la partie suivante.

Conclusion de la deuxième partie

Concevoir une biopuce capable de survivre à une mission spatiale et de produire des résultats fiables et univoques constitue un véritable challenge. La première étape du projet BiOMAS consiste à démontrer la faisabilité et la résistance d'un tel instrument au cœur d'un environnement très inhospitalier : l'environnement extraterrestre, loin des conditions clémentes de notre planète.

Dans un contexte international où la priorité a été donnée à l'adaptation de l'existant pour atteindre des objectifs analytiques exobiologiques, BiOMAS adopte une stratégie nouvelle qui vise à repenser l'ensemble de la conception de la biopuce. S'appuyant sur les compétences pluridisciplinaires de son équipe et de ses partenaires, le projet reprend pas à pas chaque composant, chaque étape de la réalisation de la biopuce afin de les optimiser pour atteindre l'objectif affiché par les agences spatiales : détecter des molécules organiques sur un autre corps du Système solaire.

L'ensemble des contraintes pesant sur le développement d'un instrument spatial a été listé et analysé afin d'élaborer un plan d'expérimentation adéquat. Ce travail a été effectué en synergie complète avec la réalisation d'un cahier des charges analytiques. On peut classer les contraintes de spatialisation selon trois grands types : les contraintes environnementales (températures extrêmes, vide, radiations, etc.), les contraintes liées à la mission (temps de stockage au sol, contraintes mécaniques imposées par le lanceur, chocs à l'atterrissage, mesures de prévention de la contamination) et les contraintes inhérentes à la réalisation de tout dispositif spatial (minimisation de la consommation d'énergie, du poids, du volume, automatisation, fiabilité). Nous avons divisé l'étude du comportement de la biopuce face à ces contraintes en deux études distinctes : la première est orientée sur les matériaux et vise à déterminer les caractéristiques que doit présenter le support, la deuxième porte sur les ligands et tente de définir leur comportement dans diverses situations extrêmes.

Ces deux grandes campagnes d'essais sont décrites dans la partie à suivre.

Troisième partie

Explorer la résistance des composants
de la biopuce pour contraindre le
développement global

Introduction de la troisième partie

Une biopuce compte deux composants principaux : un support solide, sous forme de lame généralement, et des sondes biologiques, appelées ligands. Cette troisième et dernière partie de mon manuscrit a pour objectif de présenter les essais mis en œuvre pour étudier le comportement de ces composants face à diverses contraintes, représentatives de celles qu'ils rencontreront lors d'une mission spatiale.

Le choix du matériau du support pour le développement d'une biopuce "spatiale" est un élément clé. Plusieurs types de supports sont actuellement utilisés pour la fabrication de biopuces : des verres, des thermoplastiques, etc. Cependant, comme nous l'avons précisé dans le paragraphe 2.2 de la partie 2, le matériau dont nous avons besoin doit répondre à un ensemble de critères bien particuliers, éloignés des préoccupations des industriels produisant des biopuces "de consommation courante". Un ensemble de tests comparatifs a donc été mis en place afin de déterminer quel matériau, parmi les candidats ayant été retenus après une présélection "chimique", serait le plus adapté à la réalisation d'une biopuce destinée à l'exploration planétaire. Nous avons choisi, dans un premier temps, trois axes d'étude : le comportement en dégazage, la résistance aux solvants et les caractéristiques thermiques et mécaniques.

En condition de vide et de températures élevées, les matériaux dégazent de la matière : on peut se demander, dans notre cas, quelle quantité de molécules sera rejetée lors du voyage interplanétaire et surtout quel sera l'impact de ces molécules sur le fonctionnement du dispositif.

L'extraction des molécules d'intérêt, dans les échantillons de sol prélevés *in situ*, pourra être réalisée à l'aide de solvants organiques. Il paraît donc judicieux de vérifier le comportement des différents matériaux en présence de solvants potentiellement utiles à l'extraction. Le support gonfle-t-il ? Son autofluorescence est-elle accrue ? Le contact avec le solvant modifie-t-il sa porosité ? Voilà autant de questions qui demandent à être examinées.

Enfin, notre biopuce devra faire face à un ensemble de contraintes mécaniques et thermiques qui peuvent altérer les propriétés du support. Il convient, par conséquent, de s'intéresser aux propriétés thermomécaniques des matériaux candidats afin de comparer leurs comportements face à diverses sollicitations.

Le choix des ligands, quant à lui, est plus restreint. Les anticorps affichent plusieurs avantages dans le cadre de nos applications, c'est pourquoi les campagnes d'essais décrites dans cette partie portent exclusivement sur eux. L'objectif est de déterminer l'effet de plusieurs paramètres sur l'anticorps afin de fixer les limites au-delà desquelles la reconnaissance anticorps/molécule cible est altérée. Nous nous intéressons particulièrement aux effets des variations thermiques (c'est le sous-projet BiOMAS-ARTheC : Antibody Re-

sistance to Thermal Cycles) et à l'influence des radiations cosmiques (c'est le sous-projet BiOMAS-ARCoR : Antibody Resistance to Cosmic Radiation).

Le premier chapitre présente les matériaux potentiellement utilisables pour le support. Il décrit les essais menés pour comparer leur comportement face au dégazage, aux solvants et aux contraintes thermomécaniques. Le second chapitre s'intéresse aux anticorps en tant que ligands pour notre biopuce. Il décrit les deux sous-projets qui ont émergé au cours de la thèse : le premier, BiOMAS-ARTheC, étudie l'impact des contraintes thermiques sur l'anticorps et sur sa sonde fluorescente, le second, BiOMAS-ARCoR, étudie leur résistance sous divers flux de particules, en combinant deux types d'approche : la simulation numérique et les expériences sous faisceau.

Chapitre 1

Quel support pour une biopuce "spatiale" ?

1.1 Une présélection sur critères "chimiques"

Tous les matériaux ne peuvent pas être candidats pour un support de biopuce. Comme il est dit dans le paragraphe 2.2 de la partie 2, le matériau choisi doit s'adapter à la chimie de surface dont il va faire l'objet et répondre à un ensemble de critères analytiques à de fortes contraintes. Or, à l'heure actuelle très peu de matériaux sont commercialisés sous forme de lames de biopuce et il existe peu de variétés de supports pour des applications similaires (comme les plaques 96 puits par exemple). Une présélection a donc été effectuée par nos collègues de Montpellier afin de ne conserver qu'un nombre raisonnable de matériaux susceptibles de convenir pour nos applications.

Les surfaces doivent être :

- planes et uniformes pour assurer une bonne reproductibilité des résultats,
- non poreuses,
- peu autofluorescentes pour éviter un niveau de bruit de fond trop élevé qui porterait préjudice à la sensibilité du dispositif,
- inertes envers les cibles afin de conserver une haute sensibilité en ne créant pas de fausses réactions,
- et, surtout, elles doivent permettre une fonctionnalisation de surface, c'est-à-dire la mise en place de groupements chimiques spécifiques en surface nécessaires au greffage de nos anticorps.

À partir de ces différentes contraintes, deux types de supports commerciaux ont été éliminés : les membranes qui, pour être poreuses et absorbantes, posent un problème de répétabilité des résultats, et les wafers de silicium ou d'or qui sont des "quencher" de fluorescence et coûtent relativement chers.

Nous avons donc conservé le verre, matériau le plus couramment utilisé, et plusieurs thermoplastiques : le polystyrène (PS) et le cycloooléfine copolymère (COC), qui existent déjà sous forme de lame, et le polypropylène (PP) qui n'existe que sous forme de plaque 96 puits pour le moment mais dont on peut envisager le moulage sous forme de lame. À cette sélection, a été rajouté un élastomère, le polydiméthylsiloxane (PDMS) qui présente des propriétés chimiques intéressantes tout en assurant une certaine résistance aux vibrations et chocs.

Ces matériaux ont alors subi un ensemble de tests comparatifs pour déterminer les avan-

tages et inconvénients de chacun que nous présentons par la suite.



Figure 1.1: Divers types de supports utilisés pour développer le greffage d'anticorps : des plaques 96 puits (à gauche), des lames de biopuce (en bas à droite), des wafers (en haut au milieu) et du PDMS (en haut à droite).

1.2 Étude comparative des comportements en dégazage

1.2.1 Le principe de dégazage

Le dégazage des matériaux est un phénomène qui se produit sous l'effet du vide et/ou de la température. Il consiste en une perte de masse par émission de gaz. Plusieurs mécanismes peuvent intervenir :

- sublimation et évaporation dans le cas d'un matériau qui dégaze à un taux constant indépendamment de la quantité de matière (on parle de corps pur),
- diffusion des gaz à travers les cristaux ou le long des grains dans les fissures et les pores du matériau,
- désorption superficielle des molécules physisorbées (liaisons de Van des Waals) ou chimisorbées (adsorption),
- décomposition d'un composé formé par une réaction d'équilibre.

Dans le cas des matériaux spatiaux, qui ne sont que très rarement des corps purs, tous les phénomènes se combinent et participent de concert au dégazage sous vide.

Du dégazage de ces matériaux découle alors un ensemble de conséquences facheuses pour le fonctionnement global du dispositif spatialisé. Outre la modification des propriétés intrinsèques du matériau qui a dégazé, ce phénomène pose aussi un problème crucial, celui de la contamination de l'environnement proche. Les molécules dégazées se condensent lorsqu'elles entrent en contact avec une surface froide et forment un dépôt qui peut modifier les caractéristiques et/ou le fonctionnement de la surface ainsi contaminée. Il apparaît donc primordial d'étudier attentivement le comportement en dégazage de chaque élément destiné à voler sur une mission spatiale, afin de s'assurer, d'une part, qu'il conservera ses caractéristiques propres nécessaires à son bon fonctionnement pendant la mission, et afin d'évaluer, d'autre part, le risque qu'il représente pour les éléments qui se trouveront dans son entourage.

1.2.2 Les normes spatiales

Pour décrire de manière rigoureuse et homogène le comportement en dégazage de tous les matériaux étudiés, des normes spatiales ont été mises en place. Elles fixent notamment les paramètres d'essais à mettre en œuvre et les critères d'acceptation d'un matériau.

Il existe deux normes, l'une européenne (ECSS-Q-70-02A) et l'autre américaine (ASTM E 595), qui reprennent globalement les mêmes éléments. Les conditions de température et d'hygrométrie pendant le stockage et le conditionnement des échantillons avant essai sont définies avec précision. L'essai est mené sous vide (10^{-4} Pa pour l'ECSS-Q-70-02A et moins de $7 \cdot 10^{-3}$ Pa pour l'ASTM E 595) à une température de 125°C pendant une durée de 24h. Les produits dégazés sont collectés sur une plaque maintenue à 25°C . Pour être sélectionné, un matériau doit répondre à 2 critères :

- sa perte de poids (RML : Recovered Mass Loss) doit être inférieure à 1%,
- la quantité d'éléments condensés collectés sur la plaque froide (CVCM : Collected Volatile Condensable Material) doit être inférieure à 0,1%.

Les figures 1.2 et 1.3 récapitulent les divers paramètres appliqués à l'échantillon et à la plaque froide.

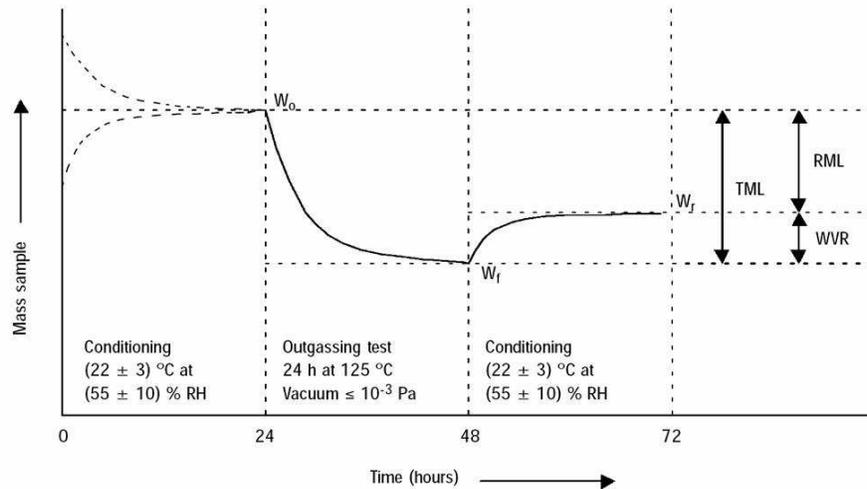


Figure 1.2: Paramètres appliqués à l'échantillon lors d'un essai normé de dégazage (RML = Recovered Mass Loss, TML = Total Mass Loss, WVR = Water Vapour Regained, RH = Relative Humidity).

1.2.3 Nos objectifs

Dans le cadre du développement de notre biopuce, nous avons jugé indispensable d'étudier le comportement en dégazage des matériaux à notre disposition pour réaliser le support : étant donné le contexte particulier de notre étude, les essais normés nous sont apparus peu appropriés. En effet, il est d'ores et déjà établi qu'une biopuce ne pourra fonctionner qu'à des températures variant sur une plage limitée qui ne dépassera pas 70°C , tel que défini pour le dispositif "Life Marker Chip" prévu pour ExoMars (ESA, 2005). Des essais à façon ont donc été mis en place, en partenariat avec le CNES, pour établir une comparaison des matériaux avec deux objectifs principaux :

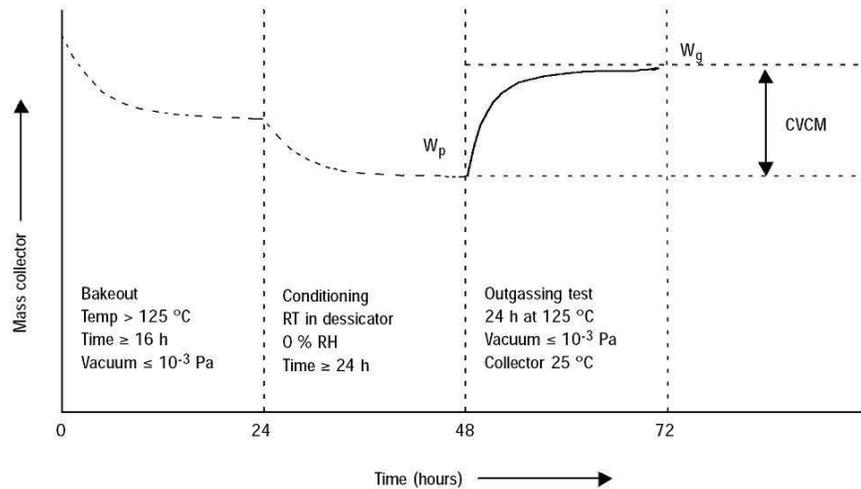


Figure 1.3: Paramètres appliqués à la plaque froide qui collecte les éléments dégazés (CVCM = Collected Volatile Condensable Material, RT = Room Temperature).

- étudier le taux de dégazage de chaque matériau,
- analyser la nature des molécules dégazées.

Le schéma cinétique de dégazage offre des informations précises sur la quantité d'éléments dégazés ainsi que sur l'ordre dans lequel intervient ce dégazage : a-t-on affaire à un dégazage par palier ou continu ? le phénomène intervient-il dès les premières montées en température ou à partir d'un certain seuil ? Autant de questions qui nécessitent des réponses s'il on veut argumenter la sélection du support.

Cependant, la nature de ces éléments dégazés s'avère dans notre cas tout aussi importante que leur quantité, sinon plus. Il faut avant tout s'assurer que ces molécules, quel que soit leur nombre, ne vont pas interagir avec les anticorps pour provoquer :

- soit une modification de leur structure et donc de leur capacité de reconnaissance,
- soit une réaction parasite, un faux-signal, en contaminant la surface de la biopuce.

1.2.4 Les procédures d'essais

Pour atteindre ces deux objectifs, nous avons procédé à deux types d'essais.

- Pour étudier la cinétique de dégazage des matériaux, un dispositif disponible dans les locaux du CNES Toulouse a été utilisé. Il comprend un groupe de pompage composé d'une pompe primaire et d'une pompe turbomoléculaire, un four équipé de plusieurs thermocouples (internes et externes), une balance à courant de Foucault d'une précision de $10\mu\text{g}$ et une cloche en verre pour la mise sous vide. Au cours de l'essai, la température du four, la température de l'échantillon ainsi que sa perte de masse sont mesurées et enregistrées. Le vide est inférieur à 10^{-4} Pa.

Un protocole d'essai comptant 3 paliers de température a été établi selon le schéma suivant : 24h à 25°C, 24h à 50°C puis enfin 48h à 70°C.

Cinq matériaux ont été testés selon ce dispositif : polypropylène (PP), cycloooléfine copolymère (COC), polystyrène (PS), verre fonctionnalisé époxy et verre revêtu de téflon rouge. Le PDMS à base de sylgard 184 n'a pas été testé car son comportement en déga-

zage est déjà répertorié dans les bases de données de l'ESA comme étant non conforme (RML $\simeq 1,5\%$, CVCM $\simeq 0,6\%$).

- La nature des éléments dégazés par les matériaux est analysée à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse (CPG) couplé à un spectromètre de masse (SM). Les échantillons, qui se présentent sous forme de copeaux très fins, subissent une désorption à une température fixée pendant une dizaine de minutes. Les produits de cette désorption sont piégés par un élément froid avant d'être injectés dans le dispositif de CPG/SM pour analyse. La CPG produit un chromatogramme qui est le reflet de la composition du mélange. Chaque pic est alors analysé par le spectromètre de masse afin d'établir la nature des molécules décelées. La difficulté technique de cette méthode réside dans la détermination du programme thermique à utiliser pour une bonne séparation des molécules. Il faut établir des rampes et paliers de température adéquats pour obtenir un chromatogramme sur lequel chaque molécule apparaît sous la forme d'un pic distinct.

Pour nos essais, nous avons choisi d'effectuer la désorption à 70°C , soit la température maximum utilisée pour l'analyse cinétique. Quatre matériaux ont été testés : polypropylène, polystyrène, cyclooléfine copolymère et téflon.

1.2.5 Les résultats

Les cinétiques de dégazage

Les cinétiques de dégazage des 5 matériaux testés sont présentées sur les diagrammes figures 1.4, 1.5, 1.6, 1.7 et 1.8. Premier résultat intéressant : on note que tous les matériaux dégazent très peu (moins de $0,06\%$) et sont donc compatibles, en termes de quantité de molécules dégazées, avec une utilisation pour une mission spatiale.

Le PP présente des paliers de dégazage qui coïncident avec les paliers de température : lorsque la température augmente, de nouveaux éléments, moins volatiles que les précédents, sont dégazés. À la fin de l'essai, l'asymptote de dégazage n'a toujours pas été atteinte, la perte de masse maximale est donc supérieure à celle affichée après les 96 heures d'essai.

La courbe de dégazage du COC est régulière, sans sursaut lors du passage à 50°C : on peut imaginer que les éléments dégazés à 25°C et 50°C sont les mêmes. La quantité de dégazage maximum est atteinte à 50°C (asymptote).

Le PS présente un dégazage continu et très rapide avec une asymptote qui apparaît dès le deuxième palier de température. En 5 h seulement, les 90% de la perte de masse maximale sont atteints : ce sont des composés très volatiles qui dégazent du matériau.

Les lames de verre fonctionnalisées époxy ont un taux de dégazage très faible car, le verre n'étant pas sensible au dégazage, seuls les produits utilisés pour le processus de fonctionnalisation sont susceptibles de dégazer. Les irrégularités de la courbe sont dues aux très faibles quantités mises en jeu. L'asymptote est atteinte au cours du palier à 70°C .

La courbe de dégazage des lames recouvertes de téflon montrent deux paliers avec un regain de dégazage lors du passage à 50°C . L'asymptote est atteinte à 50°C et aucun dégazage supplémentaire n'a lieu lors de l'augmentation de température à 70°C .

Le COC et le PS ont des comportements similaires mais le PS dégaze deux fois plus de

matière. Les lames de verre, fonctionnalisées époxy ou recouvertes de téflon, sont, comme on pouvait l'imaginer, les supports qui dégazent le moins. Parmi les polymères, le COC s'impose comme le meilleur candidat en termes de quantités dégazées. Ces premières données quantitatives demandent à être complétées par des analyses qualitatives afin d'évaluer la nocivité des composés dégazés par chaque type de support.

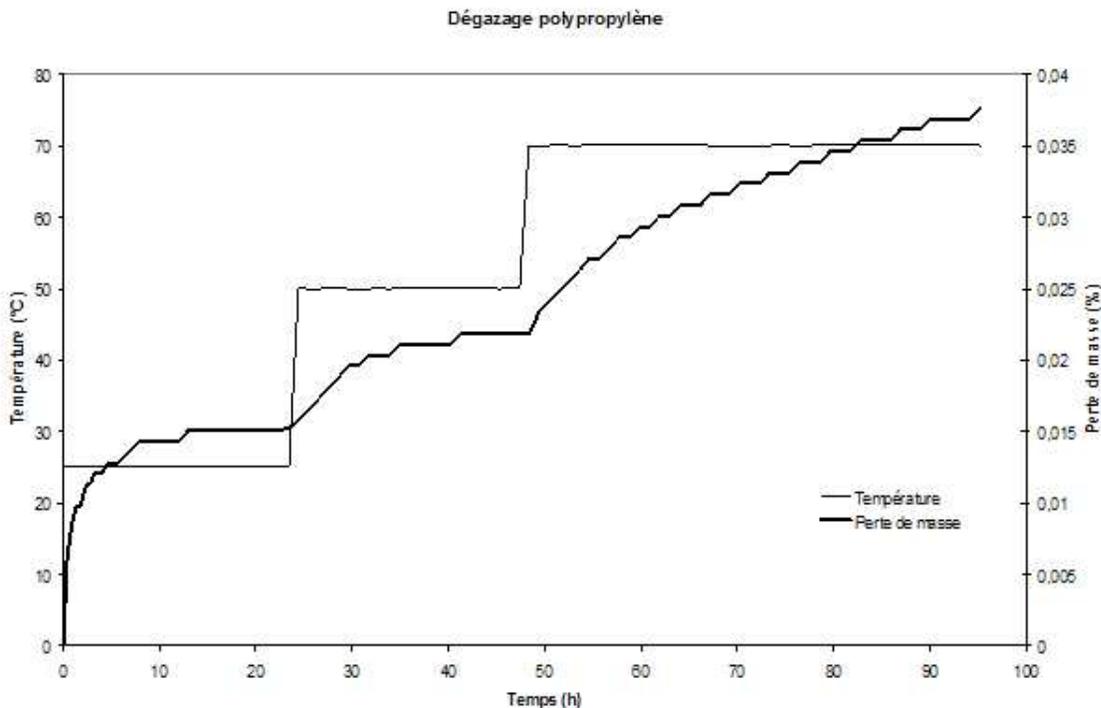


Figure 1.4: Cinétique de dégazage du polypropylène

Nature des éléments dégazés

En raison de divers problèmes techniques (notamment des pannes à répétition de l'équipement) et à cause des très faibles quantités de matière dégazée, les analyses en CPG-SM n'ont pas encore pu être menées à terme. Le protocole d'obtention des chromatogrammes est en cours d'amélioration afin d'affiner au maximum la résolution des différents pics qui vont signer la nature des éléments dégazés. La rigueur des procédures de manipulation est aussi affermie afin d'éviter la détection de produits pouvant provenir par exemple des gants du manipulateur ou des tubes à échantillons. Une fois ces dernières petites mises au point réalisées, nous pourrons enfin lister les molécules dégazées par chaque support et étudier leur impact sur les capacités de reconnaissance des ligands.

1.2.6 Conclusions

Cette campagne d'essais visant à étudier le comportement des matériaux potentiellement envisageables pour une biopuce spatiale, lorsqu'ils sont soumis au phénomène de dégazage, offre une première base de sélection du support. En termes de quantité de

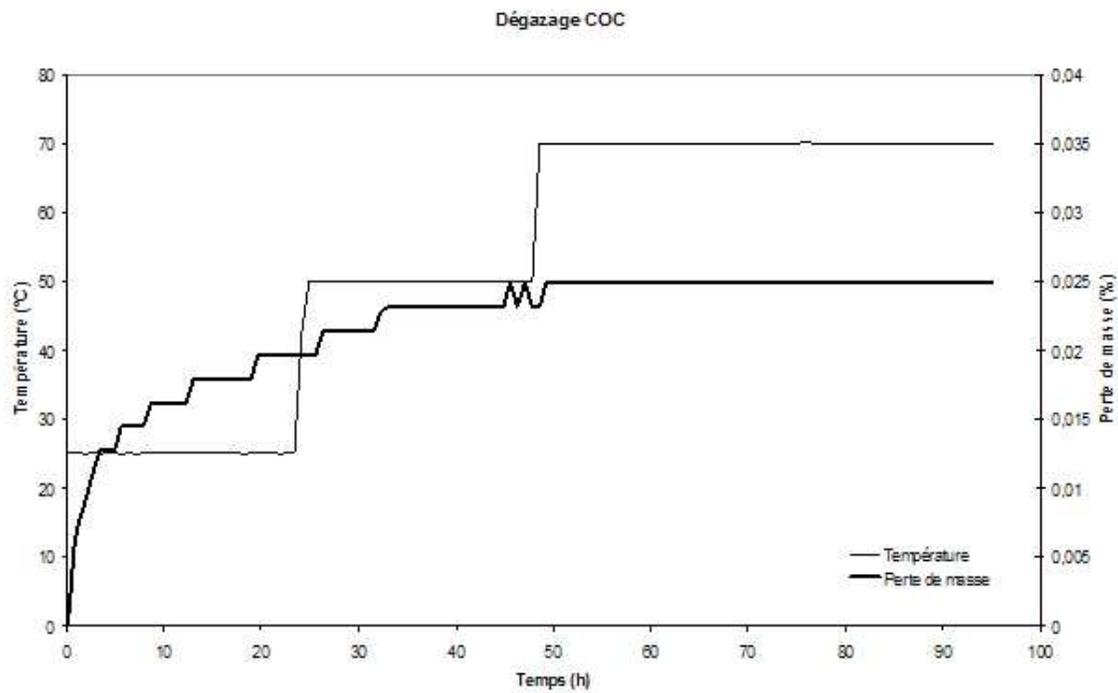


Figure 1.5: Cinétique de dégazage du COC

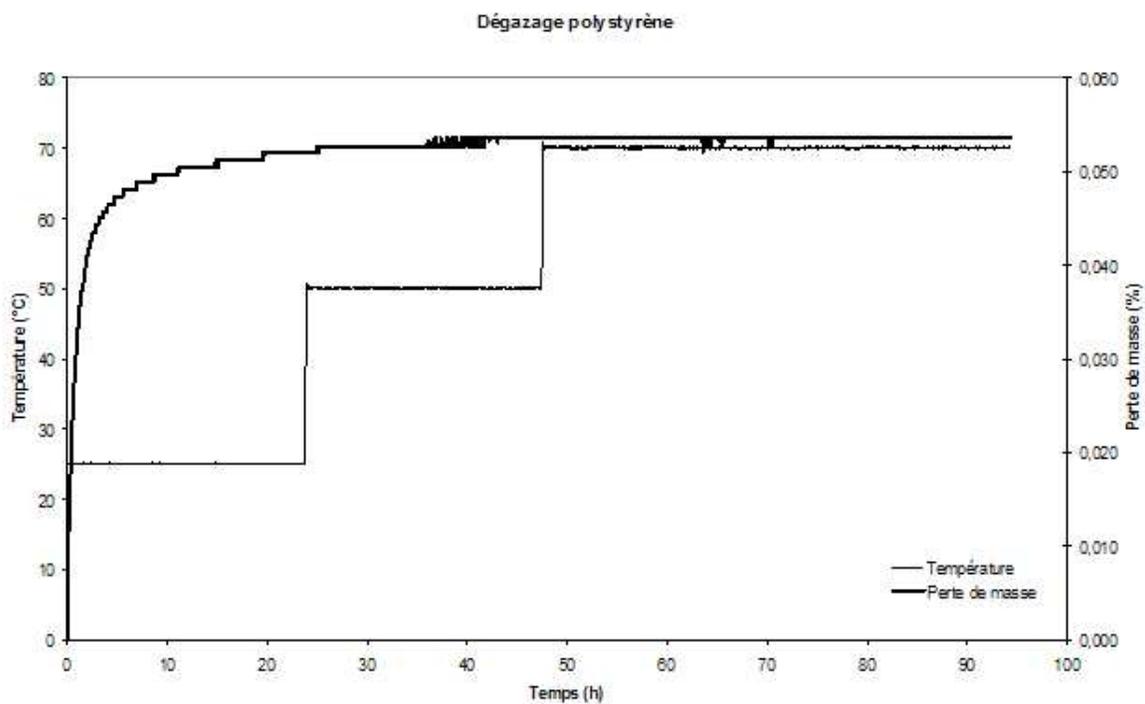


Figure 1.6: Cinétique de dégazage du polystyrène

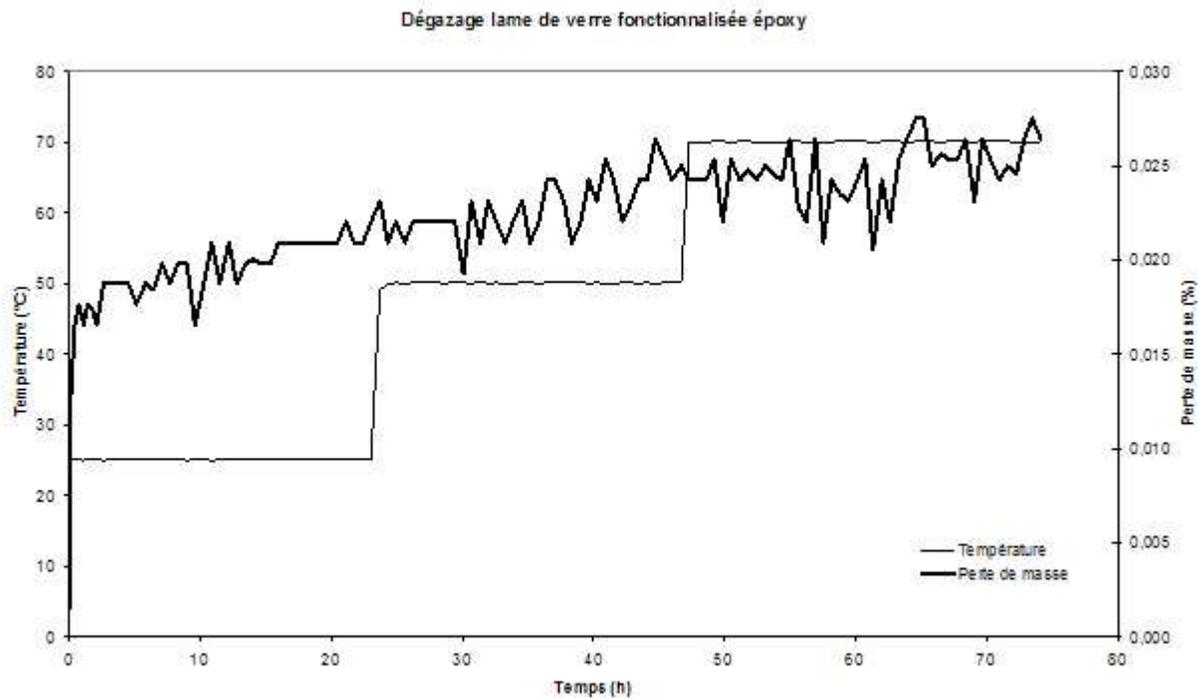


Figure 1.7: Cinétique de dégazage du verre fonctionnalisé epoxy

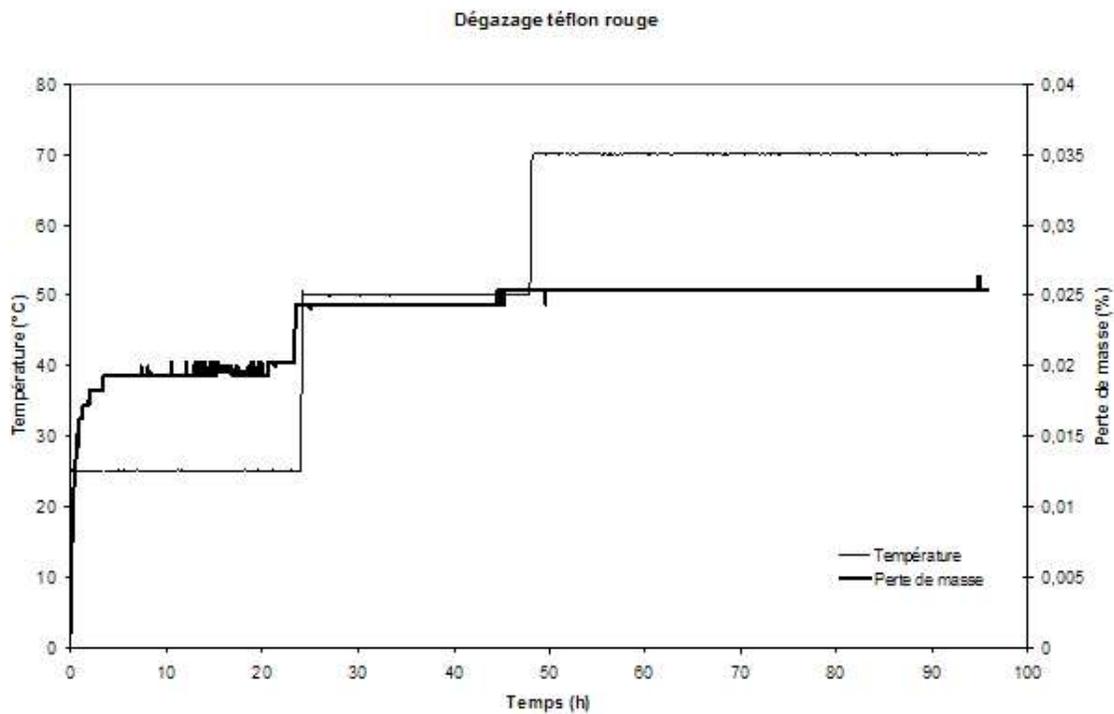


Figure 1.8: Cinétique de dégazage du verre revêtu de téflon rouge

molécules dégazées, seul le PDMS ne peut être retenu pour une utilisation spatiale. Les polymères que nous avons testés présentent, en revanche, et de manière étonnante, de très bons résultats : le COC a notamment un taux de dégazage aussi faible que les lames de verre traitées en surface, ce qui fait de lui un bon candidat. Cependant, pour réaliser une sélection cohérente des supports à partir du critère de dégazage, il nous faut impérativement parvenir à déterminer la nature de chaque dégagement gazeux, même très faible, et s'assurer qu'il ne vient pas perturber les analyses de la biopuce. Le lourd travail de mise en place des ces essais de CPG-SM devrait porter ses fruits très prochainement et nous permettre de compléter cette étude.

1.3 Sélection selon la résistance aux solvants d'extraction

Les molécules organiques d'intérêt exobiologique peuvent être extraites de l'échantillon à analyser par deux types de solvants : un solvant aqueux ou un solvant organique. Les anticorps ne peuvent être utilisés qu'en milieu aqueux, cependant il semble intéressant d'envisager le développement parallèle d'une biopuce utilisant d'autres types de ligands capables de fonctionner en milieu organique, ce qui permet ainsi la détection d'un autre panel de molécules. Nous avons donc décidé d'inclure des tests de résistance aux solvants dans notre travail de sélection d'un support pour une biopuce "spatiale". Ce travail revêt à la fois un intérêt pour le développement de notre biopuce mais aussi pour la communauté travaillant sur ce type d'outils à reconnaissance moléculaire par ligands.

Les essais ont été menés courant avril 2007, à Montpellier au sein de l'Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM), avec l'aide de nos collaboratrices chimistes.

1.3.1 Les solvants d'extraction d'intérêt

Comme présenté dans le paragraphe 1.1 de la partie I, un grand nombre de composés présente un intérêt dans le cadre d'une recherche de vie extraterrestre. Parmi ces composés d'intérêt (en partie listés dans l'extrait de tableau figure 1.2 de la partie I), se trouvent plusieurs hydrocarbures et hopanes (phytane, squalène/squalane, pristane, hopane générique). Pour extraire ces "lipides" de sols, de roches et de matrices diverses (céramiques, boues, végétaux, etc.) on emploie de manière usuelle des mélanges de solvants organiques polaires et apolaires : ils permettent d'extraire à la fois des composés non fonctionnalisés, tels que des géohopanoïdes et des hydrocarbures saturés, et des composés contenant une ou plusieurs fonctions polaires (acides, alcools, amines), tels que les biohopanoïdes et les acides gras par exemple. Quelques mélanges couramment utilisés sont le dichlorométhane/méthanol (Quenea et al., 2004; Elvert et al., 2000; Sporstol et al., 1985), le chloroforme/ méthanol (Craigh et al., 2004; Bligh and Dyer, 1959) et le n-hexane-acétone (Smith et al., 2006; Heemken et al., 1997).

Pour nos essais nous avons donc sélectionné quatre types de solvants d'extraction : un mélange méthanol/chloroforme, un mélange acétone/hexane, de l'heptane et du toluène. Nous étudions le comportement de différents supports face à ces 4 solvants susceptibles d'être utilisés lors d'une mission exobiologique.

1.3.2 Les protocoles d'essais

Nous avons confronté quatre types de matériaux aux solvants d'extraction sélectionnés :

- des lames de cycloooléfine COC fournies par la société Greiner Bio-One,
- des lames de polystyrène fournies par la société Nunc,
- des plaques 96 puits à fond en U en polypropylène fournies par Greiner Bio-One,
- du PDMS au format 2,6 cm x 3,8 cm x 0,4 cm, fourni par le Laboratoire des Sciences Analytiques de Lyon.

Tous les essais se sont déroulés à température ambiante. Pour les lames, les bains ont été réalisés dans des béchers de 50 mL, pour les plaques 96 puits, nous avons utilisé des béchers de 500 mL. Chaque échantillon a été immergé environ aux 2/3 de sa hauteur. Après immersion, une phase de séchage sous cloche à vide a été nécessaire avant analyse.

Pour un premier test, nous avons immergé les 4 matériaux dans les mélanges méthanol/chloroforme et acétone/hexane pendant une dizaine de minutes.

Par la suite, une seconde campagne d'essais s'est déroulée avec des immersions d'une durée largement supérieure. Les matériaux ont subi un bain d'une nuit (environ 15h) dans les 4 solvants présentés dans le paragraphe 1.3.1.

1.3.3 Les critères de comparaison

Pour comparer nos matériaux nous avons défini plusieurs critères d'analyse afin de nous permettre d'évaluer de manière qualitative l'impact du contact avec le solvant sur les caractéristiques du matériau :

- l'aspect visuel : le matériau s'est-il opacifié, déformé, dissous, etc ?
- le poids : le matériau a-t-il "grossi" en absorbant du solvant ou au contraire a-t-il perdu du poids en se dissolvant ?
- le niveau d'autofluorescence : la fluorescence naturelle du matériau, qui constitue un bruit de fond pour l'analyse du signal de reconnaissance ligand/cible, a-t-elle augmenté ou diminué ?
- le taux d'adsorption de protéines a-t-il été augmenté par le contact avec le solvant ? le matériau est-il devenu poreux ?

Cependant, les pesées se sont révélées très délicates et donc finalement peu fiables. Ainsi n'avons-nous pas présenté les variations de poids dans les résultats suivants.

Les lectures de fluorescence ont été réalisées à Montpellier sur un fluorimètre TwinkleTM, aux longueurs d'ondes d'excitation et d'émission de la sonde fluorescente FITC, soit respectivement 485 nm et 535 nm.

La détermination du taux d'adsorption de protéines avant et après contact avec le solvant a demandé la mise en place d'un protocole particulier. Cette mesure consiste à évaluer l'éventuelle augmentation de fluorescence du matériau après mise en contact avec une protéine marquée par une sonde fluorescente. En effet, si le contact avec le solvant augmente la porosité du matériau, les protéines se fixent à celui-ci et se retrouvent piégées. La fluorescence induite par leur présence dans le matériau augmente le niveau d'autofluorescence précédemment mesuré.

Nos lames et plaques ont été mises en contact avec une solution contenant des protéines

BSA (Serum Albumine Bovine) marquées avec la sonde fluorescente FITC. L'opération s'est déroulée à 4°C sur une durée d'environ 15 heures. La sonde FITC étant sensible à la lumière, les récipients utilisés pour la mise en contact ont été recouverts de papier aluminium. Les lames et puits des plaques ont ensuite été lavés à plusieurs reprises, séchés et analysés par lecture de fluorescence.

1.3.4 Les résultats

Bain de 10 minutes

Un premier essai, de 10 minutes sur 4 matériaux avec 2 types de mélanges de solvants, nous a permis de mettre en évidence les résistances les plus faibles. Les résultats sont récapitulés dans le tableau 1.1. Pour cet essai, nous nous sommes restreints à analyser l'aspect visuel et la modification d'autofluorescence. Les analyses d'adsorption de protéines ont été préférentiellement mises en œuvre sur les échantillons immergés pendant une nuit dans le solvant. Les résultats figurent donc dans la section suivante. On note que le PS a été détérioré plus que les autres par les 2 mélanges de solvants testés qui l'ont dissous en grande partie malgré le faible temps de mise en contact.

Matériau	Solvant	Aspect visuel	Autofluorescence	Résistance
COC	Méthanol/Chloroforme	Pas de modification	Pas de modification	Bonne
	Acétone/Hexane	Légère dissolution	Pas de modification	Bonne
PS	Méthanol/Chloroforme	Forte dégradation	-	Mauvaise
	Acétone/Hexane	Forte dégradation	-	Mauvaise
PDMS	Méthanol/Chloroforme	Pas de modification	Légère diminution	Bonne
	Acétone/Hexane	Pas de modification	Légère diminution	Bonne
PP	Méthanol/Chloroforme	Pas de modification	Pas de modification	Bonne
	Acétone/Hexane	Pas de modification	Pas de modification	Bonne

Table 1.1: Résistance des matériaux à un bain de 10 minutes dans 2 mélanges de solvants

Bain d'une nuit

Le COC, le PDMS et le PP ont été plongés pendant une nuit, soit environ 15 heures, dans 4 types de solvants (mélange méthanol/chloroforme, mélange acétone/heptane, hexane et toluène). Compte tenu des résultats de l'essai précédent, le PS n'a été testé qu'avec l'hexane et le toluène. L'ensemble des résultats en termes de modification de l'aspect visuel et du niveau d'autofluorescence sont donnés dans le tableau 1.2.

Le COC n'a résisté qu'au mélange méthanol/chloroforme et le PS seulement à l'heptane. Le PDMS et le PP ont globalement bien résisté à l'ensemble des solvants, mais il faut tout de même noter quelques gonflements qui pourraient engendrer des modifications de géométrie gênants pour la focalisation du détecteur de fluorescence embarqué avec la biopuce.

Un test d'adsorption de protéines a ensuite été réalisé sur les 10 échantillons encore viables (1 COC, 1 PS, 4 PDMS et 4 PP) ainsi que sur un échantillon témoin de chaque type de matériau. On trouvera les résultats obtenus sur ces échantillons dans le tableau

1.3. Le niveau de fluorescence a été mesuré avant et après mise en contact de l'échantillon avec une solution de protéines marquées à la fluorescéine FITC. Certains matériaux, comme notamment le PDMS, ont montré une très nette augmentation de fluorescence, preuve de l'augmentation de porosité induite par le solvant. Les mesures de fluorescence effectuées avant mise en contact avec la solution de protéines, et comparées aux mesures effectuées sur les témoins, ont confirmé les augmentations d'autofluorescence constatées précédemment et consignées dans le tableau 1.2.

1.3.5 Conclusions

Le choix du matériau pour le support de la biopuce est donc clairement conditionné par le choix du solvant organique pour la mission, et en conséquence, s'avère directement lié aux molécules organiques recherchées. Aux vues de ces tests, le PP apparaît comme le meilleur candidat : il a globalement bien réagi au contact avec les 4 types de solvants choisis, en ne révélant ni modification géométrique significative, ni augmentation d'autofluorescence, ni accroissement de sa porosité. Toutefois, il faut noter que le PP possède la plus forte autofluorescence de départ, ce qui peut s'avérer gênant pour les mesures. Le PDMS, même s'il résiste bien et ne se dissout pas dans les solvants, est caractérisé par une trop grande porosité pour être utilisé en tant que support de biopuce spatiale. Le COC, en revanche, pourra être considéré comme un matériau d'intérêt si un mélange méthanol/chloroforme est sélectionné pour l'extraction de molécules en milieu organique. De même, le PS sera considéré comme candidat dans le cas d'une extraction dans l'heptane.

1.4 Étude comparative des comportements thermiques et mécaniques

Comme nous l'avons précisé au paragraphe 2.1 de la deuxième partie, les contraintes thermiques et mécaniques imposées à un instrument spatial sont souvent très rudes. Il est donc important de ne pas omettre cet aspect pour la sélection d'un matériau adéquat pour le support d'une biopuce spatiale. Ce support doit présenter des caractéristiques thermiques et mécaniques qui lui permettront de remplir sa fonction correctement au cours des diverses phases d'une mission. Il devra tout particulièrement résister au décollage où les vibrations et les variations de températures sont considérables, ainsi qu'à l'"atterrissage" sur le corps d'intérêt, phase la plus contraignante au point de vue mécanique en raison de la violence des chocs.

En collaboration avec le Laboratoire de Génie Mécanique et des Matériaux de Bordeaux (LGM²B), nous avons défini une première campagne d'essais qui nous a donné les premiers éléments à considérer pour sélectionner notre matériau. Ces essais ont été menés à travers l'encadrement d'un stagiaire, Guillaume AMELINE, qui a consacré 3 mois à ce sujet.

1.4.1 Mise en place d'un cahier des charges thermomécanique

À partir du cahier des charges matériau établi au chapitre 2.2 de la deuxième partie de ce travail, nous avons élaboré un nouveau cahier des charges spécialement orienté sur les caractéristiques thermiques et mécaniques du support. Plusieurs points ont été mis

Matériau	Solvant	Aspect visuel	Autofluorescence	Résistance
COC	Méthanol/Chloroforme	Légère opacification	Augmentation	Bonne
	Acétone/Hexane	Opacification + ramollissement	-	Mauvaise
	Heptane	Opacification + ramollissement	-	Mauvaise
	Toluène	Dissolution complète	-	Très mauvaise
PS	Heptane	Pas d'altération apparente	Pas de modification	Bonne
	Toluène	Dissolution complète		Très mauvaise
PDMS	Méthanol/Chloroforme	Pas d'altération	Légère diminution	Bonne
	Acétone/Hexane	Gonflement	Pas de modification	Bonne
	Heptane	Léger gonflement	Pas de modification	Bonne
	Toluène	Gonflement	Augmentation	Assez bonne
PP	Méthanol/Chloroforme	Pas d'altération	Diminution	Bonne
	Acétone/Hexane	Très léger gonflement	Diminution	Bonne
	Heptane	Pas d'altération	Légère diminution	Bonne
	Toluène	Très léger gonflement	Légère diminution	Bonne

Table 1.2: Résistance des matériaux à un bain d'une nuit dans 4 types de solvants

à jour à partir d'une analyse spécifique sur les critères de résistance aux variations de températures et aux vibrations et chocs. C'est à l'aide d'une analyse fonctionnelle propre à l'établissement de cahiers des charges que nous avons défini plusieurs fonctions que doit remplir le support dont les trois principales sont :

- permettre une bonne lecture de l'information par le lecteur,
- être compatible avec le fonctionnement de la biopuce,
- survivre aux vibrations, chocs et accélérations.

Pour remplir ces trois fonctions, le support doit :

- conserver une géométrie assez stable pour permettre une bonne lecture des spots avec le détecteur (dilatation thermique restreinte, retour à l'état d'origine après variations thermiques, pas de gondolement, etc)
- conserver son intégrité, en évitant notamment le ramollissement ou les fissures qui entraîneraient à la fois la perte de ligands et des difficultés de détection,
- conserver ses propriétés optiques (éviter toute opacification, fluorescence accrue, modification de l'indice de réfraction, etc.),
- conserver ses propriétés chimiques et mécaniques afin de ne pas modifier la porosité ou la ductilité du matériau,
- ne pas dégazer de molécules nocives pour les ligands de la biopuce.

Comme ce dernier point a été décrit au paragraphe 1.2 de cette partie, nous nous sommes attachés à déterminer l'influence de différents traitements thermiques et vibratoires sur l'état de surface et la résistance à la rupture des lames de biopuces à notre disposition.

L'ensemble du cahier des charges qui a guidé nos essais thermiques et mécaniques figure dans le tableau 1.4.

1.4.2 Présentation des essais sélectionnés

À partir de ces différents éléments et des moyens d'essais disponibles au LGM²B, nous avons mis en place une liste d'essais à réaliser pendant la période du stage. À chaque essai correspond l'investigation d'un critère à travers la mesure de plusieurs caractéristiques. Ces données sont récapitulées dans le tableau 1.5.

L'ensemble des essais a été réalisé sur des lames de PS et COC fournies respectivement par Nunc et Greiner Bio-One. Quelques essais ont aussi pu être mis en place sur une plaque grossière de PP obtenue par l'intermédiaire du laboratoire de Montpellier. Le PP n'existant pas sous forme de lame à l'heure actuelle, la plaque fournie était une plaque de moulage brut, réalisée au cours d'un exercice de travaux pratiques sur les matériaux polymères. Nous nous sommes donc principalement intéressés aux propriétés de dilatométrie et de traction du matériau, tout essai de rugosimétrie étant sans intérêt. Cette plaque faisait environ 20 cm de côté et 2 mm d'épaisseur. Elle a été usinée en différentes éprouvettes, c'est-à-dire en différentes sections de matériau de dimensions calibrées, pour les besoins des divers essais.

Differential Scanning Calorimetry (DSC)

Le principe de la DSC, ou calorimétrie différentielle à balayage, est de soumettre un échantillon et une référence à la même température croissante et de mesurer la différence d'énergie consommée. L'échantillon et la référence sont placés dans deux fours différents mais dans la même enceinte calorifique. La température est maintenue toujours égale entre les deux fours et varie de manière linéaire. Ainsi, on peut définir les transitions d'état ou de phase à travers la mesure d'une consommation ou libération d'énergie.

Nous avons soumis le COC et le PS à ce test afin de déterminer leurs températures de transition vitreuse, c'est-à-dire les températures limites à ne pas dépasser pour les essais faisant intervenir une montée en température. Il faut savoir qu'au delà de cette température, le polymère change d'état, puisqu'il passe d'un état vitreux solide à un état viscoélastique dû à l'affaiblissement des liaisons intermoléculaires. Dans notre cas, la référence était tout simplement l'air.

Dilatométrie

Un essai de dilatométrie consiste à suivre l'allongement d'un matériau sous l'effet de la température. Grâce à cet essai on peut déterminer le coefficient de dilatation thermique qui fixe la loi linéaire d'expansion du volume du matériau considéré. Dans notre cas, nous avons utilisé un dilatomètre mécanique. L'échantillon est placé dans une enceinte chauffée et un bouton poussoir est positionné à son contact pour mesurer l'allongement au cours de la montée en température. L'essai se déroule sous atmosphère neutre pour éviter que le matériau ne réagisse avec les molécules de gaz à haute température.

Pour nos essais, il a fallu adapter le dispositif à la géométrie particulière de nos échantillons. Les matériaux sont habituellement présentés sous forme de cylindres pour ce type d'essai. Nous avons donc aménagé une cale en matière réfractaire sur laquelle nous avons pu faire reposer notre échantillon de lame afin que le bouton poussoir vienne à son contact (cf. figure 1.9).

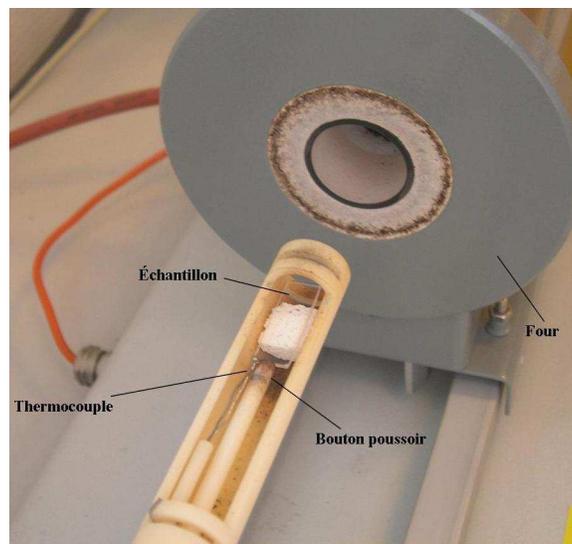


Figure 1.9: Mise en place de l'échantillon dans le dilatomètre

Essais de vibrations

Tout dispositif d'essai en vibrations comprend un vibreur, un amplificateur, un contrôleur et des capteurs. Le vibreur, ou pot vibrant, applique à l'échantillon la sollicitation vibratoire voulue. Il fonctionne selon un principe électromagnétique : son mouvement est engendré par celui d'une bobine traversée par un courant électrique et placée dans un champ magnétique. L'amplificateur de puissance fournit le courant nécessaire à l'alimentation de la bobine. Il amplifie le signal reçu du poste de pilotage en faisant varier le gain. Le contrôleur, ou la console de pilotage, permet de s'assurer que le signal vibratoire mesuré par l'accéléromètre est toujours conforme aux consignes. Les capteurs, en général des accéléromètres, permettent de mesurer l'amplitude des vibrations au cours de l'essai.

Nos essais de vibrations ont été réalisés selon deux phases : une phase de vibrations sinusoïdales et une phase de vibrations aléatoires. Ces deux aspects vibratoires constituent l'environnement de la biopuce lors du transport et du voyage spatial. Les échantillons ont été soumis à des vibrations sinusoïdales pendant 1h30min avec une accélération de 2 g et une fréquence variant entre 30 et 110 Hz, puis à des vibrations aléatoires pendant 2h30min avec des pics à 2,3 g et une fréquence comprise entre 100 et 2000 Hz. Les éprouvettes ont été fixées par l'une de leurs extrémités pour leur faire subir des vibrations maximales. Le mode de fixation est illustré figure 1.10.

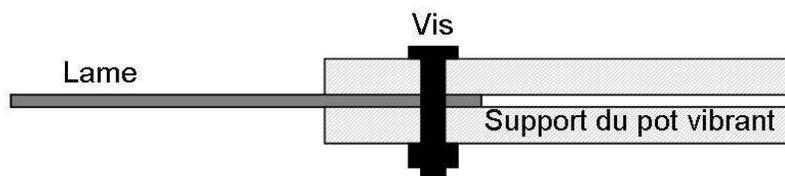


Figure 1.10: Bridage des lames pour les essais de vibrations

Deux lots d'éprouvettes ont été testés : le premier lot était constitué de lames métallisées destinées à être observées au MEB après essai, le deuxième lot comportait des éprouvettes destinées à être testées en traction afin d'observer les éventuels affaiblissements des caractéristiques mécaniques dus à la sollicitation vibratoire.

Rugosimétrie

Les essais de rugosimétrie consistent à réaliser un profil de la surface observée en traçant la topographie de celle-ci via des mesures de variation d'altitude. Pour nos essais, nous avons utilisé un rugosimètre 3D dont le fonctionnement est basé sur le principe d'aberrations chromatiques d'une lentille convergente. Un faisceau de lumière blanche est focalisé sur une surface par un système présentant une forte aberration chromatique : la longueur d'onde focalisée sur la surface dépend donc de la distance entre la lentille et la surface. Le spectre de la lumière rétrodiffusée par la surface est analysé afin de déterminer la longueur d'onde la plus intense qui correspond alors à celle focalisée à l'altitude de la surface (cf. figure 1.11). On a ainsi une mesure précise des variations d'altitude en fonction des changements de longueur d'onde en chaque point. Un avantage de cette méthode par rapport aux rugosimètres mécaniques réside dans le fait que la mesure se fait sans contact

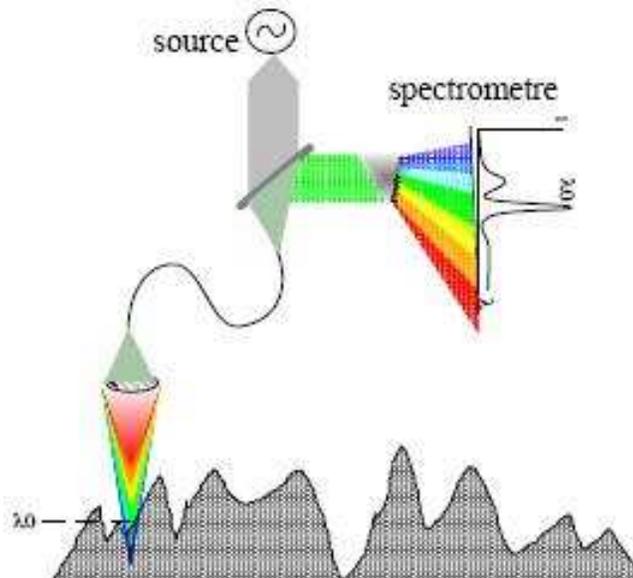


Figure 1.11: Mesure de rugosimétrie selon le principe d'aberration chromatique

et il n'y a donc pas de risque de détérioration de la surface. Or, comme nos échantillons étaient transparents, il a fallu accorder une attention toute particulière à bien mesurer la rugosimétrie de la face supérieure, celle qui nous intéressait, et non celle de la face inférieure accessible au rugosimètre par transparence.

Essais de traction

Les essais de traction permettent de déterminer la résistance à la rupture d'un matériau. Une éprouvette est fixée par ses deux extrémités dans le dispositif de traction puis étirée à vitesse constante jusqu'à ce qu'elle casse. Au cours de l'essai, son allongement ainsi que la force de traction appliquée sont mesurés. La courbe de traction tracée grâce à ces mesures fournissent des éléments quant à la déformation élastique puis plastique du matériau étudié. On détermine la contrainte élastique, la contrainte à la rupture et le module d'Young ou module d'élasticité longitudinal. Ces différentes caractéristiques permettent de définir la nature rigide ou ductile du matériau.

Pour nos essais, il a fallu adapter le dispositif à la forme particulière de nos éprouvettes. Traditionnellement, il existe des éprouvettes normées, souvent cylindriques, qui peuvent se visser dans les mors du dispositif. Dans notre cas, nous avons dû diminuer la largeur des lames pour avoir des éprouvettes plus élancées et ensuite coller des talons à leurs extrémités afin de pouvoir les fixer au dispositif. Après plusieurs investigations, le choix s'est porté sur des talons en carton, collés à l'aide d'une colle époxy bicomposants. Les thermoplastiques sont très difficiles à coller, et malgré l'optimisation de ce collage, plusieurs essais de traction n'ont pu être menés jusqu'à la rupture pour cause de glissement des talons. Cependant, nous avons tout de même pu tirer quelques informations de ces essais inachevés. Pour les essais, l'allongement a été mesuré à l'aide d'un extensomètre optique, évitant ainsi tout contact avec les échantillons.

1.4.3 Résultats

DSC

Les essais de DSC ont été réalisés sur le PS et le COC en deux exemplaires pour s'assurer du résultat. La température de transition vitreuse (T_g) du PS a été déterminée à 104°C et celle du COC à environ 102°C. Les courbes 1.12 attestent ces résultats. Ces valeurs sont largement supérieures à la température maximale envisagée pour l'utilisation de la biopuce.

On peut remarquer que le début des courbes est un peu "chaotique". Cela correspond à la mise en température et l'homogénéisation de celle-ci au sein du dispositif.

Dilatométrie

Les essais de dilatométrie ont couvert une gamme de température allant de la température ambiante jusqu'à 70°C. Les coefficients de dilatation calculés à partir des courbes tracées sont de $80.10^{-6} \text{ K}^{-1}$ pour le PS, $74.10^{-6} \text{ K}^{-1}$ pour le COC et $169.10^{-6} \text{ K}^{-1}$ pour le PP. À titre d'exemple, nous présentons la courbe de dilatométrie obtenue avec un échantillon de PS dans la figure 1.13.

Le coefficient de dilatation linéaire α se calcule à partir de l'allongement du matériau sur une plage de température considérée :

$$\alpha = \frac{\Delta L}{L_0 \Delta T} \quad (1.1)$$

où ΔL est l'allongement de l'échantillon en mètres, L_0 la longueur initiale de l'échantillon en mètres et ΔT la variation de température considérée en K ou °C. α s'exprime en K^{-1} . Nous nous étions fixés une limite de variation d'épaisseur de plus ou moins 40 μm (cf. tableau 1.4). Si on se ramène à une valeur limite de coefficient de dilatation pour une variation de température de 70°C (températures extrêmes -70°C/+70°C) on obtient un coefficient limite de $571,4.10^{-6} \text{ K}^{-1}$. Les coefficients de dilatation du PS et du COC sont largement en-dessous de cette valeur limite. La dilatation du PP, bien que supérieure à celles des deux matériaux précédents, reste inférieure à la limite fixée. Il faudra cependant rester vigilant quant à ce problème de dilatométrie lors de la fixation de la biopuce au sein du dispositif d'analyse final. S'il s'avérait en effet que les températures extrêmes et les limites de variations géométriques finales sont différentes de celles estimées ici, il faudrait veiller à ce que la distance entre le détecteur et la surface de la biopuce reste la plus stable possible malgré ce phénomène de dilatation, et donc prendre en compte la dilatation de l'ensemble du prototype pour élaborer un mode de fixation adéquat. Une solution propre à minimiser l'effet de la dilatation serait d'envisager une épaisseur de lame plus faible, tout en s'assurant que l'augmentation des déformations de planéité induites par cet enlèvement de matière ne dépassent pas la limite de 5 μm fixée.

Rugosimétrie

Les rugosités des lames de COC et PS dans leur état initial ont été mesurées pour servir de références. Ces mesures ont été pour nous l'occasion de vérifier que les lames fournies par les industriels présentaient bien des variations de profil inférieures à 5 μm . Ces deux matériaux ont démontré une rugosité bien inférieure au μm comme l'on peut le

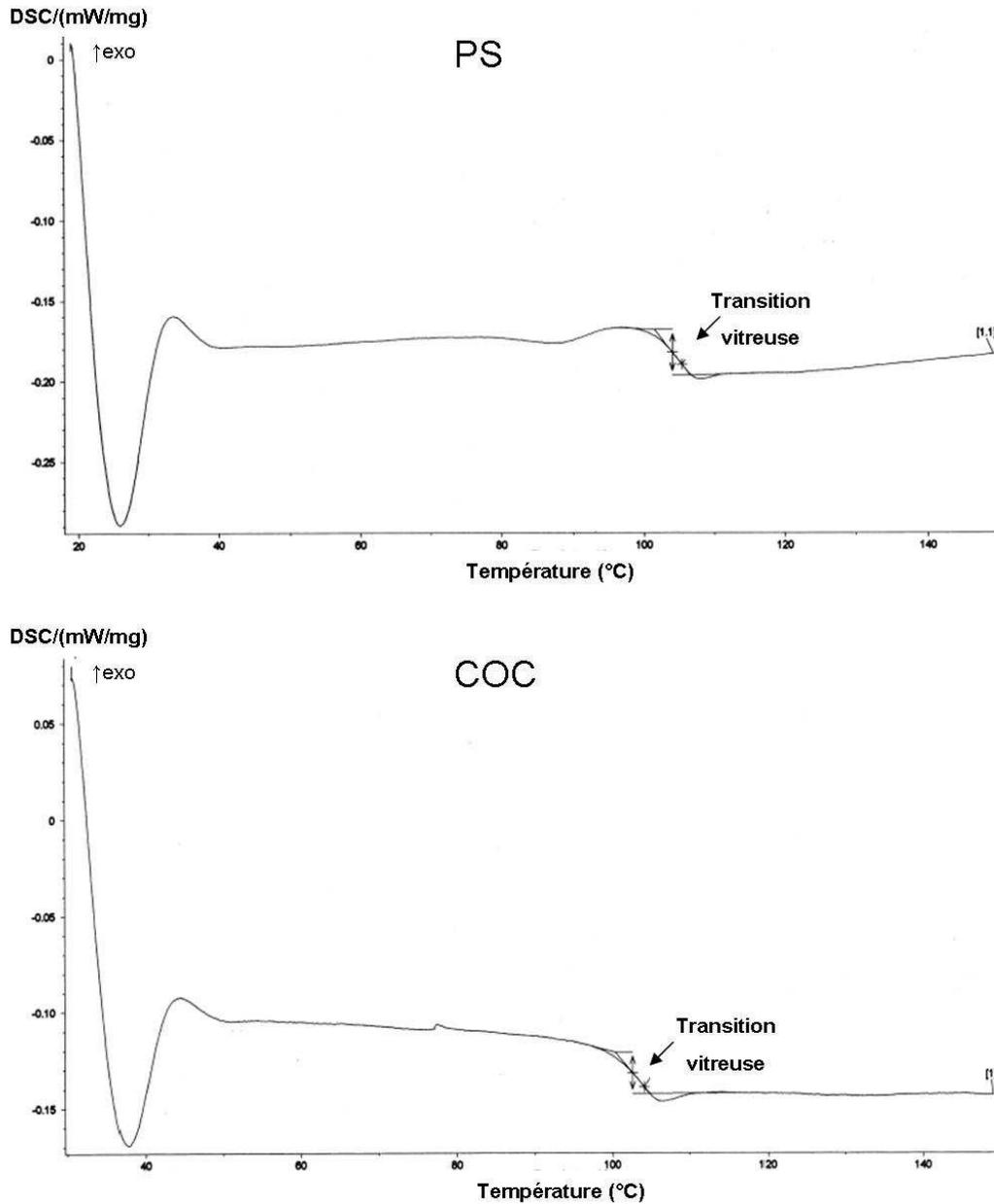


Figure 1.12: Courbes de DSC du PS et du COC. Mise en évidence de leurs températures de transition vitreuse.

constater sur les courbes 1.14. L'inclinaison des courbes est due à l'inclinaison du support sur lequel étaient déposés les échantillons pour la mesure ; elle ne reflète en aucun cas un défaut de planéité. On voit clairement que les profils de surface des deux échantillons sont très lisses.

Les rugosités de ces mêmes matériaux ont été mesurées par la suite après deux traitements de type différent : l'un mécanique et l'autre thermique. Des éprouvettes ont été testées en vibrations selon le protocole décrit au paragraphe 1.4.2. D'autres éprouvettes

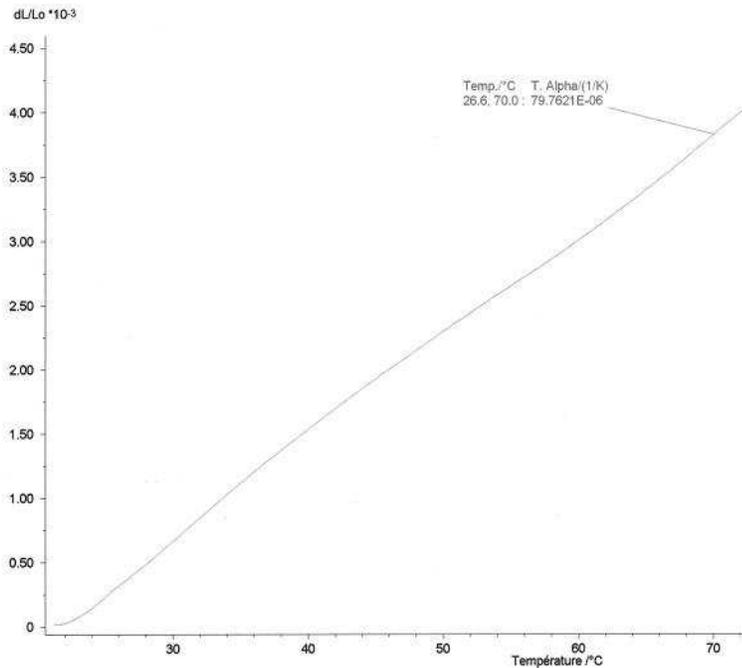


Figure 1.13: Courbes de dilatation thermique du PS

ont subi le même traitement thermique que les anticorps soumis à un "cycle long" tel que défini plus loin dans le paragraphe 2.3.2. Ce traitement correspond à 9 cycles successifs, où un cycle comprend un palier à -50°C et un palier à 50°C .

Les éprouvettes qui ont subi les vibrations présentent toujours une très faible rugosité mais révèlent un défaut de planéité (cf. figure 1.15). Le mode de fixation par encastrement d'une extrémité, très sévère pour la lame, a engendré une flexion de la lame. Le même phénomène s'observe dans le cas du PS et du COC. C'est un résultat qui, encore une fois, indique que nous devons porter la plus grande attention au positionnement et au système de fixation de la biopuce au sein du dispositif global.

Les éprouvettes soumises au cyclage thermique ont révélé deux comportements différents. Le COC n'a pas été affecté par ce traitement : il conserve une bonne rugosité et une bonne planéité. Le PS, en revanche, présente une sorte de gondolement. Sous l'effet des cycles alternant dilatation à chaud puis contraction à froid, il s'est déformé et la surface résultante apparaît bombée (cf. figure 1.16).

Traction

Des essais de traction ont tout d'abord été effectués sur les éprouvettes de PS, COC et PP, afin de déterminer les modules d'Young de ces trois matériaux. Le module d'Young E est donné par la loi de Hooke :

$$\sigma = E\varepsilon \quad (1.2)$$

où σ est la contrainte et ε la déformation. Il correspond à la pente de la portion de la courbe de traction qui va jusqu'à la limite élastique R_e (cf. figure 1.17) et nous renseigne donc sur le comportement élastique du matériau.

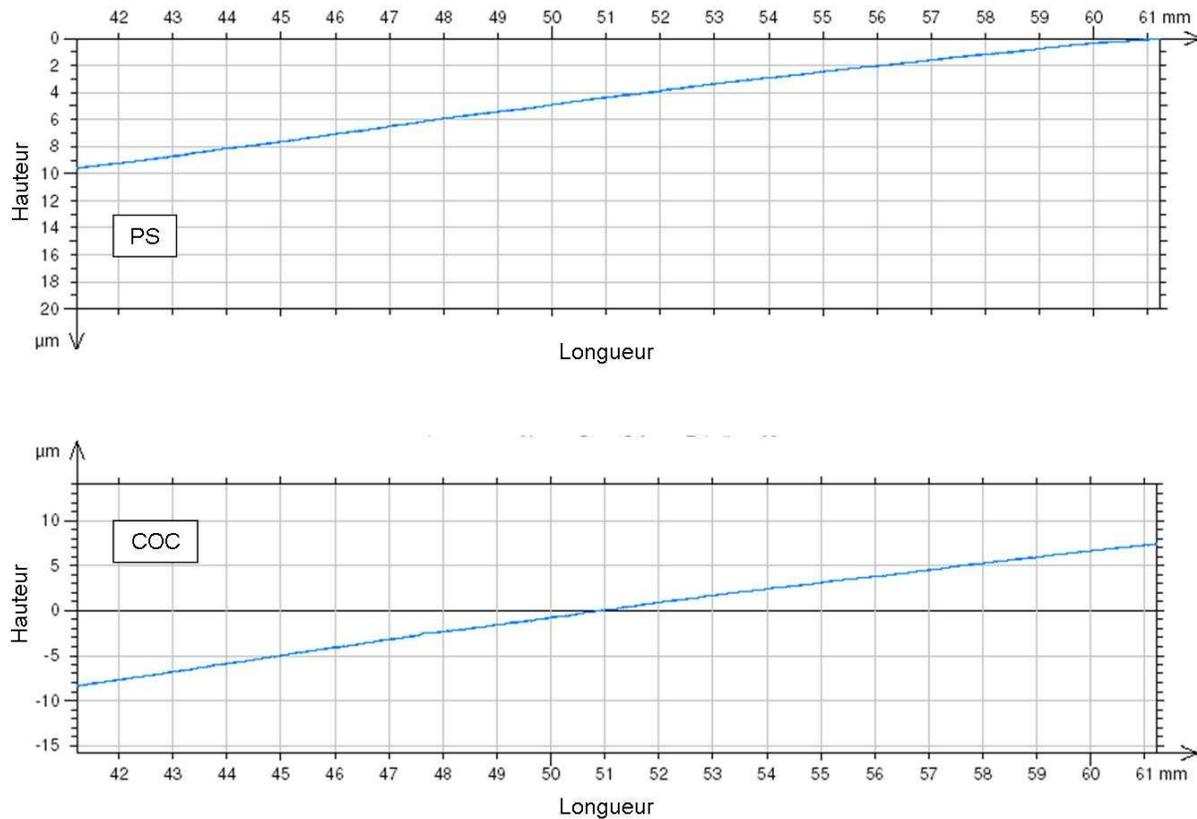


Figure 1.14: Etat de surface des lames PS et COC dans leur état initial

Les modules obtenus oscillent entre 1,7 et 2,1 GPa pour le COC, entre 2,99 et 3,04 GPa pour le PS et entre 1,06 et 1,09 GPa pour le PP.

Les contraintes à rupture ont été plus difficiles à déterminer car certaines éprouvettes n'ont pu être menées jusqu'à la rupture à cause de glissements des talons.

On a pu déterminer une contrainte à rupture d'environ 35 MPa pour le PS qui a montré un comportement fragile avec une faible déformation élastique suivie d'une rupture brutale (cf. figure 1.18).

On a constaté que le COC se déforme élastiquement au moins jusqu'à 50 MPa, ensuite les essais ont dû être interrompus car un décollement et une striction apparaissaient au niveau des mors du dispositif (cf. figure 1.19).

Le PP est apparu comme le matériau le plus ductile avec un allongement bien plus élevé que ses concurrents (cf. figure 1.20). Cependant son module d'Young est beaucoup plus faible et il commence à se déformer plastiquement pour des contraintes plus faibles (≈ 20 MPa) que celles établies pour le PS et le COC. On note encore une fois que les essais n'ont pas pu aller jusqu'à la rupture. Lors de la déformation plastique du PP, celui-ci blanchit en trahissant un réarrangement de ses chaînes moléculaires sous la contrainte.

Des essais de traction ont aussi été réalisés sur les éprouvettes traitées mécaniquement en vibrations et thermiquement en cyclage chaud/froid.

Globalement, les éprouvettes ayant subi le cyclage thermique ne présentent aucune modification de comportement mécanique significative.

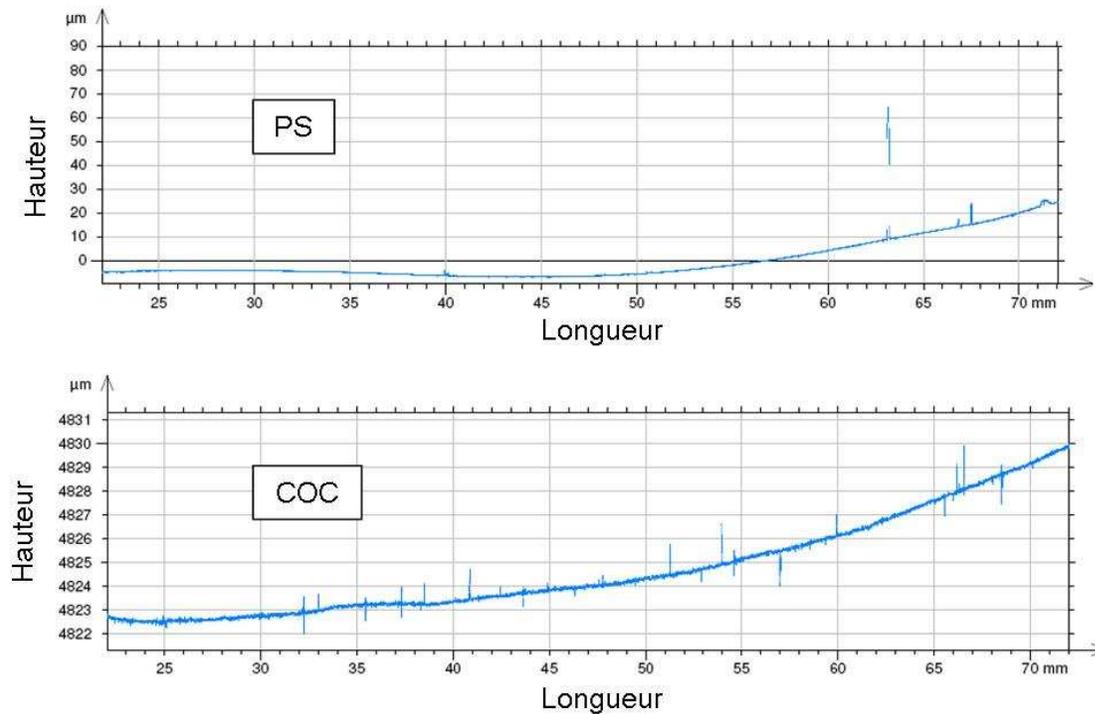


Figure 1.15: État de surface des lames PS et COC après avoir subi des essais de vibrations. Les artéfacts que l'on constate sur les courbes sont dus à des poussières.

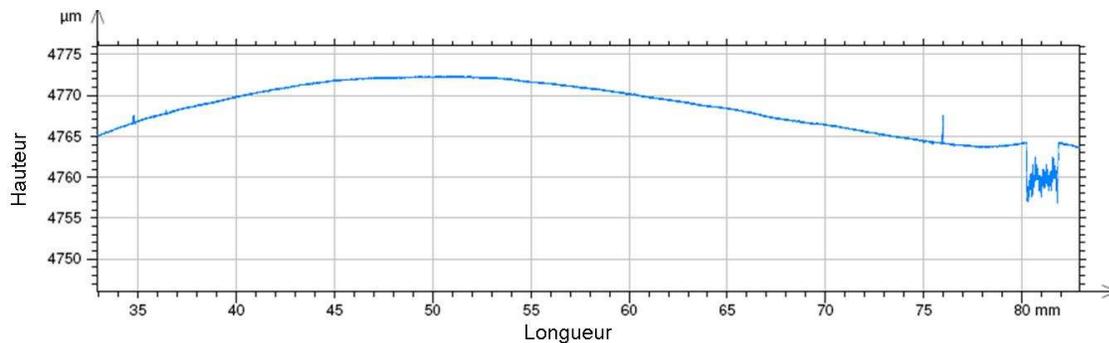


Figure 1.16: État de surface de la lame de PS après cyclage thermique

Concernant les éprouvettes sollicitées en vibrations, vu le nombre peu élevé d'échantillons testés et les difficultés de mise en œuvre des essais, aucun résultat fiable ne peut être avancé qui permettrait de définir clairement une modification des caractéristiques mécaniques dans ce cas. Il faut envisager de renouveler l'expérience après optimisation du dispositif de traction.

Globalement, on peut déduire de ces essais de traction que le PS se comporte comme un matériau fragile : il se déforme peu élastiquement et ne se déforme pas du tout plastiquement, et c'est donc un matériau cassant. Le COC est plus souple que le PS car sa déformation élastique est supérieure. Nous

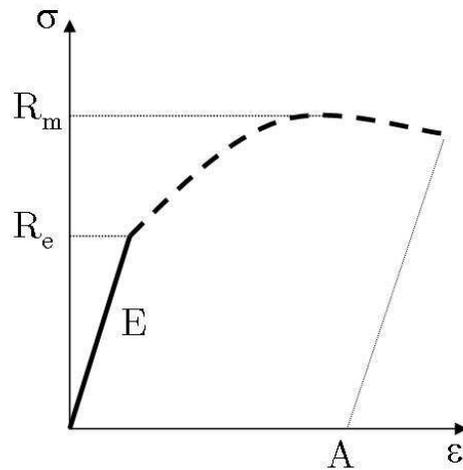


Figure 1.17: Courbe de traction théorique traçant la contrainte (σ) en fonction de la déformation (ϵ). La zone en trait plein correspond à la zone de déformation élastique alors que la zone en pointillés représente la zone de déformation plastique. La limite entre ces deux zones, R_e , est la limite d'élasticité. Au-delà de cette limite, le matériau se déforme de manière irréversible. R_m correspond à la limite à la rupture : une striction (c'est-à-dire un resserrement) apparaît dans le matériau menant à sa rupture. A est l'allongement à la rupture.

Courbe de traction d'une éprouvette de PS

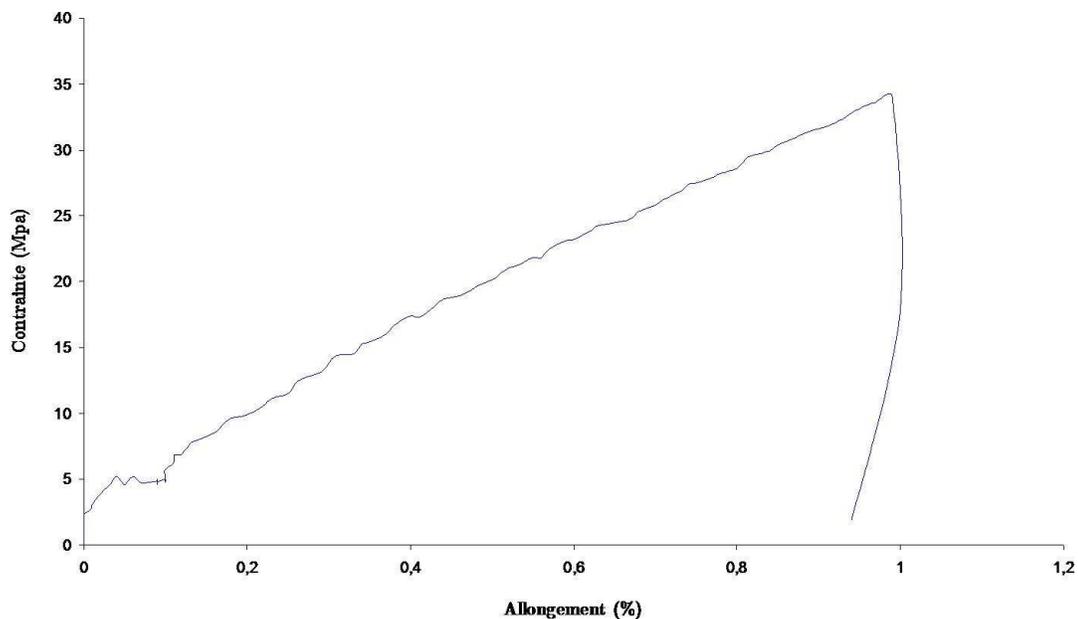


Figure 1.18: Courbe de traction d'une éprouvette de PS

n'avons pas pu déterminer sa contrainte à rupture mais l'on sait qu'elle est plus élevée

Courbe de traction d'une éprouvette de COC

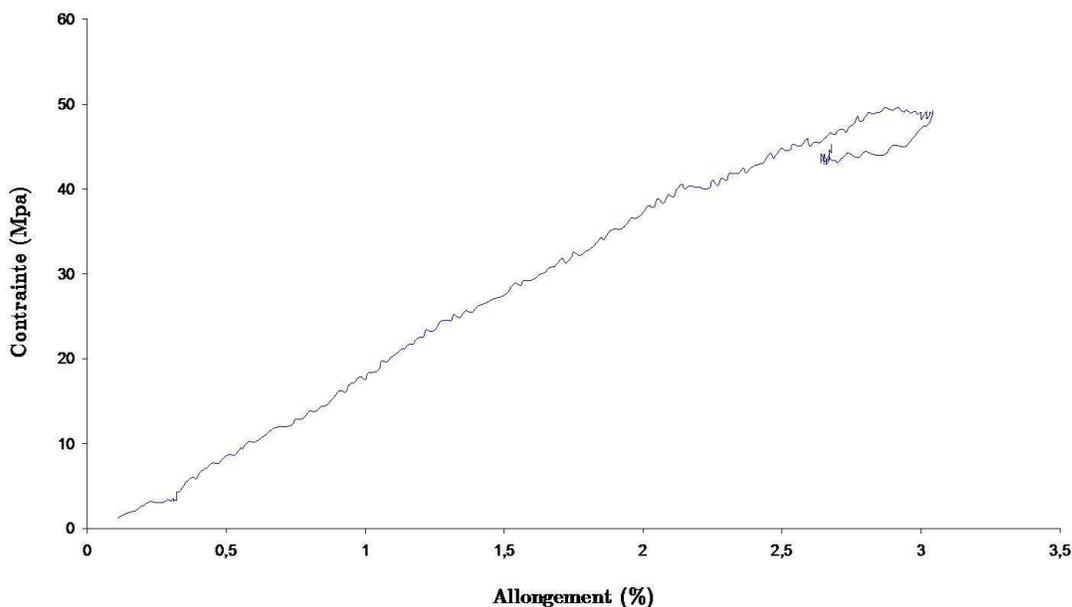


Figure 1.19: Courbe de traction d'une éprouvette de COC. La courbe se termine sur un glissement des talons.

que le précédent.

Enfin, le PP a le comportement d'un matériau ductile qui se déforme beaucoup plastiquement mais casse lorsqu'il est soumis à des contraintes inférieures à ses 2 concurrents.

1.4.4 Conclusions

L'ensemble des résultats est récapitulé dans le tableau 1.6.

Le COC présente à l'évidence les meilleures caractéristiques : dilatation la plus faible, très faible rugosité, conservation maximale de sa planéité, déformation élastique jusqu'à des valeurs de contraintes supérieures à celles du PS et du PP.

Les deux autres matériaux présentent cependant des caractéristiques convenables : leur utilisation en tant que support de biopuce peut toujours être envisagée, à condition, toutefois, de prendre quelques précautions.

Il sera intéressant de compléter la gamme d'essais menés sur le PP dès que celui-ci sera disponible sous forme de lame.

1.5 Conclusions

À travers ces essais de dégazage, résistance aux solvants et résistance mécanique, on peut tenter d'élaborer un classement provisoire des différents types de matériaux à notre disposition pour réaliser le support de la biopuce.

Un seul matériau est éliminé fermement de la liste : le PDMS. Il présente des propriétés de

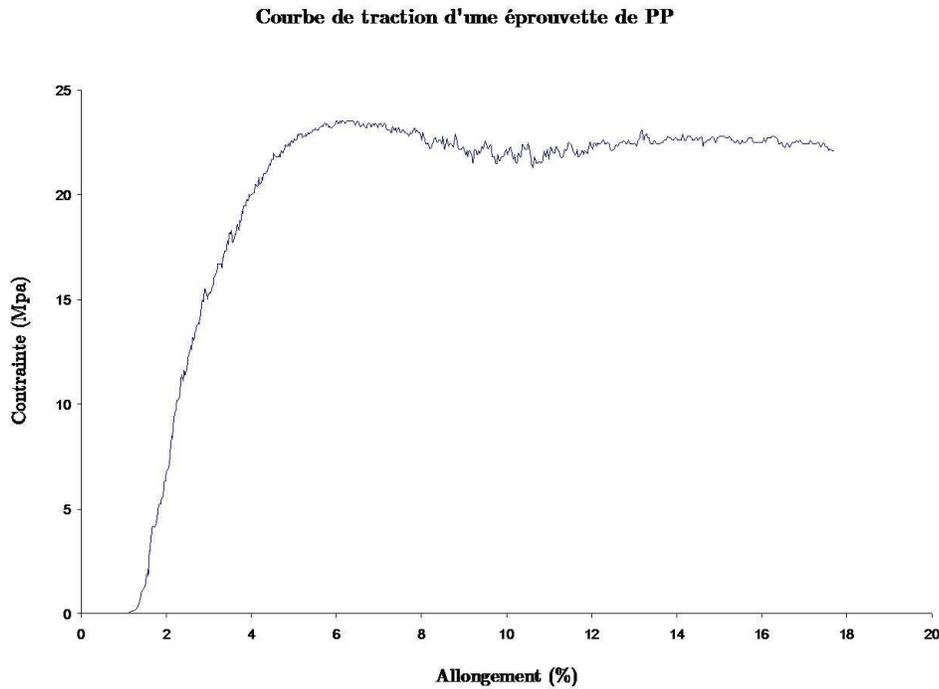


Figure 1.20: Courbe de traction d'une éprouvette de PP

dégazage au-dessus des normes en vigueur et une forte porosité aux solvants qui excluent son utilisation pour le support de notre biopuce.

Le verre, bien qu'il soit inerte d'un point de vue chimique, est notoirement fragile d'un point de vue mécanique, ce qui peut être fâcheux pour la résistance du support face aux vibrations et aux chocs. Dans un premier temps, la préférence est donc donnée aux thermoplastiques, en espérant que l'un d'eux convienne.

Le COC s'impose comme le meilleur candidat après ces trois types de tests : il dégaze très peu, possède les meilleures caractéristiques mécaniques et résiste au mélange de solvants Méthanol/Chloroforme.

Le PP et le PS possèdent tout de même des atouts et restent des candidats potentiels car leurs résultats aux tests sont dans des normes acceptables. Le PP affiche une très bonne résistance aux solvants et ses caractéristiques mécaniques et de dégazage sont suffisamment bonnes pour le maintenir dans la liste des matériaux envisageables. Le PS s'avère le candidat le moins intéressant : il dégaze en plus grande quantité que ses concurrents, il a une très mauvaise résistance aux solvants organiques (excepté pour l'heptane), et c'est le matériau le plus fragile, le plus cassant.

Matériau	Solvant	Aspect visuel avant essai	Résultats du test d'adsorption	Conclusion
COC	Méthanol/Chloroforme	Plan Légèrement opaque	Pas d'adsorption accrue	Porosité inchangée
PS	Heptane	Plan Transparent	Pas d'adsorption accrue	Porosité inchangée
PDMS	Méthanol/Chloroforme	Légèrement incurvé Transparent	Adsorption de protéines	Augmentation de la porosité
	Acétone/Hexane	Légèrement incurvé Transparent	Adsorption de protéines	Augmentation de la porosité
	Heptane	Légèrement incurvé Transparent	Forte adsorption de protéines	Forte augmentation de la porosité
	Toluène	Incurvé Transparent	Très forte adsorption de protéines	Très forte augmentation de la porosité
PP	Méthanol/Chloroforme	Plan Transparent	Pas d'adsorption accrue	Porosité inchangée
	Acétone/Hexane	Légèrement gonflé Transparent	Pas d'adsorption accrue	Porosité inchangée
	Heptane	Plan Transparent	Pas d'adsorption accrue	Porosité inchangée
	Toluène	Légèrement gonflé Transparent	Pas d'adsorption accrue	Porosité inchangée

Table 1.3: Influence du contact avec les solvants sur la porosité des matériaux

Fonction	Critère	Caractéristique	Limite	Élément modulateur
Permettre une bonne lecture des spots	Etat de surface	Planéité , rugosité	variation $< 5\mu\text{m}$	Résolution du détecteur
	Dimensions du support	Stabilité thermique	dilatation $< 40\mu\text{m}$	Utilisation d'un autofocus
		Présence de fissures	largeur fissure $< 1\mu\text{m}$	
Etre compatible avec le fonctionnement de la biopuce	Tenue en température	Température de ramolissement	$T_g > 70^\circ\text{C}$	Possibilité d'envisager l'utilisation d'un boitier pressurisé et à température contrôlée
	Tenue au dégazage	Quantité et nature des molécules dégazées	RML $< 1\%$ CVCVM $< 0,1\%$	
Survivre aux vibrations, chocs et accélérations	Comportement mécanique général	Module d'Young Contrainte à la rupture	comportement ductile	
	Tenue aux vibrations	Caractéristiques après essai sur pot vibrant	environ 4,5g	

Table 1.4: Cahier des charges thermique et mécanique pour le support d'une biopuce

Critère	Essai	Caractéristique mesurée
Tenue en température	Differential Scanning Calorimetry	Température de transition vitreuse (T_g)
Déformations géométriques dues aux variations de température	Dilatométrie	Coefficient de dilatation thermique (α)
Résistance aux vibrations	Excitation sinusoïdale et aléatoire avec pot vibrant	Contraintes élastique et à rupture Visualisation des défauts au MEB
Etat de surface	Rugosimètre	Rugosité
Résistance mécanique	Traction	Contraintes élastique et à rupture

Table 1.5: Tableau récapitulant les essais mis en œuvre pour étudier les différents critères d'intérêt

	PS	COC	PP
T_g	104 °C	102 °C	-
α (K ⁻¹)	80.10 ⁻⁶	74.10 ⁻⁶	169.10 ⁻⁶
Variation d'épaisseur pour $\pm 70^\circ\text{C}$	$\pm 5,6 \mu\text{m}$	$\pm 5,2 \mu\text{m}$	$\pm 11,8 \mu\text{m}$
Rugosité	$< 1 \mu\text{m}$	$< 1 \mu\text{m}$	-
Planéité	Déformation après vibrations ($\sim 30 \mu\text{m}$) due au mode de fixation Gondolement après cycles thermiques	Déformation après vibrations ($\sim 8 \mu\text{m}$) due au mode de fixation Reste plan après cycles thermiques	- - -
E (GPa)	~ 3	~ 2	$\sim 1,1$
R_m (MPa)	~ 35	> 50 ($R_e = 50$ MPa)	~ 23
ε_{max} (%)	0,9	3% à 50 MPa	> 35 mais blanchiment

Table 1.6: Tableau bilan comparant les caractéristiques thermiques et mécaniques obtenues pour les 3 matériaux. Les caractéristiques du COC semblent le désigner comme le meilleur matériau de ce point de vue.

Chapitre 2

Quelles sont les limites de résistance des anticorps en tant qu'outils de reconnaissance d'un instrument spatial ?

2.1 Les anticorps : des ligands aux intérêts multiples

2.1.1 Présentation générale

Les anticorps sont des glycoprotéines du sang, appelés également immunoglobulines. Ils appartiennent au système immunitaire et sont chargés de la défense de l'organisme contre les intrusions externes, car ils possèdent la capacité de détecter les molécules qui n'appartiennent pas à l'organisme, les antigènes, et déclenchent ainsi une réaction de défense immunitaire qui vise à éliminer ces intrus.

Les anticorps présentent une géométrie en forme de Y. Ils sont constitués de 4 chaînes polypeptidiques, dont on distingue deux chaînes dites lourdes et deux chaînes légères (cf. figure 2.1). Ces chaînes sont reliées entre elles par des ponts disulfures. Les extrémités des deux branches du Y sont appelées "sites antigéniques" : c'est à ce niveau que s'effectue la reconnaissance de l'antigène qui se traduit par la formation d'un complexe anticorps/antigène.

Il existe deux grandes familles d'anticorps : les anticorps monoclonaux et les anticorps polyclonaux. Les antigènes possèdent plusieurs déterminants antigéniques, appelés aussi épitopes, qui sont reconnus par l'anticorps et permettent la détection. Les anticorps monoclonaux sont produits artificiellement de telle sorte que chaque anticorps monoclonal est spécifique à un seul type d'épitope. Ce sont donc des anticorps très spécifiques à leur cible. Les anticorps polyclonaux, qui sont les anticorps que l'on observe dans la nature, sont conçus pour reconnaître plusieurs épitopes : la détection s'avère donc plus facile mais moins spécifique.

2.1.2 Les avantages des anticorps en tant que ligands

Les anticorps sont en tout premier lieu des ligands très spécifiques, en particulier les anticorps monoclonaux. La liaison qui se crée entre l'anticorps et l'antigène est une liaison

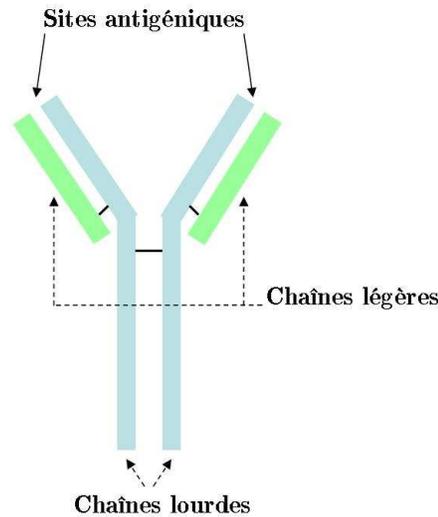


Figure 2.1: Schéma de la structure d'un anticorps

électrostatique non covalente : la reconnaissance et la formation d'un complexe fort entre anticorps et antigène ne peuvent donc avoir lieu que si la géométrie 3D du site antigénique de l'anticorps est en parfait accord avec la forme de l'antigène (Steele et al., 2001b). Ceci explique la grande spécificité des anticorps : ils reconnaissent avant tout la structure tridimensionnelle (Parro et al., 2005). Un ligand très spécifique est un atout fort pour la réalisation d'une biopuce car il va permettre de déterminer si la molécule cible est présente ou non en réduisant au maximum la probabilité de faux-signal dû à une réaction croisée. Cependant, les anticorps pallient aussi l'inconvénient d'une trop grande spécificité en permettant non seulement de détecter des molécules cibles très précises mais en s'adaptant aussi à la détection de familles de molécules. Ces anticorps anti-familles offrent la possibilité de détecter à partir d'un seul et même ligand un ensemble de molécules de structures très proches, ce qui repousse la limite de détection.

Un autre avantage de ce ligand est sa flexibilité : on peut produire des anticorps contre un vaste panel de biomarqueurs d'intérêt exobiologique (Tang, 2007). Il faut savoir que les antigènes qui s'attaquent au système immunitaire peuvent être de formes très variées : de la molécule simple aux protéines complexes en passant par des cellules entières. Ainsi, des anticorps pour détecter l'ADN et l'ARN, les acides aminés, des cyanobactéries, etc, ont déjà été créés. L'anticorps ouvre donc des perspectives immenses en tant que ligand de biopuce car il autorise la détection de milliers de biomarqueurs, de formes et de structures multiples et variées.

Enfin, les anticorps sont des ligands très sensibles avec lesquels on peut envisager de rechercher des molécules à l'état de trace dans un échantillon. Cette qualité poussée à son paroxysme a révélé des limites de détection pouvant aller jusqu'à quelques particules par trillion (Charlton and Porter, 2001).

Variété des cibles détectables, spécificité et sensibilité, voilà trois caractéristiques qui font de l'anticorps un ligand tout désigné pour le développement d'une biopuce spatiale destinée à la recherche de molécules organiques souvent à l'état de traces dans un milieu complexe.

2.2 La dénaturation des anticorps : un processus complexe

Les anticorps possèdent un fonctionnement optimal en conditions physiologiques de pH, température et solvant, c'est pourquoi ils sont régulièrement utilisés par les biochimistes. Il est cependant très difficile de fixer les limites au-delà desquelles la reconnaissance entre l'anticorps et son antigène est détériorée. Dans notre cas, comme nous ne maîtrisons pas complètement les conditions environnementales dans lesquelles va voyager notre biopuce, il apparaît primordial de définir quelles seront les limites à ne pas franchir pour que notre instrument soit opérationnel et produise un résultat fiable.

Comme nous l'avons vu plus haut, la capacité de reconnaissance de l'anticorps est entièrement liée à sa structure géométrique dans l'espace. Cette structure dépend des liaisons entre les différents acides aminés, qui confèrent à la protéine sa géométrie tridimensionnelle. Or, dans certaines conditions, ces liens peuvent se défaire, modifiant ainsi la forme de la molécule qui ne peut alors plus jouer son rôle. On dit que l'anticorps est dénaturé. Les trois principaux facteurs de cette dénaturation sont la chaleur, un pH trop acide ou trop alcalin, et un milieu très concentré en ions. Les hautes températures provoquent une agitation thermique qui peut briser les liaisons hydrogènes. L'anticorps peut aussi se dénaturer s'il est mis en contact avec un solvant organique : les régions hydrophobes se tournent vers l'extérieur alors que les régions hydrophiles se regroupent au centre de la molécule qui perd ainsi sa forme originelle. Certaines substances chimiques peuvent aussi réagir avec la molécule et briser les liaisons ioniques.

La dénaturation est un processus très complexe qui se décompose en plusieurs étapes faisant succéder altérations réversibles et irréversibles. En outre, les différentes parties de l'anticorps peuvent être plus ou moins sensibles à tel ou tel facteur (Vermeer and Norde, 2000). On admet que l'on peut craindre un début de dénaturation de l'anticorps dès que la température excède les 50°C environ ou que le pH devient soit inférieur à 6,5 soit supérieur à 8,2 (Hage, 1999; Pichon et al., 1999; Ben Khelifa, 2000; Castellari et al., 2000; Kondo et al., 2000; Hage and Nelson, 2001; Nishiyama et al., 2002; Claeys-Bruno et al., 2006a,b). Ces valeurs, il faut le préciser, sont données à titre indicatif. Or, pour notre projet nous avons besoin de valeurs plus précises qui fixent notamment la perte de reconnaissance en fonction de la température. De nombreuses questions se posent : à partir de quelles limites les performances de l'anticorps commencent-elles à s'altérer ? Dans quelles conditions la dénaturation devient-elle irréversible ? Le conditionnement sous forme lyophilisée influe-t-il, de manière positive ou négative, sur sa résistance face aux agressions qu'il rencontre ? Sans compter qu'il faut aussi évaluer l'impact de variations répétées de température, la notion de cycles thermiques.

En ce qui concerne les conditions particulières à une mission spatiale telles que la microgravité ou la résistance aux radiations cosmiques, peu d'études ont été faites. L'impact de la microgravité et de la gravité martienne sur la formation du complexe anticorps/antigène a été étudiée lors de vols paraboliques. Les résultats de cette expérience sont regroupés dans Maule et al. (2003). L'objectif premier était d'évaluer si l'effet de la gravité sur la distribution des fluides pouvait influencer la liaison anticorps/antigène. Les faibles gravités n'affectent pas la reconnaissance, en revanche, l'hypergravité semble avoir un impact sur la structure de la molécule.

Aucun article ne fournit des informations sur la résistance des anticorps aux diverses particules des rayonnements cosmiques. Thompson et al. (2006) se sont intéressés à la résistance de sondes fluorescentes sous irradiation en protons : ils soulignent l'importance de poursuivre ce travail avec des anticorps, d'autant plus qu'on manque cruellement de données dans ce domaine.

Face à ce manque de données, plusieurs campagnes d'essais visant à étudier la résistance de l'anticorps dans diverses conditions ont été mises au point. Les paragraphes suivants rendent compte dans le détail des protocoles établis et des résultats obtenus.

2.3 Étude des effets des variations thermiques sur la structure de l'anticorps - BiOMAS-ARTheC

2.3.1 Le contexte

Comme nous l'avons spécifié dans le paragraphe 2.2, les anticorps sont sensibles à leur environnement et en particulier aux conditions de températures auxquelles ils sont soumis. Or, dans le cadre de l'adaptation au spatial d'une biopuce, il serait pertinent de déterminer avec précision l'influence que des variations de températures auront sur la capacité de reconnaissance de ces protéines. D'après les études préliminaires de l'ESA concernant le projet de Life Marker Chip pour la mission ExoMars, il a été établi que la biopuce devrait supporter des variations allant de -50°C à $+50^{\circ}\text{C}$ avec des pics envisageables à $+70^{\circ}\text{C}$ (ESA, 2005). C'est à partir de ces données que nous avons décidé d'étudier plus précisément la réaction des anticorps face à diverses situations thermiques dans les limites de ces -50°C / $+70^{\circ}\text{C}$. Cette étude complexe a été regroupée sous le nom de projet BiOMAS-ARTheC pour Biochip for Organic Matter Analysis in Space - Antibody Resistance to Thermal Cycles.

Le principal objectif de l'étude a été de déterminer la sensibilité de l'anticorps face aux cycles thermiques tout en cherchant à établir si le nombre de cycles pouvait avoir un impact sur une éventuelle détérioration de ses performances. Un autre but a consisté à définir si une baisse ou une montée brutale de température pouvait le dénaturer. Enfin, la température de 70°C étant considérée comme la température limite inférieure de dénaturation irréversible des protéines, nous avons voulu tester la réaction des anticorps en question face à cette condition extrême.

Notre étude, qui porte sur le comportement des anticorps, a été menée en parallèle sur une sonde fluorescente. Pour en comprendre la nécessité, il faut préciser que l'anticorps doit être marqué avec une sonde fluorescente pour pouvoir émettre un signal lorsqu'il forme un complexe avec son antigène. Cette sonde, fixée sur l'anticorps, fluoresce lorsque le complexe ligand/cible est excité par un laser. La sonde est donc directement liée à la performance de la biopuce car elle crée le signal visible de la reconnaissance moléculaire effectuée par l'anticorps. Autrement dit, on doit absolument s'assurer que cette sonde supportera, elle aussi, les conditions thermiques spatiales. Il est indispensable de pouvoir déterminer si la perte de signal après essai correspond à une perte de reconnaissance de l'anticorps ou simplement à une détérioration de son marqueur, si nous voulons traiter correctement les résultats de nos essais. La condition indispensable à une bonne analyse

des essais était donc de vérifier la résistance de la sonde fluorescente dans les diverses situations.

2.3.2 Le protocole d'essai

Conditionnement des échantillons et matériel utilisé

Pour cette étude, nous avons choisi de travailler avec des échantillons lyophilisés. La sonde fluorescente est la Fluorescéine IsoThioCyanate (FITC), sonde commerciale qu'il est possible d'utiliser pour la détection par fluorescence sur biopuces. Les anticorps sont des anticorps monoclonaux secondaires produits par le laboratoire BIORAD. Ce sont des anticorps anti-espèce dirigés contre la partie invariante d'anticorps de lapin (anticorps primaires). Ils sont nommés anti-immunoglobuline G de lapin (antiIgG de lapin) et sont produits chez la chèvre. On les marque bien évidemment à l'aide de la sonde FITC.

Une contrainte importante pour le conditionnement des échantillons tenait au fait qu'ils devaient être fermés hermétiquement pour supporter le transport de Montpellier à Bordeaux. Nous avons donc décidé d'utiliser des flacons en verre d'une contenance de 1,5 mL (cf. figure 2.2) qui permettent de fermer hermétiquement les échantillons après lyophilisation et ce jusqu'à leur analyse après essai.

Les flacons ont été remplis soit d'une solution de 1 mL d'anticorps à la concentration de 1/200, soit d'une solution de fluorescéine, puis lyophilisés. Les solvants utilisés sont une solution de tampon de phosphate (PBS à pH 7,35) pour les anticorps et une solution de tampon carbonate (0,1M à pH 9) pour la fluorescéine, paramètres optimisés par un étudiant stagiaire de l'IBMM, Mickaël Baqué.

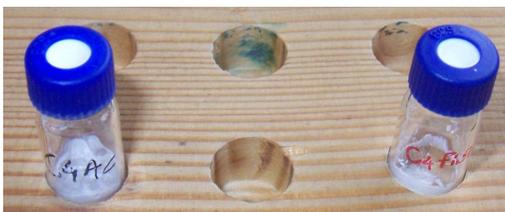


Figure 2.2: Tubes en verre contenant les échantillons lyophilisés

Les essais ont été réalisés dans une étuve Votsch installée au LAB. Sa gamme de température s'étend de -70°C à $+245^{\circ}\text{C}$, ce qui convenait parfaitement dans notre cas. Elle peut atteindre des rampes de montée ou descente en température de l'ordre de 5°C par minute. Ces variations restent, certes, insuffisantes pour effectuer des chocs thermiques rigoureux mais nous avons tout de même pu solliciter nos échantillons avec des changements de températures assez rapides. Un logiciel élaboré sous Labview (cf. figure 2.3) permet de programmer et contrôler les différentes phases des essais. Trois mesures de températures ont été enregistrées au cours du temps : une première mesure donnée par un thermocouple interne à l'étuve et situé au niveau de la soufflerie, ainsi que deux autres mesures fournies par des thermocouples positionnés par nos soins au sein de l'enceinte.

Pour favoriser la conduction thermique et limiter l'inertie, les échantillons ont été placés dans l'enceinte dans un récipient en aluminium, bon conducteur thermique.

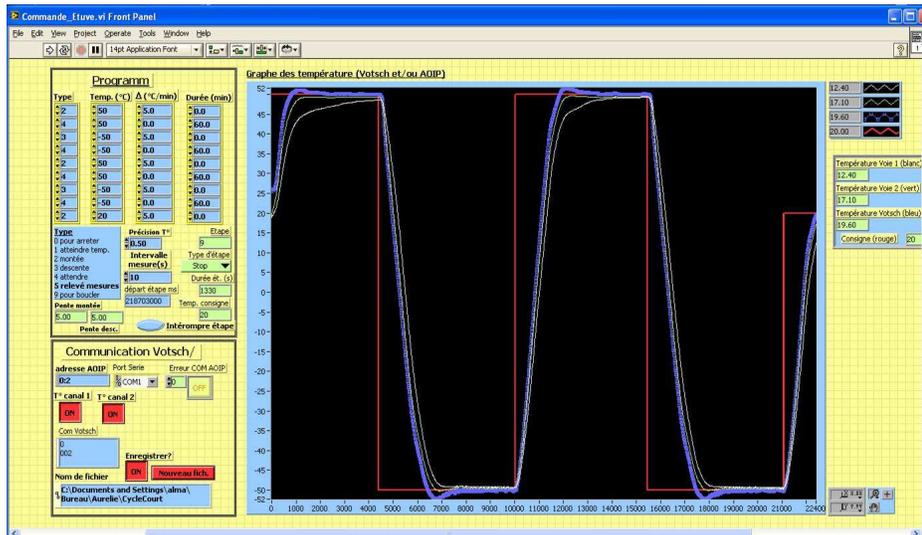


Figure 2.3: Ecran de contrôle de l'étuve : programmation des cycles sous Labview et suivi des variations de température au cours du temps. Programmation et enregistrement du cycle court.

Description des conditions thermiques

Cinq types de sollicitations thermiques ont été étudiées au cours de ce projet BiOMAS-ARTheC.

Nous avons tout d'abord défini des cycles alternant plusieurs paliers à -50°C et $+50^{\circ}\text{C}$.

Le premier cycle a été appelé cycle "réel" (CR) ou cycle court. Il comporte un premier palier d'une heure à $+50^{\circ}\text{C}$ puis une descente à -50°C pour un nouveau palier d'une heure et ensuite une répétition de ce schéma. On a ainsi 2 paliers à haute température et 2 paliers à basse température avant un retour à la température ambiante (cf. figure 2.4). L'objectif de ce cycle était de reproduire grossièrement les variations de températures envisagées pour une mission spatiale :

- une montée en température lors du décollage du sol terrestre,
- une descente en température dans l'espace avec une température négative pour toute la durée du transit jusqu'au corps d'intérêt,
- une remontée en température lors de la phase de descente pour l'"atterrissage" sur le corps du Système solaire ciblé (augmentation de la température due aux frottements avec l'atmosphère),
- une nouvelle baisse de température si le corps exploré est le siège de basses températures (comme Mars par exemple).

Un deuxième cycle, nommé cycle "extrême" ou cycle long (CL), a été programmé pour faire subir aux échantillons un plus grand nombre de cycles alternant -50°C / $+50^{\circ}\text{C}$. Pour des raisons techniques, nous nous sommes arrêtés sur un nombre de 9 cycles effectués sur une nuit soit environ 18 heures (cf. figure 2.5). Pour cet essai, la durée des paliers a été ramenée à 30 min. Le but était de déterminer, à partir d'une comparaison avec le cycle court, si le nombre de cycles subis avaient une influence sur le degré de détérioration des capacités de l'anticorps, dans le cas d'une éventuelle détérioration.

Pour compléter l'étude des résultats de ces 2 cycles, deux essais que nous avons qualifiés de "chocs thermiques" ont été réalisés :

- un choc froid (CF) où on maintient l'étuve à -50°C pour y introduire brusquement

l'échantillon pour un palier d'une heure puis à l'extraire de manière aussi brutale (cf. figure 2.6),

- un choc chaud (CC) qui reprend le même principe mais avec une étuve maintenue à 50°C (cf. figure 2.7).

L'intérêt de ces essais était double. Ils permettaient, dans le cas de la constatation d'un effet lors des cycles précédents, de déterminer si celui-ci relevait d'une dégradation à chaud ou à froid. Quant au phénomène de "choc", c'est-à-dire de changement de température brutal, il était susceptible de nous renseigner sur la sensibilité de l'anticorps à la rapidité des variations de température.

Enfin, un dernier essai à 70°C (M70) a été choisi pour évaluer les impacts de cette température limite sur les capacités de l'anticorps. Le schéma de l'essai est simple : l'échantillon est placé dans l'étuve à température ambiante, il subit ensuite une montée en température jusqu'à 70°C où il est maintenu pendant une heure avant de redescendre à température ambiante (cf. figure 2.8). La température de 70°C est effectivement un repère dans la mesure où elle est connue pour représenter la limite inférieure à partir de laquelle les protéines sont dégradées irréversiblement.

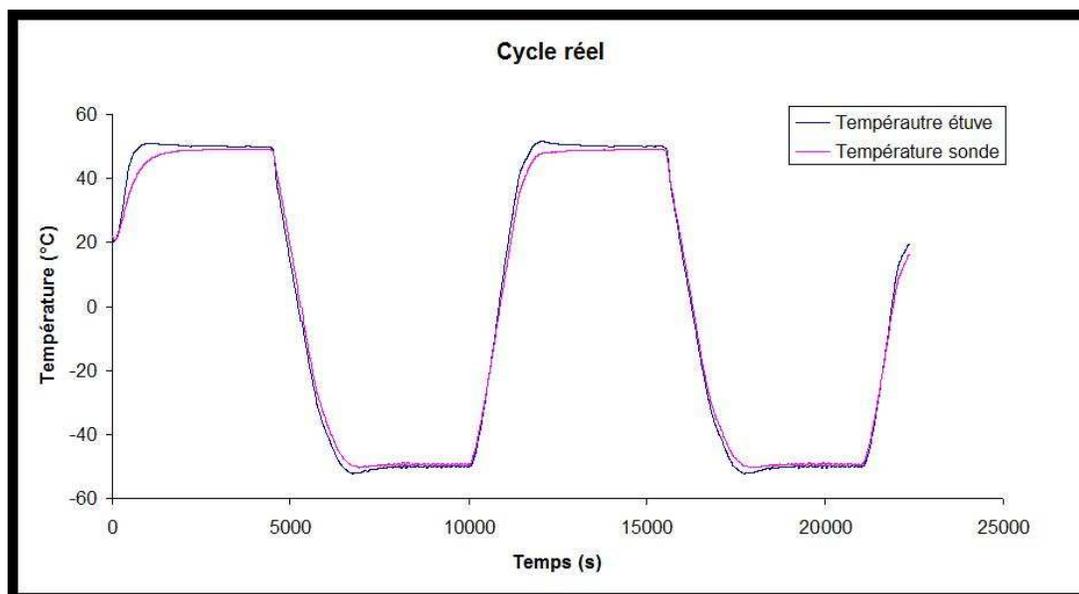


Figure 2.4: Schéma de variation du cycle "réel" ou cycle court. La température étuve est la température enregistrée par le thermocouple interne à l'étuve, la température sonde correspond à la température enregistrée par un thermocouple fixé sur l'échantillon.

Protocole d'analyse

Tous les échantillons sont analysés par immunochimie à Montpellier. Les résultats sont comparés à trois témoins et une référence. Deux témoins correspondent à des échantillons qui ont subi le transport. Le troisième est un échantillon conservé à Montpellier à +4°C dans l'obscurité. Une solution d'anticorps non lyophilisée et n'ayant subi aucun traitement thermique est prise pour référence. Il en va de même pour la fluorescéine.

Après cyclage thermique, les échantillons d'anticorps sont réhydratés avec un tampon phosphate pour analyse. La concentration de la solution est ramenée à 1/1000 ce qui

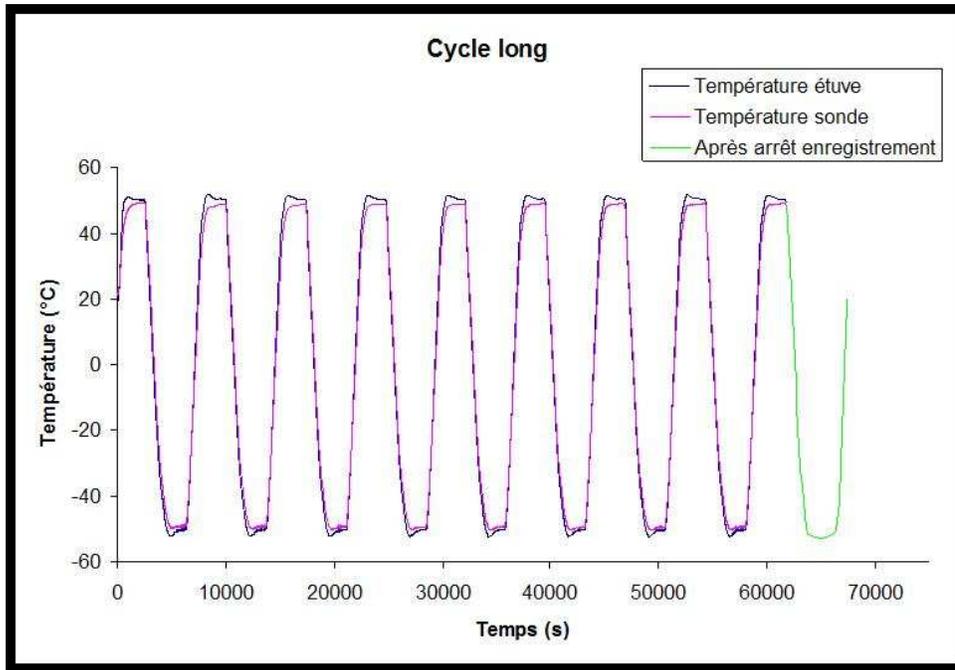


Figure 2.5: Schéma de variation du cycle long. L'ordinateur qui pilotait l'étuve s'est arrêté de manière impromptue pendant l'expérience, la courbe en vert représente donc la partie du cycle qui pas été enregistrée. On compte neuf cycles.

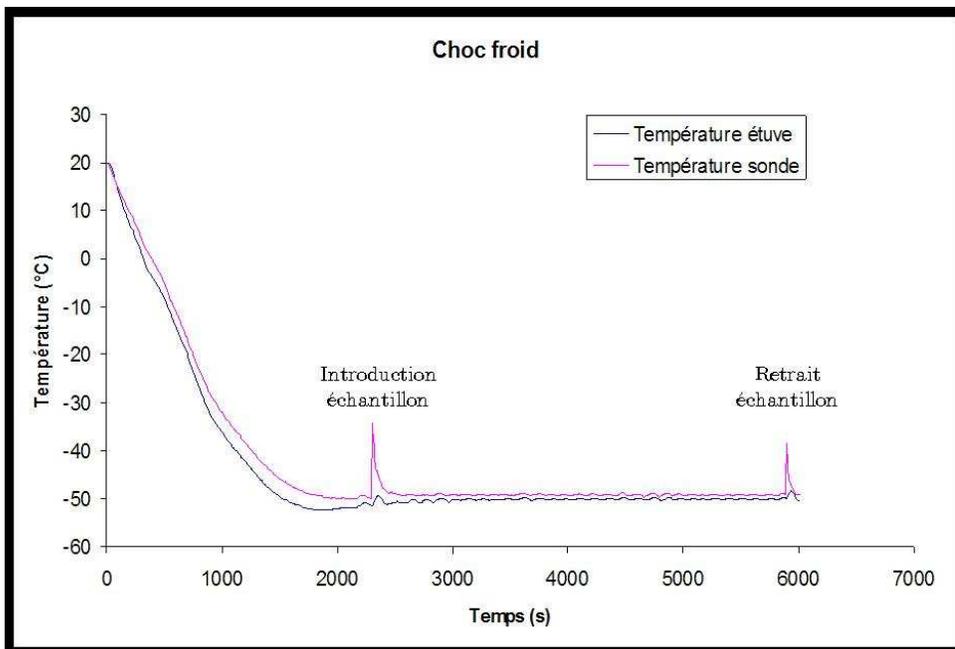


Figure 2.6: Courbe de température du choc froid. L'introduction et le retrait de l'échantillon apparaissent clairement sur les courbes, l'ouverture de la porte provoquant une hausse générale de la température dans l'enceinte.

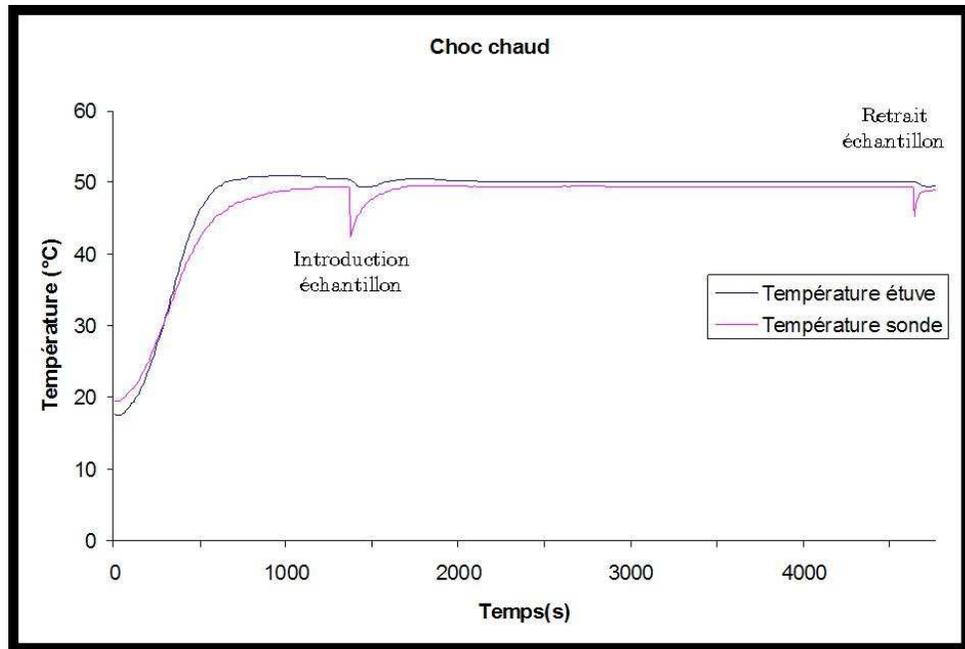


Figure 2.7: Courbe de température du choc chaud. L'introduction et le retrait de l'échantillon apparaissent clairement sur les courbes, l'ouverture de la porte provoquant une baisse générale de la température dans l'enceinte.

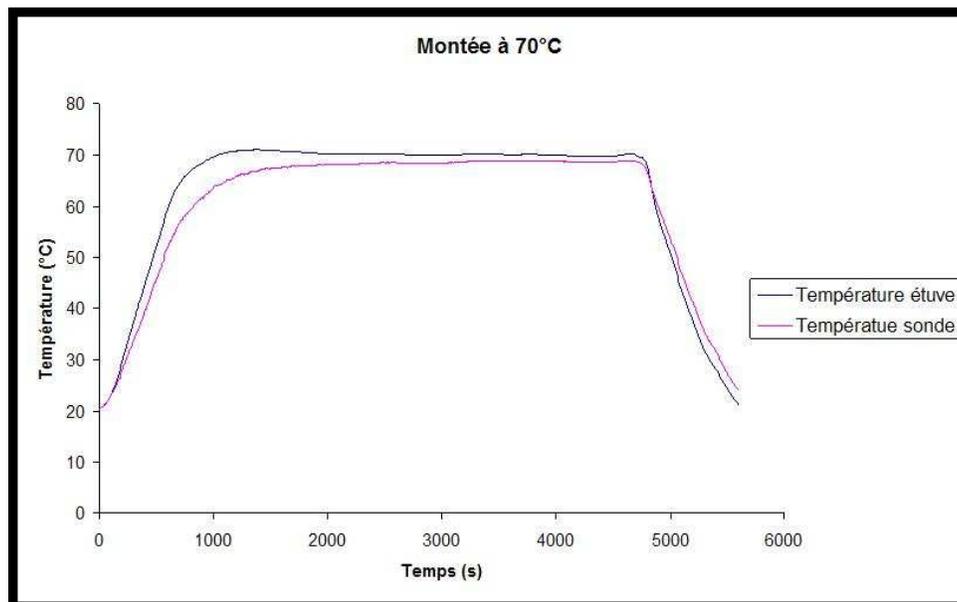


Figure 2.8: Courbe de température de l'essai à 70°C.

correspond à la concentration optimale pour l'analyse. La réhydratation de la fluorescéine est effectuée à l'aide d'un tampon carbonate. L'intensité de fluorescence des solutions est mesurée dans des microplaques 96 puits, à l'aide d'un fluorimètre fonctionnant à la longueur d'onde d'excitation de la fluorescéine (485 nm). Le volume de solution après réhydratation est suffisant pour analyser chaque échantillon au moins deux fois, ce qui permet de confirmer les résultats obtenus. Quant à l'analyse de la solution de fluorescéine, elle consiste simplement en une lecture de fluorescence.

Dans le cas des anticorps, un test de type ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) est mis en oeuvre. C'est un test immunologique par méthode indirecte. L'antigène est tout d'abord greffé au fond des puits fonctionnalisés de la microplaque. Ce greffage s'effectue à l'aide d'un bras homobifonctionnel (le glutaraldéhyde) qui se fixe à la fonction NHR du support d'une part et à l'antigène d'autre part. Dans notre cas, l'antigène est l'histamine que reconnaît ensuite l'anticorps primaire (AcI) qui lui est spécifique (anticorps anti-histamine). C'est seulement lorsque ce complexe support/antigène/anticorps primaire est formé qu'intervient l'anticorps secondaire (AcII) que l'on souhaite tester. Cet anticorps secondaire (l'anticorps antiIgG de lapin dans notre cas) reconnaît l'anticorps primaire sur lequel il vient se fixer. Et comme cet AcII est marqué d'une sonde fluorescente, il permet la détection et la quantification des AcI. Le principe de ce test est résumé sur la figure 2.9. Le test réalisé à l'IBMM a la particularité d'utiliser l'HistamineC4 en tant qu'antigène : la reconnaissance de l'histamine, très petite molécule, a été développée et validée par le laboratoire (Claeys-Bruno et al., 2006a) et constitue l'une de leurs expertises.

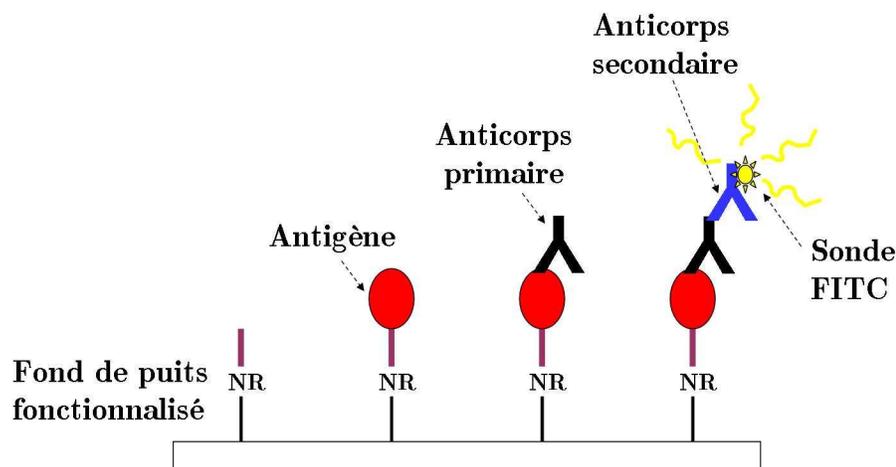


Figure 2.9: Principe du test ELISA mis en oeuvre pour l'analyse de nos anticorps antiIgG de lapin

2.3.3 La mise en lumière d'un problème amont : la lyophilisation

La première série d'essais, réalisée en décembre 2007, n'a donné aucun résultat concret sur la résistance des anticorps au cyclage thermique mais a révélé l'existence d'un problème amont dans la réalisation de la biopuce : l'étape de lyophilisation. En effet, tous les

échantillons d'anticorps testés lors de cet essai, y compris les témoins, ont démontré une perte totale de reconnaissance de leur cible. Après investigation, il est apparu que cette perte de reconnaissance était entièrement liée à l'étape de lyophilisation. Les anticorps reconnaissaient parfaitement leur cible avant lyophilisation mais pas du tout après.

La lyophilisation consiste simplement à sublimer le solvant aqueux solide pour ne récupérer que les molécules résiduelles non volatiles. La sublimation, passage direct d'un état solide à un état gazeux, est une technique appropriée aux anticorps puisqu'elle se fait à basse température où les protéines sont réputées stables. Cependant, le protocole de lyophilisation, c'est-à-dire l'enchaînement des étapes de congélation et de sublimation et les paramètres de chacune, revêt vraisemblablement une grande importance. Ainsi, après une première optimisation, il a été démontré que les anticorps conservent en partie leur capacité de reconnaissance lorsqu'une congélation de 2h à -80°C est réalisée avant la lyophilisation à proprement parler, alors que toute activité avait disparu lors de la lyophilisation première après une congélation de 2h à -196°C .

Cependant, les différentes études menées à l'IBMM à Montpellier sur le sujet n'ont pas encore permis de déterminer définitivement les raisons de la détérioration des échantillons lors de la première série d'essais, ni de mettre au point un protocole de lyophilisation assurant une conservation totale des capacités de l'anticorps.

2.3.4 Les résultats

Une deuxième série d'essais à été réalisée au mois d'avril 2008. Elle a fourni des tendances quant à la résistance des deux types d'échantillons : la sonde FITC et les anticorps antiIgG.

La fluorescéine

Les résultats concernant l'effet des cycles thermiques sur la fluorescéine sont détaillés dans le tableau 2.1. Ils sont exprimés en signal sur blanc. Le signal correspond à l'intensité de fluorescence de la solution d'échantillon dans le puits de la microplaque et le blanc correspond au signal d'une solution de tampon carbonate. Les valeurs de signal/blanc (S/B) obtenus pour les échantillons sont comparés à une valeur témoin correspondant au S/B moyen des deux "témoins transport". Ces deux témoins ont subi toutes les conditions imposées aux échantillons, excepté les cycles thermiques. On a ainsi une lecture directe de l'effet des sollicitations thermiques.

	Blanc	Témoin	CL	CR	CC	CF	M70
S/B	1,00	35,9	35,08	36,68	36,39	34,40	2,71
Incertitude	0,05	2,2	0,77	2,39	0,66	3,49	0,13

Table 2.1: Fluorescence des échantillons de FITC présentée en signal sur blanc. CL = Cycle Long, CR = Cycle Réel, CC = Choc Chaud, CF = Choc Froid et M70 = Maintien à 70°C

Le traitement à 70°C affiche le résultat le plus significatif. En effet, cet essai a affecté le noyau fluorescent de la fluorescéine qui a perdu 95% de son activité de fluorescence. C'est

un résultat qui n'était pas apparu dans la première série d'essais où tous les anticorps avaient montré une perte de reconnaissance totale. Sur cette première série, l'ensemble des sondes fluorescentes avait bien supporté les cycles thermiques. On le voit, il faudra donc s'assurer que cette perte d'activité de la fluorescéine à 70°C n'est pas imputable à un autre paramètre : l'expérience sera reconduite sur un nouvel échantillon de fluorescéine.

Pour ce qui est des autres sollicitations thermiques, les échantillons ne présentent pas de perte de fluorescence significative par rapport aux "témoins transport", il n'y a pour ainsi dire aucun effet.

Les anticorps

En ce qui concerne les anticorps, les résultats sont aussi présentés en signal sur blanc. Le signal correspond à l'intensité de fluorescence de la solution dans le puits. Le blanc est la mesure de fluorescence dans des puits où l'anticorps primaire n'a pas été injecté : comme il n'y a pas d'anticorps primaire dans ces puits, l'anticorps secondaire que l'on teste ne peut s'accrocher nulle part et se trouve éliminé lors du lavage. Cependant, un phénomène d'adsorption non spécifique peut survenir : des anticorps secondaires peuvent être adsorbés par le support, ils ne sont alors pas éliminés lors du lavage et créent un signal parasite lors de l'analyse. La mesure de blanc prend donc en compte ce phénomène. Chaque échantillon a été analysé deux fois. Les deux analyses ont été effectuées à 3 jours d'intervalle. Les échantillons ont été remis en solution pour analyse dès leur retour à Montpellier et une partie de la solution a été conservée à 4°C pour être analysée 3 jours plus tard. Les tableaux 2.2 et 2.3 regroupent l'ensemble des résultats obtenus lors des deux analyses.

	Blanc	Témoin	CL	CR	CC	CF	M70
S/B	1,00	2,20	1,69	1,85	1,92	2,13	NM
Incertitude	0,05	0,19	0,09	0,15	0,14	0,17	-
% de perte	100	0	42	29	23	6	100

Table 2.2: Résultats de l'analyse 1 sur les échantillons d'anticorps : niveau de reconnaissance des anticorps après cyclage thermique présenté en signal sur blanc. CL = Cycle Long, CR = Cycle Réel, CC = Choc Chaud, CF = Choc Froid et M70 = Maintien à 70°C. NM = Non Mesurable : le signal correspond au blanc ($< S/B_{blanc} + 3 * Incertitude_{blanc}$).

On remarque que les pertes de signal sont moins significatives dans le cas de l'analyse 2. Cet effet pourrait être dû à une régénération de l'anticorps pendant les 3 jours de stockage en solution à 4°C. C'est pourquoi, dans la discussion des résultats ci-dessous, on ne considérera donc que les résultats de l'analyse 1 qui reflètent réellement l'effet des cycles thermiques sur l'anticorps. Il se peut que le temps de stockage introduit pour l'analyse 2 fausse quelque peu les résultats, même si l'on observe les mêmes tendances. Cette possibilité de régénération de l'anticorps en solution est toutefois intéressante et mériterait d'être approfondie.

Les anticorps soumis au traitement à 70°C présentent une fluorescence du même ordre de grandeur que le blanc, ce qui tend à confirmer la perte totale de fluorescence des sonde

	Blanc	Témoin	CL	CR	CC	CF	M70
S/B	1,00	2,20	1,82	1,96	2,08	2,17	NM
Incertitude	0,08	0,19	0,16	0,10	0,18	0,12	-
% perte	100	0	32	20	10	2,5	-

Table 2.3: Résultats de l'analyse 2 effectuée 3 jours après l'analyse 1 sur les échantillons d'anticorps : niveau de reconnaissance des anticorps après cyclage thermique présenté en signal sur blanc. CL = Cycle Long, CR = Cycle Réel, CC = Choc Chaud, CF = Choc Froid et M70 = Maintien à 70°C. NM = Non Mesurable : le signal correspond au blanc.

FITC qui marquent les anticorps. Il est donc impossible de savoir si l'anticorps a été endommagé ou non.

Les anticorps sollicités au cours du cycle long enregistrent une perte de capacité de reconnaissance de l'ordre de 40%, le traitement a donc été dommageable pour l'anticorps.

Les anticorps soumis au cycle "réel" affichent des pertes d'activité de l'ordre de 30%, ce qui indique un effet destructeur. Cependant, la dénaturation est moins marquée que pour le cycle long, ce qui semble indiquer que c'est la répétition des cycles qui produit un effet délétère. Plus les variations de températures sont nombreuses, plus la dégradation augmente.

Le choc froid n'a pas eu d'effet sur les anticorps alors que le choc chaud présente une légère dégradation du signal d'environ 20%. Ce résultat indique que ce n'est pas la température en elle-même qui est destructrice pour la reconnaissance anticorps/antigène mais ce sont plutôt les variations de températures répétées. Il confirme également que l'anticorps semble plus sensible aux hautes températures qu'aux températures négatives.

2.3.5 Conclusions et perspectives

Les essais de cyclage thermique ont tout d'abord été le révélateur d'un problème plus profond, celui du conditionnement même de nos anticorps. La lyophilisation, choisie à la fois pour son côté pratique dans la spatialisation et pour ses propriétés stabilisantes vis-à-vis de l'anticorps, s'est avérée bien plus compliquée à mettre en œuvre de manière fiable qu'on l'avait imaginé. Un important travail est en cours afin d'optimiser à la fois la procédure de lyophilisation ainsi que la "matrice", c'est-à-dire la solution, dans laquelle les anticorps sont lyophilisés.

Pour ce qui est des différents traitements thermiques, la sonde de fluorescence FITC a bien résisté à l'ensemble des sollicitations, sauf dans le cas de l'expérience de maintien à 70°C pendant 1h où le noyau fluorescent s'est dégradé sous l'effet de la chaleur en perdant toute activité de fluorescence. Ce résultat reste cependant à confirmer par de nouvelles manipulations. Il serait d'ailleurs intéressant d'envisager de tester plusieurs sondes fluorescentes commerciales à 70°C afin d'en sélectionner une qui permettrait de suivre l'effet produit sur les anticorps à cette température.

Ce qui semble particulièrement affecter les anticorps, c'est la répétition de variations de températures de vaste amplitude. Les résultats de l'expérience de "choc chaud" pourraient bien indiquer que les hautes températures sont plus nocives que les basses températures

pour lesquelles on ne constate aucun effet significatif.

Il ressort de ces résultats qu'il faudra vraisemblablement faire tout particulièrement attention à la stabilité de la température de notre biopuce tout au long de la mission en évitant autant que possible des cycles de congélation/décongélation. Le point positif réside avant tout dans la prédominance des basses températures au cours d'une mission spatiale, températures pour lesquelles l'anticorps reste stable.

Il serait par ailleurs intéressant de donner une suite à ces essais en planifiant des expériences qui évalueraient l'impact de la durée de sollicitation sur la dégradation. Nous avons choisi ici d'appliquer des paliers de 30 minutes ou une heure et il serait à présent utile d'estimer s'il existe par exemple une corrélation entre le degré de dégradation et la durée de sollicitation à haute température. La dégradation de l'anticorps évolue-t-elle de manière linéaire en fonction de la durée de maintien en température? Un passage de quelques minutes à 50°C est-il aussi destructeur qu'une période de plusieurs heures à cette même température?

2.4 Étude de l'impact des radiations cosmiques sur les capacités de reconnaissance de l'anticorps - BiOMAS-ARCoR

Il existe trois moyens différents d'étudier la résistance des anticorps face aux particules cosmiques : la simulation numérique, l'expérimentation sous faisceau de particules et l'expérimentation dans l'espace. Nous avons décidé de mettre en oeuvre ces trois approches complémentaires pour élaborer une étude solide des effets de l'irradiation sur nos ligands. Ce paragraphe va donc présenter l'aspect simulation qui a été développé ainsi que les expériences en laboratoire qui en ont découlé. Un projet d'expérience sur la station spatiale internationale (ISS) est en cours de réflexion et devrait voir le jour dans les années à venir. Il ne sera pas abordé ici.

2.4.1 La simulation numérique, une étape incontournable

Pour définir quels types de particules, quels flux et quelles gammes d'énergie peuvent être considérés comme représentatifs de l'irradiation cosmique au cours d'une mission spatiale, le recours à la simulation numérique s'est tout de suite avéré indispensable. Sur cette thématique est née une collaboration très active avec le CENBG et, plus particulièrement, l'équipe Interface Physique Biologie (IPB) qui possède, en la personne de Sébastien Incerti, une forte expertise sur l'outil de simulation Geant4.

Nous avons donc décidé de simuler, avec leur aide, l'interaction entre les particules et notre biopuce au cours d'une mission martienne.

Pour cette simulation, nous avons utilisé deux outils d'application basés sur Geant4 : GRAS et PLANETOCOSMICS.

Geant4 (Agostinelli, 2003; Allison and *et al*, 2006), pour GEometry And Tracking 4, est un outil de simulation Monte Carlo, développé au CERN dans les années 1990. Il utilise le langage C++, langage orienté objet, et s'appuie sur le développement de son prédécesseur, Geant3, écrit en Fortran et longtemps considéré comme une référence pour la simulation

en Physique des Hautes Energies. Une communauté internationale regroupée autour de ce code depuis 1999 est chargée de compléter, d'améliorer et de préciser, la première version du code qui a vu le jour en 1998. Geant4 constitue donc un outil performant unique qui ne cesse d'évoluer afin de proposer des simulations d'interaction particules/matière les plus réalistes possibles.

GRAS (Geant4 Radiation Analysis in Space) est une interface utilisateur basée sur Geant4 qui permet de faciliter la simulation d'irradiation dans le cadre de projets spatiaux (Santin et al., 2005). La modélisation de géométries 3D ainsi que l'ensemble des calculs de grandeurs telles que la dose ionisante ou la fluence sont plus aisés pour l'utilisateur qui interagit avec l'outil grâce à des interfaces macrofiles et n'as pas besoin de programmer en C++. GRAS a été développé à l'ESTEC par Giovanni Santin *et al.*

PLANETOCOSMICS est un outil d'application Geant4 qui permet d'étudier l'interaction des particules avec les planètes du Système solaire (Desorgher et al., 2006). Développé à l'Université de Bern par Laurent Desorgher *et al.*, PLANETOCOSMICS tient compte en particulier de la composition de l'atmosphère et du sol, de la présence d'un champ magnétique, etc.

Pour les besoins de nos simulations, nous avons développé une interface, basée sur le logiciel ROOT (<http://root.cern.ch/>), en vue d'une utilisation combinée de GRAS et PLANETOCOSMICS.

Les spectres de particules utilisés ont été obtenus avec l'outil CREME96 (Tylka et al., 1997). Les protons, les particules alpha, les ions carbone et les ions oxygène ont été considérés : ce sont les espèces les plus abondantes du spectre de rayons cosmiques et par conséquent elles donnent une bonne représentation de celui-ci.

Pour simuler une mission de type "exploration martienne", une stratégie découplant voyage et exploration à la surface a été adoptée. Nous avons simulé un trajet de six mois entre la Terre et Mars, suivi d'une période d'exploration à la surface de Mars d'une durée d'un mois. Notre scénario de modélisation tient compte des rayons cosmiques galactiques (GCR) mais aussi des particules provenant d'événements solaires (SEP). Afin de nous placer dans un "pire cas", la simulation utilise les spectres de particules GCR au moment où l'activité solaire est minimum (donc les GCR sont maximum) et inclut un événement solaire exceptionnel, d'une durée d'une semaine, au cours du transit.

La composition de l'atmosphère martienne, la composition du sol, ainsi qu'une géométrie rudimentaire de rover ont été implémentées dans les simulations, ce qui confère un certain réalisme à notre étude.

Les simulations réalisées à l'aide de PLANETOCOSMICS ont révélé une forte abondance de particules gammas et de neutrons à la surface du sol martien. Ces particules proviennent majoritairement de l'interaction des particules cosmiques avec le sol.

Lors du voyage Terre-Mars, les particules majoritaires sont les protons, en particulier si un événement solaire a lieu.

Les doses ionisantes dans notre biopuce, située à l'intérieur du rover, restent relativement faibles. Les GCR provoquent une accumulation de dose de l'ordre de 70 mGy pour un trajet aller de six mois suivi d'un mois d'exploration. En revanche, un événement solaire d'une semaine au cours de la mission augmente largement la dose : celle-ci atteint 2 Gy pour l'interaction des SEP seuls avec notre biopuce. Et comme ces événements sont complètement imprévisibles, il convient de considérer des marges assez larges pour la dose

ionisante que pourra supporter la biopuce sans subir d'endommagement.

L'ensemble des paramètres de simulation utilisés, ainsi que les résultats obtenus sont détaillés dans l'article en Annexe A qui a récemment été accepté dans le journal *Astrobiology*.

2.4.2 Des irradiations sous faisceau : une première évaluation de l'effet du rayonnement cosmique sur les ligands

Grâce aux précieuses informations fournies par la simulation, du temps d'irradiation sous faisceau a été obtenu sur la plateforme AIFIRA (Application Interdisciplinaire des Faisceaux d'Ions en Région Aquitaine) du CENBG. Une première campagne d'essais d'irradiation en neutrons s'est déroulée à l'automne 2007 suivie d'une deuxième campagne d'irradiation, en protons cette fois-ci, au printemps 2008.

Les premiers essais : étude de l'irradiation en neutrons de plusieurs échantillons

Les simulations ayant démontré une forte abondance en neutrons au niveau du sol martien, nous avons décidé de proposer une expérience sur la ligne neutronique de la plateforme AIFIRA. Cette proposition a été acceptée par le comité de sélection et nous avons ainsi pu bénéficier de 3 jours de faisceau pour mener à bien nos irradiations. Pour des raisons techniques, deux énergies assez faibles de neutrons ont été choisies : 6 MeV et 0,6 MeV. Mais, on peut noter sur le spectre des simulations (cf. figure 2.10) que les neutrons à ces énergies sont relativement abondants. Les neutrons de 6 MeV ont été produits grâce à une collision de deutons sur une cible solide de deutérium, les neutrons de 0,6 MeV ont été obtenus par réaction de protons incidents sur une cible solide de LiF.

Deux types d'échantillons ont été irradiés : des sondes fluorescentes FITC seules et des anticorps monoclonaux marqués à la FITC. Ils ont été présentés devant le faisceau sous deux types de conditionnement : en solution et lyophilisés.

Le support utilisé était une plaque HTA, fournie par Greiner Bio-one, qui représente en quelque sorte un intermédiaire entre la lame de biopuce et la plaque 96 puits : c'est une lame, de dimensions semblables à celles d'une lame de microscope, présentant 3 rangées de 8 cupules à sa surface, dont chacune peut contenir 30 μL de solution.

Afin de pallier d'éventuelles sous-estimations des flux calculés dans nos simulations, nous avons choisi d'effectuer des irradiations sur 4 ordres de grandeur. L'irradiation de base correspondait à la quantité de neutrons reçus sur le sol martien au cours d'un mois d'exploration. En jouant sur le positionnement des échantillons et la durée d'irradiation, nous avons pu reproduire cette irradiation multipliée par 10, 100 et 1000.

Quelques éléments du dispositif expérimental sont présentés dans la figure 2.11. L'atelier mécanique du LAB a notamment développé un capuchon en aluminium à placer sur les échantillons pour diminuer l'évaporation ainsi que des systèmes de fixations permettant le positionnement des plaques HTA dans l'espace d'irradiation.

Lors de cette expérience, l'outil de simulation Geant4 a été très précieux pour définir le positionnement de nos échantillons de manière optimum. La figure 2.12 illustre les dif-

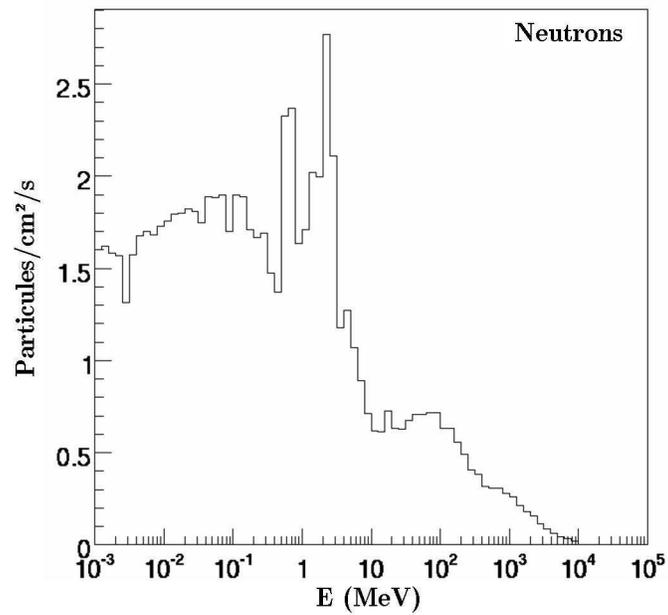
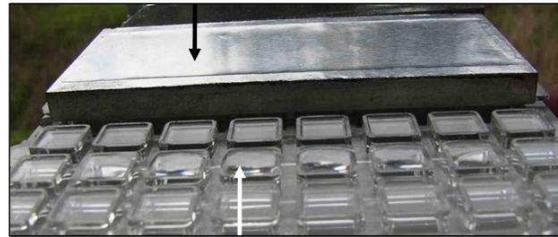


Figure 2.10: Spectre, obtenu avec PLANETOCOSMICS, présentant les flux de neutrons à la surface de Mars en fonction de leurs énergies



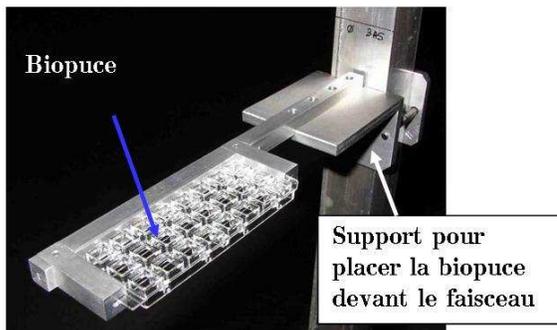
L'accélérateur de particules

Capuchon en aluminium pour réduire l'évaporation



HTA-plate : biopuce avec petites cupules

Barres en aluminium pour placer les échantillons



Biopuce

Support pour
placer la biopuce
devant le faisceau



Figure 2.11: Présentation du dispositif expérimental mis en place pour l'irradiation en neutrons

férences d'homogénéité du flux de neutrons selon l'orientation de la surface par rapport au faisceau. Les lames ont donc été positionnées de manière horizontale (pour permettre l'irradiation de liquide) et transverse par rapport à la source (pour une meilleure homogénéité).

L'angle optimum de positionnement des plaques HTA par rapport à l'axe du faisceau a aussi été étudié : un angle de 40° a été retenu pour l'irradiation à 0,6 MeV et un angle de 20° pour les neutrons à 6 MeV.

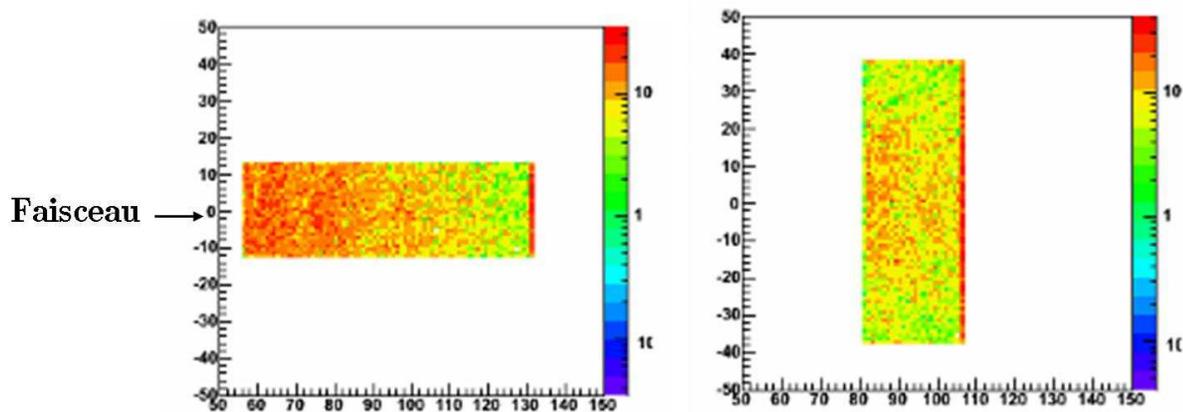


Figure 2.12: Illustration de l'inhomogénéité du flux de neutrons obtenue avec Geant4 à la surface d'une plaque HTA placée à 10 cm de la source pour la réaction pLi et pour une orientation longitudinale (à gauche) ou transverse (à droite).

Les échantillons irradiés ont été analysés à l'IBMM de Montpellier. Les neutrons n'ont provoqué aucune altération du noyau fluorescent de la FITC, qui, quel que soit le flux de particules qu'elle ait reçu, a démontré un signal de fluorescence comparable aux références et témoins d'analyse.

Les anticorps, en solution comme lyophilisés, n'ont présenté aucune perte de reconnaissance après avoir été soumis aux différents flux de neutrons. Ils ne sont pas altérés par cette particule pour les énergies considérées.

Tous les détails de réalisation de l'expérience mais aussi l'ensemble des résultats obtenus sont précisés dans l'article présenté en Annexe B qui a été soumis au journal *Astrobiology*.

Une seconde campagne d'irradiation : étude de l'effet des protons sur les anticorps

Suite à la première campagne d'irradiation en neutrons au cours de laquelle nous avons démontré nos capacités à mener de tels essais en acquérant un savoir-faire précieux dans le domaine de l'irradiation de matériel biologique et de l'analyse biochimique, une nouvelle période de temps sur la plateforme AIFIRA nous a été octroyée. Les 3 jours

de faisceau obtenus ont été exploités pour irradier des échantillons en protons cette fois-ci.

Protocole expérimental. La ligne de faisceau extrait de la plateforme AIFIRA offre un faisceau de protons atteignant une énergie d'environ 3 MeV. Pour déterminer les flux de particules pertinents, nous nous sommes appuyés sur les résultats de nos simulations. Nous avons procédé au repliment des spectres de protons de 1 à 10 MeV pour le voyage Terre-Mars de six mois et pour l'exploration à la surface de Mars pendant 1 mois. On obtient ainsi :

- un flux de $0,037 \text{ p/cm}^2/\text{s}$ pour l'exploration, soit $9,6 \cdot 10^2 \text{ p/mm}^2$ pour une durée de 30 jours,
- un flux de $0,194 \text{ p/cm}^2/\text{s}$ pour le transit, soit $30,2 \text{ p/mm}^2$ pour une durée de 180 jours.

On a donc une somme globale de $9,9 \cdot 10^2 \text{ p/mm}^2$ pour l'ensemble de la mission. Il a été décidé de prendre un facteur 1000 de sécurité par rapport aux estimations données par les simulations. Ainsi, l'objectif était d'atteindre environ $9,9 \cdot 10^5$ protons par mm^2 .

D'un point de vue technique, avec un courant de l'ordre de 30 pA, la machine délivre un flux de $5,5 \cdot 10^6 \text{ p/mm}^2/\text{s}$. Ceci nous conduit à un temps d'irradiation de l'ordre de 0,18 s pour atteindre notre objectif. Devant l'infaisabilité évidente de la mise en oeuvre d'irradiations aussi courtes, un facteur 50 a été appliqué, ramenant le temps d'irradiation d'un échantillon à 9 s. La quantité de protons reçue par les échantillons s'avère finalement 50000 fois plus importante que celle prédite pour une mission martienne.

Pour cette expérience, tous les échantillons ont été conditionnés sous forme de barrettes composant une plaque 96 puits : chaque rangée de 8 puits pouvait se détacher de son support et être placée sur le support mis en place pour l'irradiation. Cinq types d'échantillons ont été retenus :

- des anticorps primaires liés à leur antigène (lui-même immobilisé au fond des puits) sous forme lyophilisée (Ac I lyoph) et préparés fraîchement, c'est-à-dire quelques minutes avant irradiation (Ac I frais),
- des anticorps secondaires lyophilisés marqués à la FITC (Ac II lyoph),
- des anticorps commerciaux immobilisés au fond des puits (Ac com) fournis par la société ID VET,
- et des sondes fluorescentes FITC lyophilisées.

Les anticorps commerciaux sont fournis sous forme de kit, appelé kit ID Screen Influenza A Antibody. C'est un kit de diagnostic dans le domaine de la santé animale : il est utilisé pour la détection d'anticorps dirigés contre la nucléoprotéine A dans des sérums aviaires, équins et porcins. Pour les anticorps primaires, deux types de blancs ont été préparés et irradiés :

- un blanc "frais" qui correspond à un puits au fond duquel les antigènes viennent d'être immobilisés,
- un blanc "lyophilisé" qui correspond à un puits au fond duquel les antigènes ont été immobilisés puis lyophilisés.

Le support pour l'irradiation est un support plastique sur lequel peuvent être fixées 12 barrettes de 8 puits. Ce support est disposé verticalement sur une plateforme mobile dont le déplacement est contrôlé par un logiciel installé dans la salle de commande. Le

positionnement est contrôlé grâce à 2 caméras positionnées au-dessus et en-dessous de l'axe du faisceau. L'irradiation successive d'une barrette, soit 8 puits, avec un temps d'irradiation de 9 s par puits, a été programmée par nos soins. Le dispositif est présenté figure 2.13.

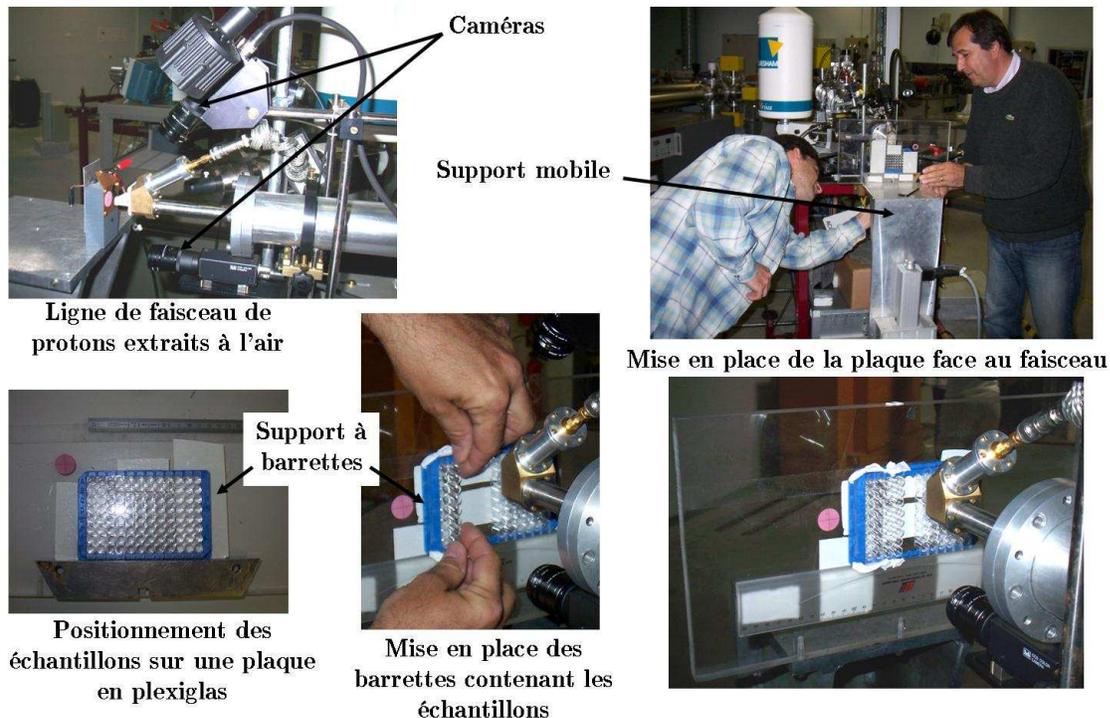


Figure 2.13: Dispositif expérimental mis en place pour irradier les barrettes d'échantillons

Pour chaque expérience, 4 barrettes ont été irradiées. Dix expériences ont été réalisées au cours de cette campagne d'essais. Le tableau 2.4 récapitule l'ensemble des échantillons irradiés au cours des dix expériences.

Le support d'irradiation a été positionné à 6 cm de la source, soit une distance de 7,09 cm entre la source et le fond du puits où se trouvent les échantillons. Le puits a un diamètre de 6,58 mm. La figure 2.14 présente l'homogénéité du faisceau à cette distance de la source. On remarque que sur un diamètre de 7 mm le faisceau d'irradiation peut globalement être considéré homogène.

Pour chaque barrette, seuls les 6 puits du milieu ont été analysés, ceci afin d'éviter des effets de bord. En ce qui concerne les anticorps primaires (frais et lyophilisés) et les anticorps commerciaux, greffés en fond de puits, une seule analyse par puits a été réalisée et une moyenne de la réponse sur les 6 puits de la barrette a été calculée. Les puits contenant les anticorps secondaires et la fluorescéine ont, quant à eux, donné lieu à 6 mesures par puits, la quantité de matière étant suffisante pour répéter plusieurs fois l'analyse d'un même puits.

	Barrette 1	Barrette 2	Barrette 3	Barrette 4
Expérience 1	Ac I frais	Ac I frais	Blanc frais	Ac I lyoph
Expérience 2	Ac I lyoph	Blanc lyoph	Ac II lyoph	Ac II lyoph
Expérience 3	FITC lyoph	FITC lyoph	Ac com	Ac com
Expérience 4	Ac I frais	Ac I frais	Blanc frais	Ac I lyoph
Expérience 5	Ac I lyoph	Blanc lyoph	Ac II lyoph	Ac II lyoph
Expérience 6	FITC lyoph	FITC lyoph	Ac com	Ac com
Expérience 7	Ac I lyoph	Ac I lyoph	Blanc lyoph	Ac II lyoph
Expérience 8	Ac II lyoph	FITC lyoph	FITC lyoph	Ac I lyoph
Expérience 9	Ac I lyoph	Ac I lyoph	Ac com	Ac com
Expérience 10	Ac I lyoph	Ac lyoph	Ac com	Ac com

Table 2.4: Récapitulatif des échantillons irradiés en protons

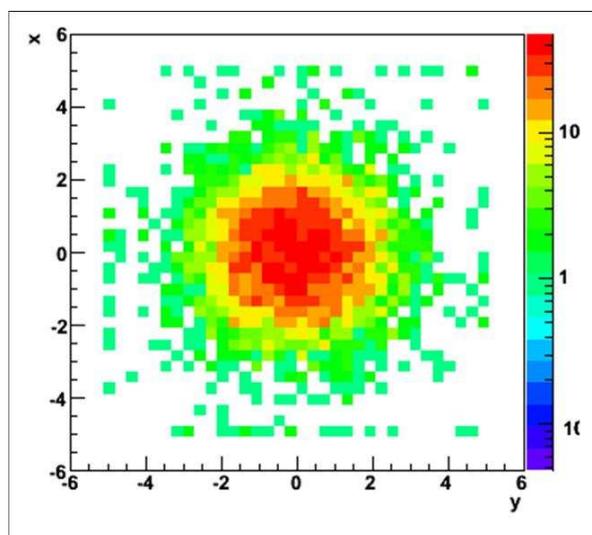


Figure 2.14: Illustration de l'homogénéité du faisceau à 7,09 cm de la source. Le fond d'un puits ayant un diamètre de 6,58 mm, l'irradiation de nos échantillons est globalement homogène. Unité des axes x et y : mm

Résultats L'analyse des différents échantillons a, avant tout, mis l'accent sur les précautions nécessaires au conditionnement et à la manipulation des échantillons. Les résultats sur les effets des irradiations ne sont pas aussi nombreux que ce qui était escompté, mais ces essais ont permis à l'ensemble de l'équipe de pointer les étapes sensibles de manipulation des anticorps et de fixer les conditions de réalisation et de stockage de notre biopuce à mettre en œuvre.

Les anticorps primaires frais (Ac I frais) irradiés présentent de très fortes pertes de signal qui rendent les résultats inexploitable car les signaux de fluorescence sont trop faibles pour être quantifiés. Ces importantes pertes peuvent avoir plusieurs origines : dégradation de l'anticorps due à l'irradiation, affaiblissement de la liaison entre l'anticorps primaire et l'antigène, dénaturation au cours du stockage, etc. Nous ne pouvons donc pas

conclure sur l'effet de l'irradiation sur ces anticorps.

Les anticorps primaires lyophilisés (Ac I lyoph) offrent des résultats très dispersés avec des pertes de reconnaissance oscillant entre 50 et 100%. Les témoins de transport et de lyophilisation sont eux aussi fortement dégradés : la perte de capacité de l'anticorps ne peut donc pas être imputée à l'irradiation. Plusieurs origines à cette dégradation peuvent être envisagées : un problème de lyophilisation, un problème de stockage, une déformation des barrettes plastiques lors du choc thermique imposé par la lyophilisation. Des essais de lyophilisation des anticorps en présence d'une solution de phosphate et en présence d'une solution contenant des sucres vont être menés. Ces deux types de solution pourraient augmenter la stabilité de l'anticorps lors du processus. Une attention toute particulière sera accordée au stockage des échantillons lyophilisés qui seront conservés sous vide et en atmosphère sèche.

En raison d'un problème technique survenu lors de la lyophilisation des anticorps secondaires, aucun résultat en termes d'irradiation n'a pu être exploité pour ces échantillons.

Les échantillons de fluorescéine, irradiés ou non, montrent une perte de fluorescence aux environs de 30%. Comme les témoins sont aussi dégradés, l'hypothèse d'une altération due à l'irradiation n'est pas recevable. Ce phénomène pourrait, en revanche, s'expliquer par une perte de matière due à une adsorption non spécifique des molécules de fluorescéine sur le plastique du contenant. Des tests pour valider cette hypothèse seront menés très prochainement dans le laboratoire de l'IBMM à Montpellier.

Les résultats les plus intéressants concernent les anticorps commerciaux. Les témoins de transport et les références présentent un coefficient de variation de 8%. Or, la société ID VET annonce un coefficient de variation de 9% sur un panel de 100 échantillons. On peut donc considérer que les deux séries d'échantillons, "témoins de transport" et "références", constituent une seule et même famille au sein de laquelle les mesures sont identiques avec une moyenne de S/B de l'ordre de 19. De la même manière, l'ensemble des échantillons irradiés a un coefficient de variation inférieur à 9% : ils forment une seule et même famille dont la valeur du S/B se situe autour de 17. En revanche, si l'on s'intéresse à ces deux familles, la famille "références" et la famille "échantillons irradiés", on se rend compte qu'elles sont significativement différentes : le coefficient de variation de l'ensemble des mesures est supérieur à 9%. La comparaison de ces deux ensembles permet ainsi de rendre compte de l'effet de l'irradiation sur les anticorps : on constate une dégradation de l'ordre de 12% des capacités de reconnaissance de l'anticorps.

Les anticorps commerciaux sont immobilisés à la fois de manière covalente et par adsorption sur leur support. On peut émettre l'hypothèse que les anticorps adsorbés désorbent lors de l'irradiation, car la liaison est faible, et sont donc à l'origine d'une perte de matière et par conséquent de la perte de reconnaissance observée. Afin d'évaluer le degré de vérité de cette hypothèse, les prochains essais d'irradiation sur anticorps commerciaux seront réalisés sur des anticorps exclusivement immobilisés par liaison covalente.

2.4.3 Conclusions et perspectives

Le projet BiOMAS-ARCoR s'inscrit dans une dynamique pluridisciplinaire alliant chimie, biochimie, analyse, physique des particules, simulation numérique et planétologie. Seule la combinaison de tous ces domaines de compétences rend ce projet cohérent et permet une interprétation efficace des données. L'équipe a acquis une solide expérience à la fois pour la réalisation de simulations originales, précises et réalistes, mais aussi pour la mise en place de campagnes d'irradiations pertinentes et inédites qui reposent sur des compétences solides en analyse de molécules organiques par anticorps. Les premiers résultats démontrent une bonne résistance des anticorps face aux neutrons de faible énergie. L'irradiation en protons a démontré une légère perte de reconnaissance mais qui semble due au type de greffage de l'anticorps sur le support et non à une dégradation de sa structure tridimensionnelle.

Cependant il reste encore beaucoup d'expériences à mettre en œuvre pour s'assurer de leur bon fonctionnement sous l'effet de l'ensemble des particules cosmiques. De nouveaux liens ont été tissés avec la cellule du CNES Toulouse qui effectue les essais d'irradiation sur composants électroniques. Plusieurs types d'essais sur anticorps devraient voir le jour au cours des mois à venir :

- irradiation en particules gamma sur les installations de l'ONERA à Toulouse,
- irradiation en protons pour des énergies de quelques dizaines de MeV à l'Université de Louvain en Belgique,
- irradiation en protons à haute énergie à Groningen aux Pays Bas.

De nouveaux essais sur la plateforme AIFIRA sont aussi à envisager. Outre l'irradiation simple d'anticorps, telle que nous l'avons mise en place pour les 2 campagnes d'essais présentées, on peut envisager par la suite la réalisation d'irradiations sur un prototype de biopuce. L'influence des particules sur les liaisons support/ interface et interface/ligands pourra être étudiée, ainsi que l'impact de l'irradiation sur les propriétés du support sélectionné. Des essais d'irradiation d'une biopuce disposée à l'intérieur d'une maquette de rover peuvent aussi être planifiés. Le laboratoire de mécanique du LAB réalise une maquette du rover ExoMars au 1/10^{ème} qui pourrait être utilisée pour ces expériences.

Concernant les simulations numériques, plusieurs perfectionnements sont prévus :

- amélioration du design du rover pour tendre vers une géométrie plus réaliste,
- meilleure modélisation des particules de haute énergie,
- prise en compte de nouvelles conditions solaires,
- étude de diverses épaisseurs de blindage afin d'optimiser le compromis poids/protection.

Il serait aussi intéressant d'adapter la méthode de simulation mise en place au cas de Titan afin de modéliser une mission de type TandEM.

Enfin, la préparation d'une expérience sur ISS demandera, si elle voit le jour, la réalisation de simulations d'irradiation dans ce nouvel environnement.

Ce projet ouvre donc des perspectives très intéressantes qui pourront apporter des résultats non seulement aux développeurs de biopuces spatiales mais aussi à l'ensemble des scientifiques qui s'intéressent aux interactions entre particules cosmiques et objets du Système solaire.

Conclusion de la troisième partie

Étudier la résistance des composants d'une biopuce face aux contraintes d'une mission spatiale est un travail qui requiert la mise en place de moyens éclectiques, ce qui nous a conduit, naturellement, à monter des collaborations. Le caractère pluridisciplinaire des essais que nous avons imaginés a fait appel aux compétences à la fois de mécaniciens, d'experts en dégazage, de chimistes et biochimistes, de physiciens nucléaires, etc. L'avancement des travaux et les résultats obtenus ont permis, en outre, de mieux définir certaines limites analytiques, soulignant l'importance d'une véritable synergie entre aspects analytiques et travaux de spatialisation.

Plusieurs matériaux, envisageables pour créer une lame de biopuce, ont subi une première batterie de tests : le polystyrène (PS), le polypropylène (PP), le cyclooléfine copolymère (COC), le verre, le verre revêtu de téflon et le polydiméthylsiloxane (PDMS). Les essais qui visent à étudier leur comportement en dégazage se poursuivent encore à l'heure actuelle. Les études de cinétique de dégazage nous ont démontré que tous les matériaux, excepté le PDMS, ont un taux de dégazage relativement faible. En termes de quantité dégazée, le meilleur candidat parmi les thermoplastiques est le COC. L'analyse de la nature des composés rejetés, qui est très délicate en raison des faibles quantités mises en jeu, nous apportera bientôt des informations quant à leur impact sur la capacité de reconnaissance du ligand.

Quatre types de solvants ont été testés sur les plastiques afin d'étudier leurs modifications de comportement en ce qui concerne leur aspect visuel, leur autofluorescence et leur adsorption de protéines. Le PP est le matériau qui a le mieux résisté à l'ensemble des tests. Le COC a très bien réagi au contact avec le mélange méthanol/chloroforme, tout comme le PS avec l'heptane. Le PDMS a démontré une forte porosité, incompatible avec une utilisation pour un support de biopuce : il est définitivement éliminé des matériaux candidats. Les premiers essais thermomécaniques réalisés montrent que le COC présente les meilleures caractéristiques mais le PS et le PP ont des propriétés convenables. Les premiers résultats obtenus demandent à être affinés et complétés par de nouveaux essais, en particulier en ce qui concerne l'étude du PP.

Le verre s'impose assurément comme le meilleur candidat en ce qui concerne le dégazage, la résistance aux solvants et la résistance aux variations thermiques, cependant, sa fragilité mécanique, bien connue, face aux vibrations et aux chocs nous incite à lui préférer un thermoplastique tel que le COC, par exemple, qui a obtenu globalement de bons résultats sur l'ensemble des tests.

Il ne faut pas perdre de vue que ce travail de comparaison pourra être enrichi par la suite avec de nouveaux matériaux. Greiner Bio-One travaille sur la réalisation de nouveaux thermoplastiques, à partir du cahier des charges que nous avons établi, afin de

nous proposer un support plus adéquat que ceux qui sont actuellement vendus dans le commerce : peut-être nous offriront-ils une alternative encore meilleure que le COC.

Différents types de ligands peuvent être envisagés pour concevoir une biopuce. Dans le cadre d'une biopuce spatiale, les anticorps présentent de nombreux avantages inhérents à leurs propriétés intrinsèques : ils sont très sensibles, peuvent être produits pour la détection de cibles très variées, et offrent la possibilité de détecter à la fois des molécules très spécifiques et des familles de molécules. Face aux contraintes environnementales d'une mission interplanétaire, l'objectif est de fixer les limites au-delà desquelles la reconnaissance anticorps/antigène est altérée de manière irréversible. Ainsi, ces données nous permettront de concevoir les dispositifs adéquats pour protéger notre biopuce, le cas échéant, et lui assurer un fonctionnement optimal. Dans le cas d'une détection par fluorescence, il faut aussi évaluer la résistance du marqueur fluorescent qui sera greffé sur l'anticorps : de lui dépend la qualité du signal lumineux identifiant les différentes molécules détectées.

Les cycles et chocs thermiques, subis par les échantillons d'anticorps et de fluorescéine, ont révélé une bonne résistance de la sonde fluorescente en-deçà de 70°C. En ce qui concerne les anticorps, on constate une perte de reconnaissance plus ou moins importante en fonction de la sollicitation imposée : les résultats semblent indiquer que la molécule est particulièrement sensible à la répétition des cycles chaud/froid. Les variations de température de forte amplitude sont vraisemblablement très délétères : ceci nous indique qu'il faudra accorder une attention toute particulière à la stabilité thermique au cours de la mission.

Aux vues de ces premiers résultats, il serait intéressant de mettre en place une nouvelle campagne d'essais pour étudier l'impact de la durée de sollicitation sur la dégradation des performances de l'anticorps, paramètre qui n'a pas encore été évalué.

L'ensemble de cette étude sur le comportement des anticorps face à divers cycles thermiques a été regroupé au sein du projet BiOMAS-ARTheC (Antibody Resistance to Thermal Cycles).

Un deuxième sous-projet de BiOMAS a émergé au cours de la thèse : BiOMAS-ARCoR (Antibody Resistance to Cosmic Radiation). Il existe très peu de données quant à la résistance de protéines, telles que les anticorps par exemple, sous l'effet des radiations cosmiques (solaires et galactiques). Nous avons décidé de nous intéresser à la question et une collaboration très active avec le CENBG a vu le jour. Dans un premier temps, nous avons utilisé des outils de simulation numérique afin de déterminer les flux de particules que recevrait une biopuce lors d'une mission d'exploration sur Mars. Ce travail original, qui a donné lieu à une publication dans le journal *Astrobiology*, nous a permis de définir de manière précise les énergies et la nature des particules auxquelles devra résister la biopuce, lors du trajet Terre-Mars et sur le sol martien. À partir de ces résultats, deux expériences sous faisceau de particules ont été menées sur la plateforme AIFIRA du CENBG. La première irradiation d'échantillons par un flux de neutrons de quelques MeV démontre que les anticorps, et la fluorescéine, sont peu sensibles à ce type de particules (publication soumise à *Astrobiology*). Les résultats de la seconde irradiation, en protons de 3 MeV cette fois-ci, sont plus difficiles à interpréter. Les anticorps commerciaux irradiés montrent une perte de reconnaissance de leur cible : une explication plausible consisterait à imputer cette perte à la désorption des anticorps liés au support par affinité donc par une liaison faible qui serait altérée sous le flux de particules. Cependant, ceci n'est qu'une hypothèse.

Les résultats nécessitent d'être confirmés et affinés.

BiOMAS-ARCoR offre de nombreuses perspectives. D'autres types de particules et d'autres énergies doivent être testés pour pouvoir obtenir une vue d'ensemble de la résistance des anticorps face au flux de particules global. Les moyens d'expérimentation sont difficiles d'accès dans ce domaine, mais de nouveaux contacts pris avec la cellule "Irradiations" du CNES vont probablement nous permettre d'obtenir des temps de faisceau sur de nouvelles plateformes (particules gammas à Toulouse, protons en Belgique, etc.). Notre équipe a développé un savoir faire précieux pour ces expériences placées sous le signe de la pluridisciplinarité et de la complémentarité des compétences : nous sommes prêts pour planifier et mener de nouvelles expériences de manière efficace et coordonnée.

En ce qui concerne la simulation numérique, plusieurs travaux peuvent être envisagés. Nos simulations d'une mission martienne pourront être améliorées à deux niveaux : nous souhaitons affiner le design du rover en utilisant des plans de maquettes plus réalistes, et les modèles d'interaction à hautes énergies seront optimisés grâce à de nouveaux codes récemment mis au point et interfaçables avec Geant4. Le même protocole de simulation pourra aussi être adapté à d'autres types de missions afin d'étudier, par exemple, les particules reçues par une biopuce destinée à l'exploration de Titan.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Mon travail de thèse consistait à étudier la résistance d'une biopuce face aux contraintes d'une mission spatiale. Cet instrument, relativement nouveau, pourrait s'avérer très précieux pour la recherche de traces de vie sur les corps du Système solaire. Face à la diversité des molécules organiques pouvant constituer un marqueur de vie, présente ou passée, la biopuce, grâce à son haut niveau de miniaturisation, permettrait de détecter une grande variété de molécules cibles à partir d'un seul et même échantillon. Mars, Europe, Titan et Encelade sont des corps tout particulièrement intéressants pour une recherche de traces de vie. Cependant, si l'on souhaite envoyer des biopuces à leurs surfaces, il faut s'assurer qu'elles supporteront les contraintes d'un si long voyage à travers le Système solaire où l'environnement s'avère inhospitalier en comparaison aux conditions clémentes qui règnent sur notre planète. Actuellement destiné aux diagnostics médicaux, l'outil biopuce nécessite donc d'être adapté aux spécificités des missions spatiales, tant du point de vue des contraintes environnementales que du point de vue des objectifs analytiques.

Le projet BiOMAS (Biochip for Organic Matter Analysis in Space), au sein duquel s'ancre mon travail, propose une approche originale qui vise à repenser la conception de la biopuce dans son ensemble afin d'en optimiser chaque étape et obtenir un instrument fiable, performant et robuste.

S'intéresser à la spatialisation d'un instrument tel qu'une biopuce est un travail qui demande réflexion et organisation. La première étape de mon travail a donc consisté à organiser mon approche de ce sujet de thèse. Il a tout d'abord fallu se familiariser avec l'ensemble des problématiques contenues dans l'intitulé. Le premier terme qui interpelle la curiosité c'est "biopuce" : quelles sont les composantes de cet instrument ? comment fonctionne-t-il ? sous quelles formes se décline-t-il ? quels sont ses points forts et ses faiblesses ? pour quelles applications est-il actuellement utilisé ? de quels périphériques a-t-il besoin ? La pluridisciplinarité du projet BiOMAS est donc très vite apparue, de par la nature même de l'outil à développer. De même, l'étude de l'impact des contraintes spatiales sur un instrument fait se recouper plusieurs domaines d'expertise. Dans ce cas précis, il fait appel à des notions d'exobiologie, de planétologie, de techniques spatiales, de mécanique, de physique nucléaire, etc. Aussi, la nécessité de segmenter l'étude s'est imposée d'elle-même. Cette segmentation s'est appuyée, dans un premier temps, sur la composition particulière de la biopuce. Une partie de mon travail s'est intéressé à la sélection d'un support solide adéquat. L'autre partie s'est orientée sur l'étude du comportement des éléments biologiques, les anticorps. Mais la séparation des différents essais tient aussi à l'impossibilité de tester en laboratoire l'ensemble des contraintes de l'environnement spatial : les effets de la température, des rayonnements, de la microgravité, du vide sont testés séparément ou tout au plus par couples. Il faut cependant noter que les analyses et

les prises de décisions ont toujours été accompagnées d'une réflexion globale : une forte synergie a toujours été maintenue entre les différents travaux menés au sein du projet afin d'assurer une cohérence et une logique au développement de notre biopuce.

Afin d'y voir plus clair face à la multitude d'orientations possibles, nous avons rédigé un premier cahier des charges listant les critères forts à prendre en compte, critères à la fois environnementaux et analytiques. Ce travail n'a pu se faire qu'avec des efforts de communication, d'échanges clairs et constructifs avec nos collègues biochimistes. À partir de ce cahier, une stratégie d'expérimentation s'est mise en place. Elle s'est bien sûr accompagnée d'une recherche de partenaires adéquats et, sous mon impulsion, plusieurs collaborations ont vu le jour. Il s'est ensuite agi de concevoir des essais pertinents avec l'ensemble de ces experts, d'élaborer un planning et de préparer à la fois les protocoles et le matériel nécessaire. Sur les trois années qui se sont écoulées, j'ai réalisé plusieurs essais, très différents, dont les résultats sont résumés ci-après.

Parmi les matériaux utilisés pour la réalisation de biopuces, nous nous sommes particulièrement intéressés aux thermoplastiques. Leur comparaison, en termes de comportement en dégazage, résistance aux solvants organiques et caractérisation thermique et mécanique, donne l'avantage au cyclooléfine copolymère. Le polypropylène et le polystyrène ne sont pas pour autant éliminés car les performances qu'ils ont démontrées pourraient être suffisantes pour la réalisation d'une biopuce spatiale, en fonction du caractère particulier de la mission pour laquelle l'instrument sera conçu. Le PDMS, en revanche, a été écarté car il est poreux et dégaze beaucoup trop. Le verre, bien qu'il présente des avantages de résistance thermique et chimique, obtient un statut de matériau de réserve en raison de ses caractéristiques mécaniques très faibles : si aucun plastique ne donne satisfaction, on pourra envisager son utilisation moyennant le développement d'un système d'absorption de vibrations et de chocs.

Les essais de dégazage ont été réalisés dans les locaux du CNES à Toulouse selon un protocole adapté à notre problématique. Pour les tests thermomécaniques, nous avons monté une collaboration avec le LGM²B qui s'est appuyée sur le co-encadrement d'un stagiaire. Enfin, l'étude de l'influence des solvants organiques sur les matériaux a pu être réalisée grâce au matériel et aux conseils avisés des membres de notre équipe à l'IBMM.

Plusieurs perspectives à ce travail peuvent être imaginées.

- Des essais permettant d'analyser la nature des éléments dégazés par chaque matériau sont en cours de réalisation. Leurs résultats donneront lieu à un ensemble de tests visant à déterminer l'impact des produits de dégazage sur les capacités de reconnaissance des ligands.
- L'analyse de nouveaux matériaux, notamment des thermoplastiques en cours de développement chez Greiner Bio-One, pourra être réalisée afin d'enrichir notre base de données.
- La mise en place d'essais thermomécaniques plus précis est en cours de réflexion afin d'affiner et compléter les premiers résultats obtenus.

Très peu d'études ont été menées sur la résistance des anticorps face aux contraintes spatiales. Nous avons donc décidé de mettre en place deux projets pour nous permettre de mieux appréhender leur comportement lors d'un voyage interplanétaire. Ces deux projets n'ont pu voir le jour que grâce à des interactions fortes avec nos partenaires biochimistes : l'expression "travail d'équipe" a vraiment pris tout son sens.

Le projet BiOMAS-ARTheC (Antibody Resistance to Thermal Cycles) étudie les mo-

difications de capacité de reconnaissance de l'anticorps lorsqu'il est soumis à plusieurs types de sollicitations thermiques. Les essais ont été réalisés au LAB, à Bordeaux, avec le concours du laboratoire d'électronique alors que la préparation et l'analyse des échantillons ont été effectuées à l'IBMM de Montpellier : cette séparation géographique des étapes successives de l'essai a réclamé beaucoup de rigueur et d'organisation. Les résultats obtenus tendent à indiquer que l'anticorps perd de son efficacité lorsqu'il subit de fortes variations de températures à répétition : plus les cycles de congélation/décongélation sont nombreux, plus la reconnaissance de la cible est altérée. L'anticorps semble aussi plus sensible aux hautes températures qu'aux basses températures, mais la dégradation de la sonde fluorescente à 70°C n'a pas permis de confirmer cette tendance.

Le projet prévoit la mise en place de nouveaux essais : des essais à 70°C seront réalisés avec un autre type de sonde fluorescente et une évaluation de l'impact de la durée de sollicitation sur le degré de dégradation sera effectuée.

Ces premiers résultats nous alertent sur le fait qu'il faudra accorder une attention toute particulière à la stabilité de la température de l'enceinte dans laquelle sera positionnée notre biopuce lors de la mission.

Le projet BiOMAS-ARCoR (Antibody Resistance to Cosmic Radiation), quant à lui, vise à déterminer l'influence des radiations cosmiques sur les performances de l'anticorps. Dans un premier temps, j'ai réalisé, en collaboration avec le CENBG et les membres de la communauté Geant4, un lourd travail de simulation numérique qui a permis de définir le type de particules et les gammes d'énergies à considérer pour mettre en place des expériences pertinentes d'irradiation sous faisceau. Ainsi, dans le cas d'une mission sur Mars, l'irradiation que recevrait une biopuce placée dans un rover a été établie avec précision et réalisme. Ce travail a suscité l'intérêt de la communauté scientifique qui travaille sur la modélisation des interactions particules/matière et a donné lieu à plusieurs communications dans des conférences internationales ainsi qu'à une publication dans le journal *Astrobiology*. Ces simulations d'une mission martienne nous ont permis d'obtenir l'accès à la plateforme d'irradiation AIFIRA à deux reprises. Nous avons ainsi pu soumettre nos échantillons à deux types de faisceaux : des neutrons de 0,6 et 6 MeV, et des protons de 3 MeV. Les neutrons n'ont eu aucune influence sur les anticorps. Ce résultat est exposé dans un article actuellement soumis à *Astrobiology*. Les protons, en revanche, ont altéré la reconnaissance des échantillons commerciaux que nous avons testés : nous avons émis l'hypothèse que cette perte de reconnaissance était due à une désorption des anticorps qui étaient liés au support par affinité. De nouveaux essais devront être menés pour confirmer cette hypothèse.

De nombreuses perspectives à ce projet sont envisageables à court terme, tant du point de vue de la simulation numérique que de l'expérimentation sous faisceau. La simulation de la mission martienne peut être affinée sur quelques points de détail : la géométrie du rover, la prise en compte des particules de haute énergie, etc. De nouvelles missions peuvent aussi être modélisées, vers Titan ou Europe par exemple, à l'aide des outils et des protocoles que nous avons mis en place. Des irradiations sous d'autres types de particules sont indispensables pour compléter nos premières expériences. Des irradiations à plus haute énergie en protons sont aussi incontournables pour obtenir une étude globale et fiable. On peut également envisager d'adapter les protocoles d'essais à d'autres types de ligands tels que les aptamères par exemple. Enfin, un projet visant à réaliser des essais sur la station spatiale internationale est en cours de préparation.

À plus long terme, l'objectif principal sera évidemment la conception à la fois méca-

nique et chimique d'un prototype de biopuce spatiale qui sera ensuite testé dans diverses conditions.

À ce jour, le projet BiOMAS a démontré la pertinence de sa démarche en produisant des résultats qui intéressent non seulement l'ensemble de la communauté scientifique travaillant sur le développement de biopuces spatiales (recherche de supports de biopuces adaptés, résistance des anticorps aux contraintes spatiales) mais qui pourraient aussi avoir des retombées sur les domaines médicaux et environnementaux par exemple (optimisation de la sensibilité et la reproductibilité des biopuces). Reprendre la conception pas à pas et optimiser les techniques et le choix des composants est un travail rigoureux qui a porté ses fruits et nous a amené à rédiger plusieurs publications, déposer un brevet (en partenariat avec le CNES) et intervenir dans diverses conférences internationales (voir Annexe C).

Bibliographie

- Agostinelli, S. *et al.*, 2003. Geant4 - A simulation toolkit. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research.
- Allison, J., *et al.*, 2006. Geant4 developments and applications. IEEE Transactions on Nuclear Science 53, 270–278.
- Anderson, J. D., Schubert, G., Jacobson, R. A., Lau, E. L., Moore, W. B., Sjogren, W. L., Sep. 1998. Europa's Differentiated Internal Structure : Inferences from Four Galileo Encounters. Science 281, 2019–+.
- Axford, W. I., Leer, E., Skadron, G., 1977. The Acceleration of Cosmic Rays by Shock Waves. In : International Cosmic Ray Conference. Vol. 11 of International Cosmic Ray Conference. pp. 132–+.
- Ben Khelifa, M.-L., 2000. Ingénierie des paramètres cinétiques de l'interaction antigène-anticorps. Ph.D. thesis, Université Joseph Fourier.
- Bibring, J.-P., Langevin, Y., Mustard, J. F., Poulet, F., Arvidson, R., Gendrin, A., Gondet, B., Mangold, N., Pinet, P., Forget, F., Apr. 2006. Global Mineralogical and Aqueous Mars History Derived from OMEGA/Mars Express Data. Science 312, 400–404.
- Bierhaus, E. B., Chapman, C. R., Schenk, P., Dec. 2006. Europa's Near-Surface Properties from Small Crater Morphology. AGU Fall Meeting Abstracts, D7+.
- Blake, R. E., Dec. 2002. Oxygen isotope biomarkers in the search for extraterrestrial life. AGU Fall Meeting Abstracts, B5+.
- Bligh, E. G., Dyer, W. J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology 37, 911–917.
- Brown, R. H., Soderblom, L. A., Soderblom, J. M., Clark, R. N., Jaumann, R., Barnes, J. W., Sotin, C., Buratti, B., Baines, K. H., Nicholson, P. D., Jul. 2008. The identification of liquid ethane in Titan's Ontario Lacus. Nature 454, 607–610.
- Cassidy, T. A., Johnson, R. E., McGrath, M. A., Wong, M. C., Cooper, J. F., Nov. 2007. The spatial morphology of Europa's near-surface O₂ atmosphere. Icarus 191, 755–764.
- Castellari, M., Fabbri, S., Fabiani, A., Amati, A., Galassi, S., 2000. Comparison of different immunoaffinity clean-up procedures for high-performance liquid chromatographic analysis of ochratoxin A in wine. Journal of Chromatography 888, 129–136.

- Charlton, K. and Harris, W. J., Porter, A. J., Oct. 2001. The isolation of supersensitive anti-hapten antibodies from combinatorial antibody libraries derived from sheep. *Biosensors and Bioelectronics* 16, 639–646.
- Chyba, C. F., Phillips, C. B., Feb. 2002. Europa as an Abode of Life. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere* 32, 47–67.
- Claeys-Bruno, M., Vandenabeele-Trambouze, O., Sergent, M., Geffard, M., Bodet, D., Dobrijevic, M., Commeyras, A., Phan Tan Luu, R., 2006a. Methodological approaches for histamine quantification using derivatization by chloroethylnitrosourea and ELISA measurement : Part I. Optimization of derivated histamine detection with coated-plates using optimal design. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 80, 176–185.
- Claeys-Bruno, M., Vandenabeele-Trambouze, O., Sergent, M., Geffard, M., Bodet, D., Dobrijevic, M., Commeyras, A., Phan Tan Luu, R., 2006b. Methodological approaches for histamine quantification using derivatization by chloroethylnitrosourea and ELISA measurement : Part II. Optimization of the derivatization step. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 80, 186–197.
- Courtin, R., Gautier, D., McKay, C. P., Mar. 1995. Titan's thermal emission spectrum : Reanalysis of the Voyager infrared measurements. *Icarus* 114, 144–162.
- Craigh, O. E., Love, G. D., Isaksson, S., Taylor, G., Snape, C. E., 2004. Stable carbon isotopic characterisation of free and bound lipids in archaeological ceramic vessels released by solvent extraction, alkaline saponification and catalytic hydrolysis. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 7, 613–634.
- Desorgher, L., Flückiger, E. O., Gurtner, M., 2006. The PLANETOCOSMICS Geant4 application. In : 36th COSPAR Scientific Assembly. Vol. 36 of COSPAR, Plenary Meeting. pp. 2361–+.
- Elvert, M., Suess, E., Grienert, J., Whiticar, M. J., 2000. Archean mediating anaerobic methane oxidation in deep-sea sediments at cold seeps of the eastern Aleutian subduction zone. *Organic Geochemistry* 31, 1175–1187.
- ESA, Jun. 2005. Preliminary Requirements and specification : LIFE MARKER CHIP.
- Fortes, A. D., Aug. 2000. Exobiological Implications of a Possible Ammonia-Water Ocean inside Titan. *Icarus* 146, 444–452.
- Grady, M. M., 2003. *Evolution on Planet Earth - The physical constraints on extraterrestrial life*. Elsevier, pp. 397–414.
- Hage, D. S., 1999. Affinity chromatography : a review of clinical applications. *Clinical Chemistry* 45, 593–615.
- Hage, D. S., Nelson, M. A., 2001. Chromatographic immunoassays. *Analytical Chemistry* 73, 198A–205A.

- Heemken, O. P., Theobald, N., Wenclawiak, B. W., 1997. Comparison of ASE and SFE with soxhlet, sonication, and methanolic saponification extractions for the determination of organic micropollutants in marine particulate matter. *Analytical Chemistry* 69, 2171–2180.
- Hörandel, J. R., Apr. 2008. The origin of galactic cosmic rays. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A* 588, 181–188.
- Kargel, J. S., Kaye, J. Z., Head, J. W., Marion, G. M., Sassen, R., Crowley, J. K., Ballesteros, O. P., Grant, S. A., Hogenboom, D. L., Nov. 2000. Europa's Crust and Ocean : Origin, Composition, and the Prospects for Life. *Icarus* 148, 226–265.
- Kasting, J. F., Whitmire, D. P., Reynolds, R. T., Jan. 1993. Habitable Zones around Main Sequence Stars. *Icarus* 101, 108–128.
- Kondo, F., Matsumoto, H., Yamada, S., Tsuji, K., Ueno, Y., Harada, K., 2000. Immunoaffinity purification method for detection and quantification of microcystins in lake water. *Toxicon* 38, 813–823.
- Krymskii, G. F., Jun. 1977. A regular mechanism for the acceleration of charged particles on the front of a shock wave. *Akademiia Nauk SSSR Doklady* 234, 1306–1308.
- Laan, E., Leeuwis, H., Kate, I. L., Boom, E., Jun. 2006. The Life Marker Chip (LMC) on board the Exomars rover. In : 4th Interplanetary Probe Workshop - Pasadena, USA.
- Maule, J. G., Steele, A., Mar. 2004. A Prototype Life Detection Chip. In : Mackwell, S., Stansbery, E. (Eds.), *Lunar and Planetary Institute Conference Abstracts. Vol. 35 of Lunar and Planetary Institute Conference Abstracts.* p. 2091.
- Maule, J. and Fogel, M., Steele, A., Wainwright, N., Pierson, D. L., McKay, D. S., 2003. Antibody binding in altered gravity : implications for immunosorbent assay during space flight. *Journal of Gravitational Physiology* 10, 47–56.
- McKay, C. P., Porco Carolyn C., Altheide, T., Davis, W. L., Kral, T. A., Oct. 2008. The Possible Origin and Persistence of Life on Enceladus and Detection of Biomarkers in the Plume. *Astrobiology* 8, 909–919.
- Melosh, H. J., Ekholm, A. G., Showman, A. P., Lorenz, R. D., Apr. 2004. The temperature of Europa's subsurface water ocean. *Icarus* 168, 498–502.
- Mitrofanov, I., Anfimov, D., Kozyrev, A., Litvak, M., Sanin, A., Tret'yakov, V., Krylov, A., Shvetsov, V., Boynton, W., Shinohara, C., Hamara, D., Saunders, R. S., Jul. 2002. Maps of Subsurface Hydrogen from the High Energy Neutron Detector, Mars Odyssey. *Science* 297, 78–81.
- Niemann, H. B., Atreya, S. K., Bauer, S. J., Carignan, G. R., Demick, J. E., Frost, R. L., Gautier, D., Haberman, J. A., Harpold, D. N., Hunten, D. M., Israel, G., Lunine, J. I., Kasprzak, W. T., Owen, T. C., Paulkovich, M., Raulin, F., Raaen, E., Way, S. H., Dec. 2005. The abundances of constituents of Titan's atmosphere from the GCMS instrument on the Huygens probe. *Nature* 438, 779–784.

- Nishiyama, S., Goto, A., Saito, K., Sugita, K., Tamada, M., Sugo, T., Funami, T., Goda, Y., Fujimoto, S., 2002. Concentration of 17β -Estradiol using an immunoaffinity porous hollow-fiber membrane. *Analytical Chemistry* 74, 4933–4936.
- Parkinson, C. D., Liang, M.-C., Hartman, H., Hansen, C. J., Tinetti, G., Meadows, V., Kirschvink, J. L., Yung, Y. L., Feb. 2007. Enceladus : Cassini observations and implications for the search for life. *Astronomy and Astrophysics* 463, 353–357.
- Parkinson, C. D., Liang, M.-C., Yung, Y. L., Kirschvink, J. L., Aug. 2008. Habitability of Enceladus : Planetary Conditions for Life. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere* 38, 355–369.
- Parnell, J., Cullen, D., Sims, M. R., Bowden, S., Cockell, C. S., Court, R., Ehrenfreund, P., Gaubert, F., Grant, W., Parro, V., Rohmer, M., Sephton, M., Stan-Lotter, H., Steele, A., Toporski, J., Vago, J., Aug. 2007. Searching for Life on Mars : Selection of Molecular Targets for ESA's Aurora ExoMars Mission. *Astrobiology* 7, 578–604.
- Parro, V., Rodríguez-Manfredi, J. A., Briones, C., Compostizo, C., Herrero, P. L., Vez, E., Sebastián, E., Moreno-Paz, M., García-Villadangos, M., Fernández-Calvo, P., González-Toril, E., Pérez-Mercader, J., Fernández-Remolar, D., Gómez-Elvira, J., Jun. 2005. Instrument development to search for biomarkers on mars : Terrestrial acidophile, iron-powered chemolithoautotrophic communities as model systems. *Planetary and Space Science* 53, 729–737.
- Pichon, V., Bouzige, M., Miège, C., Hennion, M.-C., 1999. Immunosorbents : natural molecular recognition materials for sample preparation of complex environmental matrices. *Trends in Analytical Chemistry* 18, 219–235.
- Porco, C. C., Helfenstein, P., Thomas, P. C., Ingersoll, A. P., Wisdom, J., West, R., Neukum, G., Denk, T., Wagner, R., Roatsch, T., Kieffer, S., Turtle, E., McEwen, A., Johnson, T. V., Rathbun, J., Veverka, J., Wilson, D., Perry, J., Spitale, J., Brahic, A., Burns, J. A., DelGenio, A. D., Dones, L., Murray, C. D., Squyres, S., Mar. 2006. Cassini Observes the Active South Pole of Enceladus. *Science* 311, 1393–1401.
- Prieto-Ballesteros, O., Gómez, F., Rodriguez, J. A., Garcia Baonza, V., Segura, A., Malta Team, Mar. 2008. The Habitability of the Icy Subsurface and the Potential Aqueous Ocean of Europa. Experiments at High Pressure. In : Lunar and Planetary Institute Conference Abstracts. Vol. 39 of Lunar and Planetary Institute Conference Abstracts. pp. 2026–+.
- Prise, K. M., 2006. New advances in radiation biology. *Occupational Medicine* 56, 156–161.
- Quenea, K., Derenne, S., Largeau, C., Rumpel, C., Mariotti, A., 2004. Variation in lipid abundance and composition among different particle-size fractions of a forest soil. *Organic Geochemistry* 35, 1355–1370.
- Raulin, F., Jan. 2005. Exo-Astrobiological Aspects of Europa and Titan : From Observations to Speculations. *Space Science Reviews* 116, 471–487.

- Raulin, F., Mar. 2007. Astrobiology and habitability of Titan. *Space Science Reviews*, 220–+.
- Raulin, F., Raulin-Cerceau, F., Schneider, J., 1997. *La bioastronomie*. Presses Universitaires de France, pp. 50–76.
- Reynolds, R. T., Squyres, S. W., Colburn, D. S., McKay, C. P., Nov. 1983. On the habitability of Europa. *Icarus* 56, 246–254.
- Santin, G., Ivanchenko, V., Evans, H., Nieminen, P., Daly, E., 2005. GRAS : A General-Purpose 3-D Modular Simulation Tool for Space Environment Effects Analysis. *IEEE Transactions on Nuclear Science* 52.
- Sims, M. R., Cullen, D. C., Bannister, N. P., Grant, W. D., Henry, O., Jones, R., McKnight, D., Thompson, D. P., Wilson, P. K., Jul. 2005. The specific molecular identification of life experiment (SMILE). *Planetary and Space Science* 53, 781–791.
- Sims, M. R., Pullan, D., Pillinger, C. T., Wright, I., Clemmet, J., Thatcher, J., Underwood, J., 2000. Beagle 2 : The Exobiology Lander on ESA's Mars Express Mission. Highlights of Planetary Exploration from Space and from Earth, 24th meeting of the IAU, Joint Discussion 12, August 2000, Manchester, England, meeting abstract. 12.
- Smith, K. E. C., Nothcott, G., Jones, K. C., 2006. Influence of the extraction methodology on the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in pasture vegetation. *Journal of Chromatography A* 1116, 20–30.
- Smith, P. H., Phoenix Science Team, Jul. 2007. The Phoenix Mission. *LPI Contributions* 1353, 3180–+.
- Sporstol, S., Lichtenthaler, R. G., Orelid, F., 1985. Extraction efficiencies for hydrocarbons from sediments polluted by oily drill cuttings. *Analitica Chimica Acta* 169, 343–347.
- Steele, A., McKay, D. S., Allen, C., Thomas-Keprta, K., Warmflash, D., Pincus, S., Schweitzer, M., Priscu, J., Sears, J., Hedgecock, J., Avcı, R., Fogel, M., Mar. 2001a. Mars Immunoassay Life Detection Instrument for Astrobiology (MILDI). In : *Lunar and Planetary Institute Conference Abstracts*. Vol. 32 of *Lunar and Planetary Institute Conference Abstracts*. p. 1684.
- Steele, A., Toporski, J., McKay, D. S., Schweitzer, M., Pincus, S., Pérez-Mercader, J., Parro García, V., Aug. 2001b. Microarray assays for solar system exploration. In : Ehrenfreund, P., Angerer, O., Battrick, B. (Eds.), *Exo-/Astro-Biology*. Vol. 496 of *ESA Special Publication*. pp. 91–97.
- Stofan, E. R., Elachi, C., Lunine, J. I., Lorenz, R. D., Stiles, B., Mitchell, K. L., Ostro, S., Soderblom, L., Wood, C., Zebker, H., Wall, S., Janssen, M., Kirk, R., Lopes, R., Paganelli, F., Radebaugh, J., Wye, L., Anderson, Y., Allison, M., Boehmer, R., Callahan, P., Encrenaz, P., Flamini, E., Francescetti, G., Gim, Y., Hamilton, G., Hensley, S., Johnson, W. T. K., Kelleher, K., Muhleman, D., Paillou, P., Picardi, G., Posa, F., Roth, L., Seu, R., Shaffer, S., Vetrella, S., West, R., Jan. 2007. The lakes of Titan. *Nature* 445, 61–64.

- Summons, R. E., Albrecht, P., McDonald, G., Moldowan, J. M., Oct. 2007. Molecular Biosignatures. *Space Science Reviews*, 173–+.
- Tang, B. L., Jan. 2007. A case for immunological approaches in detection and investigation of alien life. *International Journal of Astrobiology* 6, 11–17.
- Thompson, D. P. and Wilson, P. K., Sims, M. R., Cullen, D. C., Holt, J. M. C., Parker, D. J., Smith, M. D., Apr. 2006. Preliminary Investigation of Proton and Helium Ion Radiation Effects on Fluorescent Dyes for Use in Astrobiology Applications. *Analytical Chemistry* 78, 2738–2743.
- Tylka, A. J., Adams, J. H., Boberg, P. R., Brownstein, B., Dietrich, W. F., Flueckiger, E. O., Petersen, E. L., Shea, M. A., Smart, D. F., Smith, E. C., 1997. CREME96 : A Revision of the Cosmic Ray Effects on Micro-Electronics Code. *IEEE Transactions on Nuclear Science* 44, 2150–2160.
- Vago, J. L., Kminek, G., Haldemann, A., Baglioni, P., Elfving, A., McCoy, D., Gianfiglio, G., Gardini, B., Mar. 2008. Upcoming Science Activities in Support of ESA's ExoMars Mission. In : *Lunar and Planetary Institute Conference Abstracts*. Vol. 39 of *Lunar and Planetary Institute Conference Abstracts*. pp. 1235–+.
- Van Zuilen, M., Oct. 2007. Stable Isotope Ratios as a Biomarker on Mars. *Space Science Reviews*, 182–+.
- Vandenabeele-Trambouze, O., Garrelly, L., Dobrijevic, M., 2005. L'analyse au laboratoire de la matière organique extraterrestre : la problématique et les développements récents pour l'analyse des petites molécules à l'état de trace en milieu complexe. In : *Gargaud, M., Claeys, P., Martin, H. (Eds.), Des atomes aux planètes habitables*. Presses Universitaires de Bordeaux, pp. 323–356.
- Vasavada, A. R., MSL Science Team, Jul. 2007. NASA's 2009 Mars Science Laboratory : An Update. *LPI Contributions* 1353, 3031–+.
- Vermeer, W. P., Norde, W., Jan. 2000. The Thermal Stability of Immunoglobulin : Unfolding and Aggregation of a Multi-Domain Protein. *Biophysical Journal* 78, 394–404.

Acronymes

AIFIRA	Applications Interdisciplinaires de Faisceaux d'Ions en Région Aquitaine
BiOMAS	Biochip for Organic Matter Analysis in Space
BiOMAS - ARCoR	Biochip for Organic Matter Analysis in Space - Antibody Resistance to Cosmic Radiation
BiOMAS - ARTheC	Biochip for Organic Matter Analysis in Space - Antibody Resistance to Thermal Cycles
CENBG	Centre d'Études Nucléaires de Bordeaux Gradignan
CNES	Centre National d'Études Spatiales
COC	Cyclo-Oléfine Copolymère
CPG	Chromatographie en Phase Gazeuse
CREME96	Cosmic Ray Effects on Micro-Electronics
DSC	Differential Scanning Calorimetry
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FITC	Fluorescéine Iso Thio Cyanate
GC - MS	Gas Chromatography - Mass Spectrometry
GCR	Galactic Cosmic Rays
GEANT4	GEometry ANd Tracking 4
GRAS	Geant4 Radiation Analysis in Space
IBMM	Institut des Biomolécules Max Mousseron
IgG	Immunoglobine G
IPB	Interface Physique Biologie
ISS	International Space Station
LAB	Laboratoire d'Astrophysique de Bordeaux
LGM ² B	Laboratoire de Génie Mécanique et Matériaux de Bordeaux
LIBS	Laser Induced Breakdown Spectroscopy
LMC	Life Marker Chip
MEB	Microscope Électronique à Balayage
MER	Mars Exploration Rovers
MSL	Mars Science Laboratory
PDMS	Polydimethylsiloxane
PIOM	Physique des Interactions Ondes-Matière
PP	Polypropylène
PS	Polystyrène
SEP	Solar Energetic Particles
SM	Spectrométrie de Masse
TEL	Transfert d'Énergie Linéique

Annexe A

Monte-Carlo simulation of the radiation environment encountered by a biochip during a space mission to Mars

Le Postollec A.^{1,2}, Incerti S.³, Dobrijevic M.^{1,2}, Desorgher L.⁴, Santin G.⁵, Moretto P.³, Vandabeele-Trambouze O.⁶, Coussot G.⁶, Dartnell L.⁷, Nieminen P.⁵

¹ Université Bordeaux 1, Laboratoire d'Astrophysique de Bordeaux (LAB)

² CNRS/INSU, UMR 5804, 33270 Floirac, FRANCE

³ Université Bordeaux 1, CNRS/IN2P3, Centre d'Etudes Nucléaires de Bordeaux Gradignan (CENBG), UMR 5797, Gradignan, FRANCE

⁴ Physikalisches Institut, University of Bern, Bern, SWITZERLAND

⁵ ESA-ESTEC, Noordwijk, THE NETHERLANDS

⁶ Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM), Université Montpellier II, Montpellier, FRANCE

⁷ CoMPLEX, University College London, London, UK

Corresponding author

Aurélie Le Postollec

Address: Laboratoire d'Astrophysique de Bordeaux, 2 rue de l'Observatoire, 33270 Floirac, FRANCE

Phone: +33 5 57 77 56 82

Fax number: +33 5 57 77 61 10

E-mail addresses: lepostollec@obs.u-bordeaux1.fr
or lepostol@cenbg.in2p3.fr

Abstract

Simulations with a Monte Carlo toolkit have been performed to determine the radiation environment that a specific device, called biochip, would face if it is placed into a rover bound to explore Mars' surface. A biochip is a miniaturized device that can be used to detect organic molecules *in situ*. Its specific detection part is constituted of proteins whose behavior under cosmic radiation is completely unknown and must be investigated to ensure a good functioning of the device under space conditions. The aim of this study is to define particle species and energy ranges that could be relevant to investigate during experiments on irradiation beam facilities.

Several primary particles have been considered for galactic cosmic rays (GCR) and solar energetic particles (SEP) contributions. Ionizing doses accumulated in the biochip and differential fluxes of protons, alphas, neutrons, gammas and electrons have been established for both the Earth-Mars transit and the journey at Mars' surface. Neutrons and gammas appear as dominant species on Mars soil whereas protons dominate during the interplanetary travel. Depending on solar event occurrence during the mission, an ionizing dose of around a few Grays (1 Gy = 100 rad) is expected.

Keywords: biochip, Monte Carlo simulation, radiation, Mars, Geant4

Introduction

The search for life in the Solar System is one of the great challenges of new upcoming space missions. Several techniques are proposed to detect traces of organic matter on extra-terrestrial objects. A new and promising technique based on biochips, and recommended by space agencies, is under study internationally (Steele *et al.*, 2001; Bada *et al.*, 2005; Sims *et al.*, 2005; Parro *et al.*, 2007). A biochip is a miniaturized device composed of biological sensitive systems, called binders, fixed on a solid substrate. It allows the quantification of hundreds to thousands of target molecules simultaneously (Maule *et al.*, 2005). The role of each binder is to recognize a specific molecule or family of molecules and its main characteristics lie in its high affinity toward its target. In an astrobiological context, target molecules are organic molecules, called biomarkers, which could reveal the presence of extant or extinct life. Antibodies are specific binders commonly used on biochips and could be very well adapted to detect biomarkers (Tang, 2007). Geometrically, a biochip looks like a microscope slide on which antibodies are fixed. Different kinds of material can be used for the substrate (glass, thermoplastics, elastomers) that might be more or less adapted to the space constraints. The biochip allows *in situ* analysis of a sample of soil. Organic compounds contained in the sample are extracted with solvents and placed in contact with the biochip. The detection is performed by fluorescence: if an antibody is linked to its target molecule a fluorescent signal appears under laser excitation. This technique takes on a special interest for planetary exploration missions as it gives a visual result of molecules present in the soil sample analyzed.

Recent missions and discoveries about Mars define this planet as a privileged target for exobiological research. *In situ* detection of organic molecules constitutes a major aim. Programs, such as the Aurora program at ESA (European Space Agency), have begun the preparation of missions focused on the search for traces of life on Mars. For the ExoMars mission, a biochip based tool dedicated to the detection of molecules in soil (called “Life Marker Chip”) has been chosen as a reserve instrument.

However, the main concern about a biochip-based instrument is to ensure the resistance and reliability of this miniaturized and biological device under space constraints and especially under radiation hazards. Interaction of cosmic rays with the various components of the biochip must be studied to demonstrate that this kind of instrument is suitable for planetary missions. It is then imperative to conduct irradiation experiments with representative radiations in terms of nature, energy and fluences of particles. In this context, Thompson *et al.* (2006) exposed two fluorescent dyes to low-energy proton and alpha radiation with doses comparable or exceeding that expected during an unshielded cruise for an Earth-Mars transit. They suggested that more extensive radiation testing is needed before the suitability of these fluorophores for astrobiology missions to Mars can be fully confirmed. In particular, they noted that shielding effect of the spacecraft creates lower energy secondary radiation and fragments from the primary radiation that might play a large role.

Indeed, incident particles on a biochip come from cosmic rays and secondary particles originating from the interaction of cosmic rays with the spacecraft and the planetary environment (atmosphere and surface) both during the Earth-planet transit and the stay on the surface of the planet. Numerical simulations represent a precious tool to define the energy spectra and the nature of the particles that could interact with the biochip during a typical mission. For instance, Gurtner *et al.* (2005) studied the influence of Martian atmosphere and soil in the production of secondary particles by incident galactic protons. They showed that neutrons and gammas are the predominant particles at the surface for energies lower than 100 MeV.

The aim of our paper is to provide a better estimation of the nature, energy and fluences of particles that could interact with a biochip during an astrobiology mission like ExoMars. Our model takes into account the Earth-Mars transit, shielding effect of the rover and interaction of Galactic Cosmic Rays (GCR) and Solar Energetic Particles (SEP) with the Mars environment (atmosphere and soil). A Monte-Carlo code toolkit, called Geant4, and some of its derived application tools, developed by ESA and Bern University, widely used in space simulation applications (Geant4/ESA website), were chosen to perform the simulations.

The following section presents the method adopted to perform simulations. It describes the softwares, strategies and geometries used. Section 3 details the results. The last section draws conclusions and brings out some future improvements to this study.

1. Materials and method

The simulations are divided into two distinct phases: a first phase describing the irradiation during the Earth-Mars transit and a second phase modeling radiation received by the biochip at Mars' surface during soil exploration. As biochips perform *in situ* analysis, travel back to Earth is not considered in this study.

1.1. Geant4 simulation toolkit

Simulations are performed by using the GRAS and PLANETOCOSMICS codes, both based on Geant4 .

Geant4 (GEometry and Tracking 4) (Agostinelli *et al.*, 2003; Allison *et al.*, 2006) is a Monte Carlo simulation toolkit which allows the simulation of the interaction of particles with matter. It propagates elementary particles and ions through any geometrical arrangement of materials. The main physical processes that can be considered by Geant4 are: ionisation, bremsstrahlung, photo-electric effect, Compton scattering, elastic and inelastic hadronic interaction, nuclear capture and particle decay. Geant4 offers different models to treat all these physical processes. In our simulations, the electromagnetic shower is simulated by using the standard Geant4 electromagnetic package. For the simulation of hadronic interactions, different models of Geant4 are used, depending on the energy range and primary particle type (Geant4 Physics Reference Manual, 2007). For hadrons at high energies (>10 GeV), a quark gluon string model is selected. For nucleons at energies lower than 10 GeV the binary intranuclear cascade model has been chosen. In this model the cascade phase is followed by a pre-equilibrium phase at intermediate energy, and then by an evaporation regime at lower energy. For neutrons with energy lower than 20 MeV the G4NeutronHP model based on the ENDF database is used. For hadronic ion-ion interactions, we use the binary cascade model for light ions till 10 GeV/nuc. For higher energy, Geant4 does not provide any interaction models. Usually, the approximation that the effect of an ion with N nucleons is equivalent to the effect of N protons with the same energy per nucleon is made. In our case, we restrain incident ion spectra to particle energies lower than 10 GeV/nuc.

Geant4 is now widely used for space applications such as instrument design and detector response, radiation shielding, investigation of components and biological effects. Thanks to its flexible object-oriented architecture and high precision simulation capabilities, such a tool offers an interesting alternative to deterministic simulation codes. Even if it is still quite time-consuming, it allows very accurate computation that can be perfectly adapted to the special case of interest. It offers a general-purpose simulation framework, providing an easy interfacing with

other tools, which is very useful considering the large variety of application fields on irradiation issues.

1.2. Incident particles

We consider two different types of primary fluxes: Galactic Cosmic Rays (GCR) and Solar Energetic Particles (SEP).

GCR consist mainly of protons and ions of galactic origin bombarding continuously and isotropically our Solar System. The GCR flux in the heliosphere is modulated by the magnetic field of the solar wind and varies inversely with the 11 year solar activity cycle resulting in a GCR flux minimum during solar activity maximum, and a GCR flux maximum at solar minimum. SEP events consist mainly of protons due to solar flares or coronal mass ejections. They are event driven with occasional high fluxes over short periods (a few hours to a few days), and constitute one of the most severe environments faced by the space systems. The SEP events occur more frequently during the maximum of solar activity. Their radiation flux depends strongly on the distance between the Sun and the location of interest.

For our simulation, we take a GCR population as described by the CREME96 model (Tylka *et al.*, 1997; CREME96 website) for the minimum of solar activity. The considered composition of GCR is presented in Figure 1, it is composed, in percentage, by ~91% of protons, 8% of alpha particles and a small fraction of heavy ions dominated by carbon and oxygen ions. Only those four primary incident particles are considered in our study. This improves the simulation results presented by Gurtner *et al.* (2005) which considered only protons as primary particles. Taking into account alpha particles, C and O ions as primary particles allows a more precise estimation of secondary particles produced by interaction with the biochip environment (rover, planet).

The SEP population is described by the “worst week” case scenario provided in the CREME96 model. As CREME 96 spectra are given at 1 A.U., an additional scaling factor of $1/R^2$ is added to describe the dependence from the distance to the Sun (N.B.: for GCR, differences between spectra at Earth and Martian orbit are expected to be negligible (Webber, 1987)). The composition of SEP in this model is illustrated in Figure 2, it is made of protons (99.9%) and few alpha particles (0.08%). SEP spectra from ($Z=3$) to ($Z=5$) are not available in CREME96 because those species are essentially absent from solar particle events. In the GCR, they are produced as spallation products from heavier ions (mostly oxygen and carbon) colliding with protons in the interstellar medium, but between Earth and Sun, there are too few targets nuclei for these spallation interactions to be significant. The flux of heavier ions ($Z \geq 6$) for SEP particles is very small and we neglect them in our simulations.

Figure 3 summaries the total spectrum of GCR and SEP particles given by the CREME96 model and considered in our simulation. However, it should be mentioned that while the fluxes of heavier ions are indeed very low, for big and heavily shielded structures (such as the ISS for example) they can be an important contributor to the overall dose via fragmentation and other secondary production. Considering carbon and oxygen ions for GCR, we make a first step in this sense.

1.3. Earth-Mars transit simulation with GRAS

During the transit between Earth and Mars, we simulate the interaction between cosmic particle fluxes and a simple rover model containing the biochip prototype. Primary incident spectra extracted from CREME96 interact directly with the rover. We use GRAS to simulate

this mission phase, in order to define particles fluxes and to calculate ionizing doses into the biochip.

GRAS (Geant4 Radiation Analysis in Space) is a Geant4-based tool that deals with common radiation analysis types in 3D geometry models (Santin *et al.*, 2005). It was developed by ESA in order to facilitate radiation simulations in space applications. It provides an interface divided into different modules to easily define geometries, physics models, data storing, analysis, etc. Analysis includes, among others, particle fluence and ionizing dose which are of special interest in this work. GRAS uses the General Particle Source (GPS) (QinetiQ, Geant4 General Particle Source website) as its generator for the primary particles which offers many options for the choice of particle type, energy spectrum, emission point and emission direction distribution.

As we do not have a precise mission trajectory, it is schematized, in a first approximation, as an orbit at mid-distance between Earth and Mars (1.25 A.U.). Particle spectra generated by CREME96 are scaled with a $1/1.25^2$ factor for solar energetic particles events. The flux is considered as isotropic.

Typical cruise duration of 180 days with a 7 days solar energetic particle (SEP) event occurring during this period is considered.

A simple rover geometry definition is adopted for this travel simulation. It is a rudimentary cube of 1 m side made of 4 mm thick aluminum. It includes a support in its center where an aluminum box of 30 cm side is placed. The biochip, described as a slide of $75 * 25 * 1 \text{ mm}^3$ composed of SiO_2 , is positioned inside this box. The space vessel geometry is not included for the moment. In a primary assessment of radiation effects on the instrument, we just study the influence of a double aluminum shielding provided by the rover and a dedicated biochip container, for a total thickness of 6 mm.

Primary particles fluxes are generated isotropically from a spherical source surrounding the rover (Figure 4).

1.4. Simulation on Mars

The second phase of the mission simulation consists in simulation of the irradiation received on Mars. We consider a rover exploring Mars' surface during one month. In this second phase, interactions of particles with Mars atmosphere and soil add complexity to the simulation process. To simplify, and clarify, a two-step strategy using both PLANETOCOSMICS and GRAS is adopted.

First, we investigate the particle environment the rover would encounter on Mars' surface. PLANETOCOSMICS gives us the opportunity to simulate the interaction of primary particle fluxes with the Mars environment.

PLANETOCOSMICS is a Geant4 based application, which allows computation of electromagnetic and hadronic interactions of cosmic rays with planetary environments. For each planet, the user can simulate detailed planetary atmosphere, soil and magnetic field. (Desorgher *et al.*, 2005, Bütikofer *et al.*, 2008, PLANETOCOSMICS website). In our case, a Martian extension of this code is used to predict the radiation level at the Martian surface due to galactic cosmic rays and solar energetic particles events.

1.4.1. Geometry parameters

The model of Mars environment constructed is basically the same as the one of Gutner *et al.* (2005). We summarize in this section the main characteristics of this model for the atmosphere and the soil.

The Mars atmosphere is very thin: the atmospheric depth varies between 8 and 22 g/cm² at Mars' surface. It is mainly composed of carbon dioxide, nitrogen and argon as shown in Table 1. In PLANETOCOSMICS, the atmospheric parameters, such as density, pressure and temperature, are provided by the 2001 Mars Global Reference Atmospheric Model (Mars-GRAM) (Justus *et al.*, 2006). This model uses Mars topographic information from the Mars Orbiter Laser Altimeter (MOLA) instrument onboard of Mars Global Surveyor. The program computes the atmospheric parameters versus altitude profiles as function of position and Martian season.

The daily averaged atmosphere composition table of Mars at 45°N latitude and 180°E longitude (Arcadia Planitia location) on January 1st 2000 is produced for our simulations. At this position, the atmosphere is modeled by 34 layers with different thicknesses and densities, describing a 94 km thick atmosphere, from -4 km (altitude of Arcadia Planitia) to +90 km. Figure 5 shows density and surface density profiles with altitude.

The chemical composition of Mars' surface can vary a lot, especially between rock and regolith, between bright and dark dust. We have chosen an average Martian soil composition obtained from measurements of the α -proton X-ray spectrometer on Pathfinder-Sojourner (Boyce, 2002). Abundances in different materials are given in Table 2. The soil is mainly composed by oxides with a predominance of SiO₂.

In the simulations, the soil is defined so that the total surface thickness surpasses 1500 g/cm², in order to avoid particles escape below the soil layer (all particles reaching the soil are stopped or backscattered). The soil density is averaged at 3.7 g/cm³ (as in Gurtner *et al.* (2005) and Keating *et al.* (2005)), which means that the soil layer is at least 4 m thick.

The different geometry layers are defined with a sufficiently large shape square of 5000 km side. The "world" of the simulation goes from 150 km above the top of the atmosphere to 10 km beyond the soil surface. A detection surface, which records upward- and downward-directed particle fluxes, is placed 1.5 m above the soil, which is the expected altitude of a biochip placed into a rover exploring the surface (see Figure. 6).

Particles are generated at the top of the world, kilometers above the atmosphere, from a point source. We place a second detection surface a few meters above the top of the atmosphere to record the flux entering into the atmosphere and to verify it is identical to the flux generated for each particle type.

1.4.2. PLANETOCOSMICS/GRAS transition

Several particle fluxes above the surface are analyzed: protons, alphas, electrons, positrons, neutrons, gammas, ions from ($Z=3$) to ($Z=8$). Down fluxes but also backscattered fluxes from the soil are recorded by the detection surface. Primary particles spectra, extracted from CREME96, are scaled to 1.5 A.U. for SEP.

All corresponding secondary spectra on Mars soil are recorded and summed up by particle type. Then, we use those results in GRAS as separate primary sources to calculate the ionizing dose received by the biochip during a one month stay at Mars' surface.

We have developed a specific interface, based on ROOT data analysis framework (Brun, ROOT website), to ensure compatibility of spectra produced by PLANETOCOSMICS with input spectra design expected for the GRAS simulations. While the primary incident particles injected into PLANETOCOSMICS are considered as isotropic, the same assumption cannot be made for particles detected at rover altitude, after interaction with Mars atmosphere and soil. The PLANETOCOSMICS-GRAS interface generates in GRAS primary particles on the external surface of the spherical source by considering the 2-D energy-angle double differential distributions generated by PLANETOCOSMICS. It is worth to mention that with this interface

the distribution of the primary particles over the external sphere is not considered as uniform but is the function of the angular distribution as it should be the case.

1.5. Normalization

The computation of particle fluences and deposited doses from GRAS requires a careful normalization procedure, taking into account the geometry of the simulated flux generation. The real physical quantity Q_{real} – representing the particle fluence or the deposited dose – can be computed from:

$$Q_{real} = NQ_{GRAS} \quad (1)$$

where Q_{GRAS} stands for the same physical quantity simulated with GRAS and N is a normalization factor representing the number of particles entering the source sphere in reality. Q_{GRAS} is expressed per incident simulated event. N can be computed as the product of the section of the generation sphere around the rover multiplied by the omnidirectional impinging flux. For the Earth-Mars travel, this flux is simply obtained from the energy integration of the CREME96 flux multiplied by the whole solid angle 4π . For Mars ground simulation, this flux is directly extracted from the PLANETOCOSMICS flux computed on the ground.

2. Results

2.1. Simulation results for the Earth-Mars travel

This simulation details the interaction between the dominant particles of the cosmic spectrum and the rover geometry. Table 3 presents the amount and species of particles entering into the biochip, *i.e.* crossing its surface. It shows clearly the creation of secondary particles when primary ones go through the rover geometry and interact with matter. Statistical errors are calculated by GRAS following an approach very similar to the one detailed in Walters *et al.* (2002).

Differential fluxes of main particles composing the biochip environment are presented in Figure 7. These results only consider galactic cosmic rays contribution.

The different spectra highlight the effect of the rover geometry on simulations: this geometry implies modifications on the incident spectra and creates secondary particles such as neutrons, gammas and electrons that could be of importance for the biochip resistance and efficiency.

For ionizing dose calculations, results are divided into two parts. First the dose accumulated from GCR contribution is considered and then the contribution of a SEP event is studied. Solar proton events are still unpredictable nowadays and it seems judicious to uncouple both contributions.

For GCR, results per event are used to calculate global doses for a six-month travel duration, which is typically the minimum duration required for an Earth-Mars transit. Ionizing doses in the biochip due to each type of incident primary particle of GCR spectrum are presented in Table 4. The global dose accumulated during a six-month travel would be of the order of 43 mGy, considering a “solar-quiet” travel with only GCR contribution.

Simulations are performed with incident protons and alpha particles for the SEP contribution. As previously discussed, we consider a seven day event with the CREME96 “worst week” model and ionizing doses accumulated in the biochip during such an event are defined in Table 5.

The occurrence of such a big event during the travel would considerably increase ionizing dose accumulation. In this case, the global ionizing dose received during the travel could reach nearly 2 Gy.

2.2. Simulation results for the stay on Mars

Simulations on Mars soil reveal a large predominance of neutrons and gammas above the surface, as shown in Table 6.

Figure 8 presents differential fluxes obtained at soil level for protons, alpha particles, neutrons, gammas and electrons, considering only GCR contribution. Figure 9 details upward and downward particles fluxes contributions.

We pay particularly attention to neutrons spectrum, with in mind future irradiation experiments on dedicated beam lines facilities. Neutrons are produced in the atmosphere and backscattered from Mars soil. The spectrum obtained at 1.5 m above soil, with or without taking SEP into account, presents 2 peaks as predicted in Goldhagen *et al.* (2004). The largest one, centered on few MeV, is due to neutron “evaporation”.

Ionizing doses received by the biochip during a one-month stay at Mars’ surface are exposed in Table 7. There are calculated with GRAS from simulations taking into account only GCR spectra. Considering all GCR particles contributions, the global ionizing dose reaches 27 mGy (± 1 mGy).

We have compared our results on Mars with predictions performed using other computing tools. De Angelis *et al.* (2006) gives the annual fluence of neutrons, protons and ions due to GCR at the Martian surface, simulated with the HZETRN heavy ion code. The results are in good agreement, in shape and order of magnitude, with the spectra presented in Figure 8.

Radiation measurements were carried out in the orbit of Mars by the Martian Environment Experiment (Zeitlin *et al.*, 2003; Saganti *et al.*, 2005) and were found to be in 10% agreement with HZETRN calculations. It will be challenging to compare these data with our model output. Moreover, a lot of studies on Mars radiation environment try to assess biological risks for astronauts (Saganti *et al.*, 2004; Simonsen *et al.*, 1991; Cucinotta *et al.*, 2005). The high specificity of these simulations, taking into account body water for shielding and calculating increasing percentage of cancer risks, makes any comparison with our calculations very complicated. Due to our specific scenario and our original object of interest (a biochip), the present simulations are difficult to compare to other ones in the literature but we can underline that the results appear coherent with some other Mars radiation predictions (De Angelis *et al.*, 2006; Keating *et al.*, 2005; Clowdsley *et al.*, 2000).

3. Conclusion/Perspectives

The simulations performed present the type of particles and the energy ranges that a biochip, placed in a rover for a Mars exploration mission, would face. We define the amount of secondary particles created both during interaction with the Mars environment and during interaction with the rover geometry. They are taken into account to calculate physical quantities as the ionizing dose accumulation into the biochip.

Our developments are based on the Monte-Carlo Geant4 toolkit.

Using the GRAS analysis module, we estimate more precisely the radiation environment the biochip will face during the travel. Abundances of protons and alpha particles around the biochip, but also abundances of neutrons, gammas and electrons created, are presented.

Even if the rover geometry is rudimentary, the particle environment defined is much more realistic than traditional simulations studying the direct interaction between incident spectra and the object of interest.

Globally, the ionizing dose received during a six-month travel, with a seven-day solar event, plus a one-month exploration could be estimated to a few Gy. During the travel, protons are clearly the most abundant species that will be encountered and they represent the dominant contribution to the cumulative ionizing dose. At Mars' surface, interactions with the atmosphere and soil create mainly gammas and neutrons.

This study brings precision on the particle environment modeling during a space mission; nevertheless, as solar particles events are still unpredictable, it appears very difficult to evaluate their contribution and their deleterious effect. Therefore, worst cases are preferably studied here to define an upper limit of irradiation. A scenario with a one week SEP event during the travel is reasonably considered as a worst scenario but still realistic: it appears as a good compromise between neglecting their contribution and an over-estimation too much exaggerated to make sense. Moreover, there is still rather limited understanding of SEP fluences as function of helioradial distance, hence a geometrical scaling may not be the most appropriate treatment given the acceleration processes taking place as the shock propagates. This is a topic of ongoing study (for example the ESA SEPTEM project (SEPTEM project website)). Therefore, it would be interesting to refine SEP contribution when some data on this point become available. In this case, it will be possible to simulate SEP fluxes on Mars surface with a more realistic approach. Ionizing dose received by the biochip during a seven-day solar event is two orders of magnitude higher than the dose accumulated during a six-month exposure to GCR. This result clearly underlines the problem posed by those energetic and unforeseeable particles.

Both most abundant and most energetic particles have to be studied and experimented, as they are both potentially harmful for the biochip. Neutrons are numerous but their contribution to the dose is quite low whereas, for instance, oxygen ions are few but contribute greatly to the dose accumulation.

Despite the approximations introduced in the simulations, this first estimation of doses received by the biochip during a mission to Mars allows the proposition of pertinent experimental irradiations at beam facilities. In a first step, we have decided to investigate effects of neutrons on the biochip and especially on antibodies. As shielding in space devices is expected to be mainly composed of a few millimeters of aluminum, a study dedicated to neutron effects seems interesting, even if energies involved are still low, because neutrons penetrate small thicknesses of aluminum quite easily. Moreover, consequences of low energy particles on biological systems, such as antibodies, are still unknown. Neutron irradiation on fluorescent dyes and antibodies has been performed at the AIFIRA (Application Interdisciplinaire des Faisceaux d'Ions en Région Aquitaine) facility at CENBG in Bordeaux. For these experiments, fluxes of several orders of magnitude have been used to allow avoiding potentially underestimations with presented simulations. Indeed, even if it is continuously evolving, Geant4 still faces some limitations. In particular, ion physics models are only validated for energies below 10 GeV per nucleon and therefore we use only a reduced part of incident cosmic particles spectra in our simulations.

Description of the experimental method and preliminary results obtained from such neutron irradiation will be published soon.

Further simulations are in progress to improve the rover geometry model, considering the implementation of CAD blueprints in Geant4. The objective is to work on shielding design to determine the best compromise between mass and protection level. Several types of materials, thicknesses and geometries will be tested.

The possibility to include high-energy interaction models into PLANETOCOSMICS and GRAS simulations is currently under study. The use of Particle and Heavy-Ion Transport code System (PHITS) (PHITS website) could be a solution. Therefore, the energy limit of incident particles could be extended from 10 GeV/nuc up to 100 GeV/nuc.

Mars is not the only extraterrestrial body of interest for exobiology studies. Missions with astrobiological objectives to other planets or moons are under study. The same kind of simulations, with new environments such as the International Space Station (ISS) or Titan (satellite of Saturn) is under study. Simulation radiation effects on the ISS might be interesting for future experiment on board to study antibody resistance under real space constraints.

Acknowledgments

We would like to thank the French space agency (CNES), the “Région Aquitaine” and the “Institut de Physique Fondamentale” of Bordeaux (IPF) for their support.

References

Agostinelli, S., Allison, J., Amako, K., Apostolakis, J., Araujo, H., Arce, P., Asai, M., Axen, D., Banerjee, S., Barrand, G., Behner, F., Bellagamba, L., Boudreau, J., Brogna, L., Brunengo, A., Burkhardt, H., Chauvie, S., Chuma, J., Chytracsek, R., Cooperman, G., Cosmo, G., Degtyarenko, P., Dell'Acqua, A., Depaola, G., Dietrich, D., Enami, R., Feliciello, A., Ferguson, C., Fesefeldt, H., Folger, G., Foppiano, F., Forti, A., Garelli, S., Giani, S., Giannitrapani, R., Gibin, D., Gomez Cadenas, J.J., Gonzalez, I., Gracia Abril, G., Greeniaus, G., Greiner, W., Grichine, V., Grossheim, A., Guatelli, S., Gumplinger, P., Hamatsu, R., Hashimoto, K., Hasui, H., Heikkinen, A., Howard, A., Ivanchenko, V., Johnson, A., Jones, F.W., Kallenbach, J., Kanay, N., Kawabata, M., Kawabata, Y., Kawaguti, M., Kelner, S., Kent, P., Kimura, A., Kodama, T., Kokoulin, R., Kossov, M., Kurashige, H., Lamanna, E., Lampen, T., Lara, V., Lefebvre, V., Lei, F., Liendl, M., Lockman, W., Longo, F., Magni, S., Maire, M., Medernach, E., Minamimoto, K., Mora de Freitas, P., Morita, Y., Murakami, K., Nagamatu, M., Nartallo, R., Nieminen, P., Nishimura, T., Ohtsubo, K., Okamura, M., O'Neale, S., Oohata, Y., Paech, K., Perl, J., Pfeiffer, A., Pia, M.G., Ranjard, F., Rybin, A., Sadilov, S., Di Salvo, E., Santin, G., Sasaki, T., Savvas, N., Sawada, Y., Scherer, S., Sei, S., Sirotenko, V., Smith, D., Starkov, N., Stoecker, H., Sulkimo, J., Takahata, M., Tanaka, S., Tcherniaev, E., Safai Tehrani, E., Tropeano, M., Truscott, P., Uno, H., Urban, L., Urban, P., Verderi, M., Walkden, A., Wander, W., Weber, H., Wellisch, J.P., Wenaus, T., Williams, D.C., Wright, D., Yamada, T., Yoshida, H., Zschiesche, D., (2003) Geant4 – A simulation toolkit. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A* 506, 250-303.

Allison, J., Amako, K., Apostolakis, J., Araujo, H., Arce Dubois, P., Asai, M., Barrand, G., Capra, R., Chauvie, S., Chytracsek, R., Cirrone, G.A.P., Cooperman, G., Cosmo, G., Cuttone, G., Daquino, G.G., Donszelmann, M., Dressel, M., Folger, G., Foppiano, F., Generowicz, J., Grichine, V., Guatelli, S., Gumplinger, P., Heikkinen, A., Hrivnacova, I., Howard, A., Incerti, S., Ivanchenko, V., Johnson, T., Jones, F., Koi, T., Kokoulin, R., Kossov, M., Kurashige, H., Lara, V., Larsson, S., Lei, F., Link, O., Longo, F., Maire, M., Mantero, A., Mascialino, B., McLaren, I., Mendez Lorenzo, P., Minamimoto, K., Murakami, K., Nieminen, P., Pandola, L., Parlati, S., Peralta, L., Perl, J., Pfeiffer, A., Pia, M.G., Ribon, A., Rodrigues, P., Russo, G., Sadilov, S., Santin, G., Sasaki, T., Smith, D., Starkov, N., Tanaka, S., Tcherniaev, E., Tome, B., Trindade, A., Truscott, P., Urban, L., Verderi, M., Walkden, A., Wellisch, J.P., Williams, D.C., Wright, D., Yoshida, H., (2006) Geant4 developments and applications. *IEEE Transactions on Nuclear Science* 53, No. 1, 270-278.

Bada, J.L., Sephton, M.A., Ehrenfreund, P., Mathies, R.A., Skelley, A.M., Grunthaner, F.J., Zent, A.P., Quinn, R.C., Josset, J., Robert, F., Botta, O., Glavin, D.P., (2005) New strategies to detect life on Mars. *Astronomy & Geophysics* 46 (6), 26-27.

Boyce, J.M., (2002) The Smithsonian Book of Mars. *Smithsonian Institution Press, Washington, London*, pp. 77-83.

Brun, R., ROOT website, <http://root.cern.ch/>

Bütikofer, R., Flückiger, E.O., Desorgher, L., Moser, M.R., (2008) The extreme solar cosmic ray influence on the radiation dose rate at aircraft altitude, *Science of the Total Environment*, 391, 177-183.

Cloudsley, M.S., Wilson, J.W., Kim, M.-H.Y., Singleterry, R.C., Tripathi, R.K., Heinbockel, J.H., Badavi, F.F., Shinn, J.L., (2000) Neutron Environments on the Martian Surface, *1st International Workshop on Space Radiation Research and 11th Annual NASA Space Radiation Health Investigators' Workshop*.

CREME96 website, <https://creme96.nrl.navy.mil/>

Cucinotta, F., Kim, M., Ren, L., (2005) Managing Lunar and Mars Mission Radiation Risks – Part I: Cancer Risks, Uncertainties, and Shielding Effectiveness. *NASA Technical Paper*, NASA/TP-2005-213164.

Dartnell, L.R., Desorgher, L., Ward, J.M., Coates, A.J. (2007) Modelling the surface and subsurface Martian radiation environment: Implications for astrobiology. *Geophysical Research Letters* vol. 34, L02207, doi: 10.1029/2006GL027494

De Angelis, G., Wilson, J.W., Cloudsley, M.S., Qualls, G.D., Singleterry, R.C., (2006) Modeling of the Martian environment for radiation analysis. *Radiation Measurements* 41, 1097-1102.

Desorgher, L., Flückiger, E. O., Gurtner, M., Moser, M. R., Bütikofer, R., (2005) ATMOCOSMICS: A Geant4 code for computing the interaction of cosmic rays with the Earth's atmosphere. *International Journal of Modern Physics A* 20(29), 6802-6804, (419)

Geant4/ESA website, <http://geant4.esa.int/resources>

Geant4 Physics Reference Manual (2007), version Geant4 9.0, <http://cern.ch/geant4>.

Goldhagen, P., Clem, J.M., Wilson, J.W. (2004) The energy spectrum of cosmic-ray induced neutrons measured on an airplane over a wide range of altitude and latitude. *Radiation Protection Dosimetry* 110, Nos 1-4, pp. 387-392.

Gurtner, M., Desorgher, L., Flückiger, E.O., Moser, M.R., (2005) Simulation of the interaction of space radiation with the Martian atmosphere and surface. *Advances in Space Research* 36, 2176-2181.

Justus, C.G., Duvall, A., Keller, V.W. (2006) Validation of Mars Global Reference Atmospheric Model (Mars-GRAM 2001) and planned features. *Advances in Space Research* 38, 2633-2638.

Keating, A., Mohammadzadeh, A., Nieminen, P., Maia, D., Coutinho, S., Evans, H., Pimenta, M., Huot, J.-P., Daly, E. (2005) A Model for Radiation Environment Characterization, *IEEE Transaction on Nuclear Science* 52, No. 6, 2287-2293

Maule, J., Toporski, J., Wainwright, N., Steele, A. (2005) An integrated system for labeling and detection of biological molecules in Mars analog regolith using an antibody microarray. *Lunar and Planetary Science* 36, 1921.

Owen, T. (1992) The composition and early history of the atmosphere of Mars. *Kieffer, H.H., Jakosky, B.M., Synder, C.W., Matthews, M.S. (Eds.), Mars. The University of Arizona Press, Tucson, USA*, pp. 818-834.

Parro, V., Rivas, L.A., Gómez-Elvira, J. (2007), Protein Microarrays-Based Strategies for Life Detection in Astrobiology. *Space Science Reviews*, 135, 293-311

PHITS website <http://rcwww.kek.jp/research/shield/phits.html>

PLANETOCOSMICS website <http://cosray.unibe.ch/~laurent/planetocosmics/>

QinetiQ, Geant4 General Particle Source website, <http://reat.space.qinetiq.com/gps/>

Saganti, P., Cucinotta, F., Wilson, J., Simonsen, L., Zeitlin, C., (2004) Radiation climate for analyzing risks to astronauts on the Mars surface from galactic cosmic rays. *Space Science Reviews*, 110, 143-156.

Saganti, P., Cucinotta, F., Cleghorn, T., Zeitlin, C., Lee, K., Hu, X., Pinsky, L., Anderson, V., Riman, F., Flanders, J., Atwell, W., Turner, R., (2005) MARIE Measurements and Model Predictions of Solar Modulation of Galactic Cosmic Rays at Mars. *29th International Cosmic Ray Conference*, 1, 319-322.

Santin, G., Ivanchenko, V., Evans, H., Nieminen, P., Daly, E., (2005) GRAS: A General-Purpose 3-D Modular Simulation Tool for Space Environment Effects Analysis. *IEEE Transactions on Nuclear Science*, 52, No. 6.

SEPTEM project website <http://www.oma.be/SEPTEM/>

Simonsen, L., Nealy, J., (1991) Radiation Protection for Human Missions to the Moon and Mars. *NASA Technical Paper 3079*.

Sims, M.R., Cullen, D.C., Bannister, N.P., Grant, W.D., Henry, O., Jones, R., McKnight, D., Thompson, D.P., Wilson, P.K., (2005) The specific molecular identification of life experiment (SMILE). *Planetary and Space Science* 53, 781-91.

Steele, A., McKay, D., Allen, C., Thomas-Keprta, K., Warmflash, D., Pincus, S., Schweitzer, M., Priscu, J., Sears, J., Hedgecock, J., Avci, R., Fogel, M., (2001) Mars Immunoassay Life Detection Instrument for Astrobiology (MILDI). *Lunar and Planetary Science* 32, 1684.

Tang, B.L. (2007) A case for immunological approaches in detection and investigation of alien life. *International Journal of Astrobiology* 6 (1), 11-17.

Thompson, D.P., Wilson, P.K., Sims, M.R., Cullen, D.C., Holt, J.M.C., Parker, D.J., Smith, M.D. (2006) Preliminary Investigation of Proton and Helium Ion Radiation Effects on Fluorescent Dyes for Use in Astrobiology Applications. *Anal. Chem.*, 78 (8), 2738-2743.

Tylka, A.J., Adams, J.H., Boberg, P.R., Brownstein, B., Dietrich, W.F., Flueckiger, E.O., Petersen, E.L., Shea, M.A., Smart, D.F., Smith, E.C. (1997) "CREME96: A Revision of the Cosmic Ray Effects on Micro-Electronics Code". *IEEE Transactions on Nuclear Science* 44, 2150-2160.

Walters, B.R.B., Kawrakow, I., Rogers, D.W.O. (2002) History by history statistical estimators. *Medical Physics*, Vol. 29, No. 12, 2745-2752.

Webber, W.R. (1987) The interstellar cosmic ray spectrum and energy density. Interplanetary cosmic ray gradients and a new estimate of the boundary of the heliosphere. *Astronomy and Astrophysics* 179, 277-284.

Zeitlin, C., Cleghorn, T., Cucinotta, F., Saganti, P., Andersen, V., Lee, K., Pinsky, L., Atwell, W., Turner, R., (2003) Results from the Martian radiation environment experiment MARIE. *Lunar and Planetary Science* 34.

TABLES

Gas	CO ₂	N ₂	⁴⁰ Ar	O ₂	CO	H ₂ O
Abundance (%)	95.32	2.7	1.6	0.13	0.07	0.03

Table 1: Composition of the Martian atmosphere (Owen *et al.*, 1992)

Material	SiO ₂	Fe ₂ O ₃	Al ₂ O ₃	MgO	CaO	SO ₃	Na ₂ O	TiO ₂	K ₂ O
Abundance [%]	46.8	18.8	8.1	7.7	6.2	6	1.5	1.1	0.2

Table 2: Martian soil composition from measurements (Boyce, 2002)

		Particles entering into the biochip (secondary particles)				
		Proton (p) (#/cm ² /s)	Alpha (α) (#/cm ² /s)	Neutron (#/cm ² /s)	Gamma (#/cm ² /s)	Electron (#/cm ² /s)
Incident particles	p	2.17 ± 0.07	0	(5.25 ± 0.35) 10 ⁻¹	1.54 ± 0.11	(2.99 ± 0.26) 10 ⁻¹
	α	(3.79 ± 0.27) 10 ⁻²	(1.61 ± 0.04) 10 ⁻¹	(1.55 ± 0.10) 10 ⁻¹	(3.17 ± 0.18) 10 ⁻¹	(6.39 ± 0.43) 10 ⁻²
	C	(4.37 ± 0.30) 10 ⁻³	(3.61 ± 0.39) 10 ⁻⁴	(1.07 ± 0.03) 10 ⁻²	(2.57 ± 0.06) 10 ⁻²	(1.72 ± 0.30) 10 ⁻²
	O	(6.33 ± 0.29) 10 ⁻³	(6.43 ± 0.62) 10 ⁻⁴	(1.64 ± 0.06) 10 ⁻²	(4.46 ± 0.10) 10 ⁻²	(3.13 ± 0.34) 10 ⁻²
Total		2.22	0.16	0.71	1.92	0.41
Total (%)		41.0%	3.0%	13.0%	35.4%	7.6%

Table 3: Fluxes of particles crossing the biochip surface during the Earth-Mars travel. We consider only simulations with the 4 dominant incident particles of the GCR spectrum. Errors are statistical errors computed by GRAS.

Particles	Proton	Alpha	Oxygen	Carbon
Dose (mGy)	25.1	11.2	4.3	2.2
Statistical error (mGy)	1.28	0.37	0.13	0.06

Table 4: Doses received by the biochip during a six-month travel from Earth to Mars, due to the four dominant species of the GCR spectrum (N.B.: 1Gy = 100 rad = 1J/kg and biochip mass = 4.4g).

Particles	Proton	Alpha
Dose (mGy)	1861.1	19.5
Statistical error (mGy)	0.4	$4 \cdot 10^{-4}$

Table 5: Doses received by the biochip during a seven-day SEP event.

Particles	Flux without SEP (particle/cm ² /s)	Flux with SEP (particle/cm ² /s)
Gamma	160.75	277.86
Neutron	80.11	145.65
Electron	8.54	11.72
Proton	5.16	15.64
Positron	2.60	2.88
Alpha	0.32	0.33
Deuteron	0.16	0.16
O	0.12	0.12
Triton	0.08	0.08
Be	0.05	0.05
C	0.05	0.05
N	0.04	0.04
Li	0.02	0.02
B	0.01	0.01
TOTAL	258.01	454.61

Table 6: Flux of several particles 1.5 m above Mars soil. Neutrons and gammas are the dominant species. (N.B.: SEP contribution is specifically detailed because, in this case, it is clearly over-estimated, as we consider a one month event with the intensity of the worst-week event.)

Particles	Dose (mGy)	Statistical Error (mGy)
Proton	7.22	$2.5 \cdot 10^{-1}$
O	7.07	$3.8 \cdot 10^{-1}$
Gamma	1.92	$3.4 \cdot 10^{-1}$
N	1.76	$9.2 \cdot 10^{-2}$
Electron	1.75	$8.4 \cdot 10^{-2}$
C	1.72	$1.0 \cdot 10^{-1}$
Neutron	1.46	$4.6 \cdot 10^{-1}$
Positron	1.36	$4.5 \cdot 10^{-2}$
Alpha	1.00	$2.8 \cdot 10^{-2}$
Be	0.84	$5.4 \cdot 10^{-2}$
B	0.34	$1.9 \cdot 10^{-2}$
Deuteron	0.19	$8.5 \cdot 10^{-3}$
Li	0.16	$1.1 \cdot 10^{-2}$
Triton	0.11	$6.0 \cdot 10^{-3}$

Table 7: Doses (in mGy) received by a biochip during a one-month stay at Mars' surface without any SEP event.

FIGURES

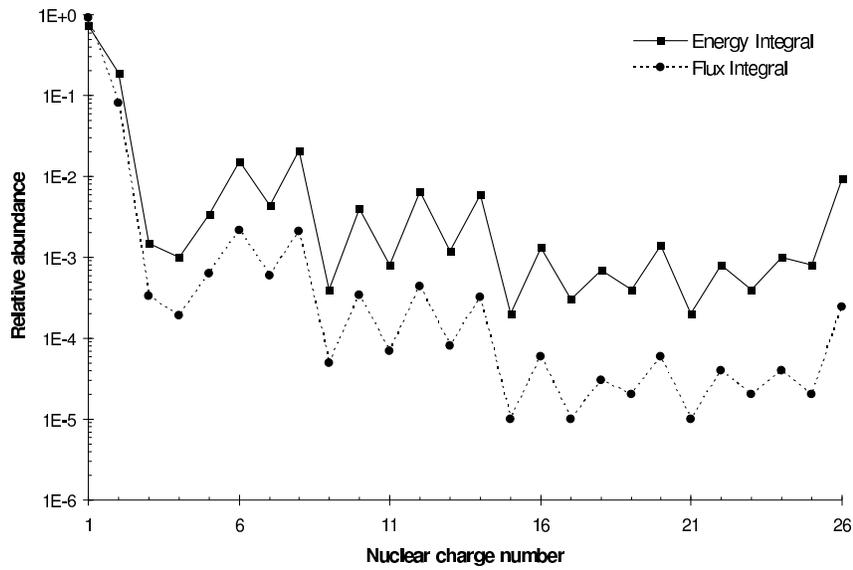


Fig. 1: Relative abundance of species from $Z=1$ to $Z=26$ in the GCR spectrum at minimum solar activity. Integral calculations are made from CREME96 spectra. They have been inspired by a similar work done by L. Dartnell (Dartnell et al, 2007) who chose to model the entire GCR spectra with H, He and C primaries.

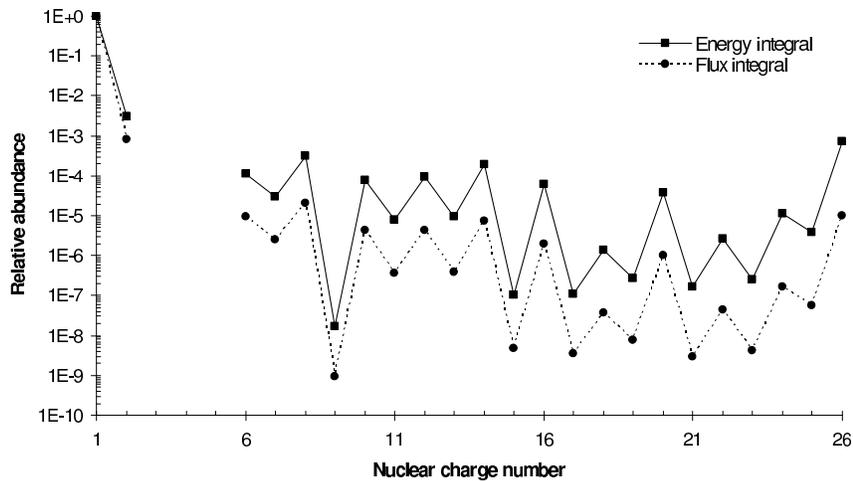


Fig. 2: Relative abundance of species from $Z=1$ to $Z=26$ in the SEP spectrum during the worst week event. Integral calculations were made from CREME96 spectra.

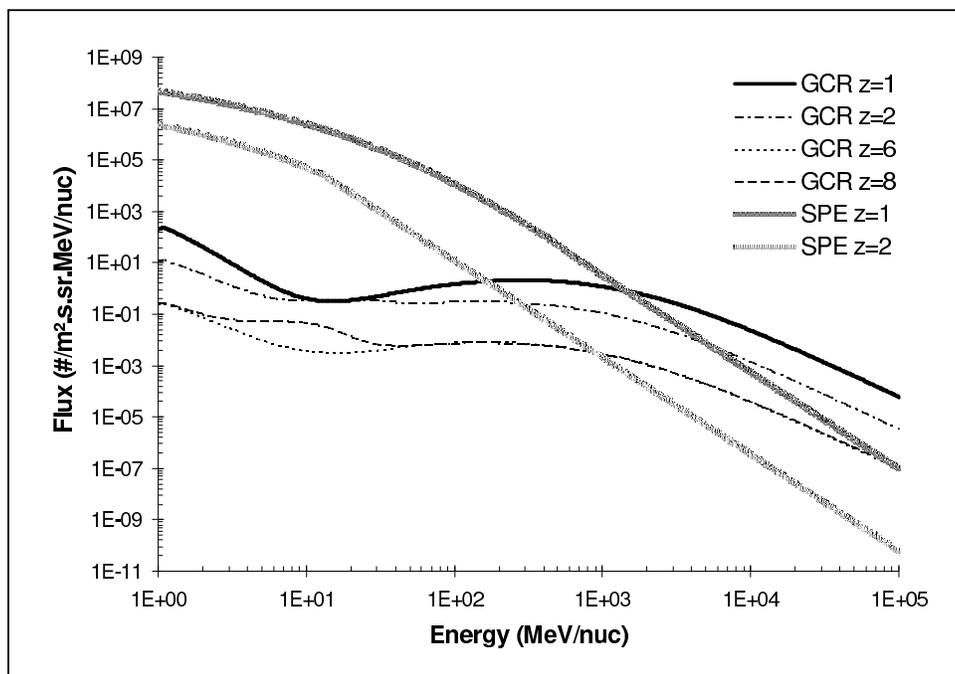


Fig. 3: Primary incident particles energy spectra extracted from CREME96 and used in this study

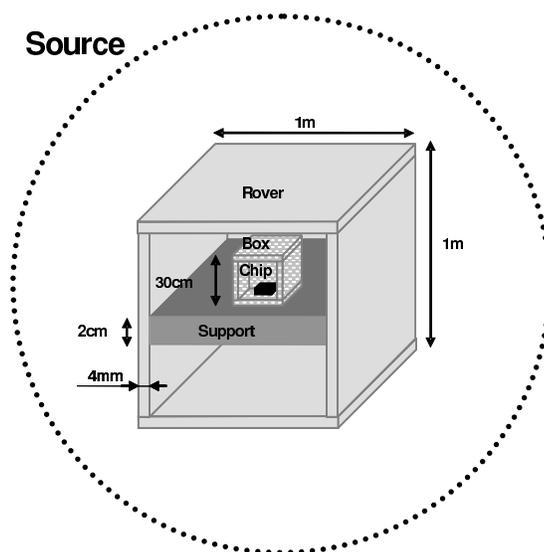


Fig. 4: Geometry implemented into GRAS simulations

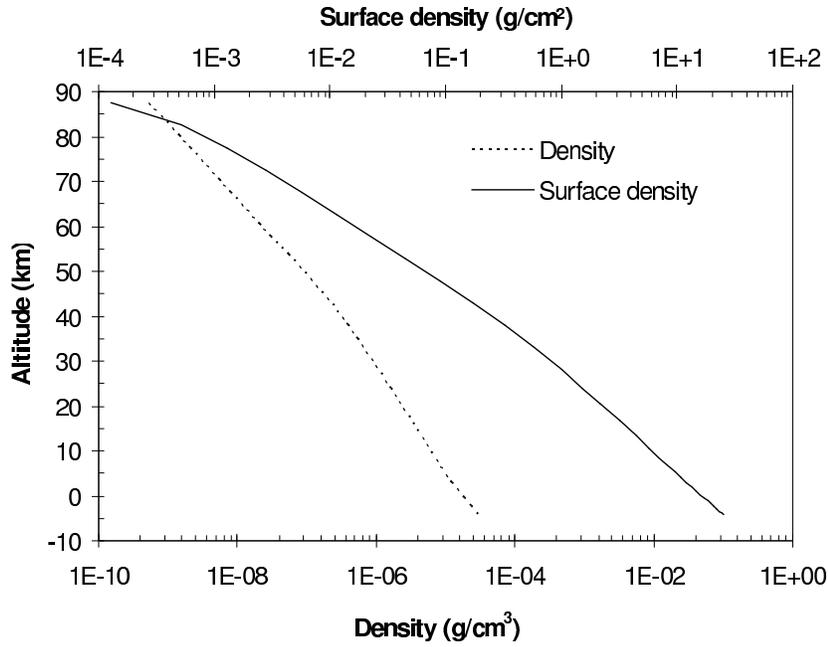


Fig. 5: Density and surface density of the daily averaged Martian atmosphere as function of altitude at 45°N, 180°E. Data are provided by Mars-GRAM.

(N.B.: the surface density corresponds to the column density integrated above the particular altitude considered)

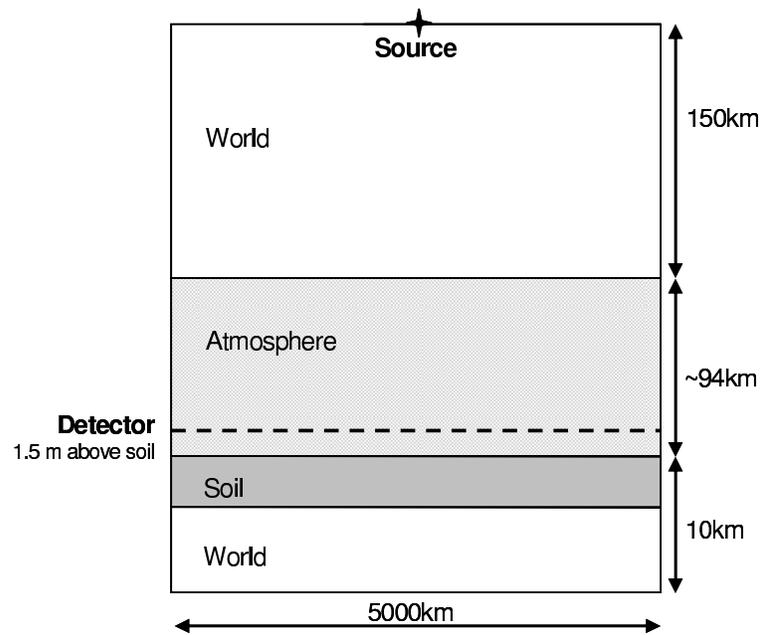


Fig. 6: Mars planet geometry implemented into PLANETOCOSMICS simulations

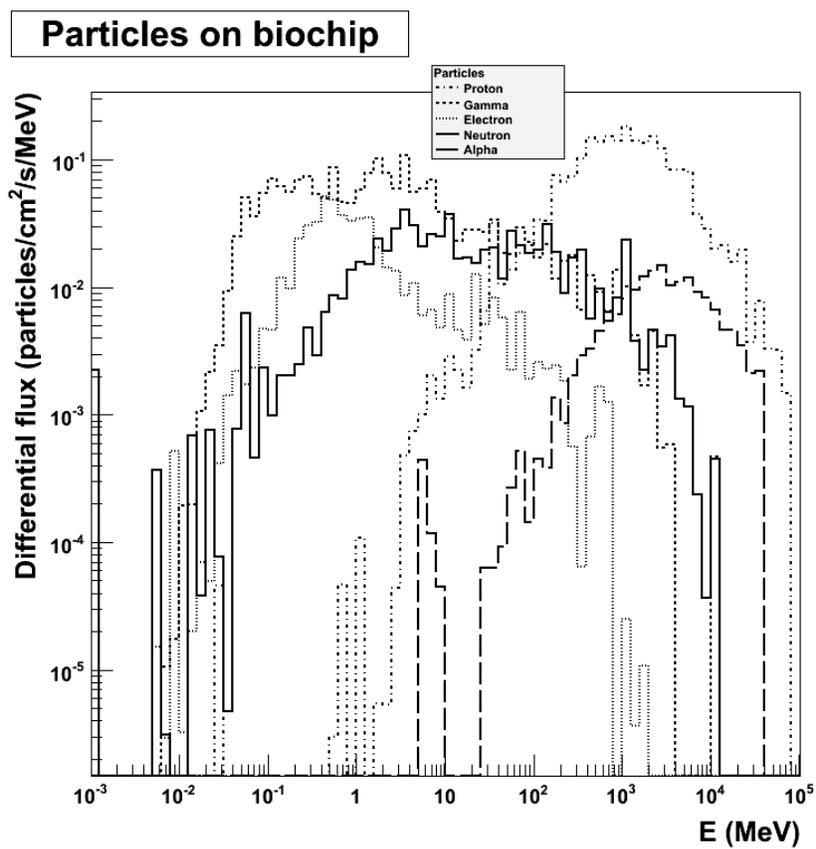


Fig. 7: Differential fluxes of protons, alphas, neutrons, gammas and electrons at biochip surface, during the transit, considering GCR contribution.

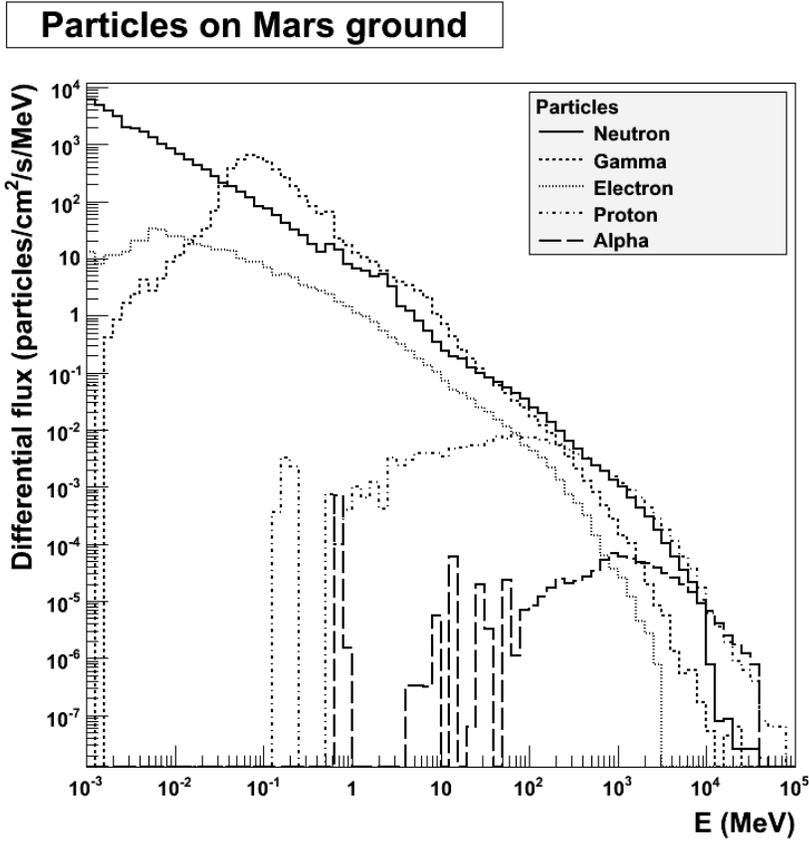


Fig. 8: Differential fluxes of protons, alphas, neutrons, gammas and electrons at 1.5 m above Mars soil, obtained with PLANETOCOSMICS simulations and considering only GCR contribution.

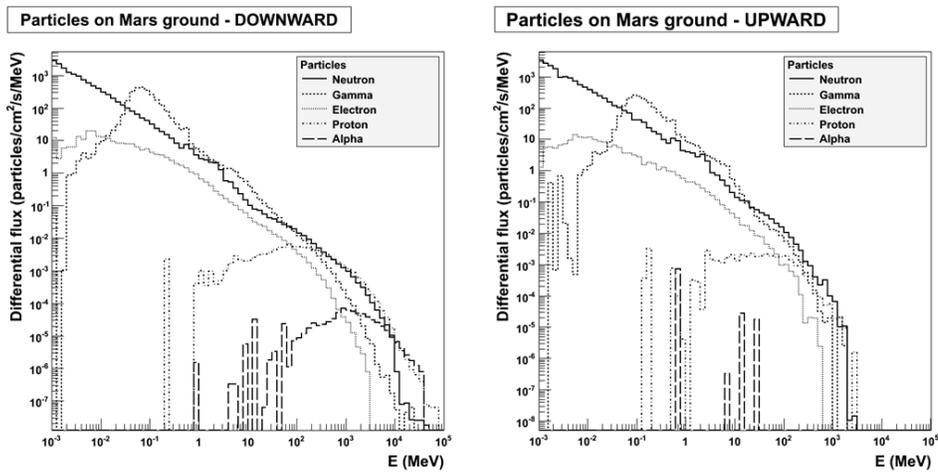


Fig. 9: Differential fluxes of upward (right) and downward (left) particles at Mars surface, obtained with PLANETOCOSMICS.

Annexe B

Investigation of Neutron Radiation Effects on Antibodies and Fluorescent Dyes Dedicated to Astrobiology Applications

Le Postollec A.^{1,2}, Coussot G.³, Baqué M.³, Incerti S.⁴, Desvignes I.³, Moretto P.⁴, Dobrijevic M.^{1,2}, Vandabeele-Trambouze O.³.

¹ Université de Bordeaux, Laboratoire d'Astrophysique de Bordeaux (LAB)

² CNRS/INSU, UMR 5804, 33271 Floirac, FRANCE

³ Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM), Université Montpellier II, Montpellier, FRANCE

⁴ Université de Bordeaux, CNRS, IN2P3, Centre d'Etudes Nucléaires de Bordeaux Gradignan (CENBG), UMR 5797, Gradignan, FRANCE

Corresponding author

Aurélien Le Postollec

Address: Laboratoire d'Astrophysique de Bordeaux, 2 rue de l'Observatoire, BP 89, 33271 Floirac Cedex, France

Phone.: +33-5-57-77-56-82

E-mail address: lepostollec@obs.u-bordeaux1.fr
or lepostol@cenbg.in2p3.fr

Abstract

Detecting life in the Solar System is one of the great challenges of new upcoming space missions. One way to detect organic matter on extra-terrestrial objects might be the use of biochips. A biochip is a miniaturized device composed of biological sensitive systems, such as antibodies, which are immobilized on a slide. In the case of *in situ* measurements, the main concern is to ensure the survival of the antibodies under space radiation.

A recent computing simulation of cosmic rays interactions with the Martian environment (Le Postollec *et al.*, 2008) shows that neutrons are one of the dominant species at soil level. Therefore, we have chosen, in a first approach, to study antibody resistance to neutrons performing irradiation experiments on a French beam facility (AIFIRA, in Bordeaux). Antibodies and fluorescent dyes, freeze-dried and in buffer solution, were irradiated with 0.6 MeV and 6 MeV neutrons. Samples analyses have demonstrated that antibody recognition capability and fluorescence dye intensity are not affected by the neutrons, in the conditions tested.

Keywords: irradiation, neutrons, antibodies, fluorescent dyes

1. Introduction

Astrobiology is at the heart of space agencies preoccupations. One of the great challenges of new upcoming space missions consists in detecting traces of organic matter in the Solar System. To achieve this purpose several techniques are under development. Some promising ones, such as biochips, plan to use antibodies as organic molecules detectors (*Steele et al., 2001; Bada et al., 2005; Sims et al., 2005; Parro et al., 2007; Le Postollec et al., 2007*). Because of their high affinity toward their targets, they appear very well adapted to detect biomarkers (Tang, 2007). In this case, the main concern is to ensure the resistance of such proteins under space constraints to achieve reliable *in situ* detections. As we are dealing with biological components, one of the main hazards easily identified is radiation. Interactions of cosmic rays with antibodies must be studied to demonstrate that they are suitable for planetary missions.

In this context, Thompson et al. (2006) exposed two fluorescent dyes to low-energy proton and alpha radiation with doses comparable or exceeding that expected during an unshielded cruise to Mars. They have shown that the dyes were not significantly affected. However, they suggest that more extensive radiation testing is needed before the suitability of these molecules for astrobiology missions can be fully confirmed. Fluorescent dyes resistance is directly linked with antibodies one as they constitute the way to perform the visual detection: antibodies are commonly labeled with those molecules to produce a signal when binding with their target molecule. Therefore, it seems judicious to couple antibodies and fluorescent dyes irradiation experiments.

However, choosing irradiation parameters that can be relevant to simulate a space mission is not a trivial problem. Most of irradiation facilities can only deliver one particle type beam. Therefore, the resistance is studied one particle at a time whereas in space molecules will be submitted to the whole cosmic spectrum at once. Another problem lies on the determination of particles fluxes that are supposed to irradiate the target during the mission. Computing simulations appear essential to settle experimental parameters. In the present work, we have chosen to study the resistance of antibodies during an exploration mission at Mars surface, as Mars is considered to be one of the most interesting bodies from an exobiological point of view (Clancy et al., 2001). We have used the results of simulations previously performed by Le Postollec et al. (2008) to define particles and energy ranges of interest.

In this paper, we present a first irradiation experiment which took place at the AIFIRA platform located at the Centre d'Etudes Nucléaires de Bordeaux-Gradignan in France. We studied antibodies and fluorescent dyes resistance to neutrons particles.

The following section presents materials and methods used to perform the irradiation experiment. Physical and chemical parameters are described. Section 3 discusses results obtained. The last section draws conclusions and brings out the perspectives to this study.

2. Materials and methods

2.1. Neutron irradiation

2.1.1. Simulated spectra at Mars surface

Several simulations with a Monte-Carlo toolkit were performed previously to this work. Secondary particles, created from the interaction of cosmic particles with Mars atmosphere and soil, were studied with a Geant4 (Agostinelli et al., 2003; Allison et al., 2006) based application, called Planetocosmics (Desorgher et al., 2005, Bütikofer et al., 2008, PLANETOCOSMICS

website), which was especially designed to facilitate simulations and analysis of cosmic particles interactions with planets.

Those simulations, described in Le Postollec *et al.* (2008), have revealed that neutrons constitute one of the dominant species of the radiation spectrum at Mars surface, in agreement with previous estimations (Gurtner *et al.* (2005), Keating *et al.* (2005), Wilson *et al.* (2004)). These neutrons are mainly created by the interactions of cosmic particles with the soil that backscatters them.

A cosmic spectrum constituted of protons, alphas particles, carbon ions and oxygen ions, interacting with a composition of Mars atmosphere given by Mars-Gram 2001 (Justus *et al.*, 2006) and a standard composition of soil extracted from Sojourner-Pathfinder measurements (Boyce, 2002), was simulated. The spectrum of neutrons, obtained at 1.5 m above the soil, is characterized by a peak around few MeV (cf. Figure 1, adapted from Figure 8 in Le Postollec *et al.*, 2008) that corresponds to a neutron “evaporation” phenomenon (Goldhagen *et al.*, 2004). Therefore, the range between 0.1 and 10 MeV appears as an interesting part of the spectrum to consider for irradiation experiments on dedicated facilities.

2.1.2. AIFIRA facility: the neutron beam line

The Centre d’Etudes Nucléaires de Bordeaux-Gradignan (CENBG) hosts the AIFIRA (Applications Interdisciplinaires des Faisceaux d’Ions en Région Aquitaine) ion beam platform (AIFIRA platform website). This facility is equipped with a 3.5 MV Singletron electrostatic ion accelerator, designed by the HVEE™ company, able to deliver high intensity beams of light ions (H^+ , D^+ , He^+) up to 50 μA , with a strong beam brightness ($>15 A/\text{rad}^2.m^2.eV$) and a high energy stability ($\Delta E/E \approx 10^{-5}$). Five beam lines are available, one of them being dedicated exclusively to the production of fast neutrons in the energy range 0.1 MeV – 10 MeV with high fluxes (10^5 to 10^6 n/cm²/s). The neutron production energy depends on the incoming charged particle (proton or deuteron), on the light target material (deuterium, tritium, 7Li) and on the emission angle. A deep cavity has been dug in the ground below the irradiation area in order to reduce neutron backscattering.

2.1.3. Radiation sources

Crossing data obtained from simulations with capabilities of the AIFIRA neutron beam line, we chose to perform neutron irradiations at two different energies separated by a decade: 0.6 MeV and 6 MeV.

As shown in Figure 2, two different methods are used to produce fluxes at these two energies. Neutrons of 0.6 MeV were produced with protons accelerated against a solid LiF target whereas neutrons of 6 MeV were obtained from deuterons crashing into a solid deuterium target.

2.1.4. Samples positioning

As neutrons are produced with azimuth symmetry around the beam axis, we calculated analytically and using a Monte Carlo method the optimum scattering angle maximizing the neutron flux. In the Monte Carlo simulation, individual neutrons were shot from the source with the Geant4 toolkit, using published differential cross section and production energy tables (Liskien and Paulsen, 1973; Liskien and Paulsen, 1975). Both analytical and Monte-Carlo methods produced results in good agreement. The samples were placed at 20° from the beam axis for the 6 MeV irradiation (Deuterium target) and at 40° for the 0.6 MeV irradiation (7Li target).

Due to technical constraints, the incident beam energy was finally set at 2.3 MeV for deuterons and protons, producing respectively neutrons of 5.36 MeV at a scattering angle of 20° from the target and neutrons of 0.49 MeV at 40°.

As the total number of neutrons received by the sample depends on the distance d from the source ($\sim 1/d^2$), we placed the sample slides so that the number of neutrons received by each sample was separated by an order of magnitude from the next one. Therefore, we used four samples receiving respectively N neutrons, $10 \times N$, $100 \times N$ and $1000 \times N$, N representing the total number of neutrons (i.e. the fluence) a sample would receive on Mars ground for a one month stay. Sample positioning from the source is shown in Figure 3.

2.1.5. Irradiation durations

Irradiation durations were defined from simulations results and from online neutron flux monitoring.

The 0.49 MeV sample irradiation was performed during about 11 h in order to deliver $5.3 \cdot 10^7$ neutrons which represents 102% of 1000 times the total number of neutrons the sample would receive during a one month stay on Mars. The 5.36 MeV irradiation lasted about 15 h, corresponding to 90% of 1000 times the total number of neutrons the sample would receive.

2.1.6. Material development

To solve specific problems and to perform a precise positioning of samples, a dedicated setup was designed by the mechanical team of the Laboratoire d'Astrophysique de Bordeaux (LAB).

As volumes of liquid involved were relatively low ($\sim 30 \mu\text{l}$ by well), the first issue was to minimize evaporation during the long time irradiation experiences. Neutrons interact strongly with plastics but are less modified by aluminum. Therefore, a special aluminum cap was developed, well adapted to the samples container geometry so that junction between both parts was finely adjusted. A rectangular shape frame was created with 1 mm thick 2017 A alloy (aluminum). For the top of the cap, a thin (0.01 mm) sheet of aluminum was stuck to the frame. The wells free from samples solution were filled with water to reduce again evaporation.

2.2. Chemical protocols for samples preparation and analysis

2.2.1. Chemicals

Fluorescein were purchased from Sigma Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France), monoclonal anti-rabbit antibodies labelled with fluorescein isothiocyanate (FITC) were obtained from Bio-Rad (France), NaHCO_3 , Na_2CO_3 , NaH_2PO_4 , NaCl , Tween® 20, sodium borohydride, glutaraldehyde, sodium acetate, NaOH , BSA, glycerol were purchased from Aldrich (France). Chemicals were analytical grade and were used as received.

Covalink™, Maxisorp™ well plates were obtained from VWR (France), High-Throughput microArraying™ (HTA™) plates were purchased from Greiner Bio-One (France)

Polyclonal rabbit anti-histamine antibodies were raised as described in Claeys-Bruno *et al.* (2006 a,b) and used in their native form. Direct fluorescence intensity (for Fluorescein dyes) and ELISA fluorescence (for antibodies) were measured on a Twinkle LB970™ (Berthold) ($\lambda_{\text{exc.}}=485 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=520 \text{ nm}$).

2.2.2. Samples selection and preparation

Neutron irradiations effects were evaluated on both antibodies and fluorescent dyes usually used for antibodies labelling (Fluorescein). In solution and freeze-dried samples were tested. These two samples physical forms might be used during a mission to Mars.

HTA™ plates were used as samples containers. A HTA™ plate consists of 4 individual sections with 24 wells each. The 24 shallow wells sections have a microscope slide size format usually used for the fabrication of biochips. These 24 wells sections will be denoted as "slides". For the irradiation experiment, samples were exposed to neutrons into such 24 wells slides which are well adapted to the volume and the concentration necessary to ELISA quantification or direct fluorescent measurement. Moreover, their geometry is close to biochips one giving the opportunity to perform a quite realistic experiment: interactions between neutrons and the slide correspond to those which will occur during a space mission. The low well rim of only 0.3 mm minimizes the quantity of the extra plastic matter and therefore lowers the creation of parasite interactions.

The use of Tween® 20 in buffered solutions leads to flat and better homogenised liquid deposits: it reduces risks of heterogenic irradiation due to various sample thicknesses (and therefore self-shielding).

2.2.3. Analysis protocol

a) Antibodies samples preparation and analysis

The antibodies concentration used for irradiation was optimised regarding volume of slides wells and ELISA analytical parameters (linearity domain, limit of detection and quantification, reproducibility (Vandenabeele-Trambouze *et al.*, 2005)).

Figure 4 presents protocols for both antibodies and fluorescein, in solution and freeze-dried.

Antibody solution was prepared from the commercial solution with phosphate-buffered saline (PBS) (10^{-2} M, adjusted to pH 7.35 with NaOH (1N)) containing 0.05% Tween® 20, to form a 1:25 dilution. 30 μ L of this solution were irradiated in 4 repetitions using 24 wells slides. After irradiation, samples were pipetted from the wells into micro centrifugal tubes (Eppendorf™), and wells were washed with 30 μ L of PBS. The washing solution was added into the Eppendorf™ tubes leading to a dilution by a factor 2. Each irradiated well was analyzed twice by ELISA method.

Freeze-drying procedure was performed on 30 μ L of diluted (1/25) antibodies (4 repetitions) by cooling down the slides in liquid nitrogen before using a Christ Alpha2-4 lyophilizator. Freeze-dried slides were stored at 4°C in dark and dry atmosphere before irradiation. After irradiation, 30 μ L of ultra pure water were added per wells to recover the freeze-dried samples. The solution was pipetted into Eppendorf™ tubes, each tube corresponding to one well. Each well was then washed using 30 μ L of carbonate buffer. The washing solution was added to the Eppendorf™ containing the corresponding sample leading to a dilution by a factor 2 (Figure 4).

All the Eppendorf™ tubes were then closed and stored at 4°C in the dark before analysis.

b) ELISA principle

Influence of irradiation, on both freeze-dried and in solution fluorescent labeled secondary antibodies, was evaluated using ELISA principle, as describe in Claeys-Bruno *et al.*, 2006 a,b. Briefly, Covalink™ plates were first covalently coated using histamine antigen. Then, wells were filled with 200 μL of 1/10000 polyclonal primary antibodies directed against histamine antigen. Wells were washed three times with PBS Tween® 20 buffer and then filled with 20 μL of irradiated goat anti-rabbit fluorescein labeled antibodies and 180 μL of PBS Tween® 20 buffer containing 1% Bovin Serum Albumin (BSA). After incubation for 1h45 at room temperature, wells were washed three times with PBS Tween® 20 and twice with carbonate buffer (pH 9, 10^{-1}M). Then, 300 μL of carbonate buffer were added per well and fluorescent measurement (signal S) was performed on a Twinkle LB970™.

For each sample, a blank was done in order to evaluate Signal to Noise ratio (S/N). Blank samples are composed of PBS buffer without primary polyclonal antibodies. As a blank experiment, measurement corresponds to the non specific interactions between the fluorescent labeled secondary monoclonal antibody and the material surface, which translates into background noise (N). Blank values were also used to estimate the limit of quantification (LOQ) of the ELISA tests. Only signals above the LOQ were taken into consideration for S/N ratio measurements.

c) Fluorescein dyes samples preparation and analysis.

Fluorescein dyes concentrations were chosen regarding to wells volume (30 μL), dilution factors used in the described protocol, and linearity range of fluorescence measurement. Fluorescein solution was prepared at 10^{-6} M in carbonate/bicarbonate buffer 10^{-1} M at pH 9, containing 0.05% of Tween® 20. Freeze-dried samples were prepared by cooling down the slides, containing 30 μL of sample per wells, in liquid nitrogen before freeze-drying.

After irradiation, the fluorescein dye samples were taken from slide wells, according to the same protocols as described for antibodies, using carbonate buffer as washing buffer (Figure 4). Fluorescence intensity of the signal (IRF_S) was measured in Maxisorp™ well plates with 10 μL of irradiated sample and 90 μL of carbonate buffer 10^{-1} M at pH 9 on a Twinkle LB970™. 100 μL of carbonate buffer were used to evaluate noise value (IRF_N). Results are presented as signal to noise ratio ($\text{IRF}_S / \text{IRF}_N$).

d) Reference samples

In order to evaluate neutron irradiation effects on both fluorescent secondary antibodies and fluorescein dyes, reference control samples were prepared. They were treated simultaneously and in the same way as the irradiated samples, except that they were not submitted to neutron irradiation.

Each experiment was done in 4 replicas.

3. Results/ Discussion

3.1. Irradiation impact on antibodies

The influence of neutron irradiation on both freeze-dried and PBS solution antibodies are presented in Figure 5 using S/N ratio measured with ELISA principle, as described in the previous section. Standard deviation (SD) and relative standard deviation (RSD) were estimated

on the 4 replicas of each sample. All RSD are under 20%: it is acceptable regarding the number of steps in the global protocol.

Antibodies, in solution or freeze-dried (Figure 5), irradiated with 0.6 MeV neutrons are significantly identical (student's test at 95% of confidence) to the reference, except for antibodies in solution which received 1000N neutrons. A second run of ELISA measurements, 5 days latter (results not shown), did not confirm the difference between the sample irradiated with 1000N 0.6 MeV neutrons and the reference for antibodies in solution (results significantly identical at 95% of confidence). These results present a S/N ratio lower than the first ELISA measurements: it indicates a partial antibodies degradation after 5 days at 4°C.

Freeze-dried antibodies (irradiated and reference) present a S/N ratio significantly lower than antibodies in solution (Figure 5, top). This result indicates that the freeze-drying procedure (as performed in this study) partially affects either antibody or fluorescent dye performances leading to signal losses. This effect of freeze-drying is also observed for samples irradiated at 6 MeV (Figure 5, bottom).

Antibodies irradiated with 6 MeV neutrons confirm that, for the fluences considered, neutrons irradiations did not affect significantly the antibody structure. For freeze-dried antibodies, the 1000N sample presents a S/N ratio lower than the reference. As previously stated, this result was not confirmed by the second ELISA measurements. Secondary antibody samples, prepared in PBS buffer and irradiated with 1000N neutrons, give a S/N ratio significantly higher than the reference one, in both ELISA analyses. This result could only be explained by a failure during sample preparation.

The results of antibodies irradiations on both freeze-dried and PBS solution (Figure 5) demonstrate that neutron irradiation do not affect neither antibodies recognition capabilities nor fluorescent dye moiety, even when samples receive a number of neutrons 1000 times greater than the one a biochip would receive during a one month stay at Mars surface.

3.2. Irradiation impact on fluorescent dyes

Fluorescein dyes, freeze-dried and in carbonate solution, were irradiated simultaneously to antibodies samples. After irradiation, the relative fluorescence intensity was measured directly. Most of the relative standard deviations (RSD) are lower than 10%: they are significantly lower than those obtained for antibodies after ELISA measurements. This result could be explained by the number of handling steps required to perform the ELISA measurements.

The results for the fluorescein dye irradiations are presented in Figure 6. Results for irradiations at 0.6 MeV are at the top of the figure. Whatever the number of neutrons (1-1000N) and the physical form of the sample (in solution or freeze-dried) used, fluorescence intensities are significantly identical (student's test at 95% of confidence) each to others and to the references, except for the 1000N freeze-dried sample. This sample gives a fluorescent S/N ratio significantly lower than the reference, but it is not confirmed by samples irradiated at 6 MeV (Figure 6, bottom) or in solution: it suggests that a problem occurred during sample preparation or during sample treatment. Indeed, fluorescein moiety could highly interfere by hydrophobic interactions or weak energy links with most of supports leading to difficulties to recover all the dyes during transfer or manipulations. Results obtained at 6 MeV seem to confirm this hypothesis since results are inhomogeneous. Indeed, the result for the freeze-dried sample irradiated with 100N neutrons is significantly lower than results obtained for all other samples

whereas N is significantly higher. For samples in carbonate solution, the irradiated samples are identical but the reference is significantly lower than samples. Nevertheless, our results do not demonstrate any irradiation effect (whatever the number and the energy of neutrons, and the physical form of the sample) on the fluorescein dye moiety. As no effect had been observed on antibodies labeled with fluorescein, we could have supposed that fluorescein was not affected by neutron irradiation. It is confirmed by the results obtained directly on irradiated dyes.

3.3. Remark on freeze-drying effects on samples

We observed that freeze-dried fluorescein samples leads to S/N ratio significantly lower than samples in carbonate solutions. The same results were obtained for antibodies samples. Since antibodies were irradiated in PBS Tween® 20 and fluorescein in carbonate Tween® 20 buffer, this difference between freeze-dried samples and samples in solution could be attributed to the freeze-drying procedure. Indeed, this preparation step could change the non specific adsorption of dyes or antibodies on the slide, or modify the three-dimensional structure of the antibodies. Further studies should be performed in order to define freeze-drying conditions that do not affect antibodies and fluorescent dyes.

4. Conclusion

Neutrons irradiations of both antibodies and fluorescein dyes were performed on samples under two physical forms (in buffer solution and freeze-dried), with two energies (0.6 and 6 MeV) and four neutrons fluences (N , $10N$, $100N$ $1000N$) corresponding to a number of neutrons up to 1000 times higher than the fluence N a biochip would received during one month on the Mars ground.

Our results did not show any evidence of a neutron irradiation effect neither on antibodies recognition capability nor on fluorescent dye intensity. It suggests that antibodies labeled with fluorescein dye will be not affected by 0.6 MeV and 6 MeV neutrons created by the interaction between cosmic rays and the Martian environment. However, a lot of other particles and energy ranges should be studied before raising any conclusion on the global resistance of antibodies and fluorescent dyes to a whole space mission. Further experiments are planned and results from a proton irradiation recently performed at the same facility are under analysis. Nevertheless, further studies to improve the freeze-drying procedure will be conducted before any new experimentation.

Acknowledgments

We would like to thank M. Aïche, G. Barreau, S. Czajkowski, G. Kessedjian, L. Mathieu, members of the "Aval du Cycle et Energie Nucléaire" research group at CENBG for their precious help during the neutron irradiation experiment, and the mechanical team of the LAB for their excellent work.

We also acknowledge the French space agency (CNES), the Région Aquitaine and the Institut de Physique Fondamentale de Bordeaux (IPF) for their financial support.

References

Agostinelli, S., Allison, J., Amako, K., Apostolakis, J., Araujo, H., Arce, P., Asai, M., Axen, D., Banerjee, S., Barrand, G., Behner, F., Bellagamba, L., Boudreau, J., Broglia, L., Brunengo, A., Burkhardt, H., Chauvie, S., Chuma, J., Chytracsek, R., Cooperman, G., Cosmo, G., Degtyarenko, P., Dell'Acqua, A., Depaola, G., Dietrich, D., Enami, R., Feliciello, A., Ferguson, C., Fesefeldt, H., Folger, G., Foppiano, F., Forti, A., Garelli, S., Giani, S., Giannitrapani, R., Gibin, D., Gomez Cadenas, J.J., Gonzalez, I., Gracia Abril, G., Greeniaus, G., Greiner, W., Grichine, V., Grossheim, A., Guatelli, S., Gumplinger, P., Hamatsu, R., Hashimoto, K., Hasui, H., Heikkinen, A., Howard, A., Ivanchenko, V., Johnson, A., Jones, F.W., Kallenbach, J., Kanay, N., Kawabata, M., Kawabata, Y., Kawaguti, M., Kelner, S., Kent, P., Kimura, A., Kodama, T., Kokoulin, R., Kossov, M., Kurashige, H., Lamanna, E., Lampen, T., Lara, V., Lefebvre, V., Lei, F., Liendl, M., Lockman, W., Longo, F., Magni, S., Maire, M., Medernach, E., Minamimoto, K., Mora de Freitas, P., Morita, Y., Murakami, K., Nagamatu, M., Nartallo, R., Nieminen, P., Nishimura, T., Ohtsubo, K., Okamura, M., O'Neale, S., Oohata, Y., Paech, K., Perl, J., Pfeiffer, A., Pia, M.G., Ranjard, F., Rybin, A., Sadilov, S., Di Salvo, E., Santin, G., Sasaki, T., Savvas, N., Sawada, Y., Scherer, S., Sei, S., Sirotenko, V., Smith, D., Starkov, N., Stoecker, H., Sulkimo, J., Takahata, M., Tanaka, S., Tcherniaev, E., Safai Tehrani, E., Tropeano, M., Truscott, P., Uno, H., Urban, L., Urban, P., Verderi, M., Walkden, A., Wander, W., Weber, H., Wellisch, J.P., Wenaus, T., Williams, D.C., Wright, D., Yamada, T., Yoshida, H., Zschesche, D., (2003) Geant4 – A simulation toolkit. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A* 506, 250-303.

AIFIRA website, http://www.cenbg.in2p3.fr/rubrique.php3?id_rubrique=65&lang=en

Allison, J., Amako, K., Apostolakis, J., Araujo, H., Arce Dubois, P., Asai, M., Barrand, G., Capra, R., Chauvie, S., Chytracsek, R., Cirrone, G.A.P., Cooperman, G., Cosmo, G., Cuttone, G., Daquino, G.G., Donszelmann, M., Dressel, M., Folger, G., Foppiano, F., Generowicz, J., Grichine, V., Guatelli, S., Gumplinger, P., Heikkinen, A., Hrivnacova, I., Howard, A., Incerti, S., Ivanchenko, V., Johnson, T., Jones, F., Koi, T., Kokoulin, R., Kossov, M., Kurashige, H., Lara, V., Larsson, S., Lei, F., Link, O., Longo, F., Maire, M., Mantero, A., Mascialino, B., McLaren, I., Mendez Lorenzo, P., Minamimoto, K., Murakami, K., Nieminen, P., Pandola, L., Parlati, S., Peralta, L., Perl, J., Pfeiffer, A., Pia, M.G., Ribon, A., Rodrigues, P., Russo, G., Sadilov, S., Santin, G., Sasaki, T., Smith, D., Starkov, N., Tanaka, S., Tcherniaev, E., Tome, B., Trindade, A., Truscott, P., Urban, L., Verderi, M., Walkden, A., Wellisch, J.P., Williams, D.C., Wright, D., Yoshida, H., (2006) Geant4 developments and applications. *IEEE Transactions on Nuclear Science* 53, No. 1, 270-278.

Bada, J.L., Sephton, M.A., Ehrenfreund, P., Mathies, R.A., Skelley, A.M., Grunthner, F.J., Zent, A.P., Quinn, R.C., Josset, J., Robert, F., Botta, O., Glavin, D.P., (2005) New strategies to detect life on Mars. *Astronomy & Geophysics* 46 (6), 26-27.

Boyce, J.M., (2002) The Smithsonian Book of Mars. *Smithsonian Institution Press, Washington, London*, pp. 77-83.

Bütikofer, R., Flückiger, E.O., Desorgher, L., Moser, M.R., (2008) The extreme solar cosmic ray influence on the radiation dose rate at aircraft altitude, *Science of the Total Environment*, 391, 177-183.

Claeys-Bruno, M. ; Vandenabeele-Trambouze, O. ; Sergent, M. ; Geffard, M. ; Bodet, D. ; Dobrijevic, M. ; Commeyras, A. ; Phan Tan Luu, R., (2006a) Methodological approaches for histamine quantification using derivatization by chloroethylnitrosourea and ELISA measurement. Part I: Optimisation of derivated histamine detection with coated-plates using optimal design. *Chemometrics and intelligent Laboratory Systems*, 80(2), 176-185.

Claeys-Bruno, M. ; Vandenabeele-Trambouze, O. ; Sergent, M. ; Geffard, M. ; Bodet, D. ; Dobrijevic, M. ; Commeyras, A. ; Phan Tan Luu, R., (2006b) Methodological approaches for histamine quantification using derivatization by chloroethylnitrosourea and ELISA measurement. Part II: Optimisation of the derivatization step. *Chemometrics and intelligent Laboratory Systems*, 80(2), 186-197.

Clancy, P., Schmitt, D., Angerer, O., (2001) ESA life sciences, exobiology and exploration. *Proc. First European Workshop on Exo-/Astro-Biology, Frascan, 21-23 May 2001*, ESA SP-496

Desorgher, L., Flückiger, E. O., Gurtner, M., Moser, M. R., Bütikofer, R., (2005) ATMOCOSMICS: A Geant4 code for computing the interaction of cosmic rays with the Earth's atmosphere. *International Journal of Modern Physics A* 20(29), 6802-6804, (419)

Vandenabeele-Trambouze, O., Claeys-Bruno, M., Dobrijevic, M., Rodier, C., Borruat, G., Commeyras, A., Garrelly, L. (2005) Comparison of methods for measurement of organic compounds at ultra-trace level: analytical criteria and application to analysis of amino acids in extraterrestrial samples. *Astrobiology*. Vol. 5, Issue 1, 48-65.

Goldhagen, P., Clem, J.M., Wilson, J.W. (2004) The energy spectrum of cosmic-ray induced neutrons measured on an airplane over a wide range of altitude and latitude. *Radiation Protection Dosimetry* 110, Nos 1-4, pp. 387-392.

Gurtner, M., Desorgher, L., Flückiger, E.O., Moser, M.R., (2005) Simulation of the interaction of space radiation with the Martian atmosphere and surface. *Advances in Space Research* 36, 2176-2181.

Justus, C.G., Duvall, A., Keller, V.W. (2006) Validation of Mars Global Reference Atmospheric Model (Mars-GRAM 2001) and planned features. *Advances in Space Research* 38, 2633-2638.

Keating, A., Mohammadzadeh, A., Nieminen, P., Maia, D., Coutinho, S., Evans, H., Pimenta, M., Huot, J.-P., Daly, E. (2005) A Model for Radiation Environment Characterization, *IEEE Transaction on Nuclear Science* 52, No. 6, 2287-2293

Le Postollec, A., Dobrijevic, M., Incerti, S., Moretto, Desorgher, L., Santin, G., Nieminen, P., Dartnell, L., Vandenabeele-Trambouze, O., Coussot, G., (2007) Development of a biochip dedicated to planetary exploration. First step: resistance studies to space conditions. *SF2A Proceedings*. Grenoble, 02-06 September 2007.

Le Postollec, A., Incerti, S., Dobrijevic, M., Desorgher, L., Santin, G., Moretto, Ph., Vandenabeele-Trambouze, O., Coussot, G., Dartnell, L., Nieminen, P., (2008) Monte-Carlo simulation of the radiation environment encountered by a biochip during a space mission to Mars. *Astrobiology*, accepted.

Liskien, H., Paulsen, A., (1973) $D(d,n)^3\text{He}$. *Nuclear Data Tables*, Vol. 11, No. 7.

Liskien, H., Paulsen, A., (1975) Neutron production cross sections and energies for the reactions ${}^7\text{Li}(p,n){}^7\text{Be}$ and ${}^7\text{Li}(p,n){}^7\text{Be}^*$. *Atomic Data and Nuclear Data Tables*, Vol. 15, No. 1.

Parro, V., Rivas, L.A., Gómez-Elvira, J., (2007) Protein Microarrays-Based Strategies for Life Detection in Astrobiology. *Space Sci Rev.*, DOI 10.1007/s11214-007-9276-1.

PLANETOCOSMICS website <http://cosray.unibe.ch/~laurent/planetocosmics/>

Sims, M.R., Cullen, D.C., Bannister, N.P., Grant, W.D., Henry, O., Jones, R., McKnight, D., Thompson, D.P., Wilson, P.K., (2005) The specific molecular identification of life experiment (SMILE). *Planetary and Space Science* 53, 781-91.

Steele, A., McKay, D., Allen, C., Thomas-Keprta, K., Warmflash, D., Pincus, S., Schweitzer, M., Priscu, J., Sears, J., Hedgecock, J., Avci, R., Fogel, M., (2001) Mars Immunoassay Life Detection Instrument for Astrobiology (MILDI). *Lunar and Planetary Science* 32, 1684.

Tang, B.L. (2007) A case for immunological approaches in detection and investigation of alien life. *International Journal of Astrobiology* 6 (1), 11-17.

Thompson, D.P., Wilson, P.K., Sims, M.R., Cullen, D.C., Holt, J.M.C., Parker, D.J., Smith, M.D. (2006) Preliminary Investigation of Proton and Helium Ion Radiation Effects on Fluorescent Dyes for Use in Astrobiology Applications. *Anal. Chem.*, 78 (8), 2738-2743.

Wilson, J.W., Cloudsley, M.S., Cucinotta, F.A., Tripathi, R.K., Nealy, J.E., De Angelis, G. (2004) Deep space environments for human exploration. *Advances in Space Research*, 34, Issue 6, 1281-1287.

FIGURES

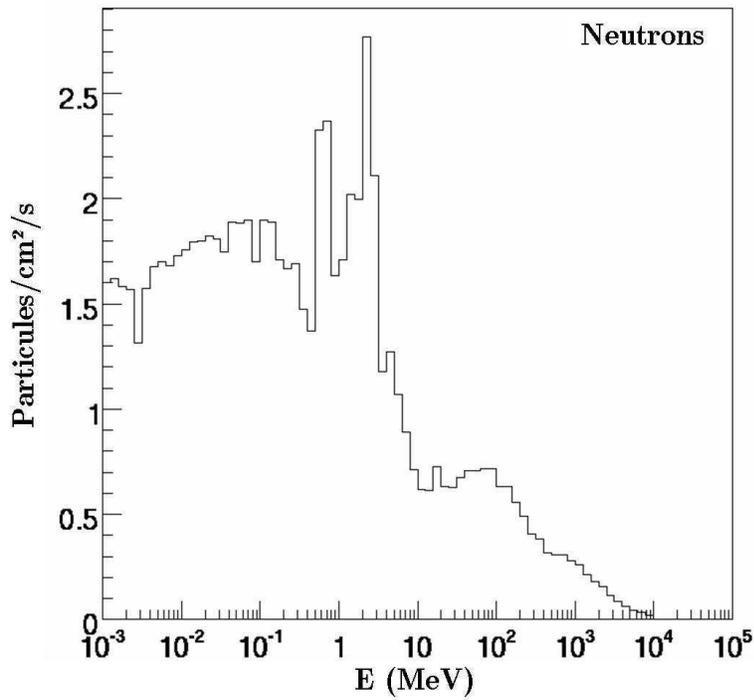


Figure 1: Simulated spectrum of neutron fluxes, as a function of energy, at Mars surface. This figure is an adaptation of Figure 8 in Le Postollec *et al.* (2008).

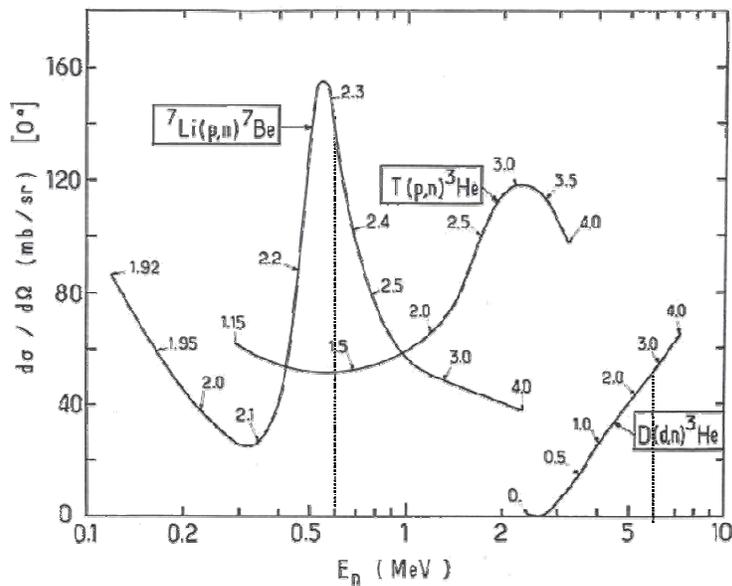


Figure 2: Diagram showing reactions that must be performed to produce 0.6 MeV and 6 MeV neutrons (dashed lines).

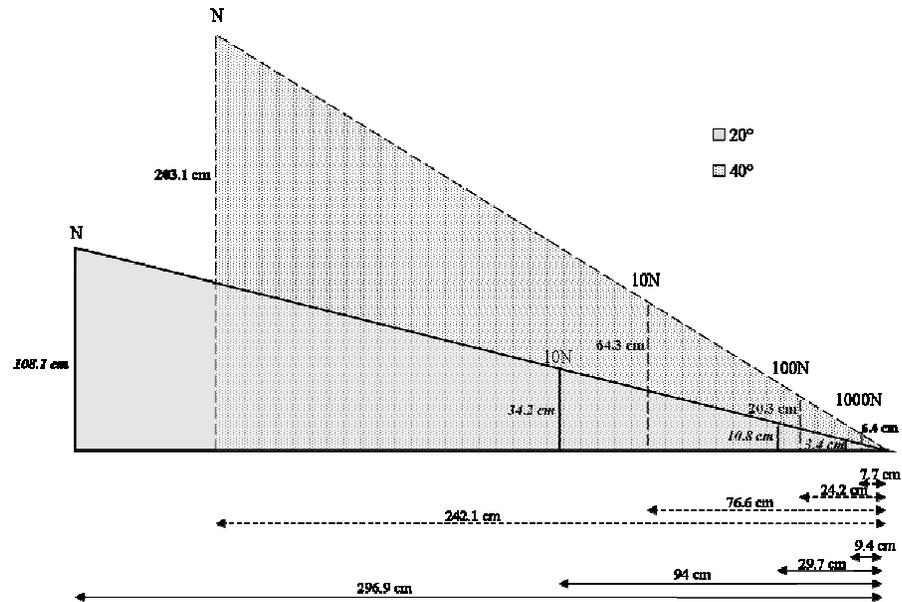
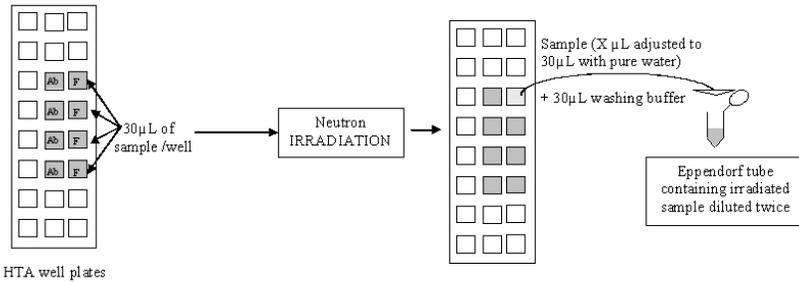


Figure 3: Samples positioning for both 0.6 MeV (inclination angle = 40°) and 6 MeV (inclination angle = 20°) irradiations. Horizontal and vertical distances from the neutrons source are given.

Case 1: antibodies or fluorescein irradiated in buffered solution



Case 2: antibodies or fluorescein irradiated under lyophilized form

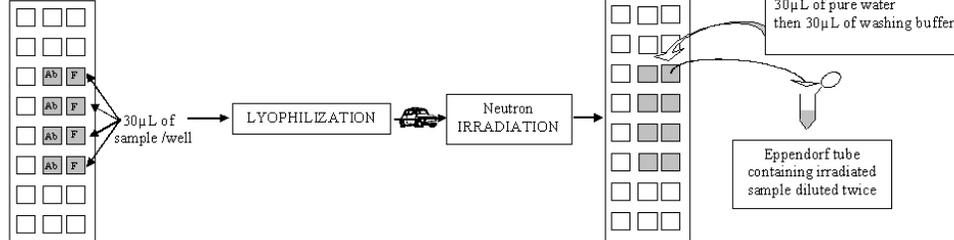


Figure 4: Protocols for both antibodies and fluorescein in solution (case 1) and freeze-dried (case 2). Ab=antibodies, F=fluorescein, Washing buffers: PBS 10^{-2} M pH 7.35 with 10% Tween® 20 (antibodies); carbonate buffer 10^{-1} M pH9 with 10% Tween® 20 (fluorescein).

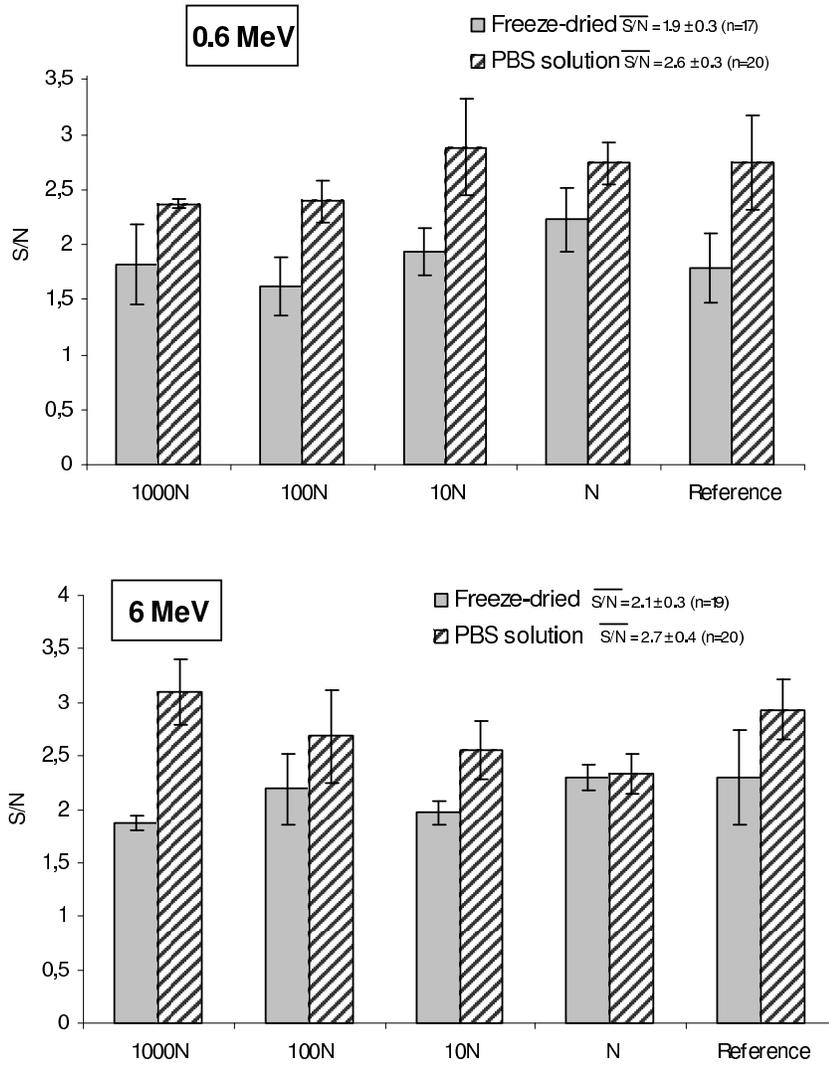


Figure 5: Influence of irradiation on antibodies in PBS buffer and freeze-dried.

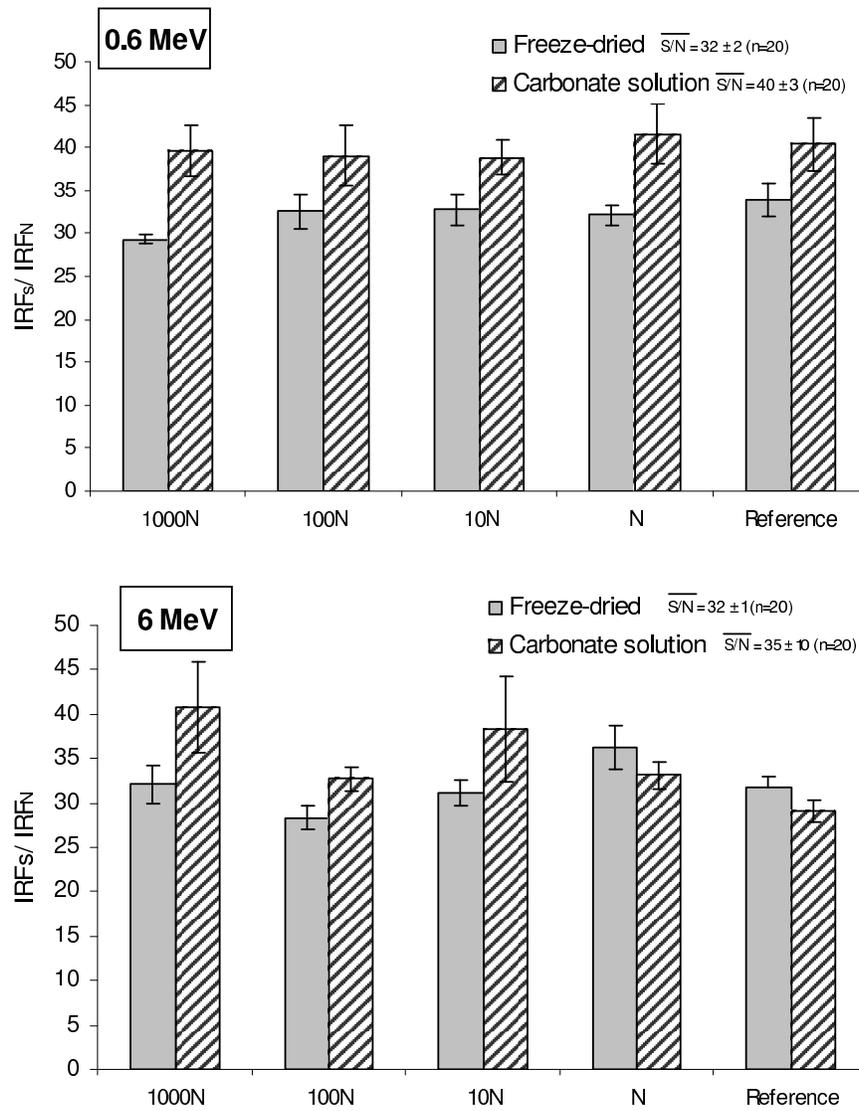


Figure 6: Influence of irradiations on fluorescein dyes in carbonate buffer solution and freeze-dried.

Annexe C

Publications, communications et formations

A. Publications à comité de lecture

Le Postollec, A., Incerti, S., Dobrijevic, M., Desorgher, L., Santin, G., Moretto, Ph., Vandenaabeele-Trambouze, O., Coussot, G., Dartnell, L., Nieminen, P., (2008)
Monte-Carlo simulation of the radiation environment encountered by a biochip during a space mission to Mars.
Accepté à *Astrobiology*.

Le Postollec, A., Coussot, G., Baqué, M., Incerti, S., Desvignes, I., Moretto, P., Dobrijevic, M., Vandenaabeele Trambouze, O.
Investigation of neutron radiation effects on antibodies and fluorescent dyes dedicated to astrobiology applications.
Soumis à *Astrobiology*.

B. Publications sans comité de lecture – Actes de colloques

Le Postollec, A., Dobrijevic, M., Incerti, S., Moretto, Desorgher, L., Santin, G., Nieminen, P., Dartnell, L., Vandenaabeele-Trambouze, O., Coussot, G., (2007)
Development of a biochip dedicated to planetary exploration. First step: resistance studies to space conditions.
Semaine de l'Astrophysique Française, SF2A, Grenoble, France, 2-6 Juillet 2007.

C. Communications présentées à des colloques

- **European Geosciences Union General Assembly 2008**, 13-18/04/2008, Vienne. *Poster*
First assessment of radiation effects on a biochip in the case of a mission to Mars
A. Le Postollec, M. Dobrijevic, S. Incerti, P. Moretto, M. Baqué, O. Vandenaabeele-Trambouze, G. Coussot, I. Desvignes
- **5th Geant4 Space Users' Workshop**, 13-15/02/2008, Tokyo. *Présentation orale* (30 min)
Mars environment simulations for traces of life detection
A. Le Postollec, M. Dobrijevic, S. Incerti, P. Moretto, L. Desorgher, G. Santin, O. Vandenaabeele-trambouze, G. Coussot, P. Nieminen, L. Dartnell
- **Fourth European Space Weather Week**, 05-09/11/2007, Bruxelles. *Poster*
Modeling the radiation environment of a mission to Mars
A. Le Postollec, M. Dobrijevic, S. Incerti, L. Desorgher, G. Santin, P. Moretto, P. Nieminen, L. Dartnell, O. Vandenaabeele-trambouze, G. Coussot, H. Seznec
- **IEEE Nuclear Science Symposium 2007**, 27/10 - 03/11/2007, Honolulu. *Présentation orale* (15 min)
Simulation of the Radiation Environment Encountered by a Biochip During a Mars Mission
A. Le Postollec, M. Dobrijevic, S. Incerti, P. Moretto, H. Seznec, L. Desorgher, G. Santin, P. Nieminen, L. Dartnell, O. Vandenaabeele-trambouze, G. Coussot

- **European Planetary Science Congress 2007**, 20 - 24/08/2007, Potsdam. *Poster*
Monte-Carlo simulation of a biochip irradiation during a Mars mission
A. Le Postollec, M. Dobrijevic, S. Incerti, P. Moretto, H. Seznec, L. Desorgher, G. Santin,
P. Nieminen, L. Dartnell, O. Vandenabeele-trambouze, G. Coussot
- **Journées SF2A 2007**, 02 - 06/07/2007, Grenoble. *Présentation orale* (15min)
Biochip resistance to planetary exploration
Le Postollec, A., Dobrijevic, M., Incerti, S., Moretto, Desorgher, L., Santin, G., Nieminen,
P., Dartnell, L., Vandenabeele-Trambouze, O., Coussot, G.
- **IEEE Nuclear Science Symposium 2006**, 29/10 - 04/11/2006, San Diego. *Poster*
Monte-Carlo Simulation of a biochip irradiation with the GEANT4 toolkit
A. Le Postollec, M. Dobrijevic, S. Incerti, Ph. Moretto, H. Seznec
- **4th Geant4 Space Users' Workshop**, 06 - 10/11/2006, Pasadena.
- **10th International Symposium on Materials in a Space Environment and 8th International Conference on Protection of Materials and Structures in a Space Environment**, 19 - 23/06/2006, Collioure.

D. Brevet

Coussot G., Vandenabeele-Trambouze O., Desvignes I., Dobrijevic M., Le Postollec A., Chazalnoel P.
Dépôt de demande de brevet en mars 2008.

E. Formations

- **Summer school : "Astrobiology: life detection in and from space"**, 17-26/07/2007, Alpbach (Autriche)
- **Cours IPPW5** (5th International Planetary Probe Workshop), 23-24/06/2007, Bordeaux
- **École Geant4**, 4-8/06/2007, Paris
- **Journées Exobiologie**, 27-28/04/2006, Bordeaux