



Ingénierie moléculaire de surfaces bi-fonctionnelles pour des applications de biodétection sans marquage basée sur la diffraction

Amandine Egea

► To cite this version:

Amandine Egea. Ingénierie moléculaire de surfaces bi-fonctionnelles pour des applications de biodétection sans marquage basée sur la diffraction. Micro et nanotechnologies/Microélectronique. INSA de Toulouse, 2012. Français. NNT: . tel-00764906

HAL Id: tel-00764906

<https://theses.hal.science/tel-00764906>

Submitted on 13 Dec 2012

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.



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse (INSA Toulouse)

Discipline ou spécialité :

Nanophysique

Présentée et soutenue par :

Amandine EGEA

le : mercredi 24 octobre 2012

Titre :

Ingénierie moléculaire de surfaces bi-fonctionnelles pour des applications de
biodétection sans marquage basée sur la diffraction

JURY

Mme. Magali REMAUD SIMEON, Président

M. Jean-François MASSON, Examineur

M. Christophe VIEU, Examineur

M. Vincent PAVEAU, Examineur

M. Philippe CROGUENOC, Invité

Ecole doctorale :

Sciences de la Matière (SDM)

Unité de recherche :

Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes (LAAS-CNRS)

Directeur(s) de Thèse :

M. Christophe VIEU

M. Vincent PAVEAU

Rapporteurs :

Mme. Anne-Marie HAGHIRI GOSNET

Mme. Françoise VINET

"Life is a series of experiences, each one of which makes us bigger, even though sometimes it is hard to realize this. For the world was built to develop character, and we must learn that the setbacks and grieves which we endure help us in our marching onward."

Henry Ford (1863 – 1947)

"Notre vie est définie par des opportunités."

A mes parents et à mon frère,

Remerciements

Je tiens en premier lieu, à remercier mes directeurs de thèse Christophe Vieu et Vincent Paveau pour leur confiance et pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser cette belle expérience. Je tiens ensuite à remercier Stéphane Lebrun et Laurence Bouet, qui m'ont permis d'évoluer dans de très bonnes conditions au sein d'Innopsys.

Je remercie le LAAS-CNRS et tout particulièrement le directeur Jean Arlat, pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire et donné cette belle structure de travail. Je remercie au même titre l'ITAV (Institut des Technologies Avancées en sciences du Vivant) et son directeur Bernard Ducommun, pour ces conditions de travail optimales.

Je souhaite ensuite remercier tous les collaborateurs avec qui j'ai interagi. Je remercie le service TEAM de la plateforme technologique du LAAS-CNRS et particulièrement Laurent Mazeng, Véronique Conédéra et Franck Carcenac, pour les développements que nous avons effectués, ainsi que leur aide en salle blanche. Merci aussi à Anne-Françoise Mingotaud (IMRCP), qui a souvent répondu à mes questions sur les polymères ! Merci à Mélinda Métivier et Philippe Croguennoc (Nanolane) pour leur accueil et leur sympathie. Merci enfin à Magali Remaud (INSA) pour son aide et sa disponibilité. Merci à Brigitte Cyrille et Camille Cazeneuve, pour leur efficacité administrative.

Je ne peux maintenant que remercier mes collègues, qui avec le temps, les discussions, les fous rires, les larmes parfois, sont devenues de vrais amis. Un doctorat est une formidable expérience professionnelle mais une expérience humaine avant tout. Je vous remercie à tous du fond du cœur.

Childérick, tant au niveau de tes conseils avisés pour le boulot et le futur, que pour nos discussions personnelles. Bon, tu auras toujours ton goût vestimentaire bien à toi mais ne t'en fais pas, tes phrases résonnent dans ma tête, et la pierre se taille petit à petit... Merci pour tout. Je te souhaite le meilleur.

Emmanuelle, que dire sur un tel bout de femme. Merci Manue pour ton sourire, ta bienveillance et ton authenticité. Merci pour ton aide, tes conseils et corrections si pertinentes ... je citerais le fameux « euh Amandine, tu diras à biiiiiip que la biotine n'est pas une protéine, quand même enfin ! » Sois heureuse ma Manue. Merci d'être une si bonne personne.

Christel, un grand merci à la mère Martin pour tes conseils et l'écoute que tu m'as donnée. Merci d'avoir pris soin de moi depuis le début ... et tes cours de cuisine : « Amandine, arrête le Mac Do, mange des légumes ». Merci pour ta sincérité et ton franc parlé, tu as toujours su m'accompagner et me guider dans cette expérience de la vie. Je te souhaite beaucoup de bonheur.

Julie F, le duo gagnant comme dirait JMF, trop de chose sont à dire et pourraient faire l'objet d'un sujet de thèse à part entière ! Entre les slasch, doch cafèch et les footings à l'ITAV. Merci pour tout. Je n'oublierai jamais nos virées au mac do à 17h pour tenir jusqu'au soir, ni les multiples séances de réflexion sur les Sciences, sur la vie, sur les manip, sur les relations. Bonne continuation ma Ju.

Anna, ou le duo des blondes, mais pas gagnant ! Petite extra terrestre dans le monde des vivants, que le vent te porte où tu le souhaites !

Jérôme, même si tu n'es plus dans le groupe, je sais que tu gardes un œil bienveillant sur moi et mon travail. La petite padawan a grandi maintenant et « so what, j'ai une thèse dude » Je te souhaite beaucoup de réussite dans ton projet professionnel. Je sais qu'on restera en contact. Merci pour tout.

Enfin, merci à Jean Marie François pour son soutien, à Liviu pour sa bienveillance, à Cécile pour toutes nos pauses et nos moments de détente. Merci à Etienne, Angélique, Aline, Christophe T. Pour finir, merci à mes collègues d'Innopsys, qui m'ont toujours accueillie et aidée. Merci à Barbara, Cyril, Mohamed, Vincent R, Bernard et Ludo.

Mes plus sincères remerciements se dirigent ensuite vers mes amis, compagnons de toujours, qui m'ont permis de tenir le coup tout au long de ses trois ans. Chacun à leur manière, bien évidemment ☺.

Merci à ma BFFE Julie L., pour son oreille attentive et ses phrases de réconfort, à toute heure du jour et de la nuit, weekends et vacances inclus. Merci pour ces séances de danse enflammées et tous ces fous rires, ces larmes, ces « bon, je dors chez toi ce soir ». Je n'aurais pas pu tenir sans toi ma Juju. Merci d'être qui tu es, je te souhaite le meilleur du meilleur de la crème.

Merci ensuite à Valérie, ex-coloc et amie d'enfance. Acolyte de thèse et acolyte de vie, liées par les événements qui nous sont toujours tombés dessus en même temps. Notre année de coloc me restera à jamais dans ma mémoire. Merci pour ces virées nocturnes dans Toulouse et ces moments de craquage total. Reste toi-même et je sais que la réussite de ta thèse est proche.

Je remercie ensuite toutes les personnes, qui par leur écoute, leur bonne humeur ou tout simplement leur présence m'ont redonné le sourire. Merci à honney bunny Matthieu, pour nos virées à Roland Garros de 9h à 21h non-stop, ainsi que pour nos rocks de compétition. Sois heureux Matthieu. Merci ensuite à Thomas, mec on n'a pas la même vie mais tu es resté le même. Merci d'être toi. Merci à Timber, pour ses craquages volants. Merci au Mény, Yoann et Amandine. Merci à Raul, Luis et Fer.

Je voudrais ensuite remercier Carlos, qui m'a supporté au quotidien, autant dans les phases de doute que dans les crises d'euphorie/hystérie. Cette thèse, c'est la tienne aussi. Merci d'avoir tenu le coup, malgré tous mes passages difficiles, et particulièrement pendant ma rédaction. Merci d'être là et d'être toi Oggy Ogg ☺.

Enfin, un merci plein d'émotion à ma famille qui m'a aidée, portée et supportée dans cette longue aventure de doctorat. Du plus profond de mon cœur, Papa, Maman, Quentin, merci d'être toujours là pour moi. Je vous dédie cette thèse (parce qu'on est bien d'accord, il n'y aura pas d'autre diplôme après ça !).

AUTEUR : Amandine Egea

TITRE : Ingénierie moléculaire de surfaces bi-fonctionnelles pour des applications de biodétection sans marquage basée sur la diffraction

DATE ET LIEU DE SOUTENANCE : 24/10/21012, salle des conférences, LAAS CNRS

RESUME en français

Le domaine du diagnostic moléculaire connaît un essor impressionnant depuis plusieurs dizaines d'années. Différents outils d'analyse d'interactions moléculaires sont présents sur le marché. La plupart d'entre eux sont basés sur des tests immunologiques utilisant la fluorescence comme technique de lecture. Or, l'utilisation de techniques de détection avec marquage comme la fluorescence augmente le coût d'une analyse et peut dénaturer un échantillon. Dans cette perspective, une technique de lecture optique sans marquage, qui est une alternative à la fluorescence, a été développée. Le principe de lecture est basé sur le suivi des modifications du spectre de diffraction de réseaux périodiques, composés de molécules sondes, lors d'interactions avec différentes solutions à analyser. Cette thèse CIFRE est le fruit d'une collaboration entre le LAAS CNRS et la société Innopsys, spécialisée dans la commercialisation d'outils de lecture optique. Elle porte sur le développement d'une plateforme dédiée à l'analyse biomoléculaire (ADN, protéines) au travers de l'utilisation de biopuces multiplexées et d'un instrument de lecture optique sans marquage automatisée. Nous montrons que cette technologie de biodétection sans marquage nécessite le développement d'une chimie de surface permettant l'organisation de molécules sondes en réseaux de lignes périodiques, tout en minimisant l'adsorption non-spécifique entre les lignes. Nous présentons l'optimisation d'un procédé de bi-fonctionnalisation de surface, qui met en jeu un dépôt multiplexé par microcontact printing sur des couches de polymères passivantes. Ces surfaces structurées à l'échelle moléculaire ont permis la détection d'interactions protéines/protéines sans marquage et le concept semble également transférable pour la détection d'hybridation de courtes séquences d'ADN.

MOTS CLES : biopuce, détection, diagnostic, protéine, passivation, chimie de surface

TITLE: Surface engineering for label free biodetection based on diffraction

SUMMARY

Development of bioassays has become the matter of intense research in the field of molecular diagnostic. Biodetection techniques have been drastically used in laboratory since the past 20 years and tend now to reach the *in-vitro* diagnostic industry. Most commercially available biosensing methods rely on immunoassays and use fluorescence as reading technique. However, the use of labeling methods such as fluorescence increases the cost of a single bioassay and may interfere with the biological functions of molecules. In this perspective, we have developed an optical label-free technique of microarray reading, which is an alternative to fluorescence. In this work, we use a label free biosensing method based on the diffraction of light by molecular gratings. Molecular gratings are employed as diffractive probe arrays for protein interaction analysis, as the diffraction efficiency changes in response to analyte binding. This Ph.D is supported by the French company Innopsys, which provides optical solutions for microarray reading and the Nanobiosystems group at the LAAS-CNRS. This work deals with the development of a detection platform for biomolecular interactions analysis, through the use of multiplexed biochips and the validation of an optical scanner. We present a special surface chemistry, based on blocking layers to reduce the non-specific protein adsorption and consequently decrease the limit of detection. Thanks to bi-functionalized biochips and this label free instrument, we have detected proteins interactions involving low molecular weight molecules.

KEYWORDS: biochip, detection, diagnostic, protein, passivation, surface chemistry

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : Nanophysique

INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R. OU DU LABORATOIRE : LAAS CNRS, 7 avenue du colonel Roche, 31077 Toulouse Cedex 4

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 : DIAGNOSTIC MOLECULAIRE : DE LA FABRICATION DE BIOPUCES AUX ANALYSES <i>IN-VITRO</i>	3
I/ DEROULEMENT D'UNE ANALYSE DE BIODETECTION	4
1. PROCESSUS DE BIODETECTION	4
a. <i>Fabrication d'un substrat moléculaire</i>	6
b. <i>Analyse biologique</i>	7
c. <i>Lecture de l'échantillon</i>	7
2. DOMAINES D'APPLICATIONS	8
II/ DEVELOPPEMENT DES BIOPUCES	10
1. TECHNIQUES DE FABRICATION	10
a. <i>Photolithographie</i>	10
b. <i>Jet d'encre</i>	11
c. <i>Dépôt par aiguilles</i>	12
d. <i>Lithographie douce</i>	13
2. LES DIFFERENTES PUCES	17
a. <i>Puces à ADN</i>	17
b. <i>Puces à protéines</i>	18
c. <i>Puces à peptides</i>	19
d. <i>Puces à sucre</i>	20
e. <i>Puces à cellules</i>	20
3. PROBLEMATIQUE	21
III/ DEVELOPPEMENT DES BIOCAPTEURS	22
1. TECHNIQUES DE BIODETECTION AVEC MARQUAGE COMMERCIALISEES	22
a. <i>Tests immunologiques</i>	22
b. <i>Lab-on-chip</i>	23
2. TECHNIQUES DE BIODETECTION SANS MARQUAGE COMMERCIALISEES	24
a. <i>Biodétection mécanique : la micro balance à quartz (QCM)</i>	24
b. <i>Biodétection optique</i>	25
i. SPR	25
ii. Interférométrie	27
iii. Interférométrie sur des surfaces nano poreuses	28
iv. Diffraction d'un réseau moléculaire	29
3. PROBLEMATIQUE	29
IV/ CAHIER DES CHARGES D'UNE PLATEFORME DE BIODETECTION : DEFINITION DU CADRE DE LA THESE	31
REFERENCES	33

CHAPITRE 2 : NANO FABRICATION DE RESEAUX MOLECULAIRES	35
I/ REALISATION DE MOULES EN SILICIUM	36
1. OBJECTIFS	36
2. PROCEDE DE LITHOGRAPHIE	37
II/ TECHNIQUES DE LITHOGRAPHIE	38
1. LITHOGRAPHIE OPTIQUE PAR CONTACT OU EN PROXIMITE	38
2. LITHOGRAPHIE OPTIQUE EN PROJECTION	39
3. LITHOGRAPHIE ELECTRONIQUE	41
4. COMPARAISON	41
III/ FABRICATION DE MATRICES DE RESEAUX PERIODIQUES PAR LITHOGRAPHIE OPTIQUE PAR PROJECTION	43
1. PROCEDE MIS EN PLACE	43
2. STRUCTURES OBTENUES : CARACTERISATION DU MOULE	44
3. STRUCTURES OBTENUES : CARACTERISATION D'UN TIMBRE	46
IV/ DUPLICATION DES MOULES	48
V/ AUTOMATISATION DES DEPOTS PAR μCP	50
1. L'APPAREIL DE DEPOT PAR μ CP SEMI-AUTOMATISE	50
2. VARIABILITE ENTRE MOTIFS D'UNE MEME IMPRESSION	51
3. VARIABILITE ENTRE PLUSIEURS IMPRESSIONS	54
4. ETUDE COMPARATIVE AVEC UN ROBOT A AIGUILLES	55
VI/ MULTIPLEXAGE DES DEPOTS	56
1. DOUBLE DEPOT DE MOLECULES EN UNE SEULE IMPRESSION	56
2. UN TIMBRE EN PDMS PERMETTANT LE MULTIPLEXAGE : LE MACROTIMBRE	58
VI/ CONCLUSIONS	60
REFERENCES	60

CHAPITRE 3 : REALISATION DE MOTIFS BIOMOLECULAIRES MINIMISANT L'ADSORPTION NON-SPECIFIQUE.. 61

I/ LIMITATION DE L'ADSORPTION NON-SPECIFIQUE SUR UN SUBSTRAT	62
1. ENJEUX	62
2. ETAT DE L'ART SUR LA REALISATION DE BIOPUCES A PROTEINES MINIMISANT L'ADSORPTION NON SPECIFIQUE	63
a. Blocage de surface	63
b. Utilisation de polymères	63
c. Immobilisation de molécules sur des couches de polymères	68
d. Traitement du timbre en PDMS pour l'impression moléculaire	68
II/ BI-FONCTIONNALISATION DE SURFACES	70
1. BLOCAGE DE SURFACE A L'ETHANOLAMINE	70
2. PASSIVATION DE SURFACE BASEE SUR DES POLYMERES	75
a. Le PLL-g-PEG	75
i. Impression moléculaire de motifs micrométriques de PLL-g-PEG	75
ii. Etude des interactions non-spécifiques par fluorescence	77

b. <i>Le PLL-g-Dextran</i>	79
i. Impression moléculaire de motifs micrométriques de PLL-g-dextran.....	79
ii. Etude des interactions non-spécifiques par fluorescence et AFM	80
iii. Propriétés anti-adhésives du PLL-g-dextran étudiées par QCM	81
iv. Influence de l'énergie de surface du timbre en PDMS.....	83
3. IMPRESSION DE MOLECULES SONDES SUR UNE COUCHE PASSIVANTE	84
a. <i>Impression moléculaire sur des couches passivantes de PEO</i>	85
i. Dépôt et maintien des molécules sondes sur une couche de passivant	85
ii. Hypothèse formulée	86
b. <i>Impression de molécules sondes sur des couches passivantes de PLL-g-dextran</i>	86
i. Fabrication d'une surface bi-fonctionnelle basée sur une couche de PLL-g-dextran	87
ii. Etude du comportement de la surface bi-fonctionnelle dans le cas d'une interaction non-spécifique	88
iii. Etude du comportement de la surface bi-fonctionnelle dans le cas d'une interaction spécifique	90
4. COMPARAISON DES TECHNIQUES MISES EN PLACE LORS D'UN PROTOCOLE COMPLET DE BIODETECTION.....	92
III/ BI-FONCTIONNALISATION DE SUBSTRATS TRIDIMENSIONNELS	95
1. OBJECTIF	95
2. OBJET D'ETUDE : UN RESEAU PERIODIQUE DE LIGNES NANOMETRIQUES	95
3. ETUDE AFM	96
a. <i>Fonctionnalisation du réseau avec les molécules sondes</i>	96
b. <i>Passivation du réseau</i>	97
4. CARACTERISATION DES RESEAUX PERIODIQUES	98
a. <i>Etude de rugosité de surface</i>	98
b. <i>Etude de l'intensité de diffraction</i>	99
IV/ CONCLUSIONS	102
REFERENCES	104
 CHAPITRE 4 : ETUDE DE LA FONCTIONNALITE DE BIOMOLECULES DEPOSEES PAR IMPRESSION : LE CAS DES ENZYMES.....	107
I/ STRUCTURATION DES ECHANTILLONS.....	108
1. REACTION ENZYMATIQUE BASEE SUR LA DEXTRAN- SACCHARASE	108
2. MICROCONTACT PRINTING DE PLL-G-DEXTRAN AVEC UN TIMBRE PLAT	109
3. MICROCONTACT PRINTING DE MOTIFS DE DEXTRAN- SACCHARASE SUR LA COUCHE DE PLL-G-DEXTRAN.....	109
4. OBJECTIF DE L'ETUDE	109
II/ TECHNIQUES DE CARACTERISATION	111
1. AFM.....	111
2. SEEC.....	114
III/ RESULTATS.....	115
1. MICROCONTACT PRINTING DE MOTIFS DE DEXTRAN- SACCHARASE SUR LA COUCHE DE PLL-G-DEXTRAN	115
2. SUIVI DE LA REACTION ENZYMATIQUE PAR AFM	115
3. SUIVI DE LA REACTION ENZYMATIQUE PAR MICROSCOPIE SEEC.....	116
4. CONCLUSION.....	116
REFERENCES	118

CHAPITRE 5 : BIODETECTION OPTIQUE SANS MARQUAGE BASEE SUR LA DIFFRACTION	119
I/ LE PHENOMENE DE DIFFRACTION ET SON UTILISATION EN BIODETECTION	120
1. INTRODUCTION.....	120
a. Diffraction par une fente	121
b. Diffraction à travers N fentes	123
2. DEVELOPPEMENT DE TECHNIQUES DE DETECTION BASEES SUR LA DIFFRACTION	125
a. Principe d'utilisation	125
b. Mise en place du système de détection.....	126
c. Application à la biodétection.....	127
i. Principe	127
ii. Détection multiple	128
iii. Interaction idéale - Interaction réelle	128
3. ETAT DE L'ART SUR L'UTILISATION DE LA DIFFRACTION.....	131
a. Biodétection.....	131
b. pHmètre.....	134
c. Multicouches lipidiques	134
d. Capteurs de gaz	135
4. CONTEXTE ET ENJEUX.....	137
II/ OUTILS DE LECTURE DEVELOPPES POUR CAPTER UNE INTENSITE DE DIFFRACTION	138
1. PREUVE DE CONCEPT EN LABORATOIRE	138
a. Présentation du banc de mesure	138
b. Applications	139
2. TRANSFERT INDUSTRIEL DU CONCEPT VERS UN SCANNER AUTOMATISE	141
a. Chaîne de développement	141
b. Cahier des charges.....	142
c. Choix techniques.....	143
i. Description générale	143
ii. Système optique	144
iii. Degrés de liberté.....	146
iv. Traitement du signal	149
v. Influence du diamètre du faisceau laser	154
vi. Reproductibilité.....	156
vii. Récapitulatif	162
d. Applications	162
III/ VALIDATIONS EXPERIMENTALES.....	163
1. ETUDE DES PARAMETRES INFLUANT SUR L'INTENSITE DIFFRACTEE	163
a. Influence de la concentration de la solution d'encrage	163
b. Influence des lavages.....	165
c. Influence de la chimie de surface.....	167
2. BIODETECTION D'INTERACTIONS PROTEINES/PROTEINES.....	171
3. BIODETECTION D'INTERACTIONS ADN/ADN.....	174
a. Concept de fabrication.....	174
b. Fabrication de biopuce diffractante	176
c. Détection d'une hybridation simulée.....	177
d. Détection d'une hybridation réelle	180

IV/ REFLEXION SUR LA BIODETECTION PAR DIFFRACTION.....	183
1. AMELIORATION DU TRAITEMENT DES IMAGES	183
2. FABRICATION DES RESEAUX	183
3. AMELIORATION DES CONDITIONS D'INTERACTION	184
4. INFLUENCE DE LA CHIMIE DE SURFACE ET DE LA PASSIVATION.....	184
5. CONCLUSIONS	185
REFERENCES	186
 <u>CONCLUSION</u>.....	187
 <u>ANNEXE 1</u> : PROCEDE DE NETTOYAGE D'UN TIMBRE EN PDMS	188
<u>ANNEXE 2</u> : ETUDE PAR QCM DE L'ADSORPTION D'ANTICORPS ANTI-GST SUR UNE COUCHE DE PLL-G-DEXTRAN DEPOSEE PAR μCP	190
<u>ANNEXE 3</u> : FIXATION DE PROTEINES SUR LA RESINE SU8	193

Introduction

Le monde dans lequel nous vivons est en perpétuelle évolution. Complexe mélange entre héritage du passé et codes du présent, notre société a un mode de fonctionnement propre où les schémas d'évolution antérieurs ne peuvent être appliqués. L'homme est passé du besoin à l'envie et de la nécessité au confort. Le domaine de la santé ne déroge pas à ce constat. L'espérance de vie a augmenté de plus de 10 ans ces 50 dernières années, témoignant de conditions de vie toujours en amélioration. Bien que le système médical bénéficie de nouvelles technologies au fur et à mesure de l'évolution des Sciences, il doit faire face à un domaine de la santé qui connaît de perpétuels changements, à l'image de notre société. L'apparition de nouveaux agents infectieux jusqu'alors inconnus il y a moins d'un demi siècle comme le VIH, ainsi que la recrudescence de certaines manifestations pathologiques comme les allergies, liées à notre mode de vie (pollution ...), témoignent de cette constante évolution. Le corps médical doit s'adapter continuellement à ces changements pour fournir aux patients les meilleurs services possibles.

Découvrir, répertorier, comprendre et combattre les pathologies sont des objectifs omniprésents. La biodétection entre en jeu dans ce contexte. Elle consiste à détecter la présence de biomarqueurs caractéristiques de pathologies dans une solution d'analyse, généralement à des concentrations très faibles et de quantifier ces entités biologiques en un temps moindre. La biodétection est utilisée à différents stades du processus médical, soit en prévention afin d'avancer un diagnostic à un patient, soit en termes de suivi de soin, pour analyser l'efficacité d'un traitement par exemple. Collecter un maximum d'informations biologiques sur un agent infectieux et connaître par exemple ses mécanismes de reconnaissance et d'action permet de mieux le combattre. Ainsi, les techniques de biodétection employées doivent donc être les plus sensibles et les plus précises possibles. Au-delà de cet objectif, d'autres critères de développement sont pris en considération, comme la durée d'une analyse ou même la complexité d'un procédé de biodétection, puisqu'en termes de diagnostic, les tests doivent être effectués dans les plus courts délais et à un coût moindre.

Dans cette perspective, de nombreuses techniques de détection d'interactions biologiques ont vu le jour ces dernières décades. Aujourd'hui, ces techniques d'analyses se sont très largement démocratisées et de véritables plateformes de détection, du substrat d'analyse à l'instrument de lecture, sont fournies. Plusieurs acteurs prennent part à cette démocratisation. Parmi eux, les sociétés de biotechnologies jouent un rôle capital. Elles se positionnent comme un véritable relais de croissance pour les grands groupes pharmaceutiques et les laboratoires de recherche publics et privés. Elles permettent le développement de techniques de biodétection mises au point en laboratoire. Le challenge à relever consiste à concevoir des systèmes dont la complexité restera invisible pour les utilisateurs et qui pourront être intégrés à la chaîne de travail des laboratoires.

Ce travail de thèse s'ancre dans ce contexte de transfert industriel. Il est le fruit d'une collaboration entre le groupe Nanobiosystèmes du LAAS-CNRS, qui a développé une technique de biodétection sans marquage basée sur la diffraction de réseaux périodiques, et la société INNOPSYS qui souhaite transférer ce concept afin d'obtenir un outil de lecture automatisée, pour des applications de

biodétection. Cette thèse est donc située à l'interface de la recherche et du développement dont les objectifs sont :

- une phase de recherche, qui requiert l'amélioration de la fabrication des substrats d'analyse. Il s'agit ici de développer des techniques de fabrication de masse, autant au niveau des technologies de micro et nanofabrication que des techniques d'immobilisation de molécules sur une surface. Dans cette optique, un grand nombre d'échantillons tests doivent pouvoir être réalisés à un coût réduit. Cette phase traite aussi de l'architecture moléculaire d'un échantillon, qui nous le verrons, ne peut être composé simplement d'un seul type de molécules. Cette étape développe donc le concept de « l'intelligence » moléculaire d'un substrat et notamment sur la bi-fonctionnalisation d'une surface.
- la phase de développement, qui consiste à transférer le concept de biodétection par diffraction d'un banc de mesure en un prototype de lecture automatisée. Il s'agit de tester l'outil de lecture et réaliser des tests de biodétection grâce aux échantillons bi-fonctionnels développés dans la phase recherche.

Au cours de ce manuscrit, nous analyserons dans un premier temps le contexte de ce projet afin de définir les problématiques de ce domaine. Le chapitre I permettra de mettre en lumière les critères de développement d'une plateforme de biodétection. Nous aborderons les caractéristiques essentielles que doit posséder une biopuce ainsi qu'un biocapteur en accord avec le marché de la biodétection optique.

Dans le chapitre II, nous expliciterons les techniques de micro et nano fabrication mises en place pour répondre aux besoins technologiques de fabrication de biopuces. Nous aborderons notamment la structuration d'un échantillon biologique par des techniques de dépôts en lithographie douce. Ces substrats sont utilisés comme base d'analyse pour la technique de biodétection choisie portant sur la diffraction de réseaux moléculaires.

Dans les chapitres III et IV, nous détaillerons les développements effectués pour obtenir des biopuces bi-fonctionnelles. Il s'agit ici de structurer des substrats moléculaires grâce à des molécules sondes tout en minimisant les interactions non spécifiques.

Le chapitre V portera sur la technique de biodétection sans marquage préalablement développée au sein du LAAS. La fabrication de prototypes de lecture sera détaillée et nous présenterons les tests de détection d'interactions biologiques réalisés, concernant des biopuces à protéines et des biopuces à ADN.

CHAPITRE 1 :	3
DIAGNOSTIC MOLECULAIRE : DE LA FABRICATION DE BIOPUCES AUX ANALYSES <i>IN-VITRO</i>	3
I/ DEROULEMENT D'UNE ANALYSE DE BIODETECTION	4
1. PROCESSUS DE BIODETECTION	4
a. <i>Fabrication d'un substrat moléculaire</i>	6
b. <i>Analyse biologique</i>	7
c. <i>Lecture de l'échantillon</i>	7
2. DOMAINES D'APPLICATIONS	8
II/ DEVELOPPEMENT DES BIOPUCES	10
1. TECHNIQUES DE FABRICATION	10
a. <i>Photolithographie</i>	10
b. <i>Jet d'encre</i>	11
c. <i>Dépôt par aiguilles</i>	12
d. <i>Lithographie douce</i>	13
2. LES DIFFERENTES PUCES	17
a. <i>Puces à ADN</i>	17
b. <i>Puces à protéines</i>	18
c. <i>Puces à peptides</i>	19
d. <i>Puces à sucre</i>	20
e. <i>Puces à cellules</i>	20
3. PROBLEMATIQUE	21
III/ DEVELOPPEMENT DES BIOCAPTEURS	22
1. TECHNIQUES DE BIODETECTION AVEC MARQUAGE COMMERCIALISEES	22
a. <i>Tests immunologiques</i>	22
b. <i>Lab-on-chip</i>	23
2. TECHNIQUES DE BIODETECTION SANS MARQUAGE COMMERCIALISEES	24
a. <i>Biodétection mécanique : la micro balance à quartz (QCM)</i>	24
b. <i>Biodétection optique</i>	25
i. SPR	25
ii. Interférométrie	27
iii. Interférométrie sur des surfaces nano poreuses	28
iv. Diffraction d'un réseau moléculaire	29
3. PROBLEMATIQUE	29
IV/ CAHIER DES CHARGES D'UNE PLATEFORME DE BIODETECTION : DEFINITION DU CADRE DE LA THESE	31
REFERENCES	33

CHAPITRE 1 :

Diagnostic moléculaire : de la fabrication de biopuces aux analyses *in-vitro*

Le domaine du diagnostic moléculaire connaît un essor impressionnant depuis plusieurs dizaines d'années. Les termes de biopuces et biocapteurs sont largement employés dans ce secteur mais la différenciation de ces deux notions est faible. Dans ce manuscrit, nous considérerons que les biocapteurs sont les instruments technologiques développés pour mener des analyses de diagnostic moléculaire. Ils sont basés sur des principes physiques de détection différents (optique, mécanique, électrique ...) mais obéissent à des critères communs. Nous verrons dans ce chapitre comment le marché du diagnostic impose ces critères et concepts de développement. A l'heure actuelle, deux grandes catégories de biocapteurs s'opposent : les techniques de biodétection avec marquage et celles sans. Nous détaillerons plus particulièrement les techniques de détection sans marquage puisque cette thèse porte sur le transfert industriel d'une technique de biodétection optique basée sur la diffraction de la lumière par des réseaux périodiques. Le stade de développement des biocapteurs est variable : certains sont en voie de recherche et développement et d'autres sont déjà commercialisés en dispositifs. Nous tiendrons compte de ce point dans ce chapitre en traitant principalement de techniques déjà commercialisées.

Conjointement aux biocapteurs, les biopuces prennent part au processus de biodétection. Dans ce manuscrit, nous considérerons que les biopuces sont les substrats moléculaires sur lesquels sont basées ces analyses. Ces échantillons sont fonctionnalisés avec des molécules variées, c'est-à-dire qu'on immobilise à leur surface des entités biochimiques bien choisies par des techniques de dépôt. Ils servent ensuite de substrat de base pour des tests de biodétection ou plus généralement d'analyse. Actuellement, il existe de nombreuses techniques d'immobilisation de molécules sur une surface, et de la même manière que pour les biocapteurs, les objectifs à atteindre sont identiques pour chaque technique de dépôt développée. Nous verrons dans ce chapitre quels sont ces objectifs pour fabriquer des substrats les plus adaptés possibles aux techniques de biodétection utilisées.

Afin de comprendre comment s'articulent biocapteur et biopuce dans une analyse, nous détaillerons dans un premier temps le déroulement d'un processus de biodétection. Nous aborderons par la suite la question de la fabrication des biopuces puis, la technique de biodétection sans marquage que nous développons et qui est basée sur la diffraction de réseaux périodiques. Nous détaillerons les tendances du marché et donc les techniques concurrentes commercialisées. Cette étude nous permettra de définir un cahier des charges et ainsi de préciser les objectifs de cette thèse.

I/ Déroulement d'une analyse de biodétection

1. Processus de biodétection

L'idée générale est d'utiliser l'affinité moléculaire entre deux biomolécules : les molécules cibles, que l'on souhaite détecter et les molécules sondes. Cette affinité particulière entre ces molécules est spécifique et les molécules interagissent entre elles de manière non covalente lorsqu'elles sont mises en présence pour former des complexes cibles/sondes (*Figure 1*). Cette affinité moléculaire peut être traduite par un paramètre thermodynamique défini à partir de la constante d'équilibre association/dissociation de la réaction.

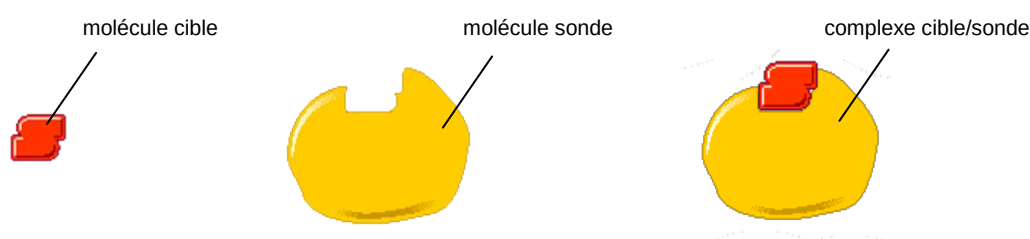


Figure 1 : Illustration du principe d'affinité moléculaire entre une molécule sonde et une molécule cible. Lorsque ces deux molécules interagissent entre elles, elles forment un complexe cible/sonde, que l'on souhaite détecter.

Lors d'une analyse moléculaire, on cherche à détecter l'interaction entre les molécules sondes, immobilisées à la surface du biocapteur ou de la biopuce, et les molécules cibles ou biomarqueurs présents dans un prélèvement ou une solution. La technique de détection choisie permet ensuite de traduire cette interaction en un signal ou une information interprétable pour l'utilisateur.

Un processus de biodétection englobe donc trois étapes :

- immobilisation de molécules sondes sur une surface
- interaction avec les molécules cibles en solution
- détection et traduction de l'information biologique en signal physique quantitatif

Lorsque ces étapes sont réunies autour d'un même outillage, on parle alors de plateforme d'analyse de biodétection.

La *Figure 2* décrit schématiquement chaque étape de ce processus, que nous allons détailler dans les trois prochains paragraphes. Nous aborderons avec plus d'attention les critères de sélection de chaque étape ainsi que les limitations de chaque phase qui peuvent impacter un processus de biodétection.

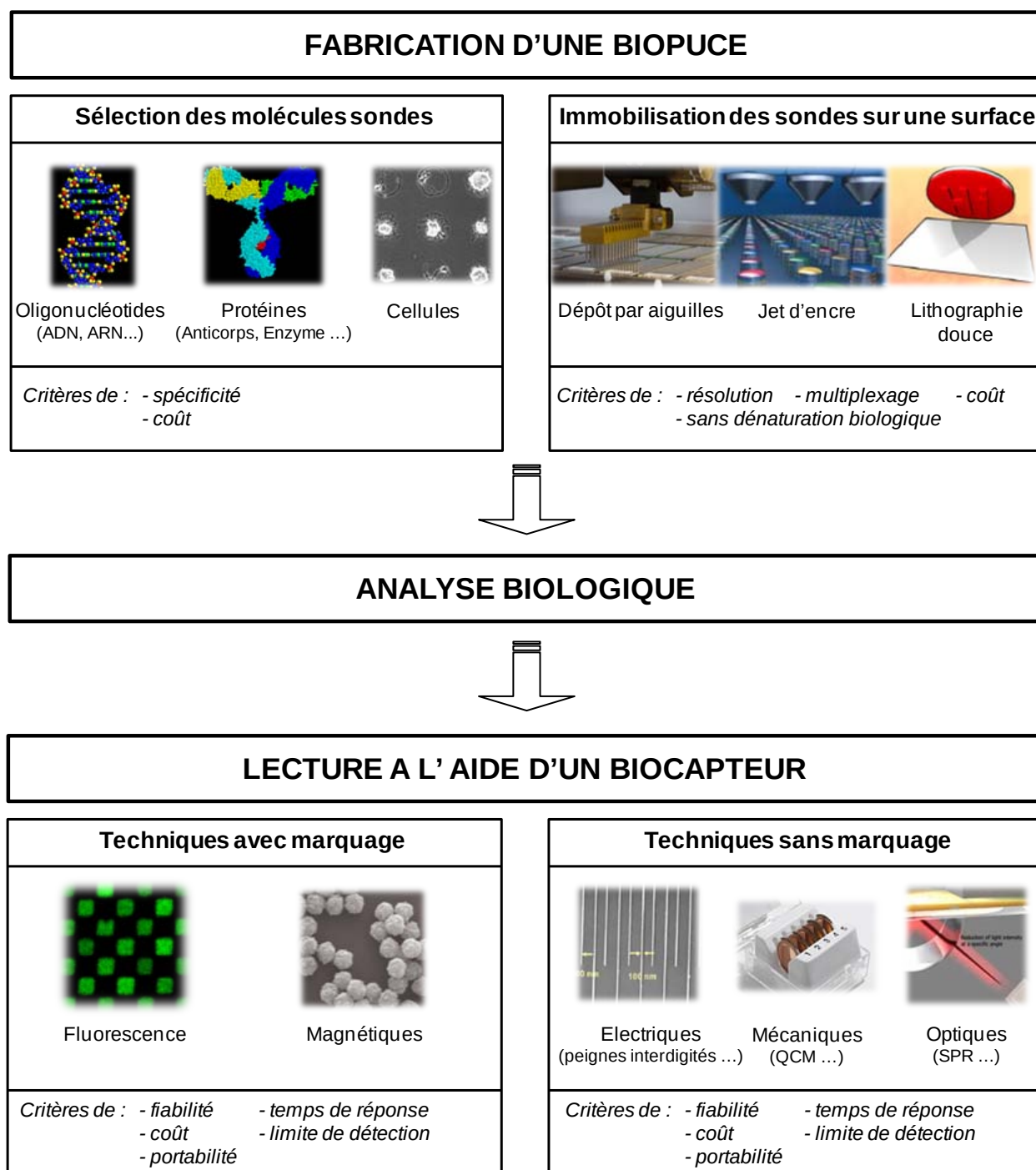


Figure 2 : Etape 1 : la fabrication des substrats d'analyse passe par une étape de sélection des molécules sondes puis d'immobilisation de ces sondes sur une surface.

Etape 2 : la solution à analyser est mise en contact avec la biopuce pour que les molécules interagissent entre elles.

Etape 3 : la lecture de l'échantillon est basée sur un principe physique, appartenant aux techniques de lecture avec ou sans marquage.

a. Fabrication d'un substrat moléculaire

La réalisation des supports sur lesquels seront basées les analyses moléculaires est la 1^{ère} étape d'un processus de biodétection. Ces substrats peuvent aussi être appelés biopuces ou puces. Ce terme désigne au sens large une surface sur laquelle des molécules sondes ou ligands sont immobilisés. Elles sont choisies en fonction de l'espèce moléculaire à détecter ou à analyser. Il existe plusieurs catégories dont les plus représentatives sont les puces à protéines, les puces à ADN et les puces à cellules (*Figure 2*). Nous verrons par la suite les caractéristiques de chacune de ces puces. Les molécules d'intérêt sont ensuite immobilisées sur un support. Pour cela, plusieurs techniques de fabrication existent et nous détaillerons les principales dans le paragraphe suivant. L'avantage de ce format biopuce (ou microarray) porte sur l'utilisation d'un support solide sur lequel des molécules sondes sont déposées de manière ordonnée afin de les immobiliser chimiquement.

Critères de choix :

Les critères de choix des molécules sondes dépendent :

- de leur sélectivité par rapport à l'espèce à détecter ou de l'objectif de la puce
- de leur coût, car la rareté du matériel biologique peut être un frein au développement commercial d'une biopuce et restreindre son usage en laboratoire si le coût de la puce s'avère trop élevé.

Le choix d'une technique d'immobilisation dépend :

- du multiplexage souhaité de la puce. Ce terme désigne le nombre d'entités biochimiques différentes que l'on souhaite immobiliser sur la surface. Cette notion permet d'effectuer plusieurs dizaines de tests simultanément sur une même surface. Pour certaines applications comme le criblage pharmaceutique, il est nécessaire de fabriquer des puces à haut débit, c'est-à-dire possédant un grand nombre de molécules par unité de surface. La technique d'immobilisation doit donc permettre d'atteindre ce challenge technologique.
- de la résolution des motifs. Les molécules sont déposées de façon organisée sur la surface afin de faciliter la lecture des analyses. Les motifs délimités sont généralement de dimension micrométrique (entre 50-150 μm). Dans la course à la miniaturisation, les biopuces ne sont pas épargnées. Si la taille des motifs est diminuée, alors la densité d'une puce peut être augmentée et il sera possible de faire plus d'analyses simultanées.
- de la dénaturation des molécules immobilisées. La fonctionnalité de certaines molécules, comme les protéines par exemple, est liée à leur conformation tri-dimensionnelle. Elles sont donc très fragiles. La technique de dépôt choisie ne doit donc pas dénaturer les molécules manipulées.

❖ **Cette étape peut rencontrer des limitations au niveau de la chimie de surface du support. En effet, il faut que les surfaces soient pré-activées ou fonctionnalisées afin que des liaisons fortes entre surface et molécules sondes se créent.**

b. Analyse biologique

Cette étape consiste à mettre en présence l'échantillon à analyser (sérum, sang, urine, salive ...) avec la biopuce. On cherche ici à former le complexe cible/sonde, dû à l'interaction spécifique de ces deux molécules.

- ❖ **La rencontre de la cible à détecter avec les molécules sondes immobilisées sur la biopuce peut être très longue, compte tenu des concentrations très faibles des cibles dans les solutions. Ce point peut être une limitation au bon déroulement d'une analyse.**
- ❖ **Une autre limitation peut provenir de la présence d'interactions non-spécifiques entre des molécules présentes en solution, mais que l'on ne souhaite pas détecter et la biopuce. Ces interactions indésirables doivent être réduites sinon elles perturbent fortement les analyses moléculaires et contribuent à augmenter le taux de faux-positifs.**

c. Lecture de l'échantillon

La biopuce est ensuite analysée grâce à un biocapteur. Ce terme désigne au sens large la multitude d'instruments d'analyses d'interactions moléculaires que l'on peut rencontrer. De manière générale, il existe des techniques de détection avec marquage et des techniques sans marquage. Le marquage est un terme désignant la nécessité d'ajouter une entité complémentaire (fluorophores, billes magnétiques, nanoparticules d'or ...) au complexe cible/sonde, afin de détecter sa présence. Ce marquage est coûteux et comporte le risque de dénaturer la molécule marquée et donc de perturber l'affinité entre la sonde et la cible.

Quelle que soit la technique de biodétection utilisée, l'objectif est de détecter l'interaction entre molécules sondes immobilisées sur le biocapteur et d'éventuelles cibles au sein du prélèvement. Le biocapteur permet ensuite de traduire cette information biologique en signal physique que l'utilisateur peut interpréter. C'est l'étape de transduction.

Critères de choix :

Les critères de choix d'un biocapteur dépendent :

- de la limite de détection. Cette notion définit la quantité la plus infime de matériel biologique que le biocapteur peut détecter. La limite de détection, que l'on cherche sans cesse à repousser, est directement reliée aux performances du biocapteur
- du temps de réponse. Dans un contexte actuel où de nombreuses techniques d'analyses existent, l'aspect temporel joue un rôle important. Il s'agit de pouvoir rendre le résultat d'une analyse en un temps le plus court possible. Même si le biocapteur permet le suivi dans le temps d'une interaction moléculaire, le système doit avoir un temps de réponse court.
- de la fiabilité. La question des résultats faux positifs ou faux négatifs est ici considérée. Un biocapteur doit être le plus fiable possible. Cette notion englobe la sensibilité d'un capteur et sa spécificité.

- du coût. Actuellement, de nombreuses techniques de biodétection sont en compétition. L'aspect financier ne peut être omis. Le coût de revient d'un système doit alors être réduit au maximum.
 - de la perturbation induite sur l'entité à détecter. On cherche à interférer le moins possible avec les molécules à détecter pour éviter leur dénaturation. Les techniques de détection avec marquage ne répondent pas forcément à cette attente.
- ❖ **L'étape de détection peut rencontrer des limitations au niveau de la sensibilité. Quelques fois, le signal biologique est tellement faible, qu'il faut pouvoir l'amplifier pour le lire. Cet aspect est très couramment utilisé pour améliorer les performances d'un capteur mais complexifie grandement sa fabrication et augmente son coût.**
- ❖ **Une autre limitation peut venir de la présence d'interactions non-spécifiques entre des molécules présentes en solution, mais que l'on ne souhaite pas détecter et le biocapteur. Ces interactions non-spécifiques perturbent les mesures et abaissent les limites de détection.**

2. Domaines d'applications

Les biopuces et biocapteurs sont présents dans de nombreux domaines. Nous verrons dans les paragraphes suivants les techniques commercialisées, et donc déjà disponibles sur le marché. Les applications de la biodétection sont vastes.

a. Le domaine de la santé

L'une des principales applications des biocapteurs concernent le secteur de la santé. Une majorité de laboratoires de recherche met au point et développe avec l'aide de sociétés industrielles des dispositifs (instruments de lecture, instruments d'analyse, support moléculaire, biopuce sur demande ...) destinés au marché de la santé.

i. Le diagnostic et le pronostic

En recherche clinique, les applications envisagées sont l'identification de marqueurs sériques et biologiques en termes de diagnostic et pronostic (cancers, maladies auto-immunes, allergies...). Grâce à la détection de molécules particulières, il est possible d'identifier certaines pathologies chez un patient.

ii. La pharmacologie

L'identification de nouvelles cibles thérapeutiques ou de nouveaux médicaments se fait grâce à des techniques de criblage pharmaceutique. Les molécules candidates ou drogues peuvent être testées afin d'observer leur interaction avec les molécules cibles, qui sont ici des entités moléculaires clés pour des processus cellulaires que l'on souhaite moduler par le médicament. Ensuite, on recherche généralement à établir une courbe dose-réponse qui permettra d'orienter la sélection de molécules médicaments efficaces à faible dose. De nouvelles interactions fonctionnelles (enzyme-substrat) peuvent également être révélées (comme certaines phosphorylations par exemple).

iii. L'agroalimentaire et l'environnement

En agroalimentaire, de nombreuses puces sont en développement pour suivre et quantifier tout au long d'une chaîne de production, la présence de bactéries ou de contaminants. Une autre application concerne le contrôle de séquences provenant d'organismes génétiquement modifiés (OGM) dans des générations successives de semences.

L'environnement n'est pas en reste non plus, qu'il s'agisse de l'analyse bactérienne de l'eau de consommation courante ou du contrôle qualité dans l'industrie pour détecter des agents infectieux dans l'alimentation (*salmonelles*, *Listeria*, *Legionella*) ou l'air.

b. Le domaine de la défense

La détection d'agents pathogènes pour des besoins de sécurité intérieure et de défense est un domaine dynamique, qui fait avancer les technologies de détection simultanée de virus, bactéries ou micro organismes.

Au-delà du domaine d'applications pour lesquelles elles sont créées, les biopuces sont surtout définies en fonction du type d'entités moléculaires qu'elles comportent. On rencontre ainsi des puces à protéines, des puces à ADN, des puces à cellule et d'autres types de puces émergentes, que nous détaillerons dans le paragraphe suivant. Nous verrons dans un premier temps, les techniques de fabrication les plus couramment utilisées pour adresser physiquement une puce, c'est-à-dire déposer de façon contrôlée et organisée des entités moléculaires fonctionnelles à sa surface.

II/ Développement des biopuces

Les biopuces sont les supports des analyses moléculaires. De nombreuses techniques de fabrication de biopuces existent. Ces méthodes sont adaptées au type de puce souhaitée (puces à protéines, à ADN, à sucre, à cellules ...) mais aussi à leur densité, qui correspond au nombre de tests que l'on peut effectuer simultanément. La densité d'une puce traduit le nombre de plots d'analyse où les sondes sont immobilisées sur la surface. On distingue des puces :

- de faible densité : entre 10 et 1000 zones d'analyse, généralement destinées au marché du diagnostic
- de moyenne densité : entre 1000 et 10 000 zones d'analyse, généralement destinées au génotypage et à l'étude des mutations génétiques
- de haute densité : supérieure à 10 000 zones d'analyse, généralement destinées au séquençage de gènes et au criblage pharmaceutique.

Nous présenterons dans ce paragraphe les voies de synthèse in-situ, c'est-à-dire la fabrication de la sonde directement sur la surface, puis la synthèse ex-situ qui consiste à déposer sur la surface la sonde déjà synthétisée. Nous terminerons enfin par détailler les diverses biopuces commercialisées sur le marché.

1. Techniques de fabrication

La synthèse in-situ ^{1 2 3} permet la synthèse de brins d'ADN directement sur la surface, nucléotides après nucléotides. Il existe deux grandes voies de synthèse in-situ : la photolithographie et le jet d'encre. Il est à noter que les puces à protéines ne peuvent être fabriquées par cette technique de synthèse in-situ. En effet, il est impossible de synthétiser une protéine élément après élément comme il est possible de le faire avec l'ADN. L'assemblage in-situ de peptides reste par contre possible.

a. Photolithographie

La photolithographie peut être utilisée pour la synthèse localisée de brins d'ADN sur une biopuce. Dans ce cas, un substrat de verre va être activé chimiquement pour être le support de la synthèse. Un masque de photolithographie est ensuite positionné au dessus du substrat et une étape d'insolation UV est effectuée. Le masque comporte des zones transparentes, laissant donc passer le rayonnement jusqu'au substrat et d'autres opaques afin de le bloquer. Le substrat est alors plongé dans une solution comportant le type de base à déposer : adénine (A), guanine (G), tyrosine (T), cytosine (C), qui sont toutes marquées avec un groupement photosensible. Les bases vont venir se greffer dans les zones insolées, qui sont donc activées (*Figure 3*).

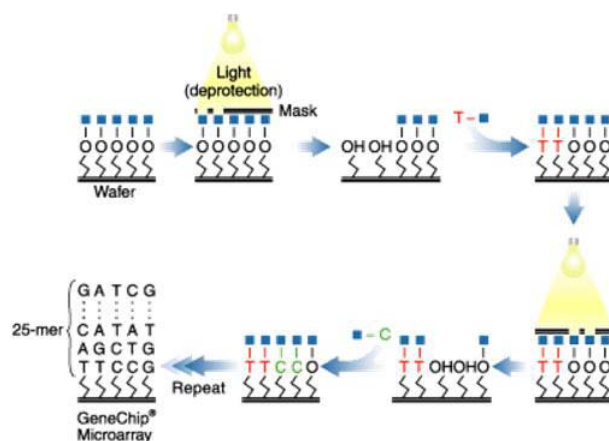


Figure 3 : Synthèse *in-situ* d'une biopuce à ADN par photolithographie. La synthèse, base par base, de la puce requiert une étape d'insolation au travers d'un masque, comportant des zones transparentes et opaques puis l'immersion du substrat dans une solution comportant la base A, T, C ou G pour que ces dernières viennent se greffer sur les zones insolées et donc activées. Le procédé est réitéré jusqu'à la synthèse complète des ADN sondes

Le procédé est répété jusqu'à la synthèse complète des sondes d'oligonucléotides. Ainsi, chaque oligonucléotide est reproduit à des millions d'exemplaires dans des régions précises. Cette technologie est adaptée à la fabrication de puces de haute densité potentiellement destinées au séquençage complet d'organismes vivants. Cependant, cette méthode reste relativement chère puisqu'elle nécessite un nombre important de masques. Ainsi pour synthétiser une puce avec des oligonucléotides de 25-mers, 100 masques différents sont requis. Des problèmes d'alignement sont aussi à considérer avec ce type de synthèse. Le processus bien qu'extrêmement précis, est onéreux et lent, et requiert des dispositifs technologiques lourds de plateforme technologique, ce qui freine sa démocratisation.

Avec ce procédé, la société Affymetrix propose des biopuces dont les sondes comportent au maximum 30 bases (GeneChip). La société Protogene utilise aussi cette voie de synthèse par photolithographie avec une technologie supplémentaire qui permet de projeter par jet d'encre les quatre bases désirées sur la biopuce, grâce à des injecteurs piézo-électriques.

Nimblegen, récemment racheté par Roche, propose le même type de biopuces, fabriquées par photolithographie mais qui emploie un miroir digital au lieu du jeu de masques⁴.

b. Jet d'encre

La seconde technique de synthèse *in-situ* porte sur une technologie inspirée des techniques d'impression des imprimantes jet d'encre (ou ink jet)⁵. Un système de microprojection par injecteurs piézo-électriques, permet de déposer les quatre bases en très petites quantités (de l'ordre de la centaine de picolitres) à la surface d'un support. La Figure 4 décrit le principe de fonctionnement. L'outil est composé de plusieurs têtes de chargement comportant une buse. Un courant électrique appliqué sur une buse piézoélectrique, engendre une déformation de cette dernière. La pression sur le réservoir de la buse évacue une partie de la solution et permet de déposer une goutte sur le substrat sous forme de spots de petites dimensions (10 µm).

Il n'y a pas de contact entre le support et les têtes de chargement, comportant les solutions à déposer.

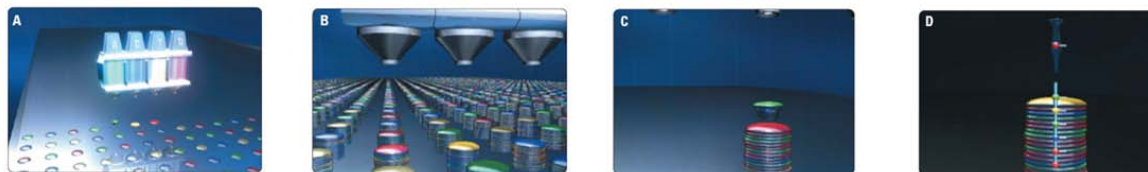


Figure 4 : Technologie à jet d'encre. (A) Première projection de la première base des différents oligonucléotides (B) projection des bases suivantes C) et (D) empilement architectural d'une sonde par dépôt successif

Les réactions de couplage ont lieu par confinement grâce à un substrat micro-structuré chimiquement. La société Protogène⁶ définit des zones hydrophiles et hydrophobes en utilisant une grille de téflon posée sur une lame de verre. Les réactions sont réalisées par dépôts séquentiels de gouttes à l'intérieur des puits (hydrophile) amenant les différents réactifs jusqu'à la réaction suivante.

Cependant, des liquides trop visqueux ne peuvent être utilisés. De plus, le nettoyage de la tête de projection ainsi que son chargement peut poser problème. Cette méthode est par ailleurs relativement lente bien que plusieurs projections soient effectuées simultanément, en fonction du nombre de têtes de chargement.

Cette technologie est exploitée par différentes sociétés comme Agilent qui propose ce genre de puces à ADN.

c. Dépôt par aiguilles

Nous allons maintenant détailler une technique de fabrication de biopuces *ex-situ*. Cette technique de dépôt par contact porte sur l'utilisation d'un automate, sur lequel est monté un agencement d'aiguilles métalliques. Ces aiguilles possèdent un canal fluide ainsi qu'un réservoir (Figure 5A). La première étape consiste à prélever une solution, généralement dans une plaque de titration car l'espacement des aiguilles correspond aux dimensions de plaques de titration standards (Figure 5B). L'automate se rapproche de la surface et permet ainsi le dépôt d'une partie de la solution sur le substrat sous forme de plots de 50 à 500 µm de diamètre environ. Il est possible de réaliser plusieurs dépôts successifs, tant que le réservoir des aiguilles est rempli.

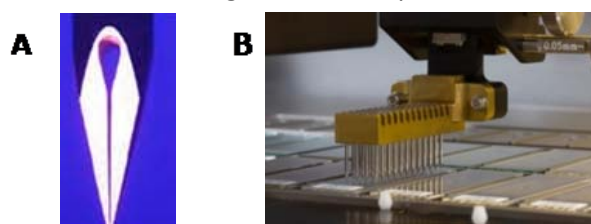


Figure 5 : Dépôt de molécules par contact grâce à des aiguilles métalliques (A) comportant un canal fluide et un réservoir (B) et montées sur un automate de dépôt

Cette technique complètement automatisée s'est très largement démocratisée pour la conception de puces comportant des milliers de zones d'analyse. Elle permet par ailleurs la conception de puces à protéines⁷, de puces à ADN dont les séquences synthétisées sont bien plus longues pour que pour des techniques de synthèse *in-situ*^{8,9}. Il est donc possible d'utiliser également des fragments de PCR.

d. Lithographie douce

Le Microcontact printing (μ CP) est une technique de dépôt par contact, qui s'apparente au principe de l'imprimerie, développée par Gutenberg. Il s'agit d'utiliser le relief d'un timbre en élastomère, que l'on vient encreur avec une solution de molécules à déposer. Le timbre sert de tampon encreur. Il est amené en contact avec un substrat et va épouser sa surface. Les molécules vont alors être transférées du timbre sur la surface, selon les motifs définis sur le timbre. Cette technique de dépôt a été introduite par G.M. Whitesides dans les années 1990¹⁰. La Figure 6 décrit les étapes de ce procédé.

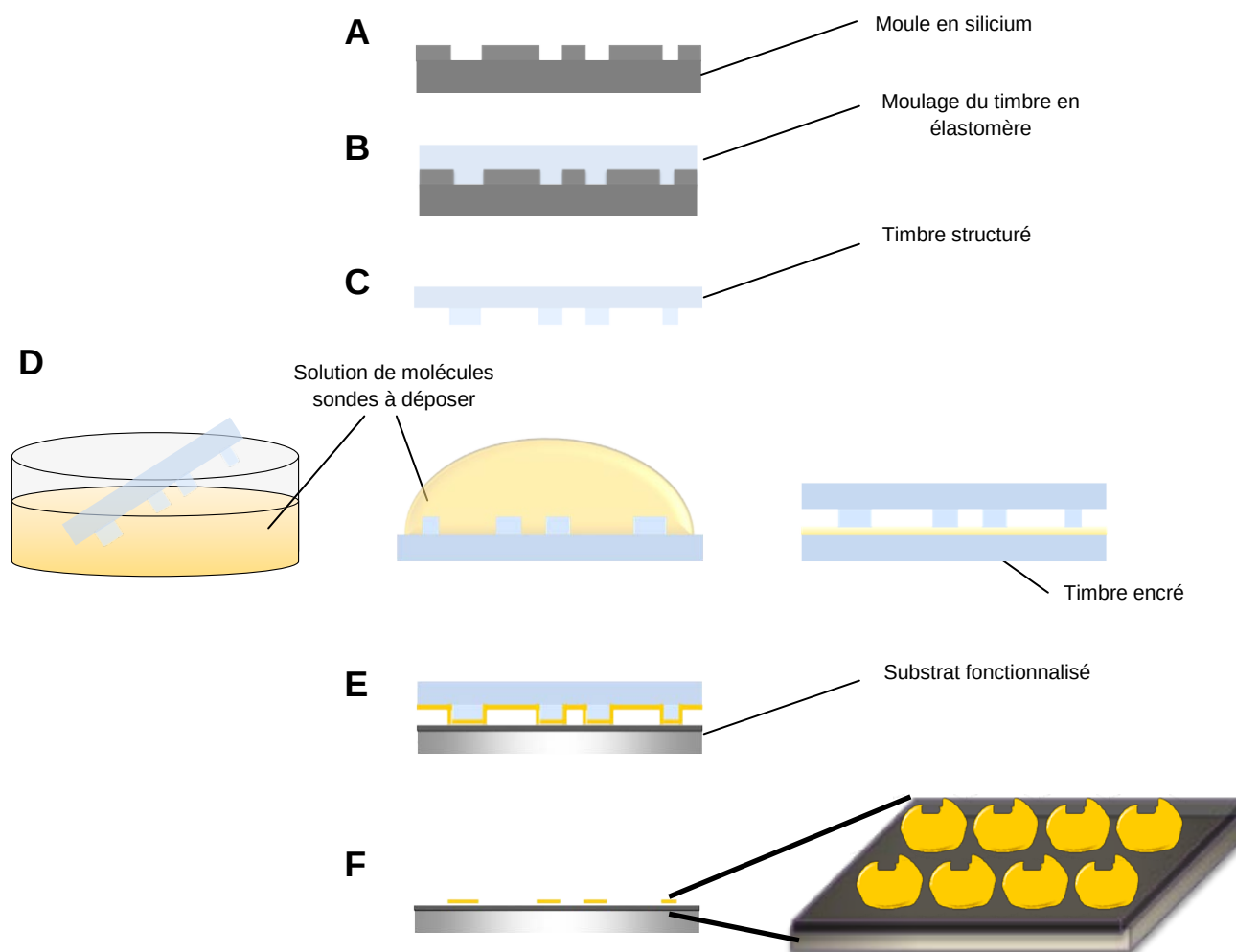


Figure 6 : Procédé de dépôt par Microcontact printing (A) Réalisation du moule structuré en silicium (B) Moulage du timbre en élastomère à la surface du moule en silicium (C) Après réticulation et démoulage, le timbre obtenu est le réplica négatif du moule en silicium (D) Encrage du timbre, en immersion dans une solution, en déposant une goutte à sa surface ou par contact avec un autre timbre encreur (E) Mise en contact du timbre avec le substrat, qui comporte une chimie de surface adéquate à la fixation de molécules (F) Substrat final sur lequel des motifs de molécules ont été transférés

Réalisation d'un moule structuré en silicium



La première étape du procédé consiste à structurer la surface d'un wafer en silicium par lithographie (lithographie optique ou lithographie électronique en fonction de la taille des structures souhaitées). Nous verrons dans le prochain chapitre le détail de ces techniques. Une étape de gravure ionique réactive (RIE) est effectuée pour libérer les structures et créer le relief topographique du moule. Ce dernier est ensuite traité en phase liquide par voie chimique avec de l'OTS (OctadecylTrichloroSilane), afin de le rendre très hydrophobe et donc anti adhésif. L'OTS est un alkylsilane, ayant une longue chaîne aliphatique (18 atomes de carbone) dont la terminaison méthyle confère aux surfaces un caractère hydrophobe (angle de contact égal à 110°). Cette étape de silanisation permet de fixer de manière covalente les molécules d'OTS à la surface du moule et de conserver le moule en silicium dans le temps grâce à la réaction décrite par la Figure 7.

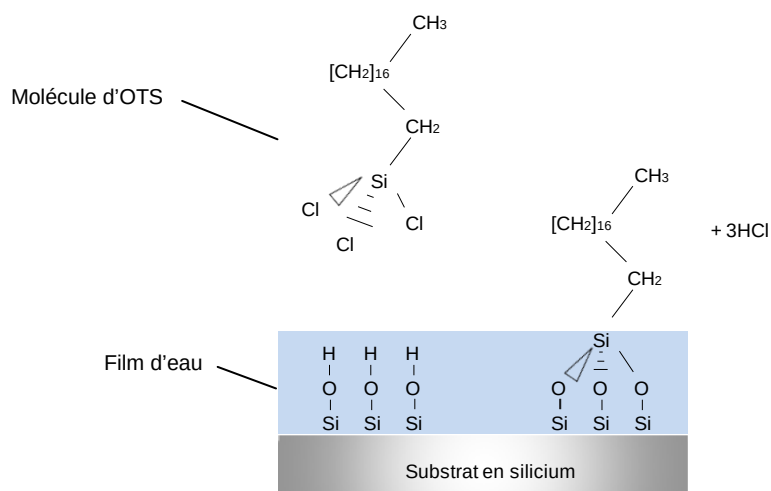


Figure 7 : Liaisons covalentes se formant entre une molécule d'OTS et la surface d'un wafer de silicium oxydé par traitement plasma O_2 , lors d'une silanisation en phase liquide

Moulage d'un timbre en élastomère



Il s'agit ensuite de déposer à la surface du moule en silicium, un élastomère. Celui que nous utilisons le plus souvent est appelé PDMS (PolyDiMéthylSiloxane, Sylgard® 184) et fournit par la société Dow Corning. D'autres types de polymères comme le polyuréthane, le polystyrène ou même les composés de type COC (Copolymère d'Oléfine Cyclique) sont aussi étudiés pour cette étape. Le PDMS est un élastomère biocompatible et inerte, ce qui permet d'envisager des applications biomédicales sans que le timbre ne réagisse avec les entités biochimiques présentes à sa surface. Il est naturellement hydrophobe (angle de contact avec l'eau $\sim 110^\circ$) et son énergie de surface critique est très basse.

Le PDMS Sylgard 184 est préparé en mélangeant une base contenant l'oligomère PDMS et un agent de réticulation (dans un rapport de 10 :1 en masse). L'agent de réticulation est composé quant à lui d'un catalyseur au platine et un oligomère hydrogéné. Cette mixture est déposée à la surface du moule en silicium puis l'ensemble est positionné en étuve à 60°C pendant 8 heures afin de réticuler le timbre. Après réticulation, le réplica de PDMS peut être démoulé.

Pour que les structures se démoulent correctement, il faut tenir compte du rapport de forme, défini par hauteur / largeur (h/l). Les hauteurs des structures doivent être proches des largeurs ($h/l \approx 1$).

Encrage du timbre



Cette étape consiste à déposer une goutte de biomolécules sur le timbre. Les molécules s'adsorbent à la surface du timbre pendant un certain temps appelé temps d'encrage. Le timbre est alors séché à l'azote, permettant ainsi de retirer la plupart des molécules sauf celles adsorbées sur la surface.

D'autres types d'encrage de timbre existent mais conduisent au même résultat : il est possible d'immerger le timbre dans la solution (les quantités de solution sont dans ce cas bien plus importantes) ou de mettre en contact le timbre avec un autre timbre plat déjà encré.

Dépôt



Le timbre encré est ensuite mis au contact du substrat. Un contact conforme et doux va avoir lieu de part la nature souple du timbre. Le temps de contact entre le timbre et la surface définit la qualité du dépôt. Pour que les molécules adsorbées à la surface du timbre soient transférées sur le substrat, il faut qu'elles aient plus d'affinité avec la surface qu'avec le timbre. Généralement, les forces d'attraction sont plus fortes avec la surface donc les molécules sont relarguées. Par ailleurs, un point crucial concerne la chimie de surface du substrat. Il est primordial d'adapter la chimie de surface du substrat en fonction du type de molécules déposées, afin qu'elles soient fixées sur la surface, de manière covalente ou électrostatique.

Le μ CP présente de nombreux avantages. C'est une méthode simple, rapide et hautement reproductible qui permet la création de motifs moléculaires bien définis sur de nombreuses surfaces. Il est aussi compatible avec un grand nombre de molécules comme les protéines, l'ADN, thiols et les silanes car il ne dénature pas les molécules lors du dépôt. Par ailleurs, des motifs peuvent être transférés sur de larges surfaces à une échelle du micromètre au nanomètre ¹¹. Les dimensions des structures sont de l'ordre d'une dizaine de nanomètres jusqu'à plusieurs centaines de micromètres ¹². La Figure 8 présente plusieurs images obtenues en microscopie à fluorescence de dépôt par μ CP de motifs moléculaires très variés.

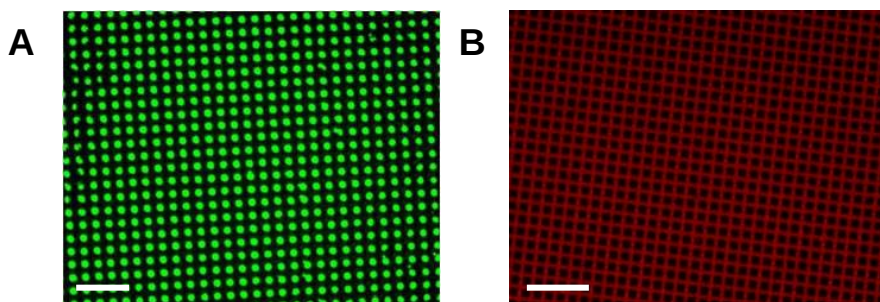


Figure 8 : Images obtenues en microscopie en fluorescence de dépôts par μ CP (A) de molécules de streptavidine marquées en fluorescence selon des plots de $5\ \mu\text{m}$ de diamètre (B) d'anticorps anti-GST marqués en fluorescence selon des lignes croisées de $5\ \mu\text{m}$ de large. Barre d'échelle : $50\ \mu\text{m}$.

Le μ CP ou encore tamponnage moléculaire est une technique de dépôt très largement employée en laboratoire pour générer des motifs moléculaires. Il permet de manière rapide de générer des surfaces moléculaires pour de multiples applications. E. Delamarche et A. Bernard sont notamment à l'origine de multiples études basées sur des surfaces imprimées par μ CP (fixation de protéines, tests

immunologiques ...)^{13 14 15 16 17} Malgré les avantages qu'offre le μ CP, il est très peu utilisé en dehors des laboratoires. Son premier frein concerne bien entendu le multiplexage des substrats. Le timbre en PDMS étant encre par une seule solution de molécules, les motifs déposés ne sont composés que de cet unique type d'entité. Cet aspect réduit considérablement l'intérêt d'utiliser le μ CP pour fabriquer des biopuces destinées au diagnostic ou encore au criblage pharmaceutique, de par la nécessité de tester plusieurs marqueurs simultanément.

Dépôt multiplexé

Peu de travaux ont été menés dans la perspective de structurer des surfaces par μ CP afin de profiter de ses nombreux avantages, tout en tenant compte de l'objectif de déposer plusieurs types de molécules différentes.^{18 19} Le timbre doit être encre avec plusieurs solutions, avant l'étape de dépôt moléculaire.

Des équipes ont ainsi encre des timbres en PDMS par DPN (Dip Pen Nanolithography)^{20 21 22}. La Figure 9 présente ce concept. Toutes les étapes de fabrication sont similaires au procédé de μ CP. La seule différence réside dans l'étape d'encre du timbre. Une ou plusieurs pointes de DPN déposent localement sur la surface du timbre des gouttes de solution. Le timbre, comportant plusieurs types de molécules à sa surface est alors mis en contact avec le substrat. Les dépôts moléculaires obtenus sont donc multiplexés.

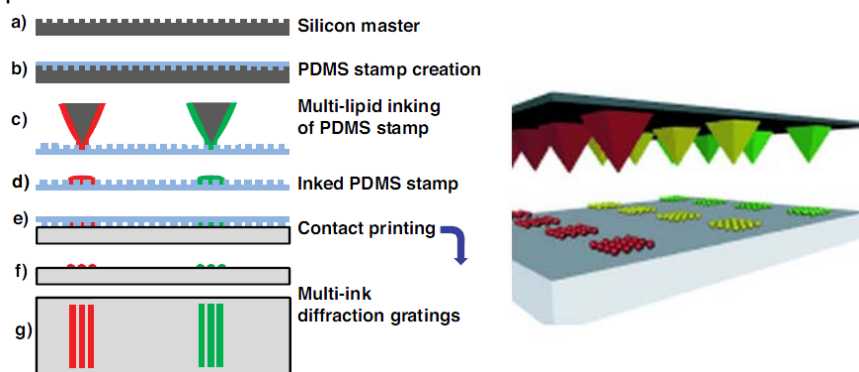


Figure 9 : Multiplexage d'un timbre en PDMS grâce à une ou plusieurs pointes de DPN déposant des molécules à la surface

Cette technique, basée sur la DPN est cependant très longue. Par ailleurs, dans le cas de motifs de dimensions importantes (exemple des lignes dans la figure à gauche) il faut s'assurer d'une bonne répartition de la solution sur l'ensemble des motifs, suite à l'encre.

Une deuxième approche, développée au cours de précédentes thèses au LAAS-CNRS^{23 24} utilise un timbre en PDMS spécial, appelé Macrotimbre pour assurer un encre avec plusieurs entités biologiques²⁵. Cet outil sera présenté au chapitre II qui porte sur la présentation des avancées technologiques.

2. Les différentes puces

a. Puces à ADN

Les biopuces communément appelées puces à ADN sont basées sur des oligonucléotides de type ADN ou ARN. L'ADN est constitué par un enchaînement séquentiel de 4 nucléotides différents. Un nucléotide est composé d'un groupement phosphate, d'un désoxyribose et d'une base azotée. Les bases azotées sont au nombre de quatre. Il existe : l'adénine (A), la guanine (G), la cytosine (C) et la thymine (T). Ces quatre molécules ont la particularité de s'unir deux à deux par des liaisons hydrogènes, en créant la structure en double hélice de l'ADN (*Figure 10*). La base A s'unit avec la T et la base C s'unit avec la G.

Le principe de la puce à ADN repose sur la particularité de reformer spontanément la double hélice si une séquence nucléotidique rencontre une séquence parfaitement complémentaire.

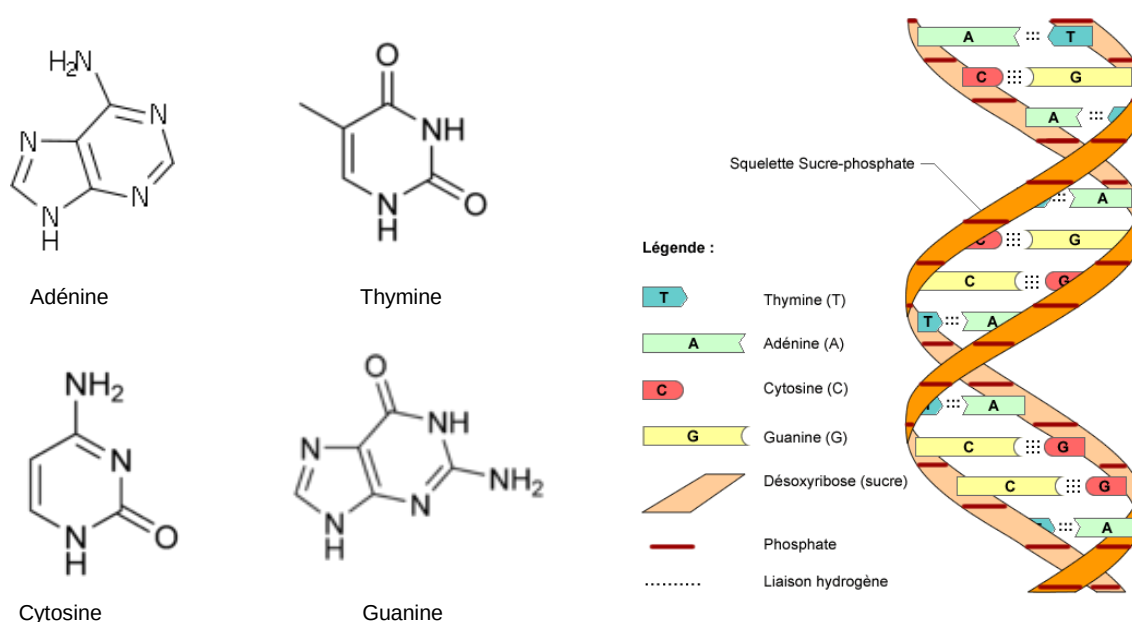


Figure 10 : Structures chimiques des 4 bases de l'ADN, l'Adénine (A), la Thymine (T), la Cytosine (C) et la Guanine (G). Chaque nucléotide est composé d'un groupe de phosphate, du désoxyribose et d'une base azotée. La complémentarité des bases A et T, G et C permet l'hybridation de deux brins d'ADN dont la séquence est complémentaire et assure la formation de la double hélice.

Le principe de puce ADN est basé sur le processus d'hybridation entre la séquence cible que l'on veut détecter et sa séquence complémentaire synthétisée par voie chimique ou enzymatique. Ainsi, cette séquence complémentaire de l'acide nucléique à détecter est appelée sonde nucléique. Une puce à ADN est constituée d'une multitude de sondes oligonucléotidiques, précisément organisées sur un support solide miniaturisé (*Figure 11*) et contient l'ensemble des séquences complémentaires des cibles à détecter.

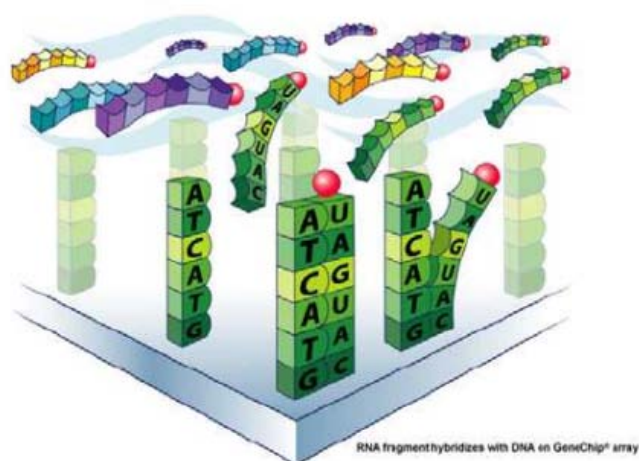


Figure 11 : Puces à ADN, proposées par Affimetrix (GenoChip) qui illustrent le principe d'analyse. Des séquences oligonucléotidiques (ici ARN) sont immobilisées sur un support solide, et lorsqu'elles rencontrent leur séquence complémentaire, les deux brins s'hybrident en double hélice.

Les biopuces à ADN sont les premières à avoir été développées, dans le courant des années 1990 ²⁶. La société Affimetrix a directement pris le relais industriel pour démocratiser ces biopuces d'analyse très prometteuses, en utilisant la photolithographie pour fabriquer les substrats.

Depuis, de nombreuses sociétés fabriquent et proposent à la communauté scientifique des puces à ADN, dont la complexité varie en fonction de l'application. Elles sont destinées au marché de la génomique qui englobe le séquençage, permettant l'amélioration de la connaissance des gènes et de certains allèles spécifiques de maladies génétiques, pour la mise au point de traitements ciblés ou même l'épigénétique. Les biopuces à ADN sont aussi de solides outils d'analyse de l'expression des gènes (analyse du transcriptome grâce au séquençage des ARNm par exemple) ^{27 28} mais aussi de diagnostic des maladies (détection de mutation) ²⁹.

Le séquençage de l'ADN a par ailleurs permis l'analyse de génome entier d'eucaryote ³⁰, comme la levure par exemple ³¹.

Biopuces à ADN disponibles commercialement : La société Illumina par exemple, commercialise actuellement des puces à oligonucléotides (CytoChip®) pour des études cytogéniques. La détection du papilloma virus peut se faire grâce à des puces commercialisées par Greiner (Papillocheck®). Enfin, les sociétés Affymetrix (GenoChip®) et Perkin Elmer (Constitutional Chip®) proposent des biopuces destinées respectivement à du séquençage ou à tester un nombre anormal de chromosomes.

b. Puces à protéines

Les puces à protéines ont été développées après les puces à ADN mais suscitent elles aussi un grand intérêt ³². Une puce à protéine comporte un ensemble de protéines (antigène, peptide, enzyme etc.) immobilisées sur un support solide. ³³.

Leur fabrication est plus complexe que pour les biopuces à ADN car les protéines sont fragiles et peuvent se dénaturer facilement de manière irréversible (tampon, température, contraintes ...). De plus, comme la fonctionnalité d'une protéine dépend de sa conformation tri-dimensionnelle, le risque majeur lors de la fabrication des puces est la modification ou la dénaturation des protéines ³⁴.

Un changement dans la taille ³⁵, la structure ou la charge d'une protéine affecte sa fonction biologique. Par ailleurs, il est possible que la liaison entre la protéine et le substrat modifie la conformation de cette dernière ce qui tend à réduire son activité et son aptitude à fixer sélectivement la cible recherchée. Par conséquent, de nombreuses études sur les chimies de surface mises en jeu dans la fabrication de biopuces sont effectuées. ³⁶

La diversification des techniques de dépôt et d'immobilisation de protéines a notamment permis l'émergence des puces à anticorps. ³⁷

Les biopuces à protéines peuvent être utilisées pour la reconnaissance de protéines cibles dans un échantillon (serum, urine, salive ...) afin de détecter certaines pathologies. ³⁸ D'autres types de puces à plus haut débit permettent l'identification de partenaires protéiques potentiels inconnus et sont dans ce cas là des outils fonctionnels d'analyses pour identifier de nouveaux médicaments ou de nouvelles cibles thérapeutiques. ³⁹

Un grand nombre d'interactions peuvent être étudiées avec les puces à protéines (protéines/protéines, protéines-peptides, protéines-phospholipides, protéines-cellules), dans certains domaines comme le cancer ⁴⁰ ou les maladies auto immunes. ⁴¹

L'utilisation de puces à protéines requiert cependant de larges volumes d'échantillons à analyser, de part la très faible quantité de cibles à détecter en solution et leur amplification comme pour l'ADN est impossible. Une stratégie d'ultra-miniaturisation des puces à protéines a été développée pour palier cet aspect, menant à des zones d'analyse inférieure au micromètre, et appelée nano-arrays. ⁴²

Biopuces à protéines disponibles commercialement : La société Phadia, rachetée par ThermoFisher Scientific, propose des biopuces à protéines pour le diagnostic d'IgE spécifiques de composants allergènes (ImmunoCAP ISAC). La biopuce permet la détection de plus de 40 des allergènes les plus fréquents en un seul test multiplexé, en utilisant des quantités de sérum très faibles (20-40 µL). La lecture de la puce se fait en deux étapes. Les anticorps IgE du sérum se lient aux allergènes présents sur la puce. Puis, grâce à un anticorps anti-IgE marqué en fluorescence, les résultats de la puce apparaissent. Le prix de cette puce reste cependant son principal écueil.

c. Puces à peptides

Les puces à peptides sont une alternative aux puces aux protéines. Alors qu'une protéine est une macromolécule biologique composée de plusieurs chaînes polypeptidiques conformées structurellement, un peptide n'est qu'un fragment de protéine. Il est composé, de la même manière que les protéines, d'acides aminés reliés entre eux par des liaisons peptidiques.

L'immobilisation de peptides sur support pour mimer une partie d'une protéine semble être moins compliquée que celle des protéines car ils sont beaucoup plus stables. Ils peuvent même être immobilisés sur une surface par des techniques de synthèse in-situ, ce qui simplifie la fabrication de puces à peptides.

Leur application est la même que pour les puces à protéines, la diagnostic, ⁴³ la détection ⁴⁴ et le criblage ⁴⁵.

Un point critique dans la conception des puces à peptides est l'accessibilité du peptide pour la cible. En effet, les séquences peptidiques sont généralement utilisées pour déterminer des sites spécifiques, et les séquences sont généralement courtes. Dans ce cas, il peut être nécessaire d'incorporer un bras espaceur entre le peptide et le support, ce qui permet de mieux présenter le peptide vers la cible.⁴⁶

Puces à peptides disponibles commercialement : La société Eurogentec propose des méthodes d'identification d'épitope (epitope mapping) mais les opérations ne se font pas sur un support solide mais dans des puits.

d. Puces à sucre

L'utilisation de puces à sucres est relativement récente. Les sucres sont parmi les constituants les plus abondants des membranes cellulaires. De nombreux événements biologiques tels que l'embryogenèse, l'oncogenèse, l'activation et la différenciation cellulaire sont directement liés à l'expression de motifs glycosylés spécifiques. Ils interviennent donc dans de nombreux mécanismes d'interactions entre cellules et pathogènes tels que des virus ou des bactéries. Plus de 80% des protéines humaines sont des glycoprotéines, c'est-à-dire qu'elles portent des sucres ou polysaccharides. Cependant, il est très difficile d'étudier en détail les glycoprotéines. Leur grande diversité complexifie les études. C'est pourquoi les puces à sucre ont récemment vu le jour et constituent de nouvelles alternatives pour les puces à ADN ou à protéines.⁴⁷

Les substrats peuvent comporter des motifs de polysaccharides, de glycanes, de glycoprotéines ou encore de glycolipides.

Ces dernières années, certaines études d'interaction entre des sucres et des protéines ont pu être suivies par SPR (surface plasmon resonance) dont le principe de fonctionnement sera détaillé dans le paragraphe suivant.^{48 49 50}

Les puces à sucre sont donc destinées à faciliter le diagnostic d'infections bactériennes (pneumocoques, méningocoques, Haemophilus Influenzae, E. coli ...) et la compréhension des processus d'infection.⁵¹

Biopuces à sucres disponibles commercialement : Glycominds est une entreprise qui commercialise la puce IBDX, basée sur l'utilisation de sucres pour le diagnostic de la maladie de Crohn à partir d'un prélèvement sanguin. Cette entreprise développe plusieurs kits pour le diagnostic de maladies auto-immunes et les inflammations chroniques telles que de nombreuses scléroses ou la polyarthrite rhumatoïde.

e. Puces à cellules

Les puces à cellules peuvent par exemple être utilisées⁵² pour enregistrer le comportement d'un réseau neuronal situé sur une micro électrode. Elles peuvent aussi porter sur la caractérisation de l'expression de gènes sur des cellules vivantes dans un contexte d'inflammations pathologiques.⁵³ De nombreuses expériences consistent également à sur-exprimer ou inhiber un gène par transfection et

observer les conséquences phénotypiques provoquées à l'échelle cellulaire. Les puces à cellules, développées relativement récemment, permettent d'envisager une meilleure compréhension des systèmes de régulation et d'expression des gènes au niveau cellulaire, en fonction de divers environnements. L'identification des protéines de liaison sert également à définir les complexes moléculaires de type : molécule pharmacologique - protéine de liaison - cible.

3. Problématique

- ❖ Parmi les nombreuses techniques de fabrication de substrats moléculaires, la lithographie douce, représentée par la Microcontact printing présente des avantages considérables. Cette technique simple et peu coûteuse permet de déposer des motifs moléculaires à haute résolution sur une surface, à une échelle micrométrique ou nanométrique. Par ailleurs, elle permet de déposer des molécules de natures variées.
- ❖ Il existe plusieurs types de biopuces actuellement en développement. Dans le cadre de ce projet, nous avons décidé de nous concentrer sur les biopuces à protéines et les biopuces à ADN, de faible densité. Le Microcontact printing peut donc être utilisé pour fabriquer les substrats moléculaires pour nos études puisqu'il est compatible avec les protéines et les oligonucléotides.
- ❖ Pour la réalisation de ces puces, le multiplexage du substrat est indispensable. Il faut donc trouver une alternative au μ CP classique, qui ne permet pas de déposer simultanément plusieurs molécules différentes.

III/ Développement des biocapteurs

Il existe plusieurs techniques de détection d'interactions biologiques. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, ces techniques peuvent être avec ou sans marquage. A l'heure actuelle, les analyses de diagnostic et de criblage sont basées principalement sur des techniques de biodétection avec marquage, et en particulier sur la fluorescence. Ce marquage est coûteux et peut dénaturer les molécules marquées. Dans le cas d'un marquage avec des fluorophores, leur stabilité dans le temps est limitée à cause du photo-blanchiment. Bien que d'autres systèmes aient émergé ces dernières décennies, la détection par marquage reste la plus répandue. Les techniques de biodétection sans marquage sont pourtant nombreuses (potentiométrique, ampérométrique, capacitive, thermique, optique, acoustique, mécanique)⁵⁴ et varient de par leur état de développement (en laboratoire ou commercialisé). Nous verrons au cours de ce chapitre, quelques unes des principales techniques de lecture avec et sans marquage commercialisées, c'est-à-dire présentes sur le marché de la détection d'interactions biologiques. Nous traiterons plus en détail la catégorie des techniques optiques de détection. Enfin, nous définirons la problématique générale que rencontrent ces technologies.

1. Techniques de biodétection avec marquage commercialisées

a. Tests immunologiques

Dans le domaine des analyses moléculaires, les tests immunologiques sont les plus couramment utilisés. Bien qu'ils fassent appel à des techniques de lecture en fluorescence, la majeure partie des tests actuels commercialisés font partie de cette famille (test ELISA, Western Blot ...). La Figure 12 décrit les possibilités de marquage en fluorescence d'une entité sur une puce d'analyse.

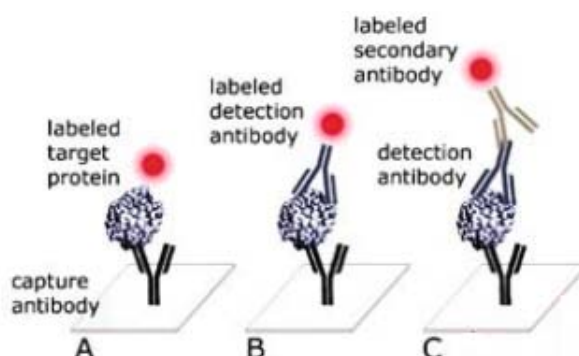


Figure 12 : Détection d'interactions moléculaires, basée sur une puce à anticorps lue par fluorescence

L'exemple de la figure précédente porte sur une puce à anticorps. Afin de traduire l'information biologique, un marqueur fluorescent doit être ajouté et couplé de façon covalente à une protéine, soit directement sur la cible à détecter (A), soit indirectement en deux étapes grâce à un anticorps marqué (B), soit indirectement en trois étapes grâce à un anticorps secondaire marqué (C).

De nombreuses sociétés (Abbott Diagnostic, Illumina ...) développent des biopuces de détection basées sur ce type de test. Greiner One propose des puces de diagnostic de différents virus (Papilloma Virus par exemple avec le support PapilloCheck). Perkin Elmer propose quant à lui des supports pour des analyses prénatales afin d'analyser d'éventuelles trisomies (13 et 18).

- ❖ **Les limites de détection de ces tests sont inférieures au nanoMolaire.**
- ❖ **La limitation des interactions non-spécifiques sur les puces proposées par Abbott Diagnostic se fait par incubation d'une solution de BSA dans un tampon de Tris HCl (50 mM Tris-HCl, pH 7.5).**⁵⁵

b. Lab-on-chip

Miniaturiser une puce d'analyse permet d'augmenter sa densité de tests mais aussi permet de libérer de la place pour incrémenter des fonctions supplémentaires. Dans cette optique, nous constatons un intérêt grandissant ces dernières années pour les systèmes « tout-en-un », appelés Lab-on-chip. Le Lab-on-Chip est un dispositif intégré rassemblant, sur un substrat miniaturisé, une ou plusieurs fonctions de laboratoire. Ce système complexe combine des avancées technologiques en micro ou nano-fluidique, en micro et nano fabrication ainsi qu'en transduction, voir amplification de signal. La réduction de l'échelle de travail permet, d'augmenter la rapidité des tests effectués et d'utiliser beaucoup moins de matériel biologique, de par la faible quantité de solution requise.

Ces nombreux avantages ouvrent des domaines d'applications très diverses (diagnostic clinique, recherche pharmaceutique, qualité des denrées alimentaires ...) ⁵⁶ et notamment dans le domaine des POC (point-of-care) où la rapidité des analyses au plus proche du patient est impérative.

Claros Diagnostics propose une technologie de diagnostic moléculaire basée sur un test immunologique. Parmi la gamme développée ou en développement, nous avons choisi de présenter la biopuce appelée, mChip ⁵⁷, qui a été utilisée pour diagnostiquer le virus VIH ainsi que la syphilis sur une population rwandaise, dans des conditions réelles d'utilisation hors laboratoire. Cette puce permet de mimer toutes les étapes d'un test ELISA sur une surface miniaturisée à bas coût et dans des conditions de travail différentes de celles d'un laboratoire. Grâce à un échantillon de 1µL de sang humain non traité, en seulement 20 minutes, 70 personnes ont pu être diagnostiquées avec un seul faux positif. Le système de microfluidique développé est un arrangement de canaux sinueux fabriqués sur une puce en polystyrène et COC (Copolymère d'Oléfine Cyclique) pour un coût inférieur à 0.10\$. L'injection des fluides dans la puce se fait manuellement à l'aide d'une seringue. L'échantillon sanguin non traité est amené en contact des 4 zones d'analyses présentes sur la puce et recouvertes de molécules sondes : antigènes VIH et antigènes syphilis, puis deux zones de contrôles (*Figure 13*). Une fois que l'échantillon est injecté dans la puce, une étape de rinçage et d'injection d'anticorps IgG conjugués à une nanoparticule d'or est effectuée. Elle permet de former le sandwich qui va permettre de détecter la présence des anticorps spécifiques du VIH et de la syphilis. Ensuite, une étape d'amplification de signal a lieu grâce à la réduction d'ions argent sur les anticorps marqués avec les nanoparticules d'or.

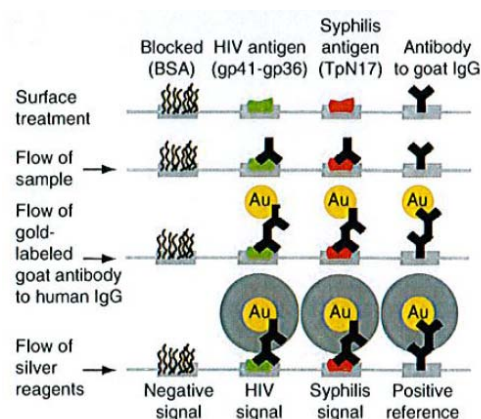


Figure 13 : Principe de fonctionnement de la puce mChip⁵⁷ basée sur un test ELISA.

La densité optique du film d'argent peut ensuite être lue par un simple rayon lumineux (LED ...) lorsqu'on fait passer des bulles d'air dans les zones de détection. Cette technologie avancée de lab-on-chip est un très bon exemple de combinaison entre challenges technologiques et maîtrise des coûts. L'entreprise WaferGen possède également différents brevets, portant sur des Lab-on-chip dont les produits sont en commercialisation (Smart Slide).

2. Techniques de biodétection sans marquage commercialisées

Nous nous concentrerons maintenant sur les méthodes de détection sans marquage commercialisées. De part la nature du marché, complexe et en constante évolution, toutes les techniques ne seront pas ici décrites mais nous détaillerons les plus couramment utilisées en laboratoire ou dans l'industrie.

a. Biodétection mécanique : la micro balance à quartz (QCM)

Les sociétés QSense et Attana Sensor Technology proposent des instruments d'analyses de biodétection appelés micro balances à quartz ou QCM. La QCM est une technique de caractérisation mécanique permettant d'enregistrer les variations de la fréquence de résonance d'un cristal de quartz par rapport à l'adsorption de masse à sa surface. Un fin disque de quartz (environ 200-400 μm d'épaisseur) est placé entre deux électrodes d'or (Figure 14A). Comme le quartz est un matériau piézoélectrique, il est possible de le faire entrer en résonance en appliquant une tension alternative grâce aux deux électrodes de contact (Figure 14B).

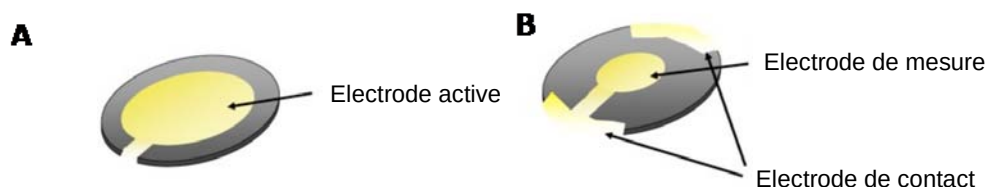


Figure 14 : Cristal de quartz sur lequel repose le phénomène de résonance piézoélectrique mis en jeu en QCM

La fréquence de résonance du cristal dépend de la masse totale du système. Lorsqu'il entre en résonance, il oscille à une fréquence qui lui est propre (Figure 15A). Si un mince film supplémentaire de matière vient s'adsorber à la surface du disque de quartz (Figure 15B et C), la masse totale change. La fréquence de résonance du quartz va diminuer (Figure 15D).

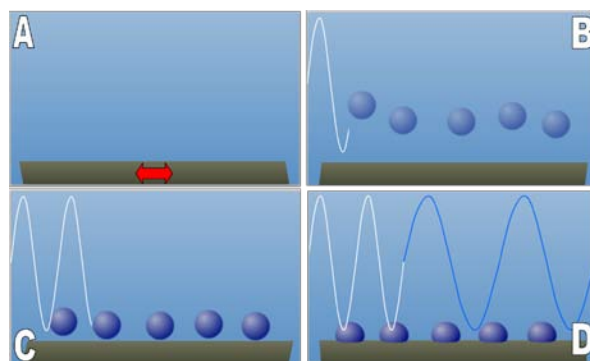


Figure 15 : Principe de fonctionnement de la QCM.

L'équation de Sauerbrey décrit ce changement fréquentiel : $\Delta m = -\frac{C \cdot \Delta f}{n}$

Δm : masse adsorbée
 Δf : variation de fréquence
 $C = 17.7 \text{ ng.Hz}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ pour un quartz de 5 MHz
 $n = 1,3,5,7$ est l'harmonique utilisée

Il est donc possible de suivre en temps réel l'adsorption de molécules sur le quartz. Il est possible de fonctionnaliser la surface du quartz pour observer l'interaction de couches moléculaires face à l'adsorption d'une solution. La QCM reste une technique d'analyses d'interactions moléculaires de laboratoire, de par la faible quantité d'études en parallèle qui peuvent être menées.

- ❖ **La limite de détection de la QCM est proche du microMolaire.**
- ❖ **La question des interactions non-spécifiques n'est pas vraiment adaptée au cas de la QCM car la surface du quartz est entièrement recouverte par les molécules injectées en solution dans les chambres. On considère que si les temps d'injection sont suffisants, la couche moléculaire formée sur le quartz sera homogène sur la totalité de la surface. Ainsi, aucun site non-recouvert (de silicium, silicium oxydée, or en fonction de la nature du quartz) ne sera accessible pour de possibles interactions non-spécifiques. Par ailleurs, le lavage du quartz après interaction permet de s'assurer que les molécules qui n'auraient pas réagi de façon spécifique avec la couche moléculaire du quartz soient éliminées.**

b. Biodétection optique

i. SPR

La résonance plasmonique de surface, couramment appelée SPR a été utilisée en temps que technique de biodétection depuis les années 1980.⁵⁸ Les biocapteurs basés sur la SPR se sont ensuite largement démocratisés dans le courant des années 2000, avec notamment l'arrivée sur le marché d'instruments automatisés commercialisés par la société Biacore Life Sciences (de GE Healthcare) ou d'autres entreprises, comme Bio-rad ou Reichert Life Sciences. La grande quantité d'appareils commercialisés témoigne de la démocratisation de la SPR, qui s'est imposée comme une technique d'analyse d'interactions moléculaires de référence.

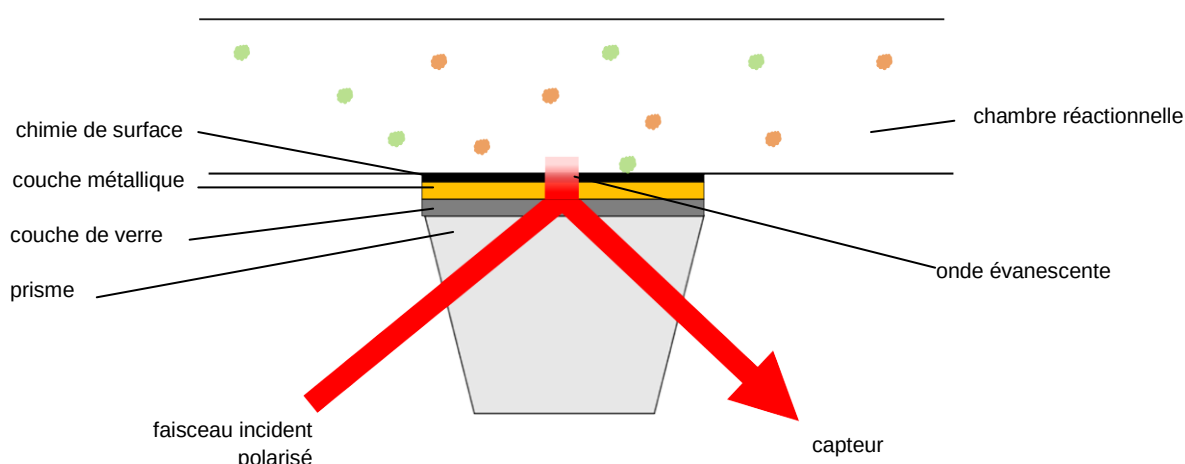


Figure 16 : Principe de fonctionnement d'un capteur à résonance plasmonique de surface

La Figure 16 présente le principe de fonctionnement. La puce, qui sert de support à l'analyse est composée d'un prisme recouvert d'une couche métallique, généralement de l'or que l'on fonctionnalise par la suite avec des molécules sondes. Pour des conditions d'illumination en réflexion totale, il est possible d'ajuster la longueur d'onde de rayonnement et l'angle d'illumination afin d'exciter l'oscillation des électrons libres de la couche d'or, grâce à l'onde évanescente. Cette onde évanescente voit son amplitude décroître exponentiellement avec la distance à la surface. L'interaction de molécules avec la surface d'or va modifier les conditions de résonance qui peuvent être analysées par simple mesure de l'intensité réfléchie, par déplacement de l'angle de résonance ou bien spectroscopiquement. L'onde plasmon joue le rôle de sonde dans le milieu où se situe la réaction biomoléculaire.

La société Genoptics, récemment rachetée par Horiba Jobin Yvon propose une gamme de biocapteurs basés sur la SPR.^{58b} Cette technologie, varie légèrement de la SPR dite classique et est appelée SPRI. Elle permet de combiner une détection sans marquage avec l'observation directe et simultanée de centaines d'interactions sur puce, déposées sous forme de spots sur la surface du prisme. L'image directe de toute la surface du prisme est observée et l'intensité de chaque spot est suivie au cours du temps.

Le taux de recouvrement de la surface (Γ mesuré en pg/mm^2), suite à la fixation de molécules, est calculé par la relation suivante qui permet de connaître la masse de molécules adsorbées sur la surface :

$$\Gamma = \frac{\Delta R \cdot L_{\text{sc}}}{S_{\text{P,R}} \cdot \partial n / \partial C}$$

Γ : taux de recouvrement
 ΔR : variation de réflectivité
 L : longueur de pénétration de l'onde évanescente
 $S_{\text{P,R}}$: sensibilité mesurée lors du calibrage
 $\partial n / \partial C$: l'incrément d'indice de réfraction, du à l'adsorption des cibles

Cette formule donne donc pour une variation de 1 % de la réflectivité (SRP) une adsorption de molécules de l'ordre de $180 \text{ pg}/\text{mm}^2$.

- ❖ **Le signal détecté peut être amplifié par différentes techniques, en augmentant les variations de masse dues à l'interaction de molécules sur la surface, grâce au greffage de nanoparticules d'or^{58c} ou en améliorant les fibres optiques^{59 60 61}. La limite de détection obtenue reste cependant inférieure à celle de la fluorescence. La détection de petites molécules (fragments d'ADN) reste problématique.**

- ❖ Plusieurs centaines de spots sont déposés à la surface du prisme pour les analyses d'interactions en temps réel. Cependant, les événements non spécifiques peuvent perturber ce suivi. Les prismes sont généralement saturés avec de la BSA ou du dextran (Biacore). Il y a de plus la soustraction d'un signal provenant d'une surface de contrôle pour s'affranchir de la perturbation provenant du bruit de fond de la surface.

ii. Interférométrie

La société Forte Bio (Pall Life Science) propose des biocapteurs basés sur des mesures d'interférométrie. Typiquement, une sonde est fonctionnalisée avec des molécules sondes et plongée dans un échantillon à analyser. Cette technique optique (Bio-Layer Interferometry) permet d'analyser la signature d'interférence d'un faisceau de lumière blanche réfléchi sur deux surfaces : une couche de protéines immobilisées sur la sonde du biocapteur et une couche interne de référence (Figure 17).

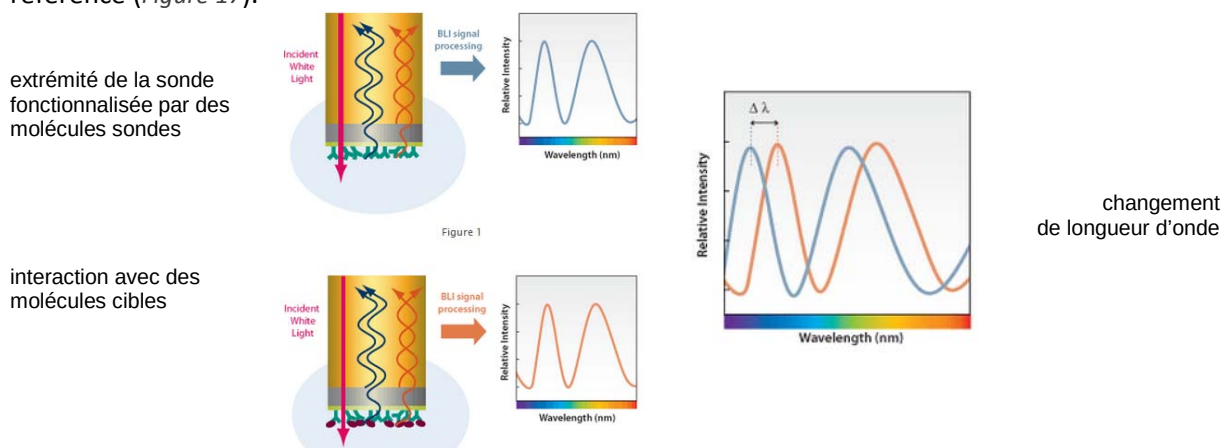


Figure 17 : Principe de fonctionnement des mesures interférométriques sur la sonde proposée. L'adsorption de molécules cibles sur la surface de la sonde induit un changement de longueur d'onde.

Si des molécules interagissent avec la surface du biocapteur, une variation dans le phénomène d'interférence aura lieu et se traduira par une variation des oscillations de l'intensité en fonction de la longueur d'onde. Les interactions moléculaires sont suivies en temps réel et la société propose une multitude de sondes comportant des chimies de surface différentes (streptavidine, anti-GST, anti-IgG ...) pour diverses applications. Cette technique a par ailleurs fait ses preuves pour la détection de molécules ayant un faible poids moléculaire (200-300 Daltons).^{62 63}

La sonde peut être plongée dans des puits de plaque de titration et permet de faire plusieurs analyses mais pas en parallèle (96 tests en 20 minutes).

- ❖ Les limites de détection obtenues sont situées entre 0.1 microMolaire et 0.1 nanoMolaire.
- ❖ Il n'y a pas d'approche de limitation d'interactions non-spécifiques pour ce type de capteur car on considère que la totalité de la surface de la sonde est couverte par une couche homogène de molécules sondes.

iii. Interférométrie sur des surfaces nano poreuses

La société Silicon Kinetics propose un instrument d'analyse d'interactions moléculaires basé sur un système d'interférométrie en lumière blanche couplé à une puce de silicium nano poreuse (Ski Sensors). La surface est composée de canaux poreux d'un diamètre de 80 nm pour une hauteur de 2 μm . Ces surfaces sont passivées avec une chimie de type silane, puis fonctionnalisées avec des chimies hydrophiles. Il n'est pas précisé plus de détail sur le type de passivation de surface mais l'OTS peut être le candidat utilisé. Les surfaces nano poreuses bi-fonctionnelles sont ensuite encapsulées dans des cellules fluidiques. Le montage optique permet d'envoyer un rayonnement lumineux sur la surface poreuse (Figure 18A).

Le faisceau réfléchi est focalisé sur un réseau de diffraction, d'où l'intensité lumineuse émise sera collectée par un photo-détecteur (Figure 18B). Des molécules sondes sont immobilisées à la surface des canaux. Lorsque des protéines interagissent avec la surface poreuse et viennent se lier aux récepteurs, une variation du spectre lumineux est observée. Le changement d'indice de réfraction dû à l'interaction moléculaire, provoque une variation du spectre lumineux. Ces variations sont proportionnelles à la masse de protéines liées à la surface. On peut donc en temps réel détecter des interactions de type protéines-protéines ou protéines-ADN. ⁶⁴ Les volumes de solution injectée sont très faibles (50 μL) pendant des temps courts (500 secondes) sur une cellule de référence et une cellule d'analyse.

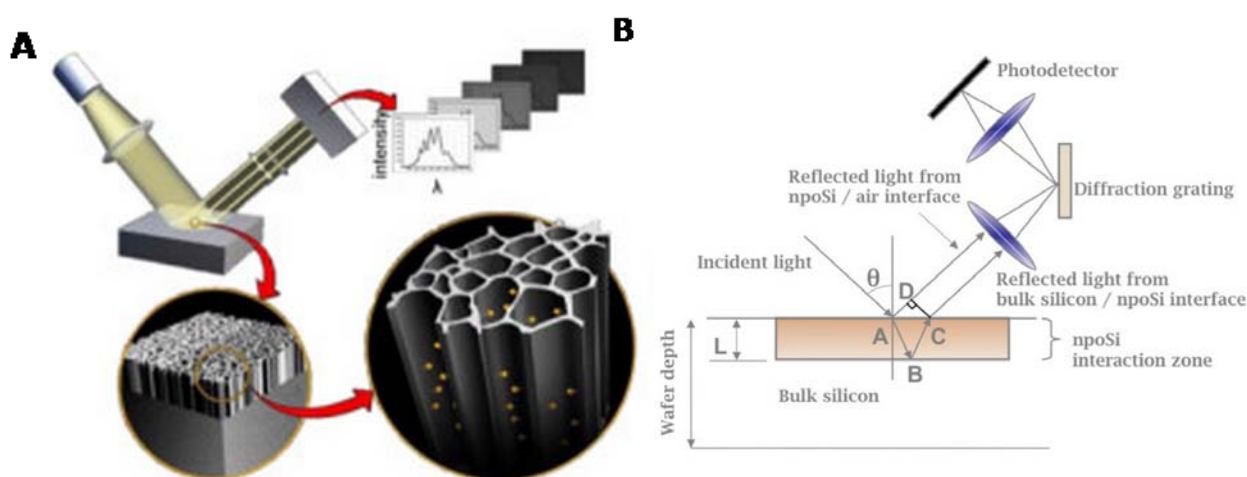


Figure 18 : (A) Schéma du substrat d'analyse composé de nano poreux, fonctionnalisés (B) Système d'analyse moléculaire

L'utilisation des canaux nano poreux permet d'effectuer des interactions, dites en 3 dimensions, aux travers de plusieurs couches moléculaires, comme l'aire de la surface de réaction est plus grande que sur des couches moléculaires classiques en 2 dimensions. La limite de détection est donc augmentée.

- ❖ Il a été montré que pour une interaction de type IgG/anti-human IgG pouvait être détectée à 100 ng/mL (alors que la même expérience menée en technologie SPR donne une limite de détection de l'ordre du 1 $\mu\text{g/mL}$).
- ❖ La question des interactions non-spécifiques est cruciale pour ce type de système, dont l'aire surfacique disponible est très importante à cause des canaux poreux. La technique de

passivation employée consiste à saturer 40% de la surface des nano pores grâce à un silane. Cette valeur assure apparemment un recouvrement suffisant pour que les molécules sondes injectées se concentrent sur le reste de la surface de silicium disponible.

iv. Diffraction d'un réseau moléculaire

La société Axela développe depuis 2001 une technologie de biodétection optique basée sur la diffraction de réseaux moléculaires. La plateforme proposée permet le suivi en temps réel d'interactions de protéines (dotLab), mais aussi l'analyse multiplexée de biomarqueurs oligonucléiques (de type ADN ou ARN) pour des tests en recherche clinique ou diagnostic. Cette technologie sera explicitée plus en détail au chapitre V.

3. Problématique

Dans le large panel de techniques d'analyses biomoléculaires commercialisées que nous avons détaillées, les biocapteurs varient de par leur performance, définie par des critères communs de limite de détection, de coût, de temps de réponse et du nombre d'analyses effectuées simultanément. Le *Tableau 1* récapitule les caractéristiques des techniques que nous avons abordées selon ces critères.

Méthodes	Marquage	Limite de détection	Tests en parallèle	Durée de l'analyse	Coût	Limitation des évènements non-spécifiques
Fluorescence	✓	< nM	+++	Plusieurs heures	+	Saturation de surface avec de la BSA ou du Tris-HCl
Interférométrie sur surface nanoporeuse	-	nM	+	Court	+	Saturation de surface avec un silane
QCM	-	μM	-	Plusieurs heures	+	-
SPRi	-	μM-nM	++	Plusieurs heures	+	Saturation de surface avec de la BSA Saturation des prismes avec du dextran

Tableau 1 : Performances des systèmes de biodétection rencontrés (+ : élevé, - : inexistant ou non adéquat)

Bien que les biocapteurs se différencient en termes de limite de détection, densité d'analyses en parallèle et durée de l'analyse, nous pouvons remarquer deux points communs à toutes ces techniques. Les biocapteurs commercialisés, aussi différents qu'ils soient, ont un coût d'analyse élevé et des techniques de limitation d'interactions non-spécifiques relativement peu développées. Ainsi,

les protocoles d'analyse incluent une étape de saturation de la surface grâce en large majorité à de la BSA. Cette phase de limitation d'interactions non-spécifiques reste cependant très classique. Les développements en biodétection effectués portent plus sur l'amélioration technique du biocapteur, que sur le support d'analyse. Seule la chimie de surface et particulièrement la sélectivité des molécules sondes employées font l'objet de recherche au niveau de l'amélioration des performances d'un substrat.

- ❖ Ce chapitre introductif a permis de mettre en évidence la présence d'interactions non spécifiques dans la majorité des biocapteurs commercialisés. Ces phénomènes perturbent la lecture d'une biopuce et entraînent des résultats erronés. Dans cette optique, nous avons décidé de travailler sur l'amélioration intrinsèque d'un substrat et notamment sur la chimie de surface qui le compose, afin de limiter les interactions non-spécifiques qui pourraient s'y dérouler. Ce défi et l'enjeu qu'il représente sera détaillé dans un chapitre dédié.
- ❖ Les approches mises en place devront tenir compte du critère du coût, autant au niveau de la structuration de la surface que des molécules employées.
- ❖ Bien entendu, le biocapteur développé doit aussi obéir aux critères communs de performance, définis plus haut, afin d'obtenir un système sans marquage pour ne pas dénaturer les molécules manipulées, hautement sensible, rapide et qui permet de tester un grand nombre d'interactions en parallèle. La technique de biodétection optique que nous avons développée, basée sur la diffraction de réseaux périodiques, peut répondre à ces critères.

IV/ Cahier des charges d'une plateforme de biodétection : définition du cadre de la thèse

Le marché de l'analyse d'interactions moléculaires est en constante expansion. La tendance qui se dessine actuellement commercialement est de fournir une plateforme d'analyse complète, où la biopuce est livrée au même titre que le système de lecture. Les Lab-on-chip représentent la version miniaturisée de ce type de plateforme tout-en-un.

Ce travail de thèse s'ancre dans le développement d'une plateforme de biodétection. A notre disposition, une technique de détection optique sans marquage, basée sur la diffraction de réseaux moléculaires, a été développée par le passé. D'après les critères de développement et les limitations rencontrées actuellement pour les biocapteurs, cette thèse portera sur deux axes.

Transfert de la technique de biodétection

La technique de détection basée sur la diffraction de réseaux moléculaires a été développée en laboratoire. Cette technologie sera expliquée dans un chapitre dédié. Le challenge de cette thèse consiste à transférer cette technologie en un outil automatisé de lecture, qui permettra de réduire les temps d'analyse.

- ❖ **Un prototype de lecture doit donc être développé et testé, en partenariat avec Innopsys qui finance cette thèse. Il servira par la suite aux tests d'analyses biomoléculaires pour des biopuces à protéines et des biopuces à ADN. Ce travail fera l'objet du Chapitre V.**

Fabrication de réseaux moléculaires

Nous avons vu que beaucoup d'efforts portent sur l'amélioration des performances des biocapteurs. Ils se différencient tous par des critères de fiabilité, de limite de détection, de rapidité d'analyse et de densité de tests effectués en parallèle. Cependant, un point commun les relie : les phénomènes d'interactions non-spécifiques qui se produisent sur un substrat limitent les analyses et perturbent la lecture, quelle que soit la technique de détection. Peu de développements portent sur l'amélioration des substrats. La limitation des interactions non-spécifiques est pourtant le point clé permettant d'augmenter la limite de détection et de fiabiliser les analyses. Cette étape est réalisée actuellement de manière très classique, par des protocoles de saturation de surface avec de la BSA.

- ❖ **Dans cette optique, nous avons décidé de travailler sur l'amélioration des propriétés intrinsèques d'un substrat, en développant des échantillons qui limitent l'adsorption non-spécifique de molécules.**
- ❖ **Le développement de techniques de bi-fonctionnalisation sera l'objet du chapitre III et IV.**

Par ailleurs, l'objectif de cette partie est de fabriquer des biopuces adaptées à la technique de détection à notre disposition, c'est-à-dire des réseaux moléculaires diffractants. Ces motifs, composés de lignes de molécules sondes doivent posséder une périodicité submicrométrique. Parmi les nombreuses techniques de fabrication de substrats moléculaires, la lithographie douce et donc le Microcontact printing présente des avantages considérables. Cette technique simple et peu coûteuse

permet de déposer des motifs moléculaires à haute résolution sur une surface, à une échelle micrométrique ou nanométrique. Il permet aussi de déposer des molécules de nature variée.

- ❖ **Le μ CP sera donc utilisé pour fabriquer les réseaux moléculaires sur les biopuces d'analyse puisqu'il est compatible avec les protéines et les oligonucléotides.**

Couplage des biopuces développées et du prototype de lecture automatisée

Ces biopuces seront destinées à l'analyse d'interactions moléculaires grâce au prototype de lecture. Une grande quantité de tests est nécessaire pour évaluer les performances du lecteur développé. Ainsi, les réseaux moléculaires doivent être générés en grand nombre et de façon standard.

- ❖ **Les dépôts par μ CP doivent donc être automatisés. A cet égard, un appareillage de dépôt par μ CP automatisé sera testé.**

Un autre enjeu de cette plateforme porte sur le coût. Il est question de réduire au maximum le coût de chaque étape nécessaire.

- ❖ **Nous verrons les approches développées pour utiliser les outils technologiques actuels de lithographie, qui répondent au besoin de multiplexage d'échantillon, tout en diminuant le coût des procédures.**

Ces deux points seront étudiés dans le Chapitre II.

Avec ce travail, nous obtenons finalement le développement d'une plateforme de biodétection à bas-coût, qui passe par la fabrication à grande échelle de biopuces composées d'une multitude de motifs moléculaires, limitant l'adsorption non-spécifique et destinées à des tests d'interactions entre protéines ou oligonucléotides, analysées en diffraction grâce à un scanner de lecture automatisée.

Références

1. J. Pritchard; H. Morgan; J. M. Cooper, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 91.
2. S. A. Sundberg; R. W. Barrett; M. Pirrung; A. L. Lu, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 12050.
3. C. P. H. B. Kiangoontra, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 12050.
4. S. Singh-Gasson; R. D. Green; Y. J. Yue; C. Nelson, *Nat. Biotechnol.* **1999**, 17, 974.
5. A. V. Lemmo; J. T. Fisher; H. M. Geysen; D. J. Rose, *Anal. Chem.* **1997**, 69, 543.
6. A. P. Blanchard; S. H. Friend, *Nat. Biotechnol.* **1999**, 17, 953.
7. J. Kimura; Y. Kawana; T. Kuriyama, *Biosensors* **1989**, 4, 41.
8. C. Heise; F. F. Bier, *Topics in Current Chemistry* **2005**, 261, 1.
9. T. N. Chang, *IEEE Trans. Autom. Sci. Eng.* **2006**, 3, 187.
10. A. Kumar; G. M. Whitesides, *Appl. Phys. Lett.* **1993**, 63, 2002.
11. Y. Xia; D. Qin; G. M. Whitesides, *Adv. Mater.* **1996**, 8, 1015.
12. Y. Xia; G. M. Whitesides, *Annu. Rev. Mater. Sci.* **1998**, 28, 153.
13. B. Michel; A. Bernard; A. Bietsch; E. Delamarche; M. Geissler; D. Juncker; H. Kind; J.-P. Renault; H. Rothuizen; H. Schmid; P. Schmidt-Winkel; R. Stutz; H. Wolf, *IBM Journal of R&D* **2001**, 45, 697.
14. A. Bernard; E. Delamarche; H. Schmid; B. Michel; H. R. Bosshard; H. Biebuyck, *Langmuir* **1998**, 14, 2225.
15. A. Bernard; J. P. Renault; B. Michel; H. R. Bosshard; E. Delamarche, *Adv. Mater.* **2000**, 12, 1067.
16. E. Delamarche; A. Bernard; H. Schmid; B. Michel; H. Biebuyck, *Science* **1997**, 276, 779.
17. E. Delamarche; A. Bernard; H. Schmid; A. Bietsch; B. Michel; Hans Biebuyck, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 500.
18. A. Perl; D. N. Reinhoudt; J. Huskens, *Adv. Mater.* **2009**, 21, 2257.
19. B. Michel ; A. Bernard ; A. Bietsch ; E. Delamarche; M. Geissler; D. Juncker; H. Kind; J. P. Renault; H. Rothuizen; H. Schmid; P. Schmidt-Winkel; R. Stutz; H. Wolf, *IBM J. Res. Dev.* **2001**, 45, 697.
20. A. Benahmed ; R. Lam; N. Rechner; C. M. Ho, *J. Micro-Nanolithog. MEMS MOEMS* **2007**, 6.
21. Z. Zheng; J. W. Jang ; G. Zheng; C. A. Mirkin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 9951.
22. Z. Zheng; W. L. Daniel; L. R. Giam; F. Huo; A.J. Senesi; G. Zheng; C. A. Mirkin, **2009**, 121, 7762.
23. J.-C. Cau. INSA de Toulouse, 2009, Biodétection optique sans marquage basée sur la diffraction de motifs moléculaires submicroniques.
24. H. Lalo. INSA de Toulouse, 2009, Réalisation d'une plateforme biopuce sans marquage, basée sur la lithographie douce.
25. J. C. C. H. Lalo , C. Thibault , N. Marsaud ,C. Severac , C. Vieu ,, *Microelectron. Eng.* **2009**, 86, 1428.
26. J. R. SP Fodor, MC Pirrung, L Stryer, AT Lu, D Solas,, *Science* **1991**, 251, 767.
27. E. A. W. D. J. Lockhart, *Nature* **2000**, 405, 827.
28. A. Milosavljevic; S. Savkovic; R. Crkvenjakov; D. Salbego; H. Serrato; H. Kreuzer; A. Gemmell; S. Batus; D. Grujic; S. Carnahan; T. Paunesku; J. Tepavcevic, *Genomics* **1996**, 27, 77.
29. K. Dill; L. H. Stanker; C. R. Young, *J. Biochem. Biophys. Methods.* **1999**, 41, 61.
30. S. Drmanac; D. Kita; I. Labat; B. Hauser; C. Schmidt; J. D. Burczak; R. Drmanac, *Nat. Biotechnol.* **1998**, 16, 54.
31. E. A. e. a. Winzeler, *Science* **1999**, 285, 901.
32. A. I. M. V. Espina, M. E. Winters, V. Calvert, J. Wulfschuhle, E. F. Petricoin, L. A. Liotta *Proteomics* **2003**, 3, 2091.
33. S. L. S. G. MacBeath, *Science* **2000**, 289, 1760.
34. G. S. E. Delamarche, H. Biebuyck, B. Michel, Ch. Gerber, H. Sigrist, H. Wolf, H. Ringsdorf, N. Xanthopoulos, H. J. Mathieu, *Langmuir* **1996**, 12, 1997.
35. J. A. Kusnezow W, Walijew A, Diehl F, Hoheisel JD., *Proteomics* **2003**, 3, 254.

36. J. V. L. Stephen P. FitzGerald, Robert I. McConnell, and El O. Benchikh,, *Clinical Chemistry* **2005**, 51, 1165.
37. F. H. Ulrike Korf, Christian Schmidt, Achim Tresch,, *Adv Biochem Engin/Biotechnol* **2008**, 110, 153.
38. C. B. Grosjean L, Mercey E, Roget A, Levy Y, Marche PN, Villiers M & Livache T. , *Anal Biochem* **2005**, 347, 193.
39. S. N. D. S. Wilson, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 494.
40. A. M. A. E. F. Petricoin, B. A. Hitt, P. J. Levine, V. A. Fusaro, S. M. Steinberg, G. B. Mills, C. Simone, D. A. Fishman, E. C. Kohn, L. A. Liotta, , *Lancet* **2002**, 359, 572.
41. C. D. H. Robinson, W. Hueber, B. B. Haab, M. Kamachi, E. J. Dean, S. Fournel, D. Fong, M. C. Genovese, *Nat. Med.* **2002**, 8, 295.
42. C. M. M. Lynch, J. Huff, S. Nettikadan, J. Johnson, E. Henderson *Proteomics* **2004**, 4, 1695.
43. C. S. Villiers M, Brakha C, Marche P, Roget A & Livache T. , *Methods Mol Biol* **2009**, 570, 317.
44. B. M., *PLoS One* **2012**, 5, 12152.
45. S.Q. Yao; M. Uttamchandani, *Current Pharmaceutical Design* **2008**, 14, 1.
46. K. Z. Luo, P.; Lodish, H. F., *Proc.Natl. Acad. Sci.* **1995**, 92, 11761.
47. Pr. WONG Chi-Huey, The Scripps Research Institute, California Campus.
48. S. R. Mercey E, Maillart E, Roget A, Baleux F, Lortat-Jacob H & Livache T. , *Anal Chem* **2008**, 80, 3476.
49. S. E. P. NLB., *Curr Opin Chem Biol* **2009**, 13, 626.
50. R. Karamanska, et al., *Glycoconj J* **2008**, 25, 69.
51. C.-H. H. Y. Liao, S.-C. Wang, C.-H. Liang, H.-Y. Yen, C.-Y. Su, J.-T. Jan, C.-T. Ren, T.-J. Cheng, C.-Y. Wu, C.-H. Wong,, *J. Am. Chem. Soc* **2010**, 132, 14849.
52. H. Moriguchi, N. Tamai, Y. Takayama, K. Kotani and Y. Jimbo, *IEEJ Transactions on Electronics, Information and Systems*, **2007**, 127, 1562.
53. S. W. Kevin R. King , Daniel Irimia , Arul Jayaraman , Mehmet Toner and Martin L. Yarmush, *Lab on Chip* **2007**, 7, 77.
54. J. M. Perkel, *Science* **2009**, 19, 1561.
55. E. P. Kartalov, *IVD Technolgy*, Multiplexed microfluidic immunoassays for point-of-care in vitro diagnostics, **2006**.
56. Zhu, *Adv Biochem Engin/Biotechnol* **2008**, 110, 81.
57. C. D. Chin, *Nat. Med.* **2011**, 17, 1015.
58. L. I. Liedberg *Sensors and Actuators B: Chemical* **1993**, 11, 63.
- 58b. Thèse Flavien Pillet, INSA de Toulouse, 2010, Développement d'un outil d'analyse d'interactions moléculaires basé sur la résonance plasmonique de surface (SPRi).
- 58c. Wu B & Wang Q. *Optica Applicata* **2009**, 39, 31.
59. J. R. Y. SS., *Sensors and Actuators B: Chemical* **1993**, 12, 213.
60. K. A. T. M. Hoa XD, *Biosens Bioelectron* **2007**, 23, 151.
61. O. H. Kurihara K, Iwasaki Y, Niwa O, Tobita T & Suzuki K., *Analytica Chimica Acta* **2004**, 523, 165.
62. Papalia et al, *Analytical Biochem* **2006**, 94, 105.
63. Myszkka, *Analytical Biochem* **2004**, 329, 316.
64. C. J. Latterich M, *Proteomics* **2008**, 6, 31.

CHAPITRE 2 :	35
NANO FABRICATION DE RESEAUX MOLECULAIRES	35
I/ REALISATION DE MOULES EN SILICIUM	36
1. OBJECTIFS	36
2. PROCEDE DE LITHOGRAPHIE	37
II/ TECHNIQUES DE LITHOGRAPHIE	38
1. LITHOGRAPHIE OPTIQUE PAR CONTACT OU EN PROXIMITE	38
2. LITHOGRAPHIE OPTIQUE EN PROJECTION	39
3. LITHOGRAPHIE ELECTRONIQUE	41
4. COMPARAISON	41
III/ FABRICATION DE MATRICES DE RESEAUX PERIODIQUES PAR LITHOGRAPHIE OPTIQUE PAR PROJECTION	43
1. PROCEDE MIS EN PLACE	43
2. STRUCTURES OBTENUES : CARACTERISATION DU MOULE	44
3. STRUCTURES OBTENUES : CARACTERISATION D'UN TIMBRE	46
IV/ DUPLICATION DES MOULES	48
V/ AUTOMATISATION DES DEPOTS PAR μCP	50
1. L'APPAREIL DE DEPOT PAR μ CP SEMI-AUTOMATISE	50
2. VARIABILITE ENTRE MOTIFS D'UNE MEME IMPRESSION	51
3. VARIABILITE ENTRE PLUSIEURS IMPRESSIONS	54
4. ETUDE COMPARATIVE AVEC UN ROBOT A AIGUILLES	55
VI/ MULTIPLEXAGE DES DEPOTS	56
1. DOUBLE DEPOT DE MOLECULES EN UNE SEULE IMPRESSION	56
2. UN TIMBRE EN PDMS PERMETTANT LE MULTIPLEXAGE : LE MACROTIMBRE	58
VII/ CONCLUSIONS	60
REFERENCES	60

CHAPITRE 2 :

Nano fabrication de réseaux moléculaires

Nous avons choisi d'immobiliser des molécules biologiques sur un substrat en utilisant la technique de lithographie douce appelée Microcontact printing (μ CP). Dans ce procédé, un timbre en élastomère est utilisé comme tampon encreur afin de transférer des molécules sur une surface selon des motifs organisés. Le timbre possède une topographie de surface, qui lui a été donnée par moulage sur une structure en silicium. Cette structure en silicium, appelé moule est donc la base du procédé de μ CP. Les motifs topographiques qu'il possède en surface vont dicter l'organisation des molécules sur un échantillon, tout comme l'échelle micrométrique ou nanométrique du dépôt. Plus les dimensions des structures présentes sur le moule sont réduites, plus il est possible d'augmenter leur densité sur la surface.

Cependant, la fabrication d'un moule en silicium dicte d'autres paramètres dans un procédé de μ CP. Cette étape impacte sur le coût général du procédé de dépôt. En effet, si la fabrication d'un timbre en élastomère, ainsi que le transfert de molécules sur la surface ne requièrent pas d'investissements technologiques coûteux. En revanche, la fabrication du moule en silicium fait appel des technologies développées pour la microélectronique, qui sont basées sur des outils de structuration de silicium lourds et onéreux. Ainsi, dans le procédé global de μ CP, l'étape de fabrication des moules est la plus longue et la plus onéreuse.

Dans cette partie, nous nous intéresserons aux outils à notre disposition pour réaliser les trois étapes principales de la fabrication d'une biopuce par μ CP : la fabrication de moule en silicium, les outils de dépôt et le multiplexage des substrats. Dans cette perspective, nous nous sommes donc intéressés en premier lieu à l'étape de structuration du silicium pour réaliser les moules mères utilisés en μ CP. Nous présenterons dans un premier temps les structures que nous souhaitons réaliser et les techniques de lithographie dont nous disposons. Nous aborderons les développements que nous avons réalisés afin de réduire le coût et le temps de procédé de fabrication des moules en silicium, qui seront par la suite utilisés pour effectuer des dépôts moléculaires par μ CP. Ensuite, afin de déposer simultanément une grande quantité de motifs sur une surface, nous avons étudié une technique de dépôt par μ CP automatisée. Nous étudierons si les dépôts moléculaires obtenus ont une définition et une régularité comparable à d'autres techniques de dépôt, comme un robot à aiguilles notamment. Pour finir, nous détaillerons les techniques de multiplexage que nous avons envisagées.

I/ Réalisation de moules en silicium

1. Objectifs

Dans ce travail de thèse, les dépôts que l'on souhaite réaliser sont des réseaux de diffraction, composés de lignes moléculaires de périodicité submicrométrique (généralement de 500 nm de largeur avec une périodicité de 1 μm). Les moules en silicium, utilisés dans le procédé de dépôt doivent donc posséder la même topographie de surface (Figure 1).

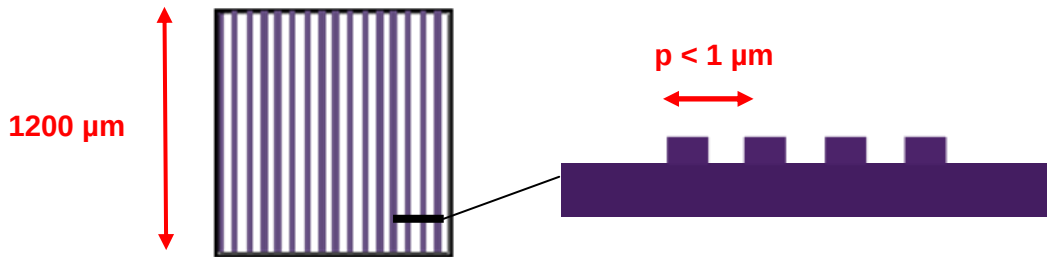


Figure 1 : Réseau de diffraction, composé de lignes dont la périodicité est submicrométrique

Une lame de microscope classique a une dimension de 76 x 26 mm. Nous souhaitons déposer des réseaux moléculaires sur une zone de 60 x 20 mm sur cette lame. Cet arrangement ordonné de réseaux est appelé matrice. Si nous fixons la périodicité de ces matrices à 2.25 mm, nous pouvons alors déposer une matrice de 25 colonnes et 12 lignes de réseaux sur une lame de microscope. Les timbres en PDMS utilisés pour déposer ces réseaux par μCP doivent donc posséder cette topographie particulière, tout comme les moules en silicium sur lesquels ils sont moulés.

Cette volonté de posséder une forte densité de structures à l'échelle nanométrique sur une large surface en silicium, reste un challenge technologique. Afin de réaliser plusieurs matrices sur un même moule en silicium, un wafer 6 pouces est privilégié.

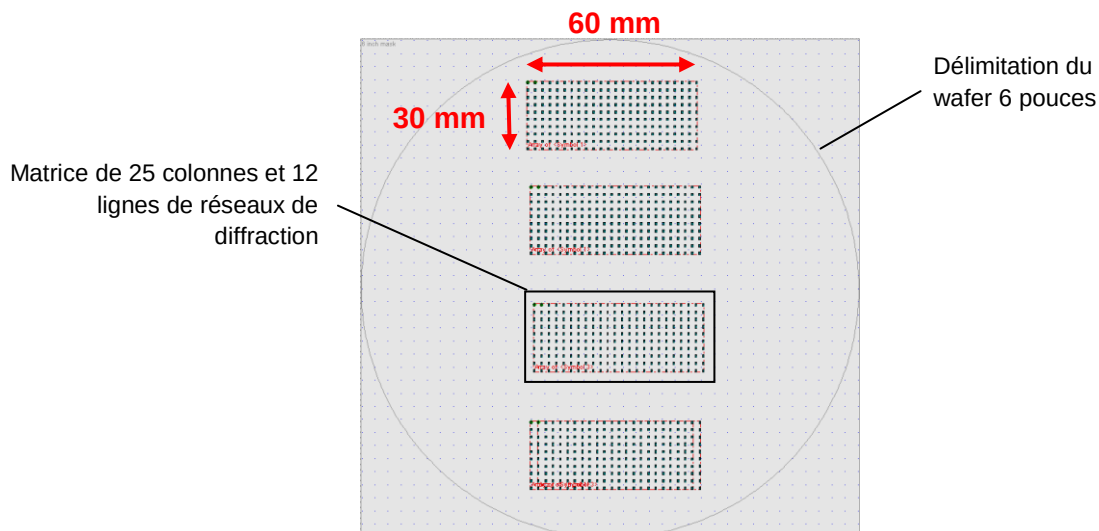


Figure 2 : Wafer de silicium souhaité, possédant 4 matrices distinctes de 25 colonnes et 12 lignes de réseaux de diffraction, composés de lignes de périodicité submicrométrique.

La *Figure 2* présente ce que nous souhaitons obtenir : 4 matrices distinctes, de 25 colonnes et 12 lignes de réseaux périodiques (1200 μm de côté et composés de lignes de 500 nm au pas de 1 μm). Ces matrices en silicium seront ensuite utilisées pour mouler les timbres en PDMS, qui serviront au dépôt par μCP de réseaux moléculaires.

2. Procédé de lithographie

Pour réaliser ces structures topographiques en silicium, nous avons à notre disposition des techniques de lithographie, qui seront détaillées au paragraphe suivant. La *Figure 3* positionne l'étape de lithographie dans le procédé global de fabrication des moules en silicium.

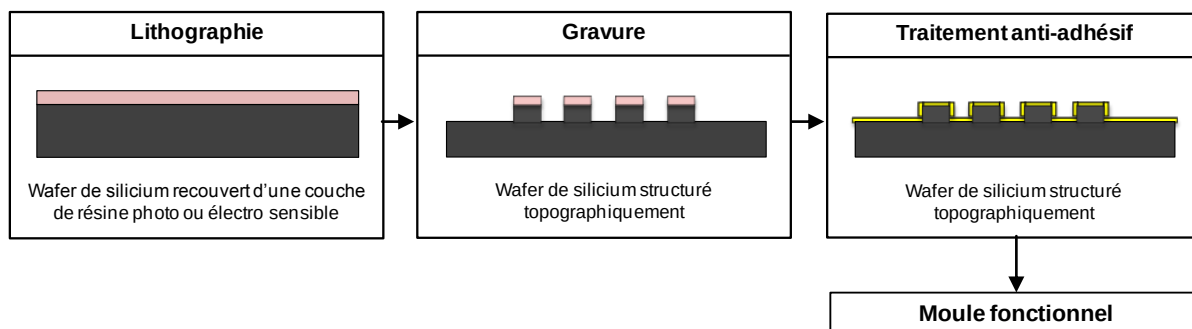


Figure 3 : Procédé de fabrication global d'un moule en silicium fonctionnel

La lithographie est la première étape du procédé de fabrication d'un moule en silicium. Elle consiste à recouvrir une plaquette de silicium d'une très fine couche de résine, photo ou électro sensible afin de définir, par des procédés d'insolation, des motifs dans cette résine. Ces motifs permettent ensuite de protéger certaines zones du wafer lors de l'étape suivante, qui consiste à graver physiquement la matière afin d'obtenir des structures topographiques en relief sur la surface. Enfin, le moule reçoit un traitement de surface anti-adhésif, généralement une couche monomoléculaire d'alkylsilane de type OTS que l'on greffe sur la surface. Ce traitement va permettre un bon démoulage des timbres en élastomère qui seront répliqués sur les structures en silicium, ainsi qu'une meilleure conservation dans le temps.

Il s'agit maintenant de déterminer quelles techniques de lithographie vont nous permettre d'obtenir les moules en silicium que l'on souhaite, composés de matrices de réseaux de diffraction.

II/ Techniques de lithographie

Dans cette partie, nous détaillerons les techniques de lithographie que nous pouvons utiliser pour générer des structures topographiques sur un moule en silicium. La lithographie optique, en contact, en proximité ou en projection, et la lithographie électronique sont à notre disposition. Nous déterminerons quelle technique convient le mieux pour réaliser les matrices de réseaux nanométriques que nous souhaitons en intégrant les critères de vitesse d'écriture, de résolution et de coût.

1. Lithographie optique par contact ou en proximité

La lithographie optique par contact ou en proximité, communément appelée photolithographie a été principalement développée pour répondre aux besoins de la microélectronique, et reste encore aujourd'hui utilisée pour la plupart des procédés industriels. Elle consiste à insoler par un rayonnement lumineux dans l'UV, une plaquette de silicium préalablement enduite d'une résine photosensible (*Figure 4A*), au travers d'un masque comportant des zones transparentes et opaques. L'insolation au travers de ce masque (*Figure 4B*) va permettre de modifier chimiquement certaines zones de la résine selon les motifs présents sur le masque (en fonction de la polarité de cette dernière, les zones ayant reçu un rayonnement lumineux sont soit fragilisées soit durcies). Les structures sont ensuite révélées par un développement en phase liquide qui dissout la couche de résine sélectivement (*Figure 4C*).

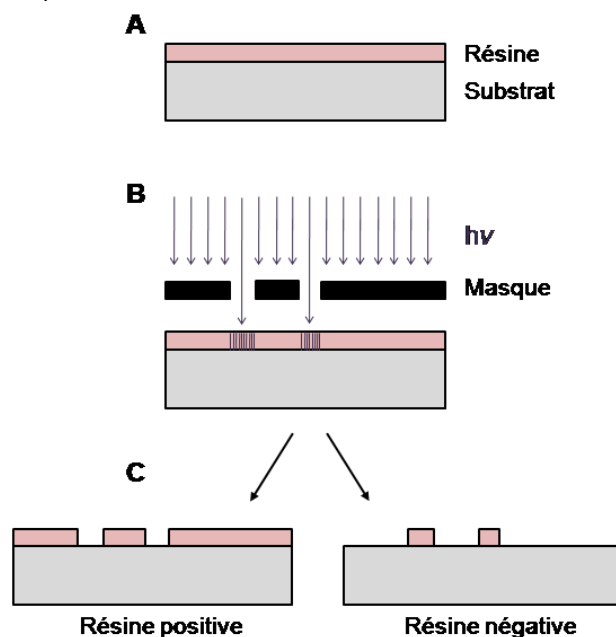


Figure 4 : Principe général de la lithographie optique par contact ou en proximité, sur une résine de polarité positive ou négative (A) Dépôt du film de résine par enduction centrifuge aussi appelé spin-coating (B) Insolation au travers d'un masque de quartz comportant des motifs transparents et opaques en chrome (C) Développement par traitement chimique révélant les motifs présent sur la plaquette de silicium

Dans le cas des résines, dites positives, la partie insolée qui est fragilisée est dissoute dans le révélateur. L'image latente laisse place à l'image concrète du motif. Inversement pour les résines négatives, les parties non insolées vont être dissoutes.

Les motifs présents sur le masque vont donc apparaître sur la plaquette de silicium qui pourra par la suite être attaquée en profondeur, chimiquement ou physiquement par des techniques de gravure comme par exemple la RIE, Reactive Ion Etching. Durant cette étape, les zones non protégées par la résine sont gravées. Nous obtenons donc une plaquette en silicium comportant des structures ou motifs en relief à l'échelle micrométrique répondant à nos besoins de structuration de la matière.

Le terme de contact ou proximité provient en fait de l'éloignement du masque par rapport au wafer enduit de résine. Certains procédés peuvent s'effectuer avec le masque légèrement éloigné du wafer, pour le protéger de la résine qui recouvre le wafer. Ce léger éloignement entraîne cependant une perte dans la résolution des motifs en raison du phénomène de diffraction.

La lithographie optique en contact ou en proximité est une technique de fabrication parallèle, c'est-à-dire qu'il est possible de réaliser simultanément plusieurs structures sur une plaquette de silicium. Cette technique est relativement simple et surtout rapide.

La résolution est définie par la plus courte période (p) d'un réseau constitué de lignes de largeur $p/2$, espacées d'une distance de $p/2$, qu'il est possible de fabriquer. Ainsi, la résolution des structures est donnée par la relation suivante :

$$p = 3 \cdot \sqrt{\left(\frac{\lambda}{n} \cdot \left(g + \frac{d}{2}\right)\right)}$$

avec λ la longueur d'onde de la source utilisée, n l'indice de réfraction de la résine, d son épaisseur et g la distance entre le masque et la résine.

Pour le système que nous avons à disposition ($\lambda=365$ nm, $g=3$ μ m, $n=1.6$ et $d=500$ nm), la résolution des structures est de l'ordre du micron.

❖ **La lithographie optique en contact ou proximité nous permet d'obtenir une résolution maximale proche du micromètre. Nous souhaitons fabriquer des réseaux de lignes dont l'épaisseur est submicrométrique. Ainsi, la lithographie optique en contact ou en proximité ne pourra être utilisée.**

2. Lithographie optique en projection

La plateforme technologique du LAAS CNRS s'est dotée récemment d'un outil de lithographie optique en projection, qui est donc à notre disposition. La particularité de cet instrument est qu'il fait appel à une technique de photo-répétition que nous allons détailler. Comme tout appareil de lithographie optique, il est nécessaire d'exposer une résine photosensible via un système optique complexe permettant l'insolation de la résine selon les motifs d'un masque. Le système d'illumination est constitué d'une source et d'un condenseur (Figure 5). La source lumineuse émet un rayonnement contrôlé en intensité à une longueur d'onde de $\lambda=356$ nm, pour la machine utilisée. Ce rayonnement traverse ensuite un condenseur, dont le rôle est de collecter, filtrer et mettre en forme le rayonnement issu de la source pour assurer une illumination uniforme sur la totalité du masque. Le faisceau lumineux passe ensuite à travers le masque où les motifs à répliquer sont reproduits. Les rayonnements incidents sont alors diffractés au niveau du masque. Enfin, un système d'alignement et de lentilles de projection forme une image des motifs du masque sur le substrat avec une taille de motifs finaux divisée par 5 par rapport à celle du masque.

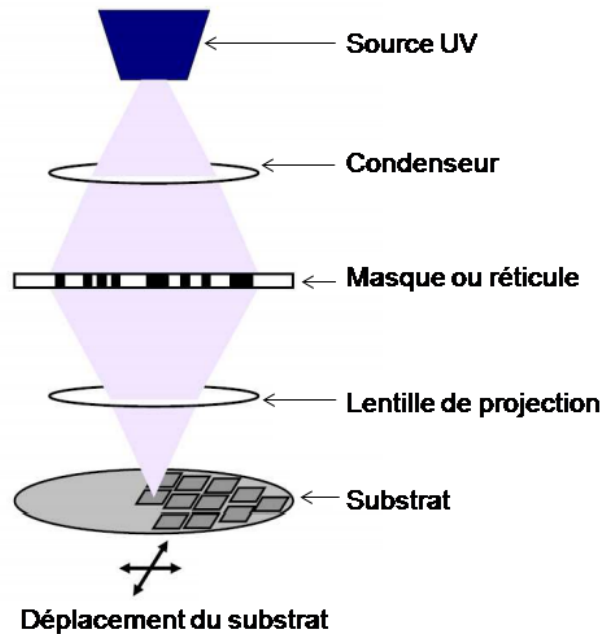


Figure 5 : Schéma général d'un outil de lithographie optique par projection

Dans cette configuration, l'image du masque est projetée sur le substrat qui est déplacé par pas successifs afin de recouvrir toute sa surface. La lithographie optique en projection est donc partiellement parallèle. Les motifs sont obtenus sur toute la surface de la plaquette par photo-répétition, d'où le nom de photo-répéteur de cet outil. Grâce à cette approche, il est possible d'exposer de grandes surfaces de silicium, typiquement des wafers de 6 pouces en un temps très réduit. Par exemple pour notre projet, 4 matrices (25 colonnes et 12 lignes) de réseaux périodiques submicrométriques sont insolées sur un wafer 6 pouces en 10 minutes.

La résolution des structures est définie par la relation suivante, dit critère de Rayleigh :

$$R = k_1 \cdot \frac{\lambda}{NA}$$

avec λ la longueur d'onde de la source utilisée, NA l'ouverture numérique de la lentille et k_1 le coefficient introduit pour tenir compte des différentes conditions de procédé telles que le contraste de la résine et son développement, la cohérence de la source ...

La résolution des motifs que l'on peut atteindre avec l'instrument disponible au LAAS (modèle Canon3000i4) est de 350nm.

- ❖ **La résolution atteignable avec l'instrument de lithographie optique en projection correspond à notre besoin. Nous pourrions donc générer des réseaux composés de lignes de périodicité submicrométrique par lithographie optique par projection.**

3. Lithographie électronique

La plateforme technologique du LAAS-CNRS de Toulouse possède un équipement de lithographie e-beam (aussi appelée lithographie par faisceau d'électron) de modèle RAITH150. La lithographie électronique repose sur l'insolation d'une résine électro-sensible (comme le PMMA qui est une résine positive) par un faisceau électronique finement focalisé, à partir d'un schéma pré-enregistré dans un ordinateur et réalisé point par point grâce à un logiciel de CAO (Conception Assistée par Ordinateur). Il n'y a donc pas de masque comme en lithographie optique. Le système est composé d'une colonne d'électrons (*Figure 6*) pour former le faisceau d'électrons, un porte échantillon et des contrôleurs électroniques (lentilles, déflecteur ...) afin de maîtriser le faisceau d'électrons jusqu'à la résine. Le faisceau d'électrons utilisé peut être focalisé au sein d'une sonde dont le diamètre peut se réduire à une dimension proche du nanomètre.

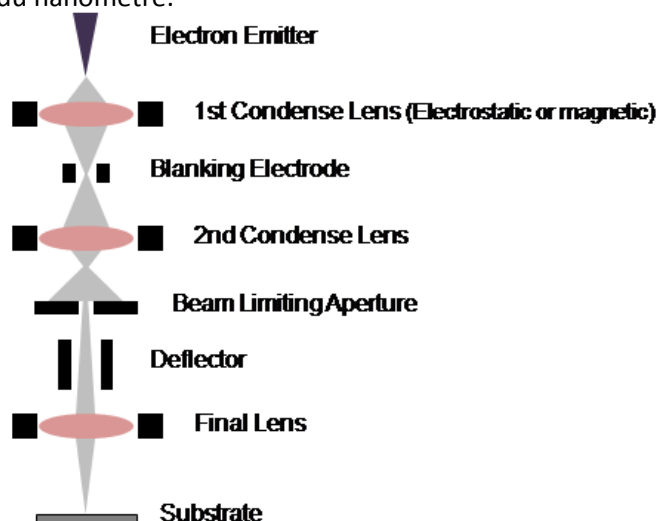


Figure 6 : Schéma d'un système de lithographie électronique

Par ailleurs, il n'est possible d'écrire que sur des champs de 100 μm par 100 μm avec notre système. L'écriture est directe et séquentielle, ce qui fait que la lithographie e-beam est lente. Typiquement, pour réaliser 16 réseaux de périodicité submicrométrique, il faut plus de 12 heures.

La principale limitation de résolution est entraînée par les électrons diffusés et électrons secondaires dans la matière qui insolent eux aussi cette dernière autour du point d'impact du faisceau.

La résolution du système de lithographie e-beam que nous possédons permet d'atteindre des résolutions ultimes, proches de 10 nm.

- ❖ **Le critère de résolution est parfaitement rempli. Il est possible de réaliser des réseaux de périodicité submicrométrique par lithographie e-beam.**

4. Comparaison

Grâce à ce bref récapitulatif des techniques de lithographie à notre disposition pour fabriquer des matrices de réseaux périodiques, nous allons pouvoir déterminer la technique la plus adaptée à nos besoins. Nos critères étaient la résolution des structures et le temps de fabrication. Le *Tableau 1*

rappelle ces paramètres pour chaque technique de lithographie. La lithographie optique en contact ou en proximité n'est pas dans ce tableau puisque elle ne permet pas d'atteindre la résolution submicrométrique que l'on souhaite.

	Lithographie optique par projection	Lithographie par faisceau d'électrons
Résolution	≈ 350 nm	≈ 10 nm
Temps	10 minutes	> 12 heures

Tableau 1 : Récapitulatif des deux techniques de lithographie à notre disposition pour fabriquer des matrices de réseaux périodiques

- ❖ **Au regard des critères ci-dessus, la technique de lithographie optique par projection paraît la plus adaptée à la fabrication des 4 matrices de 25 colonnes de réseaux, composés de lignes submicrométriques. Nous l'utiliserons donc pour réaliser nos moules en silicium. Le paragraphe suivant détaillera les structures obtenues.**
- ❖ **Le temps de fabrication nécessaire à la lithographie par faisceau d'électrons est rédhibitoire pour les structures que l'on souhaite.**

III/ Fabrication de matrices de réseaux périodiques par lithographie optique par projection

1. Procédé mis en place

La mise au point et le développement des étapes technologiques ont été effectués avec Laurent Mazenq et Veronique Conedera, ingénieurs de recherche au sein du service TEAM de LAAS-CNRS. Le procédé réalisé fut l'un des tous premiers développés à cette échelle avec le photo-répéteur. Un jour de programmation est nécessaire pour enregistrer la trajectoire du substrat ainsi que les temps d'insolation. Cette étape permet de programmer le déplacement du wafer afin d'insoler un motif de base sur le wafer et ainsi créer les 4 matrices (25 colonnes et 12 lignes) de réseaux souhaitées. Dans notre cas, ce motif est un réseau de diffraction de 1200 μm de côté, composé de lignes de largeur de 500 nm avec une périodicité de 1 μm . Lorsque ce programme est défini, le procédé de lithographie peut commencer. Les principales étapes sont brièvement détaillées ci-dessous :

- Elimination de la couche superficielle d'impuretés pour revenir au silicium natif sur la plaquette 6 pouces de silicium grâce à un bain de 2 minutes dans une solution de RT2 (mélange d'acides forts) suivi d'une rinçage à l'eau déionisée et séché sous flux d'azote.
- Dépôt d'une fine couche de promoteur d'adhérence (Hexamethyldisilazane ou HMDS) sur la plaquette, s'effectuant en phase vapeur au sein d'une étuve où le HMDS sous forme de gaz est introduit en présence du substrat
- Enduction de la plaquette de façon automatisée grâce aux pistes EVG 120. Enduction d'une couche de 1 μm de résine positive PFI 38A (Sumitomo Sumiresist)
- Recuit à 90°C pendant 60 sec.
- Insolation du wafer par lithographie optique par projection ($\lambda = 365 \text{ nm}$, dose : 1500mJ/cm², temps de réalisation des 4 matrices : 10 minutes).
- Recuit à 110°C pendant 60 sec.
- Développement en phase liquide dans le révélateur MF 26CD environ 40sec.

La *Figure 7* présente une photographie du wafer obtenu après ces étapes de procédé technologique. Le wafer est encore couvert de résine car la gravure n'a pas encore été effectuée, mais on distingue les matrices comportant les réseaux de diffraction insolés et révélés.

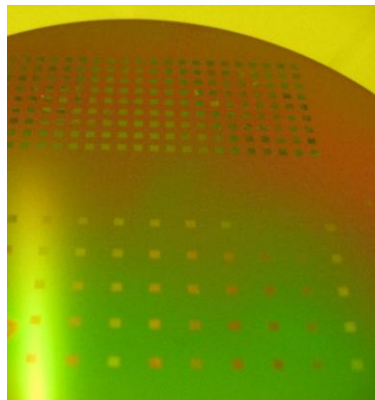


Figure 7 : Wafer de silicium 6 pouces insolés par lithographie optique en projection et observés après développement. Le motif de base apparaît sous forme de matrices.

L'étape suivante est la gravure sèche, qui consiste à attaquer le wafer en profondeur grâce à une gravure ionique réactive (RIE). Cette opération consiste à bombarder la surface du wafer recouverte de résine avec des ions afin de physiquement creuser le silicium. Comme les vitesses de gravure de la résine et du silicium sont différentes, les zones de silicium non protégées par la résine seront gravées plus rapidement en profondeur. Ce sont les motifs de la résine après développement qui servent directement de masque de gravure.

Pour ce faire, un gaz est introduit dans la chambre de gravure sous vide. Il est ionisé en un plasma réactif par l'intermédiaire d'un générateur radiofréquence qui excite une bobine placée autour de la chambre de gravure. Le plasma produit alors une attaque physico-chimique du matériau. Il en résulte des produits de réactions volatils qui sont évacués par le système de pompage (*Figure 8*).

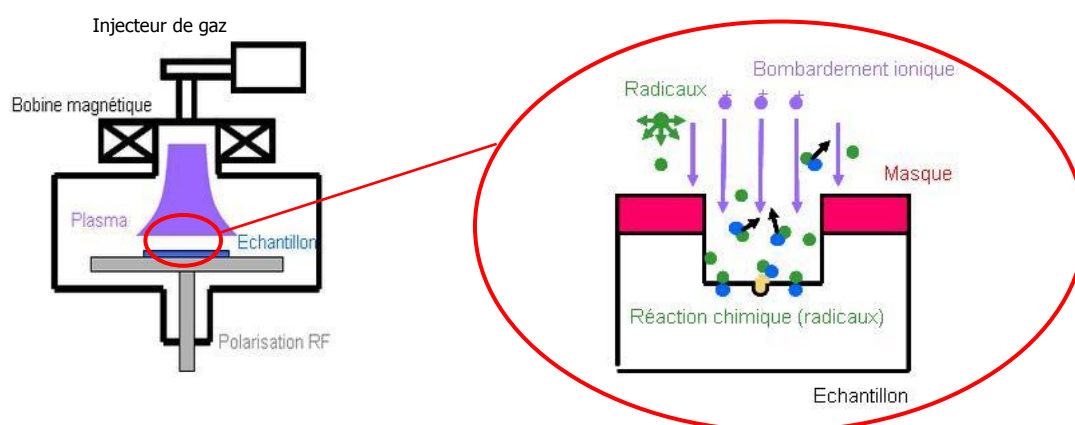


Figure 8 : Illustration d'un procédé de gravure ionique réactive RIE

La profondeur de gravure dépend de la dimension des motifs de la résine. Pour les structures que l'on utilise, la profondeur de gravure varie de 150 à 800 nm selon les moules de silicium souhaités. La résine présente sur le silicium est ensuite enlevée grâce à une étape de délaquage par traitement plasma O_2 .

2. Structures obtenues : caractérisation du moule

Le wafer de silicium, comportant les matrices de réseaux submicrométriques est alors caractérisé par microscopie électronique à balayage (MEB) afin de contrôler les structures obtenues. La *Figure 9* présente deux images MEB des lignes des réseaux présents sur le wafer. Dans ce qui suit, nous appelons lignes les parties rectilignes en relief sur la surface. Ces lignes sont bordées de cavité. Le dessin nominal des structures est tel que la largeur des lignes en relief (500nm) est égale à la largeur des cavités adjacentes (500 nm). Les cavités correspondent aux régions insolées lors de la lithographie qui ont ensuite été développées puis gravées par bombardement ionique réactif.

Ces images ont été réalisées à différents endroits du wafer. Les réseaux de diffraction possèdent des lignes de périodicité fixe de 1 μm . Leur largeur est légèrement inférieure aux 500 nm attendus, de par un développement en phase liquide légèrement trop long. La profondeur de gravure et l'aspect général des lignes peuvent être contrôlés par microscopie à force atomique (AFM).

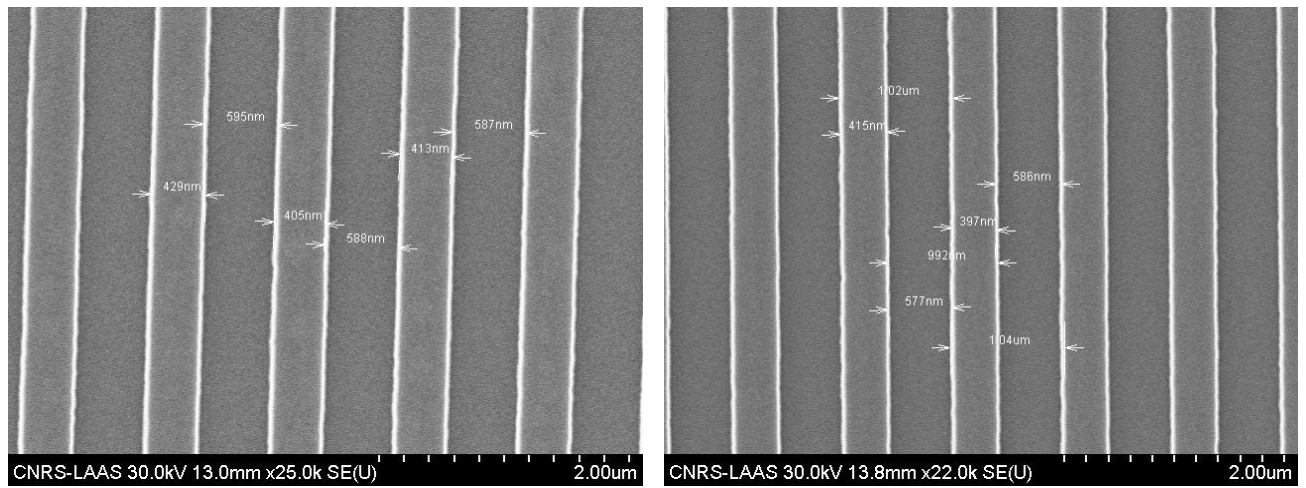


Figure 9 : Wafer de silicium, après insolation par lithographie optique en projection et gravure RIE. Les lignes observées composent les réseaux de diffraction, présents sur 4 matrices de 25 colonnes et 12 lignes.

La Figure 10 présente deux images AFM du wafer obtenu. Les fenêtres d'observation de $20\text{ }\mu\text{m} \times 20\text{ }\mu\text{m}$ (A) et $3\text{ }\mu\text{m} \times 3\text{ }\mu\text{m}$ laissent apparaître les lignes qui composent les réseaux de diffraction. Une grande reproductibilité au sein des lignes est observable. La profondeur des lignes gravées atteint 175 nm , pour le wafer présenté. Cette valeur correspond à une des plus faibles profondeurs de gravure avec laquelle nous avons travaillé. Généralement, il faut un facteur de forme (largeur/profondeur) proche de 1, c'est-à-dire dans notre cas une profondeur de gravure proche de 500 nm pour s'assurer que les structures répliquées sur le timbre en PDMS ne s'effondreront pas lors de l'étape de dépôt. Nous avons constaté qu'avec ce moule faiblement gravé, les timbres en PDMS générés ne s'effondrent pas lors de l'étape d'impression sur une lame. La profondeur de gravure de 175 nm est la limite minimale de la profondeur de gravure utilisable.

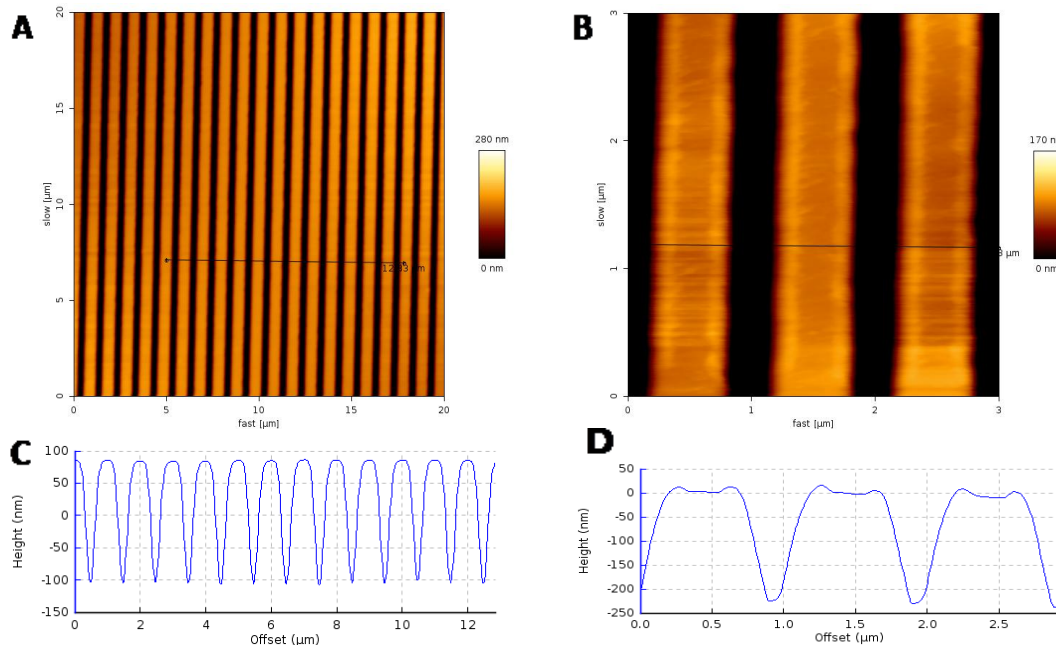


Figure 10 : (A) et (B) Image AFM obtenue en mode contact et à l'air d'un wafer de silicium obtenu par lithographie optique en projection. Les réseaux de diffraction sont composés de lignes nanométriques de 500 nm d'épaisseur avec une périodicité de $1\text{ }\mu\text{m}$. Signal de hauteur. (C) Profil de hauteur effectué sur une coupe transversale de $12\text{ }\mu\text{m}$ issue de l'image A (D) Profil de hauteur effectué sur une coupe transversale de $3\text{ }\mu\text{m}$ issue de l'image B.

3. Structures obtenues : caractérisation d'un timbre

Lorsque les dimensions des motifs sont validées par MEB et AFM, le wafer peut servir de moule pour le procédé de dépôt par μ CP. Pour cela, un traitement anti-adhésif est réalisé. Nous réalisons une fonctionnalisation de la surface du wafer en phase liquide par silanisation avec de l'Octadécyltrichlorosilane (OTS). Il s'agit simplement d'effectuer une oxydation par plasma O_2 (5 min, 1.5 mbar, 800 W) du moule afin d'éliminer les impuretés superficielles, un bain dans une solution d'hexane à 1% d'OTS (5min, rinçage à l'hexane). Notons que le trichloréthylène a été tout récemment interdit en laboratoire donc nous avons ajusté ce procédé initialement réalisé avec du trichloroéthylène par de l'hexane ou de l'opti-clear (solvant à base d'essence d'orange et d'alcool de maïs) en substitution. Ensuite, l'étape de fabrication des timbres en PDMS peut commencer. Une couche de polymère (PDMS) est étalée sur le moule puis l'ensemble est placé dans une étuve à 80°C pendant 4h. Après cette étape de réticulation pour que le timbre en PDMS prenne le relief négatif de la surface, les structures du timbre sont démoulées puis observées par AFM.

La *Figure 11A* présente une caractérisation AFM d'une zone de 20 μ m x 20 μ m du timbre en PDMS. La partie du réseau de diffraction visible est composée d'un enchaînement très régulier de lignes. Les lignes sont continues et bien définies. Il est difficile de commenter la largeur des lignes de part l'artefact de convolution du à la pointe AFM. Le profil de hauteur (*Figure 11B*) sur une coupe de 4 μ m montre que l'épaisseur des lignes est proche de 175 nm, ce qui correspond à la profondeur de gravure du moule. Pour finir le procédé de fabrication, nous avons encre un timbre en PDMS avec une solution de molécules de streptavidine, marquées en fluorescence avec le fluorophore Cy2 et effectuer une impression des molécules sur une lame de verre, préalablement nettoyée. La *Figure 11C* présente une image obtenue en microscopie à fluorescence de ce dépôt. Les lignes de molécules déposées sont très homogènes et ne présentent pas d'irrégularité. Il est donc possible de déposer à l'échelle submicrométrique avec une grande précision des réseaux de diffraction, issus d'un moule en silicium fabriqué par lithographie optique en projection.

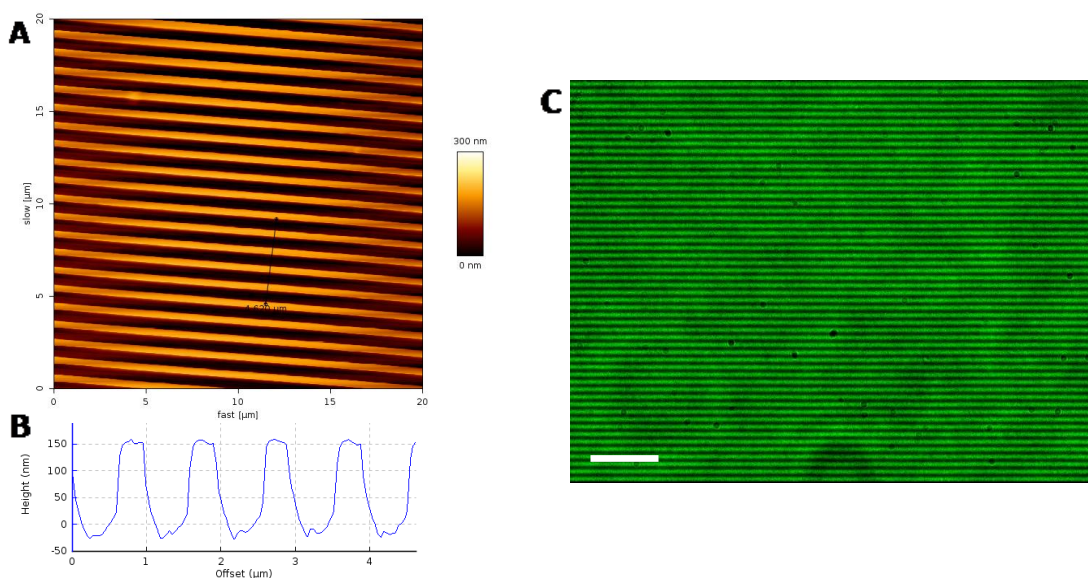


Figure 11 : (A) Image AFM obtenu en mode contact et à l'air du timbre en PDMS issu du moule réalisé en lithographie optique par projection. Signal de hauteur (B) Coupe transversale sur 4 μ m du timbre en PDMS (C) Dépôt de molécules de streptavidine, marquées en fluorescence, par μ CP effectué avec le timbre précédent. Barre d'échelle : 8 μ m.

- ❖ Nous avons démontré que la technique de lithographie optique en projection développée permet de générer des wafers de silicium comportant des matrices de réseaux de diffraction de périodicité égale à 1 μm , en quelques heures.
- ❖ Les réseaux moléculaires déposés par μCP avec un timbre, issu d'un moule réalisé par lithographie optique en projection, présentent une grande régularité et une très bonne définition des motifs à l'échelle submicrométrique.
- ❖ Avec les moules en silicium fabriqués, comportant 4 matrices de réseaux périodiques (25 colonnes et 12 lignes), nous allons pouvoir mouler des timbres en PDMS avec cette même topographie. Ces timbres permettront de déposer des réseaux moléculaires sur une zone de 60 x 30 mm d'une lame de microscope. Plus de 300 réseaux peuvent alors être déposés simultanément par μCP .

IV/ Duplication des moules

Dans notre démarche d'amélioration du procédé de μ CP, nous avons précédemment abordé les critères de temps de fabrication et de résolution des motifs présents sur un moule mère de silicium. Cependant, un critère reste à aborder et concerne le coût de ces procédés. L'étape de lithographie optique par projection, bien que largement moins onéreuse que la lithographie e-beam, reste chère. Les moules mères de silicium, utilisés pour fabriquer les timbres en PDMS sont la source principale du coût de ce procédé. Ainsi, lorsqu'un moule de silicium est généré, il est capital de le préserver en bon état et le plus longtemps possible. La couche de traitement anti-adhésif appliquée sur la surface améliore cette protection mais les nombreux moulages de PDMS impliquant de fortes contraintes en température les détériorent inexorablement. De plus, de par leur fine épaisseur (525 μ m) et leur dimension (6 pouces), les wafers de silicium présentent une grande fragilité.

Afin de les conserver le plus longtemps possible, nous avons cherché à mettre en place une technique de duplication de moule en silicium, qui s'implémente sur un procédé classique de lithographie douce. Cette méthode permet de dupliquer les motifs présents sur un moule en silicium, afin de générer une réplique en résine, qui peut être utilisée à son tour pour mouler des timbres de PDMS. Cette technique fait l'objet d'une publication ¹ que nous détaillerons brièvement. La réplique en résine comporte la même topographie que le moule de silicium. Le moule mère n'est donc utilisé qu'une seule fois, pour fabriquer son double en résine et est, à cet égard, préservé des nombreux moulages de timbres en PDMS. Cette technique de duplication est basée sur la lithographie par nano impression (NIL) et plus précisément sur une technique très proche, appelée lithographie douce par nano impression thermique assistée par UV (Thermal soft UV NIL). Le déroulement est quasiment identique à celui du NIL, à cela-prêt qu'une variation de température est ajoutée afin d'améliorer l'étape d'impression des motifs.

Nous souhaitons dupliquer un moule en silicium, qui comporte des réseaux de diffraction, composés de lignes de 500 nm de large à une périodicité de 1 μ m (*Figure 12A*).

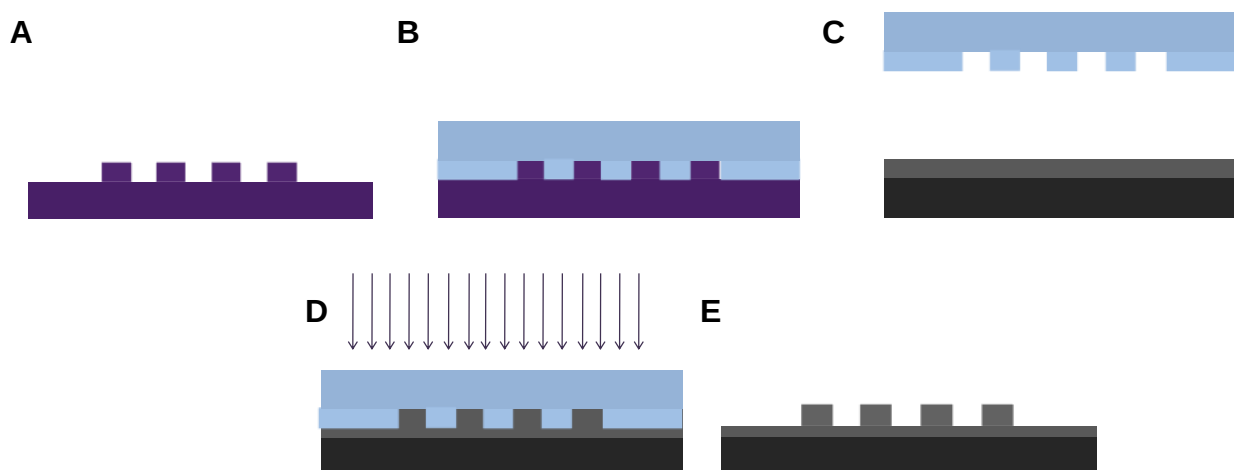


Figure 12 : Procédé de duplication de moule développé (A) Moule mère de silicium à dupliquer (B) Moulage d'un timbre en PDMS sur le moule mère (C) Ce timbre est ensuite utilisé pour imprimer les structures sur un substrat recouvert d'une fine couche de résine SU8 (D) Impression du timbre en PDMS avec légère montée en température pour ramollir la résine et aider à imprimer les structures. Insolation UV pour figer les structures (E) Retrait du timbre. Le moule en résine SU8 obtenu est une réplique du moule mère en silicium.

Un timbre en PDMS est moulé sur les réseaux en silicium (*Figure 12B*). Ce timbre, qui possède la topographie inverse de celle du moule, est ensuite utilisé pour l'étape de Thermal soft UV NIL (*Figure 12C*). Une fine couche de résine SU8 de 800 nm d'épaisseur est déposée par enduction centrifuge (spin coating) sur une lame de verre. La résine va ensuite être chauffée (jusqu'à 90°C) afin de la liquéfier légèrement pour favoriser l'insertion du timbre en PMDS lors de l'étape d'impression (*Figure 12D*). Cette phase est réalisée de façon automatique, à l'aide d'un outil d'impression dédié qui sera présenté dans le paragraphe suivant. Pendant 2 minutes, le timbre reste en contact avec la résine afin d'imprimer sa topographie. Le substrat est ensuite refroidi pendant 5 minutes grâce à un flux d'azote pour solidifier la résine topographiée et permettre un meilleur retrait du timbre. Le film de résine structuré est alors insolé par rayonnement UV afin de figer les motifs présents à la surface. Nous obtenons après retrait du timbre en PDMS un moule en résine SU8, comportant la même topographie que le moule mère en silicium initial (5% de variation sur les structures en hauteur, 10% de variation sur les structures en largeur).

La résine SU8 est un matériau chimiquement et mécaniquement stable donc non déformable, le moule en SU8 peut être utilisé en tant que moule de seconde génération pour générer des timbres en PDMS. Afin de s'assurer que les réseaux moléculaires déposés avec un timbre de PDMS issu du moule de résine SU8 sont similaires à ceux déposés avec un timbre de PDMS issu du moule en silicium, nous avons effectué un dépôt de streptavidine marquée en fluorescence avec ces deux timbres. La *Figure 13* présente l'observation en fluorescence des réseaux moléculaires déposés.

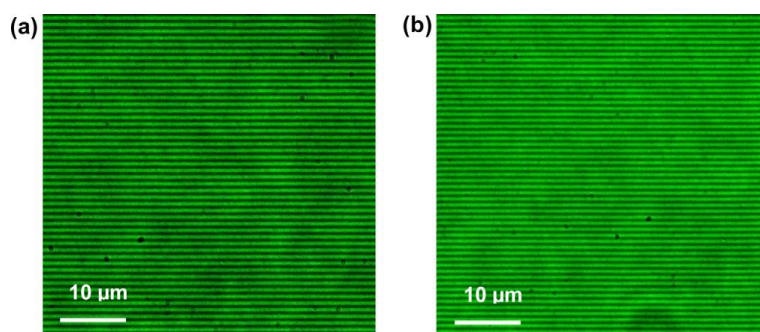


Figure 13 : Images obtenues en microscopie en fluorescence de réseaux de streptavidine déposés par μ CP avec (a) un timbre en PDMS issu du moule dupliqué en résine SU8 (b) un timbre en PDMS issu du moule mère de silicium

Les deux réseaux présentent des motifs similaires. Les lignes moléculaires obtenues par μ CP ont une grande régularité et correspondent aux motifs présents sur le moule original en silicium. Les motifs déposés par μ CP à l'échelle nanométrique avec un timbre issu sur le moule dupliqué en résine SU8 ont la même définition et régularité que ceux déposés avec un timbre issu du moule original en silicium.

- ❖ **Nous avons validé un procédé de duplication de moule en silicium fonctionnel à implémenter sur les étapes existantes de lithographie douce. Coupler la Lithographie par Nano Impression thermique assistée par UV avec le microcontact printing ouvre de nouvelles perspectives pour générer une forte quantité de moules en SU-8 sur lesquels des timbres de PDMS fonctionnels pourront être répliqués en un temps très court.**

V/ Automatisation des dépôts par μ CP

Le μ CP rencontre un franc succès en laboratoire car c'est une technique relativement facile à mettre en place et rapide à prendre en main. Les motifs moléculaires réalisés sont utilisés pour effectuer des tests ponctuels. Cependant, dès lors que l'on fabrique des échantillons en plus grand nombre, le μ CP manuel n'est plus adapté. Dans cette perspective, nous avons utilisé un outil de dépôt, provenant de la société GeSim, qui permet de déposer par μ CP des motifs moléculaires sur une surface de façon semi-automatisée. Notons ici que c'est le même instrument que nous utilisons pour effectuer la Nano Impression thermique assistée par UV, dans le but de dupliquer les moules en silicium (voir IV de ce chapitre). Nous cherchons dans un premier temps à caractériser les dépôts moléculaires réalisés grâce à cet outil et notamment les variations d'un dépôt à l'autre. En effet, les biopuces que nous souhaitons réaliser doivent être reproductibles, afin de pouvoir comparer les résultats des tests les uns avec les autres. De manière générale, la qualité du dépôt doit être uniforme (localisation des motifs, quantité de molécules déposées, épaisseur des couches,...). Fabriquer des substrats identiques facilite aussi la lecture des échantillons, qui sont analysés de façon plus systématique. Nous caractériserons donc dans un premier temps les variations au sein d'un même dépôt (variabilité intra-dépôt) effectué par μ CP automatisé et dans un second temps entre plusieurs dépôts (variabilité inter-dépôt).

1. L'appareil de dépôt par μ CP semi-automatisé

L'outil de dépôt par μ CP semi-automatisé fait partie de la plateforme technologique de l'Institut technologique avancé en Sciences du Vivant (ITAV). Il est composé d'une plateforme d'encrage et de séchage de timbres en PDMS sur la partie gauche de l'appareil (*Figure 14*) et d'une plateforme de dépôt sur la partie droite.

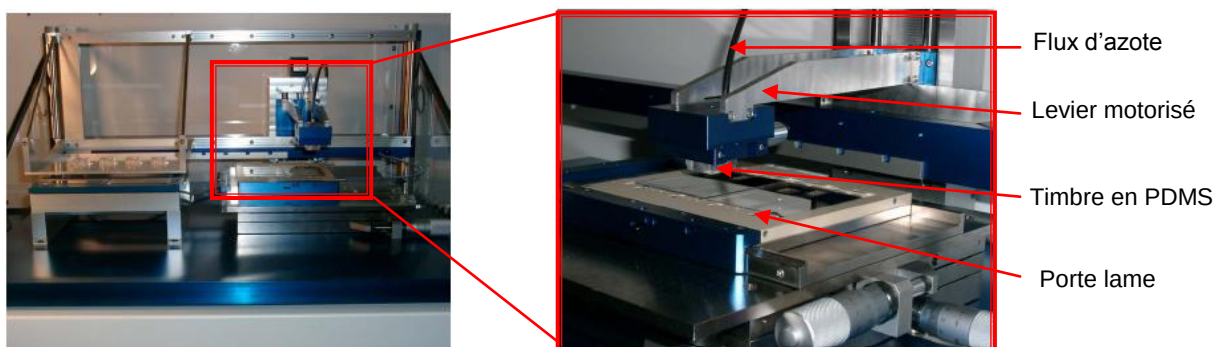


Figure 14 : Outil semi-automatisé, développé par la société GeSim permettant de réaliser des dépôts par μ CP et du soft UV NIL

Le timbre en PDMS est positionné par l'utilisateur sur un levier motorisé, qui par un système de préhension va pouvoir le maintenir et l'amener en contact avec une goutte de solution de molécules pour être encré. Ensuite, il est séché sous un flux d'azote éjecté par de petites seringues. Une fois le timbre encré et séché, l'utilisateur doit déplacer le timbre sur la partie droite de l'appareil dédiée à l'impression moléculaire. Le timbre est maintenu par le même type de levier, motorisé verticalement, qui va l'amener en contact avec le substrat à vitesse contrôlée.

Le timbre est composé d'une fine membrane de PDMS ($\approx 500 \mu\text{m}$) sur laquelle des motifs topographiques sont présents. Afin d'effectuer un contact homogène avec l'échantillon, la membrane de PDMS va être légèrement déformée par un flux d'azote (*Figure 15*). Les molécules encrées sur le timbre vont donc être transférées selon les motifs par un contact doux sur la surface de l'échantillon. Le temps de contact est défini par l'utilisateur. Ensuite, la membrane en PDMS revient à son état initial et le timbre est retiré. L'impression moléculaire peut être réalisée à l'échelle micrométrique mais aussi submicrométrique. Il est possible de réaliser plusieurs dépôts sur 4 lames en parallèle sans ré-encrage du timbre.

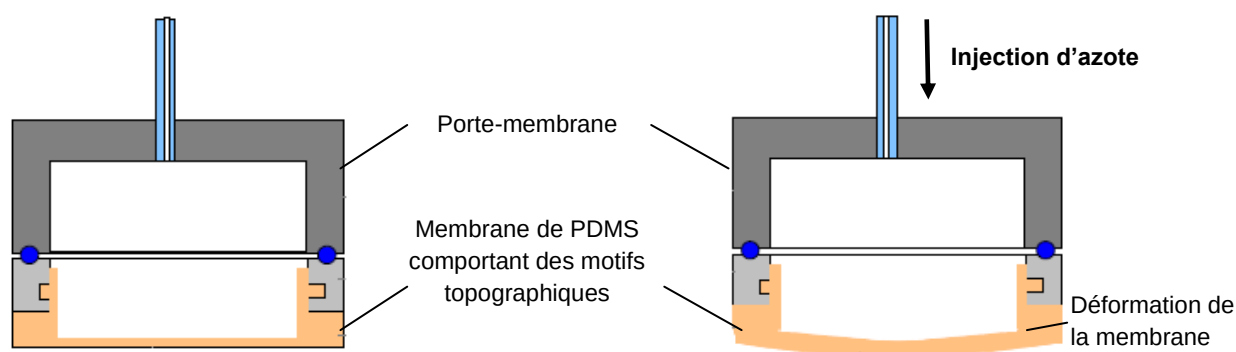


Figure 15 : Timbre de PDMS utilisé par l'outil de dépôt GeSim composé d'une membrane en PDMS sur laquelle les motifs micrométriques ou nanométriques sont moulés

La fabrication des timbres en PDMS s'effectue par moulage de la fine membrane sur des moules en silicium, obtenus par lithographie, et découpés en carrés de $15\text{mm} \times 15\text{mm}$. Avec le système actuel, c'est la taille maximale d'un timbre en PDMS et par conséquent d'un dépôt par μCP semi-automatisé avec cet outil.

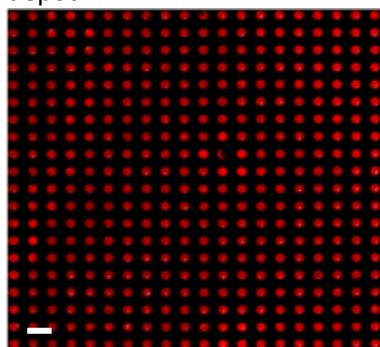
2. Variabilité entre motifs d'une même impression

Dans un premier temps, nous souhaitons analyser la variabilité au sein d'un dépôt. Il est question de comparer les motifs moléculaires réalisés, au sein d'un dépôt afin de déterminer la zone du timbre de PDMS, qui permet de déposer des motifs homogènes et similaires. Cet aspect est important car les motifs sont utilisés par la suite pour des tests d'interaction moléculaire et sont donc tous analysés. Il faut donc que les motifs moléculaires soient identiques après l'étape de dépôt, en termes de quantité de molécules déposées.

Nous avons choisi de mener cette étude à l'aide d'un scanner de fluorescence, car les programmes de traitement d'image nous permettent d'analyser un grand nombre de plots en un temps réduit. Les motifs étudiés sont donc des plots. Bien que l'on ne puisse pas, en fluorescence, remonter à l'épaisseur de molécules déposées, cette technique nous permet d'analyser par des comparaisons d'intensité, les variabilités moléculaires au sein de motifs, composés de molécules marquées en fluorescence. Pour réaliser cette étude de caractérisation de l'instrument, nous avons choisi de travailler avec des motifs de taille micrométrique, facilement quantifiable à l'aide d'un scanner de fluorescence de type biopuce. Le timbre en PDMS possède à sa surface une matrice de 20 lignes et 20 colonnes de plots, de diamètre de $160 \mu\text{m}$ avec une périodicité de $320 \mu\text{m}$. Ces résultats sont comparables pour des motifs de plus petite dimension.

Timbre de 10 mm x 10 mm comportant 400 plots

Un timbre, dont la topographie est composée de plots en relief sur une surface de 10 mm x 10 mm, est encre avec une solution de streptavidine, marquée en fluorescence (concentration : 60 $\mu\text{g/mL}$, temps d'encre 2min30, temps de contact 2min) et séché. Ce timbre est ensuite mis en contact, grâce à l'outil de dépôt automatisé, avec des lames de verre, nettoyées (bain d'isopropanol sous ultrasons, 5 min, 35 kHz puis bain d'eau déionisée sous ultrasons, 5 min, 35kHz) et activées par traitement plasma O_2 (5 min, 800 W). Les molécules de streptavidine sont alors transférées sur la surface selon les motifs du timbre. L'intensité de fluorescence de chacun des 400 plots déposés est alors analysée grâce au scanner. La *Figure 16* présente une image en fluorescence de la surface de l'échantillon après dépôt.



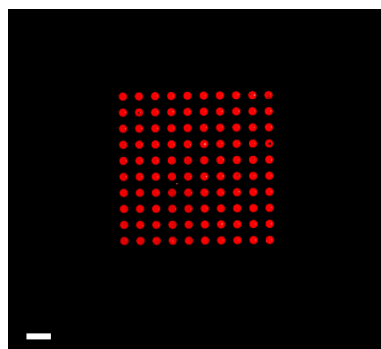
**65 % de variation
de l'intensité de
fluorescence des spots**

Figure 16 : Image obtenue par scanner en fluorescence d'un dépôt de 400 plots de streptavidine par μCP semi automatisé. Barre d'échelle : 320 μm .

Au sein des 400 plots déposés, l'intensité de fluorescence varie de près de 65 %. Cet écart est très important. Les valeurs d'intensité de fluorescence les plus extrêmes correspondent aux plots situés en périphérie de la zone d'impression. De par le gonflement de la membrane de PDMS lors de l'étape de dépôt automatisé, il s'avère que tous les plots situés en bordure de la zone d'impression ne sont pas transférés comme ceux au centre de la zone. Pour obtenir une variabilité moindre, il faut donc réduire la zone de dépôt au centre du timbre. Nous testons donc maintenant un timbre possédant la même topographie sur une zone plus réduite, de 6.5mm x 6.5 mm, ce qui correspond à 100 plots. Les plots sont toujours de même diamètre (160 μm) et de même périodicité (320 μm).

Timbre de 6.5 mm x 6.5 mm comportant 100 plots

La même procédure est suivie pour réaliser le dépôt des 100 plots. La matrice de 10 lignes et 10 colonnes de plots de streptavidine est analysée par fluorescence (*Figure 17*). L'intensité de fluorescence des plots transférés sur la lame de verre varie de près de 35%. Bien que cet écart ait diminué, il est encore important. Les plots situés en bordure de la zone d'impression sont toujours ceux qui amènent les plus grandes variations.



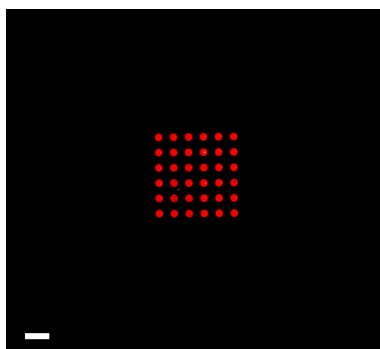
**35 % de variation
de l'intensité de
fluorescence des spots**

Figure 17 : Image obtenue par scanner en fluorescence d'un dépôt de 100 plots de streptavidine par μ CP semi automatisé. Barre d'échelle : 320 μ m.

La zone d'impression doit encore être réduite au centre du timbre.

Timbre de 3.5 mm x 3.5 mm comportant 36 plots

Nous testons maintenant un timbre possédant la même topographie sur une zone réduite à 3.5mm x 3.5 mm, ce qui correspond à 36 plots. Le dépôt de streptavidine est réalisé avec ce timbre, par μ CP automatisé dans les mêmes conditions expérimentales que précédemment.



**26 % de variation
de l'intensité de
fluorescence des spots**

Figure 18 : Image obtenue par scanner en fluorescence d'un dépôt de 36 plots de streptavidine par μ CP semi automatisé. Barre d'échelle : 320 μ m.

L'intensité de fluorescence des motifs de streptavidine est analysée (Figure 18). L'intensité des 36 plots varient de près de 26 %. Cet écart est meilleur qu'avec les zones d'impression plus larges. Cette variation ne sera pas améliorée car il n'est pas judicieux de réduire encore la zone d'impression, sous peine d'obtenir un nombre de plots d'analyse très faible.

- ❖ **La variation minimale de l'intensité de fluorescence de plots de molécules déposés par μ CP automatisé est de 26%. Cela correspond à une zone d'impression maximale (3.5 mm x 3.5 mm). Les motifs du timbre en PDMS seront donc concentrés sur cette zone, qui sera considérée comme celle permettant d'obtenir des motifs acceptables, au sein d'un dépôt, réalisé par μ CP automatisé.**

3. Variabilité entre plusieurs impressions

Dans cette partie, nous souhaitons caractériser les variations entre plusieurs échantillons fabriqués par μ CP automatisé. Cette étude nous permettra de définir si les biopuces générés avec l'outil de dépôt automatisé (et avec un même timbre) peuvent être comparables en termes de fabrication.

La même topographie (plots de 160 μ m de diamètre au pas de 320 μ m) est utilisée. Un nouveau timbre comportant 36 plots est fabriqué. Nous réalisons 25 dépôts consécutifs à l'aide de ce timbre, encre avant chaque dépôt par une solution de streptavidine (concentration : 60 μ g/mL, temps d'encre 2min30 et temps de contact 2 min). Entre chaque dépôt, le timbre est lavé (technique présentée en Annexe 1) de manière à éliminer toutes les molécules restantes à sa surface. L'intensité des 36 plots de streptavidine transférés sur un échantillon est analysée. L'intensité moyenne de ces plots est alors comparée avec les autres substrats. La Figure 19 présente l'intensité moyenne des motifs présents sur l'échantillon pour les 25 impressions réalisées.

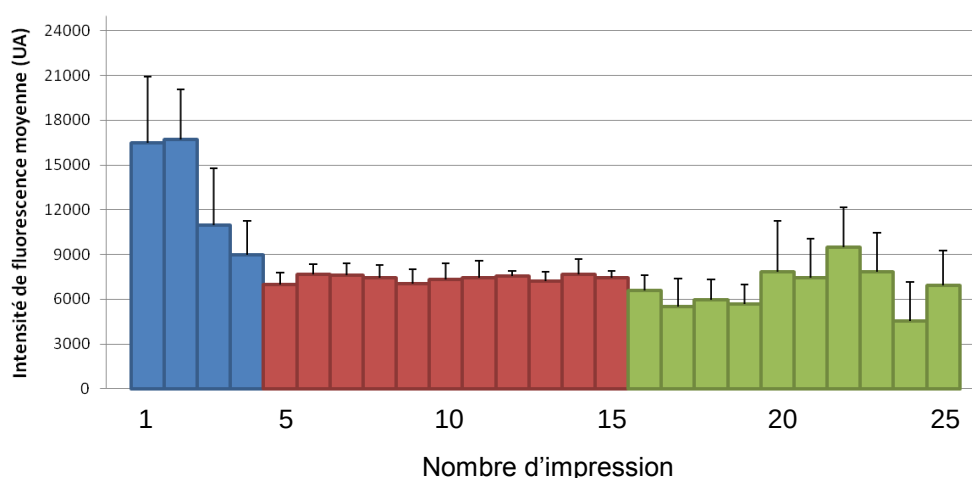


Figure 19 : Intensité de fluorescence moyenne de 36 plots de streptavidine présents sur un échantillon pour les 25 impressions successives réalisées par μ CP automatisé. Entre chaque impression, le timbre de PDMS est nettoyé et ré-encre.

Les deux premières impressions possèdent des motifs dont l'intensité de fluorescence moyenne est bien plus forte que les deux suivantes (16500 ua vs 11000). La variation de fluorescence est de l'ordre de 41 % entre les 4 premiers substrats. Cette valeur est réduite à 17 % pour les impressions n°5 à 15, soulignant une stabilité de dépôt dans cette zone. Enfin, pour les 10 dernières impressions, une fluctuation d'intensité réapparaît de façon visible sur le graphique, amenant à une variation de 35 % de l'intensité de fluorescence moyenne des différents substrats.

- ❖ **Cette étude permet de conclure quant au nombre d'impressions réalisables avec un même timbre de PDMS. Afin d'obtenir des motifs les plus similaires possibles, il faut effectuer 4 impressions au préalable avec un timbre en PDMS et le robot de dépôt Gesim pour déposer des molécules sur une biopuce. Les 4 premières impressions réalisées par μ CP avec le timbre de PDMS ne doivent pas être considérées. Ensuite, il est possible de réaliser 10 impressions successives, qui seront relativement similaires, avec ce même timbre.**

4. Etude comparative avec un robot à aiguilles

Afin d'évaluer les caractéristiques de l'outil GeSim, le μ CP semi-automatisé a été comparé avec une technique de fabrication de biopuces très courante, le dépôt par robot à aiguilles (aiguilles plates, Biorad, Plateforme Biopuce). Nous souhaitons reproduire les deux études précédentes avec le robot à aiguilles afin de comparer les valeurs de variabilité mesurées. 36 aiguilles sont donc positionnées sur la tête du robot, pour déposer des plots de streptavidine sur une lame de verre et mimer ainsi les 36 plots déposés par μ CP avec un timbre. La variabilité au sein des 36 plots sera mesurée, tout comme la variabilité entre plusieurs substrats réalisés avec le robot à aiguilles. Le *Tableau 2* présente cette étude comparative.

	Dépôt par robot à aiguilles	Dépôt par μ CP semi-automatisé GeSim
Au sein d'un même échantillon	9 %	26 %
Entre 25 échantillons	14 %	17 %

Tableau 2 : Variabilité au sein d'un échantillon de 36 plots de streptavidine, réalisé par μ CP automatisé ou par robot à aiguilles. Variabilité entre 25 échantillons, réalisés par μ CP automatisé ou par robot à aiguilles.

Au sein d'un même échantillon, comportant 36 plots de streptavidine, la variation de l'intensité de fluorescence des plots est bien plus faible (9%) si ce substrat a été réalisé avec un robot à aiguilles, que par μ CP automatisé (26%). Par contre, la variation de l'intensité de fluorescence entre 25 échantillons réalisés est du même ordre de grandeur si les dépôts ont été effectués par μ CP automatisé ou robot à aiguilles.

- ❖ Le μ CP semi automatisé, proposé par la société GeSim permet donc d'obtenir des biopuces comportant des motifs moléculaires avec seulement 17% de variation, les unes par rapport aux autres. Cette variabilité est comparable à celle obtenue pour des dépôts par robot à aiguilles.
- ❖ Rappelons que l'avantage du μ CP avec l'outil Gesim est qu'il nous permet d'obtenir des motifs avec des géométries très différentes (plots, lignes, courbes ...) alors qu'un robot à aiguilles ne permet d'obtenir que des zones d'analyse en forme de spot. Ce point est primordial. Comme nous souhaitons fabriquer des biopuces comportant des réseaux moléculaires (enchaînement de lignes nanométriques), il est impossible d'utiliser un robot à aiguilles. L'outil Gesim sera donc privilégié.

VI/ Multiplexage des dépôts

Nous avons vu précédemment qu'un besoin fort concernant le domaine des biopuces et des biocapteurs porte sur le multiplexage des échantillons. Il s'agit de déceler en une seule étape de multiples interactions ou hybridations sur un même substrat. Aussi, au sein d'un même échantillon, un grand nombre d'expériences est à mener en parallèle sur plusieurs entités. Cette capacité de densification de tests sur un même substrat est appelé multiplexage. Il faut donc pouvoir réaliser des motifs de différentes molécules sondes sur un substrat.

En μ CP, le timbre est encre avec une seule solution de molécules donc il n'est pas possible en principe de déposer des molécules différentes sur une surface. Nous présenterons donc dans cette partie deux approches innovantes qui permettent d'utiliser le μ CP pour fabriquer des substrats moléculaires multiplexés.

1. Double dépôt de molécules en une seule impression

Une première approche a été développée en se penchant sur les bases fondamentales du μ CP. L'impossibilité de déposer plusieurs molécules par μ CP provient de l'étape d'encrage du timbre, qui n'est effectuée qu'avec une seule et même solution de molécules. Si le timbre comportait différentes entités biologiques à sa surface, elles seraient alors très simplement transférées sur l'échantillon. Dans cette perspective, la technique que nous avons développée repose sur l'effondrement d'un timbre en PDMS, comportant un seul niveau de topographique. La *Figure 20* présente cette méthode, qui permet de déposer des motifs submicrométriques (lignes de 200 nm de large au pas fixe de 1 μ m) de deux molécules différentes, en une seule étape de μ CP.

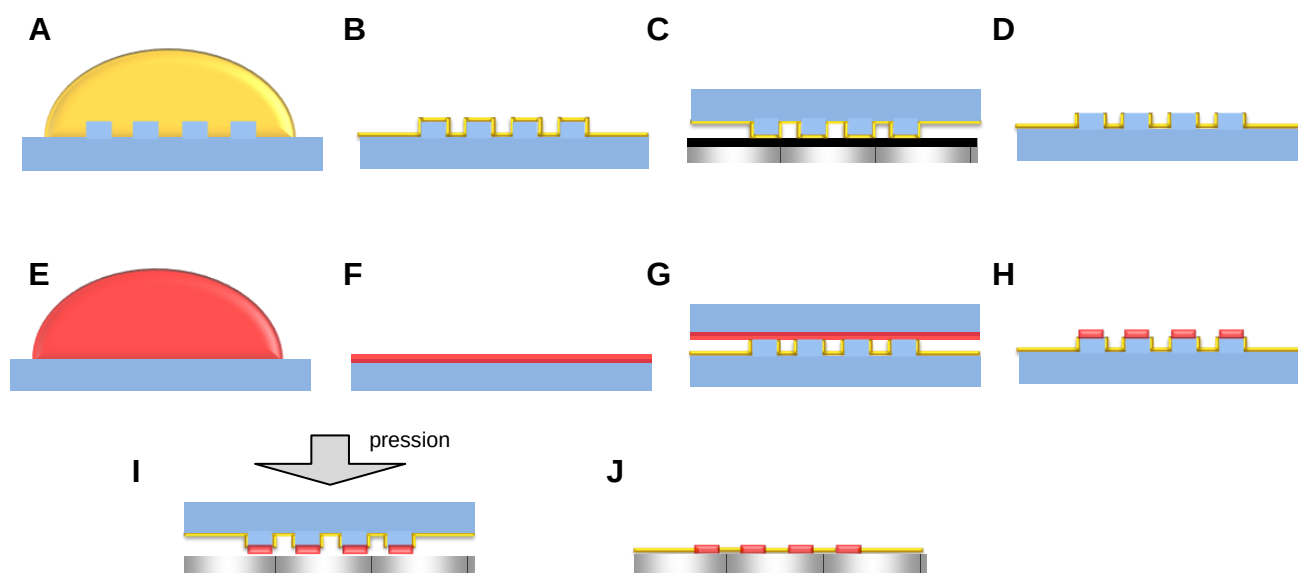
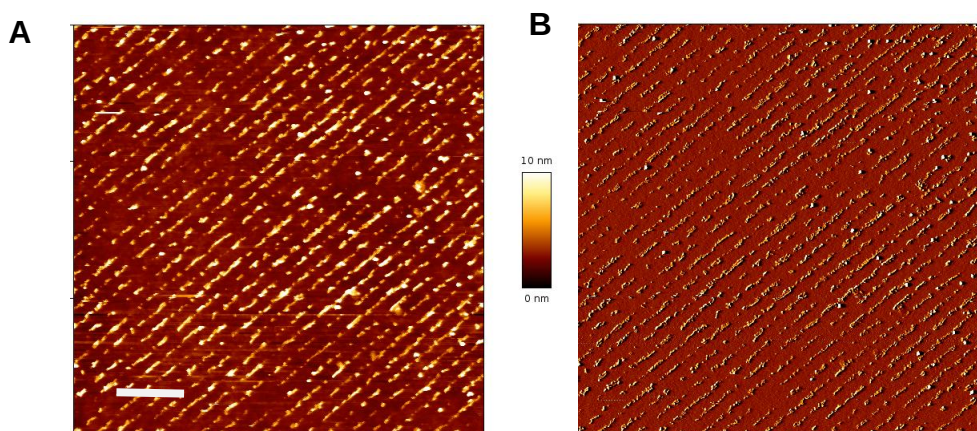


Figure 20 : Protocole expérimental permettant d'obtenir le dépôt de deux molécules différentes en une seule étape de μ CP

La 1^{ère} étape consiste à encre un timbre de PDMS avec une solution de molécule, dans notre cas des anticorps anti-GST, marqués en fluorescence avec de la Cy3 (temps d'encrage 1 min30, concentration : 100 μ g/mL) (*Figure 20A*). Le timbre est ensuite séché sous flux d'azote pour ne

conserver qu'une fine couche de molécules à sa surface (*Figure 20B*). Une succession de dépôt est ensuite effectuée afin d'éliminer les molécules présentes sur les motifs par transfert sur un substrat. Ces dépôts sont communément appelés dépôts de nettoyage (*Figure 20C*). Les molécules présentes dans les creux des motifs sont conservées sur le timbre puisqu'il n'y a pas eu contact avec le substrat. Ce timbre est conservé (*Figure 20D*). Un second timbre plat, c'est-à-dire sans motifs topographiques à sa surface est encré avec une 2ème solution de molécules, qui dans notre cas est une solution de PLL-g-PEG, marqué en fluorescence avec de la Cy2 (*Figure 20E et F*) puis séché sous léger flux d'azote (temps d'encrage : 1 min30, concentration : 50 µg/mL). Nous détaillerons dans le chapitre suivant le polymère PLL-g-PEG, retenons simplement ici qu'il permet de réduire les interactions indésirables de molécules avec la surface. Le timbre plat et le précédent timbre structuré sont ensuite mis en contact (*Figure 20G*). Un transfert de molécules de timbre à timbre s'opère (*Figure 20H*). Le timbre final, avec motifs, possède alors deux types de molécules encrées à sa surface : les anticorps anti-GST dans les creux et le PLL-g-PEG sur les motifs. Ce timbre bi-fonctionnel est ensuite mis en contact avec le substrat. Une pression (de l'ordre du MPa) va être exercée pour provoquer un effondrement de ce dernier, permettant aux molécules encrées dans les creux des motifs d'être transférées sur la surface (*Figure 20I*). L'échantillon comporte donc à sa surface des lignes constituées de deux types de molécules différentes, transférées en une seule étape de µCP (*Figure 20J*).

La *Figure 21* présente une caractérisation par AFM et par microscopie en fluorescence du réseau obtenu, comportant un enchainement régulier de lignes de PLL-g-PEG et d'anticorps anti-GST et obtenu par cette technique. Les observations par AFM ont permis de vérifier l'aspect des dépôts à l'échelle moléculaire (*Figure 21A et B*). Les motifs nanométriques sont homogènes et bien définis. L'épaisseur des lignes d'anticorps atteint 8 nm, ce qui correspond à un dépôt proche de la monocouche. Cependant, la représentation 3D et la coupe transversale de l'échantillon montrent une certaine discontinuité des lignes (*Figure 21C et D*). Les motifs observés sont des lignes de 200 nm de large au pas de 1 µm. Bien que l'observation en fluorescence des motifs obtenus soit difficile à cette échelle de par la taille des structures inférieure à la résolution du microscope utilisé et les spectres de fluorescence des marqueurs très proches, nous pouvons constater une alternance des lignes de couleur verte et rouge (*Figure 21E*). Les anticorps sont bien localisés entre les lignes de PLL-g-PEG.



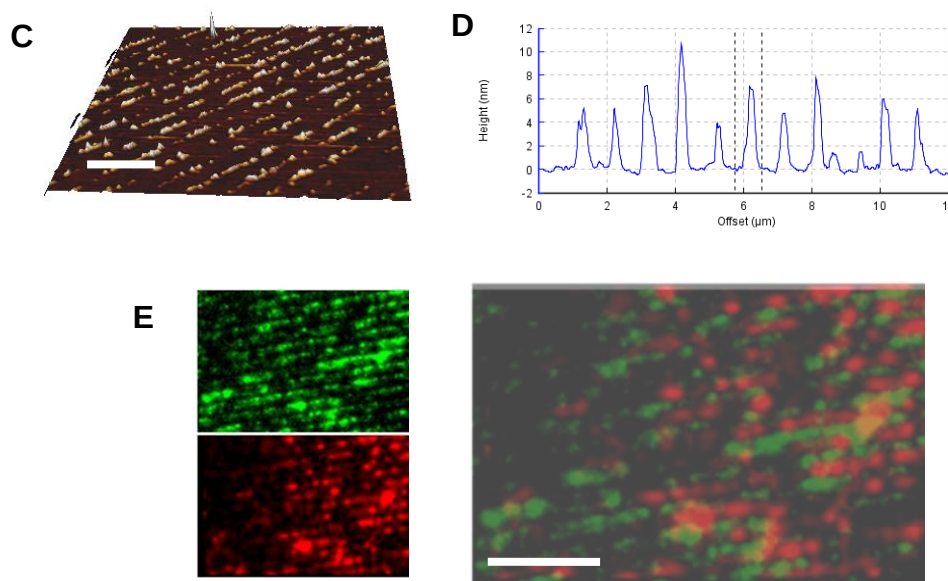


Figure 21 : Images AFM en mode contact et à l'air de réseaux composés de lignes de biomolécules de 200 nm de large au pas de 1 μm . Molécules de PLL-g-PEG marqué Cy2 et observé en vert et Anticorps anti-GST marqués Cy3 et observés en rouge (A) Relief topographique de l'échantillon. Barre d'échelle : 5 μm (B) Signal de hauteur (C) Déflection verticale du substrat (D) Représentation 3D de l'échantillon. Barre d'échelle : 2 μm (E) Profil topographique selon 12 μm de long (F) Observation de la surface par microscopie à fluorescence. Barre d'échelle : 5 μm . Une succession de lignes d'anticorps (en rouge) et de lignes de PLL-g-PEG (en vert) est visible.

Cette méthode élégante peut revêtir un certain intérêt comme nous le verrons dans les prochains chapitres car il est ainsi possible d'imaginer de déposer, en une seule étape d'impression, des motifs de molécules sondes (comme ici les anticorps) bordés de molécules anti-adhésives (comme ici le PLL-g-PEG). Cependant, cette méthode ne permet pas de déposer de multiples molécules sondes différentes, suivant des réseaux périodiques disposés en matrice comme nous le souhaitons. Nous avons donc développé une seconde approche dans ce but.

- ❖ **La technique de double dépôt de molécules en une seule impression permet de réaliser des échantillons bi-fonctionnels. Un réseau composé de lignes nanométriques de deux molécules différentes a pu être réalisé.**

2. Un timbre en PDMS permettant le multiplexage : le macrotimbre

Dans cette optique de multiplexage, une option de dépôt, concernant une fois de plus l'étape d'encre du timbre, a été ajoutée à la technique de μCP classique. Développé dans la thèse précédente ², un timbre de PDMS appelé macrotimbre répond à ce besoin. Ce dernier est composé de picots de quelques millimètres de hauteur (diamètre 1 mm, hauteur 1.5 mm) dont la surface inférieure est texturée par des motifs micrométriques ou submicrométriques par moulage (Figure 22A). Chaque picot se comporte donc comme un timbre en PDMS à part entière. Afin d'être compatible avec les applications pratiques biologiques, le macrotimbre peut être encre dans une plaque de titration de 384 à 1536 puits, chaque puits comportant une solution différente de

molécules à déposer (Figure 22B). Lors de cette étape d'encrage, chaque picot est immergé dans un puits de la plaque de titration et est encré avec une molécule différente. Les étapes d'encrage et de séchage du macrotimbre sont les points délicats de cette approche et font l'objet d'améliorations pour éviter les contaminations réciproques entre les molécules biologiques encrées sur chaque picot et un encrage homogène sur la totalité de la surface du picot (1 mm). Lorsque chaque picot est encré par une solution de molécules différentes, une étape d'impression moléculaire par μ CP est réalisée. Ainsi, un transfert de molécules organisées selon les motifs présents sur chaque picot s'effectue et nous obtenons, par un procédé de μ CP classique, un substrat biochimiquement adressé par de multiples entités moléculaires.

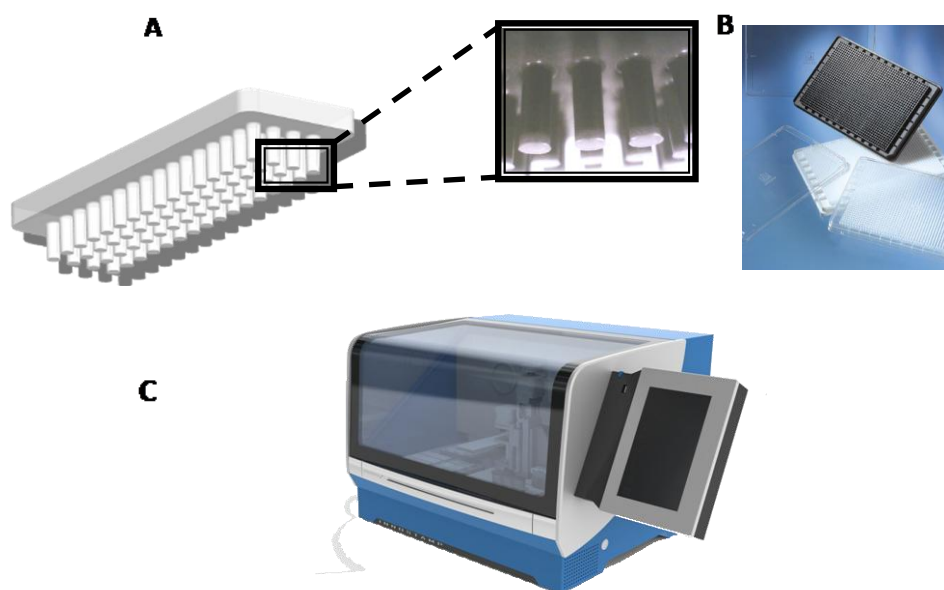


Figure 22 : Plateforme de dépôt par μ CP automatisé (A) Macrotimbre utilisé pour les besoins de dépôts multiplexés (B) compatible avec un encrage dans des plaques de titration 384 puits (C) Outil de dépôt développé par Innopsys utilisant la technologie de μ CP et la macrotimbre

❖ **Un macrotimbre comporte 64 picots. Il est donc possible de déposer simultanément 64 molécules différentes organisées selon les motifs des picots en PDMS, sur une lame.**

Ce concept de dépôt par μ CP impliquant un macrotimbre a été développé par l'entreprise Innopsys. Il a permis l'intégration du macrotimbre dans un outil de dépôt automatisé (Figure 22C), concurrent de l'appareil GeSim présenté précédemment. La Figure 23 présente un substrat sur lequel a été déposé en une seule étape d'impression des motifs alternés de streptavidine marquée avec de la Cy3 (vert) et avec de la Cy5 (rouge), et observés en fluorescence. On constate l'atout majeur de cet outil qui permet de déposer sur une large surface telle une lame de microscope des biomolécules différentes selon des motifs organisés.

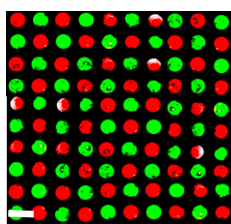


Figure 23 : Dépôt multiplexé réalisé avec le macrotimbre, encré par une solution de streptavidine, marquée en fluorescence avec de la Cy3 (observée en vert) et une solution de streptavidine, marquée en fluorescence avec de la Cy5 (observée en rouge). Barre d'échelle : 2.25 mm.

VI/ Conclusions

Dans ce chapitre, nous avons détaillé la fabrication de structures en silicium, utilisées comme moule mère pour le procédé de μ CP. Ces moules sont composées de 4 matrices de 300 réseaux de diffraction (25 colonnes et 12 lignes), qui comportent des lignes d'épaisseur de 500 nm avec une périodicité de 1 μ m. Pour générer un tel wafer de silicium, nous avons utilisé la lithographie optique par projection, qui permet en un temps très court de structurer un wafer de silicium 6 pouces à l'échelle nanométrique.

Dans l'optique de réduire les coûts de ce procédé, nous avons développé une technique de duplication des moules mères de silicium. Cette technique, basée sur la lithographie douce par nano impression thermique assistée par UV (Thermal soft UV NIL) permet de générer des moules en résine SU8, qui comportent la même topographie de surface que le moule en silicium. Les répliques obtenus en résine SU-8 sont utilisés à leur tour comme moules pour générer un grand nombre de timbres en PDMS qui permettent la fabrication de multiples substrats par μ CP.

Enfin, nous avons étudié un outil de μ CP semi automatisé, qui permet de fabriquer de nombreux substrats moléculaires. Les performances de cet outil en termes de reproductibilité sont proches de celles obtenues pour un robot à aiguilles. Par ailleurs, le dernier point étudié concerne le multiplexage de substrat et nous a amené à développer une technique de dépôt de deux types de molécules différentes par impression moléculaire avec effondrement d'un timbre en PDMS. Enfin, une technologie de timbres en PDMS modifiés, appelés macrotimbres le dépôt de multiples entités biochimiques. Avec cette méthodologie, il est possible de déposer environ 64 molécules différentes en une seule étape sur une lame de verre.

Nous avons donc maintenant à notre disposition des moules 6 pouces, comportant 1200 réseaux de diffractions, duplicables donc peu coûteux, dont la topographie est utilisée pour générer par μ CP des biopuces comportant des motifs composés de différentes biomolécules. Pour réaliser ces dépôts, deux outils sont à notre disposition, le μ CP semi-automatisé GeSim présentant des performances intéressantes et le prototype de dépôt développé par Innopsys, qui permet le multiplexage d'une lame de verre avec 64 molécules sondes différentes. Nous sommes donc capables de travailler sur des tests moléculaires multiplexés avec une technologie intéressante d'un point de vue économique.

Références

1. A.M.C. Egea *et al.*, *Microelectronic Engineering*, **2011**, 88, 1935
2. Thèse Jean-Christophe Cau, INSA de Toulouse, **2009**.



Microcontact printing of biomolecular gratings from SU-8 masters duplicated by Thermal Soft UV NIL

Amandine M.C. Egea^{a,b,d,*}, Christophe Vieu^{a,c,d}

^a CNRS, LAAS, 7 avenue du colonel Roche, F-31077 Toulouse, France

^b Innopsys, Parc Activestre, 31390 Carbone, France

^c Université de Toulouse; UPS, INSA, INP, ISAE; LAAS; F-31077 Toulouse, France

^d ITAV, 141, route d'Espagne, Canceropôle entrée B BP 50624, 31106 Toulouse, France

ARTICLE INFO

Article history:

Available online 15 January 2011

Keywords:

Soft UV NIL
Microcontact printing
Replication
SU-8 resist

ABSTRACT

Thermal Soft UV nanoimprint lithography (NIL) was performed to replicate nanostructures in SU-8 resist. The SU-8 resist was structured with a PDMS stamp molded against an original silicon master which comported gratings of lines (500 nm width/1 μ m pitch). The patterns obtained in SU-8 were used in a second step as a template for PDMS molding of daughter stamps. Pattern transfer quality and dimension control were achieved on these second generation PDMS stamps using AFM measurements. As a final validation of the whole duplication processes, these second generation PDMS stamps were finally employed to perform μ CP of streptavidin molecules on a glass slide activated by plasma O₂ treatment. AFM observation and fluorescence microscopy reveal that molecular patterns produced with SU-8-molded PDMS stamps are not discernable from those obtained with a PDMS stamp directly molded on the original silicon master. Coupling Thermal Soft UV NIL and microcontact printing opens a new method for generating a large quantity of SU-8 templates on which functional PDMS stamps can be replicated in a reduced time. We thus propose a functional duplication process for soft-lithography implementation which may further reduce the cost of this technology for industrial development.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

As an epoxy-based resist, SU-8 has been widely used for the fabrication of microsystems and optical devices after standard UV lithography processing. The chemical stability of SU-8 combined to its high Young modulus (≈ 4 GPa) confers to the devices excellent chemical, mechanical and optical properties [1]. Alternative emerging methods for processing SU-8 material at the nanometric scale have been extensively developed [2]. Among them, Soft UV nanoimprint lithography (NIL) clearly appears as a low cost and high resolution technique to replicate micro and nanostructures. Thermal Soft UV nanoimprint lithography is a close version of UV NIL and consists in the same process coupled with a temperature treatment to promote the soft imprint step [3,4].

In this paper, Thermal Soft UV nanoimprint lithography was performed to replicate nanostructures in SU-8 resist. These rigid and mechanically resistant SU-8 structures were then exploited as a hard master for soft-lithography processes [5]. This paper is thus devoted to a generic set of processes capable to duplicate eas-

ily and with high dimensional accuracy nanoscale silicon hard masters for soft-lithography processes.

2. Replication of submicronic silicon gratings in SU-8 by Thermal Soft UV NIL

Nanostructures were generated on a silicon master by ebeam lithography and Reactive Ion Etching. The features of the master consisted in arrays of 500 nm wide lines at a 1 μ m pitch with a nominal etching depth of 300 nm. To enable simple demolding of this master, an anti-adhesive treatment was carried out by a well established process using OTS (octadecyltrichlorosilane) in liquid phase. A mixture of poly-dimethyl-siloxane (PDMS) polymer, named Sylgard 184 (from Dow Corning, USA) and composed of 10–1 in mass ratio of PDMS oligomers and a curing agent, was deposited on the silicon master [6–8]. Cross-linking was performed at 60 °C during 24 h to obtain PDMS stamps, replica of this Si original master exhibiting nanoscale line and space gratings. SU-8 was then spin coated on a SiO₂ slide, previously cleaned in an isopropanol ultrasonic bath (35 kHz, 5 min, room temperature) and a deionized water ultrasonic bath (35 kHz, 5 min, room temperature) and finally cleaned by a plasma O₂ treatment (Teplas, 800 W – 5 min). A 800 nm thick SU-8 2005 was spin coated on these cleaned SiO₂ substrates at 5000 rpm for 60 s and then baked

* Corresponding author at: CNRS, LAAS, 7 avenue du colonel Roche, F-31077 Toulouse, France.

E-mail address: aega@laas.fr (A.M.C. Egea).

at 115 °C on a hotplate for 10 min for solvent evaporation. The duplication process of this silicon hard master by Thermal Soft UV NIL consisted in rising the temperature of a SU-8 spin coated substrate to 90 °C, to liquefy the SU-8 film and bringing in contact the PDMS stamp for 2 min to structure the resist layer. This imprinting process was carried out with an experimental system from Gesim Company [9]. The sample was then cooled down for 5 min under a nitrogen flow and the PDMS stamp was finally removed from the SU-8 film. The SU-8 imprinted film was exposed to UV light (Emission spectrum: 315–500 nm, intensity: 8000 mW/cm², exposure time: 30 s) to cross-link the nanostructured resist layer. The gratings obtained by Thermal Soft UV NIL were characterized by Atomic Force Microscopy (AFM) in contact mode and in air. Fig. 1 displays representative AFM images of (a) the original silicon master used to generate the template in PDMS and (b) the SU-8 nanostructures obtained after Thermal Soft UV NIL duplication process. The depth of the SU-8 grooves reached

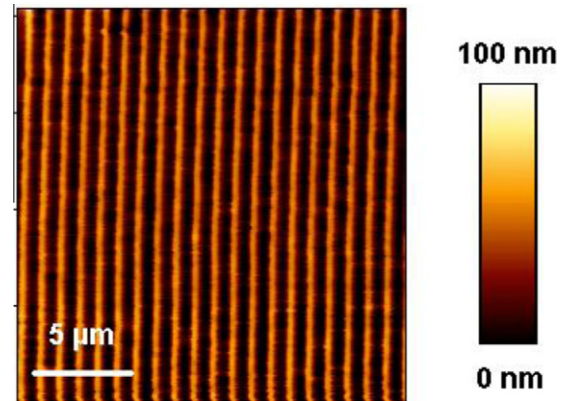


Fig. 2. AFM images of the PDMS gratings molded on the SU-8 template (contact mode in air).

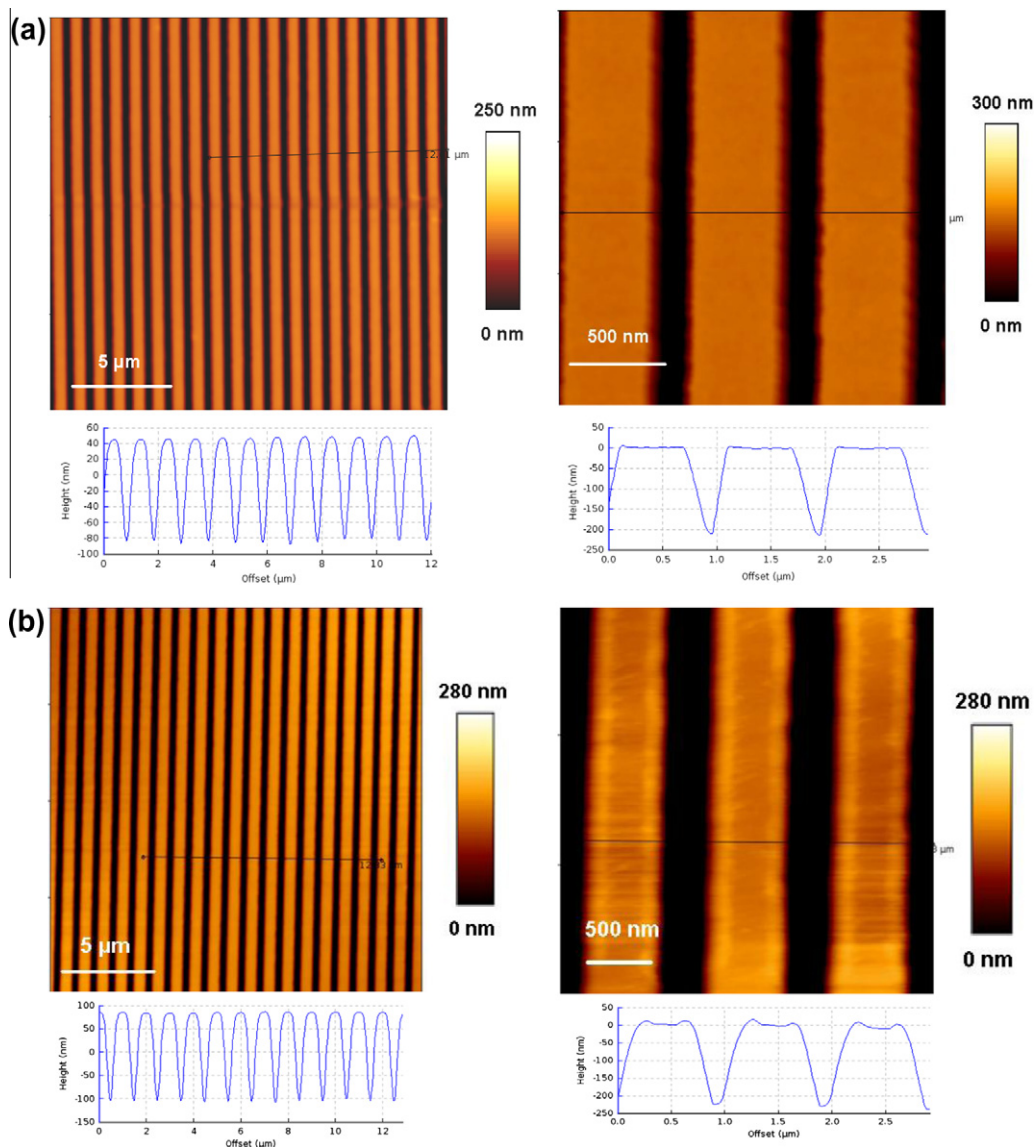


Fig. 1. AFM images and cross sections of (a) the original silicon master used to generate the template in PDMS and (b) the SU-8 nanostructures replicated by Thermal Soft UV NIL (contact mode in air).

225 nm and the width and pitch of the grating (500 nm/1 μ m) faithfully reproduced the dimensions of the silicon initial master.

3. PDMS stamp molding on SU-8 gratings

These duplicated SU-8 masters were then used in a second step to generate PDMS stamps suitable for microcontact printing (μ CP) processes. The mixture of PDMS (Sylgard 184 from Dow Corning, USA) was deposited on the SU-8 template and cross-linked at ambient temperature for 48 h to obtain PDMS replica. The morphology and dimensional control of the nanoscale features obtained in these second generation PDMS stamps were measured using AFM metrology in contact mode and in air (Fig. 2). This analysis revealed a high quality transfer of the patterns from the SU-8 template to the PDMS stamp.

4. Microcontact printing of streptavidin using second generation PDMS stamps molded on duplicated SU-8 gratings

As a final validation of the whole duplication processes, these second generation PDMS stamps were finally employed to perform μ CP of streptavidin molecules. The streptavidin molecules used to generate these nanoscale biomolecular arrays were purchased to Sigma Aldrich in powder conditioning. A solution of phosphate buffered saline (0.001 M PBS; NaCl – 0.138 M; KCl – 0.0027 M; pH 7.4) was added to the powder and the solution (100 μ g/mL) was stored at -20°C before the experiments. The patterns were generated by μ CP on glass slides, previously cleaned in an isopropanol ultrasonic bath (35 kHz, 5 min, room temperature) and a deionized water ultrasonic bath (35 kHz, 5 min, room temperature). The glass slides were then activated by a plasma O_2 treatment (Teplas, 800 W – 5 min) to provide a better adhesion of the molecules. Then, the streptavidin solution (100 μ g/mL in PBS, pH 7.4) was pipetted onto the PDMS stamps, obtained from the SU-8 template. The inking time was fixed at 2 min 30 s after preliminary experiments. After this short incubation, the stamps were dried under nitrogen flow and brought in contact for 2 min (contact time) with the clean and activated glass slides. Fig. 3 displays fluorescent images of the streptavidin gratings obtained by microcontact printing (a) with a PDMS stamp molded on a SU-8 duplicated mold and (b) with a PDMS stamp molded on the original silicon master. Fig. 3a confirms the good transfer of the molecules on the substrate. This fluorescent comparison indicates that the final biomolecular gratings obtained with second generation PDMS stamps generated from a duplicated SU-8 hard master (Fig. 3a) are not discernable from same biomolecular gratings obtained

with the first generation PDMS stamps directly molded on the initial silicon hard-master (Fig. 3b). Extensive AFM characterizations (results not shown) confirm this conclusion. Fig. 4 synthesizes the whole duplication process and its application for generating biomolecular patterns.

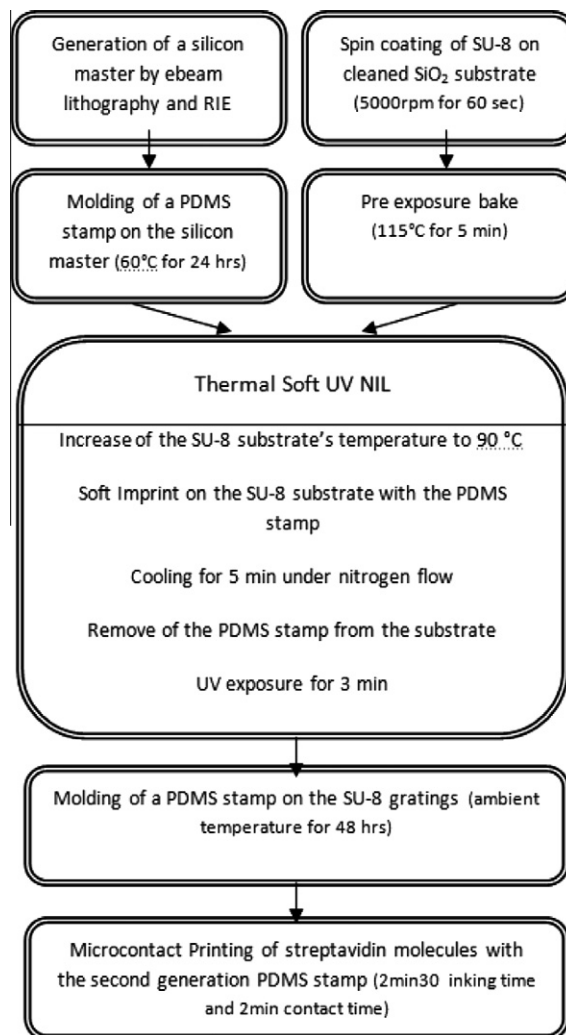


Fig. 4. Flow chart synthesizing the whole duplication process and its application for generating biomolecular patterns.

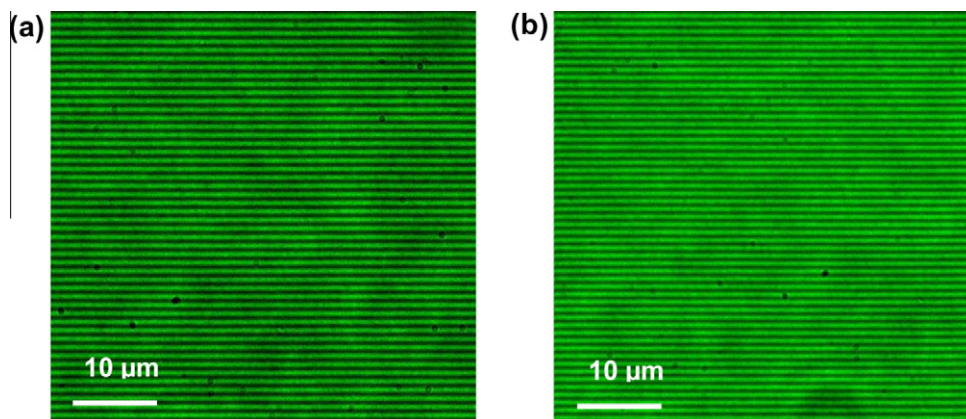


Fig. 3. Fluorescent image of a typical streptavidin grating obtained by microcontact printing (a) with a PDMS stamp molded on a SU-8 duplicated mold and (b) with a PDMS stamp molded on the original silicon master.

5. Conclusion

We have thus validated a functional duplication process for soft-lithography implementation. Coupling Thermal Soft UV NIL and microcontact printing opens a new method for generating a large quantity of SU-8 templates on which functional PDMS stamps can be replicated in a reduced time.

References

- [1] Liu et al., J. Korean Phys. Soc. 55 (2009) 1290–1294.
- [2] Xie et al., Microelectr. Eng. 85 (2008) 914–917.
- [3] Okuda et al., J. Vac. Sci. Technol. B 25 (2007) 2370–2372.
- [4] Ong et al., Opt. Lett. 31 (2006) 1367–1369.
- [5] Whitesides et al., Appl. Phys. Lett. 63 (1993) 2002–2004.
- [6] C. Thibault et al., Langmuir 23 (2007) 10706–10714.
- [7] S. Lee et al., Langmuir 21 (2005) 11957–11962.
- [8] H. Xu et al., Langmuir 10 (2009) 1021.
- [9] Gesim, <<http://www.gesim.de/>>.

CHAPITRE 3 :	61
REALISATION DE MOTIFS BIOMOLECULAIRES MINIMISANT L'ADSORPTION NON-SPECIFIQUE	61
I/ LIMITATION DE L'ADSORPTION NON-SPECIFIQUE SUR UN SUBSTRAT	62
1. ENJEUX	62
2. ETAT DE L'ART SUR LA REALISATION DE BIOPUCES À PROTÉINES MINIMISANT L'ADSORPTION NON SPECIFIQUE	63
a. <i>Blocage de surface</i>	63
b. <i>Utilisation de polymères</i>	63
c. <i>Immobilisation de molécules sur des couches de polymères</i>	68
d. <i>Traitement du timbre en PDMS pour l'impression moléculaire</i>	68
II/ BI-FONCTIONNALISATION DE SURFACES	70
1. BLOCAGE DE SURFACE À L'ÉTHANOLAMINE	70
2. PASSIVATION DE SURFACE BASÉE SUR DES POLYMÈRES	75
a. <i>Le PLL-g-PEG</i>	75
i. Impression moléculaire de motifs micrométriques de PLL-g-PEG	75
ii. Etude des interactions non-spécifiques par fluorescence	77
b. <i>Le PLL-g-Dextran</i>	79
i. Impression moléculaire de motifs micrométriques de PLL-g-dextran	79
ii. Etude des interactions non-spécifiques par fluorescence et AFM	80
iii. Propriétés anti-adhésives du PLL-g-dextran étudiées par QCM	81
iv. Influence de l'énergie de surface du timbre en PDMS	83
3. IMPRESSION DE MOLÉCULES SONDAS SUR UNE COUCHE PASSIVANTE	84
a. <i>Impression moléculaire sur des couches passivantes de PEO</i>	85
i. Dépôt et maintien des molécules sondes sur une couche de passivant	85
ii. Hypothèse formulée	86
b. <i>Impression de molécules sondes sur des couches passivantes de PLL-g-dextran</i>	86
i. Fabrication d'une surface bi-fonctionnelle basée sur une couche de PLL-g-dextran	87
ii. Etude du comportement de la surface bi-fonctionnelle dans le cas d'une interaction non-spécifique	88
iii. Etude du comportement de la surface bi-fonctionnelle dans le cas d'une interaction spécifique	90
4. COMPARAISON DES TECHNIQUES MISES EN PLACE LORS D'UN PROTOCOLE COMPLET DE BIODÉTECTION	92
III/ BI-FONCTIONNALISATION DE SUBSTRATS TRIDIMENSIONNELS	95
1. OBJECTIF	95
2. OBJET D'ÉTUDE : UN RESEAU PERIODIQUE DE LIGNES NANOMETRIQUES	95
3. ETUDE AFM	96
a. <i>Fonctionnalisation du réseau avec les molécules sondes</i>	96
b. <i>Passivation du réseau</i>	97
4. CARACTERISATION DES RESEAUX PERIODIQUES	98
a. <i>Etude de rugosité de surface</i>	98
b. <i>Etude de l'intensité de diffraction</i>	99
IV/ CONCLUSIONS	102
REFERENCES	104

CHAPITRE 3 :

Réalisation de motifs biomoléculaires minimisant l'adsorption non-spécifique

Le développement de matériaux compatibles avec les applications biomédicales demande une compréhension profonde de l'interface solide/liquide lorsque ces matériaux sont placés dans un environnement biologique. Il est crucial de maîtriser les événements moléculaires se produisant à leur surface. Dès lors qu'un système physique rencontre un environnement biologique, cette problématique entre en jeu. De nombreux domaines sont concernés, parmi eux nous pouvons lister les dispositifs implantés dans le corps humain, le matériel médical, l'ingénierie tissulaire, la médecine régénérative, la bioélectronique ou les biocapteurs et biopuces pour le diagnostic.¹ La grande variété de matériaux utilisés, d'applications et d'environnements biologiques complexifie les études menées. Ces matériaux doivent répondre à des critères communs,² sans cesse évalués et précisés en termes de biocompatibilité ou/et de biotoxicité.³

Dans ce contexte, la conception de surfaces spécifiques bio fonctionnelles devient un enjeu important. Depuis plusieurs années, l'adsorption d'entités biologiques sur une surface attire particulièrement l'attention. Le contrôle de l'adsorption non-spécifique notamment de biomolécules sur une surface fait l'objet de nombreuses recherches dans le domaine biomédical.^{4 5} Ce phénomène peut s'avérer fortement préjudiciable pour les biomatériaux, soit car il menace leur durée de vie, soit de façon plus grave car ils induisent des réponses biologiques indésirables (inflammations, thrombose, fibrose ...)

Dans le domaine du diagnostic *in-vitro*, la prévention de l'adsorption non-spécifique influe directement sur la fiabilité des résultats avancés. Les analyses biomédicales sont généralement basées sur l'utilisation de biopuces, dont la surface doit être entièrement maîtrisée à l'échelle moléculaire, tout comme les interactions qui s'y produisent. Dans ce chapitre, nous aborderons dans un premier temps les développements recensés dans la littérature pour la fabrication de surfaces résistantes à l'adsorption de protéines. Puis nous nous intéresserons à la mise en place de techniques de fabrication basées sur l'impression moléculaire pour générer des substrats bi-fonctionnels.

I/ Limitation de l'adsorption non-spécifique sur un substrat

1. Enjeux

Une biopuce est réalisée en tenant compte de la spécificité de deux entités biologiques. Les substrats sont fonctionnalisés avec des molécules sondes définies en fonction de l'espèce à détecter ou à analyser, appelée cible. L'affinité moléculaire (cible/sonde) assure une interaction unique et spécifique. Par exemple, un anticorps, monoclonal ou polyclonal, reconnaît un ou plusieurs épitopes présents sur l'antigène correspondant, on dit qu'il interagit de façon spécifique avec ce dernier. La *Figure 1A* illustre une interaction idéale entre deux entités moléculaires ayant une forte affinité. Les molécules cibles interagissent de façon spécifique avec les molécules sondes. Aucune molécule cible ne s'est adsorbée sur la surface du support, qui est préservée de toute interaction. Bien que les processus de reconnaissance mis en jeu lors d'une interaction soient relativement bien compris, en pratique les choses sont moins triviales. Un phénomène supplémentaire entre en jeu dans la plupart des procédés biologiques : l'adsorption non-spécifique. Elle se manifeste par des interactions de faible énergie se produisant entre les espèces présentes en solution et le substrat, sans qu'il y ait une spécificité particulière. La *Figure 1B* schématise ce phénomène où l'on distingue clairement des interactions dites non spécifiques, entre les molécules cibles et le substrat, en plus des interactions spécifiques entre les molécules cibles et les molécules sondes.

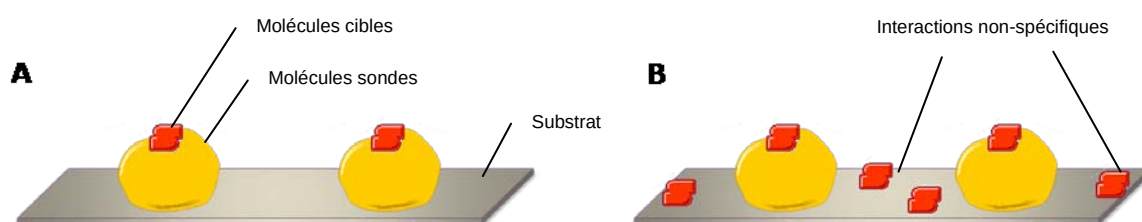


Figure 1 : Illustration d'une interaction entre des molécules sondes immobilisées sur un substrat, et des molécules cibles (A) de manière spécifique (cas idéal) (B) de manière spécifique et non-spécifique (cas réel)

Les interactions non-spécifiques sont préjudiciables à l'échelle moléculaire car elles perturbent les résultats des analyses. En biodétection, nous avons vu que l'information biologique est traduite en signal quantifiable par un principe de lecture (optique, mécanique, électrique ...). Ainsi, le signal dit efficace, c'est-à-dire représentant la véritable interaction spécifique entre deux espèces se voit concurrencé par un signal que l'on peut caractériser de bruit. Ce phénomène doit être maîtrisé sous peine d'obtenir des analyses difficiles à interpréter. L'enjeu actuel repose donc sur le développement de procédés, intégrés dans la fabrication des biopuces ou dans les protocoles d'interaction pour réduire les interactions non-spécifiques de biomolécules. De plus, modifier la surface de dispositifs de diagnostic *in-vitro* par des approches réduisant cette adsorption non spécifique permet d'augmenter significativement leur sensibilité. Cet aspect est quelque fois négligé au profit d'une amplification de signal conduisant à une augmentation du signal absolu mais pas nécessairement du rapport signal sur bruit.⁶ Or, le facteur critique contrôlant la limite de détection de dispositifs de diagnostic, est le niveau de bruit de fond. Dans le cadre de développement de techniques de diagnostic ultrasensibles, il faut considérer ce facteur pour repousser les limites de biodétection.

❖ **La réalisation de biopuces implique donc de fonctionnaliser une surface avec des molécules sondes (protéines, oligonucléotides ...) tout en diminuant le bruit de fond sur le reste du**

substrat, provoqué par de possibles adsorptions non-spécifiques. Les substrats réalisés dans cette perspective seront qualifiés de bi-fonctionnalisés. Nous considérerons pour la suite le cas de biopuces à protéines.

2. Etat de l'art sur la réalisation de biopuces à protéines minimisant l'adsorption non spécifique

Dans ce paragraphe, nous présenterons de manière non-exhaustive les approches mises en place actuellement pour limiter l'adsorption non-spécifique de protéines sur une surface. Nous aborderons les méthodes de blocage et de passivation de surface basées sur les propriétés de molécules spécifiques et de polymères.

a. Blocage de surface

Une des techniques les plus couramment employées pour limiter l'adsorption non spécifique porte sur le blocage de surface. Il s'agit d'ajouter aux solutions ou tampons utilisés (saturation, dilution ...) des molécules qui vont saturer tous les sites d'adsorption du substrat sans interagir avec les molécules sondes, qui seront donc toujours disponibles vis-à-vis d'une interaction spécifique avec la cible à détecter. La BSA est une protéine employée à cet effet. Hautement « adhésive », elle va interagir avec la surface et s'adsorber sur les sites actifs du substrat encore disponibles pour les bloquer, empêchant ainsi toute molécule de la solution d'analyse d'interagir avec le substrat. Le blocage de surface permet donc d'atténuer les interactions non-spécifiques se produisant sur une surface fonctionnelle. D'autres types de molécules ont été développées comme la BSTFA (N,O-bis-trimethylsilyl-trifluoroacetamide) et améliorent légèrement ces propriétés de blocage de surface par rapport à la BSA.⁷

b. Utilisation de polymères

L'adsorption non-spécifique peut être efficacement diminuée par l'emploi de couches moléculaires résistantes à l'adsorption de protéines. Ainsi, l'immobilisation physique ou chimique de polymères ou autre couche organique sur un substrat est fréquemment utilisée pour prévenir l'adsorption indésirable de protéines. Des polymères très similaires sont employés à travers des domaines variés.⁸ Nous pouvons citer de manière non-exhaustive l'alcool polyvinylique,⁹ le polyacrylamide¹⁰, les oligosaccharides¹¹ et polysaccharides^{12 13} étudiés dans cette optique.

Les techniques de traitement de surface ou d'immobilisation employées dépendent fortement de la nature du polymère à déposer. Le greffage covalent,¹⁴ le dépôt par traitement plasma,¹⁵ la physisorption,^{11, 16} la chimisorption,¹⁷ l'incorporation dans une matrice,¹⁸ et le dépôt de film mince¹⁹ sont les méthodes rencontrées dans la littérature pour immobiliser un polymère sur une surface.

Il existe aussi des surfaces qualifiées de bio-intelligentes²⁰ composées de polymères dont les propriétés sont « interchangeables ». Ces polymères sont sensibles à un stimulus extérieur (lumière, température, potentiel électrique, pH ou force ionique) qui vient pondérer leurs propriétés d'adsorption/désorption de protéines ou d'attachement/détachement de cellules.²¹

Au sein de la multitude de polymères disponibles, nous aborderons plus en détail le poly(ethylene oxide) ou PEO, la Poly(L-Lysine)-*grafted*-Poly(Ethylene Glycol) ou PLL-g-PEG et la Poly(L-Lysine)-*grafted*-dextran ou PLL-g-dextran, utilisés comme revêtement de surface pour prévenir l'adsorption non-spécifique de protéines.

i. Le PEO

Le poly(ethylene oxide) ou PEO est disponible commercialement sous différentes formes. La *Figure 2A* présente la structure chimique d'une molécule linéaire de PEO dont le motif central de la chaîne carbonée est répété n fois. Le poids moléculaire d'une entité de type $n=20$ atteint 1000 Da mais différentes longueurs de chaîne peuvent être réalisées permettant d'obtenir des polymères de longueur et de poids moléculaire variés. Il existe différentes versions commerciales de PEO, dont l'une présentée en *Figure 2B* qui est une molécule de PEO à 4 bras possédant des terminaisons amine pour son greffage. La plupart des groupes de recherche utilisant des chimies de surface basées sur le PEO synthétise eux-mêmes le polymère.

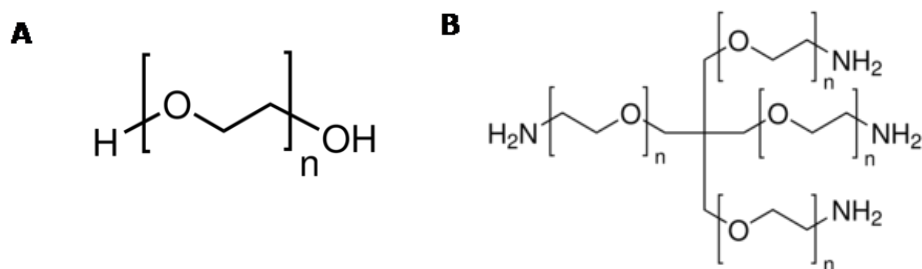


Figure 2 : Structure chimique d'une molécule de poly(ethylene oxide) disponible commercialement (A) motif carboné répété n fois (B) à 4 bras possédant des terminaisons amines

Le PEO peut être greffé de façon covalente sur une surface par polymérisation plasma^{22 23} amenant notamment à des films de polymères très homogènes en termes d'épaisseur et possédant un fort taux de greffage. Généralement, le polymère possède un groupement amine qui permet la fixation sur la surface choisie et la chaîne carbonée fait face à la solution. Il est connu pour posséder des propriétés de limitation de l'adsorption non-spécifique de protéines. De nombreuses études tentent d'analyser les facteurs à l'origine des propriétés des couches de PEO greffées, mais ne s'accordent pas toujours.²⁴ Il s'avère que l'hydratation des chaînes de la molécules dictent sa conformation (en brosse désordonnée ou en couche aplatie)²⁵ et joue sur la mobilité des chaînes en solution. Ces deux paramètres seraient à l'origine d'un effet de répulsion stérique.²⁶⁻²⁸ Par ailleurs, les liaisons électrostatiques à sa surface sont minimisées car le PEO est un polymère neutre.²⁹⁻³³

Gombotz *et al.* ont démontré par des mesures d'angle de contact que les couches de PEO possédant un poids moléculaire jusqu'à 3 kDa détienne un fort taux d'hydratation et résiste de ce fait mieux à l'adsorption de protéines (albumine et fibrogène), contrairement aux couches de PEO de faible poids moléculaire.³⁴

Il est possible de greffer des entités complémentaires sur le PEO. McPherson *et al.* synthétisèrent ainsi un copolymère dit « triblock » de PEO-poly(propylene oxide)-PEO ou (PEO-PPO-PEO) pour étudier les mécanismes de prévention d'adsorption de protéines. Il s'avère que la densité de greffage

du PEO sur une surface est le paramètre qui joue sur la limitation de l'adsorption non-spécifique de protéines sur une surface.³⁵ Sofia *et al.* démontrèrent ainsi que l'adsorption de protéines telles que la fibronectine et l'albumine était quasiment nulle sur les surfaces possédant les plus fortes densités de greffage des molécules de PEO (100 ng/cm²).³⁶

Il est possible de structurer les couches de PEO obtenus pour définir des zones micrométriques de différentes propriétés. Dans cette optique, Bretagnol *et al.* ont structuré par photolithographie une couche de PEO obtenue par polymérisation plasma (Diethylene Glycol Dimethyl Ether) pour obtenir des micro-domaines activés par un second traitement plasma. Ils ont démontré que ce type de traitement permettait de localiser spatialement l'adsorption de protéines telles que la BSA ou même des cellules comme des fibroblastes.³⁷

On recense cependant des problèmes de conservation de ces couches dans le temps lorsqu'elles ne restent pas en environnement liquide.²⁷

ii. Le PLL-g-PEG

La Poly(L-Lysine)-*grafted*-Poly(Ethylene Glycol) ou PLL-g-PEG possède une structure particulière composée de chaînes de Poly(Ethylene Glycol) (PEG) greffées sur un groupement poly(L-lysine) chargé positivement (Figure 3A).

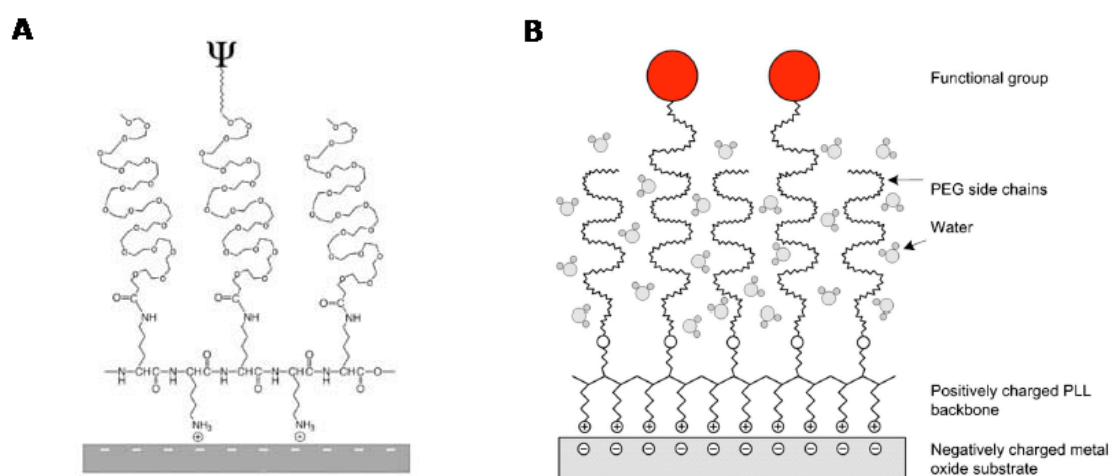


Figure 3 : (A) Illustration de l'adsorption du PLL-g-PEG marqué par une terminaison immobilisée sur un substrat chargé négativement (B) Illustration d'hydratation des chaînes de PEG en milieu liquide³⁸

Le groupe de recherche dirigé par Nicholas D. Spencer (Laboratory for Surface Science and Technology and Institute for Biomedical Engineering, Department of Materials, ETH Zurich) dont les travaux de recherche portent sur la fonctionnalisation et la caractérisation de surface dans le domaine des biomatériaux et biocapteurs, fut l'un des premiers à synthétiser et étudier les copolymères de type PLL-g-PEG. Kenausis *et al.* démontrèrent ainsi que ces macromolécules s'adsorbent spontanément sur des surfaces métalliques oxydées (TiO₂, Si_{0.4}Ti_{0.6}O₂, Nb₂O₅ ...).^{39 40} Les groupements d'amines primaires de la poly(L-lysine) chargés positivement à pH neutre, forment des liaisons de type électrostatique avec des surfaces métalliques oxydées et chargées négativement. Ces liaisons confèrent à la molécule de robustes propriétés de fixation sur ces surfaces. Les charges

présentes sur les surfaces d'attache ont donc une influence capitale sur le comportement de ce polymère.⁴¹

Les couches de PLL-g-PEG formées s'avèrent réduire efficacement l'adsorption de protéines provenant de sérum sanguin.⁴² Cette capacité de résistance à l'adsorption de protéines est directement liée aux propriétés des chaînes de Poly(ethylene glycol) (PEG).⁴³

Le PEG est neutre, hydrophile et soluble dans l'eau et dans certains solvants organiques. Il possède des caractéristiques très intéressantes telles qu'une bonne flexibilité de conformation⁴⁴, une bonne mobilité des chaînes et une forte présence d'accepteur de liaisons hydrogènes, qui lui confère un fort taux d'hydratation.^{45 46} Grâce à ces caractéristiques de chaînes en brosse désordonnée, les propriétés de répulsion de protéines des PEG sont assurées par un encombrement stérique de la surface en milieu liquide et une grande hydratation des chaînes.⁴⁷ Bien que les explications de la résistance aux protéines du PEG soient encore débattues⁴⁸, des approches théoriques et expérimentales ont montré que cet effet de répulsion stérique sur différents substrats était directement lié à la longueur et la densité des chaînes de polymères PEG.^{49 30, 50 33 29 51 52} Les polymères PEG ayant une forte densité surfacique et une grande longueur de chaînes présentent une résistance optimale aux protéines. L'architecture des PEG influe grandement sur la conformation des protéines adsorbées. Michel *et al.* ont de ce fait observé une certaine capacité pour de petites protéines (~20kDa) à s'adsorber entre les chaînes de PEG⁵³ Pasche *et al.*²⁸ modifièrent le taux de greffage g du polymère et le poids moléculaire des PEG (de 1 à 5 kDa) pour montrer que la densité de monomères éthylène glycol (EG) immobilisées sur une surface influe directement sur la résistance à l'adsorption de protéines. Des chaînes de PEG dont le poids moléculaire est situé entre 1 et 10 kDa assurent une densité de monomères EG suffisante pour passiver une surface.^{32 54 55 56 57} De plus, la faible toxicité et immunogénicité du PEG font de ce composé un candidat adapté pour des applications biomédicales.⁴²

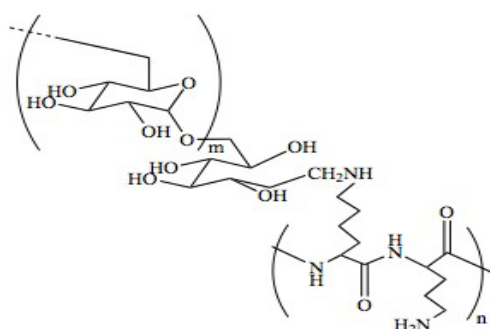
De nombreuses techniques d'immobilisation de PEG sur une surface ont par conséquent été développées, dont la physisorption^{58, 59}, la chimisorption⁶⁰, le greffage covalent de PEG sur une surface^{61 62} et la polymérisation par plasma de précurseurs d'oligo(ethylene glycol) OEG⁶³. A l'exception de la polymérisation plasma, ces techniques impliquent le dépôt d'une solution de PEG sur une surface à un taux d'immobilisation assez faible (<400 ng/cm²).⁶⁴ Cette faible densité de greffage de PEG par physisorption ou greffage covalent ne permet pas de réduire suffisamment l'adsorption de protéines au-delà du seuil de limite de détection de la plupart des techniques de diagnostic sans marquage se situant autour du ng/cm².⁶⁵ Les groupements EG font par ailleurs l'objet de nombreuses tentatives d'immobilisation sur une surface.⁶⁶ Prime and Whitesides ont démontré que des monocouches d'alcane thiol auto-assemblées avec une terminaison OEG confèrent à des surfaces d'or une résistance à l'adsorption de protéines décuplée par rapport aux surfaces basées sur les PEG.^{60 67 68 69} Les surfaces basées sur les OEG sont principalement développées pour les capteurs de détection par SPR depuis 2005.^{70 71}

Un atout indéniable à ce polymère réside dans le fait qu'il est possible de fonctionnaliser les chaînes de PEG. Pour caractériser sa localisation sur une surface par exemple, on peut ajouter un fluorophore. Des fonctionnalisations plus complexes ont été étudiées. VandeVondele *et al.*⁷² proposèrent ainsi un copolymère dont une partie des chaînes PEG greffées sont fonctionnalisées par

un motif peptidique RGD permettant de promouvoir spécifiquement l'adhésion cellulaire tout en limitant l'adsorption non-spécifique de protéines.

iii. Le PLL-g-dextran

Le Poly(L-lysine)-*grafted*-dextran (PLL-g-dextran) possède un groupement dextran greffé sur une poly(L-lysine) chargée. Le Dextran est un polysaccharide neutre composé de plusieurs unités glucosyles reliées en α -1,3 et α -1,6 (Figure 4). Les chaînes réalisées peuvent atteindre différentes longueurs et poids moléculaires allant de 3 à 20 kDa. Il est hydrophile, non chargé et soluble dans l'eau. Le PLL-g-dextran a été développé initialement pour stabiliser les triples hélices d'ADN⁷³ et pour



transporter des gènes fonctionnels sur des cellules ou des tissus. Cependant, d'autres travaux ont permis de démontrer son caractère hautement passivant.⁷⁴ De la même manière que le PLL-g-PEG, il s'adsorbe sur les substrats chargés négativement mais il n'est pas actuellement pas possible de le fonctionnaliser avec un fluorophore, ce qui entraîne des difficultés d'observation.

Figure 4 : Structure du PLL-g-Dextran

Le Dextran possède certains avantages par rapport au PLL-g-PEG. D'un point de vue du coût, le Dextran est bien moins cher que les chaînes de PEG fonctionnalisées utilisées pour la synthèse du PLL-g-PEG. Des études supplémentaires ont montré que le poids moléculaire⁷⁵, la structure⁷⁶ et la densité de greffage influencent fortement les propriétés de non adsorption de protéines, qui peuvent être supérieures à celles observées pour le PLL-g-PEG, et notamment pour des hautes températures.⁷⁷ Enfin, le PLL-g-dextran semble adéquat pour différents secteurs industriels nécessitant des solutions respectueuses de l'environnement (agro-alimentaire, industrie textile, transport maritime) et en particulier les applications biomédicales où la combinaison de la solubilité dans l'eau et des propriétés de passivation s'avèrent cruciales (analyses en laboratoire mais aussi revêtements pour cathéters, endoscope ...). Le Dextran a notamment été choisi pour la technologie Biacore basée sur des mesures SPR (Surface Plasmon Resonance). Les puces sont recouvertes d'une couche de chaînes dextran carboxylées non réticulées.

iv. Le parylène

Un autre polymère a été utilisé en 2010 pour contrôler l'adsorption moléculaire non-spécifique sur une surface. Il s'agit du parylène qui est biocompatible. L'équipe de H.G. Craighead⁷⁸ a démontré qu'il était possible de fabriquer de fins films de parylène, par un procédé de lithographie décrit par la Figure 5. Le film de parylène comporte des motifs de taille micrométrique à sub-micrométrique. Lorsqu'une solution de molécules est projetée sur ces motifs qui servent de pochoir, les molécules vont s'adsorber dans les zones disponibles. Après retrait du film, les géométries moléculaires formées sont très bien délimitées spatialement.

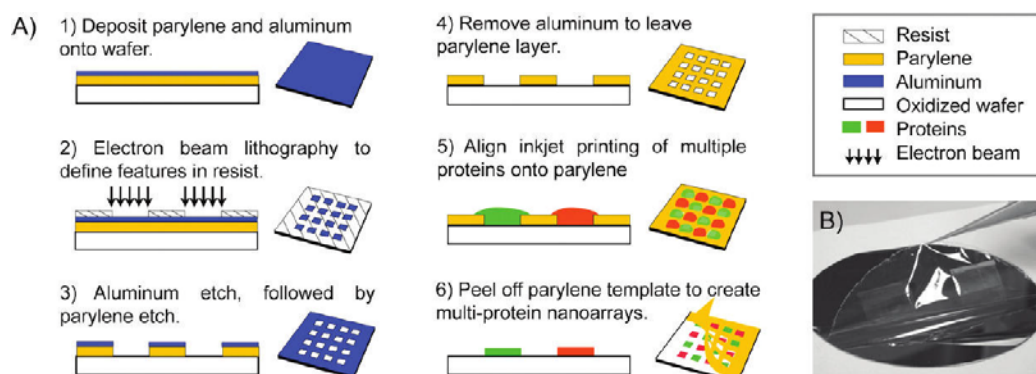


Figure 5 : (A) Procédé de fabrication de films de parylène, servant de pochoir pour le dépôt de protéines (B) Retrait du film de parylène, après projection de la solution de protéines.

Les films de parylène ont ensuite été utilisés pour différentes applications nécessitant un contrôle de l'adsorption de protéines sur une surface, comme par exemple pour délimiter des motifs de fibronectine, destinés à confiner la croissance de cellules.⁷⁹

c. Immobilisation de molécules sur des couches de polymères

Alors que les couches de PEO présentent des propriétés d'anti-adsorption pour les protéines, de manière très surprenante, différents travaux ont montré qu'il était possible de déposer des protéines par μ CP sur des couches anti-adhésives de PEO. Ruiz *et al.* ont ainsi déposé des motifs de poly(L-lysine) ou PLL sur une couche de PEO obtenue par dépôt plasma pour confiner la culture de cellules souches neuronales sur la surface.^{80 81 82} Les motifs de PLL déposés par μ CP sur la surface se maintiennent, malgré les propriétés de résistance à l'adsorption de protéines reconnues pour ces surfaces. Une des interprétations de ce phénomène réside dans le milieu environnant la couche de PEO. La couche de PEO ne se comporte pas de la même manière lorsqu'elle est en milieu liquide et lorsqu'elle est sèche. Nous détaillerons par la suite cette hypothèse.

De la même manière, Hucknall *et al.* ont démontré qu'il était possible de déposer des motifs d'anticorps sur une couche de polymère POEGMA (poly(oligo(ethylene glycol)methacrylate)) en brosse, synthétisée sur une lame de nitrocellulose pour ses propriétés passivantes.⁶ Ces surfaces bifonctionnelles ont ensuite été utilisées pour des tests de biodétection dans du sérum, démontrant de très bonnes propriétés de limitation de l'adsorption non-spécifique de protéines.

d. Traitement du timbre en PDMS pour l'impression moléculaire

Un article paru en 2010 présente des travaux intéressants portant sur l'amélioration des qualités intrinsèques d'un timbre en PDMS pour effectuer une immobilisation de molécules sur une surface par μ CP.⁸³ Ils présentent un timbre de PDMS modifié (iPDMS) permettant de réduire l'adsorption non-spécifique de protéines (pg/mL) en-deçà de la limite de détection du SPR. Un timbre de PDMS est modifié par polymérisation (surface initiated polymerization ou SIP) d'OEGMA (oligo(ethylene glycol) methacrylate) à partir de précurseurs préalablement présents sur la surface du timbre. Le poly(OEGMA) obtenu est ensuite fonctionnalisé par des groupements carboxyles et la couche obtenue sur le timbre atteint quelques micromètres et est très hydrophobe. Des anticorps sont ensuite déposés localement sur la surface puis le timbre est compressé entre deux micro-plaques. La solution contenant les analytes à détecter est ensuite injectée dans chaque puits puis une solution

contenant un anticorps secondaire marqué est injecté. Les interactions ont directement lieu sur le timbre. Comparé à des substrats de nitrocellulose bloquée à la BSA, les résultats obtenus montrent une grande augmentation de la spécificité de la réaction et une forte diminution des interactions parasites. Cependant ce type de travaux, en amont des étapes d'interaction entre molécules, reste relativement rare et complexifie le protocole d'interaction.

II/ Bi-fonctionnalisation de surfaces

Notre objectif consiste à réaliser des substrats bi-fonctionnels, composés de motifs précis de molécules sondes et minimisant l'adsorption non-spécifique sur le reste de la surface. La technique d'immobilisation de molécules que nous avons choisie porte sur l'impression moléculaire, de part les nombreux avantages qu'elle présente. Il s'agit d'intégrer dans la fabrication de motifs biomoléculaires par μ CP une ou plusieurs étapes diminuant les phénomènes non spécifiques à l'échelle moléculaire. Nous procéderons ensuite à une comparaison des méthodes employées minimisant l'adsorption indésirable.

1. Blocage de surface à l'éthanolamine

a. Etude des interactions non-spécifiques

Différents procédés de blocage de surface existent. L'un des plus couramment employés consiste à ajouter aux tampons utilisés dans les protocoles expérimentaux de la BSA ou du lait en poudre, possédant de la caséine. L'utilisation de lait en poudre dans les procédés d'interaction amène de nombreuses molécules indésirables, qui peuvent interagir avec la surface et la perturber. Quant à la BSA disponible commercialement, les produits disponibles (solution, poudre) ont une pureté de 96 à 98 %. Ces entités supplémentaires se déposent lors de l'incubation de la BSA sur le substrat, amenant une pollution de surface qui pourrait être évitée. Le blocage de surface basé sur la BSA est donc délicat à l'échelle moléculaire. Un autre type de blocage de surface basé sur l'éthanolamine a été testé à cet égard. La problématique posée consiste à analyser si un blocage de surface à l'éthanolamine est plus propre au niveau surfacique et équivalent en termes de limitation de l'adsorption non-spécifique de protéines, qu'un blocage de surface basé sur la BSA.

Pour répondre à cette interrogation, nous avons réalisé une étude en fluorescence d'un protocole complet de biodétection. L'interaction étudiée concerne le couple PLL-g-PEG fonctionnalisé à une extrémité par une terminaison biotine et une streptavidine marquée. Le protocole expérimental consiste à déposer par μ CP des motifs de PLL-g-PEG biotinylés sur une lame époxyde. Le PLL-g-PEG biotinylé se fixe sur la surface par la PLL, qui établit des liaisons électrostatiques avec la surface, et la terminaison biotine est disponible pour interagir en solution. Les motifs étudiés sont des plots de 160 μ m de diamètre à une période de 320 μ m. On effectue ensuite un blocage de surface avec de l'éthanolamine en incubant la solution sur le substrat. Enfin, une solution contenant les molécules cibles de streptavidine marquées en fluorescence (fluorophore Cy3) est incubée sur la surface. Après des lavages pour éliminer l'excès de molécules n'ayant pas interagi, l'échantillon est analysé à l'aide d'un scanner en fluorescence de type micro-array. La lecture est facilitée par la taille des motifs, largement supérieure au micron (résolution du scanner).

Le protocole expérimental détaillé, mis au point avec Emmanuelle Trevisiol, est le suivant :

- Dépôt par μ CP semi automatisé des plots de PLL-g-PEG biotinylés (concentration : 50 μ g/mL, temps d'encrage : 1min30, temps de contact 1min30) sur une lame époxyde
- Blocage de surface par incubation (ethanolamine dans tampon Tris-HCl, temps d'incubation : 30 min, lavage PBS 3x5 min)
- Interaction avec la streptavidine marquée Cy3 (concentration : 25 μ g/mL, temps d'interaction : 40 min, lavage tampon high salt 2x5 min, lavage tampon low salt 2x5min)ⁱ
- Lecture en fluorescence (scanner InnoScan900 Innopsys, λ_{exc} = 532 nm, Puissance laser = 10mW, Gain = 2%)

La Figure 6A présente la surface de la lame époxyde bloquée à l'éthanolamine et observée par scanner en fluorescence. La Figure 6B présente la surface la lame époxyde sans blocage à l'éthanolamine et observée par scanner en fluorescence. Une forte intensité de fluorescence provient de zones bien délimitées spatialement. Elles correspondent aux motifs de PLL-g-PEG biotinylés déposés par μ CP (plots de 160 μ m au pas de 320 μ m). La streptavidine étant l'unique entité marquée en fluorescence sur l'échantillon, l'intensité des plots témoignent de l'interaction spécifique de la cible streptavidine avec les motifs de PLL-g-PEG biotinylés. La fluorescence de la surface reste relativement faible comparée à celles des plots d'intérêt, pour l'image A. Au contraire, pour l'image B, on constate des trainées de fluorescence sur la surface, témoignant d'interactions non-spécifiques. L'intensité de fluorescence des motifs peut être comparée avec celle de la surface en calculant le rapport signal sur bruit (SNR). Ce paramètre nous permet d'analyser le contraste de fluorescence entre les zones d'intérêt définies par les plots de PLL-g-PEG biotinylés et le fond continu. Plus ce rapport est élevé, plus les motifs fluorescents sont discernables face au fond continu et l'interaction réalisée a été spécifique. Le SNR de l'image A, moyenné sur l'ensemble des plots, atteint plus de 100. Le SNR de l'image B est de 50. Le blocage à l'éthanolamine réduit donc considérablement les interactions non-spécifiques sur une surface.

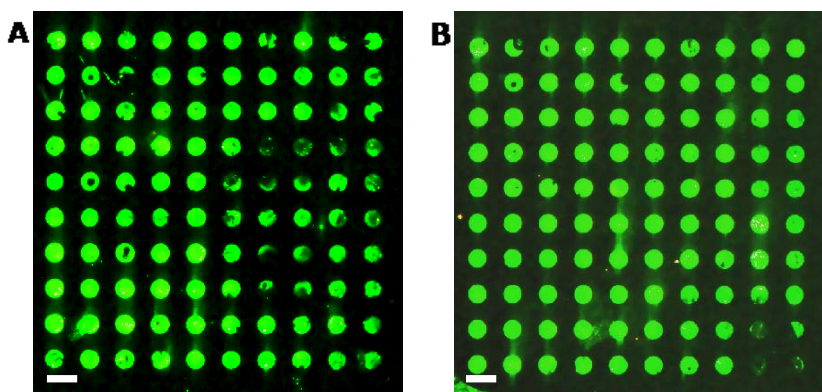


Figure 6 : Image obtenue en lecture scanner en fluorescence ($\lambda_{\text{exc}} = 532 \text{ nm}$) de motifs de PLL-g-PEG biotinylés ayant interagi avec une solution de streptavidine marquée Cy3. (A) La surface est bloquée par une incubation d'éthanolamine. SNR = 100 (B) Contrôle négatif, sans blocage à l'éthanolamine. SNR = 50. Barre d'échelle : 300 μ m.

- ❖ **Les cibles ont interagi spécifiquement avec les motifs de PLL-g-PEG biotinylés. Le blocage de surface à l'éthanolamine permet d'augmenter considérablement le rapport signal sur bruit et apparaît donc très convenable en termes de limitation d'adsorption non-spécifique, pour ce type d'interaction relativement simple basée sur la liaison streptavidine/biotine.**

b. Analyse surfacique

La caractérisation en fluorescence précédente nous a permis d'affirmer que le blocage à l'éthanolamine permet de limiter l'adsorption de protéines en surface. Nous souhaitons caractériser la même interaction PLL-g-PEG biotine / streptavidine avec une technique différente de la fluorescence qui pourrait nous apporter des informations complémentaires à une échelle moléculaire.

La méthode de caractérisation optique que nous souhaitons utiliser est non invasive car elle permet une observation grâce à un microscope optique classique fonctionnant avec une lumière blanche

polarisée. Elle est basée sur l'augmentation du contraste de surface (surface-enhanced ellipsometric contrast ou SEEC) grâce à l'utilisation de substrats spécifiques appelés Surfs. Il s'agit de contrôler les propriétés de réflexion de la lumière polarisée sur les surfs. L'augmentation de la sensibilité verticale de cette technique optique sans marquage provient d'une augmentation du contraste de l'objet par rapport à la surface. Elle atteint 0.2 nm. Le contraste est défini par la *Figure 7A* où I_1 est l'intensité de l'objet et I_0 l'intensité du fond. Minimiser l'intensité du fond permet ainsi d'augmenter le contraste.

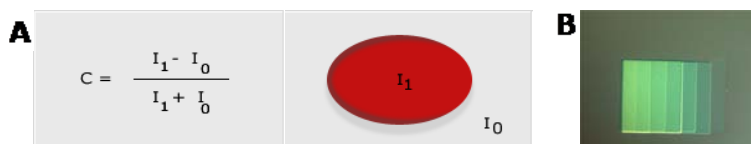


Figure 7 : (A) Formule définissant le contraste d'un échantillon où I_1 est l'intensité de l'objet et I_0 l'intensité de la surface (B) Image obtenue en microscopie optique d'un surf de calibration dont les différentes marches ont des épaisseurs connues (de 2 à 60nm)

Les substrats Surfs ont été conçus pour ne pas modifier l'état de polarisation de la lumière après réflexion. L'utilisation d'un analyseur croisé permet d'éteindre la lumière réfléchiée ($I_0 = 0$). De toutes petites quantités de matière sur le surf changent cette propriété, c'est-à-dire, modifie l'état polarisation et révèle l'échantillon. Cette technique permet donc d'observer de toute petite quantité de matière présente sur un échantillon. Les observations réalisées sont plus proches des événements moléculaires qui se produisent sur la surface. Pour obtenir une quantification de la matière observée en termes d'épaisseur, une calibration est nécessaire avant chaque mesure. Un surf de calibration possédant des marches d'épaisseurs différentes allant de 2 à 60 nm est observé au même titre que l'échantillon à analyser (*Figure 7B*). Il permet de définir la correspondance des couleurs de l'échantillon observé avec celle du calibre pour déterminer une équivalence entre le contraste observé et l'épaisseur de matière présente sur la surface.

De la même manière, le protocole expérimental consiste à déposer par μ CP des motifs de PLL-g-PEG biotinylés sur un surf. La surface du surf a reçu au préalable un traitement de type silane époxyde pour mimer la chimie de surface de la lame époxyde. Les motifs étudiés sont plus petits que les précédents car la sensibilité latérale des observations SEEC est celle d'un microscope. Les plots déposés ont un diamètre de 5 μ m pour une période de 10 μ m. On effectue ensuite un blocage de surface à l'éthanolamine sur le substrat. Enfin, une solution contenant les molécules cibles (streptavidine) marquée en fluorescence est incubée sur la surface suivie de lavages pour éliminer l'excès de solution. L'échantillon est analysé par SEEC juste après le dépôt des molécules sondes (*Figure 8*) et après blocage à l'éthanolamine et interaction avec les molécules cibles (*Figure 9*).

La *Figure 8A* présente une image de la surface de plots de PLL-g-PEG biotine observés par microscopie optique classique. Les motifs de molécules sont visiblement discernables sur les surfs malgré leur faible épaisseur. Les motifs sont bien délimités et affichent une forte régularité sur la zone de 200 μ m analysée. La *Figure 8B* présente une image de la même fenêtre d'analyse observée par SEEC et reconstituée avec une échelle de couleur artificielle représentant l'épaisseur de la matière sur la surface. Dès lors, la sensibilité de la technique laisse apparaître des différences d'épaisseur au sein des motifs déposés. Cette zone peut être observée en 3D (*Figure 8C*). La surface du surf est observée en bleu sur l'image. L'épaisseur moyenne du fond, composé du surf ayant subi une fonctionnalisation

silane époxyde se situe autour de 3 à 4 nm. Les plots atteignent une épaisseur de 8 nm avec un écart pouvant aller jusqu'à 11 nm, en bordure de la zone de dépôt. Un zoom sur une fenêtre de 30 μm délimitée par des traits en pointillés est présenté en *Figure 8D*. Il permet de discerner avec plus de précision les contours des motifs de PLL-g-PEG biotinylés déposés. Un surplus de matière est systématiquement observé au centre des spots, démontrant une certaine inhomogénéité au sein d'un même plot. Cette observation n'ayant pu être effectuée avec autant de sensibilité verticale en fluorescence démontre l'apport de cette technique de caractérisation optique lorsqu'on souhaite s'approcher de l'échelle nanométrique.

Au cours de ces expériences, nous avons noté qu'il est légèrement différent de déposer des molécules par μCP sur une surface de type surf que sur une lame de verre. Bien que la dernière couche de l'édifice moléculaire qui compose un surf soit composée de SiO_2 , les molécules ne sont pas transférées de la même manière. Il est nécessaire d'augmenter légèrement le temps de contact entre le timbre et le surf afin d'obtenir un transfert convenable de molécules.

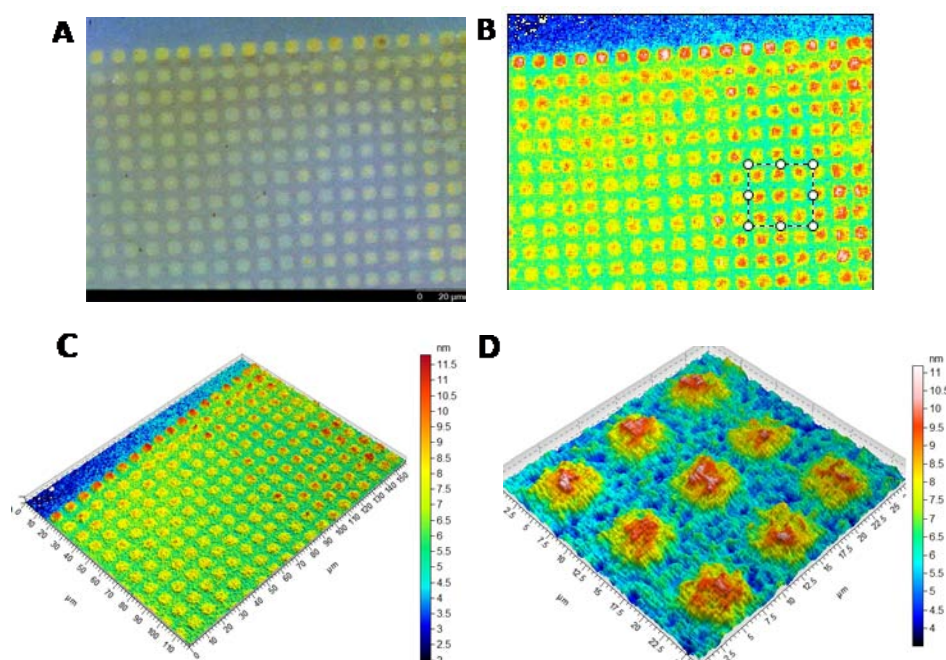


Figure 8 : Plots de PLL-g-PEG biotinylés déposés par μCP sur un surf silane époxyde (A) observés par microscopie optique (B) observée par SEEC et reconstituée par le système Salfus (C) Image en 3D (D) Zone de 30 μm agrandie en 3D.

La *Figure 9* présente l'observation de la même zone d'analyse de l'échantillon après le blocage de surface à l'éthanolamine, l'incubation de la solution de streptavidine marquée en fluorescence et les multiples lavages permettant d'éliminer les molécules excédentaires (protocole similaire à la section II/1-a). Les molécules de streptavidine étant marquées Cy3, il est possible d'observer leur localisation après interaction avec la surface. Sur la *Figure 9A*, obtenue par microscopie en fluorescence, une forte intensité de fluorescence émane de motifs bien délimités. Ces motifs correspondent aux plots de PLL-g-PEG biotinylés déposés par μCP . La surface entre les plots, bloquée à l'éthanolamine n'émet quasiment pas de fluorescence (SNR = 90). Les molécules de streptavidine ont donc interagi de façon spécifique avec les motifs de PLL-g-PEG biotinylés.

Lorsqu'on observe la même zone par SEEC (*Figure 9B*), la surface apparaît fortement perturbée. La matière présente sur l'échantillon est répartie plus uniformément sur la surface en dépit du blocage à l'éthanolamine. Les *Figure 9C et D* permettent d'entrevoir des motifs de matière biologique atteignant 10 à 11 nm. Les zones entre les motifs imprimés paraissent les plus touchées par les événements moléculaires subis. Les motifs sont moins bien définis dans ce fond de matière atteignant parfois 6 à 7 nm d'épaisseur. Le blocage de surface à l'éthanolamine semble être à l'origine de ces observations. Les molécules incubées ont pour fonction de s'adsorber sur la surface de l'échantillon pour occuper physiquement les sites d'adsorption, limitant ainsi les interactions non-spécifiques.

Grâce à l'observation en fluorescence, nous avons constaté que le blocage de surface limite correctement les interactions non-spécifiques entre les molécules de streptavidine et le surf fonctionnalisé. Cependant, la surface a subi de fortes perturbations en termes d'épaisseur à l'échelle moléculaire.

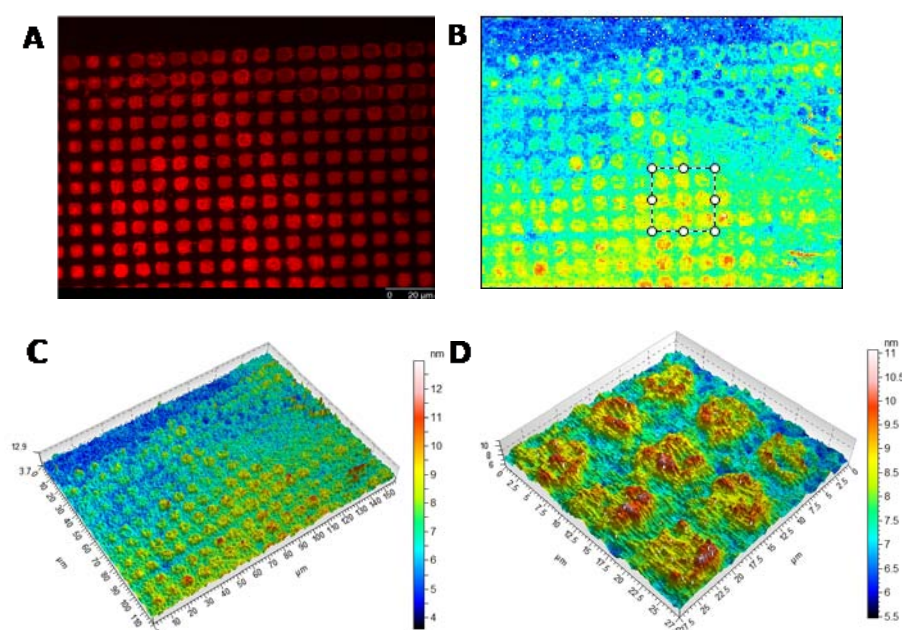


Figure 9 : Incubation d'une solution de streptavidine marquée en fluorescence (Cy3) sur les motifs de PLL-g-PEG biotinylés précédents (A) observés par microscopie à fluorescence (B) observée par SEEC et reconstituée par le système Sarfus (C) Image en 3D (D) Zone de 30 µm agrandie en 3D.

Cette comparaison met clairement en évidence de nombreux événements d'adsorption moléculaire à la surface de nos échantillons. En fonction des applications, ces événements moléculaires surfaciques peuvent ou non être préjudiciables. Pour des analyses effectuées en fluorescence (criblage, biodétection ...), l'interaction spécifique des molécules incubées avec les motifs de sondes est complètement satisfaisante. Le blocage de surface à l'éthanolamine permet bien de limiter les interactions non-spécifiques entre la cible marquée en fluorescence et les motifs d'intérêt. Dans ce cas, les événements moléculaires entraînés par les étapes de blocage, d'incubation et de lavages ne perturbent en aucun cas la lecture de l'échantillon. Par contre, pour des techniques de caractérisation basées sur des principes physiques différents et sensibles à la quantité de matière réelle présente sur la surface c'est-à-dire à l'épaisseur des couches de surface, les motifs d'intérêt sont difficiles à discerner dans le fond continu de matière.

- ❖ **On constate ici qu'il sera nécessaire d'employer des méthodes minimisant l'adsorption non-spécifique de protéines adaptées aux techniques de lecture utilisées, en particulier si le principe de lecture est basé sur les variations d'épaisseur ou d'indice optique.**

2. Passivation de surface basée sur des polymères

Une autre technique permettant de limiter l'adsorption indésirable de protéines porte sur la passivation de surface. Cette technique est basée sur le dépôt de polymères tels que le PLL-g-PEG et le PLL-g-dextran dont les propriétés assurent de faible interaction avec les protéines. Dans la littérature, ces polymères sont généralement incubés sur une surface. Les molécules en solution vont s'adsorber et se fixer sur le substrat par différents types de liaison, généralement électrostatiques pour les deux polymères cités. Nous souhaitons analyser le comportement de ces polymères face à nos techniques de dépôt par μ CP.

a. Le PLL-g-PEG

i. Impression moléculaire de motifs micrométriques de PLL-g-PEG

Nous souhaitons délimiter des motifs de PLL-g-PEG sur la surface d'un échantillon par μ CP. Les molécules de PLL(20)-g[3.5]-PEG(2) utilisées pour nos applications ont été fournies par la société Susos (Suisse). Conditionnées sous forme de poudre, une solution de PBS (0.001M PBS; NaCl - 0.138M; KCl - 0.0027M; pH 7.4) est ajoutée pour former les solutions d'encrage à des concentrations variant de 1 à 100 μ g/mL. Ces molécules sont marquées en fluorescence par des fluorophores FITC ou Rhodamine.

Les substrats sont des lames de verre nettoyées (bain d'isopropanol sous ultrasons, 5 min, 35 kHz puis bain d'eau déionisée sous ultrasons, 5 min, 35kHz) et activées par traitement plasma O_2 (5 min, 800 W). Un timbre en PDMS est encré avec une solution de PLL-g-PEG marquée en fluorescence et le timbre est ensuite séché sous flux d'azote. Les motifs présents sur le timbre de PDMS représentent un maillage de lignes croisées de taille micrométrique (2.5 μ m de large au pas de 10 μ m). Le timbre encré est ensuite amené en contact avec la lame activée pour réaliser l'étape d'impression moléculaire. Plusieurs paramètres sont à étudier afin d'obtenir des motifs biomoléculaires homogènes. Les temps d'encrage et de contact ainsi que la concentration de la solution de polymère sont les facteurs prépondérants. Les dépôts réalisés sont observés en microscopie en fluorescence pour analyser l'aspect général des motifs.

Une étude dédiée des temps d'encrage (de 30 sec à 2 min30) et de contact (de 30 sec à 2min30) a permis de définir respectivement des temps optimaux d'1 min 30 et d'1 min mais ne sera pas détaillée par souci de concision. La *Figure 10A* expose une image du substrat observé en microscopie en fluorescence (temps d'encrage : 1 min30, temps de contact : 1 min, concentration 100 μ g/mL). Avec ces paramètres expérimentaux, les motifs de PLL-g-PEG réalisés sont transférés sur le substrat avec une grande homogénéité sur la totalité de la surface et une précision importante.

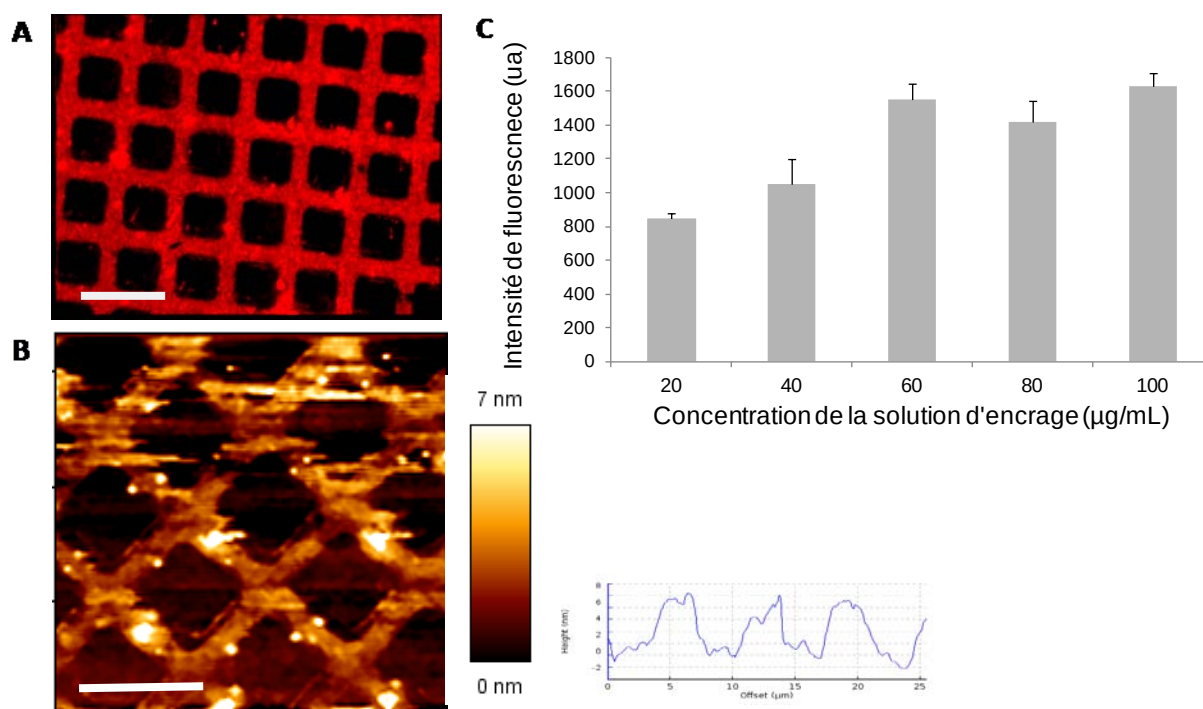


Figure 10 : Dépôt par μ CP d'un maillage de lignes croisées de PLL-g-PEG marqué par de la Rhodamine (A) observé en microscopie à fluorescence. (concentration solution d'encre: 100 μ g/mL) Barre d'échelle : 10 μ m. (B) observé en AFM en milieu liquide et en mode contact. Signal de hauteur et coupe transversale (concentration solution d'encre : 60 μ g/mL). Barre d'échelle : 10 μ m. (C) Etude de l'intensité de fluorescence obtenue pour des dépôts de PLL-g-PEG réalisés par μ CP à des concentrations variant de 20 à 100 μ g/mL.

Le bon transfert des molécules du timbre sur la lame peut aussi être contrôlé par AFM. La Figure 10B présente une image AFM du maillage de lignes de PLL-g-PEG croisées. La hauteur des motifs atteint 7 nm. L'épaisseur d'une monocouche de PLL-g-PEG, connue dans la littérature, est de 7nm en milieu liquide et 4nm à l'air.

❖ **A la concentration de 60 μ g/mL, les motifs de PLL-g-PEG obtenus sont donc proches de la monocouche. Le changement d'épaisseur entre une couche de PLL-g-PEG en milieu liquide et à l'air témoigne de la forte hydratation des chaînes de PEG, qui prennent une disposition de brosses lorsqu'elles sont en milieu liquide, augmentant ainsi l'épaisseur de la molécule.**

On ne distingue pas d'agrégats de molécules au sein des lignes comme le montre la coupe transversale de la Figure 10B, ce qui témoigne d'un transfert homogène de la solution encrée sur le timbre de PDMS sur l'échantillon. Le PLL-g-PEG peut donc être correctement déposé sur un substrat par μ CP et permet de définir des motifs micrométriques de très bonne qualité.

Par ailleurs, il est crucial d'obtenir des dépôts de biomolécules se rapprochant de la monocouche afin d'éviter que les molécules non fixées à la surface soient relarguées par la suite lors du passage en milieu liquide. Elles auraient tendance à se disperser sur le substrat et à passiver des zones d'intérêt. Il faut donc ajuster la concentration de la solution encrée sur le timbre pour obtenir des dépôts de faible épaisseur. De plus, les dépôts doivent être homogènes. Il faut donc trouver le bon compromis entre une concentration trop forte qui mènerait à plusieurs couches de molécules déposées et une concentration trop faible qui générerait des motifs irréguliers avec des zones sans molécules. Une seconde étude porte sur l'influence de la concentration de la solution de PLL-g-PEG sur le dépôt. Un

timbre de PDMS comportant le même relief topographique que précédemment (maillage de lignes), est encre avec une solution de PLL-g-PEG. La concentration de la solution varie de 20 à 100 $\mu\text{g/mL}$. Plusieurs dépôts de PLL-g-PEG sont réalisés et l'intensité de fluorescence des motifs est quantifiée. La *Figure 10C* présente l'intensité de fluorescence des motifs en fonction de la concentration de la solution de PLL-g-PEG. Plus la solution de polymère est concentrée, plus les dépôts réalisés exhibent une intensité de fluorescence forte. Concentrer la solution de 20 à 40 $\mu\text{g/mL}$ permet d'obtenir un gain en fluorescence de 20%. De 40 à 60 $\mu\text{g/mL}$, le gain en fluorescence est de 30%. L'intensité de fluorescence des dépôts augmentent parallèlement à l'augmentation de la concentration. A partir de 60 $\mu\text{g/mL}$, on observe un palier. Bien que la concentration de la solution augmente, l'intensité des dépôts reste quasi constante. L'écart maximum de fluorescence des dépôts réalisés à 60, 80, 100 $\mu\text{g/mL}$ est de 13%. La relation qui existe entre l'intensité de fluorescence et la quantité de molécules déposées n'est pas triviale. Augmenter la concentration de la solution encrée sur le timbre de PDMS permet d'obtenir des motifs de plus en plus denses. A une certaine valeur de concentration, qui dans le cas de la solution de PLL-g-PEG est définie à 60 $\mu\text{g/mL}$, les dépôts obtenus sont homogènes. Au-delà de cette concentration, il ne sera pas possible de déposer plus de matériel biologique sur la surface par μCP .

❖ **Les molécules de PLL-g-PEG peuvent donc être déposées selon des motifs précis sur une surface par μCP . A la concentration de 60 $\mu\text{g/mL}$ et selon les conditions expérimentales mises au point précédemment, nous avons donc réalisé des motifs de PLL-g-PEG proches de la monocouche d'environ 7 nm d'épaisseur. Ce point, particulièrement important nous assure de travailler avec des substrats biomoléculaires stables dont les molécules déposées sont fixées à la surface. Il reste maintenant à évaluer le comportement de tels motifs de PLL-g-PEG face à l'adsorption de protéines.**

ii. Etude des interactions non-spécifiques par fluorescence

Pour analyser le comportement du PLL-g-PEG face à l'adsorption de protéines, une solution d'anticorps anti-GST est incubée sur les motifs de PLL-g-PEG représentant le maillage de lignes croisées de taille micrométrique. Les anticorps vont alors interagir avec la surface. La concentration de la solution d'anticorps peut être modifiée mais cette étude ne sera pas détaillée. Les observations sont réalisées par microscopie à fluorescence puisque nous avons la possibilité de marquer les deux entités utilisées. Le PLL-g-PEG est marqué avec de la fluorescéine FITC ($\lambda_{\text{exc}} = 490 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{emi}} = 520 \text{ nm}$) et les anticorps anti-GST avec de la rhodamine ($\lambda_{\text{exc}} = 540 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{emi}} = 570 \text{ nm}$). Bien que les spectres de fluorescence de ces marqueurs soient proches, il est possible de différencier par microscopie à fluorescence la localisation des anticorps adsorbés sur le maillage de lignes croisées de PLL-g-PEG.

Le protocole expérimental détaillé est le suivant :

- Incubation d'anticorps anti-GST marqués avec de la rhodamine sur le maillage de lignes croisées de PLL-g-PEG (concentration : 40 $\mu\text{g/mL}$ dans PBS1x pH=7.4, temps d'incubation : 2 min)
- Lavages (PBS 1x, 3x5 min)
- Lecture en fluorescence (microscopie en fluorescence, lampe à mercure, cube d'excitation n°1 de $\lambda_{\text{exc}} = 460 \text{ nm}$ à 490 nm et cube d'excitation n°2 de $\lambda_{\text{exc}} = 510 \text{ nm}$ à 550 nm)

La *Figure 11* met en évidence les observations en fluorescence de l'échantillon. Le maillage de PLL-g-PEG présente des motifs bien définis malgré l'incubation des anticorps et les lavages qui ont été effectués (*Figure 11A*). Les molécules déposées sont donc bien liées électrostatiquement au substrat. La *Figure 11B* présente l'adsorption des anticorps anti-GST marqués avec de la rhodamine sur le

substrat. On constate qu'une forte intensité de fluorescence émane des zones entre les motifs de PLL-g-PEG. Les anticorps se sont donc adsorbés préférentiellement sur les zones de verre activé plutôt que sur les zones recouvertes de PLL-g-PEG. Le passivant a donc bien joué son rôle. Sur les motifs de PLL-g-PEG, l'intensité de fluorescence n'est pas complètement nulle. Cette observation peut provenir de deux effets. Des anticorps peuvent s'être adsorbés en très faible quantité sur les motifs de passivant. Une autre hypothèse est que l'excitation du fluorophore Rhodamine avec le cube n°2 ($\lambda_{\text{exc}} = 510 \text{ nm}$ à 550 nm) excite aussi le premier fluorophore FITC. La FITC émet donc légèrement dans le rouge et perturbe les mesures d'intensité. Cette fluorescence étant très légère comparée à celle des motifs d'intérêt ($\text{SNR} = 70$), nous pouvons affirmer que la *Figure 11* confirme donc le pouvoir passivant du PLL-g-PEG déposé par μCP .

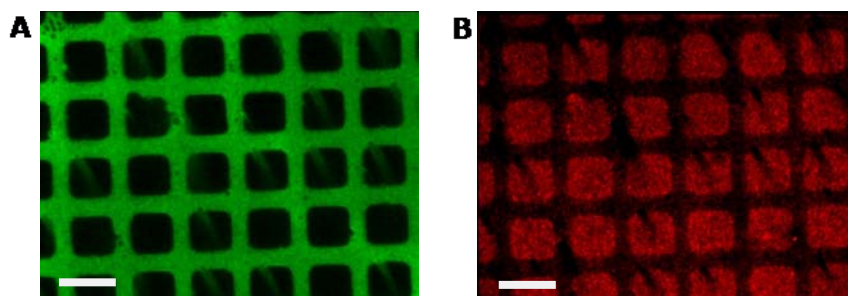


Figure 11 : Images obtenues en microscopie en fluorescence (A) de lignes de PLL-g-PEG marquées avec de la FITC et déposées par μCP (concentration de $60 \mu\text{g/ml}$) (B) d'anticorps anti-GST marqués avec de la Rhodamine incubés sur les lignes de PLL-g-PEG (concentration : $40 \mu\text{g/mL}$, temps d'incubation : 2 minutes). Barre d'échelle : $10 \mu\text{m}$.

Nous avons caractérisé la topographie de cet échantillon par AFM. La *Figure 12* propose une fenêtre de $50 \mu\text{m}$ observée en mode contact et en milieu liquide.

Nous retrouvons les zones d'intérêt sur lesquelles les anticorps se sont immobilisés. Des amas d'anticorps, d'une centaine de nm d'épaisseur sont distingués entre les lignes croisées de PLL-g-PEG. Cette topographie est retrouvée sur la majeure partie de la surface de l'échantillon. Cependant, de temps à autres, nous observons des défauts de passivation sur le substrat révélés par quelques amas d'anticorps au-dessus des zones imprimées avec le PLL-g-PEG.

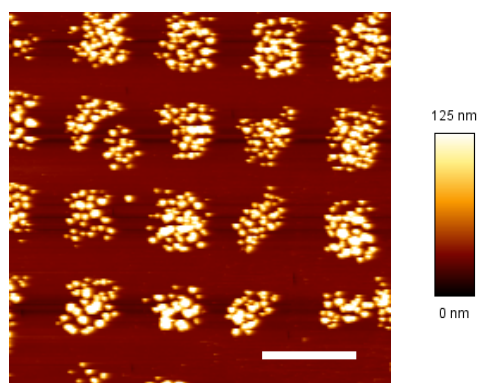


Figure 12 : Image AFM obtenue en mode contact et en milieu liquide d'anticorps anti-GST incubés sur un maillage de lignes de PLL-g-PEG. Barre d'échelle : $10 \mu\text{m}$.

Le PLL-g-PEG a été l'un des premiers polymères utilisés pour limiter les interactions non spécifiques de protéines sur un échantillon. D'autres passivants, dont les propriétés sont équivalentes voire meilleures en termes de limitation d'adsorption non-spécifique ont été synthétisés ces dernières années. Une étude dédiée portant sur l'un d'entre eux, le PLL-g-Dextran a été menée. Dans un premier temps, il s'agit d'analyser le comportement fondamental de cette molécule face à nos

techniques de dépôt par μ CP puis dans un second temps d'évaluer le comportement des substrats obtenus face à l'adsorption de protéines.

b. Le PLL-g-Dextran

i. Impression moléculaire de motifs micrométriques de PLL-g-dextran

Le PLL-g-Dextran est utilisé pour limiter l'adsorption de protéines. Il est généralement incubé sur un substrat comportant des motifs de molécules sondes. Etant donné que notre technologie d'immobilisation de molécules repose sur l'impression moléculaire, nous avons étudié le dépôt du PLL-g-Dextran par lithographie douce. Le PLL-g-dextran utilisé pour nos expériences est fourni par la société Susos (Suisse) dont la formulation est la suivante : PLL(20kDa)-g[3-4]-dextran(5kDa). Conditionné sous forme de poudre, une solution de PBS (0.001M PBS; NaCl - 0.138M; KCl - 0.0027M; pH 7.4) est ajoutée pour former les solutions d'encrage à des concentrations variant de 1 à 100 μ g/mL. Un timbre en PDMS comportant un maillage de lignes croisées de taille micrométrique (2.5 μ m de large au pas de 10 μ m) est encré avec la solution de PLL-g-dextran. Il est ensuite séché sous flux d'azote et mis en contact avec une lame de verre nettoyée et oxydée par traitement plasma O_2 . De part l'absence de marquage fluorescent de cette molécule, les seuls contrôles possibles du transfert des molécules sur la surface sont réalisés par AFM. L'observation est délicate car le PLL-g-dextran est connu dans la littérature pour avoir une très faible épaisseur en milieu liquide. En optimisant le dépôt par μ CP afin d'obtenir des couches de faible épaisseur, idéalement proche de la monocouche, les conditions d'observations par AFM sont d'autant plus difficiles. La lame de verre doit dans ce cas présenter une surface lisse exempte de toute impureté afin d'imager ces motifs de très faible épaisseur. La Figure 13 présente une analyse topographique des motifs de PLL-g-dextran déposés par μ CP et observés en milieu liquide par AFM (signal de hauteur et coupe transversale). Les motifs déposés sont bien définis et correspondent à ceux présents sur le timbre de PDMS (2.5 μ m de large au pas de 10 μ m). Aucun amas superficiel de matière n'est observé. Au sein des lignes de PLL-g-dextran, la matière déposée est homogène. L'épaisseur des lignes de PLL-g-dextran atteint 4 à 5 nm. L'impression moléculaire du PLL-g-dextran sur la lame de verre permet d'obtenir des structures de faible épaisseur d'une bonne définition à l'échelle micrométrique.

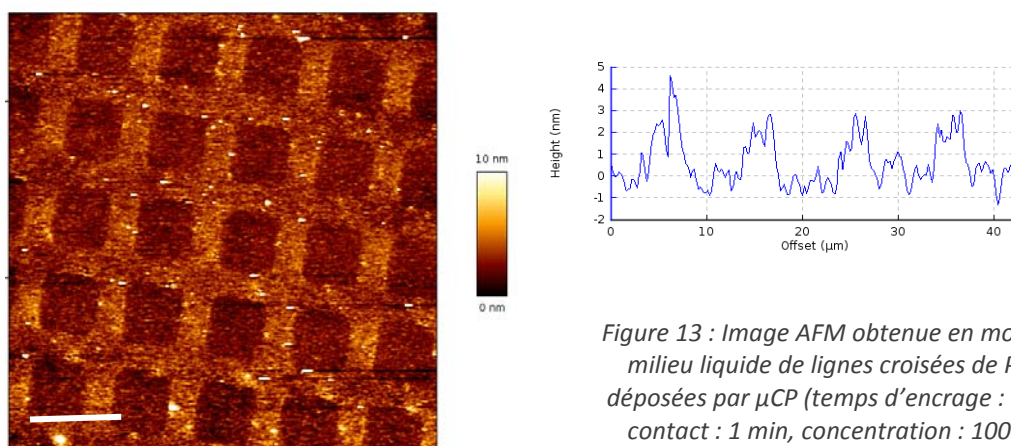


Figure 13 : Image AFM obtenue en mode contact et en milieu liquide de lignes croisées de PLL-g-Dextran, déposées par μ CP (temps d'encrage : 1 min, temps de contact : 1 min, concentration : 100 μ g/ml). Barre d'échelle : 10 μ m. Signal de hauteur et coupe transversale.

ii. Etude des interactions non-spécifiques par fluorescence et AFM

Nous souhaitons maintenant évaluer le comportement de ce maillage de lignes de PLL-g-dextran face à l'adsorption de protéines. Une solution d'anticorps anti-GST est incubée sur les motifs de PLL-g-dextran, dans les mêmes conditions expérimentales que pour le PLL-g-PEG.

Le protocole expérimental détaillé est le suivant :

- Incubation d'anticorps anti-GST marqués avec de la rhodamine sur le maillage de lignes croisées de PLL-g-dextran (concentration : 40 $\mu\text{g/mL}$, temps d'incubation : 2 min)
- Lavages (PBS 1x, 3x5 min)
- Lecture en fluorescence (microscopie en fluorescence, lampe à mercure, cube d'excitation n°2 de $\lambda_{\text{exc}} = 510 \text{ nm}$ à 550 nm)

L'adsorption des anticorps marqués avec de la Rhodamine est analysée en microscopie à fluorescence et en AFM. La *Figure 14A* présente une zone de 70 μm sélectionnée sur la surface du substrat et observée par microscopie à fluorescence. Les motifs de PLL-g-dextran ne sont pas discernables car ils ne présentent pas de marquage en fluorescence. En revanche, l'adsorption des anticorps marqués est très distincte suivant les motifs de lignes de PLL-g-dextran déposées par μCP . La couche formée par les anticorps ne paraît pas complètement homogène. Une très faible intensité de fluorescence émane entre les motifs de passivant donc une faible quantité d'anticorps s'est adsorbée sur la lame de verre, ce qui est contraire à ce que nous attendions. La caractérisation du substrat met clairement en évidence une plus grande affinité des protéines pour les motifs de PLL-g-dextran que pour le substrat de verre, pourtant activé par traitement plasma O_2 au préalable. Afin de vérifier cette observation, la topographie du substrat a été analysée par AFM. La *Figure 14B* présente une image AFM d'une fenêtre de 45 μm de l'échantillon. Des agrégats d'anticorps sont discernables de part leur forte épaisseur de près de 150 à 200 nm. Leur localisation suit précisément la géométrie de motifs de PLL-g-dextran. Les anticorps incubés sont donc adsorbés préférentiellement sur le passivant. Quelques agrégats supplémentaires sont situés entre les motifs de PLL-g-dextran, corroborant l'imagerie en fluorescence. Cette observation surprenante a été obtenue de manière systématique sur plusieurs échantillons.

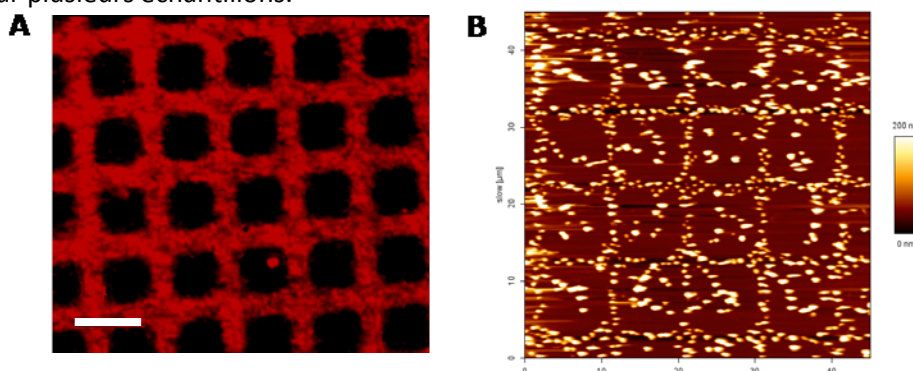


Figure 14 : Anticorps anti-GST marqués Rhodamine, incubés sur un maillage de lignes de PLL-g-dextran (concentration : 40 $\mu\text{g/mL}$, temps d'incubation : 2 min) (A) observés en microscopie en fluorescence. Barre d'échelle : 10 μm . (B) observés en AFM en mode contact et en milieu liquide

Ces observations vont délibérément en opposition avec la littérature sur le sujet. Les propriétés du PLL-g-dextran sont connues pour limiter l'adsorption des protéines lorsqu'il est incubé en milieu liquide sur une surface. De plus amples investigations ont été menées par Micro Balance à quartz (QCM) afin de comprendre le comportement du PLL-g-dextran déposé par μCP .

iii. Propriétés anti-adhésives du PLL-g-dextran étudiées par QCM

Le modèle de QCM utilisé pour cette étude est un système de Qsense E4 (QX303, société Qsense, Suède) avec lequel la caractérisation d'interaction peut être effectuée en milieu liquide sur 4 chambres en parallèle. L'objectif de cette étude consiste à caractériser les propriétés de passivation du PLL-g-dextran déposé par μ CP afin de comprendre le comportement observé précédemment face à l'adsorption d'anticorps. Une solution de PLL-g-dextran obtenue par incubation en milieu liquide sur un quartz servira de référence. Nous souhaitons déterminer si la technique de dépôt a une influence sur les propriétés passivantes du PLL-g-dextran.

La surface du disque de quartz doit être traitée à l'identique de celle des lames de verre utilisées précédemment. La surface des quartz, de type SiO_2 est donc oxydée par traitement plasma O_2 (800W, 5 min). Nous avons ensuite généré deux quartz : un 1^{er} possédant une couche de PLL-g-dextran obtenue par incubation en milieu liquide et un 2^{ème} dont la couche de PLL-g-dextran est déposée directement sur le quartz par μ CP en utilisant un timbre de PDMS plat sans motifs de surface. Cette étude fait l'objet d'une publication dont les résultats principaux seront brièvement exposés.

La Figure 15 présente les courbes de QCM caractérisant la formation d'une couche moléculaire sur le capteur. Sur le quartz n°1, une fine couche de PLL-g-dextran est déposée par μ CP. Aucune étape supplémentaire n'est à effectuer donc le quartz est positionné dans la chambre microfluidique. Un flux de PBS 1x est injecté pendant les 30 minutes. Une légère chute de fréquence de résonance (2.5 Hz) est observée mais entièrement attribuée à une dérive naturelle de la fréquence d'oscillation.

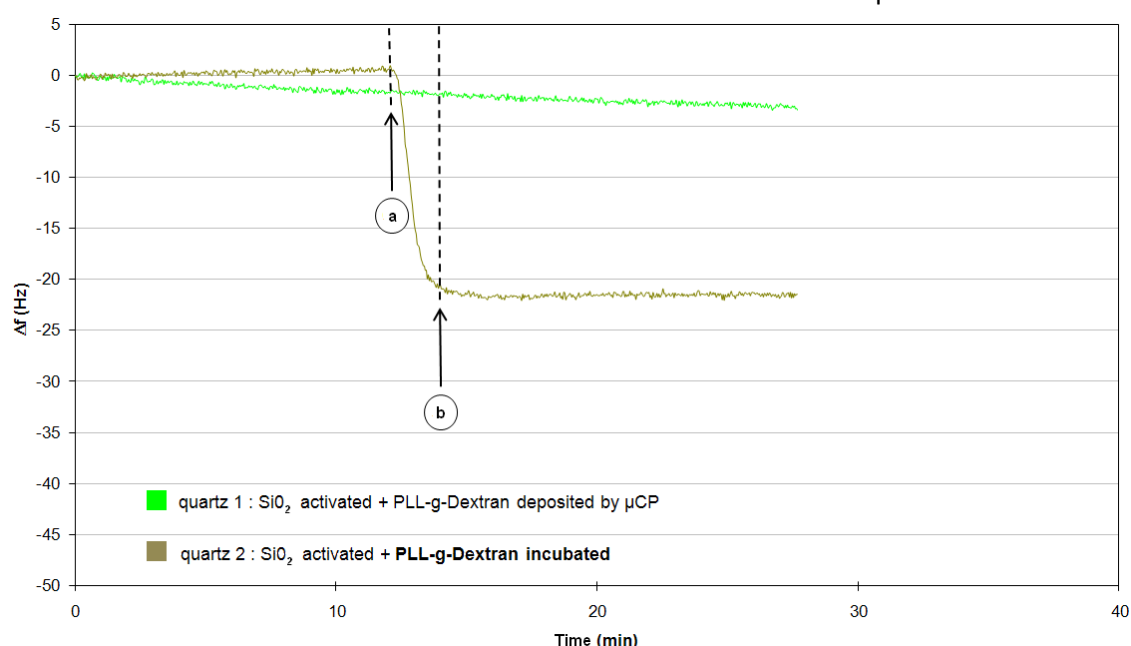


Figure 15 : Courbes QCM décrivant la formation d'une couche de PLL-g-dextran sur un quartz SiO_2 oxydé par traitement plasma O_2 . La surface du quartz n°1 comporte une couche de PLL-g-dextran déposée par μ CP avec un timbre de PDMS plat. La surface du quartz n°2 comporte une couche de PLL-g-dextran obtenue par incubation (a) injection de la solution de PLL-g-dextran de concentration de 100 $\mu\text{g/mL}$ sur le quartz 2 (b) lavage au PBS 1x.

Aucune molécule de PLL-g-dextran déposée par μ CP sur le quartz n°1, n'a été relarguée de la surface. Sur le quartz n°2, la formation de la couche de PLL-g-dextran est obtenue par incubation en milieu

liquide. Une solution de PLL-g-dextran est injectée dans la chambre (a). L'adsorption des molécules sur la surface du capteur est confirmée par la chute de la fréquence de résonance du quartz (22Hz). Un lavage au PBS pendant 15 minutes est effectué pour éliminer les molécules n'ayant pas interagi avec la surface. La fréquence de résonance du quartz après lavage est stable. Aucune désorption de molécules de PLL-g-dextran n'est observée. L'interaction entre les molécules de PLL-g-dextran incubées et la surface du quartz est donc forte. Ces interactions sont de nature électrostatique de par la présence de charges positives sur la poly-lysine et de charges négatives sur la surface du quartz.

L'étape suivante consiste à injecter une solution d'anticorps sur les deux quartz afin de comparer le comportement des deux couches moléculaires face à l'adsorption de protéines. La *Figure 16* présente les courbes expérimentales décrivant cette étape. Une solution d'anticorps anti-GST est injectée à la surface des deux quartz (a). Les protéines vont interagir avec les deux couches moléculaires pendant une durée de 10 minutes. Puis, un lavage au PBS 1x est effectué dans les deux chambres pendant 15 minutes pour éliminer tout excès moléculaire. Il est maintenant possible de décrire les interactions qui se sont produites à la surface des quartz. Un comportement radicalement opposé est observé. Les signaux, relativement stables montrent une forte chute de la fréquence de résonance du quartz n°1 (10 Hz) lors de l'injection des anticorps. Les anticorps s'adsorbent donc sur la surface du capteur. Malgré les lavages, ils ne sont pas relargués par la suite, ce qui montre une forte interaction avec la couche de PLL-g-dextran du quartz n° 1, déposée par μ CP. Au contraire, la fréquence d'oscillation du quartz n°2 ne varie pas au cours des 20 minutes d'analyse aussi bien lorsque les anticorps sont injectés dans la chambre que lors du lavage. Cette courbe démontre qu'il n'y pas d'adsorption d'anticorps sur la couche de PLL-g-dextran du quartz n°2, obtenue par incubation en milieu liquide.

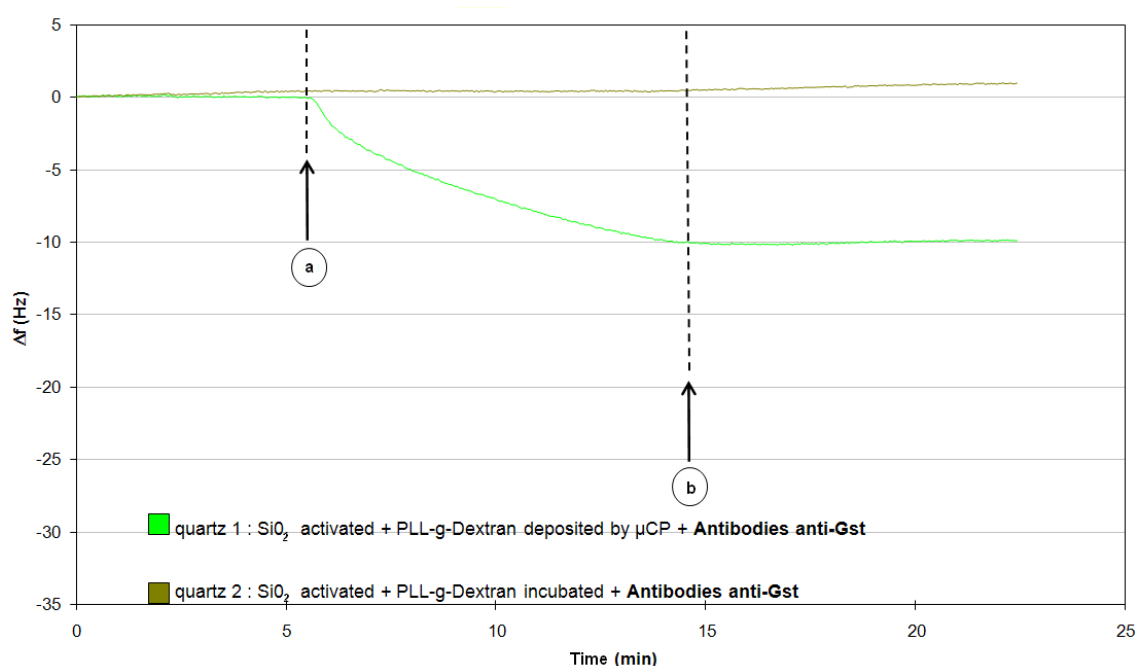


Figure 16 : Courbes QCM décrivant le comportement du PLL-g-dextran face à l'adsorption d'anticorps anti-GST. Le quartz n°1 comporte une couche de PLL-g-dextran obtenue par dépôt μ CP. Le quartz n°2 comporte une couche de PLL-g-dextran obtenue par incubation. (a) injection de la solution d'anticorps anti-GST de concentration 40 μ g/mL (b) lavage au PBS 1x.

Cette étude préliminaire montre donc un comportement radicalement différent face à l'adsorption d'anticorps d'une couche de PLL-g-dextran obtenue par incubation en milieu liquide ou par μ CP. Les

molécules de PLL-g-dextran obtenues par incubation en milieu liquide résistent à l'adsorption de protéines, conformément à la littérature alors qu'une couche de PLL-g-dextran déposée par μ CP semble interagir et fixer les protéines. La technique de formation de couches moléculaires à base de PLL-g-dextran semble donc avoir une importance capitale sur ses propriétés.

Cette expérience préliminaire a donné suite à de nombreuses analyses en QCM afin de comprendre plus fondamentalement le comportement de cette molécule lorsqu'elle est déposée par μ CP. Des expériences similaires ont été menées en faisant varier la concentration de la solution d'anticorps (de 50 à 200 μ g/mL) ainsi que la solution d'encrage du PLL-g-dextran (de 10 à 200 μ g/mL) et montrent le même comportement (Annexe 2). Les molécules de PLL-g-dextran déposées par μ CP avec un timbre de PDMS hydrophobe non traité présentent de fortes propriétés de fixation d'anticorps.

iv. Influence de l'énergie de surface du timbre en PDMS

Nous avons par la suite tenté d'élaborer un nouveau procédé afin de déposer le PLL-g-dextran par lithographie douce tout en maintenant son comportement passivant. L'étape qui diffère fondamentalement entre la formation de la couche de PLL-g-dextran exhibant des propriétés passivantes et la couche de PLL-g-dextran déposée par μ CP non passivante porte sur la technique de dépôt. La molécule de PLL-g-dextran est relativement proche en termes de structure de celle du PLL-g-PEG, elles possèdent le même groupement PLL sur lequel des chaînes de PEG ou le polysaccharide dextran sont greffés. Or, le PLL-g-PEG garde sa résistance à l'adsorption de protéines lorsqu'il est déposé par μ CP. La différence entre ces deux molécules, provenant du polysaccharide dextran peut être à l'origine du phénomène observé. Nous faisons l'hypothèse que le contact entre les molécules de PLL-g-dextran, et en particulier le groupe dextran et le timbre de PDMS entraîne une configuration particulière des molécules à la surface du timbre. Pour étudier cette hypothèse, nous avons modifié l'énergie de surface d'un timbre en PDMS grâce à un léger traitement par plasma O_2 (300W, 30sec). Ce timbre est ensuite encré par une solution de PLL-g-dextran, séché et mis en contact avec une lame de verre nettoyée et oxydée. Les motifs topographiques du timbre sont un maillage de lignes micrométriques croisées (2.5 μ m de large au pas de 10 μ m).

La *Figure 17A* présente la topographie de surface des motifs de PLL-g-dextran déposés avec un timbre oxydé, donc hydrophile. Les motifs de PLL-g-dextran paraissent homogènes et l'épaisseur des molécules déposées atteint 5 nm. La topographie des motifs ne diffère pas de ceux déposés avec un timbre de PDMS non traité au plasma (*Figure 14*). Afin de constater si le traitement du timbre a eu une influence sur les molécules de PLL-g-dextran encrées à sa surface, une solution d'anticorps anti-GST est incubée sur les motifs de PLL-g-dextran. L'adsorption des anticorps marqués avec de la rhodamine est analysée par microscopie en fluorescence. L'intensité de fluorescence des anticorps provient des zones prédéfinies entre les motifs de PLL-g-dextran (*Figure 17B*). Les anticorps se sont donc dans ce cas adsorbés préférentiellement sur la lame de verre oxydée, en dehors des lignes de passivant. Ainsi, en rendant la surface du timbre en PDMS hydrophile par traitement plasma, on peut influencer sur le comportement des molécules de PLL-g-dextran imprimées. Des molécules de PLL-g-dextran déposées par μ CP avec un timbre de PDMS légèrement oxydé conservent leurs propriétés de limitation d'adsorption non-spécifique de protéines. Cette observation corrobore l'hypothèse de

départ, qui consistait à dire que l'origine du phénomène observé est liée à l'étape d'encreage du timbre par la solution de PLL-g-dextran.

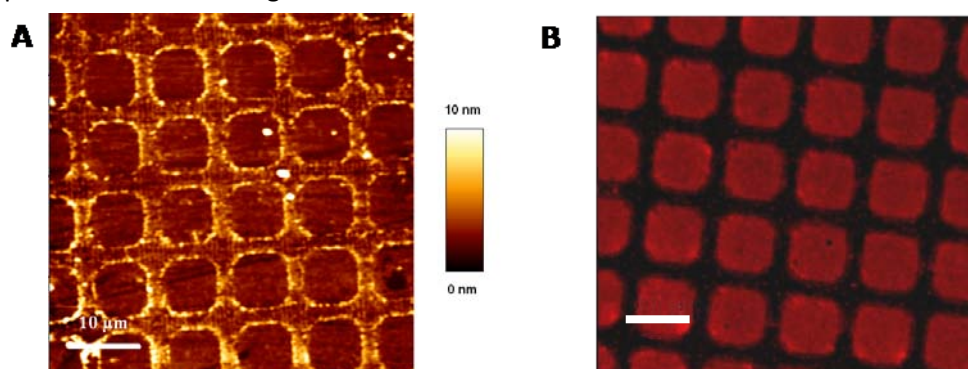


Figure 17 : (A) Maillage de lignes croisées de PLL-g-dextran, déposé par μ CP avec un timbre de PDMS préalablement oxydé par plasma O_2 observé par AFM en mode contact et en liquide (B) Incubation d'anticorps anti-GST marqués avec de la rhodamine sur le substrat observé en microscopie en fluorescence. Barre d'échelle : 10 μ m.

Nous pouvons donc utiliser le PLL-g-dextran pour ses propriétés de passivant, en prenant garde à modifier l'énergie de surface du timbre en PDMS utilisé pour son dépôt par μ CP.

Ce travail fait l'objet d'une publication présentée à la fin de ce chapitre.

3. Impression de molécules sondes sur une couche passivante

Le blocage et la passivation de surface sont des étapes clés d'un protocole biochimique pour limiter l'adsorption indésirable de protéines sur un substrat. Généralement réalisée par incubation d'une solution sur une surface, elles entraînent une succession complexe d'événements biomoléculaires lorsque les molécules incubées interagissent avec l'échantillon. Selon le type de liaisons mises en jeu, les molécules s'adsorbent de façon plus ou moins stable sur la surface. Plusieurs lavages sont ensuite indispensables pour éliminer le surplus de solution n'ayant pas réagi et les molécules faiblement liées à la surface. Ces étapes sont délicates car leur succès dépend d'un bon compromis entre de nombreux paramètres tels que le temps d'incubation, la concentration de la solution utilisée et l'efficacité des lavages. Bien que maîtrisées, les interactions non-spécifiques sur un substrat peuvent être limitées mais jamais entièrement éliminées.

Dans ce travail, nous souhaitons maîtriser les surfaces mises en jeu à l'échelle moléculaire. Pour cela, nous souhaitons nous affranchir des étapes d'incubation de solution sur une surface ayant des molécules immobilisées. En effet, nous avons constaté que l'incubation de sondes sur des motifs de polymères déposés par μ CP pouvait entraîner des défauts surfaciques (Figure 12) ainsi que des agglomérats de protéines sur l'échantillon. De même, l'incubation d'une solution de blocage ou de passivation sur des motifs de sondes déposés par μ CP, entraîne une détérioration des structures à l'échelle moléculaire (Figure 8). La problématique actuelle consiste à obtenir des surfaces bi-fonctionnelles composées de motifs de molécules sondes entourés de passivant, sans que les étapes d'incubation de molécules ne détériorent le substrat. Pour cela, nous avons développé une technique d'impression moléculaire de sondes directement sur des couches de passivant afin d'obtenir des substrats bi-fonctionnels stables.

a. Impression moléculaire sur des couches passivantes de PEO

Dans un premier temps, notre travail a porté sur des couches de PEO, fournis par l'Institute for Health and Consumer Protection (IHCP) localisé dans le centre de Joint Research Center (JRC) à Ispra en Italie. Bretagnol *et al.* ont développé une technique de fabrication de couches de PEO par des technologies de polymérisation plasma.³⁷ Fixées de façon covalente sur des lames de verre ou wafers de silicium, les couches obtenues présentent une grande homogénéité en termes d'épaisseur ($23 \text{ nm} \pm 0.5 \text{ nm}$). Ces couches possèdent une forte résistance à l'adsorption de protéines et à l'adhésion cellulaire. Cependant comme décrit dans l'article, l'équipe de F. Rossi a démontré qu'il était possible d'immobiliser des molécules à leur surface par microcontact printing sans pour autant porter atteinte aux propriétés passivantes de la couche de PEO.⁸¹ Des motifs de poly(L-lysine) et de fibronectine ont pu être déposés sur une couche de PEO pour favoriser l'attachement de cellules sur l'échantillon. Nous souhaitons dans cette partie expérimentale, reproduire cette observation et comprendre si ce phénomène est transférable à des couches de polymères de type PLL-g-dextran.

i. Dépôt et maintien des molécules sondes sur une couche de passivant

Dans cette optique, nous avons tenté d'immobiliser par μ CP des molécules sondes sur une lame de verre couverte par une fine couche de PEO, fournis par le JCR. Un timbre en PDMS est encre avec une solution d'anticorps anti-GST (temps d'encrage : 1min30) puis séché par flux d'azote. Ce timbre possède des motifs composés de plots micrométriques ($4 \text{ }\mu\text{m}$ de diamètre de période de $10 \text{ }\mu\text{m}$). Le timbre encre est ensuite mis en contact avec le substrat dont la surface est composée de la couche de PEO (temps de contact 1min, concentration $50 \text{ }\mu\text{g/mL}$). Un lavage au PBS 1x est effectué pour éliminer les molécules faiblement liées à la surface. Afin de caractériser le transfert des anticorps du timbre sur la surface PEO, nous avons réalisé des observations topographiques par AFM. La *Figure 18* présente les signaux de hauteur et de déflexion verticale ainsi qu'une coupe topographique, enregistrés sur une fenêtre de $100 \text{ }\mu\text{m} \times 100 \text{ }\mu\text{m}$ (*Figure 18A*). On observe des motifs moléculaires sur la surface correspondant à ceux présents sur le timbre. Malgré les propriétés de résistance à l'adsorption de protéines du PEO, les anticorps anti-GST ont pu être immobilisés sur cette couche. Il est difficile d'affirmer avec certitude quel type de liaison s'est établi entre les anticorps et la couche de PEO. Cependant, ces motifs ont été transférés avec peu d'homogénéité sur la couche de PEO car plusieurs plots n'ont pas été complètement déposés. Le profil topographique (*Figure 18C*) confirme ces irrégularités au sein même des motifs. La majeure partie des plots d'anticorps atteint 10 nm d'épaisseur mais l'écart type mesurée est grand (jusqu'à 14 nm d'écart entre plots). Pour obtenir des motifs homogènes, nous avons légèrement modifié les paramètres d'immobilisation des protéines sondes sur la couche de PEO. Nous avons légèrement diminué la concentration de la solution d'anticorps ($25 \text{ }\mu\text{g/mL}$) et augmenté le temps de contact avec la surface (2 min). La *Figure 18D* présente la topographie enregistrée par AFM sur une zone de $100 \text{ }\mu\text{m} \times 100 \text{ }\mu\text{m}$. Tous les plots sont transférés sur la surface mais les différences d'épaisseur des motifs sont encore présentes (*Figure 18F*).

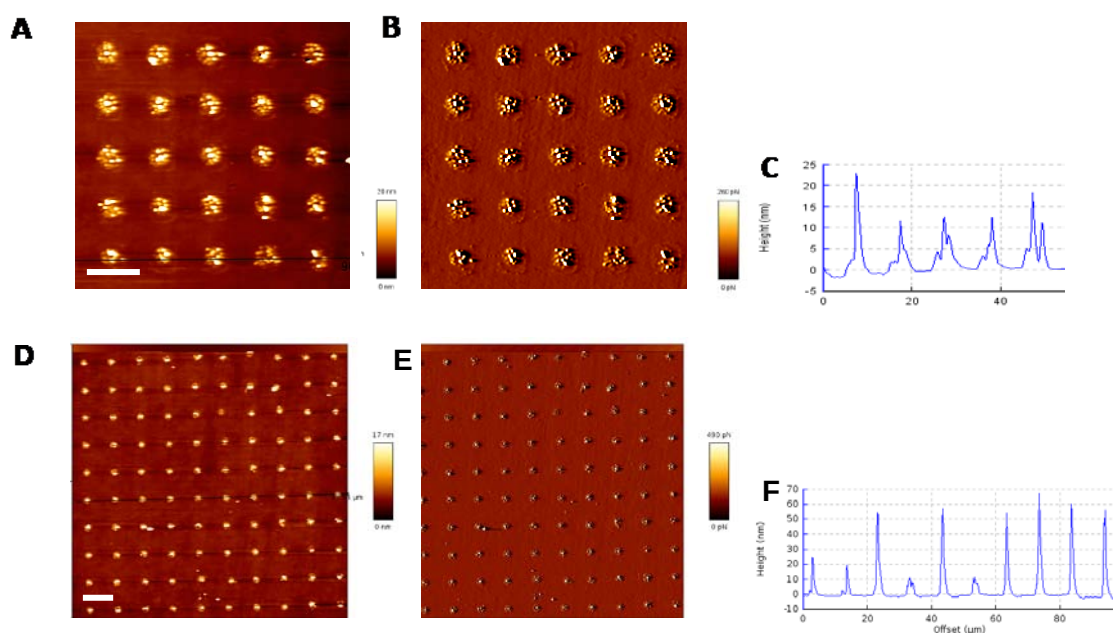


Figure 18 : Plots d'anticorps anti-GST déposés par μ CP sur une couche de PEO. Barre d'échelle : 10 μ m. (A) Signal de hauteur (B) Déflexion verticale (C) Profil topographique (Concentration : 50 μ g/mL et temps de contact : 1min) (D) Signal de hauteur (E) Déflexion verticale (F) Profil topographique. (Concentration : 25 μ g/mL et temps de contact : 2 min.)

ii. Hypothèse formulée

Ces observations nous ont permis de constater qu'il était possible d'immobiliser des molécules sondes sur une couche de passivant de type PEO. Il est cependant difficile de comprendre comment des molécules présentant des propriétés de limitation de l'adsorption de protéines, accueillent et maintiennent des motifs d'anticorps déposés par μ CP. Une des interprétations de ce phénomène réside dans le milieu environnant la couche de PEO. En milieu liquide, c'est-à-dire lorsqu'une solution de protéines est incubée sur la couche de PEO, le polymère exhibe de fortes propriétés de résistance à l'adsorption de protéines en raison de la forte hydratation de la couche. Lorsque la couche de PEO est à sec, cette hydratation est absente et la configuration de la couche permet la fixation de protéines par μ CP. Cette étape, réalisée par μ CP permet un dépôt à sec de protéines. Lorsqu'une solution est incubée sur une couche de PEO comportant des agrégats de protéines déjà fixées, il faut une énergie trop importante aux molécules d'eau pour défaire les liaisons des agrégats de protéines avec la surface. Les protéines immobilisées sur la surface à sec restent donc fixées malgré les lavages. En milieu liquide, la couche de PEO reprend ses propriétés car il n'y a pas d'énergie de liaison en jeu. Nous souhaitons donc exploiter ce phénomène inattendu.

b. Impression de molécules sondes sur des couches passivantes de PLL-g-dextran

Nous souhaitons exploiter le phénomène observé en utilisant les couches de polymères sur lesquelles nous travaillons. Nous voulons réaliser une couche homogène de PLL-g-dextran sur une lame de verre et imprimer des motifs de protéines par-dessus. Il s'agit alors d'observer dans un premier temps si les motifs de protéines se maintiennent sur la couche de PLL-g-dextran. Dans un second temps, nous analyserons le comportement de la couche de PLL-g-dextran en termes de

limitation d'interactions non-spécifiques lors d'un protocole de biodétection complet. Afin d'analyser rapidement une grande quantité de motifs, les observations se feront par fluorescence. Le comportement de la couche de PLL-g-dextran est étudié face à des molécules de streptavidine marquées par de l'Alexa 555.

i. Fabrication d'une surface bi-fonctionnelle basée sur une couche de PLL-g-dextran

Dans un premier temps, il s'agit ici d'étudier le comportement de la couche de PLL-g-dextran face au dépôt de streptavidine marquée par μ CP. Nous observerons si les sondes déposées par μ CP sur le passivant, se maintiennent à la surface, malgré plusieurs rinçages. La première étape de ce protocole consiste à réaliser une couche homogène de passivant basée sur des molécules de PLL-g-dextran. La fabrication de cette couche peut être réalisée par μ CP avec un timbre plat sans motifs et oxydé. Cependant, à la vue du comportement conflictuel du PLL-g-dextran envers le PDMS, nous avons préféré générer la couche de PLL-g-dextran par incubation de la solution sur une lame de verre. Les liaisons entre les molécules de PLL-g-dextran et la lame de verre sont assurées électrostatiquement. Les lavages finaux nous assurent d'éliminer le surplus de molécules n'étant pas fortement liées avec la surface pour obtenir une couche aussi homogène que possible.

La *Figure 19* décrit le protocole expérimental.

Le protocole de fabrication est le suivant :

- Nettoyage de la lame de verre dans un bain d'isopropanol sous ultrasons (35 kHz, 5 min) puis dans un bain d'eau DI (35 kHz, 5 min). Oxydation au plasma O_2 (300W, 5 min, 1.5 mBar)
- Incubation en milieu liquide de la solution de PLL-g-dextran (100 μ g/mL, 4min) sur la lame de verre (*Figure 19A*)
- Lavage (PBS 1x, 2x3min, agitation 100rt/min)

Ensuite, des motifs de molécules de streptavidine marquées avec le fluorophore AlexaFluor555 sont déposés sur la couche de PLL-g-dextran par μ CP (*Figure 19C*). Les motifs du timbre en PDMS sont des plots de 160 μ m de diamètre à une période de 320 μ m afin d'obtenir de larges zones d'analyse.

Le protocole de dépôt est le suivant :

- Encrage du timbre de PDMS avec motifs avec la solution de streptavidine marquée AF555 (25 μ g/mL, 2min30)
- Impression moléculaire par μ CP semi-automatisé Gesim (2min)
- Lavage (PBS 1x, 5min, sous agitation contrôlée à 100 rt/min)
- Lecture en fluorescence (scanner IS900 Innopsys, λ_{exc} = 532 nm, Puissance laser = 4mW, Gain = 2%)

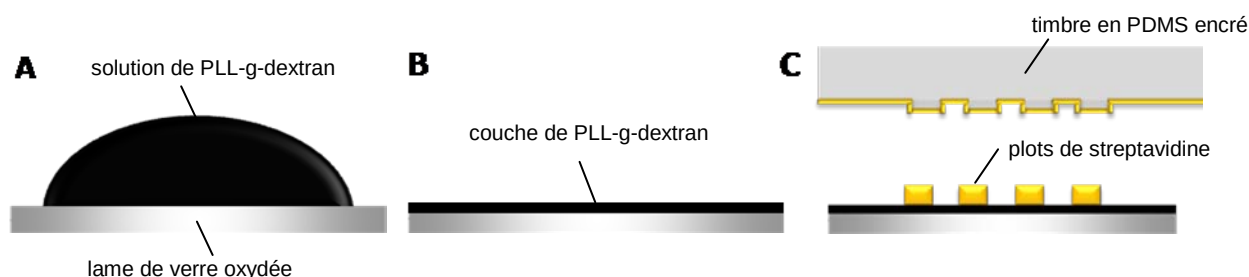


Figure 19 : (A) Incubation d'une solution de PLL-g-dextran sur une lame de verre oxydée par traitement plasma. (B) Obtention d'une couche de PLL-g-dextran de quelques nanomètres d'épaisseur (C) Impression par μ CP de plots de streptavidine marquée en fluorescence sur la couche de PLL-g-dextran.

La *Figure 20* présente l'observation en fluorescence des motifs de streptavidine marquée déposés sur la couche homogène de PLL-g-dextran. Les plots déposés présentent une grande régularité. Ils sont bien définis spatialement et exhibent une forte intensité de fluorescence sur la surface. Les motifs correspondent à ceux présents sur le timbre utilisé pour l'impression moléculaire de la streptavidine. Les molécules de streptavidine ont bien été transférées du timbre sur la couche de PLL-g-dextran selon les plots de 160 μm de diamètre à une période de 320 μm . Cette image, obtenue après lavage de l'échantillon, démontre le bon maintien des molécules de streptavidine sur la couche de passivant. Des liaisons de type non-covalent ont été réalisées entre streptavidine et PLL-g-dextran. Quelques plots sont mal définis mais plus de 96% des spots ont un rapport signal sur bruit supérieur à 10. Ce paramètre démontre le fort contraste de fluorescence entre les zones d'intérêt définies par les plots de streptavidine et le fond continu environnant les plots. Plus ce rapport est élevé, plus les motifs fluorescents sont discernables face au fond continu. Dans le cas présent, aucune molécule complémentaire n'a été incubée donc il n'y a pas d'interactions non-spécifiques entre les plots mais ce rapport nous permet de vérifier la bonne délimitation des motifs réalisés par μCP par rapport à la couche de PLL-g-dextran qui constitue le fond de l'image.

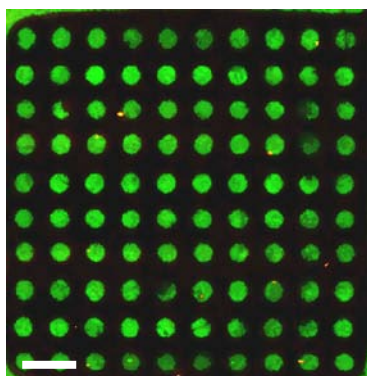


Figure 20 : Observation en fluorescence d'une matrice de plots de streptavidine marquée AF555 déposée par μCP sur une couche de PLL-g-dextran obtenue par incubation

- ❖ **L'impression de molécules de streptavidine sur une couche homogène de PLL-g-dextran est donc réalisable avec une bonne définition et un excellent maintien de motifs. Nous obtenons une surface bi-fonctionnelle, composée de plots de molécules sondes sur une couche de passivant PLL-g-dextran.**

ii. Etude du comportement de la surface bi-fonctionnelle dans le cas d'une interaction non-spécifique

Nous avons vérifié le bon maintien des sondes imprimées mais il reste à analyser le pouvoir passivant de la couche de PLL-g-dextran de la surface bi-fonctionnelle. Pour ce faire, nous allons incubé une solution de GST marquée en fluorescence sur le substrat. La GST n'étant pas supposée interagir avec la streptavidine, nous avons utilisé cette expérience pour étudier le pouvoir passivant des régions situées entre les motifs de streptavidine. La *Figure 21* décrit le protocole expérimental.

Le protocole d'interaction est le suivant :

- Incubation d'une solution de GST marquée AlexaFluor647 (5 $\mu\text{g/mL}$, 35min)
- Lavage (PBS 1x avec tween20 à 0.1%, 3x5min, sous agitation contrôlée à 250 rt/min)

- Lecture en fluorescence (scanner IS900 Innopsys, $\lambda_{\text{excit}} = 532 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{excit}} = 635 \text{ nm}$, Puissance laser = 4mW, Gain = 2%)

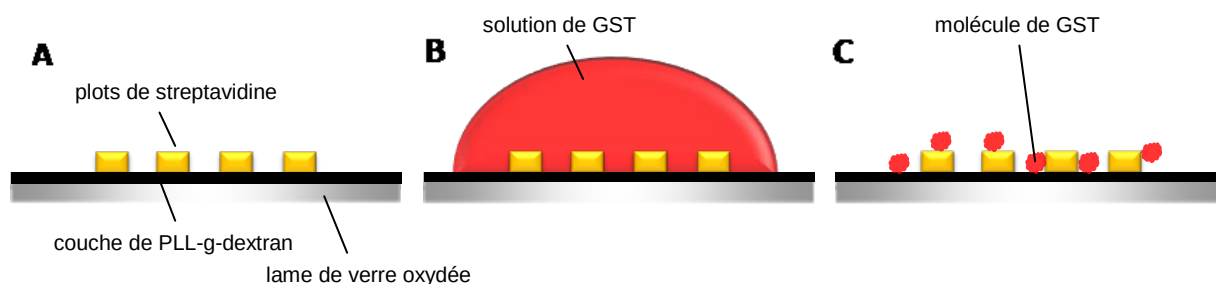


Figure 21 : (A) Surface bi-fonctionnelle étudiée : plots de streptavidine marquée en fluorescence (AF555) déposés par μCP sur une couche de PLL-g-dextran (B) Incubation d'une solution de GST marquée en fluorescence (AF647) sur la surface bi-fonctionnelle (C) Etude en fluorescence de l'adsorption des molécules de GST sur la surface bi-fonctionnelle.

La Figure 22 présente l'incubation d'une solution de GST sur le substrat précédent et observé en fluorescence selon deux longueurs d'onde d'excitation ($\lambda_{\text{excit}} = 532 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{excit}} = 635 \text{ nm}$). Les molécules de streptavidine sont observées en vert sur l'image et celles de GST en rouge. Si un pixel émet une intensité de fluorescence provenant d'une excitation des deux longueurs d'onde, le pixel est observé en jaune sur l'image.

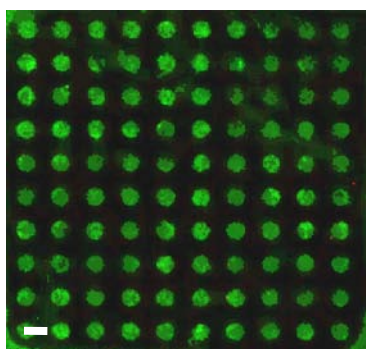


Figure 22 : Solution de GST marquée AF647 (émettant dans le rouge) incubée sur le substrat bi-fonctionnel composé de plots de streptavidine marqués AF555 (observés en vert sur l'image) sur une couche de PLL-g-dextran. Les molécules de GST ne se sont pas adsorbées sur la surface. Barre d'échelle : $150 \mu\text{m}$.

Sur l'image précédente, nous ne détectons aucune trace de fluorescence de type $\lambda = 635 \text{ nm}$, donc aucune trace de GST qui se serait adsorbée sur la surface (intensité de fluorescence de $1/65535 \text{ ua}$). Il n'y a pas d'intensité de fluorescence provenant des molécules de GST, ni sur les plots de streptavidine, ni entre les plots sur le fond. Les plots de streptavidine, répondant à l'excitation du laser de $\lambda = 532 \text{ nm}$ sont toujours présents sur la couche de PLL-g-dextran mais produisent une intensité de fluorescence légèrement moindre.

- ❖ **La couche de PLL-g-dextran de la surface bi-fonctionnelle accomplit bien son rôle de passivant puisque l'adsorption de molécules de GST, incubées sur la surface est largement réduite.**

iii. Etude du comportement de la surface bi-fonctionnelle dans le cas d'une interaction spécifique

Nous souhaitons analyser le comportement de la surface bi-fonctionnelle réalisée dans le cas d'une interaction spécifique. Il n'a pas été possible d'obtenir commercialement une molécule cible marquée par une terminaison biotine (pour interagir les plots de streptavidine sondes) et par un fluorophore (pour la lecture en fluorescence de l'interaction). Ainsi dans ce cas, nous avons utilisé un anticorps biotinylé, non marqué en fluorescence. Afin de pouvoir analyser les interactions en fluorescence, nous avons utilisé ces anticorps biotinylés comme molécules sondes et la streptavidine marquée en fluorescence comme molécules cibles, cette modification du protocole précédent est décrite sur la *Figure 23*.

Selon les mêmes conditions expérimentales, une couche homogène de PLL-g-dextran est obtenue par incubation sur une lame de verre nettoyée et oxydée. Une impression moléculaire d'anticorps marqués avec une terminaison biotine est effectuée sur la couche de PLL-g-dextran (*Figure 23A*). Les motifs du timbre en PDMS sont des plots de 160 μm de diamètre à une période de 320 μm afin d'obtenir de larges zones d'analyse.

Le protocole de fabrication est le suivant :

- Encreage du timbre de PDMS avec motifs avec la solution d'anticorps biotinylés (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1min30)
- Impression moléculaire par μCP semi-automatisé Gesim (1min)
- Lavage (PBS 1x, 5min sous agitation contrôlée 100rt/min)

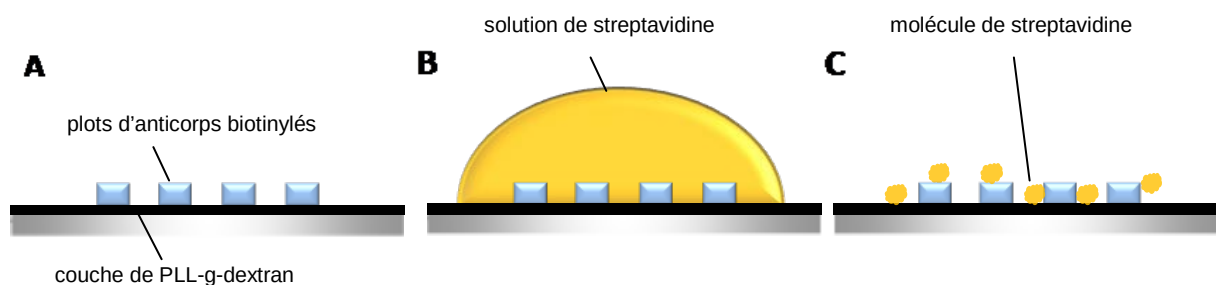


Figure 23 : (A) Surface bi-fonctionnelle étudiée : plots d'anticorps biotinylés déposés par μCP sur une couche de PLL-g-dextran (B) Incubation d'une solution de streptavidine marquée en fluorescence (AF555) sur la surface bi-fonctionnelle (C) Etude en fluorescence de l'adsorption des molécules de streptavidine sur la surface bi-fonctionnelle.

Une solution de streptavidine marquée en fluorescence est alors incubée sur la surface bi-fonctionnelle (*Figure 23B*).

Le protocole d'interaction est le suivant :

- Incubation d'une solution de streptavidine marquée AlexaFluor555 (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 35min)
- Lavage (PBS 1x avec tween20 à 0.1%, 3x5min, sous agitation contrôlée à 250rt/min)
- Lecture en fluorescence (scanner IS900 Innopsys, λ_{exc} = 532 nm, Puissance laser = 4mW, Gain = 2%)

Nous pouvons alors étudier l'adsorption des molécules de streptavidine sur la surface bi-fonctionnelle par fluorescence (*Figure 23C*). La *Figure 24* présente ces résultats. Des motifs bien délimités émettent une intensité de fluorescence sur la surface. Les motifs fluorescents correspondent à la géométrie des motifs d'anticorps biotinylés déposés par μCP . Les molécules de

streptavidine incubées ont interagi de façon spécifique avec les plots d'anticorps par des liaisons biotine/streptavidine.

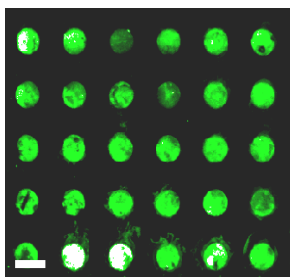


Figure 24 : Solution de streptavidine marquée AF555 (observée en vert sur l'image) incubée sur le substrat bi-fonctionnel composé de plots d'anticorps biotinylés déposés par μ CP sur une couche de PLL-g-dextran. Barre d'échelle : 150 μ m.

Entre les motifs, le fond apparaît comme sombre malgré quelques traînées fluorescentes discernables. Des interactions non-spécifiques ont ponctuellement eu lieu entre la couche de PLL-g-dextran et les cibles incubées. Il s'agit de quantifier l'intensité de fluorescence du fond pour évaluer le pouvoir passivant du PLL-g-dextran. Le rapport signal sur bruit nous permet de quantifier l'intensité de fluorescence provenant des plots par rapport à celle du fond. Nous obtenons donc une comparaison du taux d'interactions spécifiques par rapport aux interactions non-spécifiques qui se sont produites sur le substrat bi-fonctionnalisé. 89 % des plots ont un rapport signal sur bruit supérieur à 10. Cette valeur démontre qu'une grande majorité de l'intensité de fluorescence de l'échantillon provient des zones d'intérêt. L'intensité de fluorescence de la surface est très faible par rapport à celle des plots. La faible fluorescence de la surface démontre que la couche de PLL-g-dextran a joué son rôle de passivant en limitant les interactions non-spécifiques.

- ❖ **Il est possible d'immobiliser par μ CP différents types de protéines sur les couches de polymère passivantes (streptavidine, anticorps ...).**
- ❖ **Nous avons vérifié l'hypothèse selon laquelle le comportement d'une couche de PLL-g-dextran varie en fonction du milieu environnant. En milieu liquide, c'est-à-dire lorsqu'une solution de protéines est incubée sur la couche de polymère, elle exhibe de fortes propriétés de limitation d'adsorption non-spécifique en raison de la forte hydratation de la couche. Lorsque la couche de polymère est à sec, cette hydratation est absente et la configuration de la couche permet la fixation de protéines par μ CP.**
- ❖ **La chimie bi-fonctionnelle développée permet de générer des surfaces possédant des motifs de molécules sondes immobilisées à la surface d'une couche de polymères (PEO ou PLL-g-dextran) limitant les interactions non-spécifiques. Ces surfaces bi-fonctionnelles sont donc adéquates pour réaliser des tests de biodétection complets.**

4. Comparaison des techniques mises en place lors d'un protocole complet de biodétection

Nous avons développé de nombreuses chimies de surface dans l'optique de réaliser des substrats fonctionnalisés avec des molécules sondes et limitant les interactions non-spécifiques. Nous souhaitons maintenant comparer ces chimies de surface afin d'analyser quantitativement leur comportement face à l'adsorption de protéines. Comment ces différentes surfaces bi-fonctionnelles vont-elles se comporter face à un protocole complet de biodétection ?

Nous allons nous concentrer sur une expérience modèle simple qui utilise le couple anticorps anti-GST et GST. Les molécules cibles, définies par la GST seront marquées en fluorescence (AlexaFluor555). La lecture en fluorescence des échantillons après interaction nous permettra d'analyser quantitativement l'intensité de fluorescence des zones d'intérêt et de la surface. Nous pourrons alors définir quelle chimie de surface joue le mieux le rôle de passivant vis-à-vis de l'adsorption non-spécifique de protéines.

Les différents substrats sont réalisés selon les protocoles expérimentaux décrits précédemment. Les substrats étudiés sont les suivants :

- lame 1 : Impression d'anticorps anti-GST sur une lame de verre oxydée
- lame 2 : Impression d'anticorps anti-GST sur une lame époxyde bloquée à l'éthanolamine
- lame 3 : Impression d'anticorps anti-GST sur une couche homogène de PLL-g-PEG
- lame 4 : Impression d'anticorps anti-GST sur une couche homogène de PLL-g-dextran
- lame 5 : Impression d'anticorps anti-GST sur une couche de PEO
- lame 6 : Impression d'anticorps anti-GST sur lame de verre oxydée puis passivation de surface avec incubation de PLL-g-dex

Pour fixer les anticorps anti-GST à la surface des échantillons, une impression moléculaire est effectuée selon le protocole de dépôt suivant :

- Encrage du timbre de PDMS avec motifs avec la solution d'anticorps biotinylés (25 µg/mL, 1min30)
- Impression moléculaire par µCP semi-automatisé Gesim (1min)
- Lavage (PBS 1x, 2min sous agitation contrôlée 100rt/min)

Lorsque les différents substrats sont réalisés, la solution de cible est incubée à la surface de chaque échantillon selon les conditions expérimentales suivantes :

- Incubation d'une solution de GST marquée AlexaFluor555 (10 µg/mL, 20min)
- Lavage (PBS 1x avec tween20 à 0.1%, 3x5min, sous agitation contrôlée à 250rt/min)
- Lecture en fluorescence (scanner IS900 Innopsys, λ_{exc} = 532 nm, Puissance laser = 4mW, Gain = 2%)

Pour chaque échantillon, l'intensité de fluorescence de la surface est analysée pour quantifier l'adsorption des cibles en dehors des zones d'intérêt. Il s'agit de quantifier les événements moléculaires non-spécifiques par fluorescence. Pour cela, nous comparons les intensités de fluorescence du fond continu de l'échantillon, c'est-à-dire des zones entre les plots (*Figure 25*). Nous ne comparons pas le rapport signal sur bruit car cette valeur dépend de l'accroche des sondes sur les différentes chimies de surface des substrats. Le type de liaisons entre molécules sondes et surface entrent alors en jeu. Nous ne souhaitons pas que ce paramètre influe sur nos analyses puisque les observations doivent porter uniquement sur le pouvoir passivant des surfaces réalisées donc sur l'intensité de fluorescence du fond.



Figure 25 : Le calcul du rapport signal/bruit se fait en considérant l'intensité des plots et celle du fond continu de l'échantillon. Le calcul effectué pour cette expérience ne tient compte que de l'intensité du fond continu (zone hachurée) et pas de l'intensité des plots.

La Figure 26 présente les valeurs de l'intensité de fluorescence collectée autour des motifs de molécules sondes. Ces valeurs sont mesurées en unité arbitraire mais sont comparables car les échantillons ont été analysés par scanner de fluorescence avec les mêmes paramètres de lecture (gain et puissance laser). L'intensité de fluorescence de la lame de verre sert de référence. Aucun blocage ou passivation de surface n'a été mis en place pour limiter les adsorptions non-spécifiques sur cette dernière. L'intensité de fluorescence de la surface de la lame de verre est relativement élevée (1670 ua). Elle témoigne de l'adsorption des cibles de GST sur la lame, si cette dernière n'est pas préalablement traitée pour contrer cet effet. Pour la passivation de surface assurée par une couche de PLL-g-PEG, l'intensité de fluorescence est encore aussi élevée (980 ua.) mais reste inférieure à celle observée pour une lame de verre oxydée. Ensuite, les intensités de fluorescence des chimies de surface basées sur l'incubation de PLL-g-dextran et le blocage de surface à l'éthanolamine se situent entre 300 et 800 ua (respectivement 360 et 740 ua). L'adsorption de molécules de GST sur ces échantillons a lieu en faible quantité. Enfin, l'intensité de fluorescence de la surface basée sur des couches de PEO et de PLL-g-dextran est très faible, respectivement 150 et 116 ua. Cette information démontre que ces couches réduisent fortement l'adsorption non-spécifique de protéines.

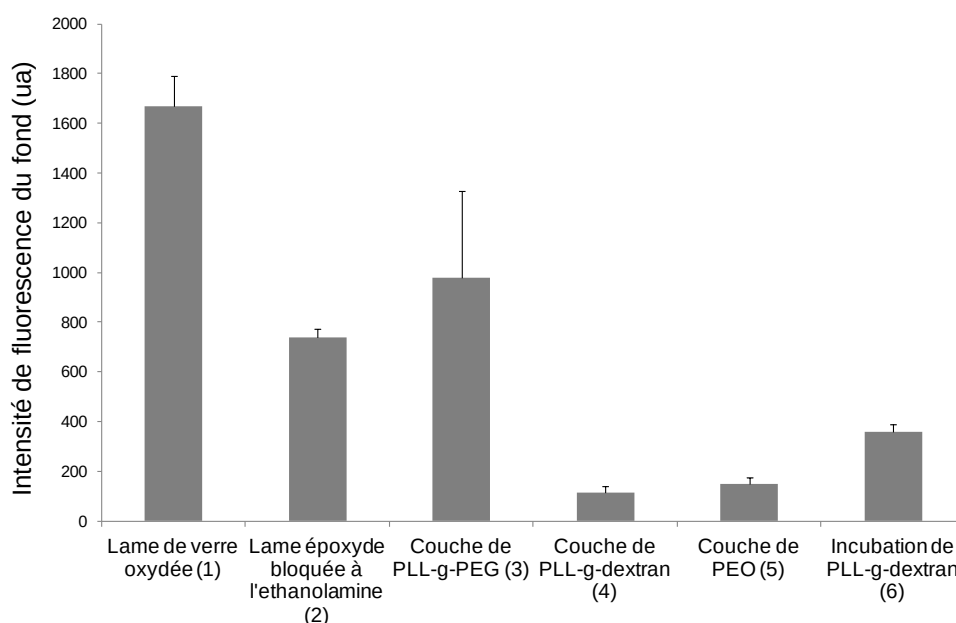


Figure 26 : Intensités de fluorescence de la surface des échantillons (zones entre les motifs) nous permettant de caractériser l'adsorption non-spécifique des différentes chimies de surface

Le coefficient de variation (CV) est défini par le rapport entre l'écart type sur la médiane en %. Le CV provenant d'une chimie de surface basée sur des molécules de PLL-g-PEG est grand (70%). Ces

surfaces présentent donc une importante irrégularité en termes de fluorescence. Ces valeurs témoignent d'une certaine instabilité des molécules PLL-g-PEG à assurer une résistance à l'adsorption de protéines de façon homogène sur tout l'échantillon. Au contraire, les chimies de surface basées sur les molécules de PLL-g-dextran (incubation ou dépôt sur couche homogène), les couches de PEO ou le blocage de surface à l'éthanolamine présentent une stabilité en termes de limitation d'adsorption non-spécifique puisque les CV enregistrés sont faibles (entre 10 et 40 %).

Cette étude comparative menée par fluorescence nous permet de conclure sur l'efficacité des surfaces développées en termes de limitation de l'adsorption non-spécifique sur un échantillon. Les chimies de surface basées sur des couches de faible épaisseur amènent une passivation de surface stable et performante (diminution de l'adsorption de près de 90 % par rapport à une lame de verre oxydée non traitée). Les échantillons basés sur des molécules de PLL-g-PEG apparaissent comme inhomogènes sur la totalité de la surface. Nous pouvons relier cette information aux propriétés des chaînes de PEG, décrites dans la littérature comme désordonnées et nécessitant une forte hydratation pour assurer leur rôle de répulsion de protéines. Le blocage de surface à l'éthanolamine minimise l'adsorption de protéines de près de 55 % par rapport à une lame de verre non protégée.

- ❖ Les expériences réalisées permettent également de montrer qu'il est préférable d'imprimer les sondes sur la couche de passivant plutôt que d'incuber le passivant après l'impression des sondes (comparaison lame 4 et 6).
- ❖ Les chimies de surface bi-fonctionnelles développées, composées de motifs molécules sondes déposés par μ CP sur une couche de polymères (PEO ou PLL-g-dextran) présentent d'excellentes propriétés de limitation de l'adsorption non-spécifique de protéines. 90 % de l'adsorption non-spécifique est réduite sur ces couches par rapport à une lame de verre oxydée non saturée. En comparaison, un blocage de surface à l'éthanolamine ne les réduit que de 55 %. Ces surfaces bi-fonctionnelles sont donc adéquates pour réaliser des tests de biodétection complets.

III/ Bi-fonctionnalisation de substrats tridimensionnels

Dans notre démarche d'étude de passivant, nous nous sommes également intéressés aux substrats non plans comportant déjà des motifs topographiques. En effet, jusqu'à présent les substrats utilisés étaient des lames de verre planes de rugosité inférieure à 0.5 nm. Pour certaines applications, il est nécessaire d'immobiliser des molécules en surface d'un substrat selon une topographie en relief. On peut facilement imaginer l'intérêt de telles surfaces pour des applications de piégeage de cellules ou de microorganismes par exemple, où le relief de l'échantillon servirait de piégeage physique et serait renforcé par une fonctionnalisation chimique des zones créées. Dans cette optique, nous souhaitons donc bi-fonctionnaliser des surfaces ayant une topographie en relief, plus complexe qu'une lame de verre plane.

1. Objectif

Notre objet d'étude est un réseau de lignes nanométriques (500 nm au pas de 1 μ m) réalisé en SU-8 par thermal soft UV NIL (*Figure 27A*). Nous souhaitons fonctionnaliser sélectivement ce substrat avec des molécules sondes tout en limitant les interactions non-spécifiques sur le reste de la surface. Pour cela, nous avons donc développé une technique de bi-fonctionnalisation de ces réseaux. Elle consiste à déposer par μ CP une molécule d'intérêt, qui dans notre cas sera la streptavidine, sur le haut des lignes grâce à l'utilisation d'un timbre en PDMS plat (*Figure 27B*). Les molécules sont transférées du timbre sur la partie supérieure des lignes, en contact avec le timbre. Ensuite, un passivant est incubé sur le reste du substrat pour condamner les zones de SU8 encore disponibles et ainsi réduire les interactions non-spécifiques (*Figure 27C*). Le substrat final comporte donc une surface en relief bi-fonctionnelle.

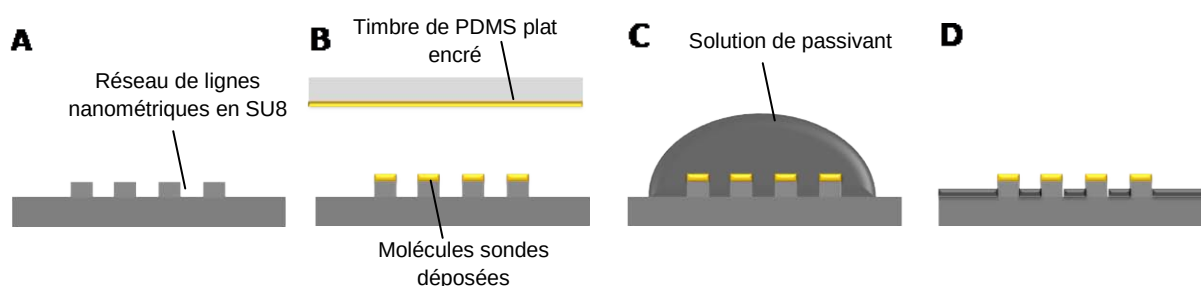


Figure 27 : (A) Substrat non plan comportant des motifs topographiques en SU8 (B) Dépôt sélectif de molécules sondes sur le haut des motifs à l'aide d'un timbre plat de PDMS (C) Incubation d'une solution de passivant sur cette surface et adsorption des molécules sur les zones de SU8 vierges (D) Surface bi-fonctionnalisée

La streptavidine peut se lier de manière forte par des liaisons covalentes avec la surface du réseau en SU-8, qui est composée d'une chimie de type époxyde. Cette forte interaction entre ces deux entités a été vérifiée par une étude rapide en fluorescence (Annexe 3).

2. Objet d'étude : un réseau périodique de lignes nanométriques

La *Figure 28* présente une image AFM du réseau de lignes nanométriques en SU8 étudié (signal de hauteur, déflexion verticale et profil transversal). Bien que la convolution de la pointe empêche de distinguer clairement le creux des lignes, on constate que la profondeur de ces réseaux est supérieure à 250 nm (*Figure 28A et C*). La partie supérieure des lignes a une rugosité faible, entre 1.5 et 2.5 nm (*Figure 28B*). La structure de ces réseaux est complexe car elle couple une profondeur de

lignes importante à une échelle submicrométrique. Il est donc difficile de fonctionnaliser sélectivement certaines zones, comme par exemple le creux défini entre deux lignes, par des techniques classiques (aiguilles, ...).

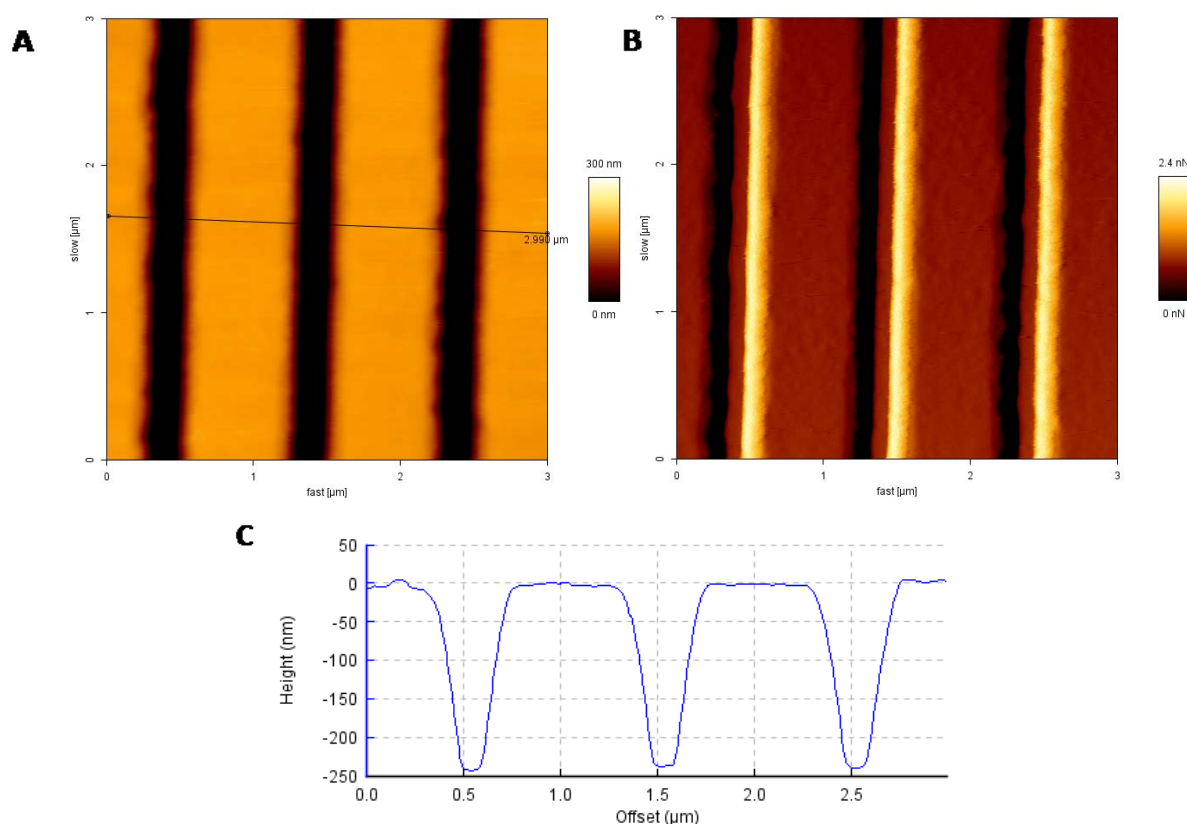


Figure 28 : Réseau de lignes submicrométriques (500 nm au pas de 1 μm) réalisé en SU-8 par thermal soft UV NIL et observé par AFM en mode contact à l'air (A) Signal de hauteur (B) Signal de déflexion vertical (C) Profil de hauteur sur une coupe de 3 μm

3. Etude AFM

a. Fonctionnalisation du réseau avec les molécules sondes

Pour immobiliser les molécules de streptavidine sélectivement sur le haut des motifs, nous avons réalisé un dépôt par μ CP avec un timbre plat. Un timbre en PDMS ne possédant pas de motifs à sa surface est encré avec une solution de streptavidine (temps d'encrage : 2 min 30), séché sous flux d'azote puis mis en contact avec le réseau de lignes en SU-8. Aucune pression n'est exercée à l'arrière du timbre pour éviter que ce dernier ne s'effondre entre les lignes de 250 nm d'épaisseur. Un transfert des molécules de streptavidine de la surface du timbre sur les motifs du réseau va se produire. Cette étape d'immobilisation sélective a été contrôlée par AFM. La Figure 29 présente les images AFM du réseau de SU-8 ayant subi ce dépôt de streptavidine par un timbre plat. De petits agglomérats sont discernables sur la partie supérieure des motifs de l'image AFM du signal de hauteur (Figure 29A). Le profil topographique réalisé sur 3 μm (Figure 29C) nous confirme une rugosité différente sur le haut des lignes du réseau. Lorsqu'on compare les profils topographiques du réseau de SU-8 vierge (Figure 28C) et du réseau de SU-8 fonctionnalisé, on constate que des molécules de streptavidine se sont déposées sur le haut des lignes. L'étape de dépôt avec le timbre plat a donc permis d'immobiliser sélectivement les molécules de streptavidine sur le haut des motifs du réseau.

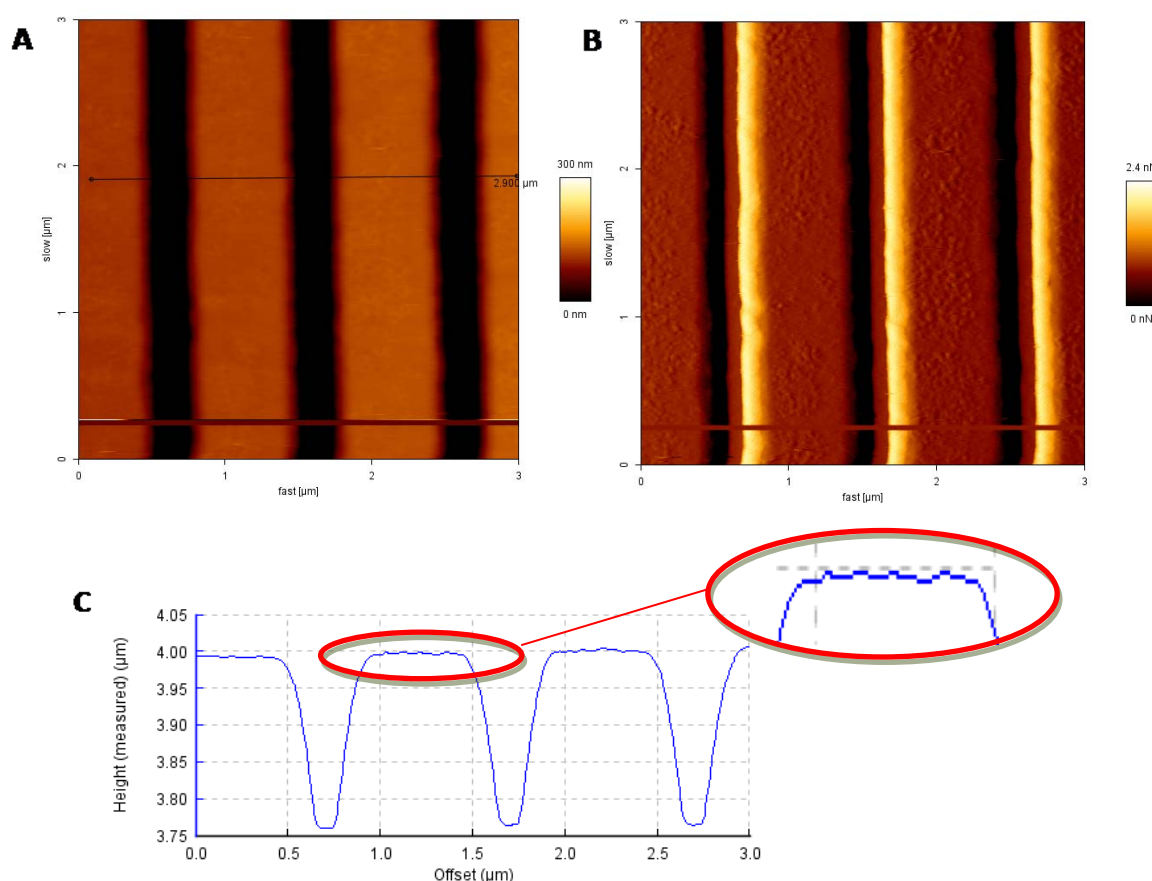


Figure 29 : Réseau de lignes submicrométriques réalisé en SU-8 par thermal soft UV NIL avec des molécules de streptavidine immobilisées sélectivement sur le haut des lignes et observé par AFM en mode contact à l'air (A) Signal de hauteur (B) Signal de déflexion verticale (C) Profil de hauteur sur une coupe de 3 μm . La cercle rouge met en avant le profil rugueux du haut des lignes suite au dépôt de streptavidine.

b. Passivation du réseau

Le haut des lignes étant fonctionnalisé, il reste maintenant à limiter l'adsorption non-spécifique pouvant se produire sur le reste du substrat, et en particulier dans les creux des lignes et les flancs. Pour cela, une incubation de PLL-g-dextran en solution, est effectuée sur l'ensemble du substrat. Plusieurs lavages au PBS 1x sont réalisés pour éliminer le surplus de molécules de PLL-g-dextran. La surface de l'échantillon est observée par AFM. La Figure 30 montre les signaux de hauteur et de déflexion verticale enregistrés ainsi qu'une coupe topographique de la surface. La partie supérieure des lignes présente toujours un aspect rugueux. Les molécules de streptavidine sont donc encore immobilisées sur le haut des lignes. Des agrégats de matière sont visibles entre les lignes. Nous nous attendions à ce qu'une majeure partie des molécules de PLL-g-dextran s'adsorbent entre les lignes de SU-8 et interagissent avec ces zones époxyde encore vierges. Cependant, le profil de hauteur (Figure 30C) ne peut nous confirmer cette hypothèse de par la convolution de la pointe qui limite les observations. Pour caractériser cette étape, nous devons faire appel à un autre type d'observation que celui proposé par l'AFM. La convolution de la pointe ne permet pas de voir non plus si les flancs des lignes sont passivés.

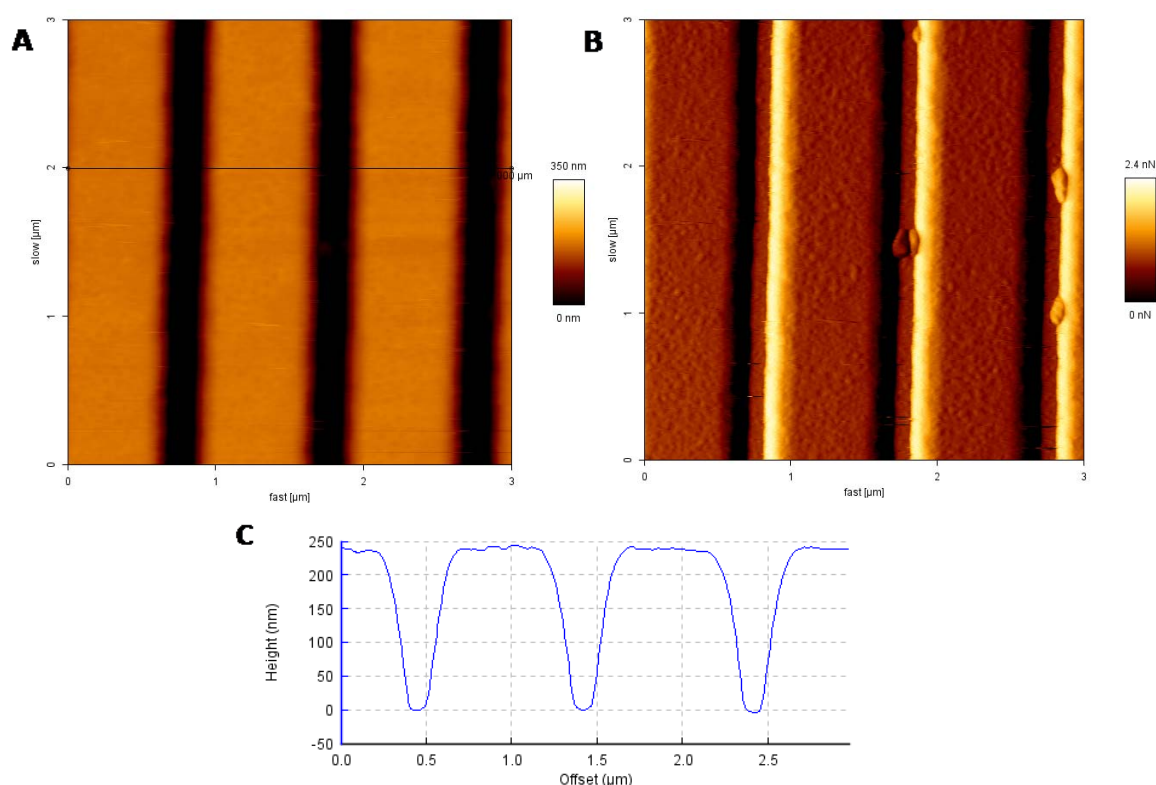


Figure 30 : Réseaux de lignes submicrométriques réalisés en SU-8 par thermal soft UV NIL avec des molécules de streptavidine immobilisées sélectivement sur le haut des lignes et des molécules de PLL-g-dextran incubées (A) Signal de hauteur (B) Signal de déflexion verticale (C) Profil de hauteur sur une coupe de 3 μm

Deux études complémentaires ont donc été menées. La première pour caractériser l'immobilisation des molécules de streptavidine sur le haut des motifs. Cette étape modifie la rugosité du haut des lignes. Par conséquent, une étude détaillée de la rugosité du haut des lignes du réseau sera effectuée par AFM. Dans un second temps, nous utiliserons une technique de caractérisation basée sur la diffraction pour suivre la dernière étape de fonctionnalisation du protocole portant sur l'incubation de PLL-g-dextran sur la surface.

4. Caractérisation des réseaux périodiques

a. Etude de rugosité de surface

Comme l'étape d'immobilisation de la streptavidine modifie le haut des lignes, nous avons effectué une étude de rugosité de cette partie des réseaux. Plusieurs fenêtres d'analyse sont tracées sur le haut des lignes des réseaux. La vérification de la linéarité de la rugosité en fonction de la résolution des zones tracées n'est pas présentée. Les mesures de rugosité présentées sont celles obtenues pour les zones de $3\mu\text{m} \times 3\mu\text{m}$. Nous obtenons une analyse statistique de la rugosité du haut des lignes à chaque étape du protocole : le réseau de SU-8 vierge, le réseau de SU-8 dont le haut des lignes est fonctionnalisé avec des molécules de streptavidine et le réseau de SU-8 fonctionnalisé par la streptavidine et passivé.

La Figure 31 présente les valeurs de rugosité mesurée par AFM sur le haut des motifs. Le réseau de SU-8 vierge, c'est-à-dire analysé directement après fabrication par thermal soft UV NIL possède une rugosité de l'ordre de 1.9 nm. Cette valeur, relativement faible, corrobore les observations AFM

précédentes où le haut des lignes présentait une surface très lisse. Lorsqu'on immobilise des molécules de streptavidine sur ces motifs par μ CP avec un timbre plat, la rugosité mesurée augmente. Elle passe de 1.9 nm à un peu plus de 3.1 nm amenant une augmentation de plus de 60 %.

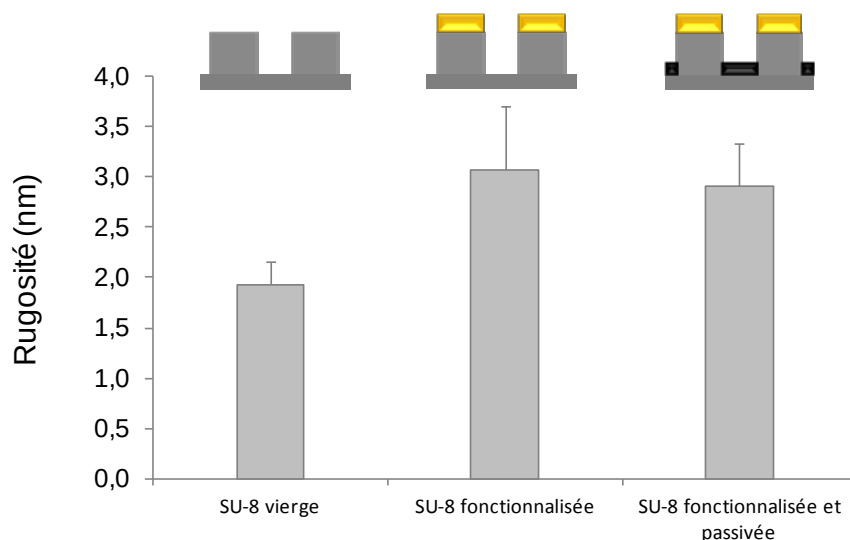


Figure 31 : Etude de rugosité sur le haut des lignes d'un réseau de SU-8 vierge, fonctionnalisé avec la streptavidine puis fonctionnalisé et passivé

Enfin, l'incubation du passivant sur l'ensemble du substrat a très légèrement diminué la rugosité des lignes (de 3.1 nm à 2.9 nm). Les molécules de streptavidine ne sont donc pas désorbées après l'incubation du passivant et les multiples rinçages. Nous avons donc la confirmation que le dépôt de streptavidine sur le haut des motifs des réseaux de SU-8 et que ces molécules ont interagi de façon covalente avec la résine SU-8 du réseau.

b. Etude de l'intensité de diffraction

Comme les observations AFM de l'étape de passivation ne peuvent nous renseigner précisément sur l'adsorption du PLL-g-dextran sur le substrat, nous avons caractérisé les réseaux de SU-8 par une technique basée sur la diffraction. Cette technique permet de caractériser une structure présentant un arrangement périodique. Le système expérimental conçu et mis au point pour ces caractérisations optiques sera détaillé dans un chapitre dédié à la fin du manuscrit. Il s'agit simplement ici de retenir que lorsqu'un faisceau incident est orienté sur une structure présentant un arrangement périodique, on observe un phénomène de diffraction décrit par le principe de Huygens-Fresnel. Pour un réseau périodique, la figure de diffraction obtenue est composée de différents ordres. L'ordre 0 correspond au faisceau réfléchi et les autres ordres sont ceux diffractés. La Figure 32A décrit schématiquement le phénomène de diffraction observé pour un réseau périodique de lignes tel que celui formé par les structures en SU8 que nous étudions. La Figure 32B est un exemple de figure de diffraction obtenue pour un réseau de lignes micrométriques unidirectionnelles.

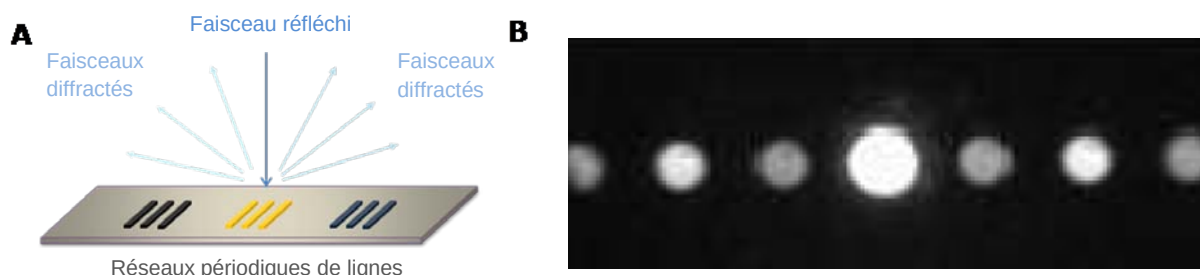


Figure 32 : (A) Schéma du phénomène de diffraction obtenu en réflexion sur un réseau périodique composé de lignes. (B) Exemple de figure de diffraction obtenue pour un réseau périodique composé de lignes micrométriques unidirectionnelles.

La figure de diffraction collectée dépend précisément des caractéristiques du réseau périodique rencontré par le faisceau incident. L'amplitude des ordres de diffraction dépend de la période du réseau, de la largeur et de l'épaisseur des lignes et de l'indice de réfraction de la structure. Différents types d'arrangements périodiques peuvent être répertoriés, variant de part leur composition ou leur dimension mais dans le cas présent, nous travaillons sur des réseaux en résine SU-8 composés de lignes de taille submicronique (500nm de large au pas de 1 μm). Nous souhaitons donc mettre à profit le système de caractérisation basé sur la diffraction pour caractériser les 3 réseaux de SU-8 précédents : le réseau de SU-8 vierge, le réseau de SU-8 dont le haut des lignes est fonctionnalisé avec des molécules de streptavidine et le réseau de SU-8 fonctionnalisé par la streptavidine et passivé. Comme l'intensité de diffraction collectée dépend des caractéristiques du réseau et notamment l'épaisseur des lignes, nous pensons ainsi pouvoir détecter des événements d'adsorption moléculaire à la surface du réseau.

Pour cette étude, nous nous sommes concentrés sur l'ordre 1 de diffraction. La Figure 33 présente les intensités de diffraction obtenues pour les 3 types de réseaux. Le réseau de SU-8 vierge, obtenu après thermal soft UV NIL exhibe une intensité de diffraction de l'ordre de 290 ua. Lorsqu'on dépose les molécules de streptavidine à l'aide du timbre plat sur le réseau SU-8, l'intensité de diffraction émise par le réseau augmente fortement. Elle atteint 520 ua, soit une augmentation de près de 80 %. Enfin, lorsque la solution de PLL-g-dextran est incubée sur l'ensemble du substrat, le réseau génère une intensité de diffraction de l'ordre de 180 ua. On observe alors une diminution très nette de près de 35 % par rapport au réseau de SU-8 vierge et de 65 % par rapport au réseau de SU-8 fonctionnalisé par les molécules de streptavidine. Nous avons vu que l'intensité de diffraction mesurée dépend des paramètres du réseau. La période du réseau reste constante au cours de cette expérience, tout comme la largeur des lignes, contrôlée par AFM. Les variations d'intensité de diffraction enregistrées proviennent donc d'un changement d'indice optique ou d'un changement d'épaisseur de lignes. L'indice de réfraction de la SU-8 est de 1.5992^{84 85}. Celui de la streptavidine est de 1.41.⁸⁶ Cette variation d'indice de réfraction, relativement faible influe très légèrement sur l'intensité de diffraction collectée. L'augmentation de l'intensité de diffraction provient majoritairement d'un changement d'épaisseur des lignes du réseau. Plus la profondeur d'un réseau est importante, plus l'efficacité de diffraction sera importante. Aussi, la variation de près de 80 % de l'intensité diffractée témoigne de l'augmentation de l'épaisseur des lignes du réseau, suite à l'immobilisation de molécules de streptavidine. Cette valeur corrobore les conclusions obtenues par l'étude de rugosité et les observations AFM : des molécules de streptavidine sont fixées sur le haut des lignes du réseau, entraînant une augmentation de la rugosité de surface et donc une légère augmentation de l'épaisseur des lignes. Lors de l'incubation du PLL-g-dextran, on constate une

diminution de l'intensité de diffraction du réseau fonctionnalisé et passivé de près de 35 % par rapport au réseau de SU-8 vierge. Au delà du faible changement d'indice de réfraction de la surface (1.5993 pour la SU-8 et 1.44 pour le PLL-g-dextran⁸⁷, la diminution de l'intensité diffractée provient d'une diminution de l'épaisseur des lignes du réseau. Les molécules de PLL-g-dextran se sont donc adsorbées préférentiellement entre les lignes du réseau ou sur les flancs afin d'interagir avec la surface époxyde de la SU-8, diminuant ainsi la profondeur du réseau. Cette valeur confirme le bon déroulement de l'étape de passivation du substrat pour diminuer les interactions non-spécifiques entre les lignes fonctionnalisées.

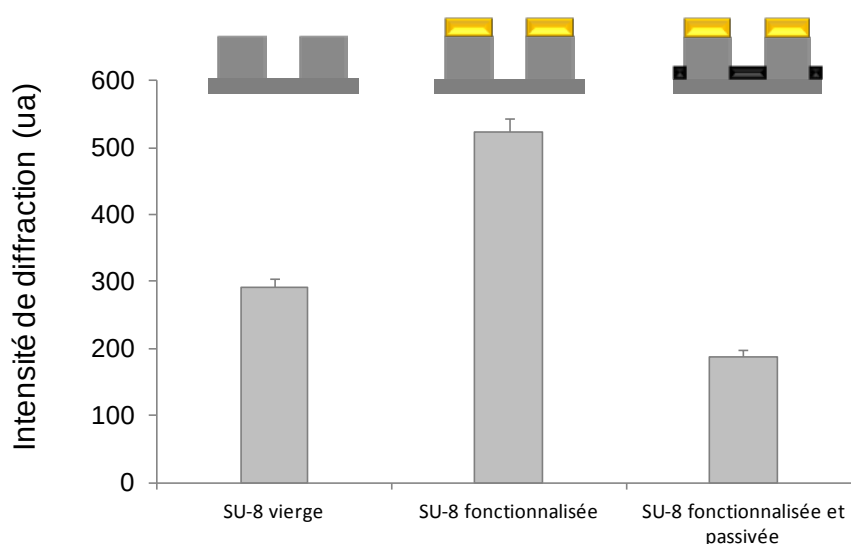


Figure 33 : Intensité de diffraction recueillie à l'ordre de 1 provenant de réseaux en SU-8 vierges, fonctionnalisés avec la streptavidine sur le haut des lignes puis fonctionnalisés et passivés.

- ❖ **Nous avons caractérisé le réseau de lignes submicrométriques en SU-8 après chaque étape de ce protocole de bi-fonctionnalisation. Les observations AFM, l'étude de rugosité et les variations de l'intensité de diffraction nous confirme l'immobilisation des sondes sur le haut des lignes du réseau et la passivation du reste du substrat à l'aide du PLL-g-dextran.**
- ❖ **Cette expérience démontre également la très bonne sensibilité de la méthode de diffraction puisque nous sommes capables de détecter des variations d'épaisseur de quelques nanomètres. A l'instar de la QCM ou du SPR, on voit que la diffraction permet de suivre l'adsorption de fines couches moléculaires sur la surface sondée. Ce principe de détection sera plus largement développé au chapitre V dans la perspective de biodétection.**

IV/ Conclusions

Importance des évènements moléculaires se produisant sur une surface

Dans un premier temps, nous avons montré que la surface d'un échantillon est un terrain propice à de nombreux évènements moléculaires. Les différentes étapes d'un protocole de biodétection (fonctionnalisation, blocage, passivation, incubation, interaction) et les multiples lavages perturbent fortement la topographie d'une surface à l'échelle moléculaire. L'interaction entre des motifs de sondes immobilisés sur une surface et une solution à analyser ne peut être vue de façon triviale comme une simple interaction entre molécules sondes et molécules cibles. De nombreuses molécules supplémentaires s'adsorbent aussi sur la surface. Parmi elles, on recense une interaction des molécules cibles avec le substrat mais aussi une interaction de toute entité présente dans les solutions (sels ...). Ces phénomènes non-spécifiques provoquent des perturbations, détectées par le signal de détection. D'une part, ils amènent une information biologique faussée, qui peut être qualifiée de bruit et diminuent de ce fait la limite de détection des capteurs. Certaines techniques de caractérisation sont plus sensibles que d'autres à ces évènements biomoléculaires. Il paraît évident que l'enjeu de la fabrication de surfaces biomoléculaires reste centré sur la minimisation de l'adsorption non-spécifique de protéines. Des substrats bi-fonctionnels, c'est-à-dire composés de molécules d'intérêt et de molécules limitant l'adsorption indésirable dans certaines zones, sont développés dans cette perspective.

Minimisation de l'adsorption non-spécifique

Au-delà du développement de substrats de plus en plus performants pour fixer des molécules, plusieurs techniques de fabrication ont été mises au point pour réduire les interactions indésirables sur un échantillon. Le blocage de surface (BSA, éthanolamine ...) et l'utilisation de polymères (PLL-g-PEG, PLL-g-Dextran, PEO ...) sont largement employés à cet effet. Notre travail montre que ces polymères sont compatibles avec la technique d'impression moléculaire de μ CP. Nous avons réalisé des motifs ordonnés de PLL-g-PEG et de PLL-g-dextran orientant préférentiellement l'adsorption de protéines en dehors des zones définies. Cependant, une étude menée par QCM a montré que le comportement du PLL-g-dextran pouvait évoluer en fonction de la technique d'immobilisation employée. Lorsqu'il est déposé en solution, il démontre de fortes propriétés de répulsion de protéines grâce au groupement polysaccharide. Déposé par μ CP, il est capable d'établir des liaisons avec les protéines de part le groupement PLL. Cette différence provient d'une interaction répulsive entre le dextran et le timbre de PDMS utilisé pour l'impression moléculaire. Ce phénomène peut être évité en modifiant l'énergie de surface des timbres de PDMS employés. Avec un léger traitement par plasma O_2 des timbres, les molécules de PLL-g-dextran déposées retrouvent leurs capacités de minimiser les interactions avec des protéines.

Bi-fonctionnalisation de surfaces

Nous avons développé une technique d'impression moléculaire basée sur des couches homogènes de polymères limitant les adsorptions non-spécifiques. Inspiré par le travail effectué pour des polymères de type PEO, nous avons réalisé des couches de PLL-g-dextran sur lesquelles des motifs de protéines (streptavidine ou d'anticorps) peuvent être déposés et se maintenir. La couche de PLL-g-

dextran exhibe pourtant des propriétés de non-adsorption en milieu liquide. L'environnement de la couche de polymères apparaît comme capitale et en particulier le taux d'hydratation de la couche. La chimie bi-fonctionnelle développée permet de générer des surfaces possédant des motifs de molécules sondes immobilisées à la surface d'une couche de polymères limitant les interactions non-spécifiques. Ces surfaces bi-fonctionnelles sont donc adéquates pour réaliser des tests de biodétection.

Efficacité des techniques face à l'adsorption non-spécifique de protéines

Une étude comparative menée par fluorescence nous a permis de conclure sur l'efficacité des surfaces développées en termes de limitation de l'adsorption non-spécifique. La saturation de surface à l'éthanolamine minimise l'adsorption de protéines de moitié par rapport à une lame de verre non saturée. L'adsorption indésirable de protéines est inhomogène sur des échantillons fonctionnalisés par des molécules de PLL-g-PEG. Enfin, les chimies de surface basées des couches de polymères de faible épaisseur amènent une passivation de surface stable et performante (couche de PLL-g-dextran et couche de PEO).

Bi-fonctionnalisation de substrats topographiques en relief

Pour certaines applications, il est nécessaire d'immobiliser des molécules sur un substrat selon sa topographie. Nous avons développé un procédé expérimental permettant de déposer sélectivement des molécules sondes sur un réseau de lignes submicrométriques tout en limitant les interactions non-spécifiques sur le reste du substrat. Bi-fonctionnaliser de façon sélective un substrat possédant une topographie à l'échelle submicrométrique est donc possible.

Références

1. B. Kasemo, *Surface Science* **2002**, 500, 656-677.
2. M. Tirrell; E. Kokkoli; M. Biesalski, *Surface Science* **2002**, 500, 61-83.
3. B. D. Ratner, *Journal of Biomedical Materials Research* **1993**, 27, (7), 837-850.
4. R. N. S. Sodhi, *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena* **1996**, 81, (3), 269-284.
5. P. Kingshott; H. Griesser, *J. Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* **1999**, 4, 403-412.
6. A. Hucknall; S. Rangarajan; A. Chilkoti, *Advanced Materials* **2009**, 21, (23), 2441-2446.
7. D. L. Stalling; C. W. Gehrke; R. W. Zumwalt, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1968**, 31, (4), 616-622.
8. M. S. Shoichet, *Macromolecules* **2009**, 43, (2), 581-591.
9. A. Amanda; S. K. Mallapragada, *Biotechnology Progress* **2001**, 17, (5), 917-923.
10. S. Park; J. P. Bearinger; E. P. Lautenschlager; D. G. Castner; K. E. Healy, *Journal of Biomedical Materials Research* **2000**, 53, (5), 568-576.
11. N. B. Holland; Y. Qiu; M. Rueggsegger; R. E. Marchant, *Nature* **1998**, 392, (6678), 799-801.
12. T. Matsuda; M. J. Moghaddam; H. Miwa; K. Sakurai; F. Iida, *ASAIO Journal* **1992**, 38, (3), M154-M157.
13. S. L. McArthur; K. M. McLean; P. Kingshott; H. A. W. St John; R. C. Chatelier; H. J. Griesser, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2000**, 17, (1), 37-48.
14. N. P. Desai; J. A. Hubbell, *Journal of Biomedical Materials Research* **1991**, 25, (7), 829-843.
15. M. Shen; Y. V. Pan; M. S. Wagner; K. D. Hauch; D. G. Castner; B. D. Ratner; T. A. Horbett, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **2001**, 12, (9), 961-978.
16. J. A. Neff; P. A. Tresco; K. D. Caldwell, *Biomaterials* **1999**, 20, 2377-2393.
17. N. D. Winblade; I. D. Nikolic; A. S. Hoffman; J. A. Hubbell, *Biomacromolecules* **2000**, 1, (4), 523-533.
18. P. D. Drumheller; J. A. Hubbell, *Journal of Biomedical Materials Research* **1995**, 29, (2), 207-215.
19. A. N. Nikolova; M. N. Jones, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1998**, 1372, (2), 237-243.
20. M. A. Cole; N. H. Voelcker; H. Thissen; H. J. Griesser, *Biomaterials* **2009**, 30, (9), 1827-1850.
21. A. Lankenau; E. Wischerhoff; K. Uhlig; H. G. Börner; J. F. Lutz; C. Duschl; O. Dössel; W. C. Schlegel, in: R. Magjarevic, (Ed.) Springer Berlin Heidelberg: 2009; Vol. 25/10, pp 134-135.
22. F. Brétagnot; L. Ceriotti; M. Lejeune; A. Papadopoulou-Bouraoui; M. Hasiwa; D. Gilliland; G. Ceccone; P. Colpo; F. Rossi, *Plasma Processes and Polymers* **2006**, 3, (1), 30-38.
23. L. Tessier. Pierre et Marie Curie Paris VI, 2009.
24. P. Hamilton-Brown; T. Gengenbach; H. J. Griesser; L. Meagher, *Langmuir* **2009**, 25, (16), 9149-9156.
25. L. D. Unsworth; H. Sheardown; J. L. Brash, *Langmuir* **2008**, 24, (5), 1924-1929.
26. P. Kingshott; H. Thissen; H. J. Griesser, *Biomaterials* **2002**, 23, 2043.
27. S. Han; C. Kim; D. Kwon, *Polymer* **1997**, 38, 317.
28. S. Pasche; S. M. De Paul; J. Voross; N. D. Spencer; M. Textor, *Langmuir* **2003**, 19, (22), 9216-9225.
29. A. Halperin, *Langmuir* **1999**, 15, (7), 2525-2533.
30. S. I. Jeon; J. H. Lee; J. D. Andrade; P. G. De Gennes, *Journal of Colloid and Interface Science* **1991**, 142, (1), 149-158.
31. S. I. Jeon; J. D. Andrade, *J. Colloid Interface Sci.* **1991**, 142, 159.
32. D. Leckband; S. Sheth; A. Halperin, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **1999**, 10, 1125.
33. I. Szleifer, *Biophysical Journal* **1997**, 72, (2, Part 1), 595-612.

34. W. R. Gombotz; W. Guanghui; T. A. Horbett; A. S. Hoffman, *Journal of Biomedical Materials Research* **1991**, 25, (12), 1547-1562.
35. T. McPherson; A. Kidane; I. Szleifer; K. Park, *Langmuir* **1998**, 14, (1), 176-186.
36. S. J. Sofia; V. Premnath; E. W. Merrill, *Macromolecules* **1998**, 31, (15), 5059-5070.
37. F. Bretagnol; O. Kylian; M. Hasiwa; L. Ceriotti; H. Rauscher; G. Ceccone; D. Gilliland; P. Colpo; F. Rossi, *Sensors and Actuators B: Chemical* **2007**, 123, (1), 283-292.
38. S. D. Paul; M. Textor Biosensor Chips, Development of Novel Surfaces and Interfaces for DNA/RNA and Protein Sensing.
39. G. L. Kenausis; J. Voros; D. L. Elbert; N. Huang; R. Hofer; L. Ruiz-Taylor; M. Textor; J. A. Hubbell; N. D. Spencer, *J. Phys. Chem. B* **2000**, 104, (14), 3298-3309.
40. T. Gillich; E. M. Benetti; E. Rakhmatullina; R. Konradi; W. Li; A. Zhang; A. D. Schluter; M. Textor, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, (28), 10940-10950.
41. S. Pasche; J. Voros; H. J. Griesser; N. D. Spencer; M. Textor, *J. Phys. Chem. B* **2005**, 109, 17545-17552.
42. J. M. Harris, *Poly(ethylene glycol) Chemistry*. New York, 1992.
43. S. Zalipsky; C. Lee, in: *Poly-(ethylene glycol chemistry): biotechnical and biomedical applications*, H. JM, (Ed.) New York: Plenum Press. : 1992; pp 347-381.
44. M. Metzke; J. Z. Bai; Z. Guan, *Journal of the American Chemical Society* **2003**, 125, (26), 7760-7761.
45. M. Morra, *Water in Biomaterial Surface Science*. Chichester, U.K., 2001.
46. J. Israelachvili, *PNAS* **1997**, 94, 8378-8379.
47. P. Vermette; L. Meagher, *Colloids Surf. BBiointerfaces* **2003**, 28, 153.
48. S. Herrwerth; W. Eck; S. Reinhardt; M. Grunze, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, (31), 9359-9366.
49. J. M. Harris, *Poly(ethylene glycol) Chemistry and Biological Applications*. Washington, DC, 1997; Vol. 680.
50. S. I. Jeon; J. D. Andrade, *J. Colloid Interface Sci.* **1991**, 142, 159-166.
51. B. Zhu; T. Eurell; R. Gunawan; D. Leckband, *J. Biomed. Mater. Res.* **2001**, 56, (3), 406-416.
52. B. McPherson Timothy; J. Lee Samuel; K. Park, in: *Proteins at Interfaces II*, American Chemical Society: 1995; Vol. 602, pp 395-404.
53. R. Michel; S. Pasche; M. Textor; D. G. Castner, *Langmuir* **2005**, 21, (26), 12327-12332.
54. T. McPherson; A. Kidane; I. Szleifer; K. Park, *Langmuir* **1998**, 14, 176.
55. N. V. Efremova; S. R. Sheth; D. E. Leckband, *Langmuir* **2001**, 17, 7628.
56. M. Malmsten; K. Emoto; J. M. Van Alstine, *J. Colloid Interface Sci.* **1998**, 202, 507.
57. Y. S. Lin; V. Hlady; C. G. Golander, *Colloids Surf. B: Biointerfaces* **1994**, 3, 49.
58. J. H. Lee; H. B. Lee; J. D. Andrade, *Prog. Polym. Sci.* **1995**, 20, 1043.
59. S. Lee; J. Voros, *Langmuir* **2005**, 21, (25), 11957-11962.
60. K. L. Prime; G. M. Whitesides, *Journal of the American Chemical Society* **1993**, 115, (23), 10714-10721.
61. K. P. M. Amiji, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **1993**, 4, 217.
62. M. V. S. G. R. Llanos, 1993, 4, 381, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **1993**, 4, 381.
63. B. D. R. G. P. Lopez, C. D. Tidwell, C. L. Haycox, R. J. Rapoza, T. A. Horbett, , *J. Biomed. Mater. Res.* **1992**, 26, 41.
64. E. P. K. Currie, M. A. C. Stuart, , *Adv. Colloid Interface Sci* **2003**, 100, 205.
65. K. A. T. M. Hoa XD, *Biosens Bioelectron* **2007**, 23, 151.
66. T. L. Lasseter; B. H. Clare; N. L. Abbott; R. J. Hamers, *Journal of the American Chemical Society* **2004**, 126, (33), 10220-10221.
67. L. Li; S. Chen; J. Zheng; B. D. Ratner; S. Jiang, *The Journal of Physical Chemistry B* **2005**, 109, (7), 2934-2941.
68. K. Feldman; G. Hohner; N. D. Spencer; P. Harder; M. Grunze, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 10134.

69. P. Harder; M. Grunze; R. Dahint; G. M. Whitesides; P. E. Laibinis, *J. Phys. Chem. B* **1998**, 102, 426.
70. K. V. Gobi; H. Iwasaka; N. Miura, *Biosensors and Bioelectronics* **2007**, 22, (7), 1382-1389.
71. K. Uchida; H. Otsuka; M. Kaneko; K. Kataoka; Y. Nagasaki, *Analytical Chemistry* **2005**, 77, (4), 1075-1080.
72. S. VandeVondele; J. Voros; J. A. Hubbell, *Biotechnol. Bioeng.* **2003**, VOL. 82,, (7).
73. A. Ferdous, T. Akaike, and A. Maruyama,, *Biomacromolecules* **2000**, 1, 186.
74. C. Perrino; S. Lee; S. W. Choi; A. Maruyama; N. D. Spencer, *Langmuir* **2008**, 24, (16), 8850-8856.
75. S. Martwiset; A. E. Koh; W. Chen, *Langmuir* **2006**, 22, (19), 8192-8196.
76. E. Osterberg; K. Bergström; K. Holmberg; T. P. Schuman; J. A. Riggs; N. L. Burns; V. A. J. M.; J. M. Harris, *J. Biomed. Mater. Res.* **1995**, 29, 741-747.
77. S. Han, C. Kim, and D. Kwon, , *Polymer Degradation and Stability*, **1995**, 47, 203.
78. B. R. C. Christine P. Tan, David M. Lin, Harold G. Craighead,, *Nano Lett.* **2010**, 10, 719.
79. J. L. Tan; J. Tien; C. S. Chen, *Langmuir* **2001**, 18, (2), 519-523.
80. A. Ruiz; L. Buzanska; D. Gilliland; H. Rauscher; L. Sirghi; T. Sobanski; M. Zychowicz; L. Ceriotti; F. Bretagnol; S. Coecke; P. Colpo; F. o. Rossi, *Biomaterials* **2008**, 29, (36), 4766-4774.
81. A. Ruiz; M. Zychowicz; L. Buzanska; D. Mehn; C.A. Mills; E. Martinez; S. Coecke; J. Samitier; P. Colpo; F. Rossi, *Micro and Nanosystems* **2009**, 1, 50-56.
82. A. B. Ruiz, L.; Ceriotti, L.; Bretagnol, F.; Coecke, S.; Colpo, P.; Rossi, F., *Journal of Biomaterials Science* **2008**, 19, (12), 1649-1657.
83. H. Ma; Y. Wu; X. Yang; X. Liu; J. He; L. Fu; J. Wang; H. Xu; Y. Shi; R. Zhong, *Analytical Chemistry* **2010**, 82, (15), 6338-6342.
84. in: Proceedings Symposium IEEE/LEOS Benelux 2002; 2002.
85. H. Lorentz. EPFL, 1998, Nouvelles technologies de microstructuration de type UV-LIGA et fabrication de composants micromécaniques.
86. Graham H. Cross et al., *Biosensors and Bioelectronics* **2003**, 19, 383.
87. C. Perrino. ETH Zurich, 2009, Poly(L-lysine)-g-dextran (PLL-g-dex).

ⁱ Composition des tampons de lavage high salt et low salt. Tampon High salt : PBS 1x, tween 20 0.1%, NaCl 1M.
 Tampon Low salt : PBS 1x, tween 20 0.1%.

CHAPITRE 4 :	107
ETUDE DE LA FONCTIONNALITE DE BIOMOLECULES DEPOSEES PAR IMPRESSION : LE CAS DES ENZYMES	107
I/ STRUCTURATION DES ÉCHANTILLONS	108
1. RÉACTION ENZYMATIQUE BASÉE SUR LA DEXTRANE- SACCHARASE	108
2. MICROCONTACT PRINTING DE PLL-G-DEXTRAN AVEC UN TIMBRE PLAT	109
3. MICROCONTACT PRINTING DE MOTIFS DE DEXTRANE- SACCHARASE SUR LA COUCHE DE PLL-G-DEXTRAN	109
4. OBJECTIF DE L'ÉTUDE	109
II/ TECHNIQUES DE CARACTÉRISATION	111
1. AFM	111
2. SEEC	114
III/ RÉSULTATS	115
1. MICROCONTACT PRINTING DE MOTIFS DE DEXTRANE- SACCHARASE SUR LA COUCHE DE PLL-G-DEXTRAN	115
2. SUIVI DE LA RÉACTION ENZYMATIQUE PAR AFM	115
3. SUIVI DE LA RÉACTION ENZYMATIQUE PAR MICROSCOPIE SEEC	116
4. CONCLUSION	116
REFERENCES	118

Chapitre 4 :

Etude de la fonctionnalité de biomolécules déposées par impression : le cas des enzymes

L'immobilisation d'entités biochimiques par lithographie douce et plus particulièrement par Microcontact printing (μ CP) est très utilisée depuis une vingtaine d'années pour répondre aux besoins de micro et nano fabrication de substrats moléculaires. Le contact entre le timbre en élastomère et la surface est effectué sans contrainte mécanique ou déformation, assurant un transfert doux des molécules encrées sur le timbre sur le substrat selon la géométrie souhaitée. Généralement, les motifs biomoléculaires déposés sont optimisés pour être les plus faibles possibles en termes d'épaisseur. Cependant, déposer une monocouche de molécules est un concept idéal, éloigné des surfaces obtenues en réalité où plusieurs strates biologiques s'agencent au sein de motifs de dimensions micro ou nanométriques. Les concentrations moléculaires atteintes dans ces zones spatialement très localisées amènent un confinement important.¹ Aussi, l'arrangement des molécules au sein des motifs formés est en général aléatoire et désordonné. Le site actif des molécules n'est pas idéalement orienté et positionné pour interagir avec des entités en solution. Des études ont été menées pour montrer que les motifs biomoléculaires réalisés par μ CP conservaient une activité biochimique satisfaisante. La fonctionnalité de molécules déposées est primordiale puisqu'elle est mise à profit pour diverses applications (attachement de cellules, biodétection, tests immunologiques ...). E. Delamarche et M. Bernard, appartenant au centre de recherche d'IBM Zurich ont notamment étudié les propriétés d'anticorps déposés par μ CP. Ils ont vérifié que la fonctionnalité d'immunoglobulines² et de 16 autres protéines^{3 4} n'était pas altérée suite à une immobilisation par μ CP.

Ce travail a permis de présenter la technique d'impression moléculaire de protéines tout en vérifiant leur activité biologique. Afin d'étayer cette analyse, nous nous sommes concentrés sur un autre type de protéines dont les propriétés sont encore plus sensibles à la conformation spatiale de la molécule que les anticorps : les enzymes. Les enzymes sont des protéines dont la structure tridimensionnelle impacte directement sur leur fonctionnalité. L'arrangement en trois dimensions des chaînes d'acides aminés et des différents domaines des enzymes assure des fonctions diverses et variées, indispensables aux besoins des organismes vivants. Même à de très faible concentration, leur activité peut être observable. De ce fait, nous avons souhaité évaluer si la fonctionnalité de molécules d'enzymes était maintenue après leur dépôt par μ CP. Nous avons donc réalisé des motifs micrométriques d'enzymes sur une surface spécifique afin de suivre leur activité au cours du temps par microscopie à force atomique. Dans un second temps, nous avons évalué la possibilité de caractériser l'activité de ces entités biologiques par une seconde technique optique non destructive

basée sur l'augmentation du contraste de surface (surface-enhanced ellipsometric contrast ou SEEC). Cette dernière technique utilise des substrats multicouches particuliers appelés SURF.

Ce court chapitre fait l'objet de deux publications en court de révision, qui sont jointes à la fin du chapitre. Le lecteur intéressé par cette partie est invité à s'y référer. Nous ne présentons dans le corps principal de ce mémoire qu'une brève introduction à ces travaux et un résumé succinct des résultats obtenus ainsi que leur discussion.

I/ Structuration des échantillons

Une collaboration avec le groupe d'Ingénierie Enzymatique de l'INSA de Toulouse a été mise en place. L'enzyme fournie a été synthétisée et étudiée par le biais de différentes thèses dirigées par M. Remaud.^{5 6} Il s'agit d'une forme tronquée de la dextrane-saccharase (DSR-S) appartenant à la famille 70 des glycoside-hydrolases (GH). Les dextrane-saccharases sont produites à l'origine par des bactéries lactiques Gram⁺ et possèdent une masse molaire moyenne de 160 à 180 kDa.^{7 8} L'analyse de leur structure primaire et leurs comparaisons avec d'autres familles d'enzymes ont permis d'identifier des domaines fonctionnels clés^{9 10} et de révéler une organisation en quatre domaines,^{11 12, 13 14} comprenant un peptide signal, une zone variable, un domaine catalytique hautement conservé, et un domaine C-terminal souvent appelé domaine de liaison au glucane ou GBD (« glucan Binding Domain »).¹⁵

1. Réaction enzymatique basée sur la Dextrane-saccharase

La dextrane-saccharase (DSR-S), issue de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F catalyse à partir de saccharose la synthèse d'un polymère d'unités glucosyle appelé dextran, dont la plupart des liaisons sont de type α -1,6.¹⁶ Dans notre problématique, l'enzyme utilisée est une forme tronquée de DSR-S spécifique des liaisons α -1,6.¹⁷ Il a été démontré que le glucose (issu de l'hydrolyse de saccharose) ou le saccharose lui-même pouvait servir de premier accepteur pour initier la polymérisation. L'élongation des chaînes de dextran est réalisée par ajout successif d'unités glycosyle à l'extrémité non-réductrice du polymère (Figure 1).

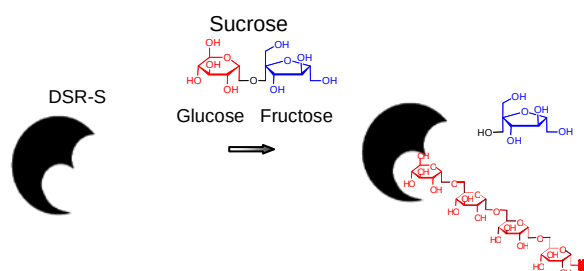


Figure 1 : Illustrations de l'élongation des chaînes de dextran, suite au transfert successifs d'unités glycosyles

La forme tronquée de l'enzyme utilisée (DSR-S varde Δ 4N)¹⁷ possède une série d'acides aminés en son extrémité C-terminale, qui permet une fixation avec le dextran avec une constante de dissociation K_d proche de 10^{-8} M et un k_{off} de $0.001s^{-1}$, témoignant de fortes liaisons avec le glucane.

Cette série d'acides aminés est le domaine de liaison au glucane ou GBD (« Glucan Binding Domain ») de l'enzyme. Pour observer l'activité enzymatique de la DSR-S, nous avons donc préparé une surface basée sur le dextran.

2. Microcontact Printing de PLL-g-dextran avec un timbre plat

Nous avons fourni une surface à base de dextran pour permettre aux molécules d'enzymes d'établir des liaisons avec la surface par l'intermédiaire de leur GBD. Ainsi, une couche uniforme de molécules de PLL-g-dextran (concentration 100 µg/mL, pH : 5.8, buffer NaAc) est déposée avec un timbre plat par µCP sur une lame de verre ou un Surf, en fonction de la technique de caractérisation utilisée par la suite. La lame de verre et le Surf sont au préalable nettoyés et oxydés par traitement plasma O₂ (Figure 2A et B).

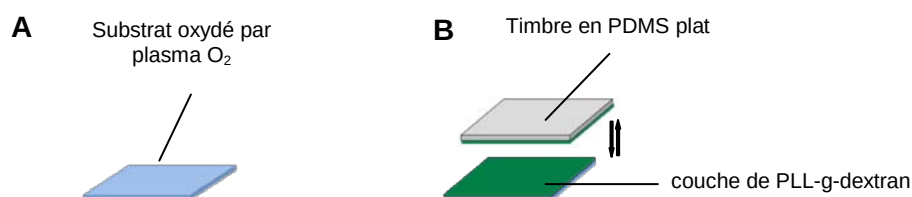


Figure 2 : Procédé de fabrication de l'échantillon d'analyse. (A) Lame de verre ou Surf nettoyés et oxydés par traitement plasma O₂ sur lesquels (B) une couche uniforme de PLL-g-dextran est déposée par µCP avec un timbre plat non structuré

La poly(L-lysine) ou PLL établit des liaisons électrostatiques avec la surface de la lame ou du surf oxydée et chargée négativement, permettant ainsi au groupement dextran d'être orienté vers la solution.

3. Microcontact Printing de motifs de dextrane-saccharase sur la couche de PLL-g-dextran

Ensuite, des motifs micrométriques d'enzymes sont déposés par µCP sur la couche de PLL-g-dextran. A l'aide d'un timbre micro-structuré (plots de 5 µm de diamètre avec une périodicité de 10 µm) et encre par la solution de DSR-S, des motifs d'enzymes sont transférés sur la couche de PLL-g-dextran (Figure 3). Les molécules d'enzyme se retrouvent donc spatialement confinées dans des plots de 5 µm sur une surface où elles peuvent se fixer.

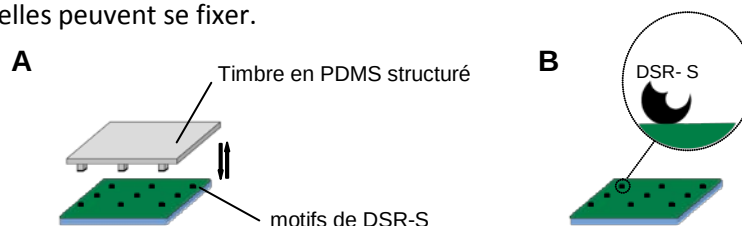


Figure 3 : (A) Des motifs d'enzymes DSR-S sont ensuite déposés sur la couche de PLL-g-dextran avec un timbre structuré (B) Chaque plot comporte des enzymes confinées

4. Objectif de l'étude

Il s'agit maintenant d'évaluer si la fonctionnalité des molécules d'enzymes est conservée après cette étape d'impression moléculaire. Pour cela, nous plaçons l'échantillon que nous venons de structurer en environnement liquide dans une boîte de Petri (Figure 4A). Le tampon est composé de buffer NaAc

enrichi en saccharose largement en excès. Le saccharose est utilisé par l'enzyme comme unité glycosyle et alimente ainsi la polymérisation (*Figure 4B*). La surface de l'échantillon est alors analysée en temps réel pendant plus de 2 heures, afin d'observer si la réaction enzymatique a lieu (*Figure 4C*). Les techniques de caractérisation choisies sont la microscopie à force atomique (AFM) et la technique optique de microscopie SEEC.

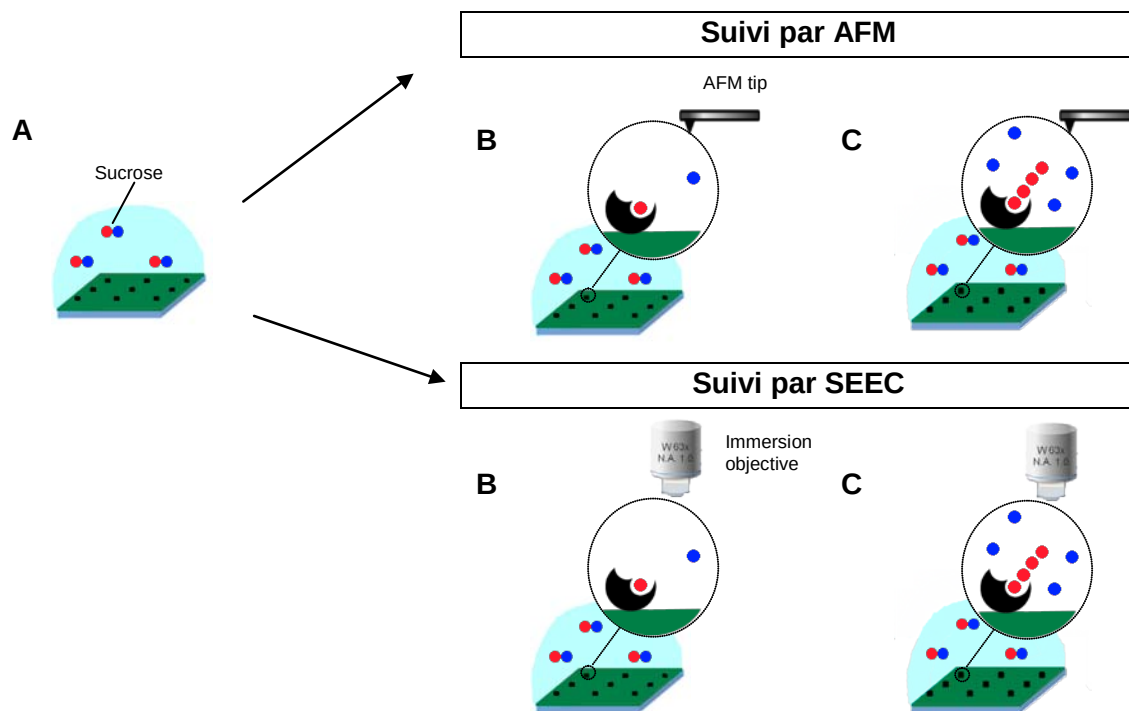


Figure 4 : (A) L'échantillon est placé en environnement liquide dans une boîte de Petri. Le tampon est composé de buffer NaAc enrichi en saccharose en excès (B) Le dextran, le glucose ou le saccharose lui-même peuvent servir de premier accepteur pour amorcer la polymérisation (C) L'AFM et la microscopie SEEC permettent de suivre en temps réel et en milieu liquide l'élongation des chaînes de dextran catalysées par la DSR-S pendant 120 minutes

L'observation de la surface en temps réel nous permet d'évaluer si les enzymes déposées par μ CP ont conservé leur fonctionnalité et sont donc à même de polymériser ou si leur activité est altérée par l'immobilisation. En quantifiant la matière présente sur la surface à l'échelle moléculaire, nous sommes à-même d'analyser l'impact du μ CP sur les propriétés des molécules d'enzymes déposées.

II/ Techniques de caractérisation

Cette étude requiert une technique de caractérisation possédant une forte résolution spatiale et une grande sensibilité en épaisseur afin d'enregistrer l'élongation des chaînes de dextran à l'échelle moléculaire. Pour étudier l'évolution cinétique des motifs biomoléculaires, les données doivent être acquises en temps réel pendant une longue période. Le substrat doit donc être placé en milieu liquide, dans des conditions physiologiques stables (pH, tampon, produit, température ...). Le suivi de ce type de réaction enzymatique impose donc de nombreux critères. Observer et quantifier en temps réel une réaction enzymatique localisée et confinée sur des motifs de manière non invasive est encore aujourd'hui un challenge technologique. A notre connaissance, l'analyse en temps réel d'une polymérisation enzymatique de saccharose a été réalisée par QCM¹⁸, SPR¹⁹ et spectroscopie de force²⁰. Ces techniques ne permettent pas de suivre une réaction confinée sur des motifs de dimension micrométrique. Or, délimiter des motifs moléculaires permet une meilleure observation de la croissance enzymatique. La polymérisation est plus facilement discernable et quantifiable sur des zones délimitées spatialement que sur une surface étendue comme c'est le cas pour les substrats observés en SPR. Nous avons choisi de suivre l'élongation de chaînes de dextran catalysée par la dextran-saccharase par AFM en milieu liquide et microscopie SEEC en milieu liquide, déjà présentée dans le chapitre précédent.

1. AFM

La microscopie à force atomique ou AFM est une technique de caractérisation développée en 1986 par Binnig *et al.* permettant d'imager la topographie d'un échantillon avec une résolution verticale de l'ordre du nanomètre. L'analyse de l'état de surface peut être effectuée sur des substrats variés, composés de matière inerte (dispositifs électroniques, métaux, polymères...) ou biologique (cellules, bactéries, protéines, ADN). Les échantillons peuvent être observés à l'air ou en milieu liquide. Dans le cas d'entités biologiques, la présence du milieu liquide autour de l'objet d'étude permet de maintenir l'échantillon au plus proche de ses conditions physiologiques et de l'observer évoluer à l'échelle moléculaire. Ce point convient particulièrement au besoin énoncé précédemment quant au suivi de la réaction de la dextrane-saccharase en milieu liquide enrichi en saccharose.

Le principe de caractérisation par AFM est basé sur une sonde qui balaye la surface de l'échantillon. La sonde est constituée d'un levier en silicium ou nitrure de silicium (*Figure 5A*) comportant à son extrémité une fine pointe (*Figure 5B*).

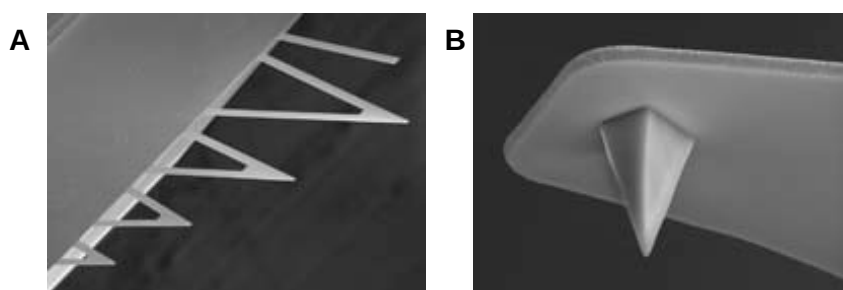


Figure 5 : (A) Images MEB de 4 leviers triangulaires et un rectangulaire situés sur une pointe MLCT-UC fournis par Bruker (B) pointe AFM située à l'extrémité d'un levier

Ces éléments sont cruciaux pour l'imagerie par AFM. Le levier, relativement fin ($0.55\ \mu\text{m}$) est défini par sa constante de raideur et sa fréquence de résonnance. Généralement, pour imager de la matière dite molle, le levier utilisé présente une certaine souplesse pour ne pas endommager l'échantillon. La pointe est définie par le rayon de courbure à son extrémité. C'est le rayon d'une pointe qui définit la résolution spatiale des images effectuées. Aussi, les pointes sont fabriquées avec des techniques issues de la microfabrication pour obtenir des dimensions nanométriques et contrôlées.

Le principe de fonctionnement de l'AFM repose sur la détection des forces s'exerçant entre la surface de l'échantillon et la pointe. Les forces interatomiques (forces de Van der Waals, forces de répulsion ionique, forces électrostatiques, forces de friction, forces magnétiques) prennent beaucoup plus d'ampleur à l'échelle micro et nanométrique que dans le macromonde. L'AFM s'appuie sur la détection de ces forces interatomiques pour caractériser l'état de surface des échantillons et ses propriétés (viscoélastiques, électriques, magnétiques, études tribologiques, mesure de forces d'adhésion...). Le système mis en place pour acquérir les données issues du balayage de la pointe sur la surface est représenté par la Figure 6.

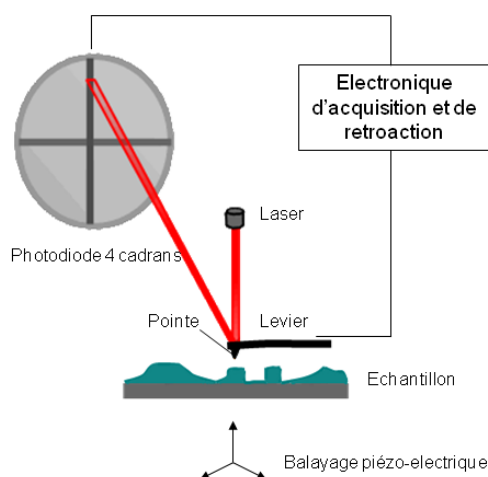


Figure 6 : Principe d'acquisition d'un microscope à force atomique

Le levier muni de la pointe balaye la surface de l'échantillon. Son déplacement est assuré par des céramiques piézo-électriques sur un échantillon fixé (fournisseur JPK Instruments) mais en pratique il est aussi possible de rencontrer des systèmes où la pointe est fixe et l'échantillon se déplace (fournisseur Bruker). Les variations du levier ou déflexions sont enregistrées grâce à un faisceau laser que l'on positionne sur l'arrière du levier. Cette partie est généralement traitée par un revêtement (Ti/Au ou Au) pour augmenter la réflexion du faisceau laser. Le faisceau est réfléchi sur un miroir puis sur une photodiode composée de quatre cadrans qui enregistre le signal lumineux. Le déplacement du spot formé sur la photodiode renseigne sur les variations du levier (déflexion et torsion). Il est possible de balayer une zone de $100\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m}$ au maximum avec l'AFM utilisé dans ce travail. Un convertisseur et tout un système complet d'électronique permettent de traduire l'information lumineuse reçue en une image en 3 dimensions de l'échantillon. Pour cela, plusieurs modes sont utilisables :

- Le mode contact où la pointe est directement appuyée sur la surface de l'échantillon. Les principales forces d'interaction entre la pointe et la surface sont des forces répulsives de très

courte portée dues à la répulsion des nuages électroniques des atomes. Les deux modes d'imagerie possibles en contact sont le mode hauteur et le mode force. Le mode hauteur est le plus couramment utilisé car il permet de fixer une consigne de force d'appui à la pointe sur la surface. Ainsi, grâce à la boucle de rétroaction, les piézo-électriques vont permettre d'ajuster les déplacements de la pointe pour que la valeur de force soit constante lors du balayage de la surface. La hauteur de la pointe va suivre le relief de l'échantillon et permettre de générer la topographie en 3D de l'échantillon. Il faut généralement prendre garde à bien régler la force de consigne pour ne pas endommager l'échantillon et notamment les échantillons biologiques. La souplesse du levier prend donc toute son importance. La torsion de levier amène des informations sur les forces d'adhésion entre la pointe et la surface et renseigne sur la nature chimique de l'échantillon.

- Le mode tapping (ou contact intermittent) où le levier oscille à une fréquence propre de vibration au voisinage de la surface de l'échantillon. Lorsque la pointe détecte la surface, l'amplitude de vibration décroît de part les perturbations induites par la surface. La pointe ne vient que périodiquement en contact avec la surface, diminuant ainsi la détérioration du substrat. L'image de hauteur représente la topographie de la surface.

Il existe aussi la possibilité de faire de la spectroscopie de force sur un échantillon par AFM. On peut alors réaliser des cartographies de force sur l'échantillon. Au-delà du relief, la pointe peut balayer la surface pour relever différentes grandeurs physiques en chaque point de l'échantillon. Par des phénomènes d'approches/retraits de la pointe, l'information enregistrée portera sur les propriétés visco-élastiques de chaque pixel de la surface.

Enfin, une plateforme AFM peut recevoir des modules supplémentaires pour permettre une caractérisation complète. Généralement, des cubes de fluorescence peuvent être ajoutés au microscope optique entourant l'échantillon afin de coupler microscopie optique, microscopie à fluorescence et microscopie à force atomique. Cette combinaison amène des informations complémentaires pour caractériser un échantillon dans sa globalité.

La microscopie à force atomique s'avère particulièrement adaptée au suivi en temps réel de réactions biologiques puisqu'il est possible d'observer et de quantifier la topographie d'un substrat avec de bonnes résolutions latérales et verticales. L'échantillon peut être placé en milieu liquide. Dans ces conditions expérimentales, il est très difficile d'imager la surface en mode tapping, ce qui permettrait de ne pas perturber la réaction enzymatique au sein des motifs. Les oscillations du levier entraînent des vibrations au sein du liquide, complexifiant grandement les analyses. Le mode contact est donc privilégié. L'AFM utilisé pour notre étude provient de la société JPK Instruments (Allemagne), le modèle est un NanoWizard II BioAFM. Les pointes utilisées dans la partie expérimentale suivante sont des MLCT-UC du fournisseur Bruker dont le rayon de courbure est de 20 nm et les leviers triangulaires de constante de raideur de 0.03 N/m. Ce levier, relativement souple va permettre un balayage doux de la pointe sur la surface. La polymérisation catalysée par l'enzyme DSR-R va donc être imagée en milieu liquide pendant 2 heures sur des motifs confinés réalisés par μ CP.

2. SEEC

La microscopie SEEC est basée sur l'augmentation du contraste de surface grâce à l'utilisation de substrats spécifiques appelés Surfs. L'augmentation de la sensibilité verticale provient d'une augmentation du contraste de l'objet par rapport au fond et permet une résolution verticale de l'ordre de 0.2 nm. La technique, décrite au chapitre III (II/1/b) nécessite un microscope optique classique avec des objectifs de grossissements différents. De toutes petites quantités de matière sont observables et quantifiables sur la surface. De plus, si l'on utilise un objectif à immersion sur le microscope, cette technique permet d'imager la topographie d'un échantillon en 3 dimensions évoluant en milieu liquide. Cette méthode de caractérisation répond à nos critères. Elle permet d'observer et de quantifier en temps réel de petites quantités de matière biologique confinée sur une surface à l'échelle nanométrique et en milieu liquide. Le système basé sur la microscopie optique conventionnelle permet de suivre l'évolution de réaction enzymatique localisée sur des motifs de taille micrométrique de manière non-invasive tout en ayant de bonnes sensibilités latérales. Nous avons observé et suivi l'élongation de chaînes de dextran catalysées par la dextran-saccharase en présence de monomères de saccharose pendant 2 heures grâce à un objectif de grossissement x63 à immersion.

III/ Résultats

1. Microcontact printing de motifs de dextrane-saccharase sur la couche de PLL-g-dextran

Quelle que soit la technique de caractérisation (AFM ou SEEC) utilisée, la première image de la surface est prise seulement 15 minutes après le positionnement de l'échantillon en milieu liquide. Ce temps est nécessaire en AFM, pour que la pointe se stabilise dans le milieu liquide et en SEEC, pour prendre une image du calibre dans les mêmes conditions que la surface d'intérêt. La Figure 7 présente la première image des motifs de dextrane- saccharase analysés en AFM (A) et en SEEC (B).

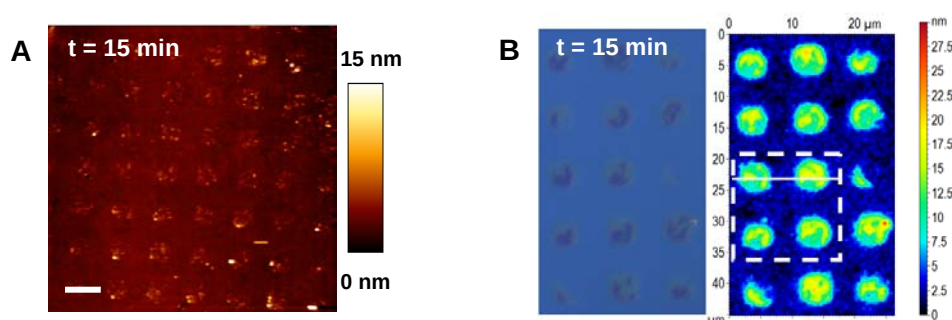


Figure 7 : (A) Image AFM en mode contact et en milieu liquide des motifs de dextrane- saccharase 15 minutes après le positionnement en milieu liquide. Barre d'échelle : 10 μ m. (B) Images en microscopie SEEC et reconstituées avec une échelle de couleur de motifs de dextrane- saccharase 15 minutes après le positionnement en milieu liquide.

Les motifs d'enzyme sont bien délimités spatialement dans des zones de 5 μ m au pas de 10 μ m, correspondant aux structures présentes sur le timbre de PDMS utilisé pour leur dépôt par μ CP. La surface de l'échantillon est composée de la couche de PLL-g-dextran. L'épaisseur des motifs est de quelques nanomètres (entre 1 et 2 nm en AFM et entre 10 et 15 nm en SEEC). Cette différence de valeur ne sera pas expliquée en fin de chapitre mais provient de la nature des deux techniques de caractérisation. La caractérisation par AFM se fait par contact. L'interaction de la pointe avec le polymère et les enzymes peut entraîner une vitesse de croissance plus faible. La caractérisation par SEEC est optique, il n'y a donc pas d'interférence entre la technique de lecture et l'échantillon.

2. Suivi de la réaction enzymatique par AFM

La pointe AFM balaye la même fenêtre de 70 μ m x 70 μ m pendant 120 minutes. Une image est effectuée toutes les 15 minutes. Les images sont ensuite analysées afin de quantifier la matière présente sur la surface. Au sein des motifs d'enzymes, on constate une augmentation progressive de l'épaisseur de la matière fixée à la surface. Cet épaissement est attribué à la réaction de polymérisation catalysée en surface par le plot d'enzymes. Comme le montre la Figure 8, 15 minutes après le positionnement de l'échantillon en milieu liquide (ce qui correspond à la première image effectuée), les plots d'enzyme ont une épaisseur inférieure à 1 nm. La polymérisation est clairement visible à partir de 60 minutes. 90 minutes après le début de l'observation, les plots ont une épaisseur qui a augmenté. Elle atteint jusqu'à 5 nm par endroit au sein des motifs. Enfin, à la fin de l'analyse (120 minutes après le début de l'observation) les plots mesurent de 3 à 7 nm d'épaisseur. Cette différence de hauteur provient d'une activité enzymatique qui varie entre chaque plot. De la matière

a donc été rajoutée au sein des motifs d'enzyme. Cet effet ne peut être attribué à l'adsorption non-spécifique de molécules de sucrose sur l'échantillon car la surface, autour des motifs n'a pas augmenté en épaisseur. Il est ensuite possible de calculer le volume de matière ajoutée sur la surface.

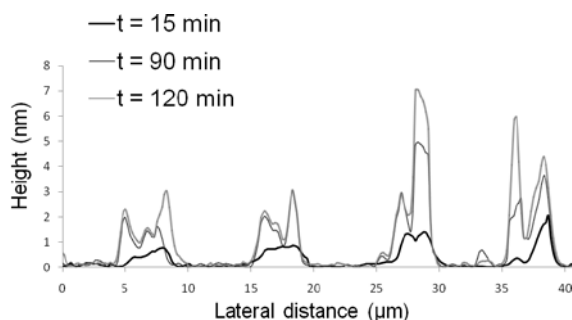


Figure 8 : Coupe transversale de la surface analysée sur 40 μm . 4 plots de dextran- saccharase sont visibles 15, 90 et 120 minutes après le positionnement de l'échantillon en milieu liquide.

3. Suivi de la réaction enzymatique par microscopie SEEC

La surface de PLL-g-dextran comportant les plots d'enzyme déposés par μCP est suivie par microscopie SEEC pendant 120 minutes. Toutes les 15 minutes, une image de l'échantillon étudié et une image du calibre sont enregistrées. C'est la même zone de motifs qui est enregistrée pendant la totalité de l'étude. La Figure 9 présente un profil d'épaisseur de l'échantillon. Deux plots sont présents sur la coupe de 20 μm en début et en fin de suivi. 15 minutes après le positionnement de l'échantillon en milieu liquide, les plots présentés atteignent de 10 à 15 μm d'épaisseur. La surface entre les motifs a une hauteur inférieure à 5 nm. Après 120 minutes, les motifs présentés atteignent 25 nm et l'épaisseur de la zone en dehors des motifs n'a pas varié. De la matière biologique s'est donc ajoutée sur les motifs de dextran- saccharase.

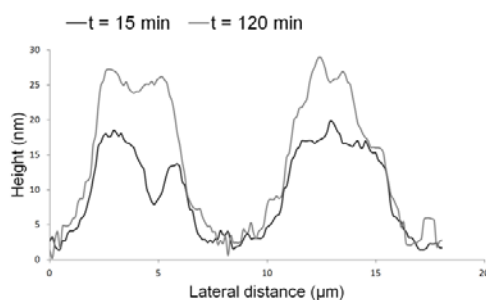


Figure 9 : Coupe transversale de la surface analysée sur 20 μm . 2 plots de dextran- saccharase sont visibles 15 et 120 minutes après le positionnement de l'échantillon en milieu liquide.

4. Conclusion

En AFM, nous avons constaté une augmentation de la matière présente au sein des motifs. De quelques nanomètres d'épaisseur en début d'analyse, l'épaisseur des plots a atteint de 3 à 7 nm en 120 minutes. En dehors des motifs d'intérêt, la surface de PLL-g-dextran a une épaisseur qui s'est maintenue identique au cours de l'analyse. Cette augmentation d'épaisseur est donc clairement

attribuée à l'activité des enzymes. Au delà du challenge technologique que représente l'observation AFM en milieu liquide pendant 120 minutes dans des conditions stables, l'élongation des chaînes de dextran a pu être enregistrée avec une sensibilité nanométrique. Aucune pollution de la pointe AFM n'a été rencontrée et les motifs n'ont pas été détruits par le contact de la pointe avec la surface.

En SEEC, le même constat a pu être effectué. Les motifs d'enzymes, qui mesuraient entre 15 et 16 nm en début d'analyse ont atteint jusqu'à 25 nm 120 minutes plus tard. La surface autour des plots est restée quant à elle à la même épaisseur pendant la totalité du suivi. La polymérisation de chaînes de dextran par les enzymes présents au sein des motifs a donc permis cette augmentation de matière. L'avantage de ce suivi par rapport à la caractérisation par microscopie à force atomique réside dans le fait que la microscopie SEEC est une technique optique non-invasive. Aussi, l'évolution des motifs d'enzymes a pu être quantifiée sans aucune perturbation extérieure. Cet aspect peut expliquer les différences d'épaisseur de matière observées entre un suivi AFM et SEEC de la même réaction enzymatique dans les mêmes conditions expérimentales. La perturbation de la pointe AFM, qui reste une technique de caractérisation par contact peut entraîner une sorte d'écrasement sur les structures observées.

❖ **Les enzymes déposées par μ CP sur la surface de PLL-g-dextran ont donc conservé leur activité biologique. Leur fonctionnalité n'a donc pas été altérée par l'impression moléculaire. Le volume de matière ajoutée peut nous renseigner sur la vitesse de polymérisation des enzymes déposées par μ CP.**

De manière plus générale, il est possible de créer une surface d'accroche en déposant une couche homogène de molécules par μ CP en tenant compte du GBD de chaque enzyme. Dans le cas de la dextran-saccarase, cette couche d'accroche était basée sur des molécules de PLL-g-dextran. Des motifs micrométriques d'enzymes ont été immobilisés par-dessus afin de délimiter des zones où la polymérisation enzymatique est localisée. Cette technique de fabrication d'échantillons peut s'appliquer à de multiples entités afin d'observer et de quantifier leur activité biologique dans des conditions stables.

❖ **Ce travail nous a permis de développer une technique de bio-fonctionnalisation adéquate pour l'étude dynamique de protéines fonctionnelles. Le μ CP s'avère intéressant pour la conception de chimie de surface spécifique permettant de fixer des enzymes à étudier.**

References

1. E. Delamarche; A. Bernard; H. Schmid; A. Bietsch; B. Michel; H. Biebuyck, *Journal of the American Chemical Society* **1998**, 120, (3), 500-508.
2. E. Delamarche; A. Bernard; H. Schmid; B. Michel; H. Biebuyck, *Science* **1997**, 276, 779.
3. A. Bernard; E. Delamarche; H. Schmid; B. Michel; H. R. Bosshard; H. Biebuyck, *Langmuir* **1998**, 14, 2225-2229.
4. A. Bernard; J. P. Renault; B. Michel; H. R. Bosshard; E. Delamarche, *Adv. Mater.* **2000**, 12, (14), 1067-1070.
5. C. Moulis. Ingénierie Rationnelle de la Dextrane-saccharase DSR-S. INSA de Toulouse, UMR CNRS 5504, UMR INRA 792, Toulouse, 2006.
6. R. Irague. INSA de Toulouse, 2011.
7. V. Monchois, Lakey, J. H., Russell, R. R. *FEMS Microbiol. Lett.* 177, 243, *FEMS Microbiol. Lett.* **1999**, 177, 243.
8. C. Moulis. INSA de Toulouse, **2006**, Ingénierie rationnelle de la Dextrane-saccharase DSR-S : compréhension du mécanisme de polymérisation pour la synthèse de dextrans de taille contrôlée.
9. H. Abo, Matsumura, T., Kodama, T., Ohta, H., Fukui, K., Kato, K., Kagawa, H. , *J Bacteriol* **1991**, 173, 989.
10. G. Mooser, Wong, C. , *I. Infect Immun* **1988**, 56, 880.
11. P. M. Giffard, Allen, D. M., Milward, C. P., Simpson, C. L., Jacques, N. A., *J Gen Microbiol* **1993**, 139, 1511.
12. R.R. Russell, *Arch. Oral Biol.*, **1990**, 35, 53S.
13. C. L. Simpson, Giffard, P. M., & Jacques, N. A., *Infect Immun* **1995**, 63, 609.
14. M. M. Vickerman, Clewell, D. B. , *Appl Environ Microbiol* **1997**, 63, 1667.
15. S. Suwannarangsee; C. Moulis; G. Potocki-Veronese; P. Monsan; M. Remaud-Simeon; W. Chulalaksananukul, *FEBS Letters* **2007**, 581, (24), 4675-4680.
16. C. Moulis; G. Vaca Medina; K. A. Boulahya; S. Pizzut-Serin; P. Monsan; M. Remaud-Simeon; G. Potocki-Veronese, *Biocatal. Biotransform.* **2008**, 26, (1-2), 141-151.
17. C. Moulis; A. Arcache; P. C. Escalier; M. Rinaudo; P. Monsan; M. Remaud-Simeon; G. Potocki-Veronese, *FEMS Microbiol. Lett.* **2006**, 261, (2), 203-213.
18. A. Murakawa, T. Mori, Y. Okahata, *Chem. Lett.* **2007**, 36, 312.
19. C. Cle, A. P. Gunning, K. Syson, L. Bowater, R. A. Field, S. Bornemann, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 15234.
20. T. Mori, Asakura, M., Okahata, Y., *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 5701

Real-time monitoring of dextranucrase-based enzymatic reaction through Surface-Enhanced Ellipsometric Contrast (SEEC) microscopy in liquid environment

Amandine M.C. Egea^{*†‡}, Melinda Metivier[§], Philippe Croguennoc[§], Magali Remaud-Simeon /, and Christophe Vieux[†] ||

[†]CNRS, LAAS, 7 avenue du colonel Roche, F-31400 Toulouse, France

[‡]Innopsys, Parc d'Activités Activestre, 31390 Carbonne, France

[§]Nanolane, Parc des Sittelles, 72450 Montfort le Gesnois, France

| Université de Toulouse; INSA, UPS, INP; LISBP, F-31077 Toulouse, France

|| Université de Toulouse ; UPS, INSA, INP, ISAE ; LAAS ; F-31077 Toulouse, France

Keywords: enzyme, microcontact printing, patterning, real-time, SEEC microscopy, dextranucrase

ABSTRACT

In this work, a dynamic enzymatic reaction based on dextransucrase is monitored in real-time and in liquid environment through Surface-Enhanced Ellipsometric Contrast microscopy. This non invasive technique allows *in situ* observations with high lateral spatial resolution and extreme vertical sensitivity, due to the particular substrates involved. These substrates, called Surfs, are the core of Surface-Enhanced Ellipsometric Contrast microscopy. They drastically enhance the sample contrast and enable direct visualization of nanometer thick films down to 0.3 nm. Therefore, *in situ* observations of biomolecules immobilized on a surface become possible in their physiological environment. In this perspective, microcontact printing is used to deposit dextransucrase enzymatic patterns on a thin layer of PLL-g-dextran and the dextransucrase polymerization is characterized for 120 minutes in biocompatible conditions. Quantitative data of the polymer growth on these microscale patterns are obtained with nanometric resolution in thickness. This study opens new paths for understanding the dynamic behavior of confined molecules such as the ones involved in bioengineered surfaces and could be applied for monitoring reactions kinetics.

INTRODUCTION

Surface patterning is a longstanding and interesting topic, widely developed for the past twenty years for providing tunable functionalities to materials through engineering. Functionalizing a substrate is required in many different areas and has become nowadays a common technological step for many biological assays.[1] From the micro to the nanoscale, various techniques were used for biopatterning purposes.[2-4] In a correlated perspective, physical observation tools also have to meet the need for characterizing biochemical molecular layers or interactions. To study kinetic processes taking place on biopatterns, data have to be acquired in real time, which implies that characterization techniques have to be reaction medium-compatible. Moreover, a high lateral spatial resolution and extreme vertical sensitivity are required due to the low quantity of matter involved in these patterned monolayers of molecules. Furthermore, techniques of observation should ideally be non invasive and non destructive for avoiding any interference during the experiments. One may consider that imaging and quantifying at the microscale an enzymatic reaction localized inside patterns of enzyme molecules in real time and in a non invasive way, is still a technological challenge. To our knowledge, real time analysis of an enzymatic saccharide polymerization taking place on a thin layer of molecules attached on a surface has been performed using quartz crystal microbalance (QCM)[5], surface plasmon resonance spectroscopy (SPR)[6] and AFM spectroscopy.[7] However, these methods have not yet proved to be able to characterize adequately micropatterns of molecules and are not suited for observing spatially confined enzymatic reactions as occurring when patterned surfaces are investigated. SPR imaging (SPRi) could be an alternative to monitor kinetics on patterned substrates. Nevertheless, the major limitation of SPRi still lies in sensitivity [8, 9] and makes it difficult to characterize spots with a size lower than 25 μm . In this work, we demonstrate that Surface-Enhanced Ellipsometric Contrast (SEEC) microscopy, in its thickness measuring extension, can be used

for monitoring in real time a dynamic enzymatic reaction occurring in liquid environment and at the nanoscale on patterns of enzyme molecules with a lateral resolution down to 300 nm. We have observed and measured the enzymatic elongation of a dextran chain catalyzed by a dextransucrase from sucrose monomers. Very small quantities of biological matter are detected and instantaneously monitored to provide 3D mapping of the surface.

EXPERIMENTAL SECTION

Characterization technique

Nanometer scale optical images and measurements were obtained from a Sarfus Mapping (Nanolane, France). This equipment included an upright optical microscope equipped for polarization in reflection, specific contrast-enhanced substrates named Surfs, a calibration standard made of nanometric steps and image treatment software (Sarfusoft 2.4). To investigate the enzymatic reaction, we used particular Surfs (top layer SiO₂), named Immersion Surf, appropriate for observations and measurements in liquid.

Dextranucrase-based enzymatic reaction

Dextranucrase (DSR-S), from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F, catalyses the transfer of glucosyl moieties from sucrose to yield a soluble polymer of D-glucosyl units linked by α -1,6 glucosidic linkages called dextran. [10] In the following experiments, we use DSR-S var Δ 4N, which is a truncated form of DSR-S highly specific for the α -1,6 linkage formation.[11] It has been established that glucose (issued from sucrose hydrolysis) or sucrose itself can serve as the first acceptor to initiate polymerization and that elongation of the dextran chains occurs via successive transfers of the glucosyl units at their nonreducing ends (**Figure 1A and 1B**). In addition, DSR-S var Δ 4N was shown to possess a series of amino acid repeats at its C-terminal end, which promotes dextran binding with a dissociation constant K_d close to 10^{-8} M and a k_{off} of $0.001s^{-1}$, testifying a strong binding to glucan.[11] [12] To observe the elongation process catalyzed by dextranucrase molecules, we therefore provide a dextran chip surface.

Microcontact Printing of PLL-g-dextran molecules with a non structured PDMS stamp

A uniform coating of Poly(L-lysine)-*graft*-dextran (PLL-g-dextran) molecules is deposited by microcontact printing (μ CP) on the Immersion Surf.

The PLL(20kDa)-*g*[3-4]-dextran(5kDa) molecules used in the following experiments are purchased in powder form at Susos, Switzerland. A solution of NaAc (pH 5,8) is added to the powder and the solution of polymer (100 μ g/mL) is stored at -20°C before the experiments.

The substrate (Immersion Surf) is previously cleaned in an isopropanol ultrasonic bath and a deionized water ultrasonic bath (35 kHz, 5 min, room temperature) and then activated by a plasma O₂ treatment (Teplas, 800 W - 5 min) (**Figure 1C**). [13]

The μ CP procedure consists in generating a silicon master by UV-photolithography on positive resist (AZ1529) and Reactive Ion Etching (RIE) of silicon. [14] [15-19] To enable simple demolding of this master, an anti-adhesive treatment is carried out by a well established process using OTS (octadecyltrichlorosilane) in liquid phase. A mixture of Polydimethyl-siloxane (PDMS) polymer, named Sylgard 184 (from Dow Corning, USA) and composed of 10 to 1 in mass ratio of PDMS oligomers and a curing agent, is then deposited on the silicon master. Cross-linking was performed at 60°C during 24 hours to obtain a PDMS stamp.

In the first set of experiments, the silicon master is a flat unprocessed wafer and the PDMS stamp molded on it does not exhibit any topographical patterns at its surface. [20] The PLL-g-dextran solution (100 μ g/mL in NaAc, pH 5,8) is pipetted and incubated on the top of the flat PDMS stamp during 2 min 30. The stamp is then dried under nitrogen flow and brought in contact for 2 min (contact time) with the Surf. PLL-g-dextran molecules have a specific structure composed of graft copolymers with dextran side chains onto a poly(L-lysine)

backbone. [21, 22] The positively charged poly(L-lysine) backbone ensures the adsorption of the molecule on the negatively charged Surf through electrostatic interactions and confers a robust attachment on the surface. The Dextran group is mainly oriented up, facing eventual additional molecules and can thus interact with the glucan binding domain of DSR-S. [11, 23] At this point, we have generated a thin PLL-g-dextran coating on the cleaned Immersion Surf (**Figure 1D**).

Microcontact Printing of dextranucrase patterns on the PLL-g-dextran coating

Next step of our experiment consists in generating micron-scale patterns of dextranucrase enzyme over the PLL-g-dextran coated Surf through μ CP. The enzyme solution is pipetted and incubated on the top of a patterned PDMS stamp during 2 min 30 sec. The PDMS stamp used in these experiments exhibits very simple geometric features of 5 μ m wide spots at a 10 μ m pitch. The inked stamp is then dried under nitrogen flow and brought in contact for 2 min with the previous dextran coated substrate. During this printing time, DSR-S molecules are gently transferred from the PDMS stamp to the substrate following the patterns designed on the stamp (**Figure 1E**). At the end of this process, we have generated a patterned microarray of DSR-S spots onto a dextran chip surface based on PLL-g-dextran molecules, suitable for investigating the biochemical activity of these patterns by SEEC microscopy (**Figure 1F**). The sample was placed in liquid environment, composed of a NaAc buffer with sucrose (mixture of 50mM NaAc solution, pH=5.8, with sucrose at a concentration of 50 g/L). Sucrose is used as the glucosyl donor and supplies the polymerization material (**Figure 1G**). In-situ SEEC microscopy monitoring was performed to observe and quantify the elongation of the dextran chains (**Figure 1H**).

RESULTS AND DISCUSSION

SEEC microscopy is a recent wide-field optical technique developed by Ausserré and Valignat [24] [25] that increases the sensitivity of conventional optical microscopes through the use of a new generation of microscope slides. These substrates, called Surfs, are the core of SEEC microscopy. They drastically enhance the sample contrast and allow direct visualization of nanometer thick films down to 0.3 nm. In addition to real-time observations, topographic images of the sample can be obtained by colorimetric correlation between the analyzed sample and a calibration standard composed of nanometric steps ranging from 1 nm to 60 nm in thickness. Studies in dry state of different kind of nanometer thick films or nano-objects were recently carried out by SEEC microscopy such as proteins biochips[26], peptides patterning[27, 28], lipid multilayers[29, 30], nanofluids[31], polyelectrolytes[32] and graphene sheets[33]. An Octadecyltrichlorosilane (OTS) pattern characterized through SEEC microscopy is published as supporting information to provide an example of measurement in liquid environment. **Figure 2A** shows the experimental visualization and measurement setup used in this study. Experiments were conducted with a 63x water immersed objective exhibiting a numerical aperture of 1.0. To observe the sample, we focused on the surface and we look straightforward at regions of interest (ROIs) like for any conventional microscopy techniques. To perform thickness measurements of the sample, an image of the calibration standard (**Figure 2B**) and an image of the sample were acquired exactly in the same illumination conditions in order to make a colorimetric correlation. Hence, calibration curves (**Figure 2C**) permit to assign each color of the sample to a particular thickness with an accuracy of ± 0.4 nm.

Restricting enzyme localization to well-defined areas by using μ CP considerably simplifies the observation and enables us to measure the enzyme activity over the produced patterns. Approximately 15 minutes passed before the beginning of the analysis. Before in-situ

monitoring, basic optical settings were performed to optimize the conditions of imaging. This time lapse was necessary for positioning the sample and the calibration standard on the microscope. We chose to focus on an arbitrarily defined zone of the sample to observe the enzymatic elongation of dextran catalyzed by DSR-S from sucrose substrate (suppliers of glucosyl monomers of dextran). **Figure 3A** displays a typical optical image obtained by SEEC microscopy that can be directly observed through the microscope eyepieces. This 20 x 40 μm zone of interest selected on the Immersion Surf covered by DSR-S patterns was observed 15 minutes after the beginning of the enzymatic reaction. Many zones of this type could be found on the sample surface allowing statistical analysis to be performed on a large population of surface patterns. **Figure 3B** exhibits the topographic map of the Figure 3A. Thanks to SEEC microscopy, all the matter present on the surface can clearly be observed. In the collected image, the spots of DSR-S molecules appear well defined and with clear edges during the whole recording of the enzymatic reaction. The size of each enzymatic spot (5 μm) corresponds very well to the dimension of the PDMS patterns showing the good transfer of the enzyme molecules on the PLL-g-dextran layer and the spatial confinement of the surface reaction on these patterns. Small aggregates of enzyme molecules can be discerned inside the spots and reach few nanometers in thickness. This observation indicates that the PLL-g-dextran coating, measuring between 3 to 5 nm high, was fully transferred on the glass slide. Every 15 minutes, an optical image of the sample and the standard calibration was taken at the same microscope settings. Each sample raw image was calibrated with its calibration standard image. We have characterized the enzymatic reaction for 120 minutes in liquid environment without any extra addition of buffer. The sucrose present in the NaAc buffer was in large excess [6] allowing us to considerate that this parameter is not as a limiting factor of the polymerization reaction. **Figure 3C** shows the same region of interest after 120 minutes of enzymatic reaction. The matter localized on the spots of enzymes has clearly increased as shown by the color scale. A 10 nm expansion of matter is approximately detected within the

spots of enzyme, describing an obvious molecular elongation process. However, the enzyme spots did not get any wider as their average diameter of 5 μm was kept constant. Through the comparison of the same area after 15 minutes and after 120 minutes of monitoring, we observe a visual growth of matter localized on the enzyme patterns. Over large areas of the sample surface, we have observed that all the printed patterns exhibited clear polymerization of material at their surface. Although PLL-g-dextran molecules are well known in the literature for their efficient anti fouling properties,[21] [34-37]the background of the sample seems to adsorb few aggregates of matter, reaching 1 or 2 nm high. This information can easily be interpreted as this observation occurs in static conditions. Indeed, any flow of buffer was injected during the 120 minutes of monitoring and contributes to this low non specific adsorption of particles present in solution on the surface. Considering the low height growth of the background (1 to 2 nm high), we thus clearly interpret the progressive thickening of the enzymatic patterns as a signature of the polymerization of sucrose monomers by the enzyme and not from adsorption of extra molecules present in the medium. 3D representations of patterns delimited by the dashed line are displayed in **Figure 3D** and **Figure 3E**. The 3D comparison of the same area at the beginning of the monitoring and at the end confirms a visual growth of the enzymatic spots. The growth of matter due to the polymerization is investigated through cross section profiles, as displayed on **Figure 3F**. The height of the patterns along a 20 μm cross section is plotted at the beginning of the monitoring ($t = 15 \text{ min}$) and at the end ($t = 120 \text{ min}$). The dimensional control offered by SEEC microscopy shows well-defined areas of active enzymatic reaction. A succession of 5 μm diameter spots of enzyme spaced by 5 μm zone of flat PLL-g-dextran is discernible on the 2 cross sections. In terms of thickness, some selective transfer of matter from the solution to the patterns can be detected thanks to the profile corresponding to the beginning of the monitoring. The spots of enzyme, as observed 15 minutes after μCP , are less than 15 nm high. At $t = 120 \text{ minutes}$, a

significant growth of matter is visible on the profile. The enzyme spots increased their average thickness up to 10 nm with a maximum value of 26 nm.

In the following, precise quantifications of the elongations of the dextran chains will be detailed. Thickness measurements of the polymerizing DSR-S was studied on a processing window of 15 μm x 100 μm containing 10 selected spots features. Topographical data on the time evolution of each pixel of this zone were processed. To focus on the enzyme polymerization, pixels corresponding to the background were excluded to the data treatment; exclusively pixels corresponding to the 10 spots of enzyme molecules were considered. This treatment is fully justified because we have previously observed that the enzymatic surface reaction is really spatially confined on the printed enzyme patterns in these engineered surfaces. **Figure 4** exhibits some histograms of the monitored thickness values. We observe a distribution of the molecular heights present on the surface, displayed by classes of 0.5 nm. On the 8 charts, the frequency (in % of occurrence) is plotted on the vertical axis, for each class of height: from 0 nm to 30 nm height. After 15 minutes of monitoring, the repartition of the matter present on the surface is very clear. In terms of thickness, the major part of pixels is recorded under 10 nm with a quasi constant frequency of 4%. Few of them are localized from 10 to 15 nm. At this stage, we cannot argue if this topography is the direct result of the μCP process or if some polymerization has been already initiated. From a global point of view, the thickness distributions are practically identical from the beginning of the enzymatic reaction ($t=15\text{min}$) to one hour later ($t=60\text{ min}$). Histograms displayed barely reach 15 nm in maximum height and the frequency recorded is close to 4%. A small change of distribution appears at $t=45\text{ min}$ for the very low height values. Pixels from 0 to 2 nm tend to be recorded at higher frequency (increase of frequency from 4% to maximum 10%). It seems to describe a beginning of activity. Small aggregates begin to grow due to the initiated polymerization process. Except this punctual signature of activity, until 60 minutes of monitoring, distributions are predominantly the same. However, at $t=75\text{ min}$, we observe a small but

recognizable change in the height profile, that can only be attributed to a polymerization process. The maximum thickness value recorded reaches 20 nm. A clear shift of distribution is observed, with a high concentration of pixels around 8 to 10 nm. At t=90min, this shift of distribution is confirmed as shown by the transition of the maximum height value from 20 to 23 nm. Many pixels are recorded from 12 to 18nm and we observe a widening of the distribution, suggesting a significant enzyme activity. At t = 105 min, the same behavior is observed. Thickness distributions shift like a constant growing front. This information clearly reveals a growth of matter on the surface. At the end of the monitoring (t=120min), the distribution has shifted to higher values (maximum height value from 23 nm to 24 nm). All classes from 12 nm to 24 nm have increased in term of frequency showing an active behavior of the enzymes present on the surface. This observation proves that the first polymers created by the enzymes kept on growing in a very constant way since 60 minutes of monitoring to the end of the enzymatic reaction. Vertical growth due to the dextransucrase activity is observed but it is noticeable that there is no lateral expansion of the patterns. This phenomenon is likely to be due to interactions between dextransucrase and its polymer product that would be mediated by the glucan binding domain.[38] [11] Indeed, the DSR-S varde14N glucan -binding domain, which was defined as a series of amino acid repeated at its C-terminal end, promotes a considerable dextran binding. This domain avoids dextransucrase diffusion through the solution and seems to contain the lateral polymer growth. [12] **Figure 5** displays a recapitulative graph of the pixel thickness during the 120 minutes of monitoring. Over the total pixel population (100%), two classes are plotted. The first class represents pixel thickness from 0 to 10 nm. The second class represents pixel thickness from 10 to 25 nm. The class population is represented in percentage over the total pixel population, during the 120 minutes of polymerization monitoring. At 15minutes after the beginning of the experiment, the thickness of more than 40 % of the pixel population is recorded between 0 to 10nm. Only 20 % of pixels reach 10 to 25 nm. For the following 50 minutes, we observed a slow

population inversion of these two classes. The 0-10 nm population slightly decreased whereas the 10-25 nm class slowly increased. Just before 80 minutes of polymerization, the population inversion occurs: pixels reaching 10 to 25 nm are more frequent than pixels reaching 0 to 10 nm. This information reveals that a clear polymerization process is engaged within the enzyme patterns. The 10-25 nm thickness class keeps on growing and at the end of the experiment, roughly 50 % of the pixel population is included in this category. Only 20% of pixels reach 0 to 10 nm. This figure underlines the active polymerization behavior of the dextransucrase patterns.

CONCLUSION

We have shown that SEEC microscopy is compatible with the *in situ* and real-time monitoring of biochemical reactions taking place on surface molecular patterns. We monitored a dextransucrase polymerization for 120 minutes in physiological conditions. Beyond the kinetics conclusions that could be done on dextransucrase activity, this study reveals a vertical polymerization behavior. Lateral growth is contained. The confined enzymes have such a strong binding to the dextran surface that lateral diffusion is avoided. We strongly suggest that confined molecular reactions involving strong ligand attachment process have a dynamic behavior which is different from molecules in solution.

Furthermore, thanks to the extreme sensitivity of SEEC microscopy, straightforward observations of patterned biomolecules in their physiological environment become possible. Protein interactions, DNA hybridizations and other biochemical events can from now on, be studied and monitored without any labeling. This fully non-contact, non-invasive and non-destructive, technique avoids sample damage and reaction disturbances. Shortcomings of other widely used techniques such as fluorescence photobleaching or atomic force microscopy (AFM) should be overpassed. We believe that SEEC microscopy solves a major bottleneck in real time monitoring of biochemical processes allowing surface patterns to be observed.

Without interfering with the reaction, the recording of a film made up of a collection of quickly acquired snapshots opens up a way to carry out dynamics studies with access to the reaction kinetics. On top of that, the added possibility of turning a 2D image into a 3D map through thickness measurement qualifies extended SEEC microscopy as a powerful nanometrological tool. In addition, SEEC measurements were performed with an immersed objective with a magnification of 63x and a numerical aperture of 1.0. Therefore, the region studied through the microscope and the camera corresponds to an area of 160 μm x 120 μm . The crucial point of quantitative SEEC microscopy is that the vertical sensitivity is not objective magnification-dependent. In other words, one will get the same nanometric sensitivity whether the magnification be 40x or 20x. Thus image size could achieve 500 μm x 380 μm and allow the study of more than 1 000 spots in only one snap shot (acquisition time lower than 67 ms).

This technique should bring new information for understanding surface phenomena occurring on micropatterned surfaces in liquid environment: molecular specific interactions and enzymatic reactions such as polymerization or proteolysis. SEEC microscopy opens an interesting methodology for characterizing in a non invasive way and under physiological conditions multi-functionalized engineered surfaces such as those involved in advanced biochips and biosensors technologies.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information available

Complementary measurements of an Octadecyltrichlorosilane (OTS) thin layer in liquid environment

This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Amandine M.C. Egea, e-mail: aegea@laas.fr

Contributions

A.E. conceived the experiments and prepared biomolecular coatings and patterns. A.E. and M.M. monitored the experiments and analyzed the data. A.E, M.M, P.C and C.V wrote the manuscript.

ACKNOWLEDGMENT

We thank the UMR5504, UMR792 Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés for providing the biological material of these experiments, particularly Laurence Tarquis and the clean room facility of LAAS-CNRS for the fabrication of silicon molds used for the printing process.

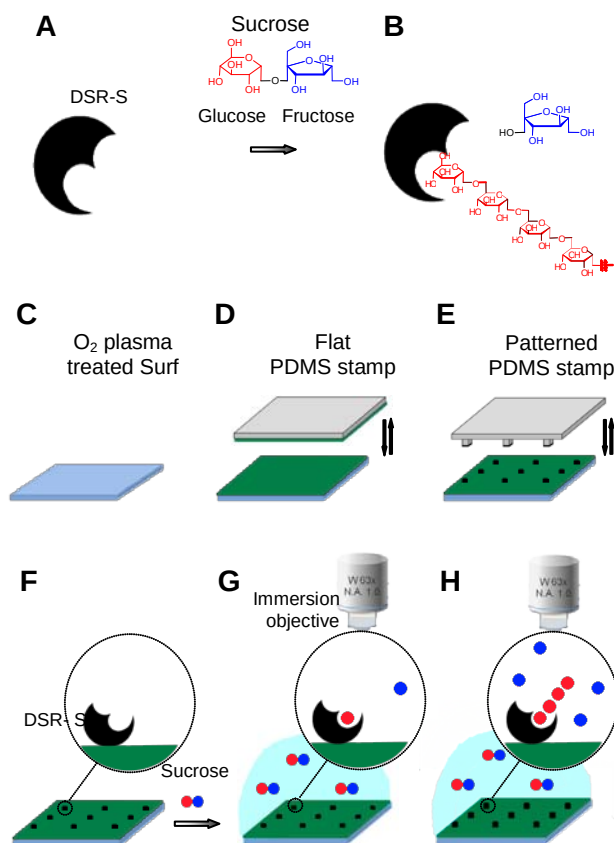


Figure 1. (A) (B) Illustrations of the elongation of the dextran chains occurring via successive tranfers of the glucosyl units at their nonreducing ends. (C) Process of sample fabrication based on a Immersion Surf activated by O₂ plasma treatment on which (D) a coating of PLL-g-dextran molecules was deposited through μ CP with a flat PDMS stamp. (E) Patterns of Dextranucrase (DSR-S) were printed onto the dextran coated surface with a structured PDMS stamp to provide patterns of enzyme molecules. (F) The sample was placed on a Petri dish, in liquid environment to monitor the elongation process through SEEC microscopy. Buffer: NaAc enriched with sucrose (140mM) (G) dextrane, glucose or sucrose itself can serve as the first acceptor to initiate polymerization [10] (H) SEEC microscopy was performed in liquid environment to observe the elongation of dextran catalyzed by DSR-S in the presence of sucrose monomers for 120 minutes.

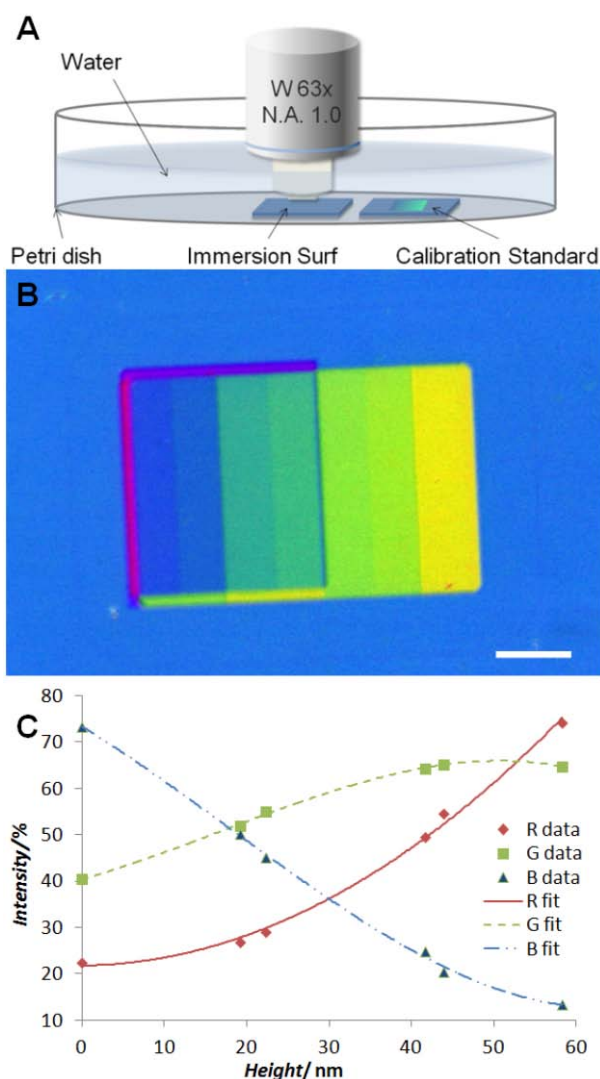


Figure 2. (A) Schematic illustration of the experimental setup. Sample and calibration standard both immersed in liquid and observed with a water immersed objective. (B) Calibration standard without image treatment (as seen through the ocular). Scale bar 20 μm . (C) Calibration curves showing the thickness dependence of calibration standard color obtained at room temperature (22°C). R : Red, B : Blue, G : Green, corresponds to the color camera components.

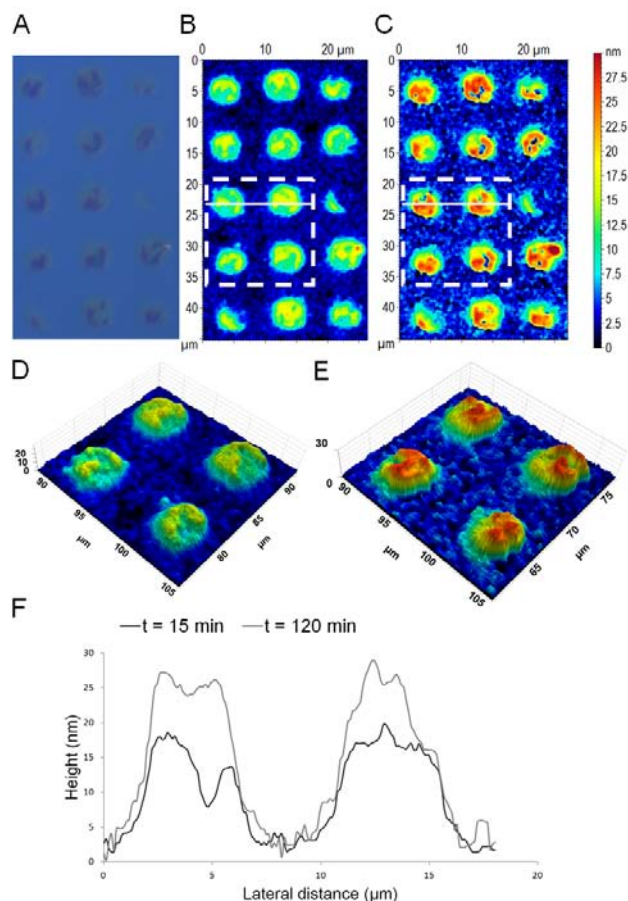


Figure 3. Patterned microarray of 5µm x 5 µm enzymatic spots onto a thin layer of PLL-g-dextran molecules observed after 15 minutes of enzymatic reaction, through: (A) SEEC microscopy (scale bar 20 µm) (B) SEEC topographic acquisition. (C) Same zone observed after 120 minutes of enzymatic reaction through SEEC topographic acquisition. (D) 3D representation of the area delimited by the dashed line of image B. (E) 3D representation of the area delimited by the dashed line of image C. (F) Height profiles of two adjacent patterns after 15 and 120 minutes of enzymatic reaction.

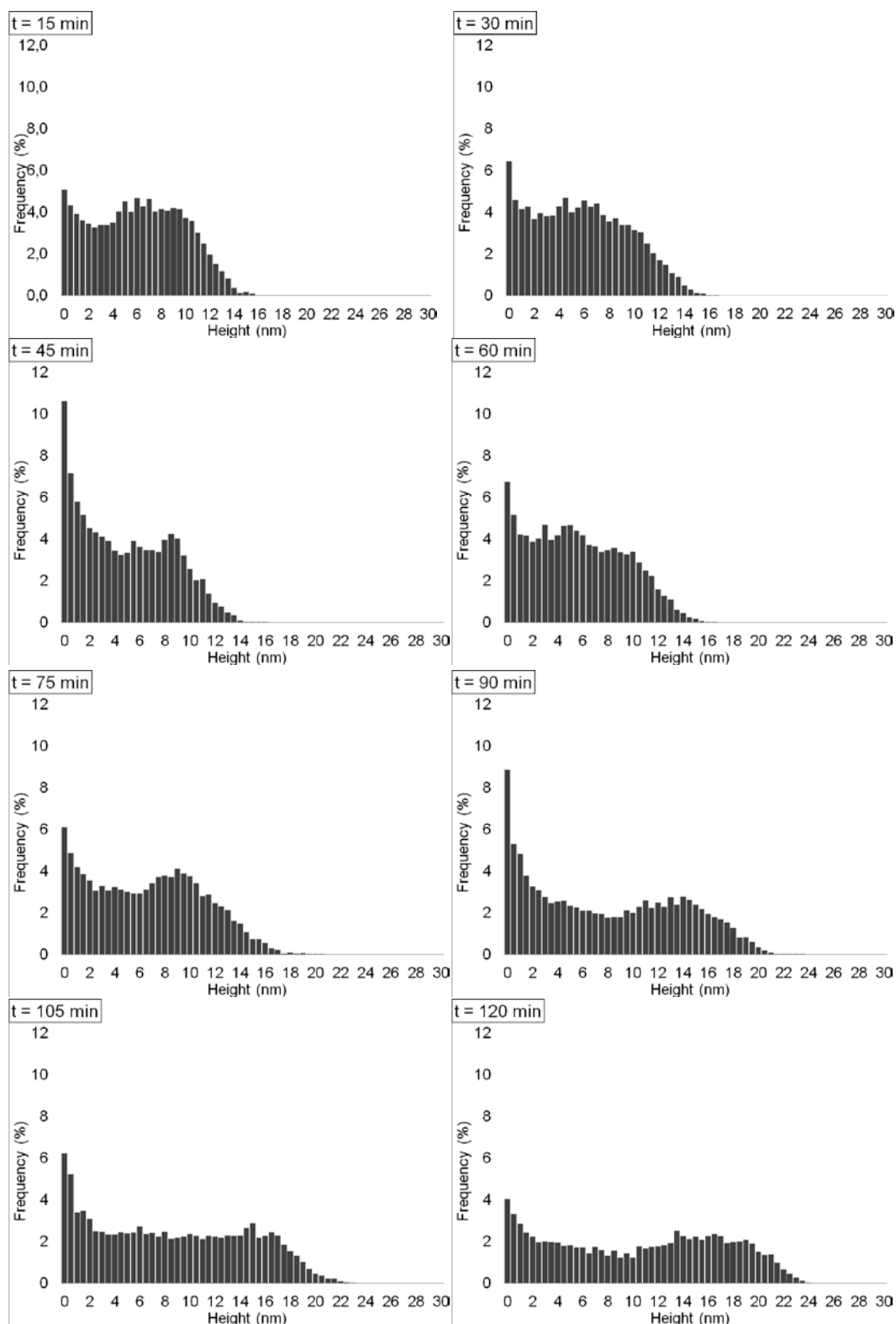


Figure 4. Height histograms from SEEC microscopy images along a 15 x 100 μm region of interest. The background of the sample, i.e. the PLL-g-dextran layer is excluded, only the 10 spots features of enzyme are considered in this analysis thus showing the enzymatic reaction confined on the molecular patterns.

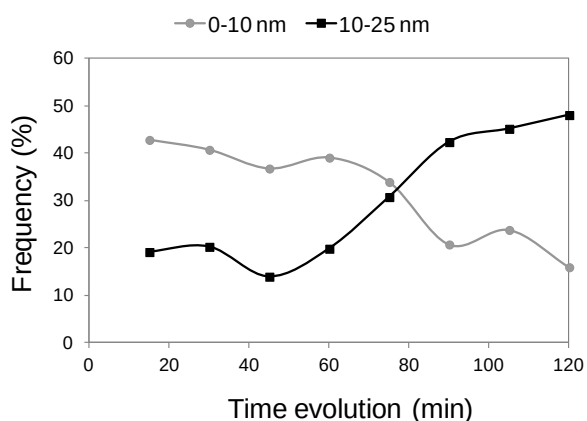
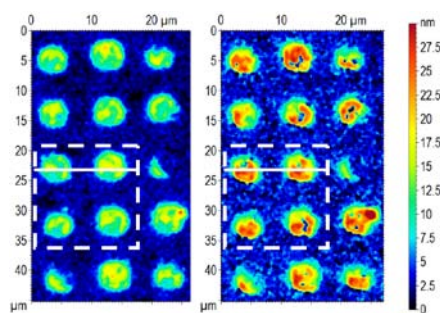


Figure 5. Time evolution of two thickness classes: pixels from 0 to 10 nm and pixels from 10 to 25 nm.

Table of contents only

TOC graphic



- [1] X. Zhou, F. Boey, F. Huo, L. Huang, H. Zhang, *Small* **2011**, 7, 2273.
- [2] Y. Xia, M. Mrksich, E. Kim, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 9576.
- [3] R. J. Jackman, J. L. Wilbur, G. M. Whitesides, *Science* **1995**, 269, 664.
- [4] J. L. Wilbur, A. Kumar, E. Kim, G. M. Whitesides, *Adv. Mater.* **1994**, 6, 600.
- [5] A. Murakawa, T. Mori, Y. Okahata, *Chem. Lett.* **2007**, 36, 312.
- [6] C. Cle, A. P. Gunning, K. Syson, L. Bowater, R. A. Field, S. Bornemann, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 15234.
- [7] T. Mori, Asakura, M., Okahata, Y., *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 5701.
- [8] L. C. Malic, Bo; Tabrizian, Maryam; Veres, Teodor, *Optics Express* **2009**, 17, 20386.
- [9] C. L. C. Wong, George Chung Kit; Ng, Beng Koon; Agarwal, Shuchi; Lin, Zhiping; Chen, Peng; Ho, Ho Pui, *Optics Express* **2011**, 19, 18965.

- [10] C. Moulis, Joucla, G., Harrison, D., Fabre, E., Potocki-Veronese, G., Monsan, P., Remaud-Simeon, M., *J.Biol.Chem.* **2006**, *281*, 31254.
- [11] S. Suwannarangsee, C. Moulis, G. Potocki-Veronese, P. Monsan, M. Remaud-Simeon, W. Chulalaksananukul, *FEBS Letters* **2007**, *581*, 4675.
- [12] T. Nihira, Mori, T., Asakura, M., Okahata, Y., *Langmuir* **2011**, *27*, 2107.
- [13] F. Rossi, P. Colpo, *Surface Modifications and Functionalization of Materials for Biomedical Applications* **2010**, 252.
- [14] A. Bernard, E. Delamarche, H. Schmid, B. Michel, H. R. Bosshard, H. Biebuyck, *Langmuir* **1998**, *14*, 2225.
- [15] A. Kumar, G. M. Whitesides, *Appl. Phys. Lett.* **1993**, *63*, 2002.
- [16] Y. Xia, G. M. Whitesides, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1998**, *37*, 551.
- [17] Y. Xia, G. M. Whitesides, *Annu. Rev. Mater. Sci.* **1998**, *28*, 153.
- [18] E. Delamarche, A. Bernard, H. Schmid, B. Michel, H. Biebuyck, *Science* **1997**, *276*, 779.
- [19] X.-M. Zhao, Y. Xia, G. M. Whitesides, *J. Mater. Chem.* **1997**, *7*, 1069.
- [20] C. Thibault, C. Severac, A.-F. Mingotaud, C. Vieu, M. Mauzac, *Langmuir* **2007**, *23*, 10706.
- [21] C. Perrino, S. Lee, S. W. Choi, A. Maruyama, N. D. Spencer, *Langmuir* **2008**, *24*, 8850.
- [22] C. Perrino, S. Lee, N. Spencer, *Tribol. Lett.* **2009**, *33*, 83.
- [23] K. J. Rosenberg, T. Goren, R. Crockett, N. D. Spencer, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2011**, *3*, 3020.
- [24] D. Ausserre, M. P. Valignat, *Optics express* **2007**, *15*, 8329.
- [25] D. Ausserre, M. P. Valignat, *Nano Lett.* **2006**, *6*, 1384.
- [26] J. Monot, M. Petit, S. M. Lane, I. Guisle, J. Léger, C. Tellier, D. R. Talham, B. B., *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 6243.
- [27] O. Carion, V. Souplet, C. Olivier, C. Maillet, N. Medard, O. El-Mahdi, J. O. Durand, M. O., *ChemBioChem* **2007**, *8*, 315.
- [28] V. Souplet, R. Desmet, M. M., *J.Pept. Sci.* **2007**, *13*, 451.
- [29] M. Hirtz, Corso, R.; Sekula-Neuner, S.; Fuchs, H., *Langmuir* **2011**, *27*, 11605.
- [30] O. A. Nafday, T. W. Lowry , S. Lenhert, *Small* **2012**, *8*, 1021.
- [31] E. Pauliac-Vaujour, A. Stannard, C. P. Martin, M. O. Blunt, I. Notingher, M. P. J., *Phys. Rev. Lett.* **2008**, *100*, 176102.

- [32] M. Lefort, F. Boulmedais, L. Jierry, E. Gonthier, J. C. Voegel, J. Hemmerle, P. Lavalle, A. Ponche, S. P., *Langmuir* **2011**, 27, 4653.
- [33] C. Valles, C. Drummond, H. Saadaoui, C. A. Furtado, M. He, O. Roubeau, L. Ortolani, M. Monthieux, A. Penicaud, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 15802.
- [34] S. Martwiset, A. E. Koh, W. Chen, *Langmuir* **2006**, 22, 8192.
- [35] N. B. Holland, Y. Qiu, M. Ruegsegger, R. E. Marchant, *Nature* **1998**, 392, 799.
- [36] Y. Qiu, R. E. Marchant, *Trans. Soc. Biomater.* **1997**, 20, 224.
- [37] E. Osterberg, K. Bergström, K. Holmberg, T. P. Schuman, J. A. Riggs, N. L. Burns, V. A. J. M., J. M. Harris, *J. Biomed. Mater. Res.* **1995**, 29, 741.
- [38] V. Monchois, Lakey, J. H., Russell, R. R. *FEMS Microbiol. Lett.* 177, 243, *FEMS Microbiol. Lett.* **1999**, 177, 243.

CHAPITRE 5 :	119
BIODETECTION OPTIQUE SANS MARQUAGE BASEE SUR LA DIFFRACTION	119
I/ LE PHENOMENE DE DIFFRACTION ET SON UTILISATION EN BIODETECTION	120
1. INTRODUCTION	120
a. Diffraction par une fente	121
b. Diffraction à travers N fentes	123
2. DEVELOPPEMENT DE TECHNIQUES DE DETECTION BASEES SUR LA DIFFRACTION	125
a. Principe d'utilisation	125
b. Mise en place du système de détection	126
c. Application à la biodétection	127
i. Principe	127
ii. Détection multiple	128
iii. Interaction idéale - Interaction réelle	128
3. ETAT DE L'ART SUR L'UTILISATION DE LA DIFFRACTION	131
a. Biodétection	131
b. pHmètre	134
c. Multicouches lipidiques	134
d. Capteurs de gaz	135
4. CONTEXTE ET ENJEUX	137
II/ OUTILS DE LECTURE DEVELOPPES POUR CAPTER UNE INTENSITE DE DIFFRACTION	138
1. PREUVE DE CONCEPT EN LABORATOIRE	138
a. Présentation du banc de mesure	138
b. Applications	139
2. TRANSFERT INDUSTRIEL DU CONCEPT VERS UN SCANNER AUTOMATISE	141
a. Chaîne de développement	141
b. Cahier des charges	142
c. Choix techniques	143
i. Description générale	143
ii. Système optique	144
iii. Degrés de liberté	146
iv. Traitement du signal	149
v. Influence du diamètre du faisceau laser	154
vi. Reproductibilité	156
vii. Récapitulatif	162
d. Applications	162
III/ VALIDATIONS EXPERIMENTALES	163
1. ETUDE DES PARAMETRES INFLUANT SUR L'INTENSITE DIFFRACTEE	163
a. Influence de la concentration de la solution d'encrage	163
b. Influence des lavages	165
c. Influence de la chimie de surface	167
2. BIODETECTION D'INTERACTIONS PROTEINES/PROTEINES	171
3. BIODETECTION D'INTERACTIONS ADN/ADN	174
a. Concept de fabrication	174
b. Fabrication de biopuce diffractante	176
c. Détection d'une hybridation simulée	177
d. Détection d'une hybridation réelle	180

IV/ REFLEXION SUR LA BIODETECTION PAR DIFFRACTION.....	183
1. AMELIORATION DU TRAITEMENT DES IMAGES	183
2. FABRICATION DES RESEAUX	183
3. AMELIORATION DES CONDITIONS D'INTERACTION	184
4. INFLUENCE DE LA CHIMIE DE SURFACE ET DE LA PASSIVATION.....	184
5. CONCLUSIONS	185
REFERENCES	186

CHAPITRE 5 :

Biodétection optique sans marquage basée sur la diffraction

Une large gamme de biocapteurs a vu le jour ces dernières années. Le développement des techniques de micro et nanofabrication a permis d'apporter les moyens nécessaires à la réalisation de tels dispositifs. La traduction de l'information biologique en signal quantifiable est basée sur des principes physiques variés (électrique, mécanique, optique ...). Il est possible de différencier deux catégories de techniques de biodétection : les techniques dites avec marquage et les techniques dites sans marquage. Les techniques sans marquage présentent l'avantage conséquent de ne pas perturber ou dénaturer l'échantillon pendant le suivi de biodétection. Parmi elles, les techniques de lecture optiques s'avèrent particulièrement avantageuses. Généralement, peu de développements lourds de microfabrication sont nécessaires, comparés par exemple aux techniques de détection mécanique (bioMEMS ...). Depuis plusieurs années, une technique de caractérisations d'interactions biologiques est étudiée au sein du groupe de recherche Nanobiosystèmes du LAAS. Cette technique de biodétection optique sans marquage est basée sur la diffraction de la lumière par des réseaux périodiques moléculaires.

Le développement d'un biocapteur englobe plusieurs étapes indispensables au bon déroulement d'un essai de biodétection. La mise au point des substrats moléculaires constitue un passage délicat mais nécessaire pour fixer les molécules biochimiques sur un échantillon. Ces sondes, de nature variée, sont choisies pour leur affinité avec l'espèce à détecter. La chimie de surface présente sur l'échantillon est primordiale pour immobiliser les entités biologiques à la surface du substrat, sans les dénaturer et en conservant leur activité biologique. La chimie de surface permet aussi de limiter les interactions non-spécifiques qui pourraient se produire sur l'échantillon. Une fois que le substrat a été mis au point, les essais de biodétection peuvent commencer afin de tester les capacités de la technique développée.

Dans ce chapitre, nous étudierons le principe physique de la diffraction, sur lequel repose la technique de biodétection développée en amont de cette thèse. Nous détaillerons notamment la contribution lumineuse d'un réseau périodique. Ensuite, nous aborderons l'outil de lecture en diffraction utilisé au préalable. L'un des objectifs de ce travail est de transformer le banc de test en un prototype de lecture semi-industriel. Nous verrons les choix techniques effectués, ainsi que les séries de tests menées sur l'appareil. Enfin, la technique de détection par diffraction sera appliquée expérimentalement à des analyses d'interactions moléculaires, portant sur des biopuces à protéines et des biopuces à ADN.

I/ Le phénomène de diffraction et son utilisation en biodétection

Dans cette partie, nous souhaitons introduire et revoir brièvement la théorie portant sur la diffraction afin d'analyser les principaux paramètres ayant un impact sur le signal mesuré.

1. Introduction

La diffraction est un phénomène omniprésent que l'on peut observer quotidiennement autour de nous. Lorsqu'une onde rencontre un obstacle qui ne lui est pas complètement transparent, une partie de l'onde est transmise au travers de cet obstacle. L'onde se propage alors au travers de l'ouverture qui limite sa progression et la diaphragme, sans modifier sa nature. Si la dimension de l'ouverture est grande par rapport à la longueur d'onde incidente, on voit apparaître un phénomène appelé diffraction. L'ouverture se comporte alors comme une source secondaire d'émission de l'onde.

Ce phénomène fut mis en évidence par Grimaldi en 1665, qui en observant le rayonnement du soleil au travers d'un trou circulaire présent sur un volet, décréta que la lumière ne se propage pas seulement suivant les modes direct, réfracté et réfléchi, mais aussi suivant un quatrième : la diffraction. La diffraction fut ensuite étudiée et interprétée au cours du XVIII^{ème} et XIX^{ème} siècle entre autre par Huygens, Fresnel, Fraunhofer et Young qui mirent en évidence la nature ondulatoire de la lumière en opposition à Newton et sa théorie corpusculaire.

La diffraction ne concerne pas que la lumière. Ce phénomène est observé pour la propagation d'ondes acoustiques. Au travers d'une porte, le son ne se propage pas de façon rectiligne mais il est diffracté lorsque l'entrebâillement de la porte est bien plus grand que la longueur d'onde des ondes acoustiques.

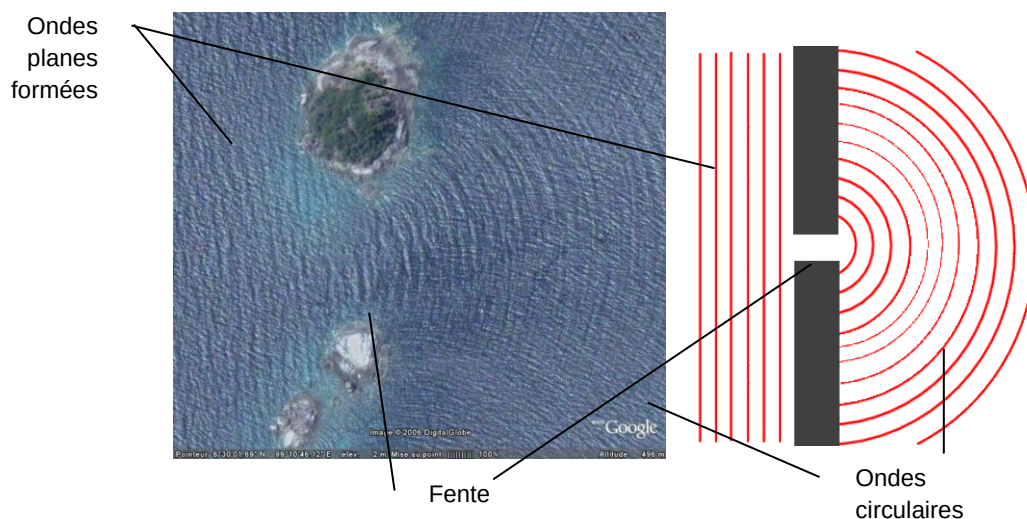


Figure 1 : Phénomène naturel de diffraction d'ondes mécaniques formées par la houle des vagues par une fente

De même, la diffraction peut s'observer à la surface de l'eau. Lorsque les vagues déferlent sur la plage, si elles rencontrent un obstacle assimilable à une fente les ondes mécaniques progressives

périodiques formées par la houle sont diffractées. La *Figure 1* illustre ce phénomène. Après le passage d'une fente de dimension égale à sa longueur d'onde, l'onde plane se transforme en onde circulaire.

Dans cette partie, nous analyserons la contribution lumineuse d'un réseau périodique éclairé par un faisceau incident monochromatique. Dans un premier temps, nous nous placerons dans un cas simple de diffraction à travers une fente unique éclairée en transmission. Nous détaillerons ensuite le cas plus complexe de diffraction à travers un réseau de N fentes sollicitées en transmission. Cette situation nous permettra de connaître la contribution diffractive d'un réseau périodique, qui peut être assimilé à un réseau de N fentes.

a. Diffraction par une fente

On considère une fente de largeur a et de longueur l (avec $l \gg a$), placée à une distance D d'un écran (*Figure 2*). Si cette distance est assez grande, on peut considérer que l'écran est situé à l'infini. Nous sommes dans les conditions de diffraction dites de Fraunhofer (ou champ lointain), les rayons qui arrivent sur l'écran sont considérés comme parallèles. Il est aussi possible de positionner l'écran dans le plan focal image d'une lentille convergente pour être dans les mêmes conditions. Lorsqu'un rayonnement lumineux de longueur d'onde λ , du même ordre de grandeur que la largeur de la fente, traverse l'ouverture, la lumière est diffractée.

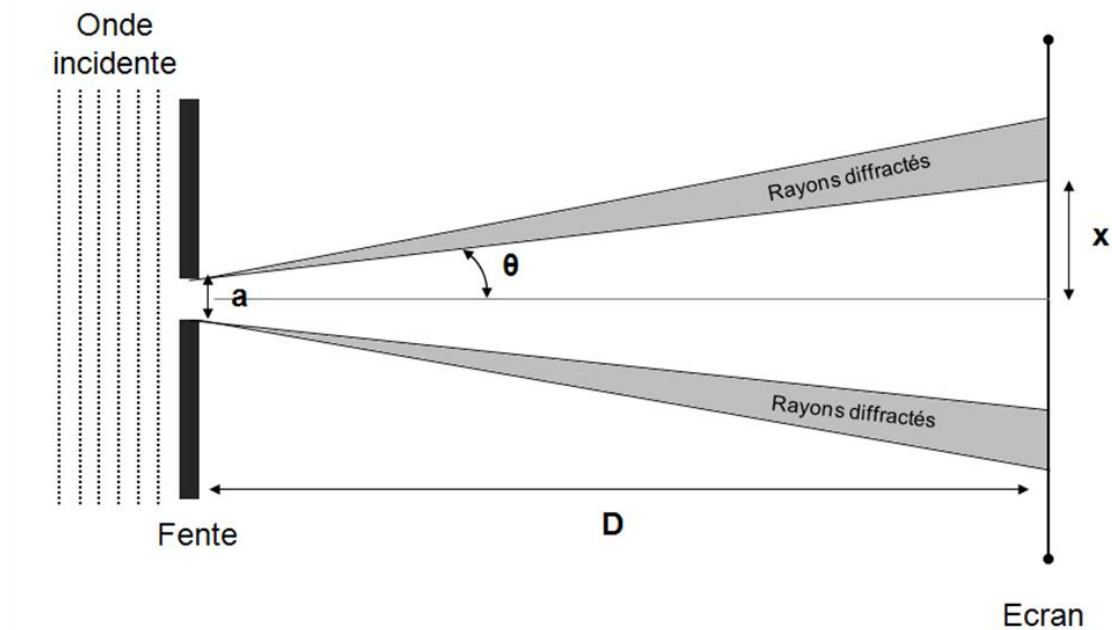


Figure 2 : Schéma de diffraction au travers d'une fente dont la figure de diffraction est observée sur un écran placé à l'infini

L'intensité lumineuse reçue par l'écran dans la direction θ est donnée par la formule suivante :

$$I(\theta) = I_0 \cdot \frac{\sin^2\left(\frac{\pi \cdot a \cdot \sin\theta}{\lambda}\right)}{\left(\frac{\pi \cdot a \cdot \sin\theta}{\lambda}\right)^2}$$

Sur l'écran, l'ensemble des intensités lumineuses reçues, provenant des divers points de la fente forme une figure de diffraction. La *Figure 3* présente la dispersion de la lumière selon l'axe x défini

perpendiculairement à la grande dimension de la fente. L'intensité de chaque point est tracée en fonction de sa position sur l'axe. La figure observée montre un pic central entouré de pics d'intensité moindre. La largeur angulaire de la tâche principale est de $2\lambda/a$. A une longueur d'onde λ et une distance écran/fente D fixes, plus la fente est fine (c'est-à-dire que le terme a est faible), plus la tâche principale est étalée. On voit aussi la présence d'une certaine périodicité dans la dispersion de la lumière sur l'écran. C'est cette périodicité qui compose la figure de diffraction observée.

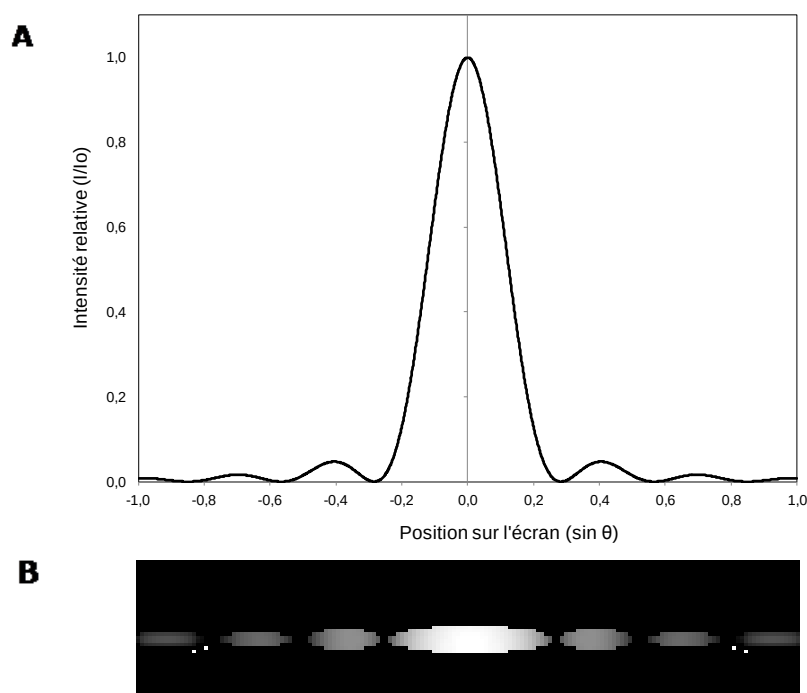


Figure 3 : Intensité lumineuse collectée sur un écran après qu'un rayon lumineux soit diffracté par une fente de longueur infinie par rapport à sa largeur (A) profil optique (B) observation réelle sur l'écran. Pour $D=3m$, $a=60\text{ nm}$, $\lambda = 10\text{ nm}$.

Lorsque la fente constituant l'obstacle est rectangulaire, c'est-à-dire que $l \approx a$, la figure de diffraction est différente. La lumière va être diffractée selon chaque arête de l'obstacle rectangulaire, qui va se comporter comme une source secondaire d'émission. La Figure 4A illustre la figure de diffraction obtenue à travers une fente rectangulaire. Dans le cas où l'obstacle est un trou circulaire, la figure de diffraction est présentée en Figure 4B. C'est une tache d'Airy, composée d'un disque central et de cercles concentriques plus atténués.

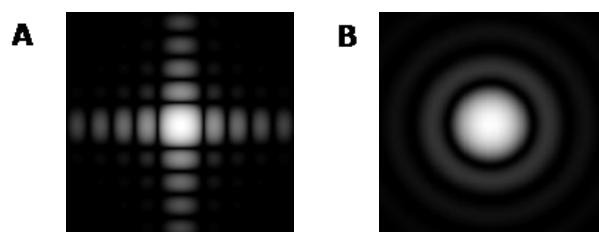


Figure 4 : Figure de diffraction obtenue lorsque l'obstacle est de forme (A) rectangulaire (B) circulaire

b. Diffraction à travers N fentes

La situation se complique dès lors que l'on considère plusieurs fentes. La Figure 5 illustre cette situation. Nous considérons un ensemble de N fentes de largeur a , disposées selon une périodicité nommée p . Un rayonnement lumineux de longueur d'onde λ éclaire en transmission cette structure. Un réseau périodique peut être considéré comme un ensemble de N fentes de largeur a , régulièrement espacées.

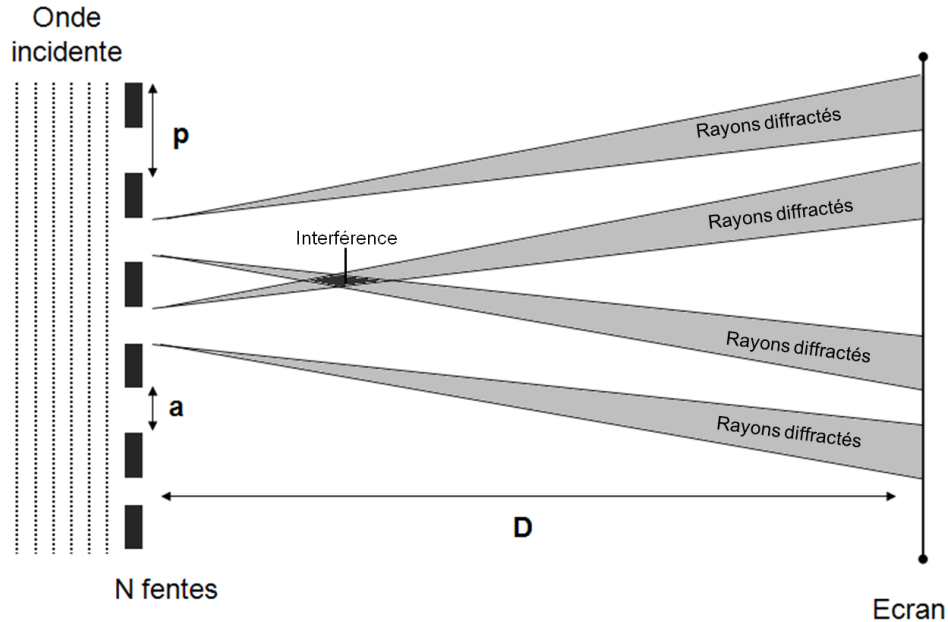


Figure 5 : Schéma de diffraction au travers de N fentes dont la figure de diffraction est observée sur un écran placé à l'infini

Chacune fente va se comporter individuellement comme décrit précédemment. A cela, va se rajouter un phénomène supplémentaire provenant de l'interférence des ondes entre elles. Le principe de Huygens-Fresnel permet de décrire cette situation. Chaque point du front d'onde va se comporter comme une source secondaire et l'onde finale sera le résultat des interférences entre ces sources ponctuelles et cohérentes. Comme les ondes émises par chaque fente parcourent une distance différente jusqu'à l'écran, elles sont déphasées et interfèrent entre elles. Chaque onde est déphasée de ϕ par rapport à la fente centrale. Ce déphasage est le suivant : $\phi = \frac{2\pi}{\lambda} \cdot p \cdot \sin\theta$. On voit alors l'apparition de franges dues à ce phénomène d'interférence lumineuse. Les interférences peuvent être de type constructif ou destructif. Sur un écran placé à l'infini, la figure de diffraction observée est le fruit d'un phénomène de diffraction couplé à un phénomène d'interférence. La diffraction d'un réseau de N fentes mène à deux phénomènes superposés : l'interférence des ondes provenant d'une même fente, appelée diffraction et l'interférence des ondes émises par les diverses fentes considérées comme des sources ponctuelles, appelée interférence. L'intensité lumineuse reçue par l'écran dans la direction θ est décrite par la formule:

Équation 1 :

$$I(\theta) = I_0 \cdot \frac{\sin^2\left(\frac{\pi \cdot a \cdot \sin\theta}{\lambda}\right)}{\left(\frac{\pi \cdot a \cdot \sin\theta}{\lambda}\right)^2} \cdot \frac{\sin^2\left(\frac{N \cdot \Phi}{2}\right)}{\sin^2\left(\frac{\Phi}{2}\right)}$$

Le premier terme représente la contribution de la diffraction (en bleu) et le deuxième est la contribution des interférences (en rouge).

La *Figure 6A* illustre la dispersion angulaire de la lumière par un réseau de fentes, selon l'axe perpendiculaire à l'axe de la fente. La figure émise par N fentes est observée en rouge et présente des pics principaux de même intensité entourés de pics secondaires, d'intensités moindres. Le réseau de N fentes génère une dispersion de la lumière selon des directions précises appelées ordres. Leur pic principal a une largeur angulaire de $\lambda / N.p$. Comme le terme $N.p$ est égal à la largeur du réseau entier (L), on constate que plus le réseau est étendu, plus les pics observés seront spatialement localisés (c'est-à-dire fins).

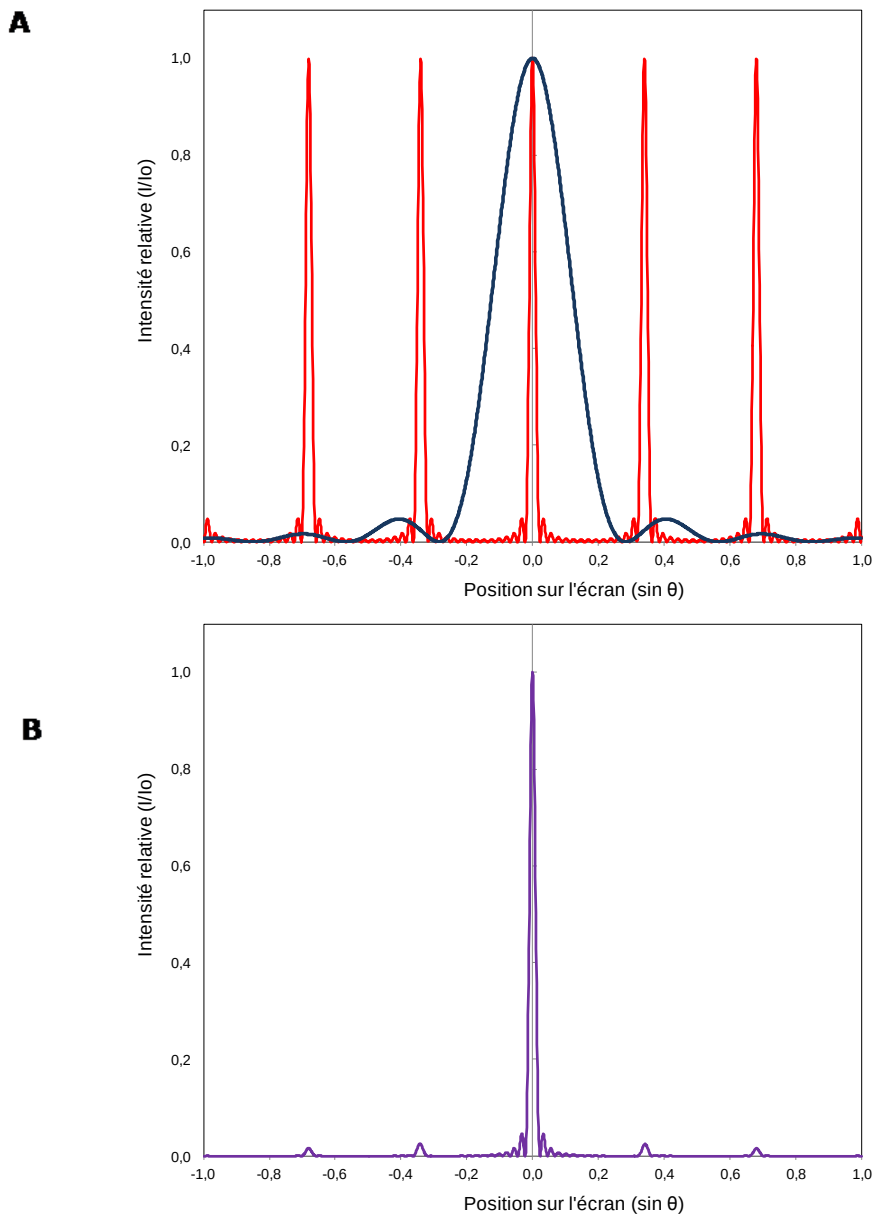


Figure 6 : Intensité lumineuse collectée sur un écran après qu'un rayon lumineux soit diffracté par N fentes (A) contribution des termes de diffraction en bleu et d'interférences en rouge (B) Figure résultante

La *Figure 6B* présente l'image de diffraction finale. La diffraction module la figure d'interférence. L'ordre 0 correspond au faisceau non dévié et les autres ordres sont ceux diffractés.

2. Développement de techniques de détection basées sur la diffraction

a. Principe d'utilisation

Nous avons vu que l'intensité lumineuse émanant d'un réseau périodique pouvait être quantifiée. Il est possible d'utiliser le phénomène décrit précédemment pour des applications de détection. La *Figure 7A* décrit le principe d'une telle technique de détection. L'objet d'étude est un réseau de diffraction, composé de lignes dont la périodicité est de dimension micrométrique ou submicrométrique. Les lignes peuvent être composées de matières différentes (molécules, résine, polymères ...). Ces réseaux sont fabriqués sur un substrat transparent de type lame de verre ou opaque de type silicium. Lorsqu'une onde plane monochromatique, par exemple un laser, éclaire à incidence normale la structure périodique, le faisceau lumineux est diffracté par le réseau dans différentes directions caractérisées par des angles discrets. Cette dispersion du spectre lumineux selon différents ordres, définit une figure de diffraction que l'on peut collecter en réflexion, grâce à un capteur situé au dessus de l'échantillon ou en transmission, (si l'échantillon est transparent) avec à un capteur situé en dessous du substrat.

Pour un réseau périodique, de période fixée et illuminé à une longueur d'onde incidente fixe, les différents ordres seront diffractés selon des angles précis. L'équation suivante régit ce principe dans le cas de la réflexion :

$$\text{Équation 2 : } p \cdot [\sin(\Theta_i) + \sin(\Theta_{\max})] = n \cdot \lambda$$

avec p : la périodicité du réseau, Θ_i : l'angle d'incidence du faisceau, $\Theta_{\max}$: l'angle de diffraction du faisceau, n : l'ordre de diffraction et λ : la longueur d'onde du faisceau incident

La figure de diffraction collectée dépend des caractéristiques de l'obstacle périodique rencontré. Ce principe peut être utilisé pour traduire une information de l'échelle micrométrique ou submicrométrique en un signal optique quantifiable.

D'après la formule développée dans le paragraphe précédent, l'intensité de diffraction obtenue dépend d'un grand nombre de paramètres. Certains sont des paramètres extérieurs au substrat (longueur d'onde incidente de la source, angle d'incidence ...) fixés par le montage expérimental. D'autres sont maîtrisables lors des étapes de fabrication des réseaux périodiques (périodicité, largeur et épaisseur des lignes, indice optique de la structure). L'amplitude des ordres de diffraction dépend donc en grande partie de l'arrangement périodique du réseau défini par la *Figure 7B* : la périodicité du réseau (p), l'épaisseur (e), la largeur (l) des lignes et l'indice de réfraction de la matière. Aussi, si ces paramètres sont modifiés au cours du temps à cause d'un événement extérieur, le spectre de diffraction sera lui aussi modifié.

- ❖ Dans cette perspective, il est possible de suivre l'intensité de diffraction issue d'un réseau périodique au cours du temps afin d'enregistrer les modifications des motifs périodiques qui le constituent.

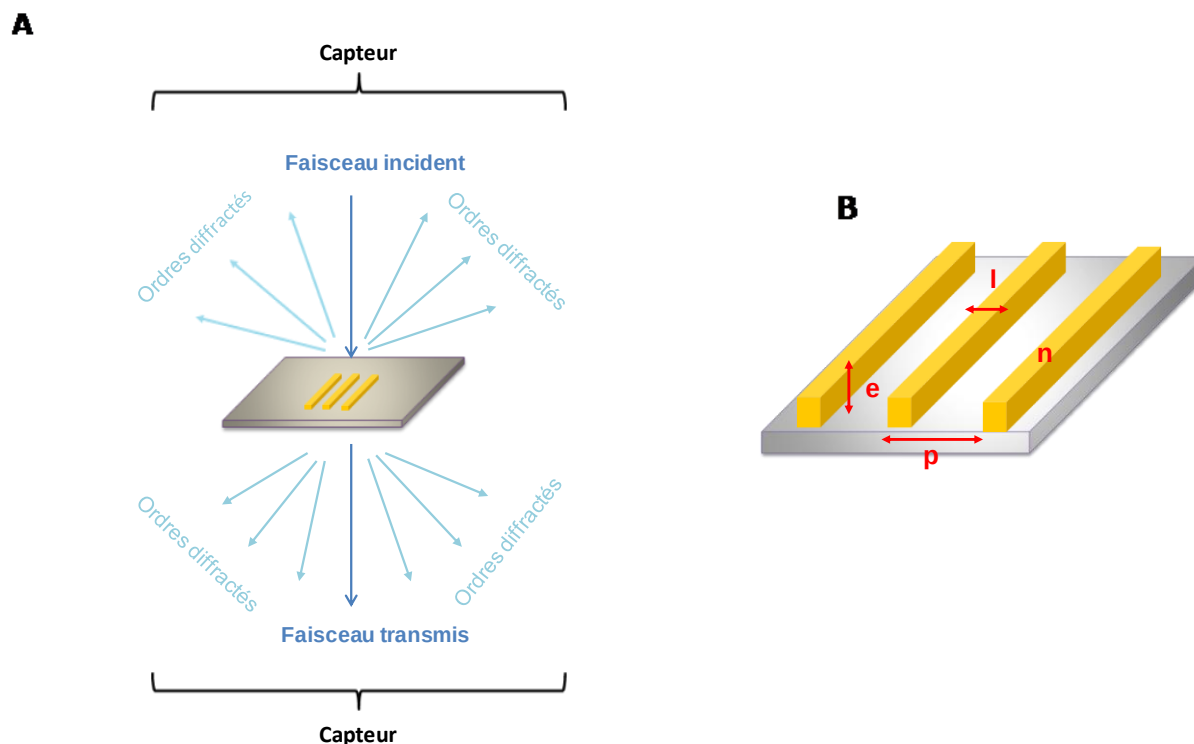


Figure 7 : (A) Substrat transparent possédant des réseaux de diffraction à sa surface, éclairés par un faisceau lumineux. La figure de diffraction peut être collectée à l'aide d'un capteur en réflexion au dessus du substrat ou en transmission en dessous du substrat (B) Réseau périodique défini par des paramètres de fabrication tels que l'indice de réfraction de la matière n , l'épaisseur des lignes e , la largeur des lignes l et la périodicité du réseau p

Cette technique de caractérisation par diffraction est employée pour détecter différents phénomènes.

b. Mise en place du système de détection

Pour la construction du système de mesure, des choix techniques doivent être faits. Nous les listons dans ce qui suit en indiquant que ces choix ont été dictés par un seul objectif : obtenir un système de lecture optique simple, peu coûteux et capable de lire rapidement des matrices de réseaux de diffraction.

- Tout d'abord, les mesures de l'intensité de diffraction (I) des réseaux se feront en réflexion et à l'ordre 1 uniquement.
- Les réseaux de diffraction auront une périodicité fixée (p) et ils seront éclairés par un faisceau laser monochromatique (λ fixe). Le laser sera positionné à une position figée elle-même, ce qui aura pour conséquence d'éclairer le réseau à la même incidence (θ_i).

D'après l'Equation 1, l'intensité de diffraction à l'ordre 1 (I) mesurée varie si :

- le terme d'interférence varie, c'est-à-dire si l'épaisseur des lignes du réseau varie
- le terme de diffraction varie, c'est-à-dire si la largeur des lignes varie

Ces postulats seront détaillés dans le paragraphe suivant, destiné à l'application de ce système de mesure pour des analyses d'interactions biomoléculaires.

c. Application à la biodétection

La diffraction peut être utilisée pour caractériser des événements à l'échelle moléculaire et notamment des interactions entre différentes entités biochimiques (protéines, ADN ...). Dans ce cas, le réseau périodique est composé de lignes de molécules sondes, immobilisées à la surface d'un échantillon. Ces dernières sont choisies pour leur spécificité face aux molécules cibles à détecter dans une solution à analyser.

i. Principe

Enregistrer la signature de diffraction d'un réseau périodique composé de lignes de molécules sondes nous permet de suivre de possibles interactions moléculaires entre les molécules sondes, immobilisées à la surface et des molécules cibles en solution dans un milieu. La *Figure 8* illustre un protocole de biodétection basé sur la diffraction. Dans un premier temps, l'intensité de diffraction provenant du réseau composé de lignes de molécules sondes est collectée. Ce signal correspond uniquement à la contribution optique du réseau avant interaction. Le substrat est ensuite mis en contact avec une solution à analyser. Si cette solution contient des molécules cibles, spécifiques des molécules sondes constituant le réseau de diffraction, les molécules cibles vont « s'adsorber » sur les lignes de molécules sondes. Dans ce cas, les paramètres physiques du réseau de diffraction sont modifiés. L'épaisseur des lignes et/ou l'indice de réfraction va augmenter et modifier ainsi la signature de diffraction du réseau. L'intensité de diffraction collectée après interaction va varier (augmenter dans le cas de la figure) si la solution analysée contient une entité biochimique spécifique des sondes.

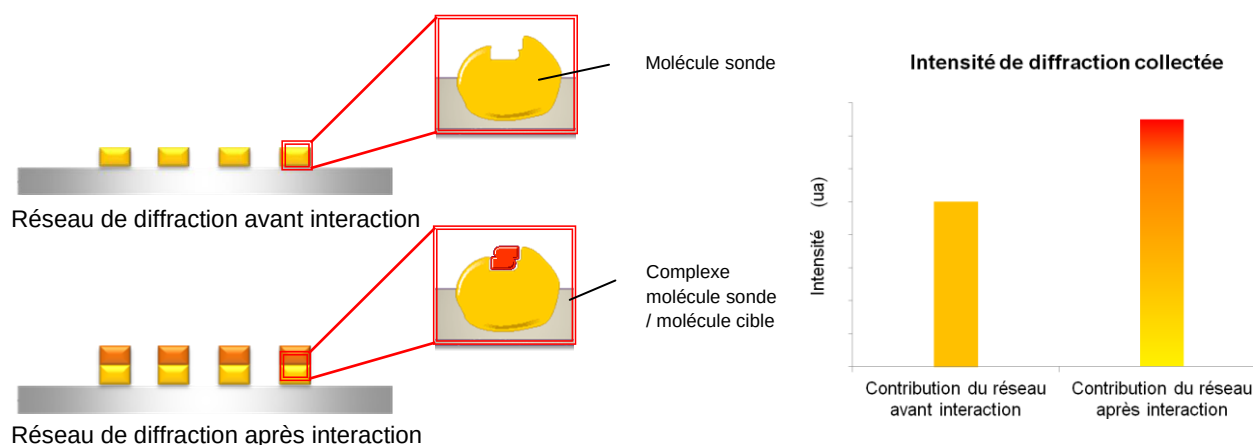


Figure 8 : Illustration de l'interaction d'un réseau composé de lignes de molécules sondes avec une solution contenant des molécules cibles. L'intensité de diffraction collectée varie avec l'adsorption des cibles sur les lignes de sondes.

Les entités biochimiques composant les lignes du réseau peuvent être de nature protéique (on parle dans ce cas de détection d'interaction) ou nucléotidique (ici, c'est une détection d'hybridation).

ii. Détection multiple

Il est possible d'étendre ce principe à la détection de multiples interactions. Sur un même substrat, plusieurs réseaux de diffraction peuvent être générés (*Figure 9*). Cette étape requiert un multiplexage des substrats, et donc des techniques adaptées d'immobilisation de matériel biologique sur la surface. Dans ce cas, le faisceau incident balaye la surface d'un échantillon et collecte les contributions lumineuses des différents réseaux, formées de molécules sondes distinctes.



Figure 9 : Illustration d'un substrat multiplexé, c'est-à-dire composés de réseaux de diffractions, chacun constitué de molécules sondes différentes

Plusieurs types de biomarqueurs ou d'entités biochimiques peuvent alors être détectés en un seul essai de biodétection. C'est le principe des biopuces, qui de par leur multiplexage, sont utilisées pour des applications de biodétections multiples.

iii. Interaction idéale - Interaction réelle

Le cas illustré par la *Figure 8* présente une situation idéale d'interaction entre deux entités biochimiques spécifiques. Les molécules se sont adsorbées idéalement avec les molécules sondes immobilisées sur le substrat. La surface de l'échantillon entre les lignes n'a pas interagi avec les molécules cibles. En réalité, l'interaction des molécules sondes avec les cibles est plus complexe. La *Figure 10* illustre la différence entre une interaction idéale (A) et une interaction réelle (B) d'un réseau composé de molécules sondes avec des molécules cibles. Dans le cas réel, la surface de l'échantillon, autour des réseaux mais aussi entre les lignes de molécules sondes est susceptible d'interagir non-spécifiquement avec les espèces présentes dans la solution à analyser.

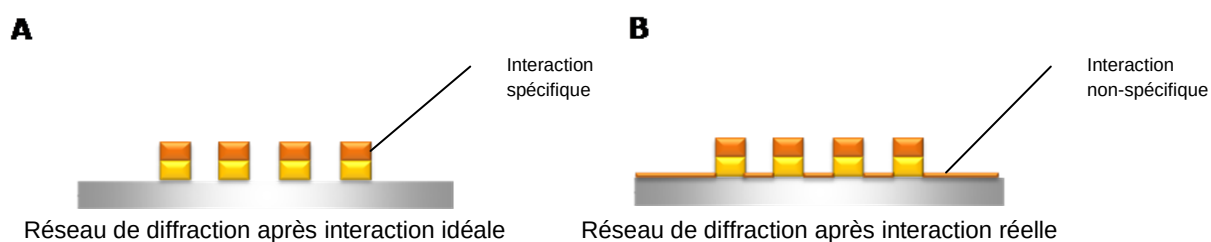


Figure 10 : Illustration d'un réseau de molécules sondes interagissant avec des molécules cibles (A) de manière spécifique (cas idéal) (B) de manière spécifique et non-spécifique (cas réel)

La présence d'interactions non-spécifiques peut perturber la signature optique des intensités collectées. La maîtrise de l'adsorption non-spécifique de molécules sur la surface est alors capitale afin de discerner le signal utile du bruit optique provenant d'événements moléculaires non-spécifiques. Par ailleurs, les événements moléculaires se produisant sur le réseau peuvent engendrer un élargissement des lignes, en plus de l'augmentation de leur épaisseur.

Le *Tableau 1* récapitule les interactions que l'on peut rencontrer à l'échelle moléculaire lors de l'adsorption de molécules cibles sur un réseau de lignes, composées de molécules sondes. Les comparaisons des intensités de diffraction collectées à l'ordre 1, avant et après interaction sont quantifiées grâce au gain. Le gain dû à l'interaction est calculé selon la formule suivante :

Équation 3 :
$$\text{Gain} = (S_{\text{après}} - S_{\text{avant}}) / S_{\text{avant}}$$

avec $S_{\text{après}} = (I_1 - I_{\text{bruit}} / I_0)_{\text{après}}$, l'intensité de diffraction à l'ordre 1 (I_1) mesurée après interaction avec les molécules cibles et normalisée par l'intensité du faisceau incident (I_0) pour s'affranchir d'éventuelles fluctuations du laser

et $S_{\text{avant}} = (I_1 - I_{\text{bruit}} / I_0)_{\text{avant}}$, l'intensité de diffraction à l'ordre 1 (I_1) mesurée avant interaction, émanant du réseau de molécules sondes uniquement, et normalisée par l'intensité du faisceau incident (I_0)

L'intensité des ordres de diffraction dépend de la période du réseau, de la largeur et de l'épaisseur des lignes et de l'indice de réfraction de la structure. En considérant que l'indice de réfraction des molécules impliquées ne varie que très peu autour de 1.4 et que la périodicité des réseaux est fixe, les modulations de l'intensité de diffraction proviennent essentiellement du possible changement de hauteur et de largeur des lignes constituant le réseau moléculaire.

Le cas A présente une interaction idéale où les molécules cibles s'adsorbent uniquement sur le réseau de molécules sondes. L'épaisseur des lignes augmente. Le signal de diffraction mesuré sera donc plus fort après interaction. Le gain est positif.

Le cas B présente une interaction critique où les molécules cibles s'adsorbent sur le réseau de molécules sondes mais aussi sur le substrat, en l'absence de blocage de surface ou de passivation. Dans le pire des cas, l'épaisseur des lignes augmente uniformément sur toute la surface, il n'y a pas de grande variation d'épaisseur car les interactions non spécifiques contrecarrent les interactions spécifiques. Le signal de diffraction mesuré après interaction sera quasi constant ou inférieur à celle avant interaction. Le gain sera donc nul ou négatif.

Le cas C présente le cas d'une interaction spécifique, plus proche de la réalité. Sous l'effet de traitement de la surface pour limiter les interactions non-spécifiques, ces dernières sont moins nombreuses que les interactions spécifiques entre molécules cibles et réseau de molécules sondes. L'épaisseur des lignes va donc augmenter après interaction. Le gain mesuré sera positif mais plus faible que dans le cas idéal.

L'importance de la limitation des phénomènes non spécifiques est donc primordiale dans une quête visant à optimiser la sensibilité de la détection.

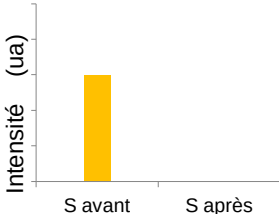
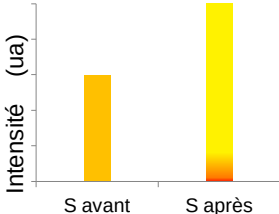
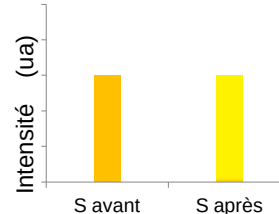
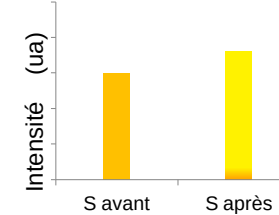
AVANT INTERACTION		
 Réseau de molécules sondes		
APRES INTERACTION		
Cas A : Interaction spécifique avec le réseau – Cas idéal		
 Sans élargissement des motifs Avec élargissement des motifs		$S_{\text{après}} \gg S_{\text{avant}}$ Gain positif
Cas B : Interaction spécifique et non-spécifique – Cas critique		
 Sans élargissement des motifs Avec élargissement des motifs		$S_{\text{après}} \approx S_{\text{avant}}$ Gain proche de 0 ou négatif
Cas C : Interaction spécifique, plus proche de la réalité		
 Interactions non spécifiques moins nombreuses que les interactions spécifiques		$S_{\text{après}} > S_{\text{avant}}$ Gain positif

Tableau 1 : Evolution des intensités de diffraction en fonction des différents types d'interactions rencontrées entre le réseau de molécules sondes (jaune) et les molécules cibles (orange)

3. Etat de l'art sur l'utilisation de la diffraction

a. Biodétection

Mettre la diffraction au service de la biodétection est un sujet d'étude abordé depuis les années 1990. Un des premiers travaux réalisés dans cette optique concerne la détection de choriogonadotropine (hormone protéique) dans du sérum humain. Tsay *et al.*¹ démontrent pour la première fois qu'il est possible de détecter et quantifier la présence d'un analyte dans une solution grâce à un réseau de molécules sondes. Dans le cas étudié, il s'agit d'un réseau d'anticorps monoclonaux anti-choriogonadotropine. En 1991, les techniques d'immobilisation de molécules sur une surface à l'échelle micrométrique et submicrométrique émergent à peine. Aussi, dans cet article, les réseaux sont réalisés en incubant une solution d'anticorps sur un substrat de silicium fonctionnalisé APTS (aminopropyltriethoxysilane) puis en insolant la surface avec une lampe UV au travers d'un masque de quartz, possédant un enchaînement périodique de lignes opaques et transparentes. Lorsque le faisceau lumineux passe à travers le masque et touche la surface, les anticorps insolés sont rendus inactifs. Le réseau, composé d'une alternance de lignes d'anticorps actifs et de lignes d'anticorps inactifs, est donc créé grâce au système d'insolation. Il est difficile de lister les détails techniques de l'article (dimensions des réseaux, spécifications source lumineuse, augmentation du signal ...) à cause du manque d'information mais la preuve de concept fut amenée. Une marque fut même simultanément déposée par la société Adeza Biomedical Corporation (OBATM : Optical Biosensor Assay). La communauté scientifique comprend alors l'enjeu de travailler avec des techniques de détection sans marquage.

Dans les années 2000, le concept de détection par diffraction fut repris pour des applications cellulaires. John *et al.*² démontrèrent en 1998 la possibilité d'immobiliser des bactéries (*Escherichia coli* O157:H7) et de quantifier leur présence en solution grâce à un réseau micrométrique d'anticorps. Le réseau moléculaire, composé de lignes de 10µm de largeur avec une périodicité de 40 µm est obtenu par microcontact printing (µCP) sur une surface de silicium. Aucun blocage de surface n'est présent dans le protocole. Les mesures se concentrent sur l'ordre 1 de diffraction. Le réseau d'anticorps seul émet une intensité de diffraction trop faible pour être détecté. Dès lors que les bactéries interagissent avec le réseau, une intensité de diffraction est collectée (Figure 11).

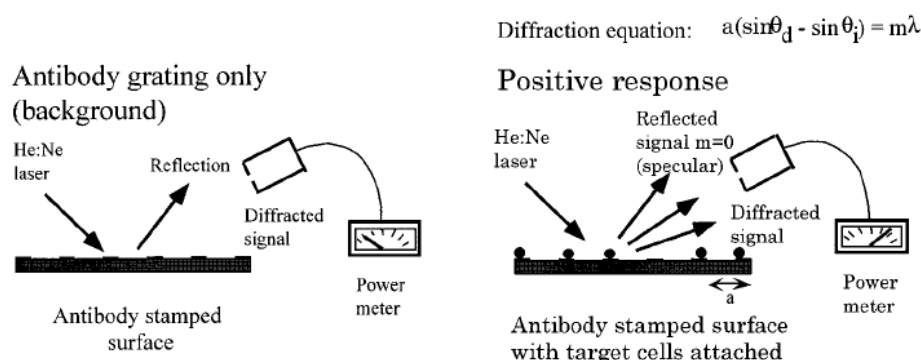


Figure 11 : Application d'un système de détection de cellules, basé sur un réseau d'anticorps²

Une approche similaire développée par Morhard et al.³ consiste à réaliser des plots micrométriques d'anticorps (anti-E.coli IgG) pour immobiliser sélectivement des bactéries (*E. Coli*). La subtilité provient de la fonctionnalisation des anticorps avec des groupes thiols, pour déposer ces complexes par microcontact printing selon des plots micrométriques sur une surface d'or.

Les chercheurs J.B. Goh, R.W. Loo, P.L. Tam et M.C. Goh sont à l'origine de nombreuses publications portant sur la biodétection basée sur la diffraction. Ils appartiennent à l'Université de Toronto et commercialisent leurs avancées technologiques grâce à la société Axela, qui a été créée en 2001. En 2002, ils démontrent que la comparaison de l'intensité de diffraction de deux réseaux moléculaires avant et après interaction avec une solution d'analytes contenant des entités cibles, permet de détecter simultanément plusieurs marqueurs.⁴ Les réseaux de molécules sondes, généralement composés de lignes d'anticorps (anticorps anti-IgG) sont déposés par microcontact printing sur des lames de verre avec une rotation de 30 à 90° l'un par rapport à l'autre (Figure 12). Il est ainsi possible de quantifier la diffraction de chaque réseau. Les figures de diffraction sont collectées en réflexion par un capteur CCD selon tous les ordres.

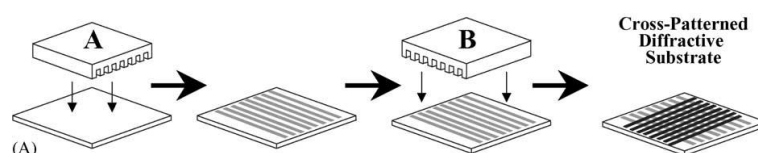


Figure 12 : Dépôt de réseaux moléculaires de diffraction, décalés d'une rotation de 90°⁴

Ces travaux sont à l'origine du développement de la détection de marqueurs multiples basée sur la diffraction. Notons que les surfaces sont bloquées par une incubation de BSA. En 2003, ils ajoutent un prisme et une cellule fluide simple, autour du réseau de diffraction déposé. Le prisme est positionné à l'arrière de la lame qui comporte le réseau et permet de se placer dans une configuration de réflexion totale interne (TIR, total internal reflection) pour collecter plus de 95% de l'intensité du laser (Figure 13).

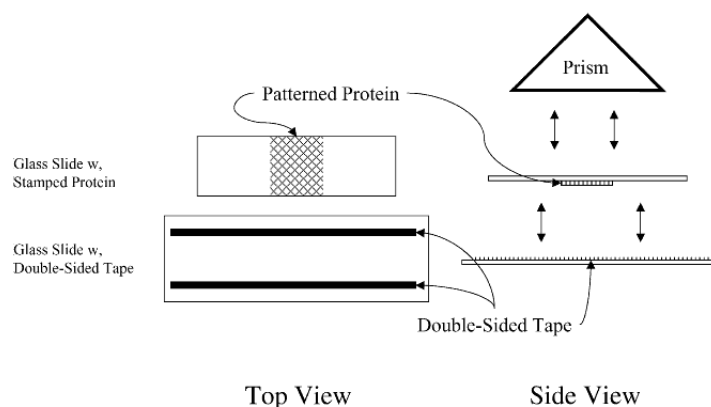


Figure 13 : Ajout d'un prisme à l'arrière de la lame comportant le réseau afin d'être en conditions de réflexion totale interne⁴

Une étape supplémentaire est ajoutée au protocole de détection. Ils incubent un anticorps après l'interaction, qui va venir se fixer sur les cibles qui ont réagi avec les lignes de molécules sondes du réseau. Cela permet d'augmenter l'épaisseur des lignes du réseau et ainsi collecter une intensité de

diffraction plus grande. Cette approche est décrite comme une technique d'amplification du signal (40 fois) mais alourdit la méthode. La limite de détection atteinte dans ces conditions est de 2.5 $\mu\text{g/mL}$ d'anticorps.^{5 6}

Enfin, en 2005 Loo et *al.*⁷ ont repoussé la limite de détection de leur système basé sur la diffraction en ajoutant, en plus de l'anticorps secondaire, un enzyme sur les réseaux moléculaires. L'enzyme réagit alors avec les lignes moléculaires et forme un produit qui précipite sur les motifs. Ainsi, un dépôt solide est présent sur les réseaux, ce qui modifie fortement la signature de diffraction et amplifie le signal d'un facteur 1000.

Par ailleurs, en 2003, Bailey et *al.*⁸ démontrent la possibilité de détecter des hybridations ADN grâce à la diffraction d'un réseau d'oligonucléotides marqués par une nanoparticule d'or.

En 2007, Savran et *al.* développent un biocapteur basé sur des réseaux de diffraction de BSA, permettant de détecter la présence de molécules de streptavidine marquées avec une bille de polystyrène (Figure 14). Bien que les billes permettent d'augmenter la limite de détection et de diminuer le signal de bruit, il est nécessaire de passer par cette étape de marquage.⁹

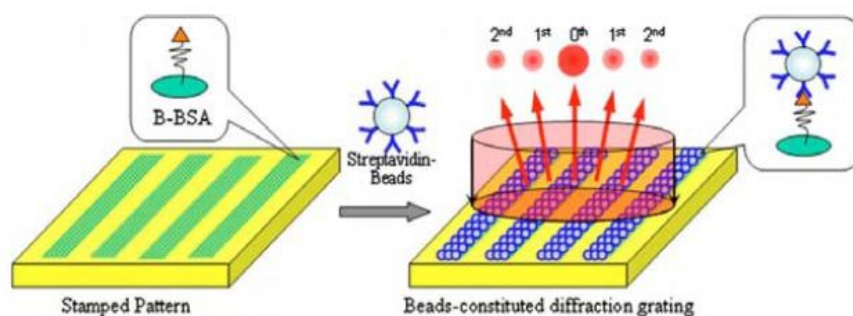


Figure 14 : Illustration schématique des réseaux de diffraction assemblés. Les cibles sont des billes de polystyrène fonctionnalisées par des molécules de streptavidine.⁹

Enfin, des travaux plus théoriques, portant sur la croissance d'un réseau par électrochimie ont permis de quantifier la puissance diffractée par un réseau périodique. Il est montré que l'intensité de diffraction augmente en fonction de la profondeur d'un réseau périodique, c'est-à-dire de l'épaisseur des lignes qui le composent, ainsi qu'en fonction du contraste de l'indice de réfraction entre le réseau et le milieu environnant.¹⁰

En conclusion, la diffraction est utilisée pour développer des techniques de biodétection qui portent sur des interactions anticorps/antigène, des hybridations d'oligonucléotides et du tri de cellules. Les motifs réalisés sont des réseaux de plots ou des lignes de dimensions micrométriques déposés sur une surface par microcontact printing.

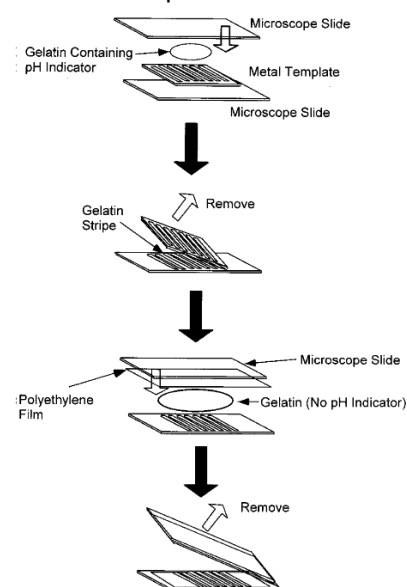
- ❖ **Généralement, les surfaces sont bloquées à la BSA pour limiter les interactions non-spécifiques. Les protocoles de détection sont effectués à l'aide d'une cellule fluidique.**
- ❖ **Les réseaux diffractifs utilisés ont toujours une période nettement supérieure au micron.**

Les limites de détection atteintes sont impressionnantes car :

- ❖ **la présence d'un prisme contre la lame analysée permet de se placer dans des conditions de rayonnement en réflexion totale interne (TIR). Le faisceau lumineux est entièrement réfléchi (95%).**
- ❖ **le signal est toujours amplifié après une interaction, soit par l'utilisation d'un marqueur secondaire que l'on incube sur la surface pour rehausser la hauteur des lignes du réseau et donc augmenter les signaux collectés, soit en utilisant des enzymes qui précipitent sur les lignes du réseau et changent l'indice de réfraction de la structure.**

b. pHmètre

Une utilisation moins commune du concept de détection par diffraction a permis le développement de substrats particuliers caractérisant le caractère acido-basique d'une solution.¹¹ Un double réseau



est fabriqué dont les lignes ont une largeur de 250 μm (Figure 15). Le 1^{er} réseau est obtenu en coinçant une solution gélatineuse contenant un indicateur pH (thymolphthaléine) sur une grille métallique, maintenue entre deux lames de verre. La structure est figée en la positionnant au froid. De la même manière, un 2^{ème} réseau est fabriqué en coinçant une autre solution gélatineuse sur le substrat précédent. Cette fois, la gélatine ne contient pas d'indicateur pH. L'indicateur est transparent lorsque le pH est inférieur à 9.3 et devient bleu lorsque le pH est supérieur à 10.5. Lorsque les substrats sont placés en environnement acide ou basique, les lignes du réseau sont modifiées et une intensité de diffraction peut être collectée en transmission. Cette approche a permis de développer un capteur chimique basé sur l'adsorption de la lumière.

Figure 15 : Fabrication de double réseau¹¹

c. Multicouches lipidiques

Nafday et al. ont récemment couplé des techniques de nanofabrication comme le Dip Pen Nanolithographie (DPN) et le microcontact printing (μCP).¹² Cette technique de fabrication a été présentée dans la chapitre I. Elle permet d'encreur un timbre de PDMS avec différentes solutions. Le timbre est ensuite mis en contact avec un substrat, ici du polystyrène et des réseaux multiplexés de lignes de lipides (DOPC ou 1,2-dioleoyl- sn -glycero-3-phosphocholine), de période submicrométrique (<700 nm) et d'épaisseur contrôlée (de 0 à 120nm) sont déposées par μCP (Figure 16).¹³ Cette technique de multiplexage est longue mais permet de réaliser des dépôts multiplexés par μCP .

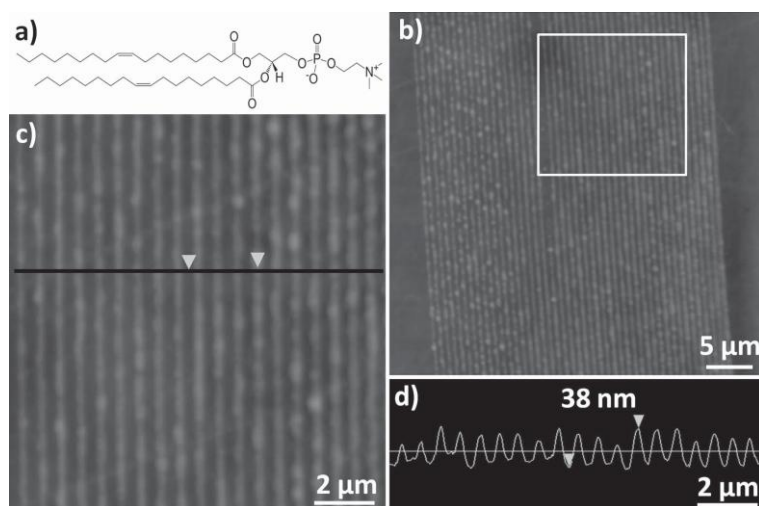


Figure 16 : (a) Structure de DOPC (b) et (c) Réseaux de multicouches lipidiques compose de DOPC, déposés par μ CP sur une surface de polystyrène (d) Coupe transversale de la ligne sur l'image c ¹³

Ces réseaux sont ensuite utilisés en tant que biocapteurs optiques sans marquage basés sur la diffraction. Lenhert et al. ont démontré que lorsque des lipides fonctionnels étaient incorporés sur le réseau de multicouches lipidiques, l'intensité de diffraction émanant du réseau lipidique variait en fonction de l'interaction avec l'analyte. ¹⁴ Le système expérimental développé en laboratoire est monté sur un microscope inversé. Il permet d'éclairer le réseau de diffraction avec une fibre optique en lumière blanche à un certain angle d'incidence. L'intensité de diffraction est collectée par une caméra CCD positionnée normalement à la surface. L'angle d'incidence est déterminé selon la période du réseau de diffraction. A terme, ce type de réseau permettrait de caractériser l'interaction de drogues avec une membrane lipidique.

d. Capteurs de gaz

De nombreuses études portent sur le développement de capteurs de gaz rapides (temps de réponse inférieur à la minute), réversibles (c'est-à-dire permettant de réinitialiser le capteur en le ramenant à son état fondamental) et sensibles (quelques ppm). Le marché des capteurs de gaz est poussé par un besoin omniprésent autant au niveau de la sécurité et qualité de l'air (industrie chimique, agroalimentaire, biomédicale) que de la défense intérieure.

Bailey et Hupp travaillent depuis plus de 10 ans sur le développement de capteurs de gaz basés sur la diffraction de la lumière visible. ¹⁵ Le cœur de ce type de détection est basé sur des réseaux diffractants. Des réseaux de lignes de taille micrométrique, présentant un arrangement périodique sont fabriqués par micromoulage capillaire (MIMIC ou micro-molding in capillaries) ¹⁶ à base de polymères (polyepichlorohydrine, polyisobutylène et polybutadiène) (Figure 17).

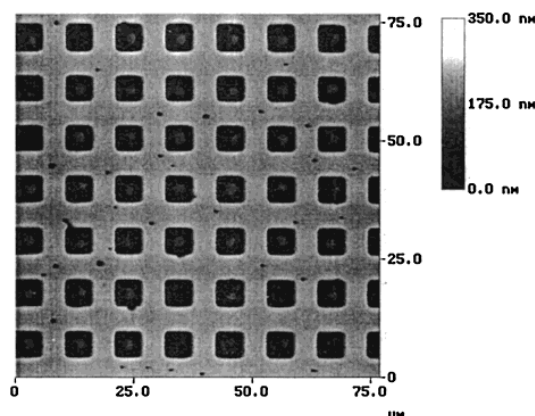


Figure 17 : Image AFM d'un réseau de polymère (PECH polyepichlorohydrine), de 160 ± 5 nm d'épaisseur ¹⁶

Ces réseaux diffractent sensiblement la lumière provenant généralement d'un laser monochromatique grâce au contraste périodique de l'indice de réfraction des motifs et du milieu environnant le substrat (air, liquide ...). Lorsque les motifs de polymère interagissent avec un analyte cible, le contraste d'indice de réfraction change. Cette modification entraîne une variation de l'intensité diffractée par le réseau. Le suivi des modifications du spectre lumineux de diffraction permet donc de détecter l'interaction d'un composé volatil avec le réseau diffractant de polymère. Ce type de capteur a fait ses preuves pour détecter des composés organiques volatils variés ^{17 18 19}, Bailey et Hupp démontrèrent des sensibilités intéressantes (7 à 400 ppm) pour la détection de toluène, méthylethylcétone, chloroforme et hexane grâce à des réseaux diffractants. La sélectivité de ces capteurs est généralement le facteur limitant de ce type de chimio-détection.

Le développement de capteur de gaz fait aussi partie des thématiques de recherche du LCC (Laboratoires de Chimie de Coordination) de Toulouse. Plusieurs thèses ont permis de mettre en avant les aspects théoriques et expérimentaux de tels capteurs pour la détection de composés organiques volatils. Basé sur des réseaux micrométriques de composés à transitions de spin, Akou *et al.* ont montré que le suivi de l'intensité diffractée d'un tel réseau permettait la détection de méthanol. ²⁰ Parmi la gamme d'ions métalliques présentant une transition de spin, les composés à base de Fer restent les plus étudiés. L'intérêt de ces composés réside dans le fait qu'ils possèdent deux configurations électroniques différentes, appelées haut spin (HS) et bas spin (BS), qui commutent sous l'effet d'une perturbation extérieure comme la température, la pression, la lumière, un champ magnétique ou même l'adsorption de molécules volatiles ou de gaz. C'est ce dernier cas qui est visé pour détecter la présence de composés organiques volatils (COV) grâce à des composés à transitions de spin tel que le $[\text{Fe}(\text{hptrz})_3](\text{OTs})_2$. Le changement de configuration électronique entraîne des changements de propriétés physiques (magnétisme, volume, couleur ...) ainsi qu'optiques, qui au final engendrent une modification de l'intensité de diffraction issue du réseau. ²¹

²²

Le centre de recherche de Langley appartenant à la NASA (National Aeronautics and Space Administration) a aussi déposé un brevet sur ce type de capteurs de gaz, basés sur la diffraction. ²³

4. Contexte et enjeux

La thèse présentée s'ancre dans un fort contexte de transfert industriel. Deux précédents doctorats^{24 25} ont permis d'évaluer le potentiel de la biodétection par diffraction en laboratoire pour des applications de criblage pharmaceutique. Au cours de ces projets, un banc de mesure a été développé afin d'apporter la preuve de concept de cette technologie.

- ❖ **Le 1^{er} objectif de cette thèse consiste à transférer la technologie développée en laboratoire autour de la biodétection basée sur la diffraction dans un contexte industriel.**
 - ❖ **Transformer le banc de mesure en un instrument de lecture automatisée, en collaboration avec la société Innopsys. Cet appareil doit permettre une lecture rapide de l'intensité de diffraction émise par des réseaux biomoléculaires présents sur un échantillon.**
 - ❖ **Tester les prototypes de lecture réalisés, afin de vérifier s'ils correspondent aux spécifications du cahier des charges.**
 - ❖ **Améliorer les prototypes. Deux versions seront donc développées.**
- Par ailleurs, la fabrication des réseaux de biomolécules se fait selon les développements d'ingénierie moléculaire décrits dans les chapitres précédents.
- ❖ **Le 2^{ème} objectif de ce projet porte sur l'utilisation des réseaux moléculaires fonctionnels limitant l'adsorption non-spécifique pour des tests de biodétection.**
 - ❖ **Vérifier la possibilité de lire des réseaux de biomolécules (protéines ou ADN) avec le prototype développé.**
 - ❖ **Réaliser des analyses moléculaires (protéine/protéine ou ADN/ADN) dans le cadre de protocoles complets de détection.**

II/ Outils de lecture développés pour capter une intensité de diffraction

Dans un premier temps, nous détaillerons brièvement l'outil de lecture développé en laboratoire en amont de cette thèse et qui permet de faire des mesures de diffraction à l'échelle nanométrique. L'objectif de ce travail est de transférer ce banc de test en un prototype de lecture répondant à des contraintes semi-industrielles. Les choix techniques de conception seront présentés dans un second temps ainsi que les tests et validations effectués sur l'appareil.

1. Preuve de concept en laboratoire

a. Présentation du banc de mesure

La bibliographie détaillée précédemment montre qu'il est possible d'utiliser la diffraction d'un réseau de biomolécules pour caractériser des interactions moléculaires. Ce mode, appelé « biocapteur », suit l'évolution d'un seul réseau. Le banc de mesure en diffraction, développé lors d'une précédente thèse,²⁴ a été conçu dans l'idée d'amener la preuve de concept de l'utilisation de la diffraction pour suivre l'évolution de plusieurs réseaux de molécules. Ce mode, appelé « biopuce », renvoie donc à un substrat multiplexé, c'est-à-dire possédant plusieurs réseaux de molécules sondes différentes permettant de détecter de multiples cibles.

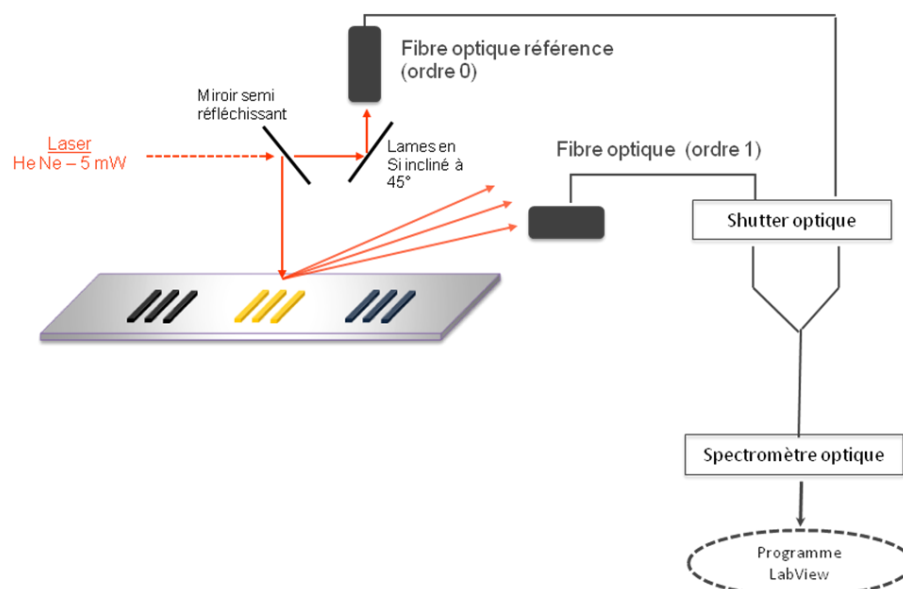


Figure 18 : Montage expérimental développé en laboratoire

La Figure 18 illustre le banc de test mis en place expérimentalement pour caractériser une biopuce en diffraction. Les mesures sont concentrées à l'ordre 1. Un faisceau laser (He-Ne de $\lambda=633\text{nm}$) balaye l'ensemble du substrat, une première fois grossièrement pour détecter les intensités émises par les réseaux périodiques et enregistre leurs coordonnées sur l'échantillon puis balaye une seconde fois les zones repérées avec un pas plus précis. Pendant ce deuxième balayage, la planéité du substrat et l'alignement du réseau sont optimisés pour maximiser l'intensité reçue par les fibres optiques. De

nombreux degrés de liberté sont présents mais le temps nécessaire pour lire un échantillon avec ce banc, est de plusieurs heures.

Le banc de mesure est disposé sur une table anti-vibration d'1 m². Cette taille est acceptable pour un système expérimental de laboratoire mais trop important selon les critères industriels. Aussi, l'ensemble des composants et des principes de lecture doivent être revus pour diminuer la taille du prototype de lecture automatisée.

Une cellule fluide simple permet d'amener les fluides sur la surface de l'échantillon mais les mesures sont effectuées « à l'air », grâce à l'insertion intentionnelle d'une bulle d'air dans le système fluide.

b. Applications

Le banc de mesure a été utilisé pour détecter l'interaction entre une protéine A, de 43 kDa et un anticorps spécifique IgG₁ anti-A, de 150 kDa lors de la thèse précédente.²⁴ La Figure 19 décrit le protocole expérimental suivi.

Des réseaux de streptavidine sont déposés par μ CP sur des lames époxydes (A). Un flux de PBS est ensuite injecté pendant 1h30 afin d'éliminer les molécules faiblement liées à la surface de la lame.

	Protocole expérimental
(A) Réseau de lignes de streptavidine sur une lame époxyde	
Rinçage (PBS 1h30)	
(B) Incubation de la protéine A marquée à la biotine (60 µg/mL pendant 45)	
Rinçage éventuel	Mesure du signal de diffraction S_{avant}
(C) Incubation de l'anticorps cible (80µg/mL pendant 7h)	
Rinçage (PBS 10h)	Mesure du signal de diffraction $S_{après}$

Figure 19 : Protocole expérimental mis en place pour tester le concept de la biodétection sans marquage basé sur la diffraction, avec le banc expérimental

La protéine A, marquée par un groupement biotine est ensuite incubée sur la surface (60µg/mL durant 45 min). Elle va interagir avec le réseau et se fixer sur les lignes de streptavidine par des liaisons biotine/streptavidine (B). Il n'est pas précisé dans le protocole expérimental si des rinçages

sont effectués à cette étape afin d'éliminer le surplus de protéines A présentes sur l'échantillon. L'intensité de diffraction S_{avant} émanant de ces réseaux est mesurée et correspond au spectre de diffraction du réseau périodique composé des molécules sondes. Ensuite, une solution contenant l'anticorps spécifique est incubée sur la surface (80 $\mu\text{g/mL}$ pendant 7h) puis un rinçage au PBS est effectué pendant 10h (C). L'intensité de diffraction $S_{\text{après}}$ émanant de réseaux après interaction avec les molécules cibles est mesurée.

La variation du signal de diffraction ΔS atteint près de 200 à 1000 %. Cette valeur indique une forte interaction moléculaire de l'anticorps cible avec le réseau. On notera la longueur importante des étapes d'incubation et de rinçage qui ne sont pas compatibles avec une utilisation réelle.

Cependant, sans blocage de surface ni passivation, des interactions non-spécifiques ont pu avoir lieu. Ainsi, l'adsorption non-spécifique des anticorps cibles a été étudiée, en répétant le protocole précédent à l'exception de l'incubation de la protéine A. Une solution contenant les anticorps cibles est incubée sur le réseau de lignes de streptavidine, déposé sur la lame époxyde. La Figure 20 présente cette étude en diffraction pour 6 réseaux de diffraction normalement identiques. Le signal de diffraction ΔS chute de près de 100%. En l'absence de protéine A, les anticorps s'adsorbent sur toute la surface, et en particulier entre les lignes du réseau. Ensuite, au cours du lavage au PBS qui suit, le signal de diffraction remonte. Les anticorps se désorbent petit à petit de la surface. Quel que soit le temps du lavage, le signal de diffraction reste constant. Des anticorps sont donc restés adsorbés entre les lignes du réseau, au contact du substrat époxyde.

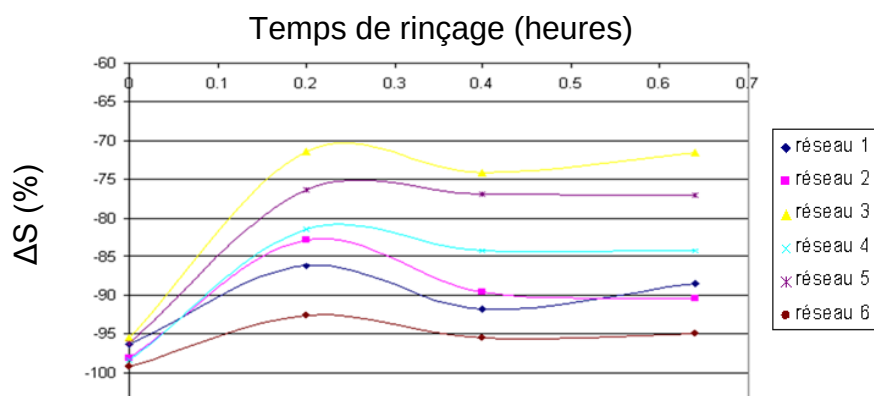


Figure 20 : Interaction non spécifique entre l'anticorps cible avec le réseau de streptavidine quantifiée en terme de gain (intensité de diffraction après incubation de l'anticorps comparée à l'intensité du réseau de molécules sondes)

- ❖ **Les lavages ne suffisent pas à éliminer les interactions non-spécifiques.**
- ❖ **Cette étude témoigne de la présence d'adsorption non spécifiques qui se superposent aux interactions spécifiques entre un réseau de sondes et la cible en solution. Il est donc capital de minimiser ces phénomènes pour que des tests de biodétection puissent s'effectuer par diffraction.**
- ❖ **Une seconde technique de caractérisation (fluorescence, AFM ...) doit être employée pour étudier en parallèle de la mesure en diffraction, la nature spécifique ou non spécifique des interactions moléculaires.**

2. Transfert industriel du concept vers un scanner automatisé

Dans ce paragraphe, nous présenterons le déroulement du transfert du banc de mesure en diffraction vers un prototype de lecture automatisée.

a. Chaîne de développement

Les phases de développement d'un outil sont nombreuses. La *Figure 21* retrace le déroulement général du développement d'un produit. La 1^{ère} étape consiste à exprimer les besoins. Il s'agit de définir les attentes de consommateurs, d'utilisateurs ou même d'un secteur par des études de marché. Dans notre cas, nous souhaitons développer un outil de biodétection sans marquage basée sur la diffraction.

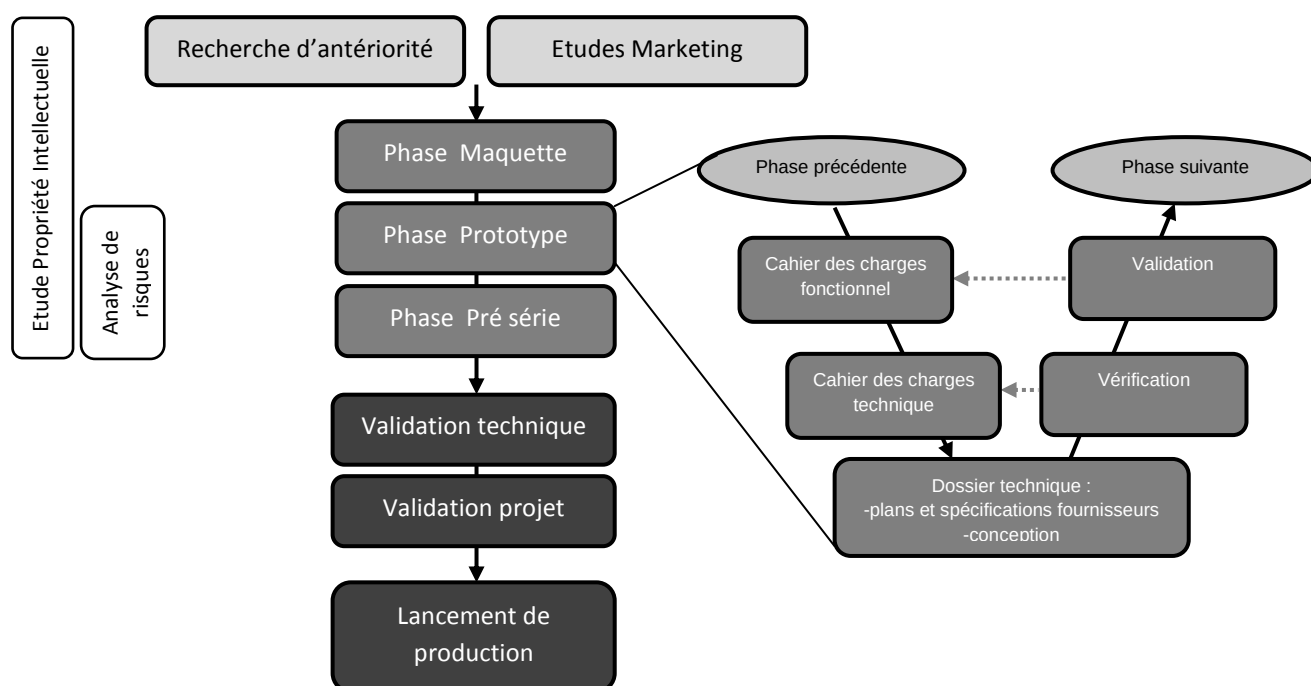


Figure 21 : Cycle de développement d'un produit

Ensuite, on passe à la phase de développement, qui comprend une phase maquette, une phase prototype et une phase pré série. Pour chaque phase de développement, le schéma de droite est reproduit : on définit ce que l'on souhaite par un cahier des charges fonctionnel et un cahier des charges technique. Ensuite, on passe à l'étape de conception puis s'en suivent la partie de tests pour vérifier les caractéristiques techniques du produit et valider la partie fonctionnelle. En parallèle à ces phases d'études et de développement, des études de la propriété intellectuelle ainsi que des analyses de risques sont menées.

Concernant le scanner de lecture en diffraction que nous souhaitons développer, le projet a débuté dans cette thèse à partir de l'étape maquette. Une preuve de concept en laboratoire a été effectuée par le biais de deux thèses avant d'amorcer le transfert industriel du projet. Le cahier des charges a été rédigé en septembre 2009 et sera présenté dans le paragraphe suivant. La phase maquette a permis de fabriquer un exemplaire de l'outil défini afin de démontrer la faisabilité industrielle.

Ensuite, lors de la phase prototype, deux versions de l'appareil ont été développées. Mon travail s'est concentré sur les essais et tests lors des étapes de vérification et validation de la phase prototype.

b. Cahier des charges

Transférer un concept physique d'un laboratoire à l'échelle industrielle nécessite de suivre une série d'étapes de façon méthodique. Les caractéristiques de base de l'instrument de lecture doivent être modifiées car elles ne répondent plus aux mêmes critères. Le principe de lecture basé sur la diffraction reste le même, mais le cadre du projet doit être redéfini avec soin. Le *Tableau 2* définit le cadre du développement du prototype de lecture en détaillant les grandes lignes du cahier des charges, en réponse aux attentes d'un marché connu de part l'activité de l'industriel Innopsys.

CONTRAINTES TECHNIQUES	
<u>Contraintes temporelles</u>	Les temps de réponse de l'appareil doivent être fortement diminués. La lecture d'un échantillon, de type lame de verre de microscope, ne doit prendre qu'une dizaine de secondes. La lecture de l'échantillon et l'acquisition de données doivent être plus rapides. Le temps de lecture ne devra pas excéder 5min pour une lame entière avec une taille de pixel de 40µm.
<u>Contraintes spatiales</u>	Il est nécessaire de condenser la taille qu'occupe la machine en optimisant la place et l'agencement des composants entre eux. La taille définie est de 25 x 25 x25 cm avec un poids inférieur à 12 kg (respect du standard français AFNOR X35-109 concernant le poids).
<u>Sensibilité</u>	Détecter des réseaux de quelques nanomètres d'épaisseur basés sur des lignes moléculaires avec un rapport signal/bruit minimum de 3, à l'ordre 1 de diffraction en réflexion (mesures effectuées à l'air).
<u>Reproductibilité</u>	L'erreur maximale de mesure due au prototype de lecture doit être inférieure à 5% de variation de signal (à température ambiante). Cet impératif est basé sur un calcul simple concernant l'épaisseur de lignes moléculaires lors d'une interaction. Si l'on considère une interaction classique entre deux molécules (type streptavidine/biotine), la molécule cible à détecter (biotine) a une épaisseur d'environ un nanomètre. L'épaisseur des molécules sondes (streptavidine) est d'une vingtaine de nanomètres (une ou deux couches moléculaires). Ainsi, la variation de hauteur est de l'ordre de $1/20 = 0.05$. Nous observons donc une variation de hauteur du réseau de 5%. La variabilité due au prototype doit donc être inférieure à 5% afin de ne pas être dans le même ordre de grandeur qu'une variation due à un événement moléculaire que l'on souhaite détecter.
<u>Dynamique</u>	La dynamique nécessaire est de 10^5 sur la variation de signal à détecter.

CONTRAINTES EXPERIMENTALES	
<u>Substrat</u>	Les échantillons doivent être générés sur des lames de microscope standards (76x26 mm), fonctionnalisées ou non.
<u>Épaisseur moléculaire</u>	Les réseaux sont déposés sur le substrat par μCP. La variation de hauteur des lignes suite à une interaction est d'autant plus visible que la hauteur des lignes est faible. Exemple : hauteur de lignes avant interaction de 10 nm, hauteur de lignes après interaction de 17 nm, variation = 70 % hauteur de lignes avant interaction de 20 nm, hauteur de lignes après interaction de 27 nm, variation = 35 % Les lignes des réseaux doivent se rapprocher de la monocouche de molécules pour conserver une grande sensibilité.
<u>Limitation de l'adsorption non-spécifique</u>	Les réseaux générés doivent être bi-fonctionnels. Ils sont composés de molécules sondes actives mais les événements non spécifiques doivent être limités entre les lignes de sondes et sur le reste du substrat. Un procédé de passivation ou de blocage de surface doit être ajouté pour fiabiliser les analyses.
<u>Conditions de manipulation</u>	Travailler avec des concentrations de molécules cibles plus faibles inférieures au micromolaire (initialement de 80 μ g/mL équivalent à 1.5 μ M) afin de se rapprocher des conditions de biodétection réelle. Diminuer les temps d'interaction et de rinçage (initialement de 7 à 10h). Pas de cellule fluidique pour effectuer les mesures de diffraction au sein du prototype. Les manipulations expérimentales se font à l'extérieur du prototype de lecture, qui doit rester un appareil de mesure uniquement.

Tableau 2 : Récapitulatif des spécifications principales du cahier des charges du prototype de lecture en diffraction

L'enjeu de ce chapitre consiste à coupler le travail de fabrication de réseaux moléculaires fonctionnels limitant l'adsorption non-spécifique (chapitre II et III) avec le scanner de lecture afin d'étudier la faisabilité de la biodétection basée sur la diffraction dans des contraintes d'utilisation moins souples qu'en laboratoire.

c. Choix techniques

Deux versions du prototype de lecture ont été développées, selon les critères définis par le cahier des charges. La version 1 du prototype est antérieure à la version 2, améliorée.

i. Description générale

Le prototype de diffraction est composé de plusieurs blocs : le bloc optique qui protège le chemin lumineux du laser et des intensités de diffraction collectées, le bloc électronique et les axes de déplacement (Figure 22).

Deux axes de déplacement sont présents sur l'appareil. L'axe de déplacement, qualifié de « rapide » porte un des miroirs qui réfléchit le laser sur la surface de l'échantillon. Cet axe assure un balayage

transverse du laser sur l'échantillon. L'échantillon est maintenu dans le porte-lame, qui se déplace longitudinalement grâce à l'axe de déplacement qualifié de lent.

Un laser de longueur d'onde 635 nm balaye la surface. Le système optique sera détaillé dans le paragraphe suivant afin de comprendre comment le laser est amené sur l'échantillon et comment l'intensité de diffraction est collectée.

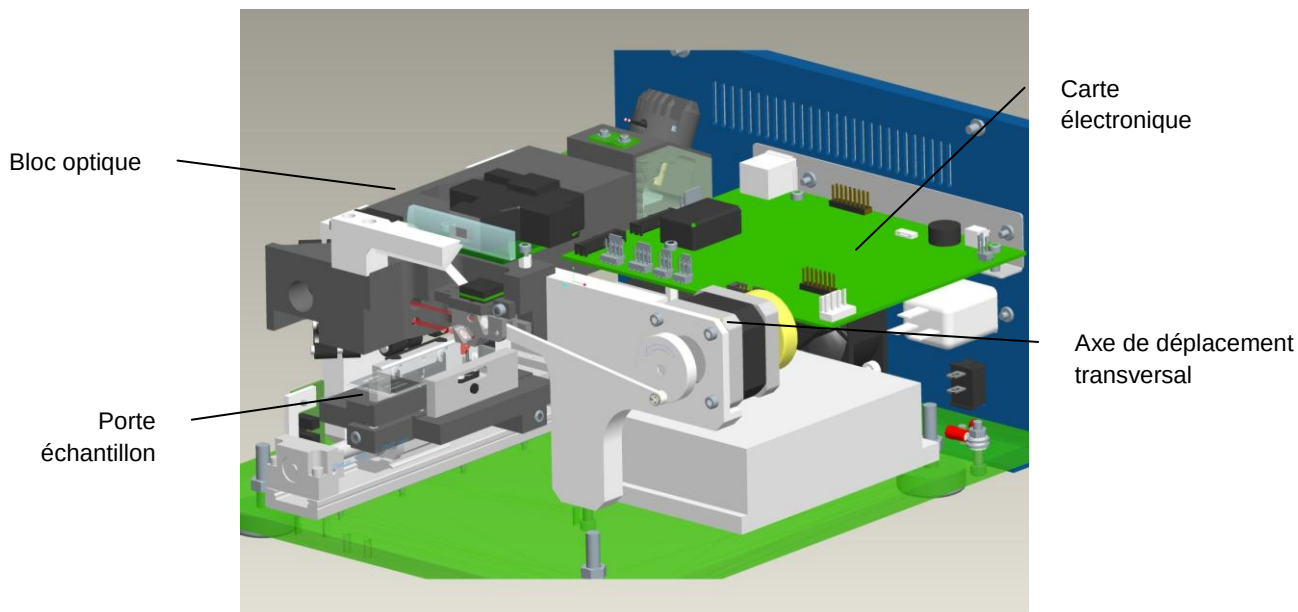


Figure 22 : Schéma du prototype de lecture en diffraction, sans le capot extérieur

ii. Système optique

Le système optique est un élément crucial qui assure deux fonctions : amener le faisceau laser sur les réseaux de diffraction et recueillir le signal lumineux émanant du substrat. L'agencement des composants (miroirs, lentilles, diaphragmes...) est primordial pour collecter le maximum de signal utile tout en évitant de capter la lumière diffuse. La précision des mesures, liée à la convergence du faisceau et son diamètre peut varier en fonction des choix techniques effectués.

La Figure 23 illustre le système optique du prototype n°2. La source lumineuse provient d'un laser qui fournit un rayonnement monochromatique de longueur d'onde $\lambda=635$ nm. Un montage de prismes et une lentille mettent en forme le faisceau, qui est dirigé vers un miroir qui réfléchit le faisceau à incidence quasi normale sur l'échantillon ($\theta_i=2^\circ$). Le faisceau est diffracté par le réseau périodique présent sur l'échantillon. L'intensité de diffraction à l'ordre 1 est collectée grâce à un autre miroir qui renvoie le rayonnement dans le bloc optique, puis un dernier miroir dirige le faisceau lumineux vers le capteur composé d'une photodiode silicium.

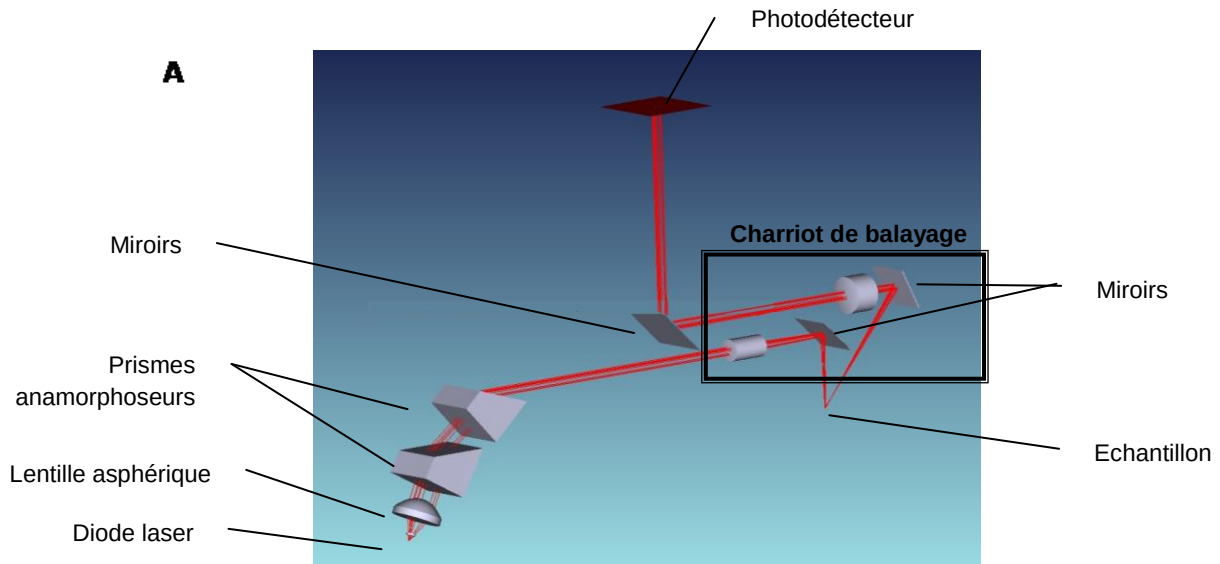


Figure 23 : Schéma du chemin optique du prototype de lecture version 2

Les éléments encadrés dans la Figure 23 sont positionnés sur un charriot de balayage, qui est déplacé selon un axe transversal pour balayer la lame en largeur.

Les mesures de diffraction sont concentrées sur l'ordre 1, émis selon un angle que l'on peut calculer d'après l'Équation 2. Cet angle déterminera la position du miroir qui réfléchira le faisceau diffracté à l'ordre 1 vers le capteur. D'après la formule, le terme $\sin\theta_i$ est quasi nul puisque le faisceau incident éclaire le substrat à incidence quasi normale et $n = 1$. Ainsi :

$$\sin \theta_{\max} = \frac{\lambda}{p} = \frac{635}{1000}$$

$$\theta_{\max} = 39.4^\circ$$

- ❖ **Le miroir qui permettra de collecter le signal de diffraction à l'ordre 1 sera placé de manière fixe à un angle de $\theta_{\max} = 39.4^\circ$.**

iii. Degrés de liberté

Les degrés de liberté présents sur le prototype de lecture automatisée sont moins nombreux que ceux présents sur un banc de mesure. Nous souhaitons caractériser la tolérance de lecture du prototype. Il s'agit de déterminer les conditions pour qu'un faisceau lumineux entre dans le capteur. Lorsqu'un réseau de molécules est déposé par μ CP sur une lame, les deux paramètres qui jouent sur le trajet du faisceau diffracté sont :

- l'angle, appelé b , formé par le côté d'un réseau et le bord de la lame (voir Figure 24A)
- la période d'un réseau, appelé p (défini sur la Figure 24B).

Nous souhaitons caractériser la variation maximale de ces deux paramètres pour que le faisceau diffracté soit collecté par le capteur.

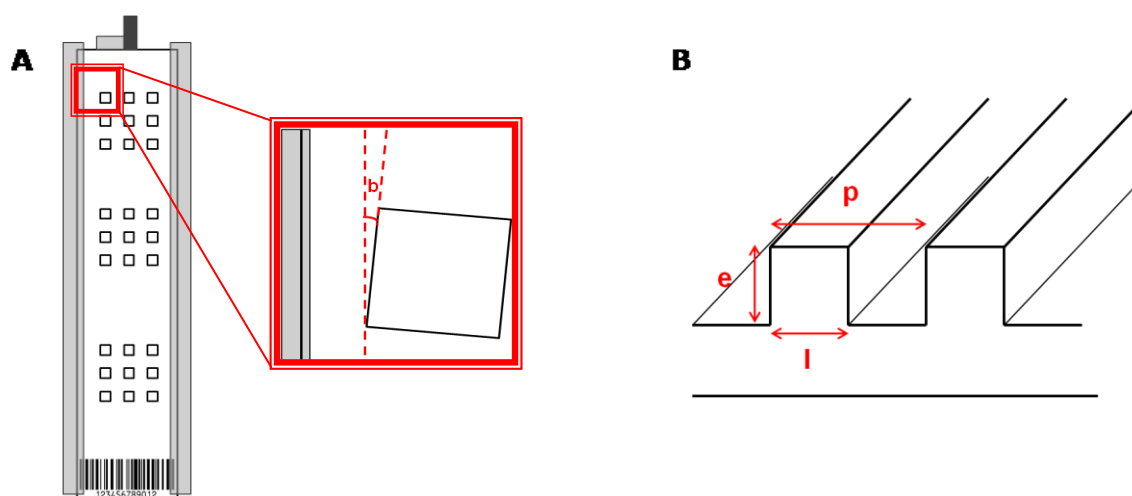


Figure 24 : (A) Lame de microscope comportant des réseaux de diffraction à analyser et positionnée dans le porte-échantillon. L'alignement du réseau périodique avec le bord de la lame définit l'angle b . (B) Réseau périodique vu transversalement. La période p du réseau, l'épaisseur e des lignes et la largeur l des lignes sont définies sur la figure.

Alignement du réseau périodique avec le bord de la lame

Dans cette partie, nous souhaitons quantifier la tolérance de fabrication maximale que l'on peut atteindre au niveau de l'alignement des réseaux périodiques avec le bord de la lame pour que l'intensité lumineuse soit collectée par la photodiode. Le chemin optique parcouru par la lumière diffractée à l'ordre 1 est schématisé par une ligne droite en pointillé représentée sur la Figure 25.

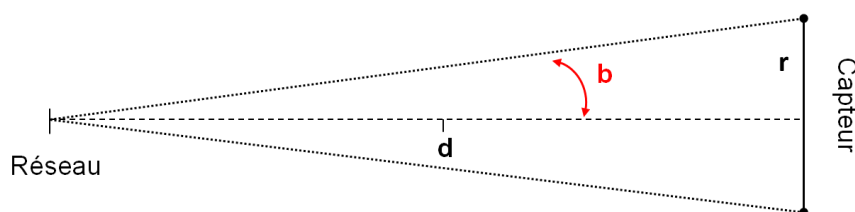


Figure 25 : Schématisation de la distance réseau / capteur, appelée d .

Le faisceau lumineux diffracté par le réseau rencontre différents miroirs disposés dans le bloc optique afin de le guider jusqu'au capteur. Le chemin optique parcouru mesure 225 mm. Pour qu'une intensité lumineuse soit collectée par la photodiode, il faut que le faisceau entre dans le

capteur, diaphragmé par un orifice circulaire de 5.8 mm de diamètre. L'angle $b_{\max}$ peut être calculé comme suit :

$$\tan b = \frac{r}{d} \quad \Leftrightarrow \quad b = \arctan\left(\frac{2.9}{225}\right) \quad \Leftrightarrow \quad b_{\max} = 0.738^\circ$$

avec b : angle formé par le réseau et la verticale, r : le rayon de la photodiode, d : la distance réseau/photodiode

- ❖ **Pour que le faisceau diffracté à l'ordre 1 soit collecté par la photodiode, le réseau périodique doit être réalisé avec une tolérance de $\pm 0.7^\circ$ d'alignement par rapport au côté de la lame. Cette valeur impose de fortes contraintes de fabrication. Les réseaux moléculaires sont déposés sur le substrat par microcontact printing (μ CP). Il n'est pas envisageable de pouvoir manuellement atteindre une telle précision. C'est à ce niveau que le μ CP semi-automatisé réalisé avec l'automate Gesim et détaillé dans le chapitre II intervient. Cet outil de dépôt est utilisé pour assurer un alignement quasi-parallèle des réseaux moléculaires déposés avec le substrat.**

Périodicité du réseau

D'après l'Équation 2, nous pouvons calculer la variation de la périodicité du réseau toléré par le système optique. Nous cherchons à calculer la variation maximale Δp de périodicité sans que le faisceau lumineux ne sorte de la photodiode.

$$\sin \Theta_{\max} = \frac{\lambda}{p} \quad \Leftrightarrow \quad \sin(\Theta_{\max} + b) = \frac{635}{p + \Delta p}$$

Avec $b = 0.738^\circ$ et la période théorique sur un réseau fixée à $p = 1000$ nm, nous obtenons :

$$\Delta p = 15.9 \text{ nm}$$

- ❖ **Il s'agit de trouver un compromis bruit/tolérance angulaire. L'industrialisation de l'équipement va permettre de rendre le lecteur moins tolérant donc de diminuer le bruit diffus (et ainsi augmenter la sensibilité) mais impose des contraintes de fabrication fortes pour que le faisceau diffracté soit collecté par le capteur.**
- ❖ **Les réseaux périodiques doivent être générés par μ CP à l'échelle nanométrique, avec un alignement des lignes moléculaires par rapport au bord de la lame contrôlé au degré près ($b_{\max} = 0.7^\circ$) et sans variation dans la périodicité supérieure à 16 nm. Si ces spécifications ne sont pas contrôlées, le faisceau diffracté sera collecté en dehors du capteur.**
- ❖ **Ces contraintes techniques imposent une fabrication de réseaux contrôlée par des techniques de μ CP semi-automatisées.**

Ces exigences ont été assouplies pour la version 2 du prototype de lecture. Le système optique de la version 1 possédait une lentille de focale 1m qui imposait de multiples allers-retours du faisceau entre deux miroirs. Ces trajets lumineux amplifiaient les petites erreurs de fabrication des réseaux (autant au niveau de l'angle d'alignement b que de la périodicité p). Le système optique a donc été simplifié.

La *Figure 26* présente l'impact de l'alignement du réseau sur l'intensité de diffraction collectée pour la version 2 du prototype. L'intensité diffractée provenant d'un même réseau est analysée selon différents alignements. Pour modifier l'angle b , formé entre le côté du réseau et le bord de la lame, l'axe rapide portant l'échantillon est dévissé et orienté à souhait.

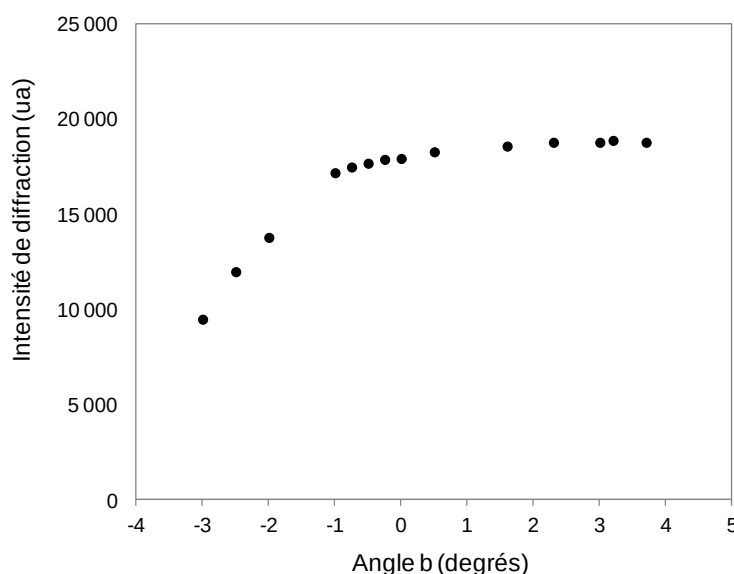


Figure 26 : Influence de l'alignement du réseau de diffraction par rapport au bord de la lame sur l'intensité diffractée à l'ordre 1 collectée par le capteur

Une intensité lumineuse est collectée par le capteur jusqu'à un décalage du réseau de $\pm 4^\circ$. La version 2 du scanner de lecture est plus tolérante. Cependant, la version 2 du scanner est moins bien réglée que la version 1 car l'angle $b=0^\circ$, qui correspond à un alignement optimum entre le réseau et la lame, n'est pas l'angle pour lequel le signal est maximal. Il semblerait même qu'un alignement de quelques degrés du réseau par rapport au bord de la lame (de $b=[1-4^\circ]$) permettrait d'obtenir une intensité plus forte que lorsque le réseau est parfaitement parallèle au bord de lame ($b=0^\circ$). C'est l'inverse pour les angles négatifs.

❖ **Les tolérances du prototype version 2 permettent d'envisager de fabriquer les réseaux moléculaires par μ CP manuel.**

Le *Tableau 3* récapitule les tolérances de lecture du prototype de lecture en diffraction, version 1 et 2.

	Alignement du réseau	Périodicité du réseau
Tolérance de lecture Prototype version 1	$\pm 0.7^\circ$	$\pm 16 \text{ nm}$
Tolérance de lecture Prototype version 2	$\pm 3^\circ$	$\pm 60 \text{ nm}$

Tableau 3 : Récapitulatif des spécifications des prototypes de lecture en diffraction 1 et 2 en termes d'alignement et de périodicité des réseaux

Ici, nous touchons du doigt la complexité de transférer un projet à l'échelle semi-industrielle ou industrielle. Chaque choix de conception engendre des contraintes expérimentales fortes.

iv. Traitement du signal

Pour effectuer des analyses de biodétection, le principe consiste à comparer l'intensité de diffraction d'un réseau avant et après interaction avec la solution à analyser. L'intensité de diffraction du réseau avant interaction provient des lignes formées par les molécules sondes. Après interaction, si les molécules cibles se sont adsorbées sur la surface, l'intensité de diffraction émanant du réseau périodique sera modifiée. Il faut noter que la partie biologique de ces tests s'effectue en dehors du scanner. La lame est analysée une 1^{ère} fois avant interaction puis elle est retirée du scanner. La solution à analyser est ensuite mise en contact avec l'échantillon. Après les étapes biologiques (interaction, rinçages ...), la lame est repositionnée dans le scanner pour être analysée une 2^{ème} fois.

Interface graphique

Le logiciel d'acquisition de mesures a été développé au sein d'Innopsys, sous Java. Il permet par l'intermédiaire d'une interface graphique de contrôler différents paramètres : les paramètres de mesure, les paramètres d'affichage des images et les paramètres d'analyse des images. La Figure 27 présente cette interface graphique.

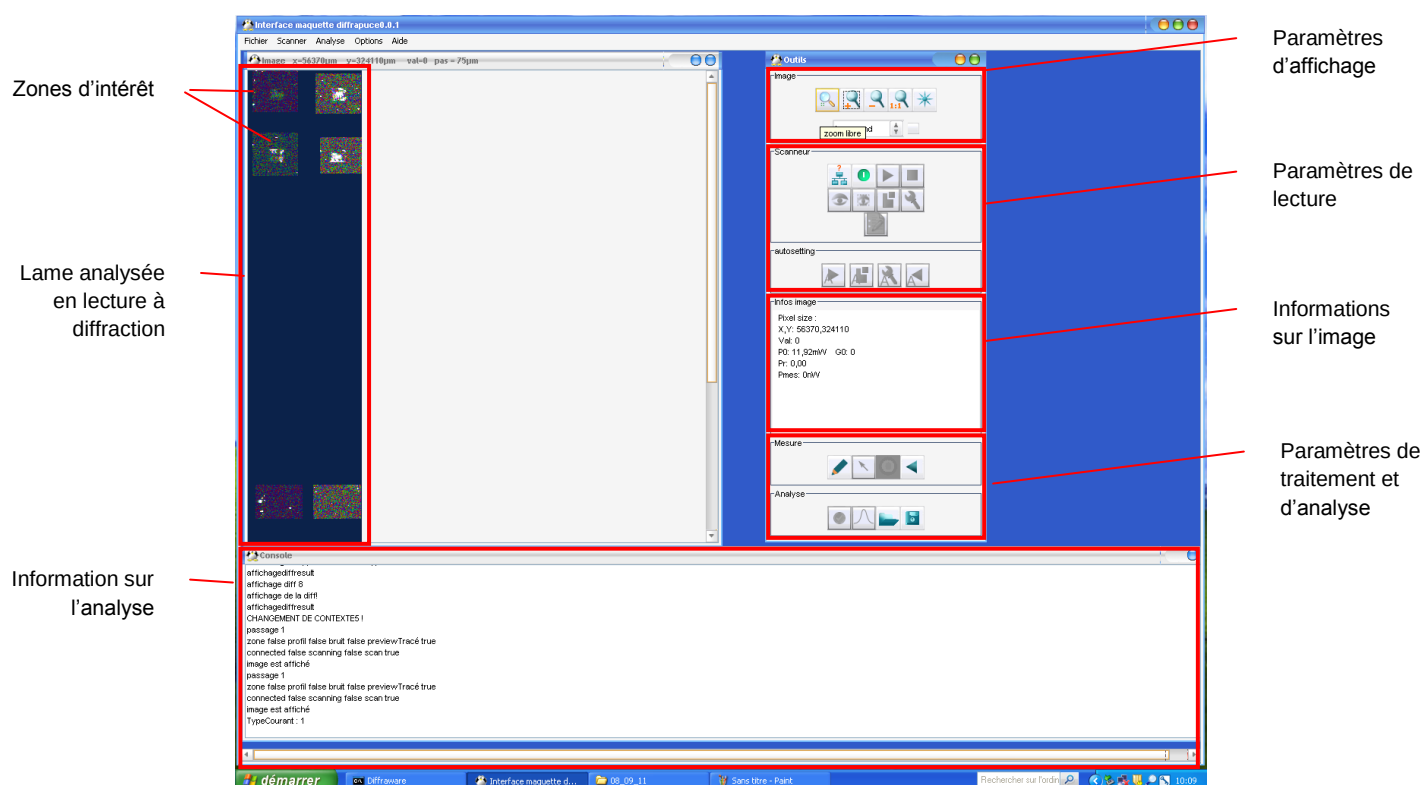


Figure 27 : Interface graphique permettant de contrôler l'acquisition des images

Il existe deux modes d'imagerie. Un mode « pré-scan » qui permet de faire une lecture rapide de la lame pour repérer les réseaux de diffraction sur le substrat. Un mode « scan » qui analyse avec un pas plus précis les zones d'intérêt. Les paramètres de lecture, réglés par l'utilisateur sont :

- la puissance du faisceau incident P , modifiable de 0 à 4 mW, qui permet d'atteindre une gamme dynamique de lecture importante. Pour des réseaux ayant des intensités de diffraction importantes, la puissance laser doit être diminuée pour ne pas obtenir des mesures d'intensité saturante. Au contraire, pour des réseaux diffractant faiblement la lumière, il faut augmenter la puissance laser pour collecter un maximum d'intensité lumineuse.
- le gain électronique G^1 , variable de 1 à 15. Il est aussi possible d'acquérir des images avec une certaine amplification électronique du signal pour permettre des mesures de faibles intensités de diffraction. Cette amplification se fait par l'intermédiaire du réglage du gain de l'image. Augmenter le gain d'une mesure permet de collecter une intensité de diffraction plus forte mais le bruit du signal augmente aussi.
- la dimension du pixel, qui varie de 10 à 800 μm . Le pas des mesures est directement relié à la résolution des images mais il est impossible de la diminuer en-deçà de 10 μm . Cette valeur est donc la résolution maximale que peut atteindre une mesure. Chaque pixel mesure 10 x 10 μm . Les réseaux moléculaires ont une périodicité de 1 μm . Leur taille est variable (entre 400 μm et 1200 μm de côté), ce qui signifie qu'un réseau de 400 μm de côté sera composé de 40 pixels. Bien sûr, il reste à considérer le diamètre du faisceau laser sur la surface.

Un bon réglage de ces valeurs est primordial pour détecter une intensité lumineuse exploitable.

Fenêtre de lecture

La fenêtre définie par l'utilisateur permet d'effectuer une lecture précise d'une zone de l'échantillon. Cette fenêtre doit être choisie avec attention. Tous les pixels présents au sein de cette zone seront analysés par la suite en termes d'intensité lumineuse. La *Figure 28* explicite deux cas d'analyse. Si la zone définie est trop grande par rapport au réseau de diffraction, le risque de tenir compte de poussières ou de défauts de surface est présent. Des défauts surfaciques émettent une certaine intensité lumineuse lorsqu'ils rencontrent le faisceau laser et la diffusion de cette intensité parasite est collectée par le capteur. Il est donc nécessaire de définir la fenêtre d'analyse minimale. Cependant, la fenêtre ne peut être trop réduite au risque de ne considérer qu'une partie de l'intensité de diffraction émise par le réseau. L'information mesurée ne représente pas le comportement global du réseau face à la diffraction du signal faisceau lumineux.

¹ NB : ne pas confondre ce gain avec le gain biologique défini auparavant

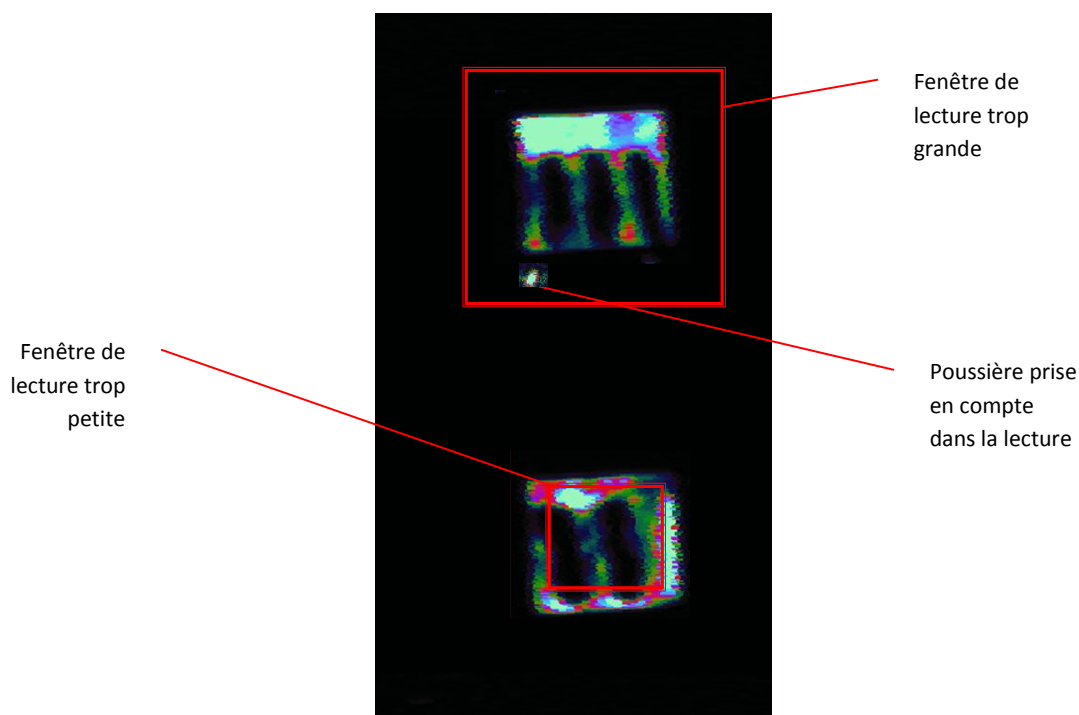


Figure 28 : Fenêtres d'analyse définies par l'utilisateur

Le *Tableau 4* illustre l'importance de la fenêtre d'analyse définie. Nous souhaitons quantifier l'impact de la définition de la fenêtre de lecture sur les mesures. Pour cela, une série de 10 mesures est effectuée sur un réseau de référence réalisé en résine SU-8. Ce réseau est donc stable dans le temps. Deux fenêtres de tailles différentes sont définies autour d'un réseau. La 1^{ère} n'est pas ajustée, c'est-à-dire qu'elle tient compte des pixels appartenant au fond noir. La 2^{ème} est plus réduite autour du réseau d'intérêt. Pour chaque fenêtre, nous calculons le coefficient de variation (CV) des mesures. Cette valeur est définie comme l'écart type (σ) relevé dans une série de mesures et normalisé par le signal moyen de diffraction sur la série :

$$CV = \sigma / S_{\text{moy}}$$

avec S le signal de diffraction pour une série de mesures, défini comme le maximum de l'intensité de diffraction à l'ordre 1 (I_{max_1}) auquel on soustrait le bruit de fond (I_{bruit}) et normalisée par l'intensité du faisceau

$$\text{incident } (I_0): S = [(I_{\text{max}_1} - I_{\text{bruit}}) / I_0]$$

En jouant sur la taille de la zone, on constate que les mesures varient. Pour une fenêtre d'analyse non ajustée, le CV calculé pour les mesures est de 13.4 %. Cette valeur est très importante. Lorsque l'on ajuste la zone à analyser, le CV diminue fortement (6.4%). L'écart entre les mesures diminue de 50% lorsque la zone définie est ajustée autour du réseau. Bien que les pixels correspondant au bruit de fond soient soustraits, leur présence perturbe les mesures. Si on ne soustrait pas le fond, les mesures relevées montrent un CV de 13,4%.

	Coefficient de variation
Grande fenêtre d'analyse	14.6 %
Fenêtre d'analyse ajustée	6.4 %
Fenêtre d'analyse ajustée sans soustraction de l'intensité de bruit de fond	13.4 %

Tableau 4 : Influence de la taille de la fenêtre d'analyse sur les mesures

- ❖ **La définition de la fenêtre de lecture est donc très importante. Un autre paramètre peut cependant entrer en jeu dans ces résultats : la définition de la fenêtre de traitement.**

Fenêtre de traitement

Après qu'une zone ait été « lue » en diffraction, l'utilisateur définit une fenêtre de traitement (schématisée par les zones encadrées 0, 1 et 2 sur la Figure 29) ainsi qu'une zone délimitant le bruit de fond de l'image.

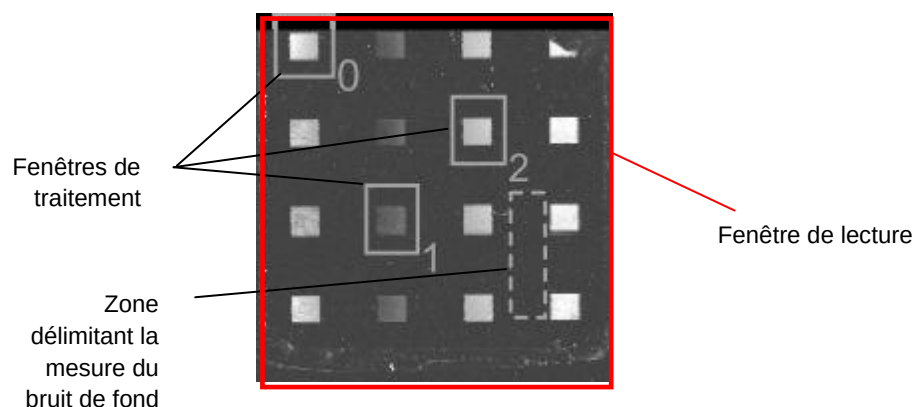


Figure 29 : Définition des zones d'analyse et traitement des valeurs

D'après l'Équation 3, le logiciel relève les intensités de tous les pixels présents sur la zone définie. Le signal transmis à l'utilisateur (S) est défini comme le maximum des intensités de diffraction à l'ordre 1 ($I_{\max_1}$) de l'image, auquel on soustrait l'intensité lumineuse du bruit de fond (I_{bruit}) normalisé par l'intensité du faisceau incident qui est alors transmis à l'utilisateur :

$$S = (I_{\max_1} - I_{\text{bruit}}) / I_0$$

Le signal de diffraction avant interaction (S_{avant}) est alors comparé avec celui après interaction ($S_{\text{après}}$) avec la solution étudiée pour définir le gain.

- ❖ **Dans cette configuration d'analyse, la fenêtre définie par l'utilisateur doit être identique pour les analyses effectuées avant et après le test d'interaction.**

Le choix de prendre en considération le maximum de l'intensité d'une image peut être discuté. Cette valeur représente-elle un comportement global au sein d'un réseau ? Le maximum de diffraction

d'une zone est-il positionné au même endroit après interaction avec la solution d'analytes ? Cette approche, assez simpliste, ne considère pas la possible présence d'agrégats de matière sur la surface ou de poussières qui pourraient biaiser les valeurs collectées. Un pixel lumineux en dehors du réseau peut alors être enregistré alors qu'il ne fait pas partie du signal utile. La définition de la fenêtre d'analyse est capitale.

Deux autres approches de traitement sont étudiées. Elles consistent à tenir compte de l'intensité moyenne de diffraction relevée sur une zone ou d'intensité médiane. Relever l'intensité de diffraction moyenne d'une zone définie est plus représentatif du comportement global de la surface. Cependant, la définition de la fenêtre d'analyse est capitale. Tous les pixels sont traités et considérés dans l'analyse. Si la zone définie est assez large autour des réseaux diffractants, les pixels proche de zéro, correspondant au fond de l'image diminueraient donc la valeur moyenne finale. Analyser la valeur médiane de l'intensité de diffraction collectée sur une zone est une approche permettant de pondérer les valeurs extrêmes (maximales et minimales) pouvant être relevées sur l'échantillon. Ce type de traitement atténue donc les écarts d'intensité provoqués par des éléments parasites, qui ne sont pas représentatifs du comportement diffractif de l'échantillon (poussières, défauts ...). Cependant, l'analyse de la médiane de l'intensité lumineuse atténue aussi les variations d'intensité. Dans le cas d'une comparaison d'échantillon avant et après interaction avec une solution à analyser, les variations d'intensité peuvent être très faibles. Par un traitement par médiane, ces variations peuvent ne pas être mises en relief.

Nous souhaitons quantifier l'impact du traitement de l'image sur les valeurs d'intensité transmises à l'utilisateur. Le *Tableau 5* retrace qualitativement ces approches. Une série de 10 mesures est effectuée sur un même réseau. Le signal maximal, le signal moyen et le signal médian sur la zone

	<i>Intensité de diffraction moyenne au sein de la série (ua)</i>	<i>CV au sein de la série</i>
<i>Intensités maximales</i>	2650	6.4 %
<i>Intensités moyennes</i>	2050	2.5 %
<i>Intensités médianes</i>	1940	1.8 %

sont relevés, ainsi que les variations des mesures au sein de la série représentées par le CV.

Tableau 5 : Intensité (maximum, moyenne et médiane) de diffraction collectée sur une zone.

Nous constatons qu'au sein de 10 mesures sur une même zone, le coefficient de variation est plus faible si l'on considère le signal médian sur le réseau. Le signal moyen permet aussi d'obtenir des variations acceptables. Le signal maximum quant à lui, offre des valeurs instables qui peuvent être facilement perturbées à cause de défauts surfaciques.

❖ **Le traitement des mesures doit donc se faire à partir de l'intensité médiane ou moyenne des pixels sur une image.**

v. Influence du diamètre du faisceau laser

Pour collecter l'information lumineuse, un faisceau laser balaye la surface de l'échantillon à incidence normale. Lorsqu'il rencontre un réseau périodique, une intensité de diffraction est collectée à l'ordre 1 à un angle de $\theta = 39^\circ$. La *Figure 30* présente 3 situations de lecture d'un réseau périodique par le scanner développé. La première ligne de la figure représente le point d'impact du laser sur la surface de la lame. La deuxième ligne correspond à l'intensité lumineuse observée à l'ordre 1 de diffraction. La troisième ligne est un profil optique de l'intensité lumineuse collectée. Les réseaux périodiques mesurent 400 μm de côté dans l'exemple suivant. Cette valeur a été choisie pour une première batterie de tests.

Dans un premier temps (cas A), nous nous positionnons dans le cas où le diamètre du faisceau laser est supérieur à la distance entre deux réseaux ainsi qu'au côté du réseau (diamètre > 400 μm). L'intensité de diffraction collectée est donc la somme des contributions des réseaux 1 et 2, puisqu'ils reçoivent tout deux le rayonnement lumineux du laser simultanément. L'image collectée à l'ordre 1 démontre une juxtaposition de deux intensités lumineuses, correspondant à la diffraction des réseaux 1 et 2. Sur le profil optique enregistré, nous observons deux pics lumineux correspondant respectivement aux intensités de diffraction des réseaux 1 et 2. L'intensité résultante n'est donc pas assez précise pour traduire les événements moléculaires du réseau 1 indépendamment du réseau 2. Il est donc essentiel que la distance entre les réseaux périodiques présents sur la lame soit suffisamment grande par rapport au diamètre du faisceau laser pour distinguer leur contribution diffractive propre.

Dans le cas B, la distance inter-réseau est supérieure au diamètre du faisceau laser. Cependant le diamètre du faisceau incident est du même ordre de grandeur que le côté d'un réseau périodique ($\pm 400 \mu\text{m}$). Cette configuration correspond à la version 1 du prototype du scanner de lecture. L'observation visuelle de ces mesures démontre la faible pixellisation de l'image, due à la taille du spot. L'intensité lumineuse collectée représente de façon globale les événements moléculaires qui se sont produits sur le réseau périodique. Les contours de ce dernier ne sont donc pas discernables en termes d'intensité lumineuse.

Dans le cas C, le diamètre du faisceau laser est largement inférieur au côté d'un réseau périodique ($\pm 70 \mu\text{m}$). L'image observée de l'intensité de diffraction à l'ordre 1 est plus précise. La géométrie du réseau est discernable. Au sein même du motif périodique, il est possible de distinguer des variations d'intensité. Cette configuration correspond à celle mise en place pour la version 2 du prototype de diffraction. Elle permet des mesures plus fidèles aux événements diffractifs émanant de la surface de la lame. Le diamètre du faisceau laser est capital pour la mesure. Il influe grandement sur la précision des mesures.

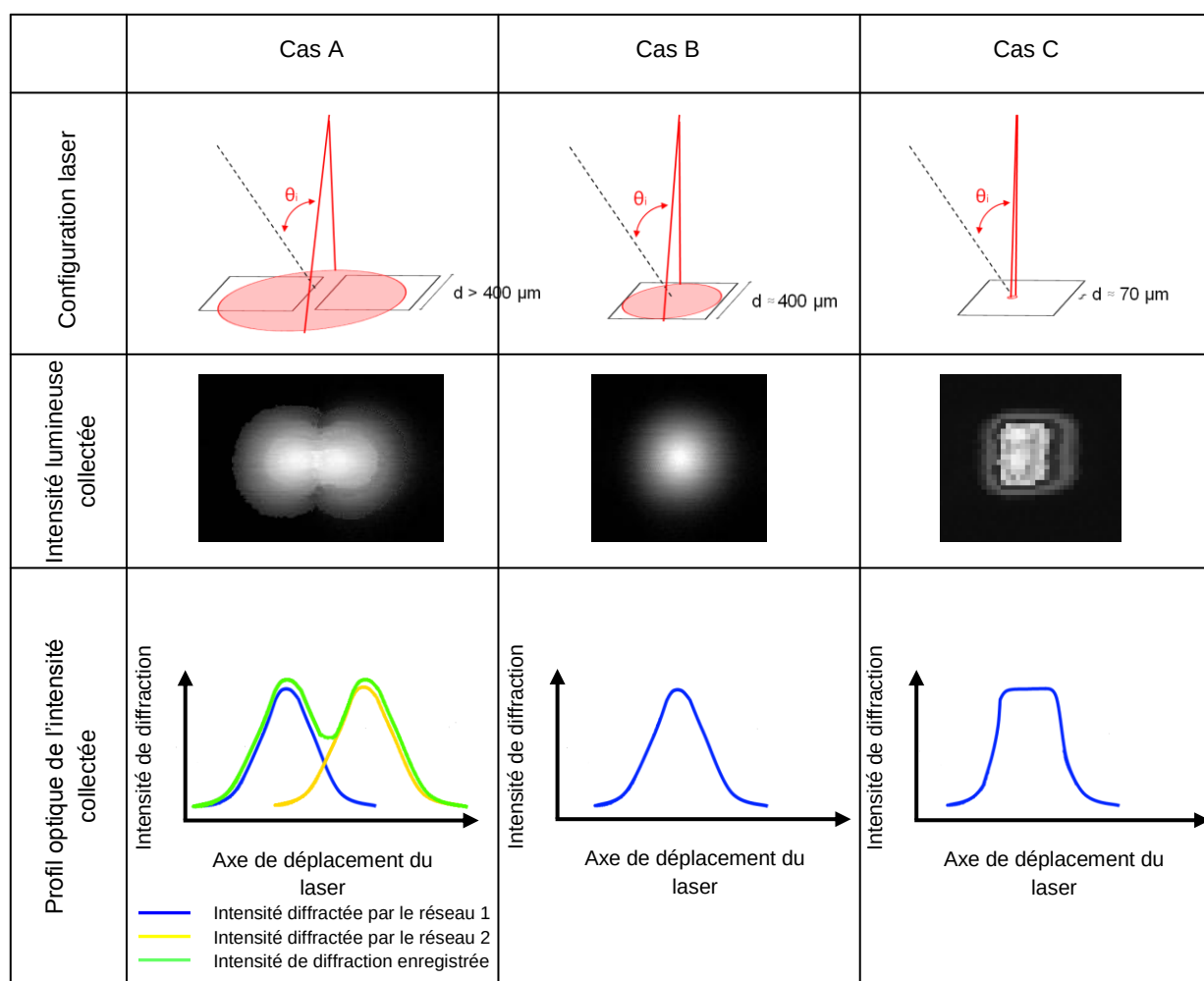


Figure 30 : Faisceau laser incident balayant un échantillon possédant à sa surface des réseaux (A) lorsque le diamètre du faisceau est plus grand que la distance entre deux réseaux ainsi que le côté d'un réseau (B) lorsque le diamètre du faisceau est égal au côté du réseau (C) lorsque le diamètre du faisceau est bien inférieur au côté du réseau

- ❖ **Ces observations qualitatives nous ont permis de mettre en évidence l'importance du diamètre du laser. Les mesures des intensités diffractées seront précises, plus le diamètre du faisceau incident est faible. Le diamètre du laser du prototype de lecture version 2 est défini à 70 μm , dimension particulièrement adaptée pour la lecture de réseaux de largeur minimale de 100 μm .**

vi. Reproductibilité

Dérive temporelle

Nous souhaitons dans cette partie caractériser les dérives que l'appareil peut subir, suite à un évènement extérieur. Nous avons souhaité évaluer la stabilité de l'appareil (version 1) au cours du temps. Pour cela, nous avons fabriqué une lame de référence comportant des réseaux de diffraction figés. Cette lame possède à sa surface des réseaux de lignes submicrométriques fabriqués en SU-8 par thermal soft UV NIL. La SU-8 ayant été figée par exposition UV, les structures fabriquées n'évoluent pas dans le temps. Les caractéristiques des réseaux de résine ne varient pas (hauteur de lignes, période, indice de réfraction ...). Avant chaque essai, cette lame de référence est analysée en diffraction. L'intensité de diffraction des différents réseaux est mesurée et enregistrée. Il est ensuite possible de suivre cette valeur au cours du temps afin d'estimer les variations de lecture, directement liées à l'outil de mesure. 20 mesures sont effectuées sur un même réseau afin de moyenner les valeurs obtenues. Plusieurs réseaux de référence sont présents sur la lame mais la *Figure 31* présente l'évolution de l'intensité de diffraction de l'un d'entre eux, sur 35 jours d'utilisation.

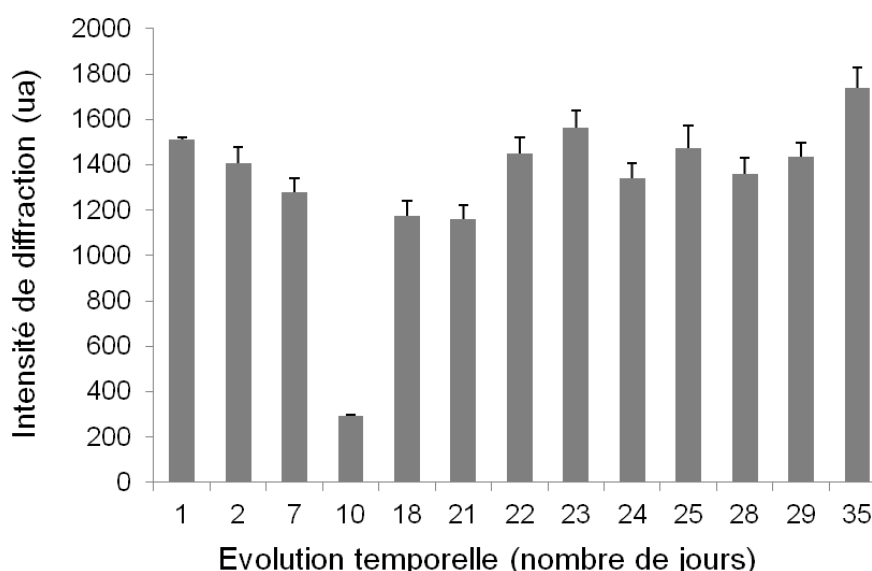


Figure 31 : Evolution de l'intensité de diffraction d'un même réseau, composé de lignes de résine SU-8, sur 35 jours (moyenne sur 20 mesures)

La valeur positionnée sur le graphique correspond au maximum de l'intensité de diffraction relevée sur le réseau. De façon générale, les intensités de diffraction enregistrées sont clairement variables d'un jour à l'autre. Avec une moyenne située autour de 1400 ua, les écarts observés sont importants (jusqu'à 33 % entre chaque valeur). Une forte chute de l'intensité de diffraction est visible le 10^{ème} jour d'utilisation, reporté sur le graphique. Cette valeur très faible (291 ua) provient en réalité d'un dérèglement d'un des composants du système optique. Un des miroirs s'était légèrement décalé, provoquant ainsi une sortie du faisceau lumineux en dehors de la photodiode. Une étape de calibration a donc été nécessaire pour rétablir le cheminement lumineux au sein du système optique. Les mesures du 10^{ème} jour sont exclues des traitements. Les mesures de contrôle ont suivi leur cours

après la recalibration du scanner. Cependant, on constate encore de fortes variations de l'intensité de diffraction sur la série de 35 jours.

	<i>Intensité moyenne sur la série de 35 jours collectée sur le même réseau (ua)</i>	<i>Ecart type</i>
<i>Avant recalibration</i>	1399	9 %
<i>Après recalibration</i>	1411	12 %

Tableau 6: Une recalibration a eu lieu le 10^{ème} jour. Moyenne et écart type de l'intensité de diffraction avant et après recalibration, enregistrée sur un même réseau

Le *Tableau 6* récapitule l'intensité de diffraction moyenne collectée avant et après recalibration de la machine. Nous constatons que cette étape n'a pas permis d'améliorer les fluctuations entre les valeurs mesurées (9% de variation entre les valeurs mesurées avant recalibration et 12 % après). Nous avons vu que l'intensité de diffraction mesurée dépend de plusieurs paramètres propres au réseau périodique étudié (dimensions et indice de réfraction). C'est le même réseau en SU-8 qui est étudié donc ces grandeurs ne varient pas au cours du temps.

- ❖ **Les variations d'intensité de diffraction proviennent donc de l'appareil de mesure. Elles peuvent avoir plusieurs origines (positionnement de la lame dans le porte-échantillon, sensibilité à la température, mobilité des composants ...). Nous allons donc étudier ces différents points.**

Dérive thermique

Le scanner de lecture en diffraction est positionné dans une pièce où la température n'est pas contrôlée aussi précisément qu'en salle blanche. Nous avons souhaité étudier si les petites variations de température dans la pièce pouvaient perturber les mesures collectées par l'appareil. Pour cela, nous avons utilisé la lame de référence. Nous avons enregistré l'intensité diffractée provenant de 4 réseaux pendant 10 heures d'utilisation au cours d'une même journée. 20 mesures sont effectuées toutes les 15 minutes. La *Figure 32A* présente l'évolution de l'intensité de diffraction des 4 réseaux au cours de 10 heures de caractérisation. Les intensités de diffraction relevées fluctuent énormément au cours des 2 premières heures de mesure, tout comme à partir de la 6^{ème} heure. Les valeurs d'intensité mesurée entre 2 et 6 heures d'utilisation sont relativement stables. Les intensités de diffraction des réseaux ne sont pas comparables entre elles mais les courbes affichent la même tendance d'évolution. Les fluctuations mesurées témoignent d'un phénomène global, commun à tous les réseaux présents sur la lame de référence.

Pour quantifier ces variations (ΔI), nous comparons la valeur de l'intensité relevée (I_{t+1}) avec la précédente (I_t), selon la formule suivante :

$$\Delta I = (I_{t+1} - I_t) / I_t$$

La Figure 32B présente ces variations au cours des 10 heures d'utilisation. Pour les mesures effectuées entre 3 et 5 heures d'utilisation, la courbe de variations est quasi plane. Cela démontre une stabilité des mesures dans cette période temporelle. En moyenne, les variations d'une mesure sur la précédente sont proches de 2 % dans cette zone pour les 4 réseaux confondus (maximum de 3.4%). Dans cette période temporelle, peu de fluctuations sont observées et le scanner de lecture est donc stable. Avant 3 heures d'utilisation, les variations d'une mesure sur la précédente sont comprises dans une gamme de -20 à +20 % (moyenne de 9 %). Ces variations sont très grandes puisque rappelons que les réseaux présents sur la lame sont figés et la lame n'est pas déplacée du porte-échantillon. Après 5 heures d'utilisation, les variations sont comprises entre une tranche de -10 et +10 %. Le même type d'oscillations est observé, bien que plus faible en amplitude (moyenne de 4%).

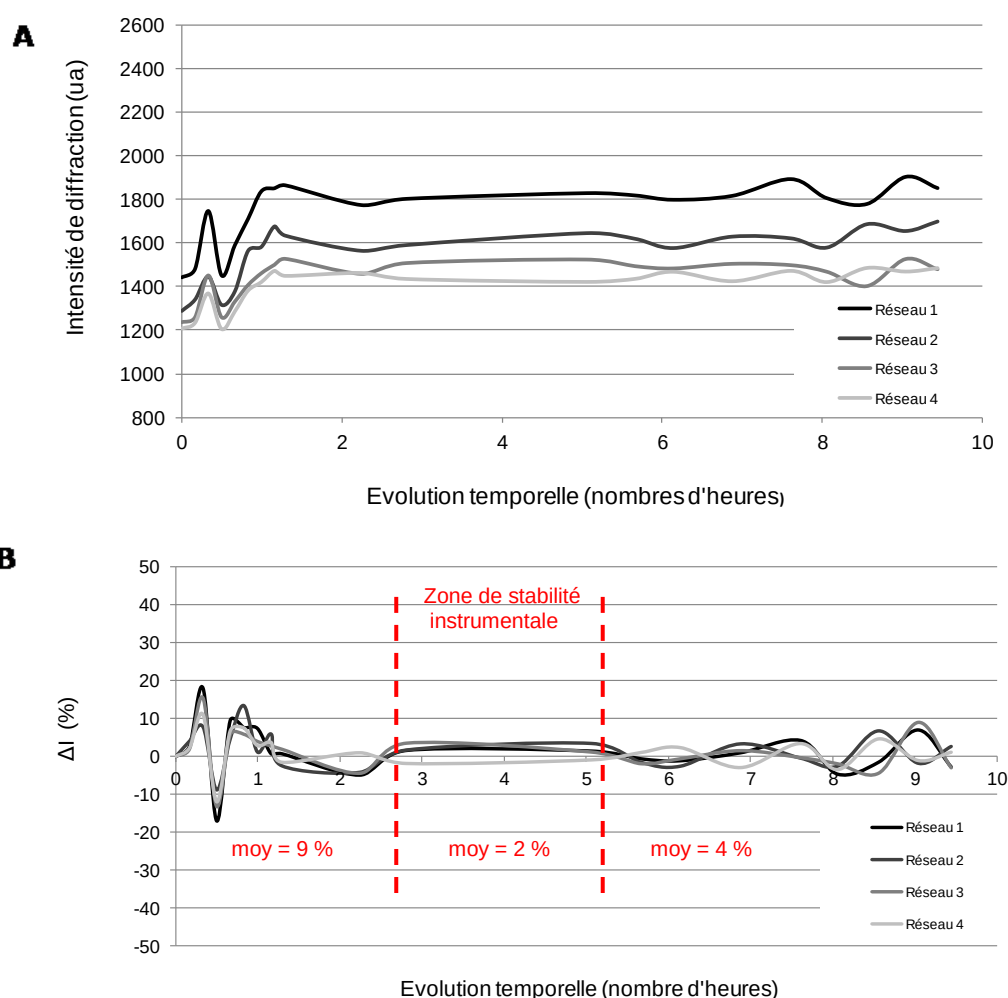


Figure 32 : (A) Evolution de l'intensité de diffraction de 4 réseaux de référence au cours d'une journée de mesure (série de 20 mesures toutes les 15 minutes) (B) Variation de l'intensité de diffraction mesurée par rapport à l'intensité de diffraction précédente

❖ Il semblerait que le scanner de lecture ait besoin d'une période de préchauffage d'environ 2 heures avant de se stabiliser. L'ensemble des composants nécessite sûrement une stabilisation en température lors du démarrage. Enfin, les variations de mesure observées après 6 heures d'utilisation témoignent d'une nouvelle instabilité de l'appareil.

❖ **Le prototype présente une forte dérive en température. Ces caractérisations mettent en avant l'extrême nécessité d'asservir le scanner de lecture en température. Cette option n'était pas présente pour la version 1 du prototype mais elle a été ajoutée pour la version 2.**

Le laser de la version 2 du prototype est asservi en température. Afin de contrôler son comportement vis-à-vis des fluctuations thermiques, le scanner est positionné dans une étuve. Les tests en étuve permettent d'évaluer la réponse du prototype à une modification de température. Une lame de référence est analysée pendant 2 heures à 15°C, puis l'étuve augmente de 5°C toutes les 45 minutes jusqu'à 35°C. 10 mesures environ sont effectuées à chaque température. Les mesures commencent dès l'allumage de l'appareil, il n'y a pas de préchauffe. Les mesures d'intensité de diffraction d'un réseau de référence sont présentées par la *Figure 33*.

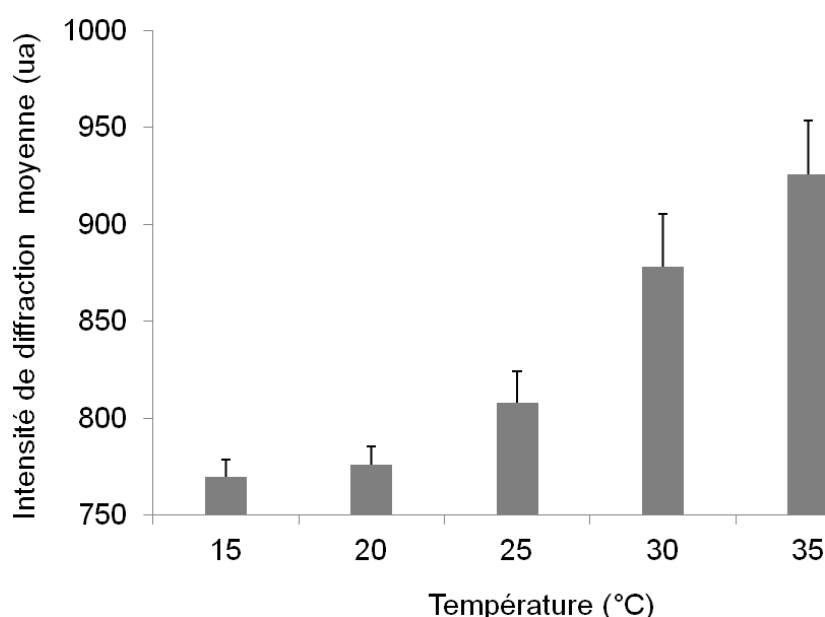


Figure 33 : Intensité de diffraction moyenne émise par un réseau de diffraction réalisé en SU-8 en fonction de la température en étuve

L'intensité de diffraction émise par le réseau de référence évolue en fonction de la température. Nous constatons que pour les faibles températures (15 et 20°C), les valeurs mesurées sont cohérentes (respectivement 770 et 776 ua) avec des écarts type de 2 %. A 25°C, cet écart augmente pour atteindre 4% de variation au sein de la série de mesures. Enfin, les écarts observés dans la série de mesures effectuées à 30°C et 35°C sont plus élevés (5-6%) tout comme les valeurs d'intensité enregistrées.

❖ **Les variations de mesure provenant du prototype 2 sont acceptables entre 15 à 25°C (2-4% selon les spécifications). Bien que le laser présente un asservissement en température, on voit apparaître une dérive du scanner avec la température à partir de 25°C. L'analyse du signal médian au lieu du signal maximum confirme le même comportement. Il est donc important de contrôler la température de la pièce où est positionné le scanner.**

Dérive spatiale

L'échantillon à analyser est maintenu dans le scanner de lecture par un porte-lame. La *Figure 34* offre trois vues différentes de cette pièce. Le porte échantillon est positionné sur l'axe lent de

déplacement, qui commande la mobilité de la lame à analyser selon un axe longitudinal, c'est-à-dire selon la longueur de la lame (*Figure 34A*). Le porte lame fabriqué en aluminium présente une rainure afin de guider la face supérieure de la lame (*Figure 34B et C*). Son insertion dans la pièce est assurée par des roulettes mécaniques qui exercent en même temps une petite pression sur la face inférieure de la lame pour la maintenir contre la rainure. Le maintien de l'échantillon dans l'appareil est donc assuré de façon mécanique.

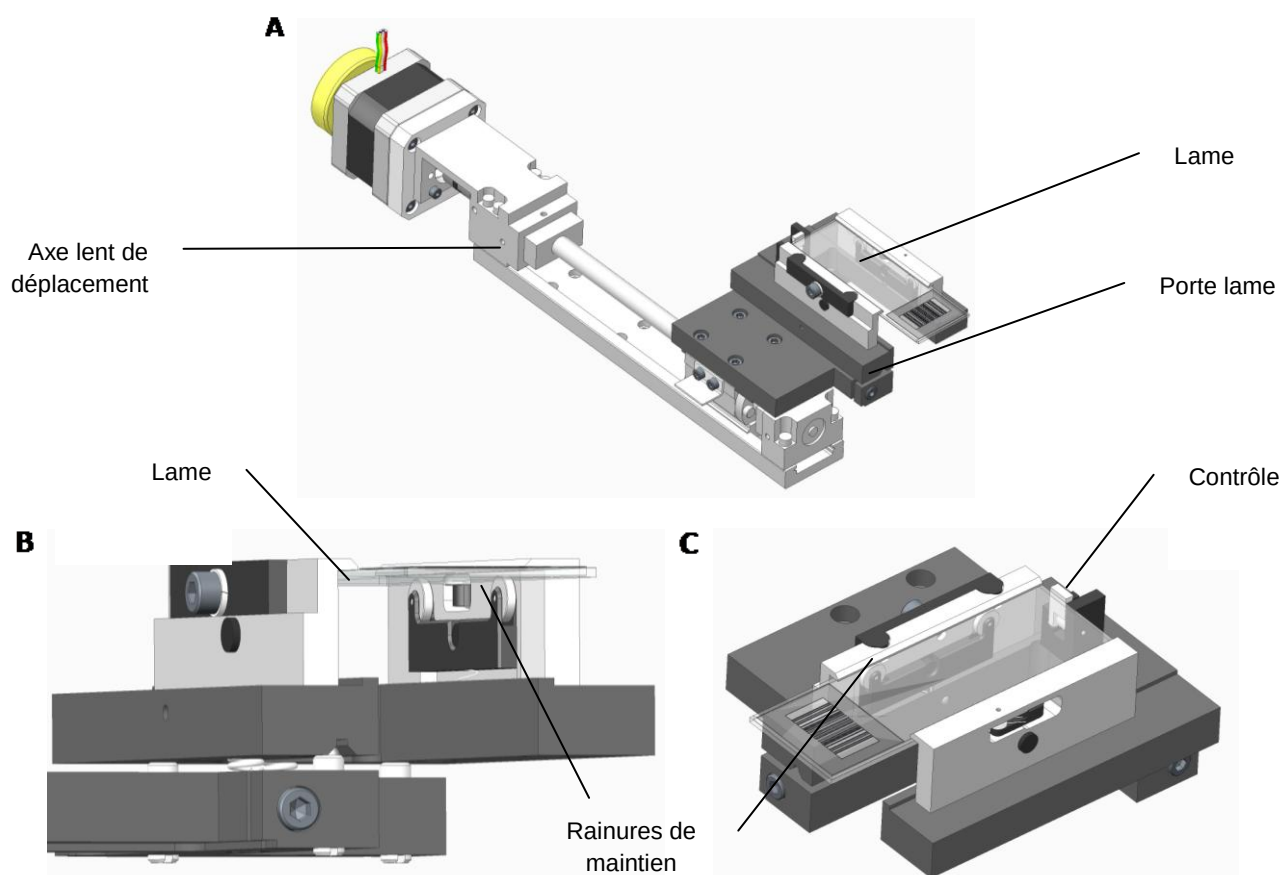


Figure 34 : (A) Axe lent de déplacement portant le porte échantillon en son extrémité (B) Vue transverse du porte échantillon composé d'une rainure et de roulettes mécaniques pour insérer la lame à étudier (C) Vue de dessus du porte échantillon

Pour effectuer des tests de biodétection basés sur la diffraction, l'intensité diffractée d'un réseau est comparée avant et après interaction avec la solution à analyser. La partie biologique de l'expérience est donc réalisée en dehors du scanner de lecture. Ce principe de manipulation ex-situ impose un retrait, suivi d'un repositionnement de la lame dans la machine. Lors du traitement d'images, le logiciel relève le maximum de l'intensité de diffraction sur une fenêtre d'analyse définie par l'utilisateur. Pour que les analyses soient comparables, cette fenêtre doit être inchangée. Aussi, il est capital de replacer la lame à l'identique dans le scanner. La pièce porte-échantillon ou guide-lame est étudiée.

Nous souhaitons dans cette partie comparer l'impact de ce paramètre sur les mesures. Pour cela, nous allons mesurer l'intensité de diffraction émises par des réseaux figés en résine SU-8, présents sur une lame de référence. Une série de 10 mesures est effectuée sur chaque réseau, selon deux cas de figures : avec la lame retirée et replacée dans l'appareil entre chaque mesure et avec la lame

immobile dans l'appareil pour la totalité des mesures. Les effets de la dérive en température mis en avant dans le paragraphe précédent sont négligeables ici car ces tests sont effectués sur une période très courte dans la zone de stabilité de l'appareil de lecture (erreur moyenne intrinsèque dans cette zone = 2%).

Le *Tableau 7* présente le coefficient de variation (CV) des ces mesures. Rappelons que le CV représente la plus grande variation observée au sein d'une série de mesures.

	Prototype de diffraction Version 1 Avant réglages	Prototype de diffraction Version 1 Après réglages	Prototype de diffraction Version 2
CV (%) avec repositionnement de la lame entre chaque mesure	Gamme de 4 à 30	Gamme de 2 à 9	Gamme de 1 à 2
CV (%) sans repositionnement de la lame entre chaque mesure	Gamme de 2 à 6	Gamme de 2 à 6	Gamme de 2 à 4

Tableau 7 : Coefficient de variation calculé pour une série de 10 mesures sur 4 réseaux de référence selon les différentes versions du scanner de lecture

Pour la version 1 du scanner de lecture, les CV calculés sont plus élevés lorsque la lame est retirée et repositionnée entre chaque mesure. Ce point est problématique car lors d'un test de biodétection, la lame va effectivement être déplacée entre chaque mesure. Le porte échantillon est remis en cause. Des améliorations techniques ont été apportées pour la version 2.

❖ **Ce prototype de lecture permet d'obtenir dorénavant des variations de mesure bien plus faibles, qui sont comprises dans une gamme de 1.5 à 4 %. Par rapport aux spécifications définies dans le cahier des charges (< 5 %), ces valeurs sont acceptables.**

vii. Récapitulatif

Le *Tableau 8* récapitule les caractéristiques techniques des deux prototypes de diffraction développés.

	Prototype de diffraction Version 1	Prototype de diffraction Version 2
Tolérance alignement	$\pm 0.7^\circ$	$\pm 3^\circ$
Diamètre faisceau	400 μm	70 μm
Préchauffe	oui (3 hrs)	non
Variations dues à la dérive thermique	De 5 à 6 % jusqu'à 25°C De 8 à 10 % de 25 à 35°C	De 2 à 4 % jusqu'à 25°C De 5 à 6 % de 25 à 35°C
Variations dues à la dérive spatiale	De 2 à 9 %	De 2 à 4 %
Variation intrinsèque totale	De 5 à 10 %	De 2 à 6 %

Tableau 8 : Récapitulatif des spécifications techniques des deux prototypes de lecture en diffraction développés

❖ **Une amélioration nette du prototype a permis d'obtenir un outil de lecture qui est maintenant utilisable pour des analyses de biodétection.**

d. Applications

En marge des développements techniques effectués pour la fabrication de l'instrument de mesure, une réflexion plus globale est nécessaire pour positionner cet outil sur le marché de la biodétection. Le point fort de la technique de biodétection mise en place concerne la généricité du principe de lecture. Il en est de même au niveau de la fabrication des échantillons. Les concepts ont été développés dans cette optique afin de mettre au point des procédés standards, relativement faciles à transférer pour différentes finalités. Ainsi, la versatilité de la biodétection par diffraction nous permet de cibler différents secteurs (sécurité, santé, agroalimentaire, diagnostic médical ...) bien que les entités biochimiques mises en jeu soient très variées.

Au sein de ce travail de thèse, deux types de détection sont étudiées. La biodétection de protéines a été ciblée dans un premier temps. Les applications visées touchent la fabrication et la lecture de biopuces basées principalement sur des anticorps. Dans un second temps, la détection d'hybridation de brins d'ADN a été abordée. Bien que les molécules utilisées soient de nature différente, le principe de biodétection reste identique : collecter l'intensité diffractée émise par des réseaux moléculaires au cours d'interactions biologiques. Il s'agit de déterminer si la technique de biodétection basée sur la diffraction est viable pour des biopuces à protéines et des biopuces à ADN.

III/ Validations expérimentales

Dans cette partie, nous effectuerons les premiers tests biologiques avec le scanner de lecture en diffraction. Dans un premier temps, nous évaluerons expérimentalement les paramètres qui modulent l'intensité de diffraction émise par un réseau de molécules. Les réseaux sont déposés par microcontact printing (μ CP) sur une lame de verre oxydée par traitement plasma O_2 ou sur des substrats fonctionnalisés. Ils sont composés de lignes de 500 nm avec une périodicité fixe de 1 μ m. Nous étudierons l'influence de la concentration de l'encre utilisée sur le timbre pour imprimer les réseaux, l'influence des lavages et enfin l'influence de la chimie de surface sur l'intensité diffractée. En dernier lieu, nous étudierons la signature diffractive de réseaux bi-fonctionnels au cours de protocoles complets de biodétection portant sur des couples moléculaires simples (biopuces à protéines et biopuces à ADN). Les mesures sont effectuées à partir du prototype de diffraction version 2.

1. Etude des paramètres influant sur l'intensité diffractée

a. Influence de la concentration de la solution d'encrage

Nous cherchons ici à déterminer quel est le lien entre la concentration de la solution d'encrage et le réseau périodique déposé, en termes de dimension (épaisseur des lignes) et d'intensité diffractée. Pour cela, un timbre de PDMS nanostructuré par des lignes de 500 nm au pas fixe de 1 μ m, est encré avec une solution de streptavidine (temps d'encrage 2 min30) dont la concentration varie entre 10 et 200 μ g/mL. Le timbre est ensuite séché sous un flux léger d'azote puis mis en contact avec une lame de verre oxydée par traitement plasma O_2 (temps de contact : 2min). Les réseaux générés sont alors caractérisés par AFM puis en diffraction.

Dans un premier temps, les analyses AFM consistent à imager la surface des réseaux moléculaires sur plusieurs fenêtres (généralement de 10 μ m x 10 μ m) pour relever la hauteur des lignes par le biais de profils transversaux en mode contact et à l'air. La *Figure 35A* présente les images AFM de réseaux périodiques obtenus avec une solution d'encrage à 10 μ g/mL et celle de droite à 200 μ g/mL. Les lignes observées sont denses et homogènes. Il apparaît cependant une meilleure homogénéité au sein même des lignes, pour l'image du réseau déposé avec la solution de concentration 200 μ g/mL. Les molécules étant plus nombreuses en solution, elles sont donc transférées en plus grande quantité au sein des motifs. L'épaisseur des lignes est ensuite analysée. La *Figure 35B* est un graphique représentant l'épaisseur des lignes d'un réseau en fonction de la concentration de la solution de streptavidine encrée sur le timbre. Les lignes déposées avec un timbre encré à 10 μ g/mL ont une épaisseur de 7 nm. Cette épaisseur augmente de manière croissante, plus l'encre de la solution est concentrée. A 200 μ g/mL, les lignes mesurent 12 nm d'épaisseur. Cependant, la relation entre ces deux variables n'est pas linéaire. Il y a un certain palier à partir de 100 μ g/mL, ce qui confirme les précédentes expériences témoignant de l'existence d'une valeur maximale de concentration au-delà de laquelle les couches déposées ne seront pas forcément plus épaisses.

L'intensité de diffraction émanant de ces réseaux périodiques est ensuite mesurée. La *Figure 35C* illustre les intensités collectées à l'ordre 1 provenant des réseaux moléculaires en fonction de la concentration de l'encre utilisée.

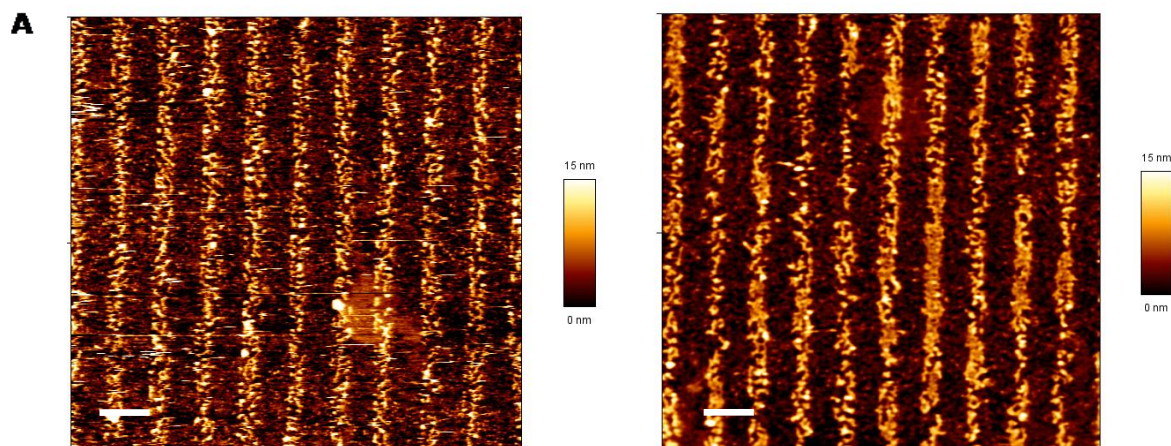
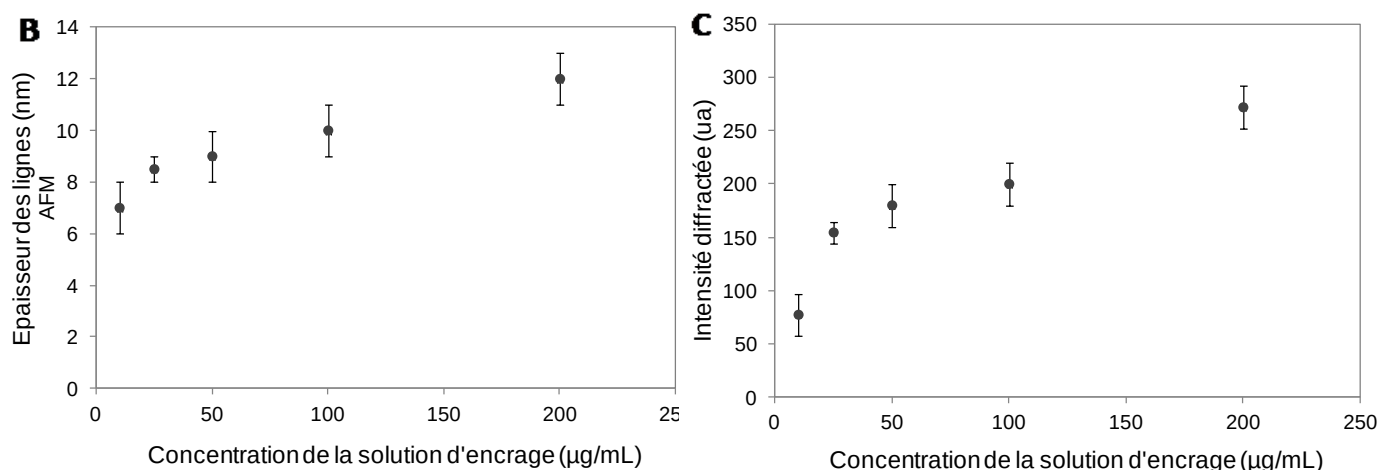
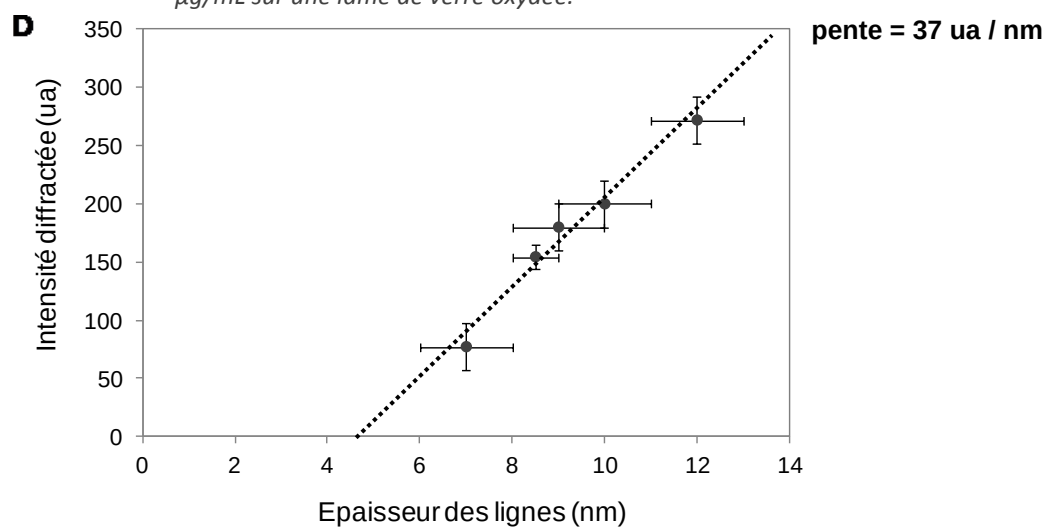


Figure 35 : (A) Images AFM d'un réseau périodique (500 nm au pas fixe de 1µm) déposé par µCP avec un timbre en PDMS encre par une solution de streptavidine à (gauche) 10 µg/mL et (droite) 200 µg/mL en mode contact et à l'air. Barre d'échelle : 1 µm.



Epaisseur des lignes (B) et Intensité de diffraction (C) de réseaux périodiques (500 nm au pas fixe de 1µm), déposés par µCP avec un timbre en PDMS encre par une solution de streptavidine à 10, 25, 50, 100 et 200 µg/mL sur une lame de verre oxydée.



(D) Regroupement des deux graphiques précédents afin d'exprimer l'intensité de diffraction en fonction de l'épaisseur des lignes du réseau analysé. Ce graphique nous donne l'équivalence d'un changement d'intensité diffractée induit par une variation d'épaisseur de lignes : 37 ua / nm.

Plus la solution de streptavidine est concentrée, plus le réseau diffracte la lumière. Il y a donc une corrélation entre ces deux paramètres, qui n'est pas de type linéaire. On retrouve la même tendance que le graphique précédent. Si on couple les deux graphiques B et C, il est possible d'obtenir l'évolution de l'intensité de diffraction d'un réseau en fonction de l'épaisseur des lignes qui le composent. Ce graphique est présenté en *Figure 35D*. Une relation quasi linéaire relie ces deux paramètres. Ce graphique pourra être utilisé ultérieurement comme étalon afin d'attribuer à chaque variation d'intensité ΔI , une augmentation ou diminution des lignes d'un réseau Δe si les mesures sont effectuées dans les mêmes conditions (couple de puissance laser (P) et gain (G) particulier, qui dans notre cas est $P=4\text{mW}$ et $G=3.6$). La sensibilité de la lecture en diffraction dans ces conditions est de 37 ua/nm .

❖ **Nous venons donc de confirmer expérimentalement que l'intensité de diffraction émise par un réseau périodique dépend de l'épaisseur des lignes qui le composent. C'est sur cette théorie que s'appuie le principe de biodétection par diffraction.**

b. Influence des lavages

L'épaisseur des lignes composant un réseau influe fortement sur l'intensité de diffraction du réseau. Il est primordial que les réseaux déposés soient donc stables dans le temps, pour constituer une base fiable d'analyses au cours des tests de biodétection. Nous souhaitons caractériser l'évolution d'un réseau moléculaire dans des conditions de manipulations expérimentales. Au cours des protocoles expérimentaux, de nombreux lavages sont présents. Aussi, nous allons comparer l'intensité de diffraction d'un réseau moléculaire avant et après lavage pour constater les effets d'un tel passage en milieu liquide sur le signal de diffraction.

Un timbre structuré (lignes de 500 nm au pas de $1\mu\text{m}$) est encré avec une solution de streptavidine, variant de 10 à $200 \mu\text{g/mL}$ selon les conditions décrites au chapitre III. Les réseaux sont déposés par μCP sur deux types de substrat : une lame de verre oxydée et une lame fonctionnalisée époxyde. Une image AFM du réseau est effectuée après impression moléculaire, ainsi qu'une mesure de l'intensité diffractée. Ensuite, un léger lavage au PBS $1\times$ (3min , sous agitation contrôlée mais faible) est effectué pour éliminer les molécules faiblement liées à la surface de l'échantillon. Un seul lavage est nécessaire car c'est le 1^{er} passage en liquide qui permet de désorber la plupart des entités faiblement liées à la surface. Une seconde analyse AFM est menée, ainsi qu'une lecture en diffraction du substrat rincé.

La *Figure 36* présente la comparaison des caractérisations AFM effectuées sur une fenêtre de $10 \mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$ sur le réseau périodique. L'image A correspond au réseau de lignes de streptavidine après μCP sur une lame de verre simplement oxydée. Les lignes sont bien définies et leur épaisseur atteint une dizaine de nanomètres. L'image B correspond au même réseau imagé après le léger lavage au PBS. Les lignes sont pratiquement indiscernables. Beaucoup de molécules ont désorbé entre les lignes des réseaux pour venir combler les creux et se lier à la surface de la lame de verre oxydée.

Nous constatons ici l'importance d'une chimie de surface qui fixe les molécules de manière covalente.

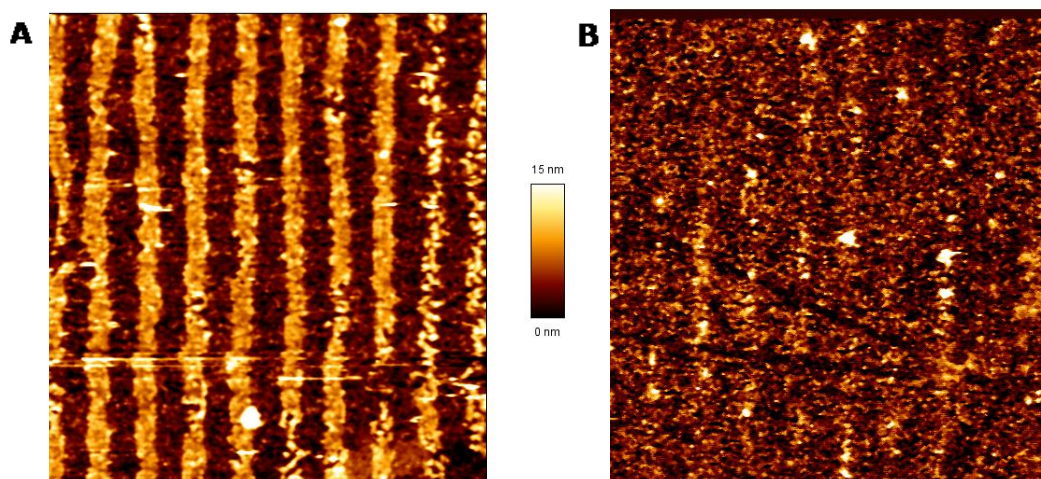


Figure 36 : Images AFM d'un réseau périodique (500 nm au pas fixe de 1 μ m), déposés par μ CP avec un timbre en PDMS encre par une solution de streptavidine à 100 μ g/mL sur une lame de verre oxydée (A) après l'étape d'impression (B) après un léger lavage au PBS.

Nous mesurons maintenant l'intensité de diffraction de ces réseaux périodiques avant et après lavage grâce au prototype de lecture. La Figure 37 présente les variations d'intensité de diffraction avant et après lavage en fonction de la concentration de la solution d'encrage.

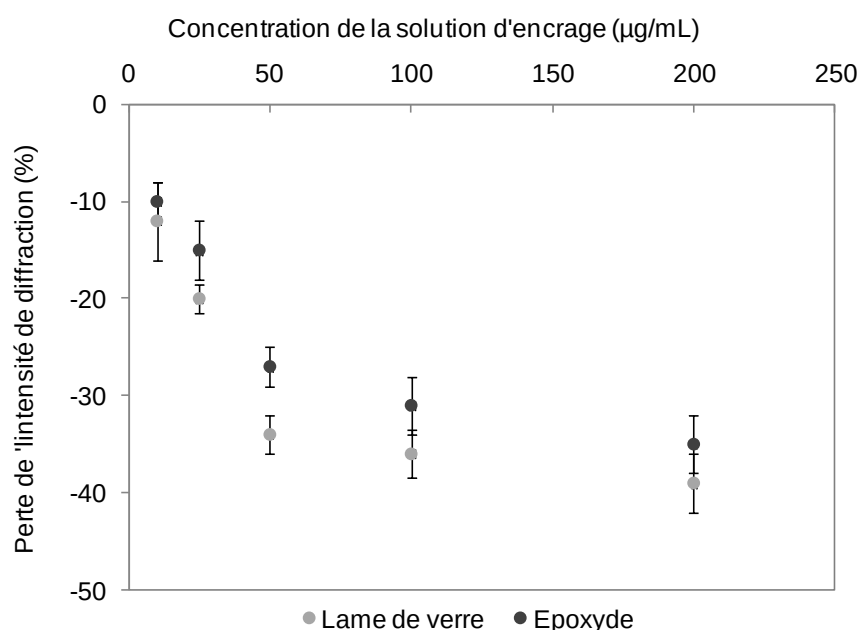


Figure 37 : Intensité de diffraction mesurée après un léger lavage émise par des réseaux périodiques composés de lignes de 500 nm au pas de 1 μ m, déposés par μ CP avec une solution de streptavidine de concentration différente

Les valeurs sont exprimées en termes de perte d'intensité, c'est-à-dire que l'on compare l'intensité de diffraction avant l'étape de lavage par rapport à celle d'après. Nous constatons que plus l'encre est concentrée, plus la perte du signal de diffraction est importante après lavage. Pour un réseau déposé avec une solution de streptavidine à 200 μ g/mL, l'intensité de diffraction collectée réduit de près de 40 % alors qu'à 10 μ g/mL, la perte du signal est de 12%. Ce résultat paraît cohérent car généralement plus la solution d'encrage est concentrée, plus le matériel biologique est transféré sur

l'échantillon est important. Cependant, toutes les molécules transférées ne sont pas fortement liées à la surface. Comme la perte du signal est imputée à une diminution de l'épaisseur des lignes des réseaux, cela signifie que des molécules ont désorbé de la surface au cours du lavage.

La même tendance est observée quel que soit le substrat utilisé. Pour le substrat époxyde, les pertes d'intensité de diffraction sont moins importantes que pour la lame de verre. Cela signifie que les molécules ont moins tendance à se désorber de la surface quand l'échantillon est fonctionnalisé par des groupements époxydes. Dans ce cas, les molécules déposées créent de plus fortes liaisons avec le substrat. Cette expérimentation amène plusieurs remarques :

- ❖ Lors d'un protocole biologique complet, plusieurs incubations et lavages vont se succéder. Les réseaux périodiques se détériorent lors des différents passages en milieu liquide. Comme l'épaisseur des lignes des réseaux est directement reliée à l'information lumineuse collectée pour les analyses, il faut que les réseaux soient les plus stables possibles moléculairement et fortement reliés à la surface de l'échantillon. Une chimie de surface adéquate est donc préconisée pour fixer les réseaux moléculaires.
- ❖ Un blocage de surface ou une passivation est nécessaire pour éviter que les molécules désorbées ne se positionnent entre les lignes du réseau. Cette étape est primordiale pour interpréter correctement les signaux de diffraction collectés et ne pas superposer des effets parasites à l'information biologique utile.
- ❖ Plus l'encre du timbre utilisé pour déposer les réseaux est concentrée, plus le matériel biologique transféré sur la surface est important. Seule la couche en contact avec le substrat est fixée à la surface. Il faut donc essayer de travailler avec des couches moléculaires proches de la monocouche. On peut aussi prévoir un lavage supplémentaire après le dépôt des molécules sondes en réseau afin d'être sûr de ne conserver que les sondes accrochées à la surface à condition d'avoir optimisé des couches anti-adhésives entre les lignes afin d'éviter le re-dépôt des sondes.

c. Influence de la chimie de surface

Nous avons vu l'importance d'utiliser des substrats fonctionnalisés pour déposer les réseaux moléculaires afin de fixer au mieux les molécules transférées. Une chimie de surface induit cependant un bruit de fond. En fluorescence, cet effet est observable. C'est pourquoi pour toutes les analyses effectuées avec un scanner ou un microscope en fluorescence, le fond fluorescent autour des motifs d'intérêt est soustrait au signal relevé. Qu'en est-il si le principe de lecture n'est pas basé sur la fluorescence mais sur la diffraction ?

Nous souhaitons quantifier l'intensité émise par différents substrats : une lame de verre oxydée par traitement plasma O_2 , une lame fonctionnalisée avec une chimie époxyde et une lame fonctionnalisée avec une couche de dendrimères, que l'on appellera dendrilame ²⁶, sans qu'aucun réseau ne soit présent à leur surface. Dans ce cas, la chimie de surface amène une intensité diffuse, qui est collectée par le capteur et qui amène un bruit de fond préjudiciable en diffraction. Bien que notre capteur collecte l'intensité de diffraction à l'ordre 1, on ne peut dans cette étude parler

d'intensité diffractée puisqu'il n'y a pas d'arrangements périodiques sur la surface. La *Figure 38* présente les valeurs d'intensités lumineuses émanant des différents substrats. Les mesures sont effectuées à une puissance laser fixe de 4mW et à un gain variant de 1 à 8.

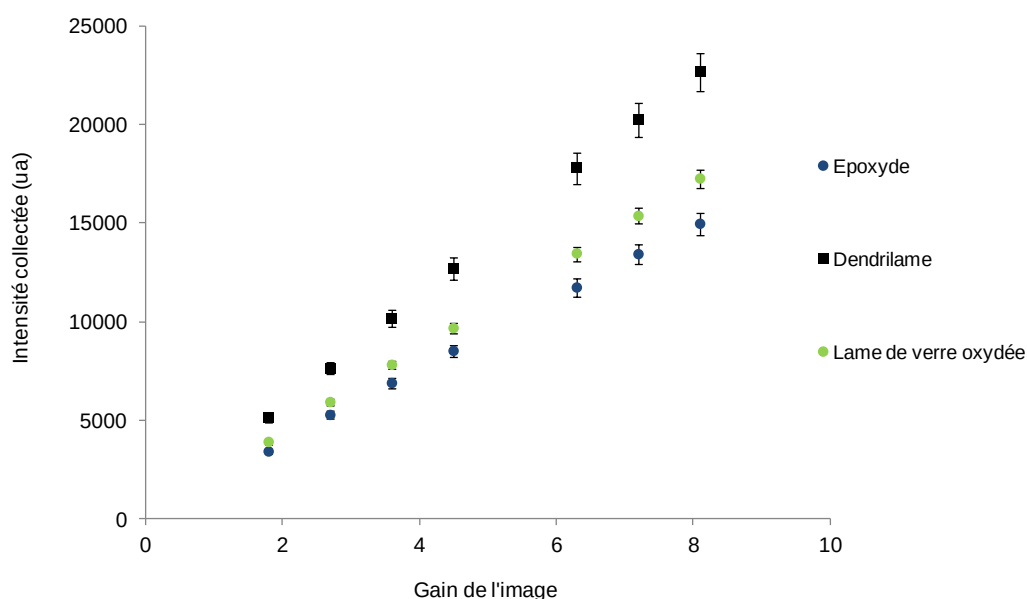


Figure 38 : Bruit de fond lumineux émanant de différents substrats analysés en lecture par diffraction. Les mesures sont effectuées avec une puissance laser fixe de 4 mW et un gain variant de 1 à 8.

De façon globale, le bruit de fond lumineux d'une lame fonctionnalisée époxyde est plus faible que pour les autres substrats. La lame de verre oxydée présente un fond lumineux plus élevé qu'une lame époxyde, mais relativement correct. Au contraire, les signaux émanant d'une lame fonctionnalisée avec des dendrimères sont les plus élevés.

A une puissance laser de 4mW et un gain de 1.8, un réseau moléculaire composé de lignes d'anticorps, d'une dizaine de nanomètres d'épaisseur, donne une intensité de diffraction autour de 15 000 ua. A ces conditions de lecture, le bruit de fond relevé pour les différents substrats est compris entre 3 000 et 5 000 ua. Cela signifie que plus d'un tiers du signal utile est bruité ou que le rapport signal sur bruit (S/B) est de 3. La *Figure 39* présente les images de l'intensité lumineuse collectée pour les 3 substrats (P=4mW et G=1.8). Qualitativement, il apparaît clairement que le fond lumineux d'une lame époxyde et d'une lame de verre oxydée est bien plus faible que le fond d'une lame fonctionnalisée avec des dendrimères.

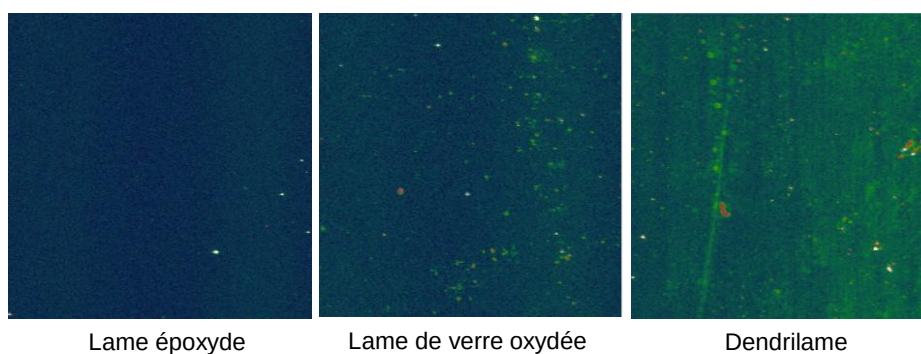


Figure 39 : Images du bruit de fond collecté sur chaque substrat à une puissance laser fixe de 4mW et un gain fixe de 1.8

- ❖ **Si l'on raisonne uniquement en termes de bruit de fond collecté par l'instrument de lecture en diffraction, les substrats : lame de verre oxydée et lame époxyde génèrent moins de perturbations lumineuses qu'une lame fonctionnalisée avec des dendrimères. Ce sont ces substrats qu'il faut donc favoriser et utiliser comme surface d'accueil pour déposer les réseaux moléculaires.**

Plus le gain des images augmente, plus le bruit de fond est grand. Les écarts entre les substrats se creusent aussi, au fur et à mesure de l'augmentation du gain.

- ❖ **Augmenter le gain d'une image permet d'exalter les signaux lumineux collectés. L'observation précédente confirme qu'il n'y a pas de discrimination dans cette amplification. Le signal utile amplifié, tout comme le bruit de fond parasite. Nous revenons ici sur l'importance de pouvoir discerner le signal de diffraction utile, provenant des réseaux moléculaires analysés, du signal indésirable, amené par le bruit de fond du substrat.**

Afin de comprendre l'origine de ces résultats, il faut remonter au principe physique utilisé. L'information collectée en diffraction correspond à la densité optique de l'échantillon, avec une forte contribution de la hauteur de la matière présente en surface. Aussi, un bruit de fond collecté en diffraction ne le sera pas forcément avec d'autres techniques de lecture, comme par exemple par fluorescence. Il faut donc être attentif à chaque contribution moléculaire. Nous avons étudié les substrats précédents en AFM afin d'observer précisément la quantité de matière présente sur la surface. La rugosité des différents substrats est analysée sur plusieurs fenêtres de $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$. Elle représente les variations d'épaisseur au sein de la chimie de surface. La Figure 40 présente les valeurs de rugosité obtenues. Les images AFM réalisées sont présentées par la Figure 41.

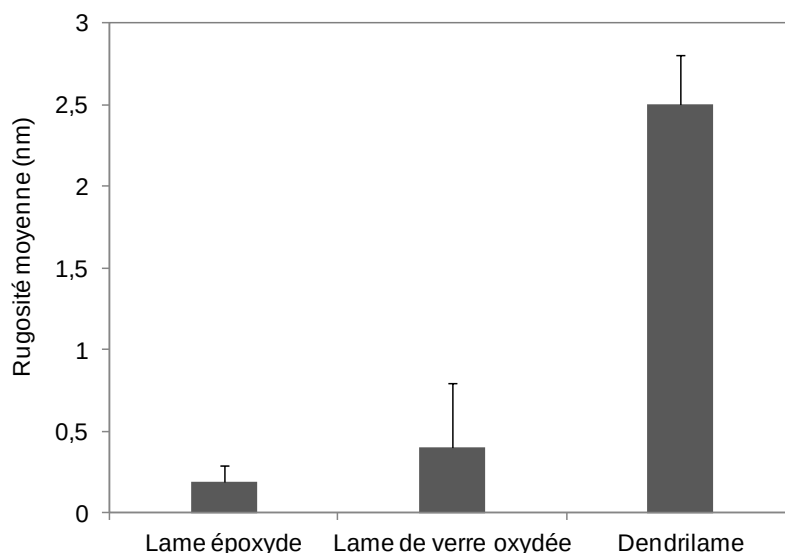


Figure 40 : Rugosité moyenne de différentes chimies de surface observées par AFM

La rugosité de la lame époxyde est la plus faible ($0.2 \pm 0.1\text{nm}$). Cette valeur témoigne donc d'une surface très lisse, avec de faibles variations de hauteur dans la chimie de surface époxyde. Cette tendance est confirmée par l'observation AFM, donnée par la Figure 41. Aucun relief particulier n'est détecté par la pointe AFM. La rugosité de la lame de verre oxydée est légèrement supérieure. Elle se

situé autour de 0.4 nm. Bien que plus rugueuse qu'une lame époxyde, la surface d'une lame de verre oxydée est relativement lisse. L'image AFM confirme cet aspect. Enfin, la dendrilame possède une rugosité de $2.5 \pm 0.3 \text{ nm}$. Cette valeur assez élevée est corrélée aux molécules utilisées pour fonctionnaliser ce substrat, qui sont des dendrimères. Les dendrimères peuvent être assimilés à des sphères de 7 nm de diamètre. Aussi, les multiples dendrimères constituant la chimie de surface de la lame, amènent une certaine rugosité de surface. Cette observation est confirmée par l'image AFM où l'on peut apercevoir une surface inhomogène. De nombreuses variations de hauteur sont visibles. Les amas de matière, de forme circulaire, sont dus à la présence des dendrimères qui composent la chimie de surface.

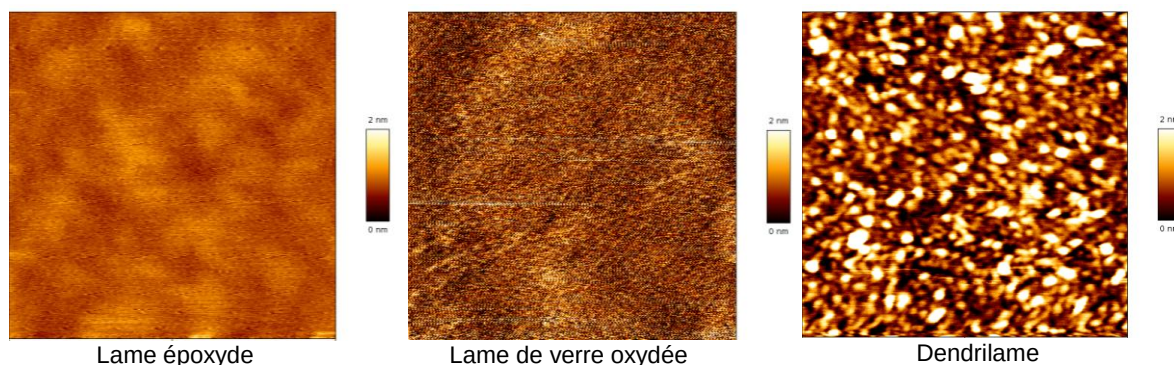


Figure 41 : Images AFM de différentes chimies de surface observées en mode contact et à l'air. Fenêtre de $1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$.

Les résultats amenés par l'étude du bruit de fond de différents substrats peuvent être corrélés à l'étude de rugosité précédente. En effet, on entrevoit un lien entre la rugosité de chimie de surface et le bruit de fond provoqué en lecture en diffraction. Plus un substrat possède une chimie de surface rugueuse, plus il réfléchira une intensité lumineuse parasite, que le scanner détecte.

- ❖ **D'un point de vue technique, il est nécessaire de travailler avec des surfaces les moins rugueuses possibles afin de limiter au maximum le bruit de fond parasite que le scanner de lecture en diffraction collecte. Sur cet aspect, les substrats lame de verre oxydée et lame époxyde paraissent nettement supérieurs, de part leur faible rugosité et donc leur faible bruit de fond.**
- ❖ **Cette optimisation n'est pas pertinente pour des méthodes de détection basées sur la fluorescence. On voit ainsi que les chimies de surface « habituelles » mises au point et optimisées pour les biopuces à lecture optique classique en fluorescence peuvent s'avérer contre-indiquées en diffraction.**
- ❖ **Il faut cependant faire attention aux groupements chimiques constituant la chimie de surface. Une lame de verre ne présente pas de chimie de surface puisqu'elle n'est pas fonctionnalisée avec des groupements particuliers. Comme elle est chargée négativement, des liaisons de type électrostatiques peuvent être réalisées. La lame époxyde permet quant à elle d'immobiliser les molécules déposées par des liaisons covalentes. Il est donc plus facile de fixer de façon stable et solide des molécules sur une lame époxyde, en particulier dans le contexte actuel où les précédents tests ont montré que les molécules déposées avaient tendance à désorber des lignes d'un réseau moléculaire. La lame**

époxyde paraît être le substrat le plus adapté à nos besoins. Les tests de biodétection se feront sur des lames époxydes.

2. Biodétection d'interactions protéines/protéines

Dans cette partie, nous allons utiliser les différentes chimies de surface bi-fonctionnelles développées au chapitre III comme substrat de base pour des analyses d'interactions moléculaires par diffraction. D'après l'étude comparative de ces chimies, il s'est avéré que les surfaces bi-fonctionnelles basées sur une couche de PLL-g-dextran déposée sur une lame époxyde et une couche de PEO sont celles qui limitent le plus les interactions non-spécifiques (90% d'adsorption non-spécifique en moins par rapport à une lame sans passivation). Nous allons donc utiliser ces substrats pour des tests de biodétection, suivis en diffraction.

La première étape de ce protocole consiste à réaliser les réseaux de diffraction, composés de lignes périodiques de molécules sondes. Selon les paramètres mis au point au chapitre III, des réseaux anticorps anti-GST sont déposés par μ CP sur des couches de PLL-g-dextran et des couches de PEO (50 μ g/mL). Les réseaux mesurent 1.2 mm de côté et les lignes ont une largeur de 500 nm à une périodicité de 1 μ m.

La *Figure 42* présente une image de 8 réseaux d'anticorps anti-GST, obtenue grâce au scanner de lecture. Les variations de couleur représentent les variations d'intensité du signal de diffraction à l'ordre 1 de chaque pixel de la surface. Plus un pixel est clair, plus le signal de diffraction collecté est fort. On distingue les formes géométriques des réseaux. Cependant, le signal de diffraction collecté n'est pas uniforme au sein des réseaux. Ces observations démontrent que de toutes petites variations de matière au sein des lignes, provenant de l'étape de dépôt par μ CP, sont détectables par le scanner. On comprend alors qu'il est primordial de considérer le signal moyen ou médian de diffraction au sein d'un réseau et non le maximum (comme établi précédemment).

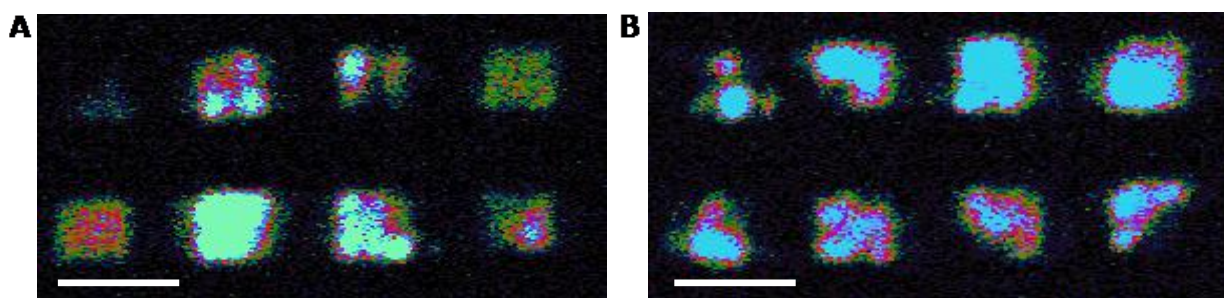


Figure 42 : Signal de diffraction à l'ordre 1 de 9 réseaux d'anticorps anti-GST déposés par μ CP (A) sur une couche de PLL-g-dextran (B) sur une couche de PEO. Barre d'échelle : 1 μ m.

Grâce à la technique de dépôt multiplexé développée au chapitre II, il est possible de déposer des réseaux moléculaires sur une lame entière, ce qui nous permet d'obtenir des résultats statistiques du signal de diffraction sur de nombreux réseaux. On peut ainsi commenter le comportement global des réseaux au sein d'une lame. Le *Tableau 9* présente le signal de diffraction moyen ($S_{\text{après dépôt}}$ défini d'après l'Équation 3) d'un échantillon de 20 réseaux d'anticorps anti-GST.

	Signal de diffraction moyen au sein de 20 réseaux	Ecart type
Anticorps anti-GST déposés sur une couche de PLL-g-dextran	20 186	3
Anticorps anti-GST déposés sur une couche de PEO	15 490	15

Tableau 9 : Signal de diffraction moyen collecté sur un échantillon de 20 réseaux d'anticorps anti-GST, déposés sur une couche de PLL-g-dextran et une couche de PEO (avec les mêmes paramètres de lecture du scanner)

Les surfaces bi-fonctionnelles subissent ensuite un lavage au PBS (1x, 5min sous agitation), afin d'éliminer les molécules sondes qui ne seraient pas immobilisées sur les couches de PLL-g-dextran ou de PEO. Le signal de diffraction des réseaux est à nouveau analysé ($S_{\text{après lavage}}$).

Enfin, une solution de PBS contenant des molécules de GST (5 μ g/mL), marquées en fluorescence est incubée sur la surface. 45 minutes plus tard, l'échantillon subit 3 lavages au PBS afin d'éliminer l'excès de molécules et est analysé en diffraction ($S_{\text{après interaction}}$).

La Figure 43 présente les signaux de diffraction moyens, relevés sur les 20 réseaux analysés à chaque étape du protocole avec une puissance laser de $P=4\text{mW}$ et $G=3.6$.

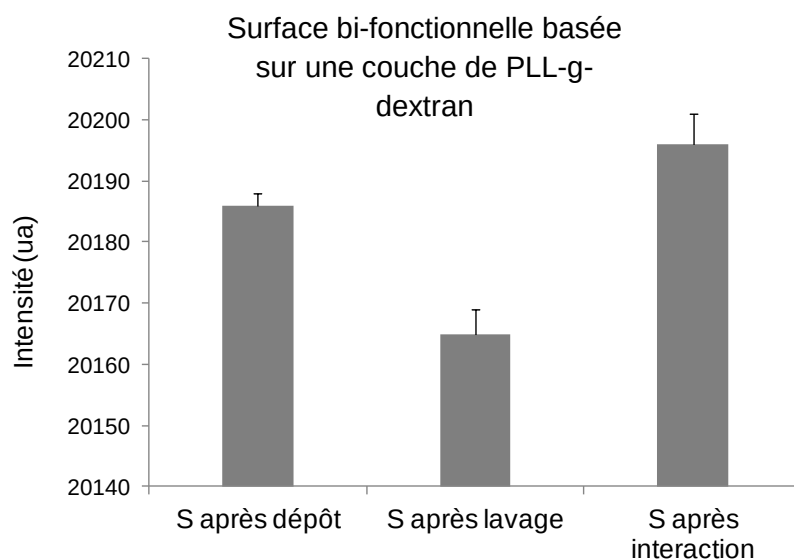


Figure 43 : Signal de diffraction moyen sur 20 réseaux, analysés après dépôt des réseaux d'anticorps anti-GST ($S_{\text{après dépôt}}$) sur une couche de PLL-g-dextran, après lavage ($S_{\text{après lavage}}$) et après interaction avec les molécules cibles de GST, marquées en fluorescence ($S_{\text{après interaction}}$).

Le signal de diffraction moyenné sur les 20 réseaux diminue après le léger lavage au PBS. Cette observation correspond aux molécules sondes, qui se sont désorbées. L'épaisseur des lignes a donc dû diminuer. Enfin, le signal de diffraction augmente après interaction avec les molécules cibles de GST (de 31 ua).

- ❖ Si l'on se réfère à notre courbe d'étalonnage présentée au III/1, cette variation correspond à un épaissement moyen des lignes d'environ 1 nm, qui pourrait donc effectivement refléter l'adsorption des molécules de GST (26 kDa) sur le réseau d'anticorps.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous observons la surface de l'échantillon en fluorescence. La lame comporte une zone de contrôle en fluorescence composée de larges plots d'anticorps anti-GST (160 μm au pas de 320 μm) déposés sur la couche de PLL-g-dextran et qui a subi le même protocole biologique. La Figure 44 présente l'image de cette zone de contrôle, présente sur la lame.

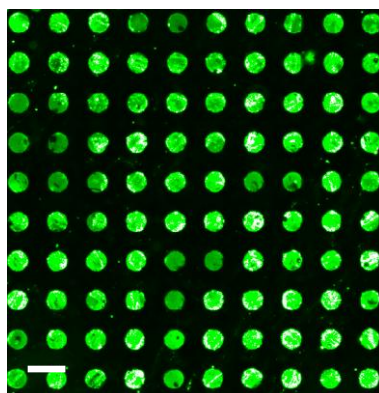


Figure 44 : Contrôle de l'interaction entre les plots d'anticorps anti-GST déposés sur la couche de PLL-g-dextran et les molécules de GST, marquées avec le fluorophore AF555. Barre d'échelle : 320 μm .

Les molécules de GST, marquées en fluorescence se sont adsorbées sur les plots d'anticorps anti-GST. Cette observation en fluorescence nous confirme l'interaction spécifique entre anticorps anti-GST et GST, que l'on a détecté en diffraction.

La même étude en diffraction est menée pour des réseaux d'anticorps anti-GST déposés sur une couche de PEO. La Figure 45 présente les signaux de diffraction relevés sur 10 réseaux après le dépôt des réseaux périodiques, le léger lavage au PBS puis après interaction avec la solution de GST. La zone de plots d'anticorps anti-GST, qui permet le contrôle en fluorescence de l'interaction avec les cibles GST, marquées est sur la droite de l'image.

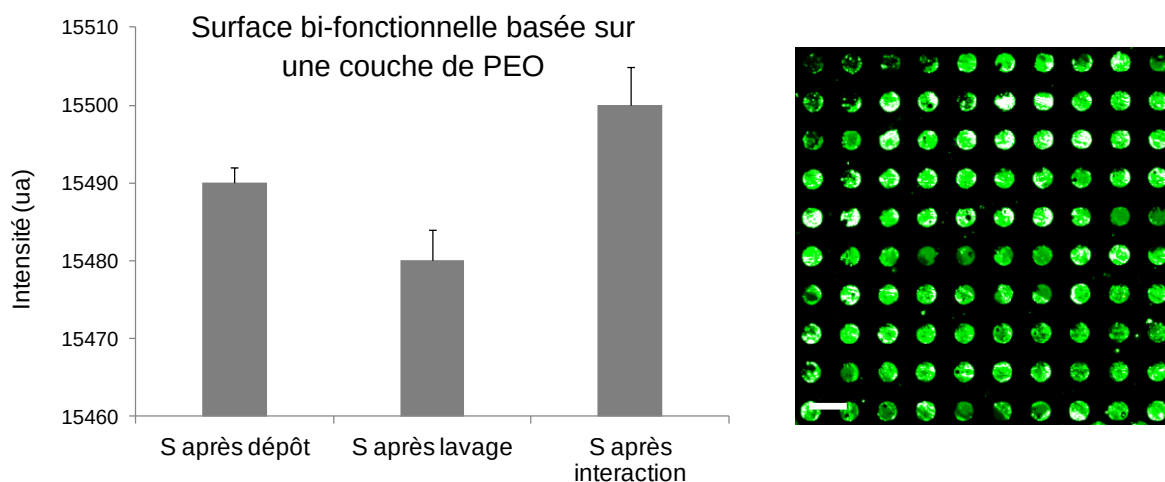


Figure 45 : Signal de diffraction moyen sur 10 réseaux, analysés après dépôt des réseaux d'anticorps anti-GST (S après dépôt) sur une couche de PEO, après lavage (S après lavage) et après interaction avec les molécules cibles de GST, marquées en fluorescence (S après interaction). Contrôle de l'interaction spécifique entre les anticorps anti-GST et les molécules de GST, marquées avec le fluorophore AF555. Barre d'échelle : 320 μm

Le signal de diffraction provenant des réseaux de diffraction diminue légèrement après le lavage des lignes d'anticorps anti-GST et augmente de 20 ua après interaction avec la solution contenant les

molécules cibles de GST. L'image de fluorescence nous confirme le bon déroulement de l'interaction entre anticorps anti-GST et GST.

Les variations d'intensité mesurées sont faibles. Rappelons que les molécules de GST sont des petites molécules (26 kDa) et que l'adsorption de ces molécules sur des lignes d'anticorps anti-GST n'amène qu'une très faible augmentation d'épaisseur.

- ❖ **Nous avons détecté une interaction de type protéines/protéines à une concentration de 100 nM grâce au système de biodétection par diffraction, et ce pour une protéine de faible poids moléculaire.**

3. Biodétection d'interactions ADN/ADN

Dans la large gamme d'applications biologiques, nous avons souhaité étudier le marché de la détection d'ADN. Les techniques de détection et de lecture de biopuces à ADN sont nombreuses. La détection d'hybridation d'oligonucléotides touche des domaines comme l'agroalimentaire, la défense ou même les applications biomédicales. Le projet *Innodiag*, développé au sein de notre équipe de recherche a pour objectif de détecter les récidives du cancer du sein chez la femme. Il s'agit dans un premier temps d'identifier des gènes spécifiques (collaboration avec des biologistes et des statisticiens) puis dans un second temps, de réaliser une biopuce possédant les fragments d'ADN spécifiques, immobilisés à sa surface. Ce projet nous permet d'initier la fabrication de réseaux basés sur des oligonucléotides et de les utiliser pour des tests de lecture en diffraction. Notons qu'il n'existe aucun outil commercial permettant de réaliser des microarrays ADN par lecture optique sans marquage. Ce travail a été mené en collaboration avec Julie Foncy, doctorante chez Dendris, partenaire du projet.

a. Concept de fabrication

Le principe des biopuces à ADN consiste à immobiliser un simple brin d'oligonucléotides sur un substrat, préalablement traité, puis de mettre en contact une solution à analyser, elle-même préalablement purifiée et éventuellement amplifiée par PCR (polymerase chain reaction). Si la solution contient la séquence nucléotidique complémentaire de celle immobilisée sur le substrat, les deux brins vont s'hybrider. Il faut alors faire appel à une technique de lecture pour traduire cette information biologique. Ces techniques sont généralement basées sur la fluorescence car il est possible de marquer les cibles en fluorescence, soit lors d'un processus impliquant une polymérase, soit lors d'une PCR si l'on souhaite amplifier les fragments nucléotidiques.

L'ingénierie de surface portant sur les biopuces à ADN est relativement plus mature que celle des protéines. La chimie de surface développée pour ces substrats est robuste et fiable. C'est pourquoi aucune étude n'a porté au préalable dans ce manuscrit sur le développement de chimie de surface, qui a déjà été mise en point par le passé. L'objectif de cette partie consiste à fabriquer des biopuces à ADN par lithographie douce, en comparant trois chimies de surface : une lame de verre oxydée, une lame époxyde et une dendrilame. Développée par E. Trévisiol *et al.*^{26 27}, une dendrilame est basée sur le greffage covalent de dendrimères de génération 4 sur une lame de verre fonctionnalisée APTES

(Figure 46). Ces dendrimères sont neutres, de forme sphérique (7 nm de diamètre) et possèdent 96 terminaisons aldéhydes, permettant ainsi de fixer des brins d'ADN possédant des terminaisons amines par des liaisons covalentes.

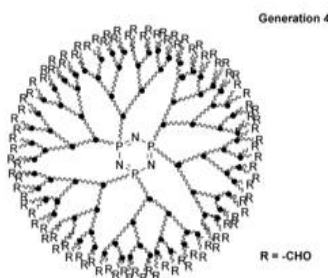


Figure 46 : Représentation d'un dendrimère de génération 4

L'avantage des dendrilames est qu'il est possible de réduire la surface chimiquement après fixation des brins d'ADN, afin de lier de manière covalente les brins d'ADN ($\text{COH} + \text{NH}_2 \Rightarrow \text{CNH}$) mais aussi de supprimer les interactions non spécifiques sur le reste de la lame en occupant les groupements aldéhydes disponibles.

Les biopuces seront ensuite utilisées pour des tests de détection d'hybridations. Les différentes étapes de structuration de ces substrats consistent à :

- déposer par μCP des réseaux périodiques composés de lignes d'oligonucléotides sur des substrats fonctionnalisés. Cette étape est schématisée par la Figure 47. Il s'agit ici de définir les conditions de dépôt pour obtenir des réseaux homogènes et d'analyser quelle chimie de surface permet d'immobiliser au mieux les oligonucléotides.

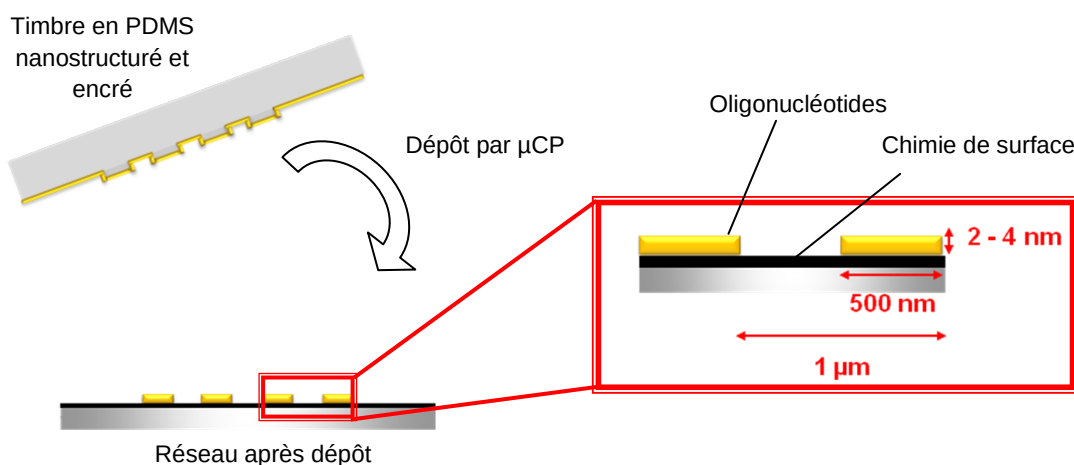


Figure 47 : Fabrication de réseaux périodiques (lignes de 500 nm de largeur au pas de 1 μm) composés d'oligonucléotides par impression moléculaire.

- réduire la surface grâce à une solution de NaBH_4 , si le substrat est une dendrilame.

L'échantillon est alors conformé dans un format de biopuce, qui peut alors servir de surface d'analyse pour des tests de biodétection en diffraction. Les étapes de lecture en diffraction sont réalisées avec la version 2 du prototype.

b. Fabrication de biopuce diffractante

Dans cette partie, nous souhaitons valider la première étape de fabrication de biopuce à ADN, qui porte sur le dépôt d'oligonucléotides en réseau périodique par impression moléculaire. Pour cela, il faut dans un premier temps déterminer certains paramètres comme les temps d'encrage, de contact ainsi que la bonne concentration de solution d'ADN. Puis dans un second temps, il s'agit de trouver la chimie de surface optimale qui permettra d'immobiliser les molécules déposées à la surface de la lame, sans que la rugosité de surface ne perturbe la lecture en diffraction. Nous avons vu dans le paragraphe précédent que ce point nécessite une attention particulière. Nous souhaitons dans cette batterie de tests comparer trois substrats, dont le bruit de fond amené par la chimie de surface a été étudié précédemment : une lame de verre oxydée par traitement plasma O_2 , une lame époxyde et une dendrilame.

Un timbre en PDMS comportant des réseaux de lignes (500 nm de large au pas de 1 μm) est encré avec une solution d'oligonucléotides simple brin de 25 bases, marqués NH_2 à une extrémité et Cy3 à l'autre. Les paramètres de dépôt sont étudiés afin d'obtenir des réseaux homogènes. Les paramètres optimums sont : 30 sec de temps d'encrage, 30 sec de temps de contact pour une solution à 0.5 μM . La Figure 48 présente les contrôles de ces dépôts obtenus en microscopie en fluorescence (A) et en AFM (B) sur une lame époxyde, une lame de verre oxydée et une dendrilame. Les images de fluorescence montrent une alternance de lignes fluorescentes et de lignes sombres. Les oligonucléotides sont bien déposés de façon contrôlée en réseau périodique, quel que soit le substrat.

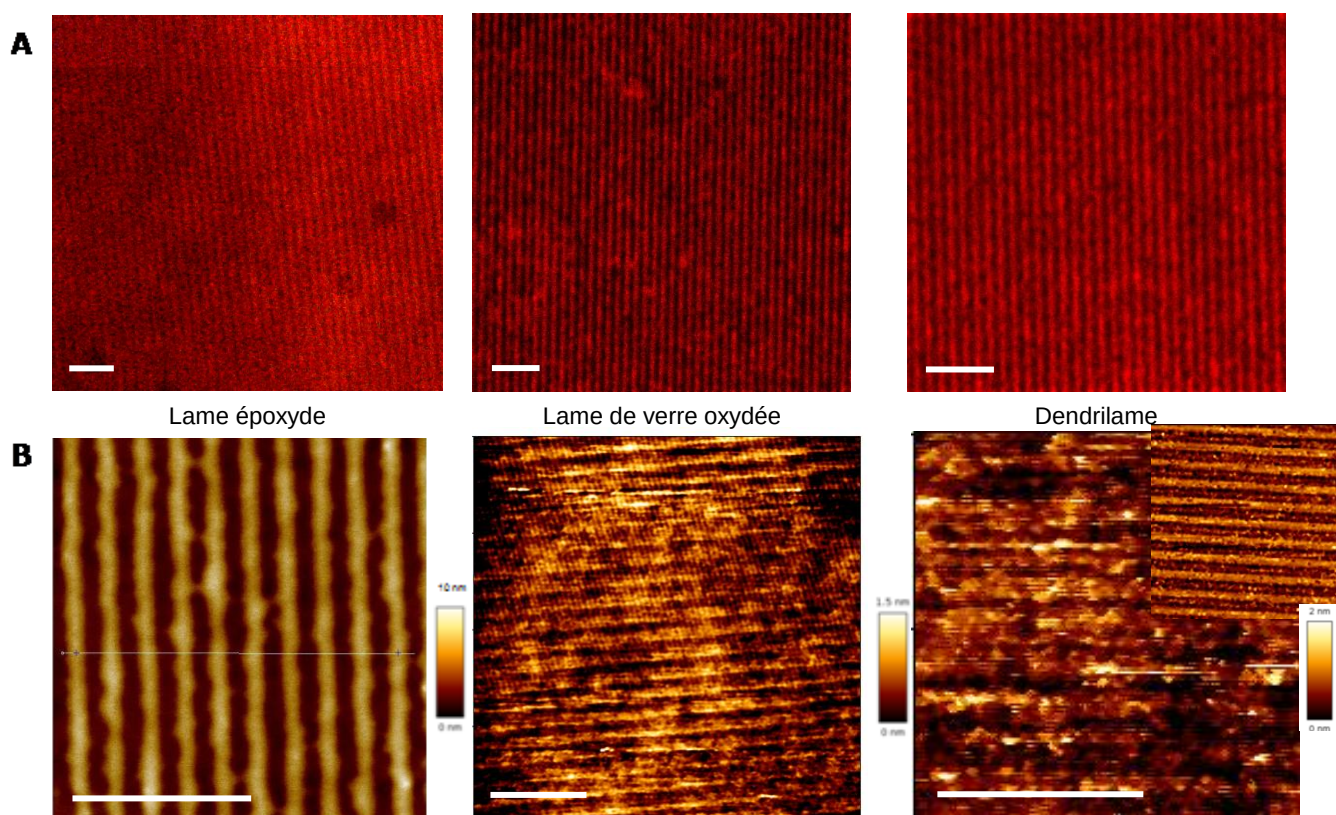


Figure 48 : Réseaux de lignes (500 nm au pas de 1 μm) composées d'oligonucléotides simple brin de 25 bases marqués Cy3 déposés sur une lame époxyde, une lame de verre oxydée et une dendrilame (A) observés en microscopie à fluorescence et (B) en AFM en mode contact et à l'air. Signal de hauteur. Barre d'échelle : 5 μm .

L'imagerie AFM nous permet de mesurer les hauteurs de ces structures. L'image AFM d'un réseau d'oligonucléotides (simple brin de 25 bases) déposé sur une lame époxyde montre que les lignes ont une hauteur de 10 nm. Pour un réseau déposé sur une lame de verre, les lignes d'oligonucléotides ont une épaisseur très faible, proche de 1 nm. Cette différence d'épaisseur peut être expliquée, soit parce que plus de matière biologique est déposée sur une chimie de surface de type époxyde, soit parce que la forte interaction de la pointe AFM avec la chimie époxyde perturbe l'interprétation directe des hauteurs. Or, l'intensité de diffraction du réseau d'oligonucléotides déposé sur la lame de verre est la même que celui déposé sur la lame époxyde donc les épaisseurs des lignes sont identiques. La chimie de surface époxyde perturbe les mesures AFM. Les lignes d'oligonucléotides mesurent donc 1 nm d'épaisseur. Sur la dendrilame, le contrôle en AFM n'a pas donné d'image exploitable de part la rugosité de la chimie de surface, très proche en épaisseur de celle des lignes du réseau. Cependant, le signal de déflexion latérale présenté en substitution montre une alternance de lignes de différentes natures qui tend à prouver le bon dépôt d'un réseau périodique.

- ❖ Nous avons validé le premier objectif de cette étude qui portait sur le dépôt d'oligonucléotides par μ CP selon des réseaux de périodicité submicrométrique. Les paramètres optimums sont : 30 sec de temps d'encrage, 30 sec de temps de contact pour une solution à 0.5 μ M.
- ❖ Le dépôt de réseau périodique, contrôlé par microscopie à fluorescence montre une bonne régularité des lignes d'oligonucléotides sur les trois substrats testés : la lame de verre oxydée, la lame époxyde et la lame fonctionnalisée avec des dendrimères.
- ❖ La caractérisation AFM de ces dépôts montrent que l'épaisseur des lignes constituant les réseaux est différente, à cause de l'interaction entre les différentes chimies de surface et la pointe AFM. Le signal de hauteur d'un réseau déposé sur la lame de verre, qui est le seul substrat sans chimie de surface et très peu rugueux, montre des lignes de 1 nm d'épaisseur.

c. Détection d'une hybridation simulée

Nous souhaitons utiliser ces réseaux périodiques d'oligonucléotides comme substrat d'analyse pour des tests de détection d'hybridation. Il faut donc vérifier que l'on peut détecter par lecture en diffraction la signature d'une hybridation d'ADN. Pour cela, nous allons générer deux types de réseaux. La *Figure 49* illustre le plan expérimental. Le premier type de réseau est composé d'oligonucléotides sondes, c'est-à-dire de fragments d'ADN simple brin (25b) (A). Le deuxième type de structure mime un réseau obtenu après une hybridation (B). Il est donc composé de fragments d'ADN, double brin (319 pb). La diffraction d'un faisceau lumineux par ces deux types de réseaux sera-t-elle différente, afin de nous permettre de différencier un réseau d'ADN sondes d'un réseau d'ADN après hybridation ? La sensibilité de la technique de lecture permet-elle d'envisager de détecter une hybridation ?

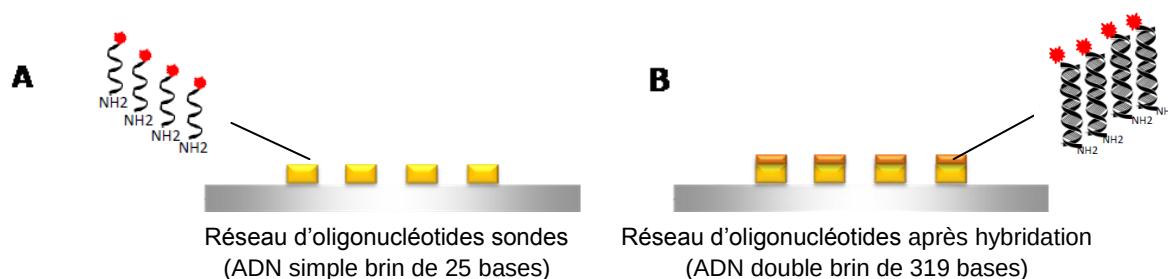


Figure 49 : (A) Réseau périodique (lignes de 500 nm au pas de 1 μm) composé de lignes d'ADN sondes, simple brin de 25 bases (B) Réseau périodique de lignes d'ADN double brin de 319 paires de bases, mimant une hybridation entre le réseau précédent d'oligonucléotides sondes avec son complémentaire cible

Les réseaux sont déposés sur les trois substrats étudiés : la lame époxyde, la lame de verre oxydée et la lame fonctionnalisée avec des dendrimères. Cette étude nous permet aussi d'analyser l'influence de la chimie de surface face à une lecture en diffraction. Nous avons vu que la chimie de surface des substrats est primordiale pour immobiliser et fixer les molécules déposées à la surface mais que les lames fonctionnalisées amènent un bruit de fond non négligeable en diffraction. Il s'agit de trouver la chimie de surface optimale qui permettra d'immobiliser les molécules déposées à la surface de la lame, sans que la rugosité de surface ne perturbe la lecture en diffraction.

Les réseaux d'ADN sondes sont déposés selon le protocole expérimental mis au point au paragraphe précédent. Un second timbre en PDMS comportant des réseaux de lignes (500 nm de large au pas de 1 μm) est encre avec une solution d'oligonucléotides double brin de 319 paires de bases, marqués NH_2 à l'extrémité 5' et Cy3 à l'extrémité 3'. Ces deux substrats sont ensuite analysés en diffraction. Deux dépôts supplémentaires de contrôle sont générés. Un timbre en PDMS fraîchement démoulé et un timbre en PDMS simplement encre avec la solution tampon sont mis en contact avec le substrat selon les mêmes paramètres de dépôt. Comme ces deux réseaux ne comportent pas d'oligonucléotides, ils sont utilisés comme contrôles.

La Figure 50 présente les intensités de diffraction collectées à l'ordre 1 pour le réseau d'ADN sonde (oligonucléotides simple brin de 25 bases), le réseau d'ADN mimant une hybridation (oligonucléotides double brin de 319 bases), ainsi que deux contrôles. Les intensités de diffraction ne sont pas quantifiées en unité arbitraire mais normalisées par rapport à l'intensité émise par le réseau d'ADN double brin.

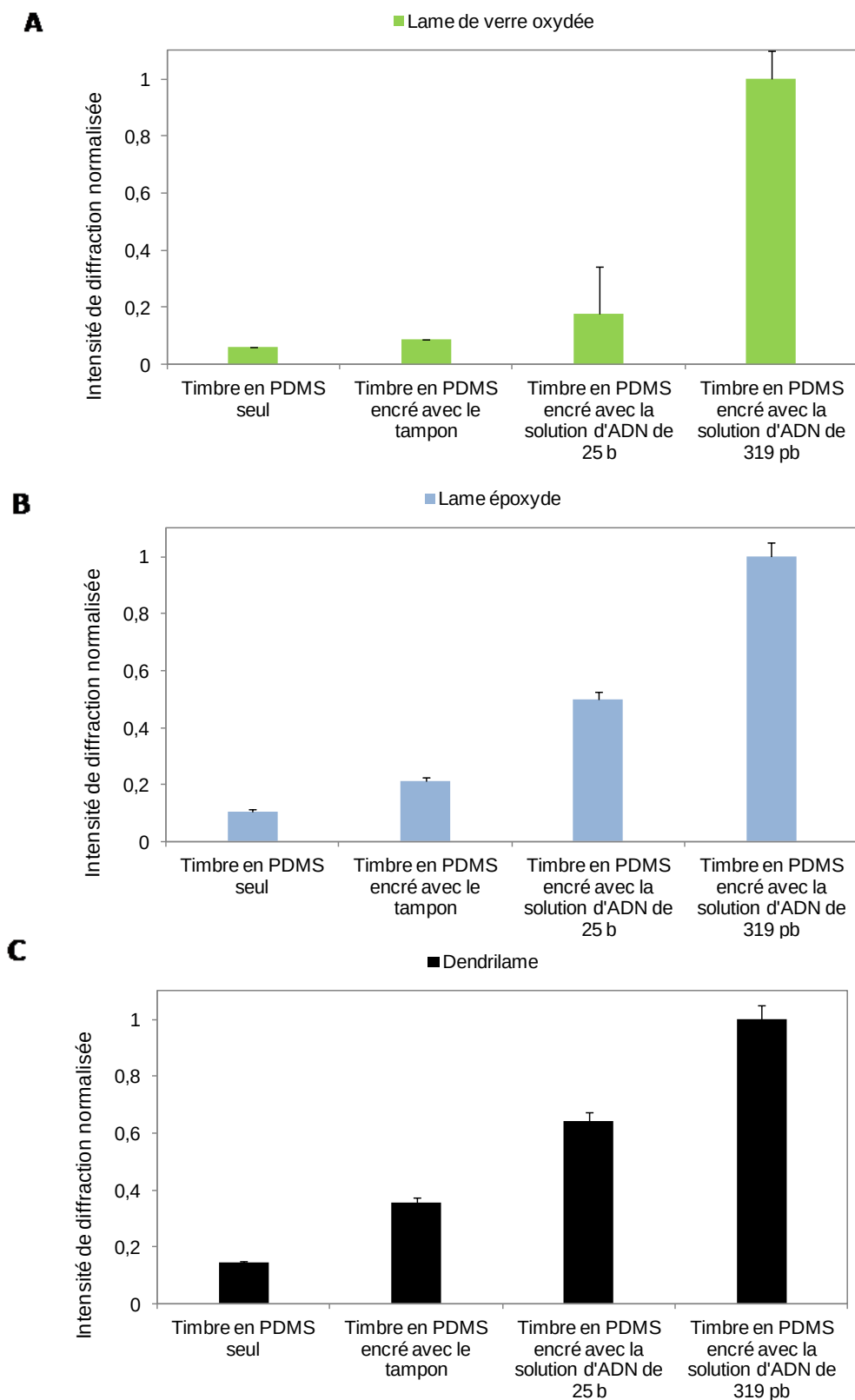


Figure 50 : Intensité de diffraction mesurée pour des réseaux périodiques, composés de lignes d'oligonucléotides de 25 pb (8 kDa) et 319 pb (210 kDa), déposés par μ CP sur des substrats (A) lame époxyde (B) lame de verre oxydée (C) lame fonctionnalisée avec des dendrimères. Les deux premières valeurs (timbre seul et timbre encre avec la solution tampon) sont des contrôles négatifs. Les intensités sont normalisées par celle émanant du réseau d'ADN double brin, qui est donc égale à 1.

Quel que soit le substrat, les réseaux composés d'oligonucléotides émettent une intensité de diffraction (I) plus forte que les contrôles. La contribution du dépôt de monomères de PDMS sur la surface tout comme la contribution du dépôt de la solution tampon sont négligeables en termes d'intensités collectées. Par ailleurs, l'intensité diffractée par un réseau d'ADN double brin est bien plus forte que celle émise par un réseau d'ADN sonde simple brin, et ce quelle que soit la chimie de surface de l'échantillon ($I = 0.6$ sur la dendrilame, $I = 0.5$ sur la lame époxyde et $I = 0.2$ sur la lame de verre). Cette information démontre que la contribution d'un réseau d'ADN sonde est différente de celle d'un réseau d'ADN dont les sondes se sont hybridées avec leur complémentaire. Ce résultat suggère fortement que nous pouvons détecter la signature d'une hybridation ADN par diffraction. Selon le type de chimie de surface, ces contributions sont plus facilement détectables. Sur une lame de verre, l'intensité d'un réseau d'ADN sonde est relativement proche de celle émise par les contrôles. Il est donc préférable d'utiliser des substrats fonctionnalisés pour générer les réseaux diffractants. Cette remarque n'était pas triviale, compte tenu du bruit de fond amené par les molécules composant les chimies de surface. Grâce à ces tests, nous avons donc montré que :

- ❖ Les réseaux d'oligonucléotides générés sur différents substrats diffractent considérablement un faisceau lumineux. Ils peuvent donc servir de base pour des tests de biodétection par diffraction. Ceci est d'autant plus intéressant que les oligonucléotides sondes sont de faible poids moléculaire (8 kDa). Il est donc possible d'utiliser la technique de biodétection par diffraction pour analyser la contribution de molécules de faible poids moléculaire.
- ❖ Des réseaux d'ADN double brin ont été utilisés pour mimer des réseaux d'ADN sondes après hybridation. Ces réseaux mimant une hybridation parfaite émettent des intensités de diffraction supérieures (de 50 à 80 %) à celles provenant d'un réseau d'ADN sondes. Il est donc possible d'utiliser la technique de détection par diffraction pour mettre en évidence des hybridations d'ADN.
- ❖ La signature d'une hybridation est d'autant plus visible en diffraction que l'échantillon possède une chimie de surface. Bien que les valeurs d'intensité diffractée après hybridation (en unité arbitraire) soient plus faibles sur les substrats fonctionnalisés de part la contribution de la couche de la chimie de surface, la différence entre intensité diffractée avant et après hybridation est supérieure. Il faut donc utiliser des substrats fonctionnalisés. Pour la suite des tests d'hybridation, la chimie de surface basée sur les dendrimères est la seule qui a été testée. Ce choix n'est pas le plus optimal puisque nous avons montré précédemment que la rugosité de la couche de dendrimères n'est pas adaptée à la détection par diffraction.

d. Détection d'une hybridation réelle

Nous souhaitons maintenant détecter une hybridation réelle par diffraction. L'intensité d'un réseau d'ADN sonde sera comparée à celle obtenue après le protocole expérimental de test. Les séquences nucléotidiques utilisées sont parfaitement complémentaires.ⁱ Il ne s'agit pas ici de détecter la présence d'oligonucléotides particuliers par un cas appliqué mais simplement de valider la technique

de détection par un protocole expérimental simple. Les brins d'oligonucléotides cible possèdent 20 bases et sont marqués en fluorescence. La taille des oligonucléotides sondes est la même que celle des oligonucléotides cibles.

Des motifs d'oligonucléotides sondes sont générés par μ CP sur une lame fonctionnalisée par des dendrimères (temps d'encrage 30 sec, temps de contact 30 sec, 0.5 μ M de concentration). Les motifs sont composés de réseaux périodiques (500 nm au pas de 1 μ m), qui permettront des analyses de diffraction et de plots micrométriques (160 μ m de diamètre au pas de 320 μ m) qui permettront un contrôle en microscopie à fluorescence. L'intensité de diffraction émise par les motifs est enregistrée. La lame est alors réduite par un bain de NaBH_4 pendant 3h, pour fixer de façon covalente les oligonucléotides déposés avec les dendrimères et réduire les interactions non-spécifiques en dehors des motifs d'intérêt. Le substrat est alors mis en contact pendant 30 minutes sous agitation avec une solution de SSC contenant des brins d'ADN complémentaires de ceux déposés (20 bases). Des lavages sont effectués pour éliminer l'excédent de molécules n'ayant pas réagi (3x5 minutes au SSC 2x).ⁱⁱ L'intensité de diffraction émise par les motifs est de nouveau analysée. Afin d'avoir une confirmation du bon déroulement du procédé d'hybridation, un contrôle en microscopie en fluorescence a été effectué au préalable.

La Figure 51 présente les résultats de validation en fluorescence. Une image de la surface est analysée en microscopie à fluorescence (A). On constate la présence des plots émettant une intensité de fluorescence particulièrement élevée par rapport au fond continu. Cette image témoigne de l'hybridation des brins d'oligonucléotides cibles, marqués en fluorescence, sur les plots d'oligonucléotides sondes déposés.

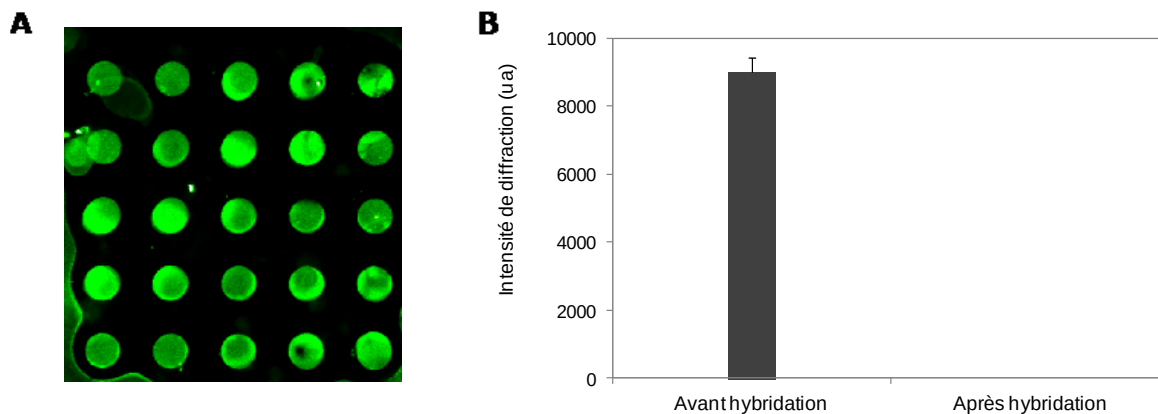


Figure 51 : (A) Contrôle obtenu en microscopie à fluorescence témoignant de l'hybridation de brins d'ADN cibles, marqués en fluorescence sur les plots d'ADN sondes déposés sur la dendrilame. Pour faciliter l'analyse de ce contrôle, les motifs déposés ne sont pas des réseaux mais des plots de 160 μ m au pas de 320 μ m. (B) Intensité de diffraction collectée sur des réseaux d'ADN (lignes de 500 nm au pas de 1 μ m) déposés sur une dendrilame, avant et après hybridation avec une solution contenant les brins d'ADN complémentaires.

L'hybridation des deux brins complémentaires s'est correctement déroulée. L'analyse en diffraction de cette hybridation est présentée en B. Avant hybridation, l'intensité de fluorescence moyenne relevée sur les réseaux d'ADN sondes atteint 9000 ua. Après hybridation, aucune intensité de fluorescence n'est détectée. L'observation de la surface grâce au scanner de lecture révèle une surface chaotique, possédant de nombreuses sources parasites de perturbations lumineuses.

Nous avons la confirmation que l'hybridation se déroule correctement, comme en témoignent les analyses en fluorescence de la surface. Les analyses en diffraction ne traduisent pas cette information. Plusieurs hypothèses sont envisageables :

- Les sondes d'oligonucléotides se sont détachées au cours du protocole d'hybridation (réduction, lavage, hybridation, lavage). Cette hypothèse paraît difficile à imaginer car les plots fluorescents témoignent de la présence d'oligonucléotides sondes sur la surface. Par ailleurs, les liaisons entre dendrimères et brins d'ADN sondes sont de type covalent.
- L'information utile est noyée dans le bruit de fond, qui perturbe les analyses. Les intensités de diffraction mesurées dépendent des différences de hauteur de la matière présente sur la surface. Or, la taille des oligonucléotides cibles est de 20 bases, ce qui correspond à la taille des oligonucléotides sondes, dont l'épaisseur a été mesurée à 1-2 nm. Un ajout de matière proche de 1 ou 2 nm au maximum est donc relativement difficile à détecter dans une chimie de surface dont la rugosité est dans cet ordre de grandeur.
- L'épaisseur des lignes varient peu ou pas lors de l'hybridation du brin complémentaire.

Des expériences complémentaires ont été menées en augmentant la concentration de la solution d'oligonucléotides sondes (de 0.5 μM à 20 μM) mais les résultats obtenus sont identiques.

- ❖ Ces expériences montrent que la chimie de surface à base de dendrimères qui a été mise en œuvre et optimisée pour améliorer la lecture des biopuces ADN en fluorescence n'est pas adaptée à la lecture en diffraction, en raison d'une rugosité rédhibitoire. Une chimie de surface de faible rugosité (< 1nm) doit être mise en œuvre afin de détecter par diffraction des hybridations ADN/ADN.
- ❖ La sensibilité de la technique de lecture permet de discriminer des brins d'ADN selon leur taille. Des brins d'oligonucléotides de 25 bases déposés en réseau périodique n'ont pas la même signature diffractive que des brins d'oligonucléotides de 319 paires de bases. L'analyse d'interactions entre molécules de faible poids moléculaire est envisageable.
- ❖ La limite de détection sera améliorée si la taille des séquences cibles est plus grande que celle des séquences sondes.
- ❖ Il est possible de structurer la chimie de surface afin de faire ressortir les réseaux d'oligonucléotides en épaisseur, au-delà de la rugosité de la chimie de surface. De cette manière, l'information biologique au cours d'un protocole d'hybridation sera mise en relief et les rapports signaux/bruit seront améliorés.

IV/ Réflexion sur la biodétection par diffraction

Ce paragraphe a pour but de résumer les conclusions amenées par le travail expérimental précédent. Il s'agit de définir les conditions ou impératifs de fabrication de réseaux diffractants et de lecture en diffraction pour que la biodétection par diffraction soit viable. Cette réflexion permettra donc de définir les grandes lignes pour tendre vers un substrat adéquat pour des tests de biodétection par diffraction.

1. Amélioration du traitement des images

Précédemment, nous avons vu qu'en lecture en diffraction le bruit de fond était problématique. Ce signal parasite provient d'intensité lumineuse diffuse. La propreté d'un échantillon contribue à la diminution de ces signaux indésirables. Cependant, la chimie de surface du substrat constitue aussi une source de bruit de fond. Chaque couche moléculaire peut réfléchir la lumière et générer des perturbations en termes de bruit. L'une des spécifications du prototype de diffraction était de développer une technique de lecture sensible. Toutes les sources de bruit (trace de séchage, poussière ...) sont donc d'autant plus collectées. Il faut trouver le compromis adéquat entre un système sensible qui peut détecter l'information lumineuse utile et être le plus sélectif possible.

Beaucoup d'améliorations ont été menées dans cette perspective au niveau de la fabrication des échantillons. Différentes chimies de surface ont été étudiées, comme différentes techniques de passivation et de blocage de surface permettant de réduire le bruit de manière biologique. De ce fait, il a été défini que les réseaux moléculaires générés devaient être stables moléculairement et donc très proches des monocouches de matière.

- ❖ Considérer la médiane ou la moyenne des intensités lumineuses sur un réseau, et non le maximum comme il a été développé dans le logiciel de traitement d'image est primordial.
- ❖ Par ailleurs, un capteur de bruit diffus, qui serait orienté de manière à ne pas collecter les intensités de diffraction à l'ordre 1 mais simplement l'intensité lumineuse générale d'un substrat permettrait d'obtenir des rapports signal/bruit bien supérieurs. On peut imaginer de positionner l'échantillon sur une platine mobile selon un axe de rotation pour sortir le faisceau diffracté à l'ordre 1 du chemin optique, et donc du capteur, afin de collecter le bruit parasite émis par le substrat.

2. Fabrication des réseaux

La stabilité des lignes composant un réseau de molécules sondes est primordiale. L'épaisseur du réseau est directement liée à l'intensité de diffraction qu'il émane. Afin de limiter la désorption des molécules déposées sur la surface, les molécules déposées doivent être immobilisées de façon robuste grâce à une chimie de surface. Seule la couche moléculaire en contact avec la chimie de surface sera fixée. Les couches supérieures resteront agrégées à l'air mais dès que l'échantillon sera placé en milieu liquide, la solubilité des protéines détruit les interactions entre elles et altère la qualité des réseaux.

- ❖ **Il est donc crucial de fabriquer des réseaux de lignes, dont l'épaisseur est proche des monocouches.**

3. Amélioration des conditions d'interaction

Un paramètre expérimental important qui n'a pas été pris en compte dans nos tests de biodétection concerne la fluidique. Ce choix était volontaire car le scanner de lecture était destiné à un personnel de laboratoire qui manipule lui-même les lames d'analyse. Le scanner ne devait rester qu'un appareil de mesure et non une plateforme d'interactions. Cependant, nous n'avons pas favorisé la rencontre des cibles avec les sondes lors de nos protocoles d'interaction. Les phases d'interactions sont effectuées sous de très faibles agitations en mouvement quasi-statique. L'ajout d'une cellule fluidique favoriserait la rencontre entre les molécules cibles contenues en solution et les réseaux de molécules sondes, immobilisés sur la surface. Ce choix technique était volontaire (cf. cahier des charges) mais a limité les tests expérimentaux.

Un système de fluidique résoudrait d'autres points clés des tests de biodétection. Les flux éliminent facilement le surplus de molécules n'ayant pas réagi ou faiblement fixées sur une surface. Ce type de lavage est moins violent à l'échelle moléculaire que des lavages manuels. Par ailleurs, cela permettrait aussi de pouvoir suivre l'intensité de diffraction au cours du temps et de suivre pas à pas les modifications que le réseau subit afin d'améliorer la compréhension fondamentale d'une interaction entre deux entités. En-deçà du seuil de détection du ng/mL, concevoir un système fluidique autour des biocapteurs est obligatoire.

- ❖ **Le choix technique pris lors de la rédaction du cahier des charges est à revoir : un système de fluidique permettrait de favoriser la rencontre entre molécules cibles et molécules sondes, tout en limitant les perturbations de surface à l'échelle moléculaire.**

4. Influence de la chimie de surface et de la passivation

Immobiliser de façon stable et robuste les molécules sondes sur un substrat est crucial. Dans un contexte où la contribution de chaque molécule peut être détectée, il faut s'assurer d'une chimie de surface adaptée sur l'échantillon. Nous avons vu que la chimie de surface d'un échantillon amène cependant un bruit de fond parasite aux mesures en diffraction. Comme l'épaisseur de la matière présente sur la surface engendre une intensité lumineuse collectée, l'épaisseur de la chimie de surface amène aussi sa contribution. Nous avons démontré expérimentalement que plus un substrat est rugueux, plus le bruit de fond collecté est important. Il faut trouver un compromis entre ces deux paramètres.

- ❖ **Pour que les échantillons générés soient compatibles avec une lecture en diffraction, il faut que les réseaux moléculaires ne soient pas noyés dans le bruit de fond provoqué par la chimie de surface. Aussi, la chimie de surface de l'échantillon doit être peu rugueuse ou structurée en relief.**

L'intensité de diffraction collectée étant directement reliée à l'épaisseur des molécules, un autre constat est à retenir.

- ❖ L'épaisseur de la chimie de surface doit être inférieure à l'épaisseur des motifs déposés. Il en est de même si l'on ajoute une couche de blocage ou de passivation de surface. L'épaisseur de la couche de passivation doit être inférieure à l'épaisseur des motifs déposés.
- ❖ Une autre solution consiste à structurer la chimie de surface afin de faire ressortir les réseaux d'oligonucléotides en épaisseur, au-delà de la rugosité de la chimie de surface. De cette manière, l'information biologique au cours d'un protocole d'hybridation sera mise en relief et les rapports signaux/bruit seront améliorés. Réaliser un pré-réseau dans la chimie de surface, que l'on viendrait ensuite fonctionnaliser est une perspective prometteuse.

5. Conclusions

- ❖ Les biopuces basées sur des réseaux de protéines permettent une détection d'interaction par diffraction, mais les dépôts doivent être proches des monocouches et la chimie de surface adaptée pour que les protéines déposées sur la surface restent fixées au cours du protocole complet. Nous avons détecté des molécules de faible poids moléculaire (GST de 26 kDa) grâce à notre technique de détection sans marquage basée sur la diffraction, à une concentration de 0.1 μ M.
- ❖ Pour détecter une hybridation ADN avec des réseaux composés d'oligonucléotides, il faut pouvoir rehausser l'épaisseur des réseaux après hybridation, en utilisant un brin complémentaire plus long ou en texturant la chimie de surface.

Références

1. Y. Tsay, C. Lin, et al., *Clin Chem* **1991**, 37, 1502.
2. R. D. Pamela M. St. John, Nathan Cady, John Czajka, Carl A. Batt, and Harold G. Craighead, , *Anal. Chem.* **1998**, 70, 1108.
3. F. Morhard; J. Pipper; R. Dahint; M. Grunze, *Sensors and Actuators B: Chemical* **2000**, 70, 232-242.
4. J. Goh; R. Loo; R. McAloney; C. Goh, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2002**, 374, (1), 54-56.
5. J. B. Goh; P. L. Tam; R. W. Loo; M. Cynthia Goh, *Analytical Biochemistry* **2003**, 313, (2), 262-266.
6. J. B. Goh; R. W. Loo; M. C. Goh, *Sensors and Actuators B: Chemical* **2005**, 106, (1), 243-248.
7. R. W. Loo; P. L. Tam; J. B. Goh; M. C. Goh, *Analytical Biochemistry* **2005**, 337, (2), 338-342.
8. R. C. Bailey; J.-M. Nam; C. A. Mirkin; J. T. Hupp, *Journal of the American Chemical Society* **2003**, 125, (44), 13541-13547.
9. C.-L. Chang; G. Acharya; C. A. Savran, *Applied Physics Letters* **2007**, 90, (23), 233901-233901-3.
10. F. S. Marikkar; C. Carter; K. Kieltyka; J. W. F. Robertson; C. Williamson; A. Simmonds; R. Zangmeister; T. Fritz; N. R. Armstrong, *Langmuir* **2007**, 23, (20), 10395-10402.
11. F. Nakajima; Y. Hirakawa; T. Kaneta; T. Imasaka, *Analytical Chemistry* **1999**, 71, (13), 2262-2265.
12. S. Lenhart; P. Sun; Y. Wang; H. Fuchs; C. A. Mirkin, *Small* **2007**, 3, (1), 71-75.
13. O. A. Nafday; T. W. Lowry; S. Lenhart, *Small* **2012**.
14. F. B. S. Lenhart, T. Laue, S. Walheim, C. Vannahme, S. Klinkhammer, M. Xu, S. Sekula, T. Mappes, T. Schimmel, H. Fuchs, *Nat. Nanotechnol.* **2010**, 5, 275.
15. J. T. H. R.C. Bailey, *Anal. Chem.* **2003**, 75, 2392.
16. Y. Xia; G. M. Whitesides, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1998**, 37, 551-575.
17. R. C. H. Bailey, J. T., *J. Am. Chem. Soc* **2002**, 124, 6767.
18. X. S. Dang, K. J.; Hupp, J. T., *Langmuir* 17, 3109.
19. G. A. T. Mines, B.; Stevenson, K. J.; Li, J.; Hupp, J. T., *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, 41, 154.
20. A. Akou; I. y. A. Gural'skiy; L. Salmon; C. Bartual-Murgui; C. Thibault; C. Vieu; G. Molnar; A. Bousseksou, *Journal of Materials Chemistry* 22, (9), 3752-3757.
21. H. G. P. Gütllich, *Top. Curr. Chem* **2004**, 233.
22. G. M. A. Bousseksou, L. Salmon, W. Nicolazzi, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 40, 3313.
23. NASA Integrated Universal Chemical Detector with Selective Diffraction Array.
24. J.-C. Cau, Thèse INSA de Toulouse, 2009.
25. H. Lalo, Thèse INSA de Toulouse, 2009.
26. Brevet Inra, CNRS FR, **2002**, 05049, J. L. E. Trévisiol, G. Pratviel, A.-M. Caminade, J. M. François, J.-P. Majoral and B. Meunier
27. V. Le Berre; E. Trévisiol; A. Dagkessamanskaia; S. Sokol; A.-M. Caminade; J.P. Majoral; B. Meunier; J.M. François, *Nucl. Acids Res.* **2003**, 31.
28. S. Rodriguez, Thèse IMRCP, Toulouse, 2011.

ⁱ Fragment du gènes HSP12 : HSP12-forw : [AmC6F]AATATGTTTCCGGTCGTCTC. La séquence est de 5' en 3'. ADN dans du tampon phosphate 0.3M, pH7

ⁱⁱ Tampon hybridation : SSC 5X, 0.1%SDS
 Tampon de lavage 1 : SSC 2X, 0.2% SDS (2x3min)
 Tampon lavage 2 : 0.1X SSC (1x3min)

Conclusion

La biodétection consiste à détecter la présence de biomarqueurs dans un prélèvement. Ces biomarqueurs sont la signature de pathologies et leur concentration en solution nous informe sur l'état de santé d'une personne. La biodétection est utilisée à différents stades du processus médical, soit en prévention afin d'avancer un diagnostic à un patient, soit en termes de suivi de soin, pour analyser l'efficacité d'un traitement par exemple. Ainsi, les techniques de biodétection employées doivent donc être les plus sensibles et les plus précises possibles. Au-delà de cet objectif, d'autres critères de développement sont pris en considération, comme la durée d'une analyse ou même la complexité d'un procédé de biodétection, puisqu'en termes de diagnostic, les tests doivent être effectués dans les plus courts délais et à un coût moindre.

Ce travail de thèse s'ancre dans le développement d'une plateforme de biodétection, qui répond à ces critères de détection de biomarqueurs à faible concentration en des temps d'analyse courts et à un faible coût. Nous disposons d'une technique de détection optique sans marquage, basée sur la diffraction de réseaux moléculaires, développée en laboratoire de recherche. L'objectif de cette thèse privée portait sur le transfert de cette technique à une échelle industrielle pour l'entreprise Innopsys, spécialisée dans la fabrication et commercialisation de scanners de lecture pour des applications biomédicales. Un prototype de lecture automatisée a donc été créé au cours de ce travail et atteint des performances prometteuses. Afin de diminuer la limite de détection, des biopuces bi-fonctionnelles, basées sur une couche anti-adhésive de PLL-g-dextran ont été développées. Elles permettent de limiter plus de 90% des interactions non-spécifiques sur un substrat et diminuent de ce fait le seuil de détection. Nous avons détecté des interactions de type protéine/protéine à une concentration de 100 nanoMolaire (couple classique anticorps/antigène). La lecture, ainsi que les protocoles de détection respectent des délais temporels courts. Cette preuve de concept a donné suite à un projet dédié au diagnostic et concerne la détection d'interactions protéiques. Il s'agit de coupler le scanner de lecture développé à une biopuce permettant de détecter plusieurs dizaines d'allergènes dans un sérum humain. Une seule biopuce actuellement commercialisée permet cette opération mais la lecture en fluorescence des résultats entraîne un coût élevé et donc une faible utilisation en laboratoire d'analyse. Nous pensons donc être concurrentiels grâce à notre scanner optique de lecture, à bas coût, basé sur la diffraction.

Les résultats de cette thèse ont aussi mis en évidence la possibilité d'utiliser cet outil d'analyse pour détecter des hybridations de type ADN. Ainsi, cette perspective a été étudiée dans un projet dédié en collaboration avec l'entreprise Dendris. Ce dernier porte sur la détection de possibles récurrences du cancer du sein chez la femme. Dans le processus médical, ce projet se positionne donc au niveau du suivi des patients. Il s'agit ici de détecter des séquences d'ADN spécifiques qui sont susceptibles d'intervenir dans les récurrences du cancer du sein.

La plateforme proposée est donc composée d'un scanner de lecture à grande vitesse ainsi que de biopuces spécifiques réduisant les événements indésirables sur un échantillon. Nous atteignons donc des seuils de détection prometteurs, qui ont permis des applications concrètes dans le domaine du diagnostic et du suivi de patient (détection d'allergènes et détection de récurrence du cancer du sein).

ANNEXE 1 : PROCEDE DE NETTOYAGE D'UN TIMBRE EN PDMS	188
ANNEXE 2 : ETUDE PAR QCM DE L'ADSORPTION D'ANTICORPS ANTI-GST SUR UNE COUCHE DE PLL-G-DEXTRAN DEPOSEE PAR μ CP	190
ANNEXE 3 : FIXATION DE PROTEINES SUR LA RESINE SU8	193

Annexe 1 : Procédé de nettoyage d'un timbre en PDMS

Le timbre en PDMS de l'outil GeSim est composé d'une fine membrane de PDMS dont la topographie a été moulée sur un moule en silicium de 15 mm x 15 mm. Il est plus rapide de nettoyer un timbre pour le réutiliser à nouveau plutôt que d'en générer un autre. Il s'agit d'éliminer les molécules biologiques qui ont été encrées à sa surface. Nous avons développé une technique de nettoyage de timbre permettant d'éliminer les molécules présentes sur la fine membrane de PDMS.

Il s'agit d'utiliser le timbre à nettoyer pour 3 procédés de lithographie douce par nanoimpression assistée par UV et température (thermal soft UV NIL). Cette technique, expliquée dans le chapitre III consiste à imprimer des structures topographiques dans une fine couche de résine, légèrement liquéfiée, grâce à un timbre en PDMS. Au cours de ce procédé d'impression, le timbre entre en contact avec la résine. Si des molécules sont présentes à sa surface, elles vont alors être transférées sur la résine. En effet, la résine que nous utilisons (SU8) possède une chimie de surface de type époxyde. Ces groupements époxydes réagissent avec les molécules (en particulier les amines des protéines), qui sont donc figées dans la couche de résine sacrificielle. Ce procédé est répété 3 fois sur 3 couches de résines sacrificielles afin d'éliminer toutes les molécules présentes à la surface du timbre en PDMS.

Comme ces molécules sont marquées en fluorescence, il est possible de contrôler leur transfert sur la couche de résine par observation en fluorescence. La *Figure 1* présente une image obtenue en fluorescence de la couche résine, sur laquelle une première impression a été effectuée avec un timbre à nettoyer.

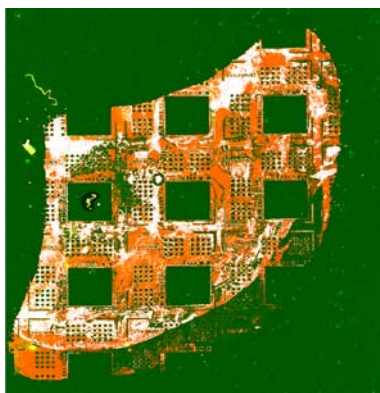


Figure 1 : Image obtenue par un scanner en fluorescence d'une couche de résine sacrificielle, sur laquelle on a transféré des molécules présentes à la surface d'un timbre à nettoyer, par thermal soft UV NIL.

On distingue les motifs topographiques du timbre, imprimés sur la couche de résine. L'auto-fluorescence de la résine est observée en vert sur l'image et les molécules biologiques sont observées en rouge. On constate que des molécules ont été transférées en grand nombre sur la résine. Un 2^{ème} procédé de thermal soft UV NIL est effectué sur une nouvelle couche de résine sacrificielle. La *Figure 2* présente l'observation en fluorescence de la résine, après cette étape.

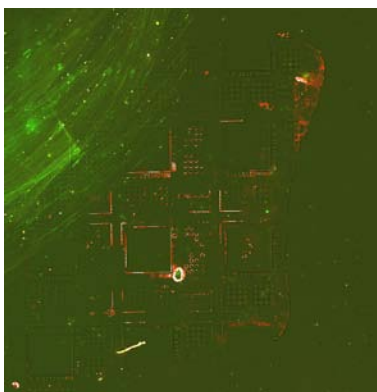


Figure 2 : Image obtenue par un scanner en fluorescence d'une 2^{ème} couche de résine sacrificielle, sur laquelle on a transféré des molécules présentes à la surface d'un timbre à nettoyer, par un 2^{ème} procédé de thermal soft UV NIL.

Des molécules, observées en rouge sur l'image, ont été transférées sur la couche de résine, mais en plus faible quantité que lors de la 1^{ère} étape de thermal soft UV NIL. Les molécules présentes sur le timbre à nettoyer ont donc été relarguées sur la résine, en majorité lors de la 1^{ère} impression. Pour s'assurer que le timbre ne possède plus de molécules à sa surface, une 3^{ème} étape de thermal soft UV NIL est menée sur une nouvelle couche de résine. La Figure 3 présente l'observation de la couche de résine après cette impression.

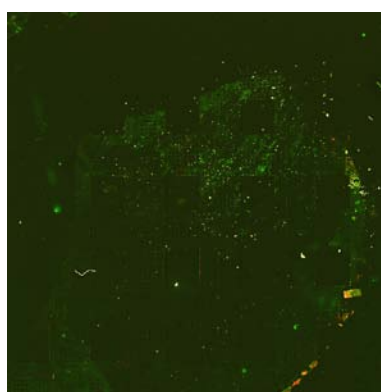


Figure 3 : Image obtenue par un scanner en fluorescence d'une 3^{ème} couche de résine sacrificielle, sur laquelle on a transféré des molécules présentes à la surface d'un timbre à nettoyer, par une 3^{ème} étape de thermal soft UV NIL.

Seule l'auto-fluorescence de la résine est visible en vert sur l'image de fluorescence. On ne distingue pas de trace de fluorescence de molécules biologiques (observées en rouge sur l'image) qui auraient été transférées sur la résine. Le timbre en PDMS ne possède donc plus de molécules à sa surface.

- ❖ **Trois étapes de thermal soft UV NIL avec le timbre que l'on souhaite nettoyer, permettent de transférer complètement les molécules présentes à sa surface, sur une couche de résine sacrificielle. Grâce à ce procédé, les timbres en PDMS peuvent être nettoyés et donc réutilisés, par exemple pour déposer d'autres solutions par μ CP.**

Annexe 2 : Etude par QCM de l'adsorption d'anticorps anti-GST sur une couche de PLL-g-dextran déposée par μ CP

L'étude en QCM présentée ci-dessous consiste à générer une couche de PLL-g-dextran par μ CP. Un timbre en PDMS plat est encre avec une solution de PLL-g-dextran à une concentration de 50 $\mu\text{g/mL}$. Il est ensuite séché et mis en contact avec un quartz de QCM, de type SiO_2 . De cette manière, une couche homogène de molécules de PLL-g-dextran est transférée sur le quartz. Deux autres couches de PLL-g-dextran sont générées sur deux quartz supplémentaires, grâce à une solution de 100 $\mu\text{g/mL}$ et 200 $\mu\text{g/mL}$. Les quartz sont ensuite placés dans les chambres de QCM. Une solution d'anticorps anti-GST est alors injectée dans chaque chambre, à différentes concentrations (de 10 $\mu\text{g/mL}$ à 500 $\mu\text{g/mL}$).

La Figure 4 présente les courbes de QCM obtenues lors de l'injection d'anticorps à 10, 100 et 500 $\mu\text{g/mL}$ sur trois quartz recouverts d'une couche de PLL-g-dextran déposée par μ CP à 50 $\mu\text{g/mL}$.

La Figure 5 présente les courbes de QCM obtenues lors de l'injection d'anticorps à 10 et 100 $\mu\text{g/mL}$ sur trois quartz recouverts d'une couche de PLL-g-dextran déposée par μ CP à 100 $\mu\text{g/mL}$.

La Figure 6 présente les courbes de QCM obtenues lors de l'injection d'anticorps à 10, 100 et 500 $\mu\text{g/mL}$ sur trois quartz recouverts d'une couche de PLL-g-dextran déposée par μ CP à 200 $\mu\text{g/mL}$.

Interaction d'anticorps anti-GST sur une couche de PLL-g-dextran déposée par μ CP à 50 $\mu\text{g/mL}$

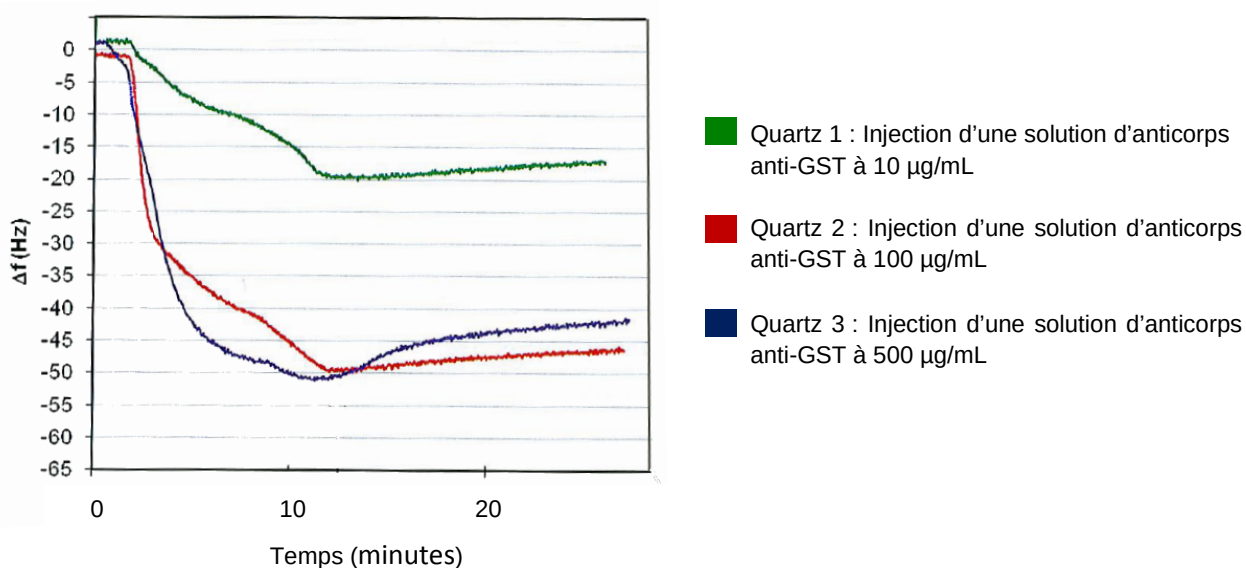


Figure 4 : Courbes de QCM décrivant l'interaction entre une solution d'anticorps anti-GST et une couche de PLL-g-dextran déposée par μ CP à 50 $\mu\text{g/mL}$. (A) Injection des anticorps (B) Lavage au PBS 1x.

Les trois quartz sont recouverts d'une couche de PLL-g-dextran déposée par μ CP à 50 $\mu\text{g/mL}$. Une solution d'anticorps anti-GST est injectée à 10 $\mu\text{g/mL}$ sur le quartz 1, à 100 $\mu\text{g/mL}$ sur le quartz 2 et à 500 $\mu\text{g/mL}$ sur le quartz 3 (A). Une forte chute de la fréquence de résonance est observée pour les trois quartz. La chute de fréquence est d'autant plus importante, que la solution d'anticorps est

concentrée : on observe une variation de 50 Hz sur le quartz 3 sur lequel la solution d'anticorps a été injectée à 500 $\mu\text{g/mL}$ et une variation de 20 Hz sur le quartz 1 sur lequel la solution d'anticorps a été injectée à 10 $\mu\text{g/mL}$. A $t=12$ minutes, un flux de PBS 1x est injecté sur les trois quartz (B). Une très légère augmentation de la fréquence de résonance (4 Hz) est alors observée sur les quartz 2 et 3, qui se stabilise par la suite. Les chutes de la fréquence de résonance observée sur les trois quartz (18 Hz pour le quartz 1, 42 Hz pour le quartz 2 et 46 Hz pour le quartz 3) témoignent de la forte adsorption des anticorps anti-GST sur la couche de PLL-g-dextran déposée par μCP . Comme il n'y a pas de désorption des anticorps après le lavage des quartz au PBS, les liaisons entre anticorps et couche de PLL-g-dextran sont donc fortes.

Interaction d'anticorps anti-GST sur une couche de PLL-g-dextran déposée par μCP à 100 $\mu\text{g/mL}$

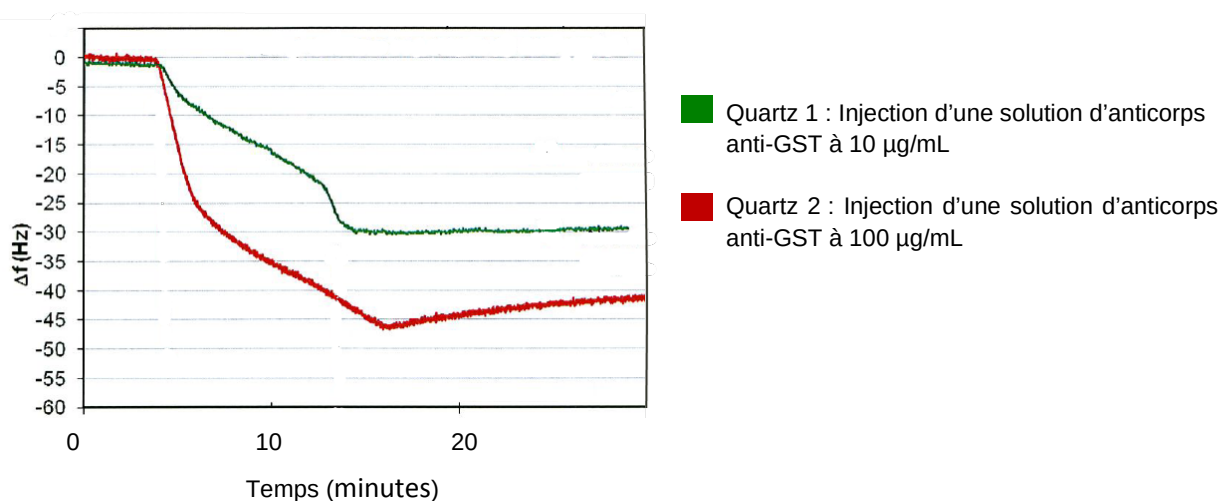


Figure 5 : Courbes de QCM décrivant l'interaction entre une solution d'anticorps anti-GST et une couche de PLL-g-dextran déposée par μCP à 100 $\mu\text{g/mL}$. La solution d'anticorps injectée sur le quartz 1 est à 10 $\mu\text{g/mL}$. La solution d'anticorps injectée sur le quartz 2 est à 100 $\mu\text{g/mL}$. La solution d'anticorps injectée sur le quartz 3 est à 500 $\mu\text{g/mL}$.

De la même manière, une solution d'anticorps anti-GST est injectée à 10 $\mu\text{g/mL}$ sur le quartz 1 et à 100 $\mu\text{g/mL}$ sur le quartz 2, tout deux recouverts d'une couche de PLL-g-dextran déposée par μCP à 100 $\mu\text{g/mL}$. Une forte chute de la fréquence de résonance est observée sur les deux quartz : 30 Hz pour le quartz 1 et 46 Hz pour le quartz 2. Un flux de PBS 1x est alors injecté (B), provoquant une très légère augmentation de la fréquence de résonance (5 Hz) sur les quartz 2. Les variations de la fréquence de résonance des quartz (30 Hz pour le quartz 1 et 40 Hz pour le quartz 2) témoignent de la forte adsorption des anticorps anti-GST sur la couche de PLL-g-dextran déposée par μCP .

Interaction d'anticorps anti-GST sur une couche de PLL-g-dextran déposée par μ CP à 200 μ g/mL

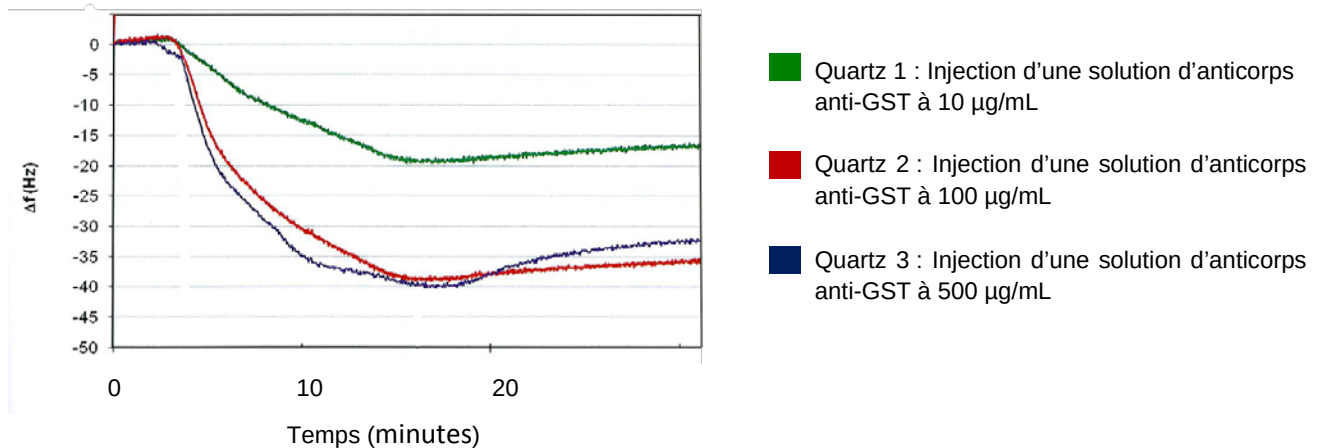


Figure 6 : Courbes de QCM décrivant l'interaction entre une solution d'anticorps anti-GST et une couche de PLL-g-dextran déposée par μ CP à 200 μ g/mL. La solution d'anticorps injectée sur le quartz 1 est à 10 μ g/mL. La solution d'anticorps injectée sur le quartz 2 est à 100 μ g/mL. La solution d'anticorps injectée sur le quartz 3 est à 500 μ g/mL.

Enfin l'expérience est renouvelée une nouvelle fois avec trois quartz recouverts d'une couche de PLL-g-dextran déposée par μ CP à 200 μ g/mL. Trois solutions d'anticorps à 10, 100 et 500 μ g/mL sont injectées (A) et un léger lavage au PBS est effectué (B). Une forte chute de la fréquence de résonance est observée sur les trois quartz : 20 Hz sur le quartz 1 et 40 Hz pour le quartz 2 et 3. Ces courbes montrent qu'il y a une forte interaction entre les anticorps injectés et les couches de PLL-g-dextran déposées par μ CP.

- ❖ **Quelle que soit la concentration de la couche de PLL-g-dextran obtenue par μ CP avec un timbre plat, les anticorps anti-GST s'adsorbent fortement sur la couche de PLL-g-dextran.**
- ❖ **Plus la concentration de la solution d'anticorps injectés est grande, plus la masse adsorbée sur les quartz est élevée.**
- ❖ **Des molécules de PLL-g-dextran, déposées par μ CP ne présentent pas de propriétés de limitation de l'adsorption de protéines. La conformation de la couche déposée par μ CP présente au contraire une forte fixation des anticorps.**

Annexe 3 : Fixation de protéines sur la résine SU8

La fixation de molécules de streptavidine sur une résine SU8, de type époxyde est étudiée. Les groupements époxyde de la résine interagissent fortement avec les groupements amines des protéines, pour réaliser des liaisons de type covalent. Afin de vérifier cette forte interaction entre streptavidine et résine SU8, nous avons déposé une couche de molécules de streptavidine, marquées en fluorescence sur une fine couche de résine SU8 par μ CP. A l'aide d'un timbre plat, encre et séché, les molécules sont transférées à la surface de la résine. Une première observation en fluorescence permet de relever l'intensité de fluorescence moyenne de la couche moléculaire déposée sur la résine. Ensuite, un lavage au PBS 1x, sous agitation est effectué pendant 5 minutes. Cette étape permet d'éliminer les molécules faiblement fixées à la surface de la résine. Une deuxième observation en fluorescence permet de relever l'intensité moyenne des molécules restantes. Enfin, un troisième lavage au PBS est mené, suivi d'une dernière observation en fluorescence. Au cours de ces trois lavages, seules les molécules fixées de façon covalente avec la couche de résine participent à la fluorescence. Ainsi, il est possible de quantifier l'adhésion des molécules de streptavidine sur une résine SU8.

La *Figure 7* présente les valeurs d'intensité de fluorescence de la couche de streptavidine déposée sur la résine, juste après le dépôt, après le premier lavage et après le second lavage.

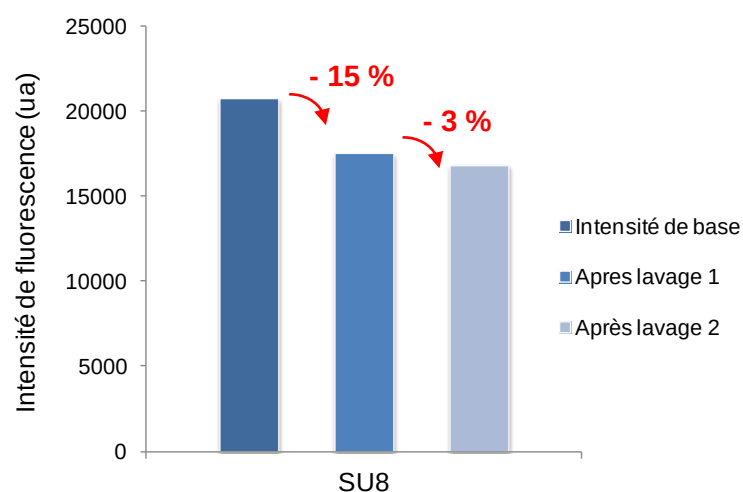


Figure 7 : Intensité de fluorescence d'une couche de molécules de streptavidine, déposée par μ CP avec un timbre plat, sur une couche de résine SU8.

L'intensité de fluorescence émise par la couche de molécules de streptavidine déposée sur la résine SU8 est d'environ 20000 ua. Après le premier lavage, on constate une perte de 15 % de l'intensité de fluorescence de la couche moléculaire pour des conditions d'illumination similaires. Cette information signifie que des molécules de streptavidine se sont désorbées. Les molécules faiblement liées à la surface de la résine ont donc été éliminées. Après le second lavage, l'intensité de fluorescence mesurée ne chute que de 3%. Cette valeur, relativement faible, montre que la plupart des molécules de streptavidine sont fixées sur la résine SU8 après le premier lavage. L'interaction entre streptavidine et résine SU8 est donc forte, ce qui permet d'immobiliser des protéines de façon robuste sur la couche de résine.