Adressage et immobilisation de biomolécules sur des surfaces : Interaction spot-dans-spot et bioélectrochimie localisée à l'échelle 1-50μm

Nathalie Berthet-Duroure

▶ **To cite this version:**

Nathalie Berthet-Duroure. Adressage et immobilisation de biomolécules sur des surfaces : Interaction spot-dans-spot et bioélectrochimie localisée à l'échelle 1-50μm. Micro et nanotechnologies/Microélectronique. INSA de Toulouse, 2009. Français. NNT : . tel-01071232

HAL Id: tel-01071232

https://theses.hal.science/tel-01071232

Submitted on 3 Oct 2014

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

THESE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE TOULOUSE

Délivré par *l'Institut National des Sciences Appliquées*
Discipline : *Microbiologie et Biocatalyse*

Présentée et soutenue par *Nathalie Berthet-Duroure*
Le 11 Mars 2009

Titre : *Adressage et immobilisation de biomolécules sur des surfaces : Interaction spot-dans-spot et bioélectrochimie localisée à l'échelle 1-50µm*

JURY

François ROSSI	**Liviu NICU**
André MEISTER	**Emmanuelle TREVISIOL**
Pascal MAILLEY	**Jean Marie FRANCOIS**
Gérard GOMA	**Ali AIT-IKHLEF**

Ecole Doctorale : *Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques, Bioingénieries*
Unité de recherche : *EAD5 Plateforme Biopuces*
Directeurs de thèse : *Jean Marie FRANCOIS et Emmanuelle TRÉVISIOL*
Rapporteurs : François ROSSI et André MEISTER

à l'ornithorynque et au pithécanthrope
qui déambulaient dans la pinacothèque,

Merci en tout premier lieu à mes trois encadrants :

- *Jean-Marie, dont les actions de longue date en faveur du développement de l'interdisciplinarité sur le site toulousain ont permis à cette thèse de voir le jour*
- *Emmanuelle, qui a su me guider à travers les embuches propres au travail à la frontière entre plusieurs disciplines, avec chacune leurs cultures et leurs codes particuliers*
- *Liviu, qui m'a ouvert les portes du « nanomonde », depuis les bancs de l'INSA jusqu'à mes premiers pas en salle blanche, en passant par les « cours de pilotage » de Bioplume et l'ouverture à de biens belles relations scientifiques et humaines*

Merci aux « filles de la Plateforme » : Lidwine, Céline, Delphine, Véronique, Flavien et Nathalie, ainsi qu'à Sergueï, pour les journées passées ensemble dans la bonne humeur, la gourmandise, les petits potins, et les grandes discussions

Merci à tous les membres du groupe Nano pour leur accueil chaleureux, pour leur patience à me faire découvrir leurs domaines, pour les moments de convivialité partagés, et en particulier ceux avec qui j'ai travaillé le plus directement :

- *TomTom, ses idéaux, ses petits riens imprévisibles, son éternelle bonne humeur*
- *Fabrice, et ses 10min-maxi-de-travail-sans-dire-de-bêtise*
- *Thierry, pour le tout-début*
- *Jean-Bernard, notre expert en mécanique de précision/programmation/vidéo/etc…*
- *Daisuké, le magicien de l'infiniment petit*

Merci au groupe TEAM pour son soutien indispensable en salle blanche

Merci à Pascal, Yoann, Emeline, et Maud : un mélange savoureux de sérieux et d'humour. Je garderai un excellent souvenir de cette rencontre, et j'espère que nous nous retrouverons pour de nouveaux projets

Merci à tous ceux qui ont partagé mon temps « hors-thèse », pour m'avoir permis de me détendre, me ressourcer, m'investir dans de petites choses et de grands évènements, et tout simplement de vivre agréablement ces trois années
Merci spécial à ma « tante Lafuma » pour l'aiguillage depuis de longues années, et au docteur Olive, qui ne m'a pas étranglée avec une clé anglaise dans le hall

Merci à Papa et Maman

Merci à toi Julien

Sommaire

Liste des abréviations. *10*

Introduction. ***11***

Chapitre I : Adressage et immobilisation de biomolécules dans le contexte des biopuces et des biocapteurs miniatures. ***15***

I.1. Biopuces, biocapteurs : techniques en quête de méthodes d'adressage et d'immobilisation de biomolécules, simples, miniaturisables, et économes. ***15***

I.1.1. Puces à ADN et à protéines: un essor spectaculaire, une miniaturisation nécessaire. *15*

I.1.2. Biocapteurs : miniaturisation pour plus d'intégration et de meilleures performances. *20*

I.1.3. Deux secteurs, le même défi : adresser et immobiliser des biomolécules en moindre quantité, à très haute résolution, dans des environnements complexes. *21*

I.2. Adressage de biomolécules sur des surfaces : un large éventail de techniques du millimètre au nanomètre. ***22***

I.2.1. Adressage par dépôt de liquide. *22*

I.2.1.a. Dépôt par contact : le modèle du stylo plume. *22*

- Pipettes et aiguilles. *22*

- Dépôt à l'aide de la pointe d'un AFM. *24*

- Dépôt à l'aide de microleviers : le robot Bioplume. *29*

I.2.1.b. Dépôt sans contact : le modèle de l'imprimante jet d'encre. *34*

- Dépôt par jet d'encre. *34*

- Dépôt par « électrospray ». *35*

- Dépôt par activation laser (LIFT). *37*

I.2.2. Adressage par impression : le modèle du tampon encreur. *38*

I.2.3. Adressage à l'aide de masques ou selon le modèle du pochoir. *41*

I.2.3.a. Synthèse *in situ* d'oligonucléotides grâce à des masques ou des miroirs. *41*

I.2.3.b. Lift-off de protéines : la peinture au pochoir. *42*

I.2.3.c. Ecoulement dirigé dans des réseaux microfluidiques. *43*

I.2.4. Adressage grâce à des surfaces préstructurées. *45*

I.2.4.a. Structuration topographique. *45*

I.2.4.b. Structuration chimique ou biochimique. *46*

I.2.4.c. Structuration électrique. *46*

I.2.5. Une échelle particulièrement intéressante (1-20µm), une technique à développer : Bioplume. *48*

I.3. Immobilisation de biomolécules sur des surfaces : un bref aperçu. ***50***

I.3.1. Immobilisation par physisorption. *50*

I.3.1.a. Adsorption directe. *50*
I.3.1.b. Liaison électrostatique. *50*
I.3.1.c. Piégeage physique. *51*

I.3.2. Immobilisation par liaison covalente. *51*

I.3.2.a. Synthèse *in situ.* *52*
I.3.2.b. Couplage à l'aide de molécules intermédiaires. *52*
I.3.2.c. Couplage électrochimique. *55*

I.3.3. Immobilisation par liaison d'affinité. *56*

Chapitre II : Adressage de biomolécules sur des surfaces actives : comment réduire les quantités nécessaires ? ***65***

II.1. Bioplume : des spots 10 fois plus petits. ***65***

II.1.1. Utilisation du robot Bioplume pour des dépôts de molécules biologiques. *65*

II.1.2. Parallélisation des dépôts en utilisant une puce fluidique dédiée. *67*

II.2. De la chambre d'hybridation à l'interaction « spot-dans-spot ». ***70***

II.2.1. Hybridation classique en chambre d'hybridation. *71*

II.2.2. Mise au point de l'hybridation en gouttes. *71*

II.2.2.a. Gouttes déposées à la pipette sur spots de 0,2µL. *71*
II.2.2.b. Gouttes déposées à l'aide du robot commercial Chipwriter Pro : technique « spot-dans-spot ». *73*
II.2.2.c. Gouttes déposées à l'aide de Bioplume. *76*

II.2.3. Adaptation de la technique « spot-dans-spot » avec Bioplume aux puces à protéines. *80*

Chapitre III : Immobiliser des biomolécules sur des surfaces : quelle chimie pour une adaptation à des volumes réactionnels réduits et à un environnement fragile et complexe ? ***87***

III.1. Identification des contraintes de mise en œuvre de cinq méthodes d'immobilisation. ***87***

III.1.1. La chimie des dendrimères : performante mais difficilement adaptable à un format miniature. *87*

III.1.2. Silanisation de SiO_2 avec un époxysilane. *88*

III.1.3. Auto-assemblage d'alcanethiols sur surface d'or. *95*

III.1.4. Immobilisation par l'intermédiaire de PLLgPEG-biotine. *105*

III.1.5. Immobilisation et adressage simultanés par électrochimie localisée : polymérisation de pyrrole. *109*

III.1.6. Bilan sur les contraintes de mise en œuvre des cinq méthodes d'immobilisation abordées. *118*

III.2. Electrochimie localisée adaptée à Bioplume : validation de la pertinence de la méthode pour l'adressage et l'immobilisation de biomolécules sur des biocapteurs de petite taille. ***120***

III.2.1. Electrodépôt d'anticorps sur prismes de SPRi. *120*

III.2.2. Electrodépôt d'ADN sur la section de fibres optiques. *124*

Chapitre IV : Pour aller plus loin avec Bioplume comme outil d'électrochimie localisée : électro-désorption et miniaturisation. ***133***

IV.1. Electrodésorption localisée : étude sur le polymère PLLgPEG. ***133***

IV1.1. Tests d'électrodésorption localisée de PLLgPEG avec Bioplume. *135*

IV1.2. Etude de la désorption de PLLgPEG par voltampérométrie cyclique. *141*

IV.2. Miniaturisation de l'électrodépôt de polypyrrole : NanoBioplume. ***151***

IV.2.1. Adaptation de NanoBioplume au dépôt par électrochimie. *151*

IV.2.2. Electrodépôt de cuivre avec NanoBioplume. *155*

IV.2.3. Electrodépôt d'oligonucléotides-pyrrole avec NanoBioplume. *157*

IV.3. Fabrication d'un système de microélectrodes adapté à Bioplume. ***159***

IV.3.1. Design des microélectrodes. *160*

IV.3.2. Procédé de fabrication. *161*

IV.3.3. Mise au point et fabrication d'un premier lot de puces. *164*

IV.3.4. Validation des microélectrodes : électro-dépôt d'ADN. *168*

Bilan et Perspectives. ***173***

Matériel et Méthodes. *181*

Liste des communications scientifiques. *191*

Annexes.

Annexe 1 : Notions fondamentales d'électrochimie. *195*

Annexe 2 : Publications. *197*

Liste des abbréviations

ADN : Acide DésoxyRibonucléique
AFM : microscope à force atomique (Atomic Force Microscope)
BSA : albumine de sérum bovin
CE : contre-électrode (Counter Electrode)
CEA : Commissariat à l'Energie Atomique
CGH : hybridation génomique comparative (Comparative Genomic Hybridization)
CpGV : Cydia Pomonella Granulosis Virus
DPN : Dip Pen Nanolithography
EDL : Electric Droplet Lithography
ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FITC : fluoréceine (Fluoresceine IsoThioCyanate)
G6P : Glucose-6-Phosphate
GST : Glutathion-S-Transférase
HRP : peroxydase de radis noir (HorseRadish Peroxidase)
ISM : Institut des Sciences Moléculaires
ITO : oxyde d'indium dopé à l'étain (Indium Tin Oxide)
LAAS : Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes
LIFT : dépôt par activation laser (Laser Induced Forward Transfer)
MEB : Microscope Electronique à Balayage
MEMS : MicroElectroMechanical Systems
MUA : acide mercapto-undecanoïque (Mercapto Undecanoic Acid)
NADIS : NanoDispenser
NTA : acide nitrilo-acétique
PDMS : PolyDiméthylSiloxane : polymère permettant la réalisation de motifs nanométriques
PEG : PolyEthylène Glycol
PVDF : PolyVinylidene DiFluoride
RE : électrode de référence (Reference Electrode)
RIE : gravure par faisceau d'ions (Reactive Ion Etching)
SERS : spectroscopie Raman exaltée en surface (Surface Enhanced Raman Spectroscopy)
SNP : polymorphisme d'un seul nucléotide (Single Nucleotide Polymorphism)
SPR : resonance des plasmons de surface (Surface Plasmon Resonance)
SPRi : imagerie par SPR
THF : TetraHydroFurane
TRITC : rhodamine (Tetra methyl Rhodamine Iso Thio Cyanate)
UV : rayonnement ultraviolet
WE : électrode de travail (Working Electrode)

Introduction

Au cours de l'histoire des sciences, la démocratisation de l'enseignement s'est accompagnée d'une division du savoir en disciplines, justifiée par l'accumulation des connaissances. Le modèle historique du « savant », érudit dans tous les domaines, a donc laissé la place à celui d'une communauté de scientifiques, nombreux et spécialisés. Il est pourtant communément admis que la confrontation des points de vue et des connaissances est un moyen efficace pour accéder à la compréhension d'un phénomène ou la résolution d'un problème. C'est pour cette raison que de nombreuses initiatives sont menées pour réunir des chercheurs d'horizons divers autour de projets interdisciplinaires. Dans le domaine des biotechnologies, cette mise en commun des savoirs a abouti par exemple à la création des biopuces, à l'interface entre la biologie, la physique, la chimie et l'informatique.

Une **biopuce** est une lame de verre sur laquelle sont déposées des milliers de gouttelettes de solutions biologiques, permettant chacune de réaliser une analyse indépendante. Cette analyse consiste à détecter la reconnaissance entre des biomolécules complémentaires, plus précisément des ADN (oligonucléotides) ou des protéines. La méthode de détection est généralement la fluorescence, mais de nouveaux systèmes sont en développement, basés sur une transduction mécanique, électrique ou optique. De façon plus générale, les systèmes permettant ainsi de convertir une reconnaissance biologique en un signal mesurable sont appelés **biocapteurs**. Ce domaine est actuellement en pleine mutation, grâce au développement des techniques de microfabrication, qui permettent de réaliser des capteurs de taille micrométrique voire nanométrique. L'émergence de ces biocapteurs miniatures permet de concevoir des systèmes d'analyse facilement transportables auprès du patient, et fonctionnant avec des prélèvements biologiques de petits volumes. Le biocapteur est alors intégré dans un système complexe qui permet d'effectuer toutes les opérations depuis la préparation de l'échantillon jusqu'à l'affichage du résultat. Nous nous intéresserons plus spécifiquement aux biocapteurs pour lesquels une biomolécule dite « sonde » est immobilisée sur une surface et permet de tester la présence de la biomolécule complémentaire dans l'échantillon à analyser.

Que ce soit dans le domaine des biopuces ou des biocapteurs, l'évolution vers la miniaturisation fait apparaître des problématiques communes, qui seront articulées ici autour de deux points clés : l'adressage et l'immobilisation. Par « **adressage** », nous entendons le processus qui permet d'amener les biomolécules à un endroit précis de la surface, en formant éventuellement des motifs. D'autre part, l'« **immobilisation** » est ce qui permet de s'assurer que les biomolécules restent fixées sur la surface, même si celle-ci est placée dans un fluide qui peut être mis en mouvement. Ces deux étapes deviennent délicates dès lors que les surfaces concernées sont de plus en plus petites et intégrées dans un environnement complexe et fragile.

Dans un premier chapitre, nous présenterons plus en détail le contexte des biopuces et des biocapteurs dans lequel s'inscrit ce travail de thèse. Nous dresserons ensuite un bilan des méthodes existantes en termes d'adressage et d'immobilisation.

Le second chapitre sera tourné vers la problématique de l'adressage, que nous avons choisi de réaliser à l'aide du robot Bioplume. Nous montrerons que des motifs de 5-20µm peuvent être réalisés de façon multiplexée, puis que les quantités de matériel peuvent être diminuées en utilisant la technique d'interaction spot-dans-spot que nous avons développée.

Dans le chapitre suivant, nous exposerons les tests d'immobilisation réalisés pour cinq chimies de surface différentes. Dans une première partie, nous mettrons en évidence les performances et les contraintes de mises en œuvre de chacune de ces techniques. Nous montrerons alors que la méthode électrochimique de polymérisation de pyrrole permet de répondre aux exigences de réalisation sur des surfaces réduites et d'environnement complexe qui constituent la problématique de la thèse. Ceci passe par un couplage de l'électrochimie avec le robot Bioplume choisi précédemment comme méthode d'adressage. Pour illustrer l'efficacité de cette technique d'adressage et d'immobilisation simultanés, nous détaillerons dans une deuxième partie son application à deux biocapteurs particuliers. Ainsi, l'électrodépôt sera réalisé d'abord sur des prismes de SPRi, puis sur la section de fibres optiques utilisées pour l'endoscopie par effet SERS.

Le dernier chapitre permettra d'approfondir l'électrochimie localisée appliquée au robot Bioplume. Trois aspects seront présentés : d'abord l'électrodésorption, puis la réalisation à l'échelle du femto-litre à l'aide de plumes à pointes nanométriques, et enfin l'électrodépôt sur des microélectrodes conçues et fabriquées spécialement pour ce type d'étude.

Le choix de ce sujet de thèse est issu d'une volonté de travail interdisciplinaire : les résultats présentés sont donc le fruit de la collaboration avec des spécialistes de domaine aussi variés que la biochimie, l'électronique, la microfabrication, ou l'électrochimie.

Chapitre I

Chapitre I : Adressage et immobilisation de biomolécules dans le contexte des biopuces et des biocapteurs miniatures.

I.1. Biopuces, biocapteurs : techniques en quête de méthodes d'adressage et d'immobilisation de biomolécules, simples, miniaturisables, et économes

I.1.1. Puces à ADN et à protéines : un essor spectaculaire, une miniaturisation nécessaire

Une biopuce est un support solide sur lequel sont déposées plusieurs milliers de gouttelettes appelées « spots », contenant chacune une molécule biologique différente en solution. Ces biomolécules appelées « sondes » sont sélectionnées pour leur pertinence par rapport à une problématique de recherche ou d'analyse. La biopuce est ensuite recouverte d'une solution préparée à partir de l'échantillon à analyser. Cette solution contient les acides nucléiques ou les protéines extraits de l'échantillon, purifiés, marqués, (généralement en fluorescence) et appelés « cibles ». Chaque spot représente alors un test d'interaction différent : plusieurs milliers d'informations sont ainsi obtenues simultanément.

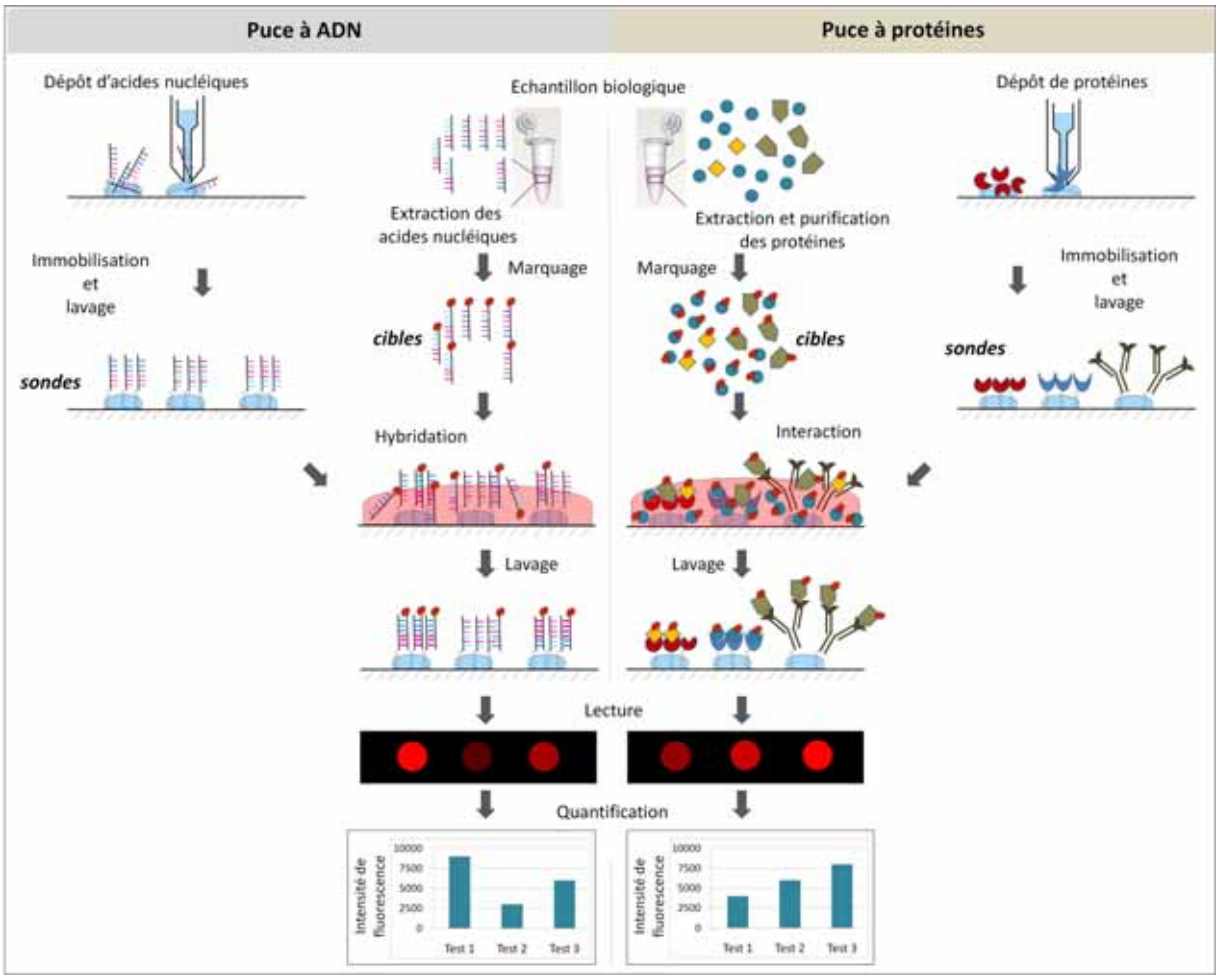


Figure 1 : Principe des biopuces.

Le concept de puce à ADN est né au début des années 1990 dans la dynamique créée autour du séquençage des génomes. Les puces à protéines se sont développées un peu plus tard, essentiellement à partir des années 2000. Depuis cette période, l'activité scientifique sur le sujet a augmenté de façon spectaculaire : à titre indicatif, l'évolution du nombre de publications référencées sur le site «PubMed » sous le mot clé « microarray » entre 1995 et 2007 est proche d'une augmentation exponentielle (figure 2).

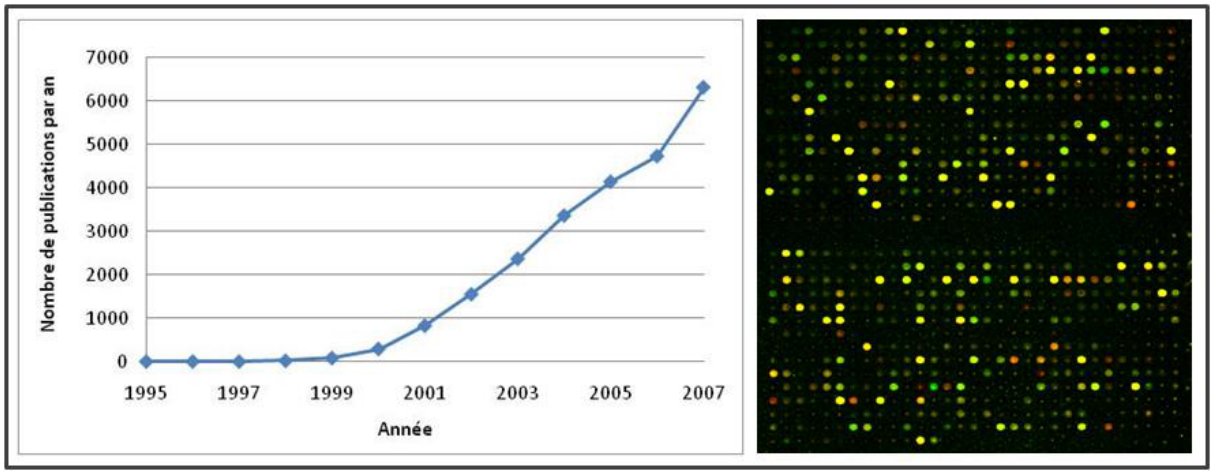


Figure 2 : Evolution de la production scientifique autour des biopuces entre 1995 et 2007.
Cette estimation a été réalisée en comptant le nombre de publications répondant au mot clé « microarray » sur le site PubMed ; b. Image d'une puce à ADN en fluorescence.

Historiquement, les premières utilisations des **puces à ADN** ont été le séquençage [1], la transcriptomique [2] et le génotypage [3] [4]. A partir de ces configurations de base, une large variété d'applications s'est ensuite développée. Quelques unes sont citées figure 3.

C'est certainement dans l'**étude des transcriptomes** que les puces à ADN ont apporté l'évolution la plus importante, en offrant la possibilité d'une étude globale. En effet les techniques de biologie moléculaire existantes ne permettaient alors d'étudier simultanément qu'un nombre restreint de gènes. Des études fondamentales ont ainsi été réalisées sur la réponse transcriptomique à divers stimuli, par exemple des changements environnementaux [5] [6], des changements d'état physiologique [7], ou la délétion de certains gènes [8]. La comparaison globale des transcrits a été particulièrement utilisée en cancérologie [9]. Ainsi, une nouvelle classification des types tumoraux a pu être mise en place sur la base de signatures moléculaires caractéristiques. De nouveaux types ont aussi été découverts, en particulier parmi les lymphomes B et T [10] [11].

En termes de **génotypage**, les deux techniques les plus abouties sont l'hybridation génomique comparative (CGH) et la recherche de polymorphismes génétiques sur un seul nucléotide (SNP). Ces techniques permettent par exemple d'établir la cartographie d'un génome, en étudiant les amplifications, délétions et mutations. La détection de mutations uniques est particulièrement utile pour l'identification de divers variants de micro-organismes, ce qui a des applications directes en médecine, en agroalimentaire et en environnement.

a.

Tableau 1A
Applications des puces à ADN

Matériel hybridé	Applications	Référence
ADNc	Criblage de banque	Grezz (1992) Mamm. Genome 11 : 609
Oligonucléotides	Caractérisation par empreinte d'oligonucléotides	Drmanac S. et al. (1996) Genomics 37: 29–40
ARNm	Mesure du transcriptome	Schena (1995) Science 270 : 467
ARNm	Mesure de la taille des ARNm	Hurowitz et al. (2003) GenBiol 5: R2
ARNm	Détection de gènes	Penn et al. (2000) Nature Genet 26: 315–318
ARNm	Validation de gènes	Shoemaker et al. (2001) Nature 409: 922–927
ADN	Reséquençage de gène	Kozal MJ et al. (1996) Nat Med 2: 753–759
ADN	Phénotypage	Gingeras et al. (1998) Genome Res 8: 435–448
ADN	Génotypage CGH	Pollack (1999) Nat. Genet. 23 : 41
ADN	Génotypage SNP	Winzeler et al. (1998) Science 281: 1194–1197
Plasmide	Suivi de réplication	Khodursky et al. (2000) PNAS 97: 9419–9424
Protéine	Sites reconnus par un facteur de transcription	Bulyk et al. (1999) Nature Biotech 17: 573–577
ADN	Sites de fixation d'un facteur de transcription sur la chromatine	Yver (2001) Nature 409: 533

b.

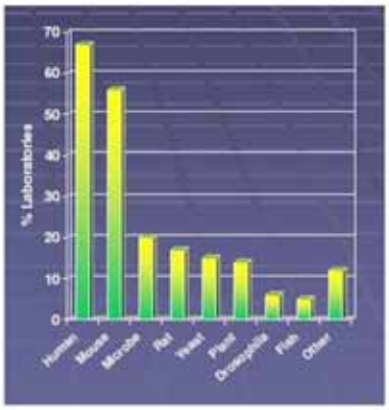


Tableau 1B
Applications des puces à ADN au niveau du transcriptome

Matériel hybridé	Propriété mesurée	Référence
ARNm	Transcriptome	[5]
ARNm	Taux de dégradation des ARNm	Wang et al. 2002 PNAS 99: 5860–5865
ARNm liés aux polysomes	Taux de traduction des ARNm	Johannes et al. 1999 PNAS 96: 13118–13123
ARNm liés aux membranes	Localisation subcellulaire des protéines	Diehn et al. 2000 Nature Genetics 25: 58–62
ARNm liés aux polysomes mitochondriaux	Localisation subcellulaire des protéines	Marc et al. 2002 EMBO reports 31 (21)

Figure 3 : a. Quelques applications des puces à ADN. [12] ; b. Aperçu des principaux organismes étudiés [13]

La figure 3b montre que la grande majorité des études porte sur l'homme et sur les organismes modèles comme la souris, le rat, la drosophile, la levure ou la bactérie *E. coli*. Parmi les microorganismes, on trouve essentiellement ceux ayant un intérêt agroalimentaire, les pathogènes, et ceux ayant un intérêt biologique particulier, comme les extrémophiles ou les symbiotes. Quelques études portent aussi sur divers animaux et plantes non modèles (porc, poulet, bœuf, tomate, tabac,…).

[1] : C.R. Cantor, A. Mirzabekov et E. Southern, *Genomics*, 1992, **13**, 1378-1383

[2] : M. Schena, D. Shalon, R.W. Davis, P.O. Brown, *Science*, 1995, **270,** 467-470

[3] : E.A. Winzeler, D.R. Richards, A.R. Conway, A.L. Goldstein, S. Kalman, M.J. McCullough, J.H. McCusker, D.A. Stevens, L. Wodicka, D.J. Lockhart, R.W. Davis, *Science*, 1998, **281**, 1194-1197

[4] : J.R. Pollack, C.M. Perou, A.A. Alizadeh, M.B. Eisen, A. Pergamenschikov, C. F. Williams, S.S. Jeffrey, D. Botstein et P.O. Brown, *Nature Genetics*, 1999, **23**, 41-46

[5] : K. Kuranda, V. Leberre, S. Sokol, G. Palamarczyk, et J. François, *Mol. Microbiol.*, 2006, **61 (5)**, 1147 - 1166.

[6] : E. Redon, P. Loubière, M. Cocaign-Bousquet, *Journal of bacteriology*, 2005, **187**, 3589-3592

[7] : N. Viguerie, H. Vidal, P. Arner, C. Holst, C. Verdich, S. Avizou, A. Astrup, W.H. Saris, I.A. Macdonald, E. Klimcakova, K. Clement, A. Martinez, J. Hoffstedt, T.I. Sorensen, D. Langin, *Diabetologia*, 2005, **48 (1)**, 123-31.

[8] : A. Lagorce, N.C. Hauser, D. Labourdette, C. Rodriguez, H. Martin-Yken, J. Arroyo, J.D. Hoheisel, J. Francois, *J. Biol. Chem.*, 2003, PMID: 12644457

[9] : T.R. Golub, D.K. Slonim, P. Tamayo, C. Huard, M. Gaasenbeek, J. P. Mesirov, H. Coller, M.L. Loh, J.R. Downing, M.A. Caligiuri, C.D. BloomÞeld, E.S. Lander, *Science*, 1999 , **286**, 531-537

[10] : A.A. Alizadeh *et al*, *Nature*, 2000, **403**, 503-511

[11] : B. Ballester, O. Ramuz, C. Gisselbrecht, G. Doucet, L. Loï, B. Loriod, F. Bertucci, R. Bouabdallah, E. Devilard, N. Carbuccia, M.-J. Mozziconacci, D. Birnbaum, P. Brousset, F. Berger, G. Salles, J. Briere, R. Houlgatte, P. Gaulard et L. Xerri, *Oncogene*, 2006, **25**, 1560-1570

[12] : D. Baron, M. Raharijaona, R. Houlgatte, *ITBM-RBM*, 2007, **28**, 210–215

[13] : K.G. Krull, *Proceedings of Advances in Microarray Technology conference*, 2008, Barcelone, Spain

Dans le cas des **puces à protéines**, les applications concernent potentiellement le champ très vaste des analyses faites jusqu'alors par tests immunologiques, par exemple l'étude des voies de signalisation et des systèmes de régulation, le criblage pharmaceutique ou l'identification de pathogènes. Quelques exemples de puces dédiées à l'analyse de maladies infectieuses sont présentés figure 4 : ces puces peuvent permettre l'identification des marqueurs de pathogènes mais aussi l'étude de la réponse immunitaire suite à l'infection, ou suite à l'injection d'un vaccin.

Les puces à protéines suscitent aussi un intérêt grandissant dans le domaine des maladies auto-immunes, qui affectent 5% de la population mondiale [14] mais dont certains auto-antigènes ne sont toujours pas identifiés. Les efforts dans ce domaine ont conduit récemment à l'entrée en phase clinique d'une puce permettant d'identifier dix de ces maladies [15].

La détection d'allergènes est un autre champ d'application particulièrement intéressant du point de vue économique. Les premiers dispositifs proposés dans ce domaine donnent des résultats très encourageants puisque les standards internationaux des tests allergiques semblent respectés [16] [17] [18]. Sur le plan fondamental, les nouvelles possibilités d'analyse globale des protéomes permettent une étude poussée de la traduction et des modifications post-traductionnelles, qui peuvent être éventuellement complémentaires avec une étude transcriptomique sur puce à ADN.

a. Les applications biomédicales des puces à protéines

Destination	Molécules déposées		
	Protéines/peptides	Antigènes	Anticorps
Évaluation de la réponse immunitaire[a]	x	x	
Recherche des candidats aux vaccins[a]	x	x	
Cartographie d'épitopes[b]	x	x	
Profil d'expression des protéines [c]	x (lysats)		x
Étude des modifications post-traductionnelles (phosphorylation, etc.)[c]	x (lysats)		x
Recherche des biomarqueurs	x	x	x
Recherche de cibles thérapeutiques	x		x
Suivi de l'effet des médicaments	x (lysats)		x
Criblage des agents thérapeutiques	x		
Développement d'essais immunologiques	x	x	x
Développement d'outils diagnostiques	x	x	x

[a] Les puces peuvent aussi contenir des molécules non protéiques (sucres, oligosaccharides, ADN, etc.).
[b] Cette cartographie est habituellement effectuée par des courts peptides correspondant à la séquence de la protéine d'intérêt.
[c] On peut utiliser les puces constituées de lysats avec les protéines totales (puce à reverse phase).

b. Puces à antigènes dédiées aux maladies infectieuses

Pathologie	Agent pathogène	Nature des antigènes	Source du sérum
Sida	*SHIV*	Peptides, protéines recombinantes	Macaque
	HIV-1	Peptides mimétiques (phage display)	Homme
Sars	*Coronavirus*	Proteines recombinantes	Homme
Peste	*Yersinia pestis*	Protéines recombinantes	Lapin
Méningite	*Neisseria meningitidis*	Protéines recombinantes	Homme
Tuberculose	*Mycobacterium tuberculosis*	Fractions protéiques Protéines recombinantes	Homme
Lèpre	*Mycobacterium leprae*	Protéines natives Protéines recombinantes	Homme
Tularémie	*Francisella tularensis*	Protéines recombinantes	Souris
Malaria	*Plasmodium falciparum*	Protéines synthétisées dans un système acellulaire	Homme
Variole	*Vaccinia*	Protéines recombinantes	Souris, homme

Figure 4 : Quelques applications des puces à protéines (a) et exemples de puces pour la détection de maladies infectieuses (b) [16].

Pour résumer, l'activité scientifique engagée depuis une quinzaine d'années autour de la technique des biopuces a entraîné son essor au niveau académique, qui permet aujourd'hui l'entrée dans une seconde phase, celle de la commercialisation et du passage en clinique. C'est le cas par exemple pour deux puces de diagnostic proposées respectivement par Roche et par Agendia [19] [20]. Cet essor est dû à l'expertise grandissante du point de vue technique mais aussi au développement d'outils d'analyse et d'interprétation des données [21]. Les biologistes sont en effet confrontés à des quantités de données sans précédent, dont du sens ne peut être tiré qu'à l'aide de traitements statistiques et d'outils bioinformatiques spécialisés. Les efforts dans ce domaine sont particulièrement importants actuellement [22] [23].

Les évolutions pressenties pour les prochaines années concernent trois points : l'application à des domaines et problématiques de plus en plus variés, l'obtention de données de plus en plus fiables, et l'intégrabilité. **Evoluer vers plus d'intégrabilité** signifie pouvoir réaliser la totalité des manipulations nécessaires sur un dispositif le plus petit possible, nécessitant le minimum d'intervention de la part d'un opérateur, et utilisant des quantités de matériel biologique réduites. Des évolutions importantes ont déjà été réalisées dans ce sens : les étapes d'extraction, d'amplification et de marquage ont ainsi été miniaturisées pour être réalisées en « laboratoires sur puces » [24] [25] [26]. Pour pouvoir réaliser le même nombre d'analyses sur des surfaces de plus en plus réduites, les biopuces contenues dans ce type de dispositif devront présenter une densité de spots bien plus importante que les puces actuelles. Des techniques d'adressage permettant de **miniaturiser les spots** devront donc être développées.

Afin de s'adapter à ces nouveaux formats, de nouvelles méthodes de détection devront aussi être imaginées. Heureusement le domaine des biocapteurs évolue lui aussi vers des systèmes de plus en plus miniaturisés.

---

[14] : D.L. Jacobson, S.J. Gange, N.R. Roseb et N.M.H. Graham, *Clinical Immunology and Immunopathology*, 1997, **84 (3)**, 223-243

[15] : www.whatman.com

[16] : V. Sakanyan, et M.-C. Arnaud, *IRBM*, 2007, **28 (5-6)**, 187-193

[17] : C. Harwanegg, S. Laffer, R. Hiller, M.W. Mueller, D. Kraft, S. Spitzauer, R. Valenta, *Clinical & Experimental Allergy*, 2003, **33 (1)**, 7-13

[18] : J.-C. Gaudin, H. Rabesona, Y. Choiset, G. Yeretssian, J.-M. Chobert, V. Sakanyan, M. Drouet, T. Haertlé, *Clinical & Experimental Allergy*, 2008, **38 (4)**, 686-693

[19] : J. de Leon, *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 2006, **6 (3)**, 277-286

[20] : J. Couzin, *Science*, 2007, **315 (5814)**, 924

[21] : J. Quackenbush, *N. Engl. J. Med.*, 2006, **354 (23)**, 2463-2472

[22] : L. Shi *et al*, *BMC Bioinformatics*, 2008, **9 (Suppl 9)**, S10

[23] : R. Simon, *Current Opinion in Biotechnology*, 2008, **19**, 26-29

[24] : M.A. Burns, B.N. Johnson, S.N. Brahmasandra, K. Handique, J.R. Webster, M. Krishnan, T.S. Sammarco, P.M. Man, D. Jones, D. Heldsinger, C.H. Mastrangelo, D.T. Burke, *Science*, 1998, **282**, 484

[25] : B.C. Giordano, J. Ferrance, S. Swedberg, A.F.R. Hühmer, et J.P. Landers, *Analytical Biochemistry*, 2001, **291**, 124-132

[26] : R.H. Liu, J. Yang, R. Lenigk, J. Bonanno, et P. Grodzinski, *Anal. Chem.*, 2004, **76**, 1824-1831

I.1.2. Biocapteurs : miniaturisation pour plus d'intégration et de meilleures performances

Un biocapteur est un système permettant de traduire une reconnaissance biologique spécifique en un signal mesurable. Il est composé d'une couche biologique sensible, d'un transducteur, et d'un système d'acquisition et de traitement des données.

L'expertise actuelle en microélectronique permet de fabriquer des composants de taille micrométrique, utilisés par exemple dans les téléphones portables. Pourquoi ne pas imaginer utiliser ces techniques pour fabriquer de nouveaux biocapteurs ? En effet, la réduction de taille des biocapteurs laisse entrevoir de multiples avantages. D'abord, les transports de masse et de chaleur sont plus rapides lorsque les distances sont réduites, ce qui permet de penser que les paramètres de détection sont améliorés. Ensuite, la réduction globale de la surface active limite la quantité d'échantillon biologique nécessaire pour l'analyse, ce qui est particulièrement intéressant pour tous les échantillons précieux, par exemple les biopsies contenant peu de cellules, les prélèvements sur nourrissons ou les protéines minoritaires d'un sérum. Enfin, la conception de biocapteurs miniatures permet l'intégration dans des systèmes compacts, portatifs, et entièrement automatisés.

D'un point de vue économique, les techniques de microfabrication permettent de réaliser un grand nombre de capteurs à moindre coût. Une détection multiplexée sur plusieurs capteurs est aussi envisageable sans qu'il soit nécessaire d'augmenter l'encombrement du dispositif.

Une large variété de dispositifs de type biocapteurs miniatures a été proposée, que ce soit dans le domaine de la transduction électrique, optique, électrochimique, ou mécanique. Quelques exemples sont rassemblés figure 5.

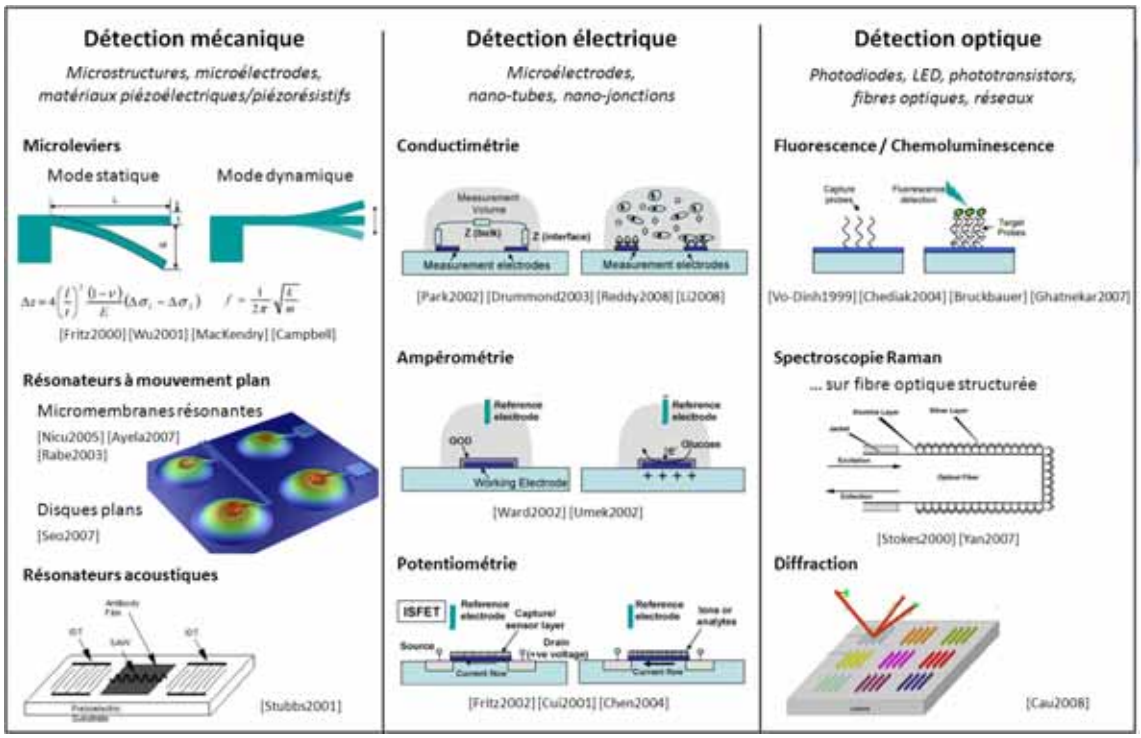


Figure 5 : Quelques exemples de biocapteurs miniatures en cours de développement.
Les références liées à cette figure se trouvent à la fin de ce chapitre

Un biocapteur électromécanique ou BioMEMS est développé par l'équipe de Liviu Nicu au LAAS-CNRS. Il est composé de micromembranes résonantes à actionnement et détection piézoélectriques [27]. Son principe repose sur la relation entre la masse des membranes et leur fréquence de résonance. Lors d'une interaction biologique, l'ajout de masse se traduit ainsi par une baisse de la fréquence de résonance [28] [29].

Les premiers tests de fonctionnalisation de la surface de ces membranes, menés en 2004, ont permis de soulever deux problèmes. D'une part il est impossible de fonctionnaliser les membranes par simple trempage dans une solution. En effet, ceci fait gonfler le gel de silicone qui protège les microcircuits et les contraintes mécaniques qui apparaissent coupent certaines pistes. Ce problème de fragilité n'est pas spécifique aux micromembranes : électrodes miniatures, nano-fils ou micro-leviers sont nécessairement moins robustes que leurs équivalents macroscopiques. Des méthodes permettant d'**adresser des biomolécules à la surface de ce type de structures** doivent donc être recherchées. La difficulté réside dans leur petite taille, leur fragilité, et leur intégration dans un environnement complexe.

I.1.3. Deux secteurs, le même défi : adresser et immobiliser des biomolécules en moindre quantité, à très haute résolution, dans des environnements complexes

Que ce soit dans le domaine des biopuces ou des biocapteurs, les contraintes qui apparaissent suite aux évolutions récentes sont les mêmes :

- ✓ Pour des raisons pratiques et économiques, une réduction des quantités de matériel biologique à utiliser est indispensable.
- ✓ Les biomolécules doivent être adressées sur des surfaces de plus en plus réduites, que ce soit pour augmenter la densité d'une biopuce ou pour s'adapter à la réduction de taille des biocapteurs.
- ✓ Ces surfaces sont éventuellement plus fragiles et plus complexes, qu'il s'agisse d'un système de biopuce intégrée ou de structures actives d'un capteur.
- ✓ Les chimies de surface mises au point pour le format en lame de verre des biopuces ne sont pas nécessairement adaptables à des surfaces de petite taille intégrées à un environnement complexe.

Ces problématiques peuvent être rassemblées autour de deux points clés : l'**adressage** et l'**immobilisation** des biomolécules sur une surface. Un état de l'art de ces deux domaines est donc présenté dans les paragraphes suivants.

---

[27] : M. Guirardel, *Conception, réalisation et caractérisation de biocapteurs micromécaniques résonants en silicium avec actionnement piézoélectrique intégré : détection de l'adsorption de nanoparticules d'or*, Thèse, Conception de Circuits Microélectroniques et Microsystèmes, Toulouse, 2003

[28] : L. Nicu, M. Guirardel, F. Chambosse, P. Rougerie, S. Hinh, E. Trévisiol, J.-M. Francois, J.-P. Majoral, A.-M.Caminade, E. Cattan, C. Bergaud, *Sensors and Actuators B*, 2005, **110**, 125-136

[29] : C. Ayela, F. Vandevelde, D. Lagrange, K. Haupt, L. Nicu, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2007, **46(48)**, 9271- 4

I.2. Adressage de biomolécules sur des surfaces : un large éventail de techniques du millimètre au nanomètre.

Adresser des molécules sur une surface signifie les y apporter de façon précise et contrôlée, éventuellement en formant des motifs prédéfinis. Dans le cadre des biopuces, il s'agit généralement de réaliser des matrices de spots ronds ou carrés sur des surfaces planes comme des lames de verre. En ce qui concerne les biocapteurs, les biomolécules doivent être adressées à l'endroit même où la détection aura lieu. Pour répondre à ces problématiques, des méthodes variées ont été proposées, la plupart inspirées de techniques largement connues comme l'imprimerie, l'écriture au stylo-plume ou le simple acheminement dans une canalisation. Des adaptations ont permis d'atteindre des résolutions inférieures au millimètre, puis largement inférieures au micron. Pour comparer les méthodes entre elles, on peut aussi s'intéresser à la variété et à la taille des surfaces adressables, à la quantité de matériel biologique nécessaire, à la reproductibilité des motifs, en taille, en forme et en épaisseur, à la vitesse du processus et enfin à la possibilité d'alignement sur des motifs pré-existants.

I.2.1. Adressage par dépôt de liquide

I.2.1.a. Dépôt par contact : le modèle du stylo plume

Les techniques de dépôt par contact reposent sur le phénomène de capillarité : lorsqu'une aiguille contenant un liquide est mise au contact d'une surface, une goutte est déposée. La taille de la goutte dépend des énergies de surface, de la tension superficielle du fluide, du taux d'humidité, de la force d'appui, du temps de contact et de la géométrie de l'aiguille. Depuis les premiers systèmes à aiguilles ou capillaires de quelques centaines de microns [30] [31], des efforts de miniaturisation ont été réalisés. En particulier, l'utilisation de la pointe d'un microscope à force atomique (AFM) a été largement étudiée. Un dispositif intermédiaire basé sur des microleviers a été proposé par le LAAS-CNRS. L'ensemble de ces techniques est détaillé dans les paragraphes suivants.

- *Pipettes et aiguilles*

La majorité des robots commerciaux utilisés pour la réalisation de biopuces utilisent des aiguilles en acier inoxydable montées sur une tête mobile pilotée par un robot. Ces aiguilles ont une forme très proche de la pointe d'un stylo plume, avec un canal et parfois un réservoir. Elles sont trempées dans le liquide à déposer qui remplit le canal par capillarité puis mises en contact avec la surface sur laquelle une goutte est alors déposée [32] [33]. Un grand nombre de spots peut être réalisé sans qu'il soit nécessaire de recharger l'aiguille, ce qui permet d'obtenir des réplicats sans trop allonger le processus de dépôt. Il existe aussi des aiguilles plates qui sont utilisées pour les fluides les plus visqueux, par exemple lorsque le tampon de dépôt contient du glycérol. La taille des spots déposés par ces deux types d'aiguilles varie de 50 à 500µm.

Parmi les sociétés qui commercialisent ce type de système, on peut citer Telechem International/ArrayIt, Biorad, Genetix, et l'original V&P Scientific Incorporation qui propose un système simplifié pour dépôt manuel. Grâce aux documents détaillés fournis par P. Brown de l'université de Stanford (USA), certains laboratoires choisissent aussi de fabriquer eux-mêmes leur robot de dépôt [34] [35].

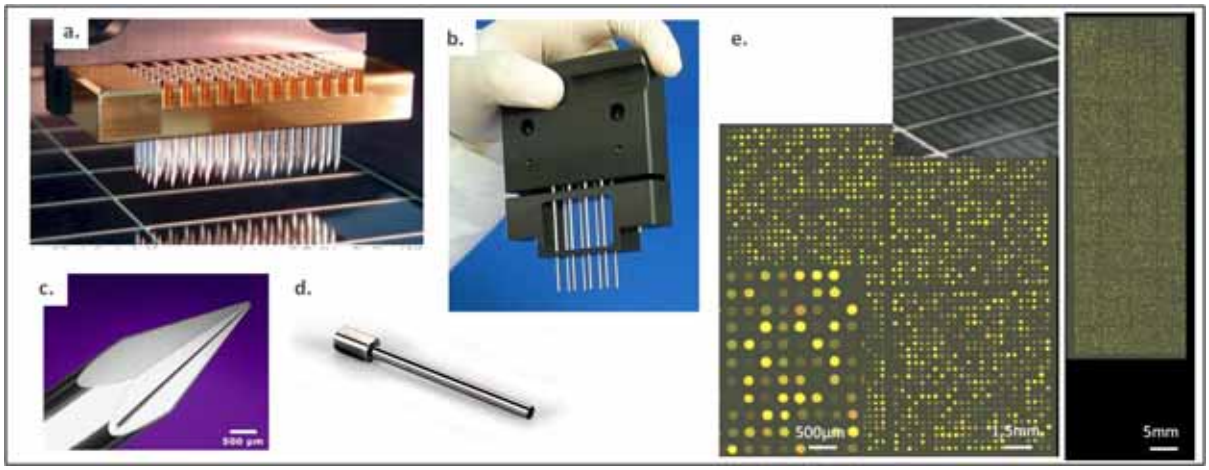


Figure 6 : Dépôt par aiguilles : exemples de systèmes commerciaux.
a.Tête mobile portant 48 aiguilles [30] ; b. Système de dépôt manuel [36] ; c. Aiguille à canal ;
d. Aiguille pleine [30] ; e. Vues de spots déposés sur une lame de verre. En bas, image en fluorescence.

Inspirés de la micropipette traditionnelle, des dispositifs à base de capillaires ont été proposés. Un système d'actionnement du liquide y a été intégré pour faciliter le dépôt sur les surfaces les plus hydrophobes : ultrasons [37] ou impulsion électrique [38]. Rodolfa *et al* ont proposé une pipette à deux réservoirs, permettant de déposer simultanément deux liquides, ou de déposer un deuxième liquide dans une goutte existante [39]. L'utilisation de capillaires très effilés a permis de diminuer la taille des spots à une dizaine de microns [40] mais la géométrie des ouvertures obtenues est difficilement reproductible. Pour pallier cet inconvénient, Guenat *et al* ont proposé un procédé de microfabrication en silicium ou polymère [41]. La parallélisation des dépôts est ainsi rendue possible puisque plusieurs pipettes peuvent être fabriquées sur un même support. Cependant le manque de flexibilité de ces structures rend leur manipulation complexe.

[30] : www.arrayit.com
[31] : www.bio-rad.com
[32] : M. Schena, D. Shalon, R.W. Davis, P.O. Brown, Science, 1995, **270,** 467-470
[33] : G. Yershov *et al*, *Proc. of the National Academy of Sciences USA*, 1996, **93**, 4913-4918
[34] : A. Thompson, S. Lucchini et J.C.D. Hinton, Trends in Microbiology, 2001, **9 (4)**
[35] : http://cmgm.stanford.edu/pbrown/mguide/index.html
[36] : www.vp-scientific.com
[37] : B.J. Larson, S.D. Gillmor, M.G. Lagally, , Review of Scientific Instruments, 2004, 75 (4), 832-836.
[38] : K.T. Rodolfa, A. Bruckbauer, D. Zhou, A.I. Schevchuk, Y.E. Korchev, et D. Klenerman, Nano Letters, 2005, 6 (2), 252-257.
[39] : K.T. Rodolfa, A. Bruckbauer, D. Zhou, Y.E. Korchev, et D. Klenerman, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2005, **44**, 6854 –6859
[40] : C.-H. Lee et A. Lal, *IEEE Transactions on Ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control*, 2004, **51 (11)**, 1514
[41] : O.T. Guenat, S. Generelli, M. Dadras, L. Berdondini, N.F. de Rooij et M. Koudelka-Hep, *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 2005, **15**, 2372

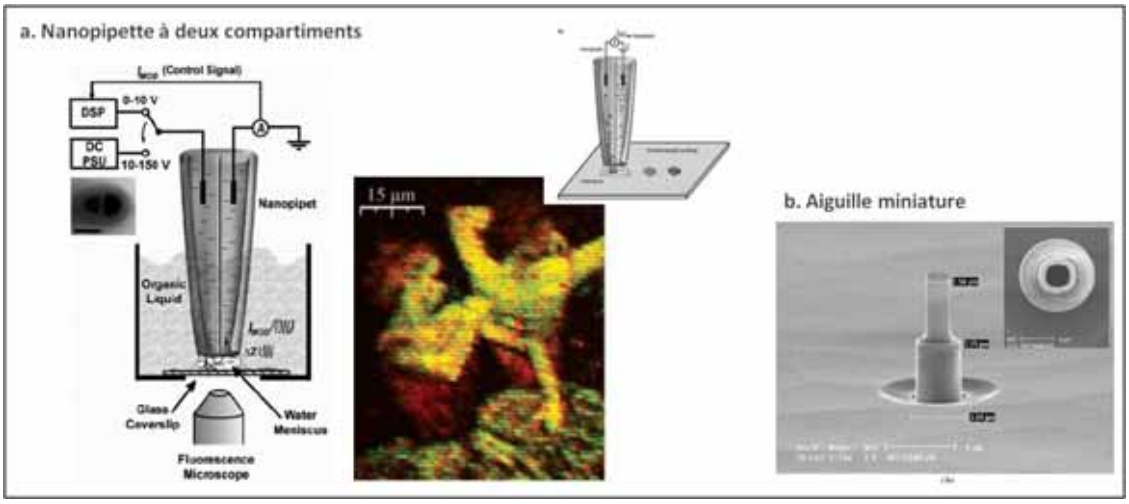


Figure 7 : a. Nanopipette à deux compartiments ; b. Aiguille miniaturisée par microfabrication
a. En bas : Dépôt de deux fluorophores pour obtenir une image à 3 couleurs : vert, rouge et jaune (vert + rouge) [38] [39] ; b. Aiguille plate miniaturisée par microfabrication [41]

➢ *Dépôt à l'aide de la pointe d'un AFM*

Le Microscope à Force Atomique (AFM) permet de réaliser des images d'une surface avec une résolution inférieure au nm (30Å latéral, 1Å vertical). Proposé par Binnig, Quate et Gerber en 1986, son principe repose sur l'utilisation d'une pointe très fine (2-3nm à l'extrémité) fabriquée en même temps que le microlevier qui la comporte. La pointe est déplacée au-dessus de la surface à imager : toute variation de l'état de surface se traduit par une déformation du microlevier qui est enregistrée à l'aide d'un laser pointé dessus (figure 8) [42].

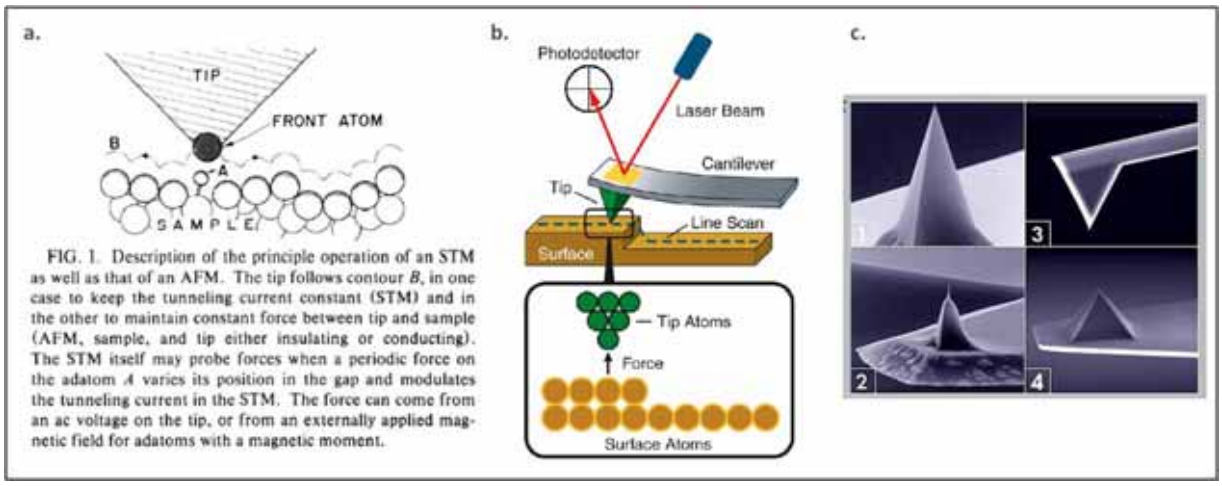


Figure 8 : Principe du Microscope à Force Atomique.
a. Extrait de la première publication, en 1986 [42] ; b. Principe [43] ; c. Divers design de pointes [44].

[42] : G. Binnig, C.F. Quate, C. Gerber, *Physical Review Letters*, 1986, **56**, 930-933
[43] : www.agilent.com
[44] : www.nanoworld.com

L'idée d'utiliser la pointe d'un AFM pour déposer des molécules biologiques a été proposée par Jaschke et Butt en 1995 [45] et développée par le laboratoire de Chad A. Mirkin à l'université de Northwestern (Evanston, USA) [46] [47] [48] qui l'a baptisée « Dip-Pen Nanolithography ». La pointe de l'AFM est trempée dans la solution à déposer qui y sèche instantanément. Le dépôt a lieu dans une atmosphère contrôlée en humidité, ce qui permet la formation d'un ménisque lorsque la pointe est mise en contact avec la surface. Ce ménisque se forme spontanément en raison des dimensions réduites de la pointe. Les molécules présentes sur la pointe se dissolvent alors et sont ainsi déposées. Des motifs de quelques dizaines de nanomètres peuvent être obtenus de cette façon [47].

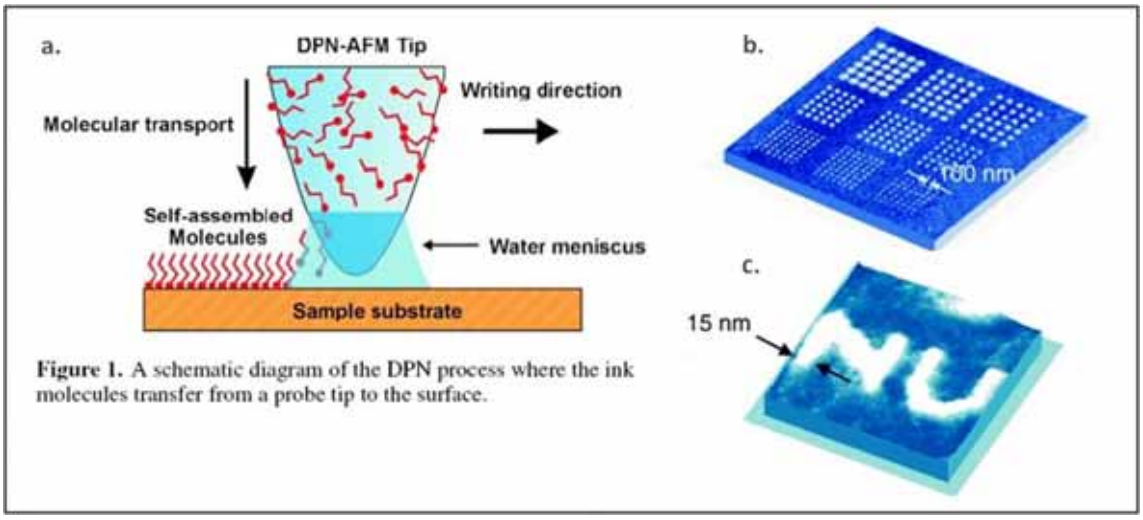


Figure 9 : Dépôt de thiols par « Dip-Pen Nanolithography ».
a. Principe du dépôt à l'aide de la pointe d'un AFM [49] ; b. Dépôt de MHA sur Au [50] ; c. Lignes (15nm) de MHA sur Au [51] ; MHA : acide mercapto-hexadécanoïque

Dans un premier temps, ce sont de petites molécules, en particulier des dérivés contenant des fonctions thiols, qui ont été déposées comme couche d'accroche pour de l'ADN ou des protéines [52] [53]. En 2004, Lee *et al* ont ainsi réalisé une nano-puce à anticorps, pour la détection du virus HIV dans le plasma de patients [54].

---

[45] : M. Jaschke, and J. Butt, *Langmui*r, 1995, **11**, 1061
[46] : R.D. Piner, J. Zhu, F. Xu, S. Hong, C.A. Mirkin, *Science*, 1999, **283**, 661-663.
[47] : D.S. Ginger, H. Zhang et C.A. Mirkin, *Angewandte Chemie International Edition*, 2004, **43**, 30
[48] : K. Salaita, Y. Wang, et C.A. Mirkin, *Nature Nanotechnology*, 2007, **2**, 145-155
[49] : M. Zhang, D. Bullen, S. W. Chung, S. Hong, K. S. Ryu, Z. Fan, C.A. Mirkin et C. Liu, *Nanotechnology*, 2002, **13**, 212–217
[50] : L.M. Demers, C.A. Mirkin, *Ang Chemie*, 2001, **113**, 3159; *Ang. Chemi. Int. Ed.,* 2001, **40**, 3069.
[51] : S.H. Hong, J. Zhu, C. A. Mirkin, *Science* 1999, **286**, 523
[52] : H. Zhang, Z.Li, C.A. Mirkin, *Avanced Materials*, 2002, **14**, 1472
[53] : K.B. Lee, S.-J. Park, C.A. Mirkin, J.C. Smith, M. Mrksich, *Science*, 2002, **295**, 1702-1705.
[54] : K.-B. Lee, E.-Y. Kim, C.A. Mirkin, et S.M. Wolinsky, *Nanoletters*, 2004, **4 (10)**, 1869

Le dépôt direct d'ADN a été proposé par L.M. Demers, du laboratoire de Mirkin [55], et utilisé par exemple par Chung *et al* pour réaliser une jonction bio-électrique entre deux nanoélectrodes [56]. L'ADN a été déposé dans l'espace de 20-100nm séparant les nanoélectrodes, puis hybridé avec l'ADN complémentaire portant une nanoparticule d'or, pour des études de conductivité. Ce concept a été repris par d'autres équipes et très récemment la détection spécifique d'interactions ADN/ADN grâce à ce type de jonction a été validée [57].

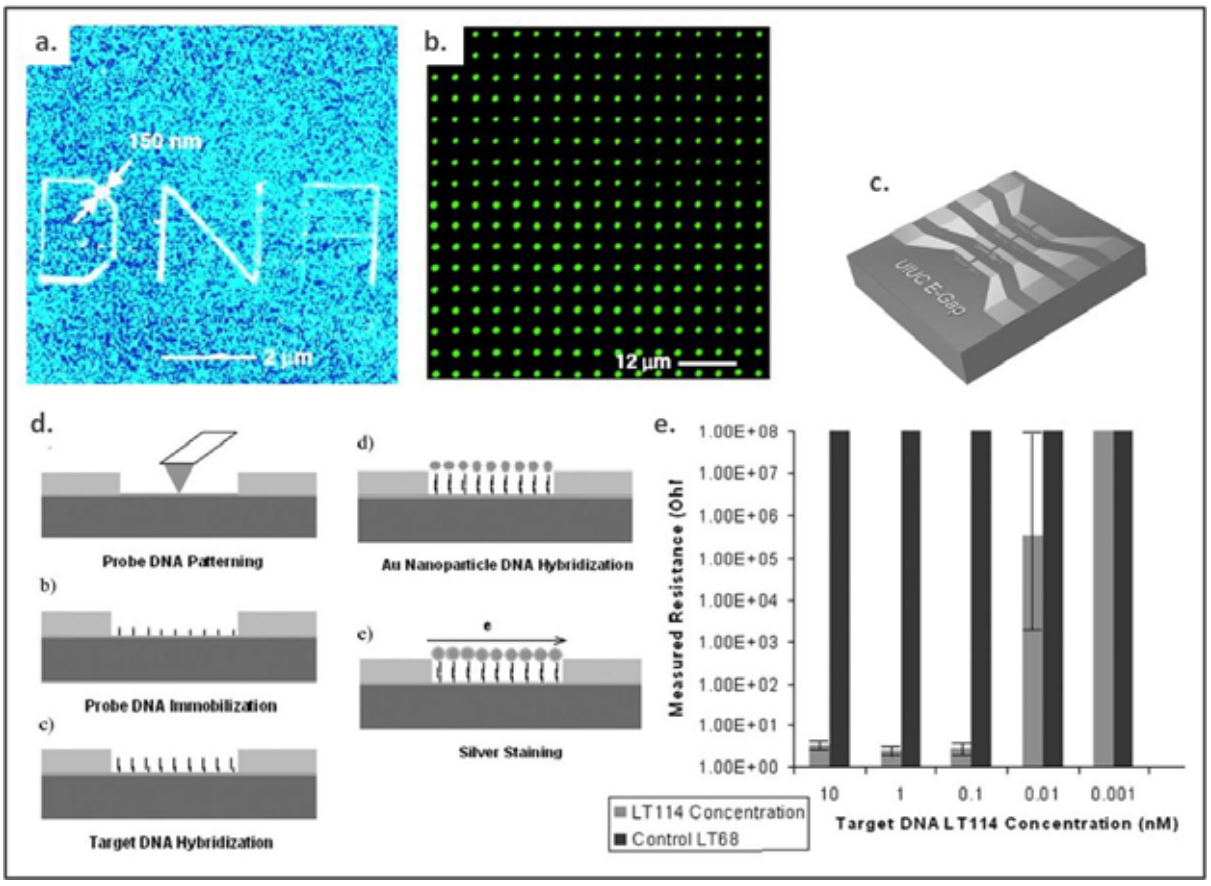


Figure 10 : Dépôt direct d'ADN par « Dip-Pen Nanolithography ».

a. Dépôt d'ADN sur or. Image AFM en mode tapping ; **b.** Dépôt d'ADN sur résine. Image en fluorescence après hybridation avec l'ADN complémentaire [55]

c, d, e. Détection d'une interaction ADN/ADN grâce au dépôt par DPN sur un système de nanoélectrodes.

c. Système de nanoélectrodes ; d. Schéma de principe ; e. Détection de l'hybridation de l'oligonucleotide LT114 à partir de 10-100pM, grâce à une variation de résistance entre les nanoélectrodes [57]

[55] : L.M. Demers, D.S. Ginger, S.-J. Park, Z. Li, S.-W. Chung, C.A. Mirkin, *Science*, 2002, **296**, 836-1838.

[56] : S.W. Chung, D. S. Ginger, M.W. Morales, Z. Zhang, V. Chandrasekhar, M.A. Ratner, C.A. Mirkin, *Small*, 2005, **1**, 64-69

[57] : S. Li, S. Szegedi, E. Goluch, et C. Liu, *Anal. Chem.*, 2008, **80**, 5899–5904 Wilson 2001 65E] : D.L.

Le dépôt direct de protéines par DPN s'est développé à partir des résultats de Wilson *et al* sur du collagène modifié par un thiol [58] [59] [60]. En 2006, Lee *et al* ont optimisé les conditions de dépôt en termes de temps de contact et d'humidité pour obtenir des plots d'épaisseur homogène (15+/-5nm). Ainsi, une interaction protéine/protéine a pu être détectée grâce à la variation de l'épaisseur du plot [61].

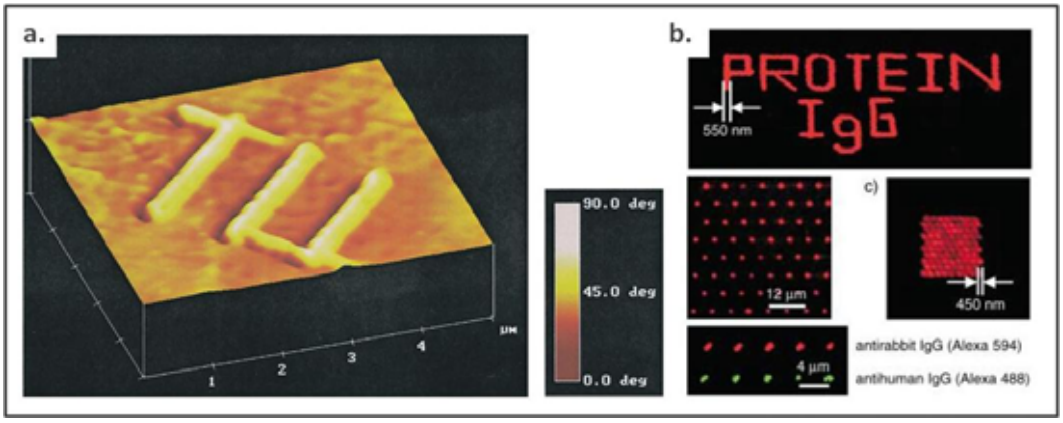


Figure 11 : Dépôt direct de protéines par « Dip-Pen » Nanolithographie.

a. Dépôt sur Au de collagène modifié par un thiol. Image AFM en mode tapping [58] ; **b.** Dépôt sur SiO2 d'anticorps marqués en fluorescence [59]

Le dépôt *via* un ménisque oblige à contrôler précisément le taux d'humidité [62] et à recharger très régulièrement la pointe. Pour pallier cet inconvénient, plusieurs équipes ont proposé de modifier la pointe pour y ajouter un canal [63] [64] [65]. Le nouveau dispositif, baptisé **stylo « nano-fontaine »** (nanofountain pen) ou **NADIS** (nanodispenser) a été utilisé pour déposer des protéines [66] et réaliser des motifs de molécules à fonctions thiols de 40 à 200nm [67].

---

[58] : D.L. Wilson, R. Martin, S. Hong, C.A. Mirkin, *Proc. of the Nati. Ac. of Sc. USA*, 2001, **98**, 13660-1364

[59] : J.-H. Lim, D. S. Ginger, K.-B. Lee, J. Heo, J.-M. Nam, C.A. Mirkin, *Ang. Chem. Int. Ed.n*, 2003, **42**, 2309

[60] : K.-B. Lee, J.-H. Lim, et C.A. Mirkin, J. *Am. Chem. Soc.*, 2003, **125 (19)**, 5588-5589

[61] : M. Lee, D.-K. Kang, H.-K. Yang, K.-H. Park, S.Y. Choe, C. Kang, S.-I. Chang, M.H. Han, I. Kang, *Proteomics*, 2006, **6**, 1094-1103

[62] : M. Su, X.Liu, S.Y. Li, V.P. Dravid, C.A. Mirkin, *Langmuir*, 2005, **21 (23)**, 10902

[63] : A. Lewis, Y. Kheifetz, E. Shambrodt, A. Radko, E. Khatchatryan, et C. Sukenik, *Applied Physics Letters*, 1999, **75 (17)**, 2689

[64] : A. Meister, S. Jeney, M. Liley, T. Akiyama, U. Staufer, N.F. de Rooij et H. Heinzelmann, *Microelectronic Engineering*, 2003, **67-68**, 644

[65] : A. Meister, M. Liley, J. Brugger, R. Pugin, H. Heinzelmann, *Appl. Phy. Lett.*, 2004, **85 (25)**, 6260

[66] : H. Taha, R.S. Marks, L.A. Gheber, I. Rousso, *Applied Physics Letters*, 2003, **83 (5)**, 1041

[67] : N. Moldovan, K.-H. Kim, et H.D. Espinosa, *Journal of Microelectromechanichal Systems*, 2006, **15 (1),** 204-213

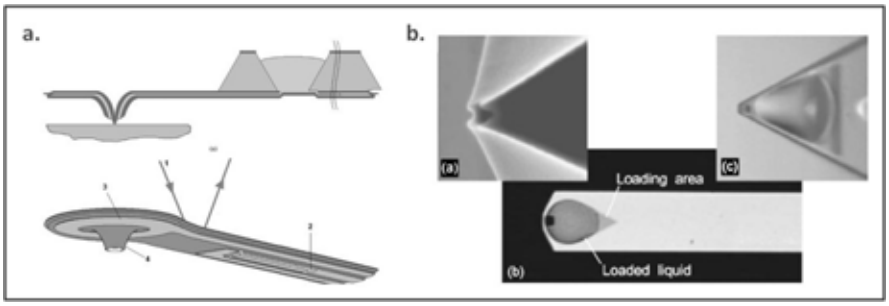


Figure 12 : Pointes d'AFM avec canal intégré.
a. Stylo « nanofontaine » [67] ; **b.** NADIS (nanodispenser) [65]

Une autre technique dérivée du « Dip-Pen » est le « Scanning Probe Contact Printing » : la pointe est fabriquée en PDMS, un polymère qui permet de transférer les molécules sur la surface sans qu'un ménisque soit nécessaire [68] [69]. Cette méthode est inspirée de la lithographie douce qui sera présentée au paragraphe I.2.2.

Le dépôt de molécules biologiques à l'aide d'une pointe AFM est aujourd'hui maîtrisé par environ 200 laboratoires dans le monde [48] et commercialisé par la société NanoInk Inc. (Chicago, USA). Des applications ont été proposées à la fois dans le domaine des biopuces miniatures et dans l'adressage sur des biocapteurs nanométriques. Sa puissance réside essentiellement dans la très haute résolution obtenue (inférieure à 50nm). Cependant le protocole de dépôt est encore long et les surfaces adressables de taille très limitée. Des efforts ont été réalisés dans ce sens, en particulier en proposant une parallélisation des dépôts grâce à plusieurs pointes intégrées sur la même tête mobile [49] [70]. Cependant, les dimensions des pointes rendent la manipulation de tels outils particulièrement délicate.

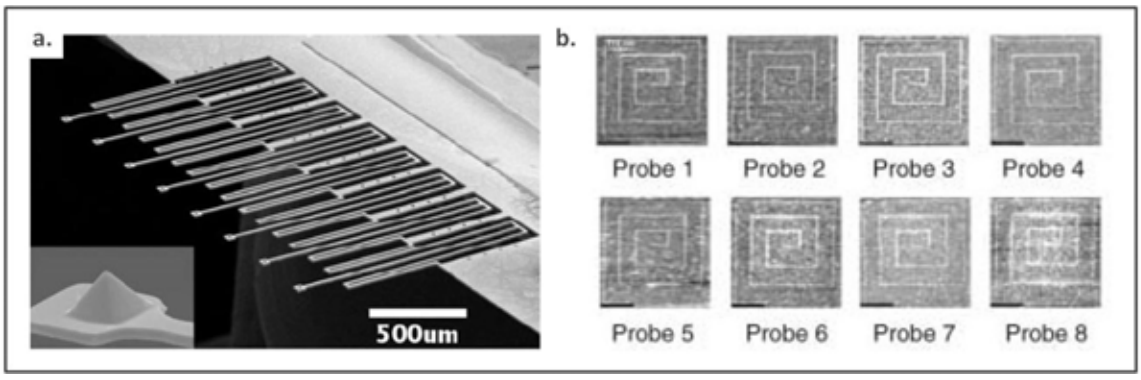


Figure 13 : Dépôt avec plusieurs pointes en parallèle.
a. Image MEB de huit microleviers fabriqués sur le même support, et zoom sur une pointe ; **b.** Motifs d'ODT réalisés en parallèle avec ces huit pointes [49]; ODT : octadecanethiol.

[68] : X.Wang, K.S. Ryu, D.A. Bullen, J. Zou, H. Zhang, C.A. Mirkin, et C. Liu, *Langmuir*, **19 (21)**, 8951
[69] : H. Zhang, R. Elghanian, N.A. Amro, S. Disawal, et R. Eby, 2004, *Nano Letters*, **4 (9)**, 1649.
[70] : K. Salaita, Y. Wang, J. Fragala, R. A. Vega, C. Liu, C.A. Mirkin, *Angewandte Chemie International Edition*, 2006, **45**, 7220-7223.

➢ *Dépôt à l'aide de microleviers : le robot Bioplume*

Le robot Bioplume a été développé au LAAS-CNRS dans le cadre du projet « Emerging Nanopatterning Methods » financé par la communauté européenne (contrat n° NMP4-CT-2003-500-120). Son principe, proposé par Bergaud *et al*, repose sur le dépôt par contact à l'aide de microleviers à canal, montés sur un système de contrôle des déplacements [71].

Les microleviers, appelés communément « plumes » ou « bioplumes », sont trempés dans la solution à déposer qui remplit le canal par capillarité, puis ils sont mis en contact avec la surface où une goutte de liquide est alors déposée. Le chargement par trempage plutôt qu'une alimentation à partir d'une cartouche de liquide a été choisi pour faciliter le nettoyage et ainsi éviter les contaminations en cas de dépôts successifs. Dès les premiers prototypes, un canal et un réservoir ont été incorporés aux microleviers. C'est ce qui leur donne une forme très proche de celle d'une plume de stylo. Il a été choisi de ne pas fermer ce canal pour éviter tout problème d'obturation dans le cas de solutions visqueuses ou colloïdales. Il a été démontré que 10000 spots consécutifs pouvaient être ainsi déposés sans qu'il soit nécessaire de recharger les plumes. La réalisation de plusieurs matrices identiques sur la même surface ou sur plusieurs supports différents peut donc être envisagée sans aucun souci.

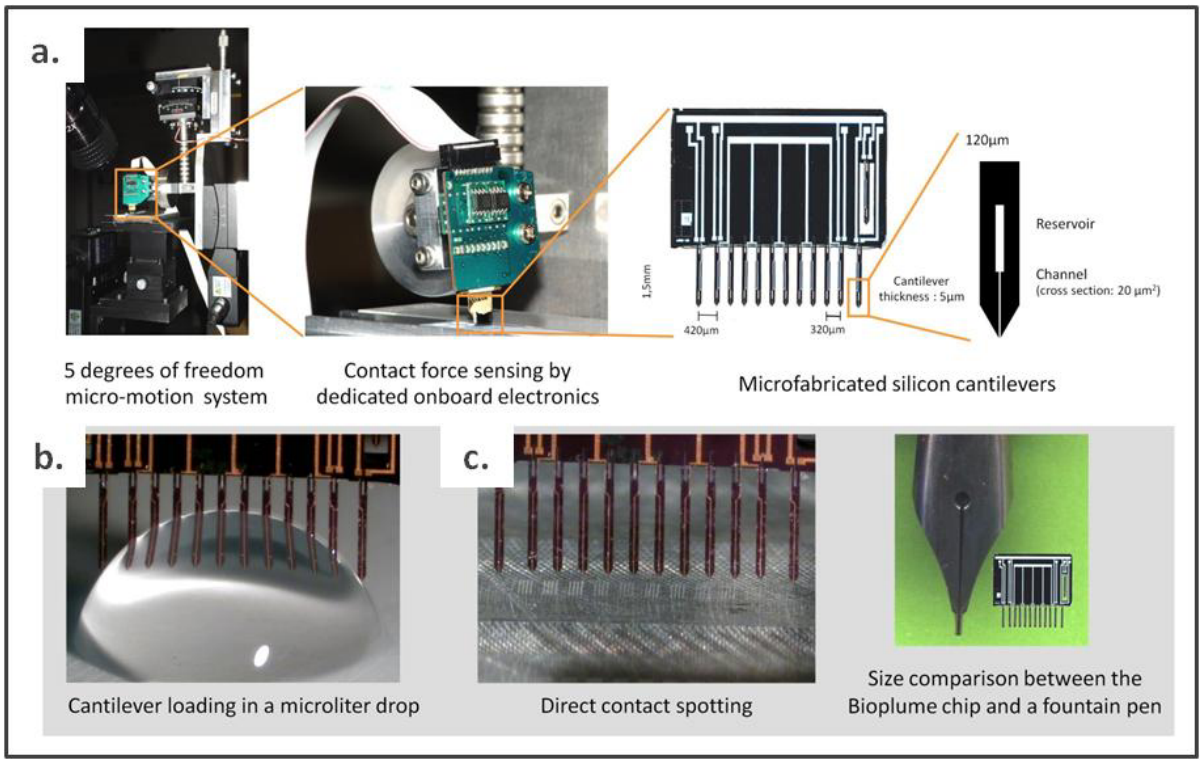


Figure 14 : Bioplume : robot de dépôt par contact à l'aide de microleviers.
a. Vues d'ensemble du robot et des plumes ; **b.** Chargement des plumes par trempage dans une goutte de quelques µL ; **c.** Dépôt par contact [72].

[71] : P. Belaubre, M. Guirardel, V. Leberre, J.-B. Pourciel, C. Bergaud, *Sens. and Act. A*, 2004, **110**, 130-135
[72] : N. Berthet-Duroure, T. Leïchlé, J.-B. Pourciel, C. Martin, J. Bausells, E. Lora-Tamayo, F. Perez-Murano, J.-M. François, E. Trévisiol, L. Nicu, *Biomedical Microdevices*, 2008, **10 (4)**, 479-87

Le procédé de fabrication des plumes utilise les techniques classiques de la microélectronique, ce qui permet de fabriquer en parallèle une grande quantité de dispositifs : une utilisation comme matériel jetable est donc envisageable. En outre, plusieurs leviers peuvent être intégrés sur un support commun, ce qui permet de réaliser de multiples dépôts simultanément. Classiquement, ce sont des barrettes de 12 leviers qui ont été fabriquées.

Les premiers prototypes ont été testés en 2002 : des motifs de 10 à 50µm ont été obtenus mais il est apparu nécessaire d'ajouter un système permettant de contrôler l'uniformité des dépôts. A cet effet, des capteurs piézorésistifs ont été incorporés à l'encastrement des quatre leviers situés aux extrémités de chaque barrette. L'objectif est de contrôler à la fois le parallélisme des plumes par rapport à la surface, la force d'appui et le temps de contact. L'efficacité de la correction du parallélisme sur l'homogénéité des dépôts est présentée figure 15. L'influence du temps de contact sur la taille des spots a aussi été démontrée, ainsi que l'effet négligeable de la force d'appui [73].

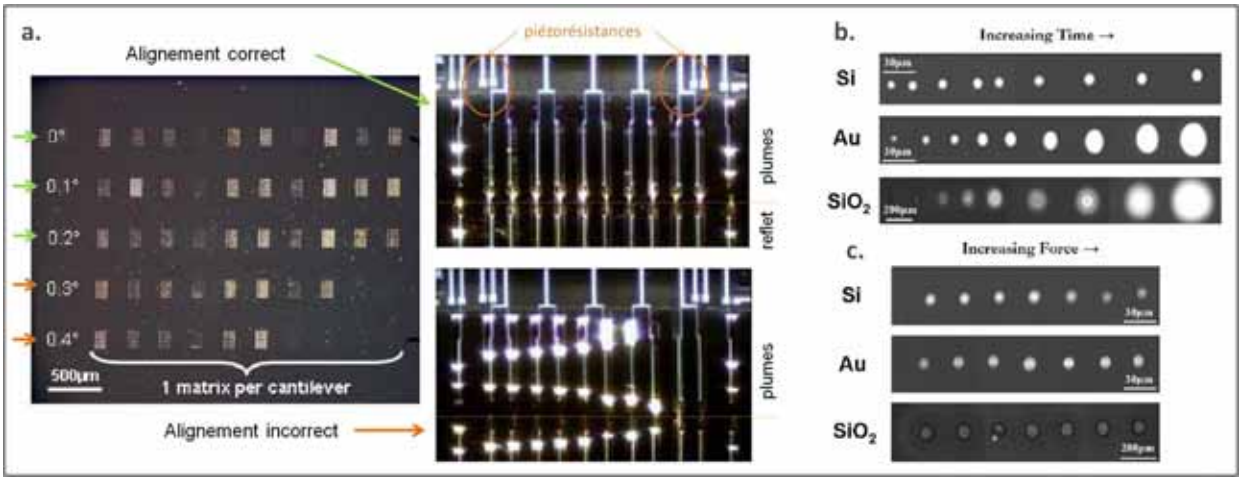


Figure 15 : Utilisation des capteurs de force piézorésistifs.
a. Réglage du parallélisme des plumes par rapport à la surface : lorsque l'angle est trop important, on voit nettement que certaines plumes ne déposent plus ; **b.** Augmentation de taille des spots avec le temps de contact ; **c.** Influence négligeable de la force d'appui sur la taille des spots [73]

Une électrode d'or a également été incorporée à l'intérieur du canal pour réaliser des tests d'électromouillage et d'électrochimie.

L'électromouillage consiste à actionner un liquide sous l'effet d'un champ électrique : l'angle de contact du liquide sur le support conducteur est modifié en injectant des charges à l'interface solide/liquide. L'application de ce phénomène au remplissage d'un canal a été modélisée et validée au LAAS-CNRS par L. Tanguy *et al* [74]. Il a été démontré que les plumes pouvaient être chargées de cette manière, ce qui peut être intéressant dans le cas de liquides visqueux [75].

[73] : T. Leïchlé, D. Saya, J.-B. Pourciel, F. Mathieu, C. Bergaud, et L. Nicu, *IEEE NTC Review on Advances in Nano/Micro Engineered and Molecular Systems*, 2006, **1**, 337
[74] : L. Tanguy, T. Leïchlé, et L. Nicu, *Journal of Applied Physics*, 2007, **101**, 044907
[75] : T. Leïchlé, D. Saya, J.-B. Pourciel,F., L. Nicu, C. Bergaud, *Sensors and Actuators A: Physical*, 2006, **132(2)**, 590-596

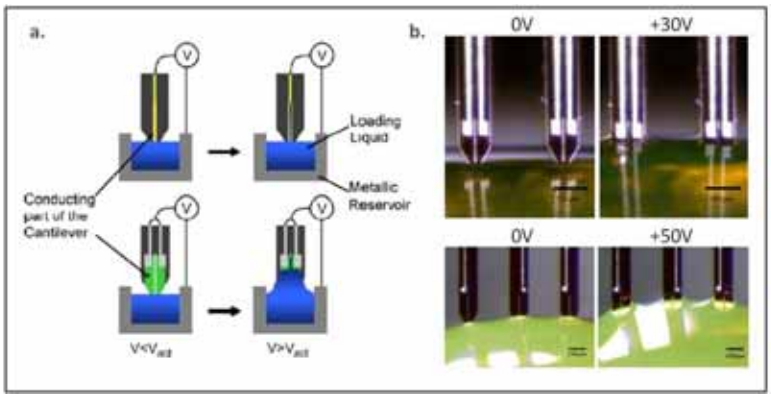


Figure 16 : Actionnement du liquide par électromouillage.
a. Principe; **b.** Exemples d'actionnement de liquide à d'aide d'électrodes intégrées aux plumes [73].

Le fonctionnement de l'électrode d'or ayant été vérifié, des expériences d'électrochimie localisée à l'aide de Bioplume ont été mises en place. Ceci signifie que la chambre de réaction est réduite au volume de la goutte déposée (quelques dizaines de femtolitres) : la surface de dépôt, conductrice, est utilisée comme électrode de travail (WE) tandis que l'électrode présente dans le canal de la plume joue le rôle de contre-électrode (CE). Dans cette configuration, il n'est pas possible d'ajouter une électrode de référence (RE) : elle est donc reliée à la contre-électrode (cf figure 17). Dans un premier temps, ce montage a été testé pour le dépôt de cuivre à partir d'une solution ionique de $CuSO_4$ [76] ; puis il a été appliqué à la fixation d'ADN par électropolymérisation de pyrrole [77]. Cette chimie est détaillée au paragraphe III.1.5.

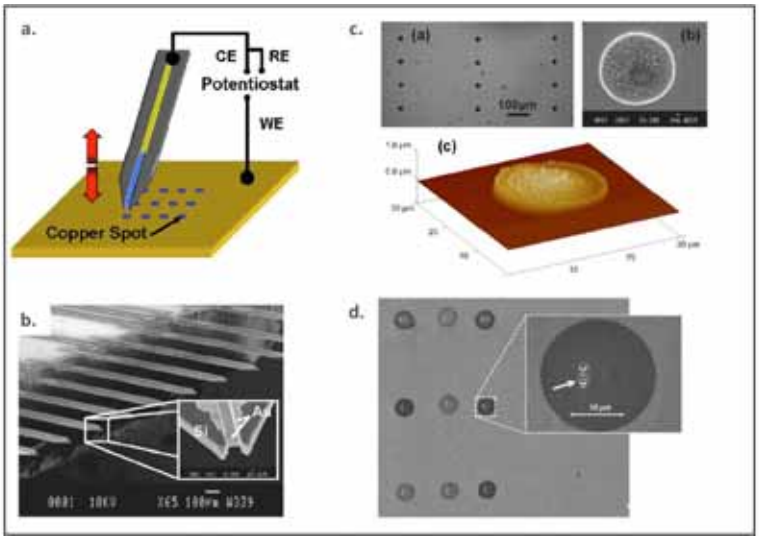


Figure 17 : Electrochimie avec Bioplume.
a. Montage; **b.** Image MEB montrant l'électrode d'or intégrée au canal de la plume ; **c.** Dépôt de Cu. Images au microscope, au MEB, à l'AFM [76]; **d.** Dépôt d'ADN par électropolymérisation de polypyrrole [77]

[76] : T. Leïchlé, L. Nicu, E. Descamps, B. Corso, P. Mailley, T. Livache, C. Bergaud, 2006, Applied Physics Letters, **88**, 254108
[77] : E. Descamps, T. Leïchlé, B. Corso, S. Laurent, P. Mailley, L. Nicu, T. Livache, et C. Bergaud, *Advanced Materials*, 2007, **19**, 1816–1821

L'intérêt suscité par Bioplume auprès de diverses équipes a permis de valider le dépôt d'une grande variété de matériaux : métal [76], polymères [78][79], colloïdes [78][80], et ADN [77]. Les gouttes ont aussi été utilisées comme lentilles pour des applications en optique dans le domaine des diodes laser [81].

Parallèlement à ces efforts applicatifs, le système de contrôle des déplacements et la carte électronique ont été continuellement améliorés dans le but de rendre l'interface utilisateur la plus conviviale possible, et d'obtenir une carte électronique performante et intégrée [82].

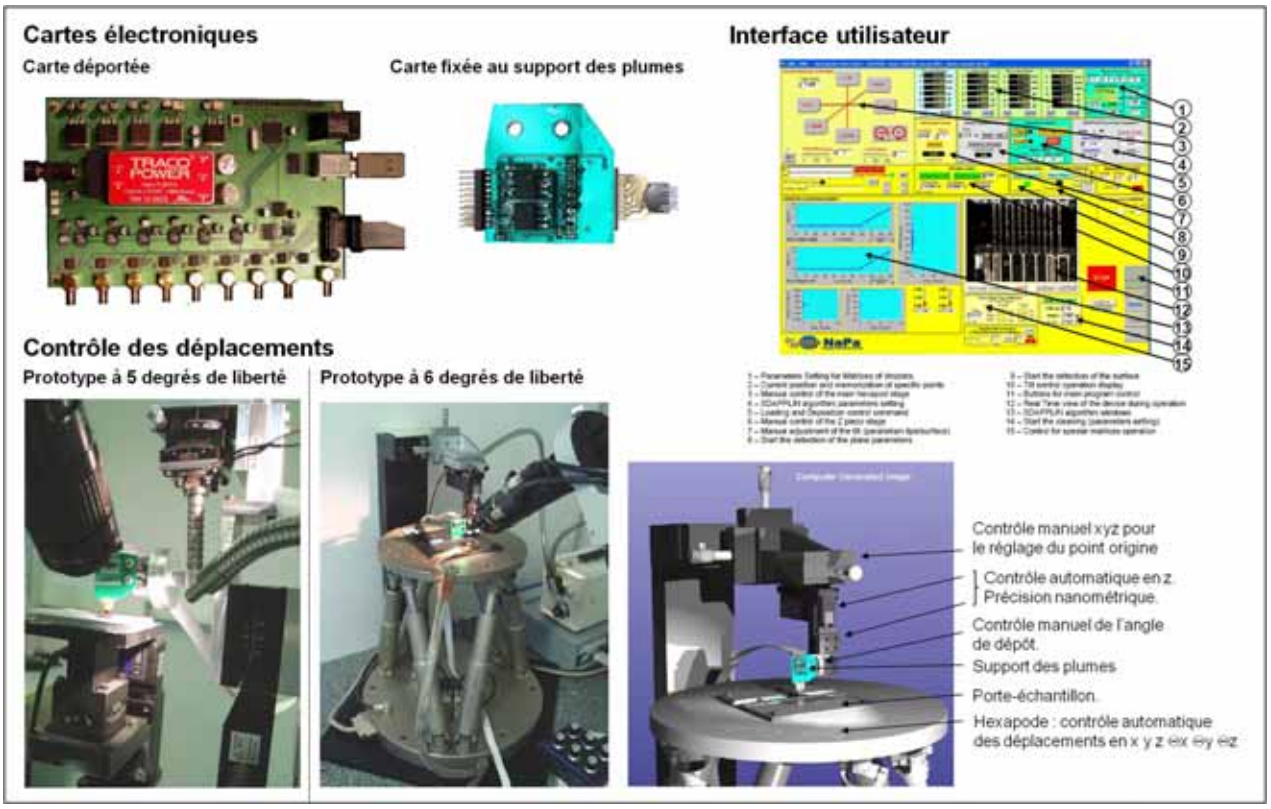


Figure 18 : Images du système de contrôle des déplacements, des cartes électroniques permettant le contrôle de la force d'appui, et de l'interface utilisateur [82].

[78] : T. Leïchlé, M. Manso Silvan, P. Belaubre, A. Valsesia, G.Ceccone, F. Rossi, D. Saya, J.-B. Pourciel, L. Nicu et C. Bergaud, Nanotechnology, 2005, **16**, 525–531

[79] : F. Vandevelde, T. Leïchlé, C. Ayela, C. Bergaud, L. Nicu, et K. Haupt, *Langmuir*, 2007, **23**, 6490-6493

[80] : A. Valsesia, T. Leïchlé, L.-M. Lacroix, L. Nicu, F. Bretagnol, P. Colpo, F. Rossi, et C. Bergaud, *Small*, 2006, **2(12)**, 1444 – 1447

[81] : V. Bardinal, E. Daran, T. Leïchlé, C. Vergnenègre, C. Levallois, T. Camps, V. Conedera, J. B. Doucet et F. Carcenac, Optics Express, 2007, **15 (11)**

[82] : *Demonstration of automated, well-controlled nanodispensing tool with integrated fluidic system for multiple cantilevers*, Délivrable 11.5 du projet « Emerging Nanopatterning Methods » financé par la communauté européenne (contrat n° NMP4-CT-2003-500-120), 2008

Dernièrement, une méthode permettant de miniaturiser les dépôts a été proposée par Daisuké Saya *et al*. Le principe consiste à prolonger les plumes par une pointe beaucoup plus fine obtenue par gravure anisotrope selon les plans cristallins inclinés du Si (110). Des gouttes de diamètre inférieur à 5µm ont été obtenues. Ce nouveau système a été nommé NanoBioplume [83].

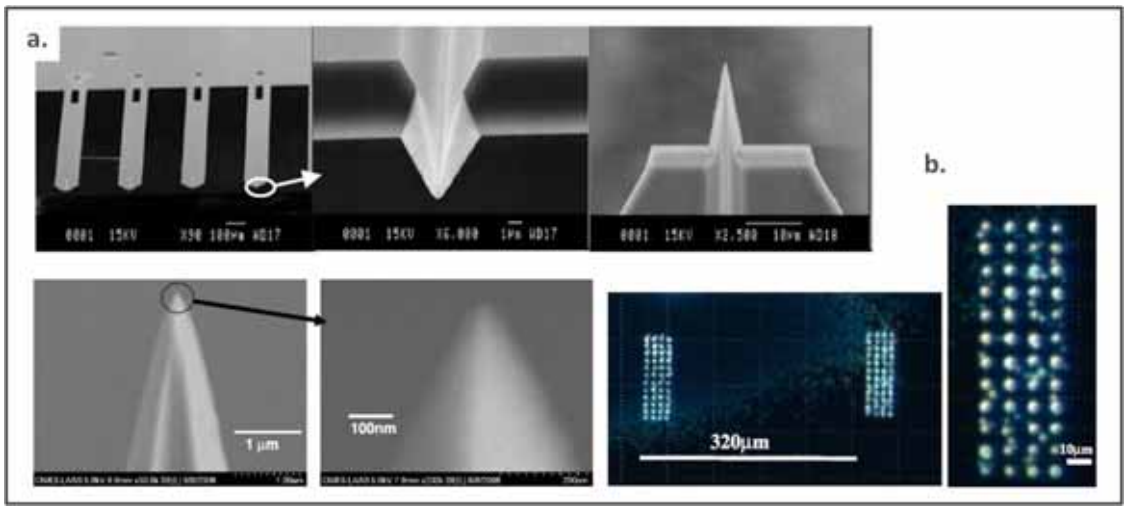


Figure 19 : Plumes à pointes nanométriques, ou « NanoBioplumes ».
a. Images au MEB et zoom sur la pointe. Noter le rayon de courbure de 100nm seulement
b. Spots d'eau contenant 25% de glycérol obtenus avec NanoBioplume [83]

Que ce soit sur le plan technique ou sur le plan applicatif, la technologie Bioplume a aujourd'hui atteint un niveau de maturité suffisant pour envisager l'entrée dans une phase d'industrialisation. C'est dans ce but que la société **MicroBioChips** a racheté en mars dernier les licences d'exploitation du robot.

[83] : D Saya, T Leïchlé, J.-B. Pourciel, C. Bergaud et L. Nicu, *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 2007, **17**, 1-5

I.2.1.b. Dépôt sans contact : le modèle de l'imprimante à jet d'encre

- *Dépôt par jet d'encre*

Le dépôt de biomolécules par jet d'encre est directement inspiré de la technique employée dans les imprimantes. Son intérêt réside dans la bonne qualité des motifs obtenus, et ceci sur des surfaces importantes, dans des temps relativement courts et à un coût raisonnable. Alors qu'aujourd'hui des robots de dépôt dédiés spécialement au dépôt de puces à ADN ou à protéines sont commercialisés [84], les premiers prototypes étaient des imprimantes traditionnelles dont la cartouche avait été simplement remplie de solution biologique [85] [86].

Le principe du dépôt par jet d'encre consiste à éjecter le liquide d'une buse, soit par une élévation de température, soit par un actionnement piézoélectrique dans les cas les plus courants. La seconde méthode permet d'obtenir des spots plus homogènes et évite les risques de dénaturation thermique dans le cas de biomolécules [87]. Certains injecteurs développés plus récemment utilisent aussi un actionnement par ondes acoustiques [88].

Dans le domaine biologique, le dépôt par jet d'encre a été utilisé pour réaliser des motifs d'ADN [85] [89], de protéines [90] [91] [92] [93], ainsi que de cellules procaryotes [94] [95] et eucaryotes [96]. La figure 20 présente quelques exemples de motifs obtenus : le couplage avec des logiciels classiques de bureautique a permis, dès les premières études, la réalisation de motifs complexes. Leur taille est généralement de quelques centaines de microns.

L'un des avantages majeurs de cette technique est la possibilité de déposer sur une très grande variété de substrats : structurés, poreux, fragiles, ou même à travers des motifs dessinés dans un masque. Par exemple, l'utilisation pour le dépôt sur des biocapteurs miniatures (MEMS) a été validée par Bietsch *et al* : des gouttes ont ainsi été déposées sur la surface de microleviers [97].

---

[84] : www.arrayjet.co.uk

[85] T. Goldmann, J. S. Gonzaleza, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 2000, **42**, 105-110

[86] : J. Xu, M. Lynch, J.L. Huff, C. Mosher, S. Vengasandra, et G. Ding, Biomed. Microdevices, 2004, 6 (2), 117.

[87] : N. Reis, C. Ainsley, et B. Derby, *Journal of Applied Physics*, 2005, **97**, 094903

[88] : U. Demirci et M. Toner, *Applied Physics Letters*, 2006, **88**, 053117

[89] : T. R. Hughes *et al*, *Nature Biotechnology,* 2001, **19**, 342-347

[90] : F. Turcu, K. Tratsk-Nitz, S. Thanos, W. Schuhmanna, P. Heiduschka, *Journal of Neuroscience Methods*, 2003, **131**, 141–148

[91] : A. Roda, M. Guardigli, C. Russo, P. Pasini, and M. Baraldini, *BioTechniques* , 2000, **28**, 492-496

[92] : L. Pardo, W. C. Wilson, Jr., et T. Boland, *Langmuir*, 2003, **19**, 1462-1466

[93] : B.K. Singh et A.C. Hillier, *Anal. Chem*., 2007, **79**, 5124-5132

[94] : T. Xu, S. Petridou, E.H. Lee, E.A. Roth, N. Vyavahare, J.J. Hickman, T. Boland, *Biotechnol Bioeng*., 2004, **85(1)**, 29-33.

[95] : J. Merrin, S. Leibler, J. S. Chuang, *PLoS ONE*, **2(7)**, e663

[96] : T. Xu, J. Jin, C. Gregory, J.J. Hickman, T. Boland, *Biomaterials* , 2005, **26**, 93-99

[97] : A. Bietsch, J. Zhang, M. Hegner, H. P. Lang et C. Gerber, *Nanotechnology, 2004,* **15**, 873–880

[98] : P. W. Cooley, D. B. Wallace, et B. V. Antohe, *Proceedings of SPIE Conference on Microfluidics and BioMEMS*, 2001, **4560**, 177

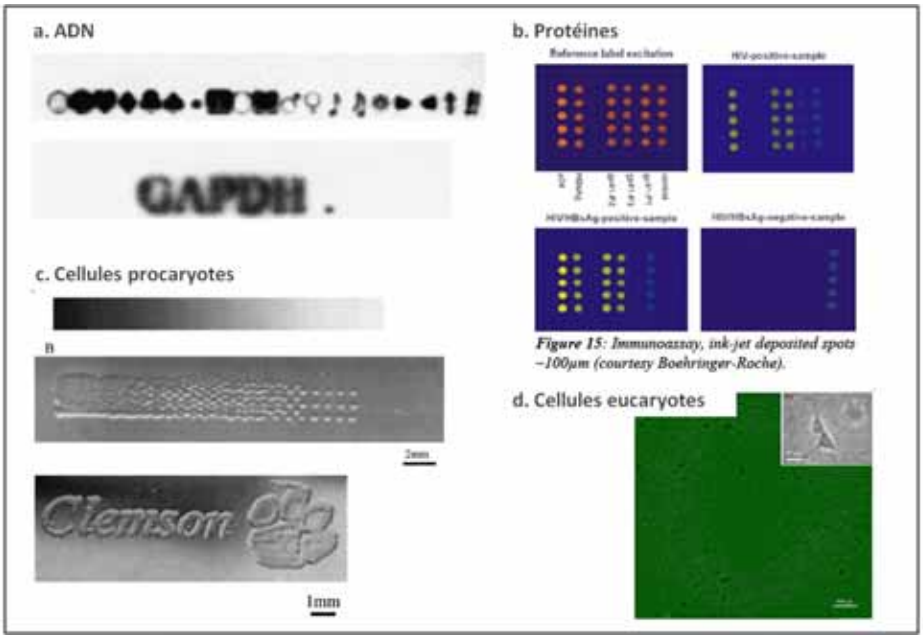


Figure 20 : Exemples de motifs réalisés par jet d'encre avec des solutions biologiques.
a. Hybridation d'ADN sur membrane de nylon. Marquage radioactif [85] ; **b.** Interaction antigène/anticorps pour un test de diagnostic du VIH [98]; **c**. Colonies d'*E.coli* sur agarose après dépôt et culture [94] ; **d.** Motifs de neurones. Zoom : morphologie correcte des neurones après 7 jours de culture [96].

La possibilité de fabriquer plusieurs buses en parallèle en utilisant les techniques classiques de microfabrication a aussi été démontrée [99], ce qui permet d'envisager une fabrication de masse à faible coût et une éventuelle miniaturisation. Cependant, la réduction de l'orifice de la buse qui permettrait d'obtenir des gouttes plus petites demande d'augmenter considérablement l'énergie nécessaire pour éjecter le liquide. La taille minimale des spots a ainsi été estimée à 10µm [100].

Enfin, malgré ses énormes potentiels et les nombreux développements effectués, la technique de dépôt par jet d'encre souffre encore d'un manque d'homogénéité des motifs obtenus, dû à la formation de gouttelettes satellites lors de l'éjection du liquide. Le nettoyage de tout le système fluidique alimentant les buses nécessite aussi une attention particulière pour éviter les contaminations.

- *Dépôt par « électrospray »*

Le dépôt par « électrospray » consiste à éjecter le liquide depuis une aiguille en appliquant une différence de potentiel entre la solution et la surface de dépôt. Le liquide est nébullisé et se dépose sous forme de fines gouttelettes. Ce principe a été étudié dès 1914 par Zeleny *et al* [101] et développé plus tard pour l'application à la spectrométrie de masse [102].

[99] : S.C. Shen, C.T. Pan, Y.R. Wang, C.C. Chang, *Sensors and Actuators A*, 2006, **127**, 241-247
[100] : P. Calvert, *Chem. Mater.*, 2001, **13**, 3299-3305

[101] : J. Zeleny, *The Physical Review*, 1914, **3 (2)**, 69
[102] : M.Yamashita et J.B.Fenn, *The Journal of Physical Chemistry*, 1984, **88 (20)**, 4451

L'application au dépôt d'ADN et de protéines a été proposée par Morozov *et al* : dans ces premières études, les motifs (matrices de spots) ont été obtenus grâce à un masque. La viabilité des biomolécules malgré l'application de courants de l'ordre de 500nA a été vérifiée : possibilité d'hybridation (ADN de phage λ), conservation de l'activité enzymatique (peroxidase de raifort), et possibilité d'interaction antigène/anticorps pour une gamme variée de protéines [103].

Moerman *et al* ont proposé une méthode de dépôt direct : la morphologie des spots n'est plus contrôlée par un masque mais en éloignant la surface de l'aiguille au moment précis où la forme de goutte souhaitée est obtenue. Cet éloignement diminue l'énergie électrique et stoppe le dépôt. Trois enzymes (lactate déshydrogénase, G6P déshydrogénase, pyruvate kinase) ont été déposées de cette façon et leur activité a été vérifiée par test enzymatique sur le support [104]. La possibilité d'obtenir des spots de moins de 5µm de diamètre a été démontrée en utilisant la rhodamine comme modèle (petite molécule fluorescente). Dans cette configuration, l'impulsion électrique nécessaire était de 1000V pendant 10ms [105].

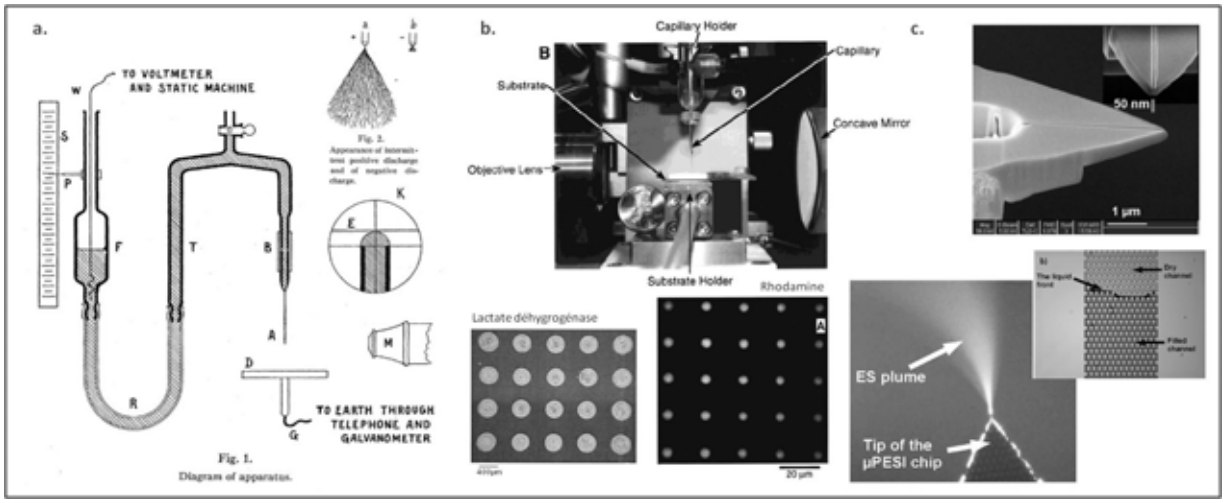


Figure 21 : Dépôt par « électrospray »

a. Premier prototype proposé en 1914 pour l'étude du phénomène d'« électrospray » [101]. **b.** Dépôt de lactate déshydrogénase [104] et de rhodamine avec un système de dépôt actuel [105]. **c.** Etude de nanocapillaires pour miniaturiser les dépôts. En bas, optimisation du système de remplissage à l'aide de micropiliers [106] [107].

Les efforts actuels vont dans le sens de la miniaturisation des aiguilles de dépôt, dans le but d'obtenir des spots plus petits et d'appliquer des tensions moins élevées [106]. Un des défis consiste à charger correctement ces aiguilles. Pour cela, un système utilisant des micro-piliers augmentant les effets de capillarité à l'intérieur du canal a été proposé [107].

[103] : V.N. Morozov, et T.Y. Morozova, *Anal. Chem.*, 1999, **71**, 3110-3117

[104] : R. Moerman, J. Frank, J.C.M. Marijnissen, T.G.M. Schalkhammer, et G.W.K. van Dedem, *Anal. Chem.*, 2001, **73**, 2183-2189

[105] : O. Yogi, T. Kawakami, M. Yamauchi, J.Y. Ye, et M. Ishikawa, *Anal. Chem.*, 2001, **73**, 1896-1902

[106] : S. Arscotta et D. Troadec, *Applied Physics Letters*, 2005, **87**, 134101

[107] : L. Sainiemi, T. Nissil, V. Jokinen, T. Sikanen, T. Kotiaho, R. Kostiainen, R.A. Ketola, S. Franssila, *Sensors and Actuators B* , 2008, **132**, 380-387

➢ *Dépôt par activation laser (LIFT)*

Si un film mince déposé sur un support activable est excité par un laser, il y a formation d'une goutte de liquide qui est éjectée et peut ainsi être déposée sur la surface placée face au film. Ce phénomène appelé « Laser Induced Forward Transfer » (LIFT) permet le dépôt d'une très grande variété de matériaux puisqu'aucune contrainte de viscosité n'est à prendre à compte. L'application au dépôt de protéines [108] et d'ADN [109] a été proposée, et des matrices de spots de 10 à 100µm de diamètre ont été réalisées. La taille des motifs dépend directement de l'énergie du laser utilisé [110]. L'optimisation des conditions de dépôts a ainsi permis d'atteindre une résolution de l'ordre de la dizaine de nanomètres.

Dans le cas d'un dépôt d'ADN avec révélation par hybridation, l'homogénéité des spots et la qualité des résultats obtenus sont équivalents à ceux résultants d'un dépôt à l'aide d'aiguilles [109]. Dans le cas des protéines, la conservation de la conformation après dépôt a été démontrée par test enzymatique par exemple avec la luciférase [111] et la peroxydase de raifort [112]. En optimisant la nature du support activable, Kattamis *et al* ont même récemment réussi à déposer des cellules souches embryonnaires sans perte de viabilité [113].

Adaptable à une grande variété d'encres et de supports, cette technique présente de sérieux atouts. Cependant, des développements restent nécessaires pour faciliter en particulier l'alignement sur des motifs préexistants sur la surface.

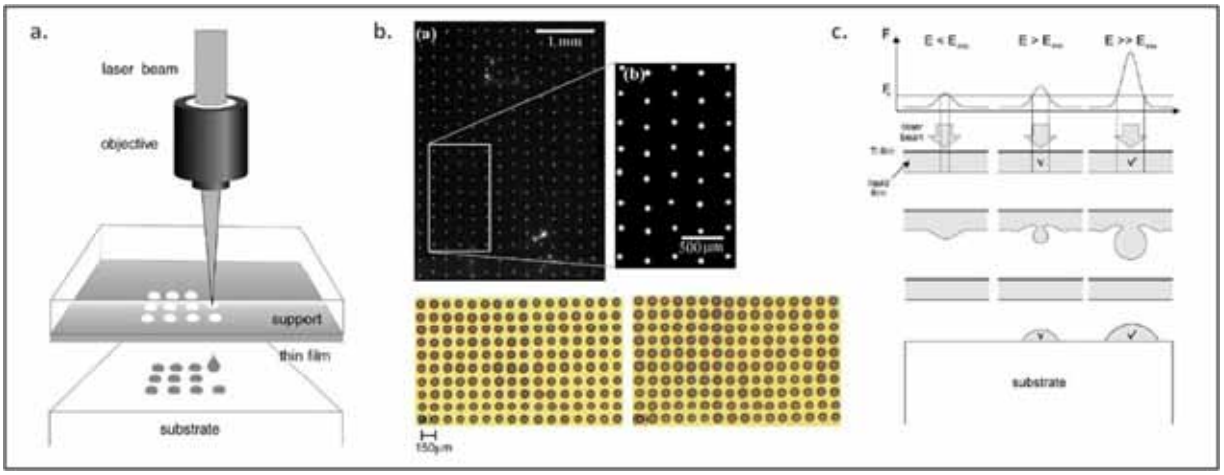


Figure 22 : Dépôt par activation laser

a. Principe [109] : **b.** Matrices de BSA [108] et d'ADN [109] ; **c.** Etude de la taille des spots selon l'énergie du laser [110].

[108] : J.A. Barron, H.D. Young, D.D. Dlott, M.M. Darfler, D.B. Krizman et B.R. Ringe, *Proteomics*, 2005, **5**, 4138-4144

[109] : M. Colina, P. Serra, J.M. Fernandez-Pradas, L. Sevilla, J.L. Morenza, *Biosensors and Bioelectronics*, 2005, **20**, 1638-1642

[110] : P. Serra, J.M. Fernandez-Pradas, M. Colina, M. Duocastella, J. Dominguez, J.L. Morenza, *Journal of Laser Micro/Nanoengineering*, 2006, **1 (3)**, 236-242

[111] : Y. Tsuboi, Y. Furuhata, N. Kitamura, *Applied Surface Science*, 2007, **253**, 8422-8427

[112] : V. Dinca, A. Ranella, M. Farsari, D. Kafetzopoulos , M. Dinescu, A. Popescu, C. Fotakis, *Biomed. Microdevices*, 2008, **10**, 719-725

[113] : N.T. Kattamis, P.E. Purnick, R. Weiss, C.B. Arnolda, *Applied Physics Letters*, 2007, **91**, 171120

I.2.2. Adressage par impression : le modèle du tampon encreur

Bien avant l'invention de l'imprimante et bien après la découverte de l'écriture à la plume, la reproduction d'écrits a longtemps été réalisée grâce à des tampons encrés. C'est ainsi que de multiples matériaux ont été étudiés pour leur propriété à reproduire fidèlement des motifs de plus en plus petits à l'aide d'encres de toutes sortes.

L'équipe de G.M. Whitesides de l'Université de Harvard a proposé d'utiliser comme tampon un timbre souple en **PDMS** (Poly-DiMéthyl Siloxane) qui convient particulièrement à l'impression de biomolécules [114]. Le timbre est fabriqué à partir d'un moule comportant les motifs souhaités, réalisés par photolithographie ou lithographie électronique. Le PDMS est versé dans le moule sous la forme d'une solution liquide, puis il est réticulé, ce qui permet d'obtenir un matériau solide et souple (figure 23). Le timbre est ensuite immergé dans la solution contenant les molécules à déposer, puis il est très correctement séché avant d'être appliqué sur la surface de dépôt. Ce séchage est très important car il permet d'éviter l'apparition de bavures. Les molécules sont donc transférées à sec, grâce à une plus grande affinité pour la surface que pour le timbre. La qualité de reproduction des motifs du moule vers le timbre de PDMS puis du timbre vers la surface est exceptionnelle : elle permet d'atteindre une **résolution inférieure à 100nm**. La qualité d'impression dépend essentiellement du rapport de profondeur des motifs reproduits sur le timbre et du contrôle de l'appui sur la surface [115].

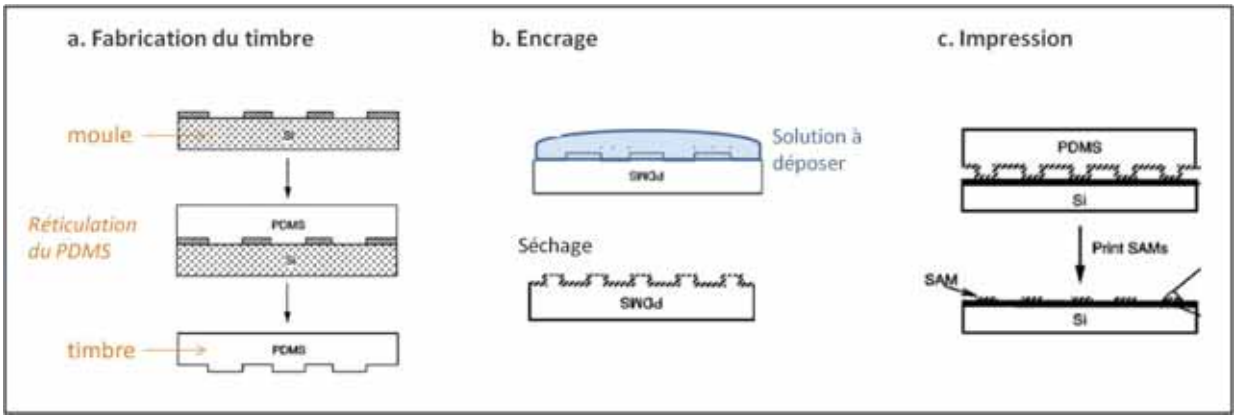


Figure 23 : Principe de la lithographie douce
Schéma adapté de Xia et Whitesides [114]

La possibilité d'imprimer des protéines à l'aide d'un timbre de PDMS a été démontrée [116] [117] et des motifs nanométriques ont été obtenus, par exemple des lignes d'anticorps de 40nm de large [118]. A cette échelle, la différence entre une protéine isolée et un agrégat peut être distinguée. Des peptides ont aussi été imprimés dans le but d'obtenir des sites d'accroche spécifique pour des cellules : des motifs de cellules animales ont ainsi été obtenus [119] [120].

[114] : Y. Xia et G.M. Whitesides, *Annual Review of Materials Science*, 1998, **28**, 153-184
[115] : K.G. Sharp, G.S. Blackman, N.J. Glassmaker, A. Jagota, et C.Y. Hui, *Langmuir*, 2004, **20**, 6430-6438.

En réduisant la taille des sites d'accroche, Cerf *et al* ont récemment réussi à réaliser des matrices de bactéries, chaque plot portant une cellule unique [121]. L'impression directe de bactéries sur gel d'agarose est aussi possible : des colonies organisées ont été obtenues, et leur courbe de croissance tout à fait normale montre qu'elles n'ont pas été endommagées durant l'impression [122].

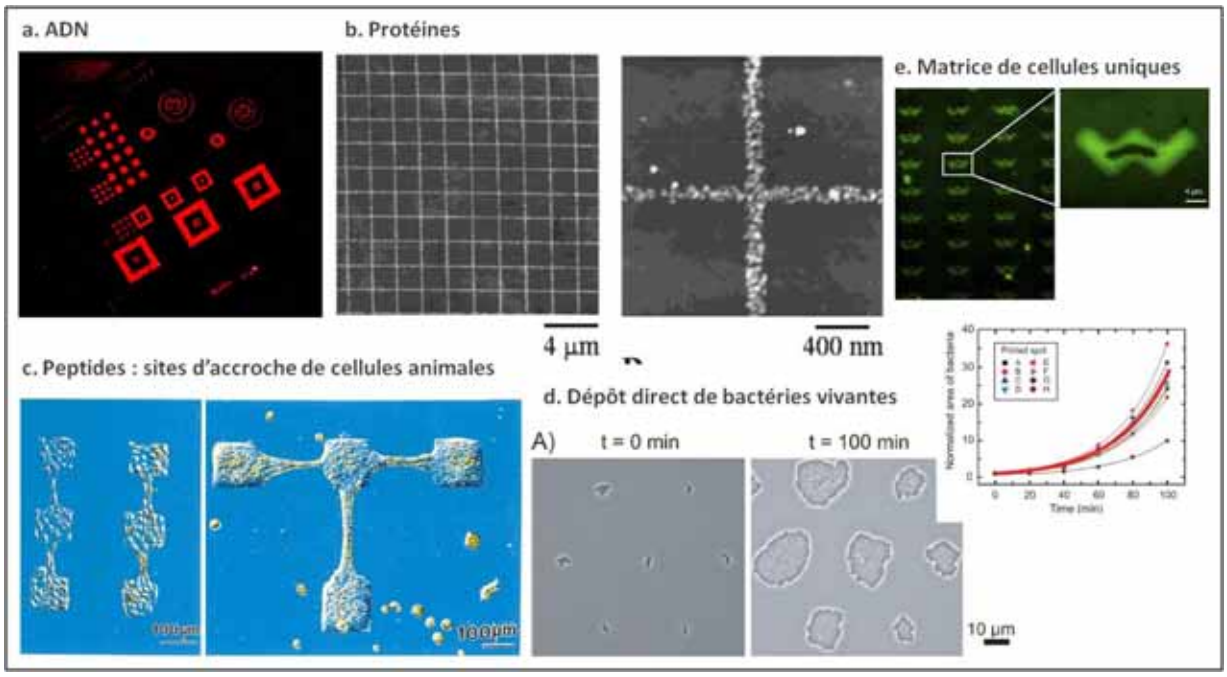


Figure 24 : Motifs d'ADN, de protéines et de cellules imprimés par lithographie douce.
a. Motifs d'oligonucléotides. Révélation par hybridation avec le complémentaire marqué [124] ; **b.** Lignes d'anticorps de 100nm de large, séparées de 2µm [118] ; **c.** Motifs de peptides révélés par l'accroche de cellules endothéliales bovines (gauche) et de cellules épidermiques humaines (droite) [119] ; **d.** Dépôt direct d'*E.coli* sur gel d'agarose. Images après dépôt et après 100min de culture ; courbe de croissance [122]; **e.** : Matrice d'*E.coli* immobilisées sur des motifs imprimés (forme de M). Zoom, en noir : une bactérie/plot [121]

[116] : A. Bernard, J.P. Renault, B. Michel, H.R. Bosshard, et E. Delamarche, *Advanced Materials*, 2000, **12 (14)** ; 1067-1070
[117] : 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, Printing meets lithography: Soft approaches to high-resolution patterning, *IBM J. Res. & Dev.*, 2001, **45(5)**, 697-719
[118] : J.P. Renault, A. Bernard, A. Bietsch, B. Michel, H.R. Bosshard, E. Delamarche, M. Kreiter, B. Hecht, U.P. Wild, *J. Phys. Chem. B*, 2003, **107**, 703-711
[119] : S. Zhang, L. Yan, M. Altman, M. Lässle, H. Nugent, F. Frankel, D.A. Lauffenburger, G.M. Whitesides, A. Rich, *Biomaterials*, 1999, **20**, 1213-1220
[120] : D.Y. Wang, Y.C. Huang, H. Chiang, A.M. Wo, Y.Y. Huang, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, 2007, **80(2)**, 447-53
[121] : A. Cerf, J.-C. Cau et C. Vieu, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2008, **65**, 285-291
[122] : L. Xu, L. Robert, Q. Ouyang, F. Taddei, Yong Chen, A.B. Lindner et D. Baigl, *Nano Letters*, 2007, **7 (7)**, 2068-2072

Enfin, l'impression de matrices d'ADN a été réalisée [123], et des tests d'hybridation ont permis de détecter des mutations de 2-3pb sur le gène hsp12 de la levure *S. cerevisiae* [124]. Xiao *et al* ont aussi proposé une méthode de synthèse d'ADN *in situ* en utilisant un timbre de PDMS [125].

La fabrication de biopuces par impression est donc envisageable. Cependant, chaque timbre ne permet d'imprimer qu'un seul type de molécules dans la configuration classique. Pour pallier cet inconvénient, une équipe pluridisciplinaire du LAAS-CNRS et de la Plateforme Biopuces de Toulouse a développé le « macrotimbre » (figure 25). Ce timbre de PDMS présente des picots de 1,5 mm espacés de 2,25 mm qui peuvent être chargés individuellement par trempage dans une plaque de microtitration. La surface de chaque picot peut ensuite être structurée et comporter des motifs nanométriques [126]. Des motifs de molécules différentes ont ainsi été obtenus en une seule impression sans qu'il y ait contamination d'un puits à l'autre.

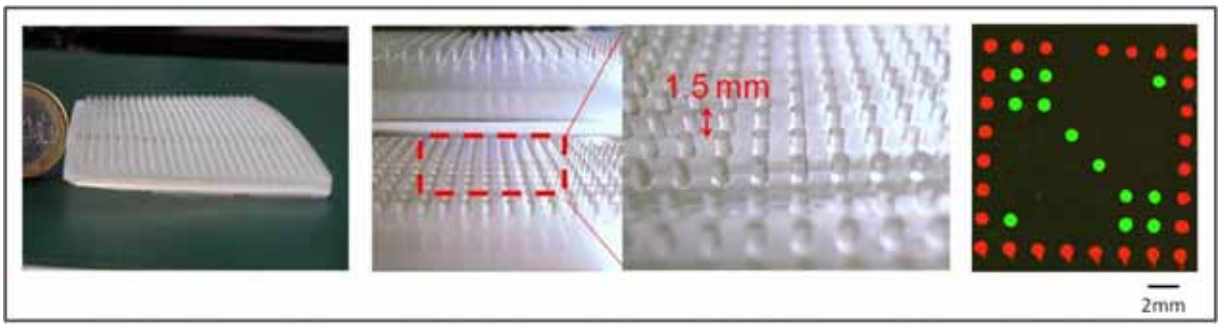


Figure 25 : Macrotimbre, permettant l'impression multiplexée grâce à des picots pouvant être chargés individuellement dans une plaque de microtitration [126]

L'une des difficultés majeure en nano-impression est le contrôle de l'appui du timbre sur la surface, qui conditionne la qualité des motifs. Très récemment, l'équipe de C.A. Mirkin a présenté des résultats d'impression sur des surfaces de grande taille, réalisés grâce à un timbre monté sur un actionneur piézoélectrique [127]. Des millions de motifs ont pu être réalisés simultanément en utilisant cette technique.

En ce qui concerne l'impression sur des surfaces structurées, Foley *et al* ont démontré qu'il est possible d'imprimer des protéines dans des canaux de 2 à 15 µm de profondeur [128]. Cependant, le problème du contrôle du contact reste à résoudre dans le cas de surfaces fragiles.

[123] : S.A. Lange, V. Benes, D. Kern, H. Hörber, A. Bernard, Analitical Chemistry, 2004, 76, 1641-1647.
[124] : C. Thibault, V. Le Berre, S. Casimirius, E. Trévisiol, J. François et C. Vieu, *Journal of Nanobiotechnology*, 2005, **3 (7)**
[125] : P.F. Xiao, N.Y. He, Z.C. Liu, Q.G. He, X. Sun et Z.H. Lu, *Nanotechnology*, 2002, **13**, 756-762
[126] : J.-C. Cau, H. Lalo, J.-P. Peyrade, C. Vieu, C. Thibault et C. Severac, Procédé et dépôt simultané d'un ensemble de motifs sur un substrat par un macro timbre, 2007, brevet ref : 20070057543
[127] : F. Huo, Z. Zheng, G. Zheng, L.R. Giam, H. Zhang, C.A. Mirkin, *Science*, 2008, **321**, 1658-1660.
[128] : J. Foley, H. Schmid, R. Stutz, et E. Delamarche, *Langmuir*, 2005, **21**, 11296-11303

I.2.3. Adressage à l'aide de masques ou selon le modèle du pochoir

I.2.3.a. Synthèse in situ d'oligonucléotides grâce à des masques ou des miroirs

En photolithographie, un masque portant des motifs en chrome est utilisé pour activer sélectivement certaines zones d'une résine. Cette technique a été adaptée à partir de 1991 à la synthèse *in situ* d'ADN et de peptides par l'équipe de Stephen P.A. Fodor en Californie [129]. Dans l'élan du projet de séquençage du génome humain, la synthèse d'ADN a été plus particulièrement développée [130] et une puce portant des séquences représentatives de l'ensemble du génome humain a ainsi été réalisée [131]. Commercialisées par la société Affymetrix, les puces fabriquées par cette technique offrent l'avantage d'une très haute densité de sondes oligonucléotidiques (jusqu'à 6,5 millions sur 1,28cm^2) [132].

La méthode de synthèse consiste à utiliser des nucléosides modifiés (ou phosphoramidites) protégés par un groupement photolabile. Toutes les sondes présentes sur la puce sont fabriquées en même temps. Pour allonger d'un nucléotide l'ensemble des sondes, un jeu de quatre masques est nécessaire, un pour chaque base (A, T, G ou C). Prenons pour exemple l'ajout de l'adénine (A). Sur le masque, une zone claire est dessinée à l'emplacement de chaque sonde devant être allongée d'une base A. La puce est éclairée à travers ce masque et tous les oligonucléotides concernés sont déprotégés. Le phosphoramidite portant la base A, est alors injecté et se fixe spécifiquement sur les sites déprotégés. Ce processus est répété pour les trois autres bases, puis pour chaque nouvel « étage » de synthèse. Les motifs obtenus sont d'une excellente régularité et d'une taille limitée seulement par la résolution du masque et la diffraction de la lumière. Cependant, la nécessité de fabriquer un nouveau jeu de masques pour chaque nouvelle synthèse rend la méthode coûteuse.

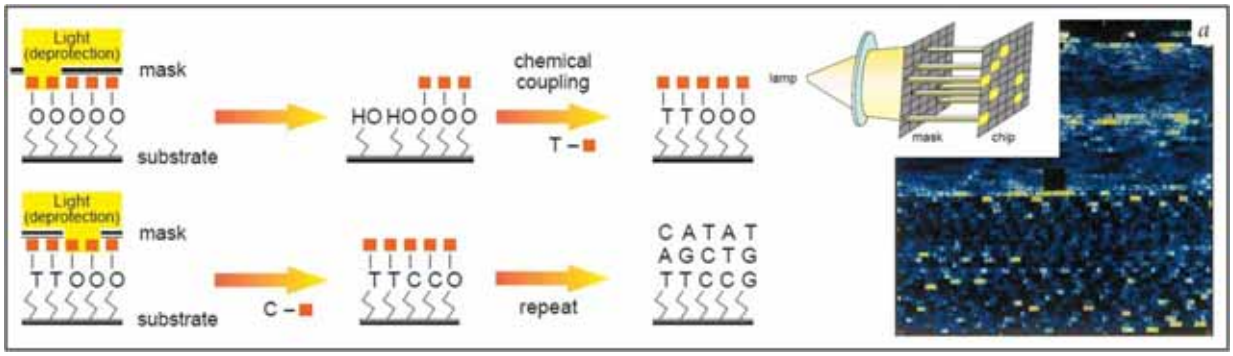


Figure 26 : Principe de la synthèse *in situ* d'ADN à l'aide de masques de photolithographie.
A droite, puce pour le typage du virus VIH. [132]

[129] : S.P.A. Fodor, J.L. Read, M.C. Pirrung, L. Stryer, A.T. Lu, et D. Solas, *Science*, 1991, **251 (4995)**, 767-773

[130] : A.C. Pease, D. Solas, E.J. Sullivan, M.T. Cronin, C.P. Holmes, S.P.A. Fodor, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994, **91 (11)**, 5022-5026

[131] : D.J. Lockhart, H. Dong, M.C. Byrne, M.T. Follettie, M.V. Gallo, M.S. Chee, M.Mittmann, C. Wang, M. Kobayashi, H. Norton et E.L. Brown, *Nature Biotechnology*, 1996, **14**, 1675 - 1680

[132] : R.J. Lipshutz, S.P.A. Fodor, T.R. Gingeras et D.J. Lockhart, *Nature Genetics Supplement*, 1999, **21**, 20-24

La société Nimblegen (Roche) a développé une méthode très proche, qui permet de s'affranchir du coût des masques. Ceux-ci sont remplacés par un jeu de miroirs digitaux, qui réfléchissent ou non la lumière selon leur orientation. A chaque nouvelle étape, les miroirs sont orientés de façon à être soit « blancs », soit « noirs ». Un seul jeu de miroir permet ainsi de réaliser n'importe quel motif.

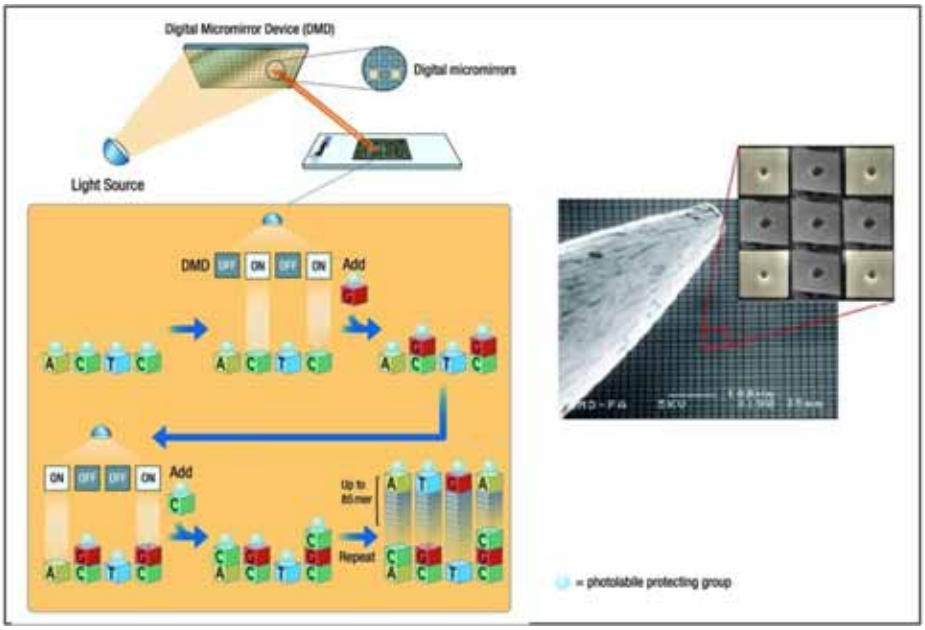


Figure 27 : Synthèse *in situ* d'ADN à l'aide de miroirs digitaux.
A droite, miroirs digitaux comparés à la pointe d'une aiguille de dépôt [133].

I.2.3.b. Lift-off de protéines : la peinture au pochoir

Le lift-off est une technique utilisée en microélectronique pour réaliser des motifs à partir de métaux (paragraphe IV.3.2.c.). Cette méthode a été récemment adaptée à la réalisation de motifs de protéines. La surface est recouverte d'une résine photosensible, dans laquelle des motifs sont réalisés par photolithographie. Ces motifs sont des zones où la résine a été enlevée : ils sont comparables aux « trous » d'un pochoir. Une solution de protéine est déposée sur cette résine, et donc en même temps à l'intérieur des motifs. La résine est ensuite éliminée par une dissolution à l'acétone, et seules les protéines présentes au niveau des motifs restent sur la surface. Des motifs de collagène et de fibronectine de quelques microns ont été obtenus et la conformation correcte des protéines a été vérifiée par une interaction avec des anticorps puis avec des cellules hépatiques [134].

[133] : www.nimblegen.com/technology/manufacture
[134] : J.Y. Lee, S.S. Shah, C. C. Zimmer, G.-Y. Liu, et A. Revzin, *Langmuir*, 2008, **24 (5)**, 2232-2239

Le lift-off apparaît comme une méthode simple pour réaliser des motifs complexes de protéines sur de grandes surfaces. L'utilisation comme pochoir permet aussi d'augmenter la résolution des motifs tout en utilisant un système de dépôt peu sophistiqué. Par exemple, une passivation des zones non actives d'une surface avec de l'lbumine de sérum bovin (BSA) peut être envisageable. Cependant, il reste à démontrer que la méthode est applicable à des protéines plus fragiles, en particulier à cause de la révélation à l'acétone.

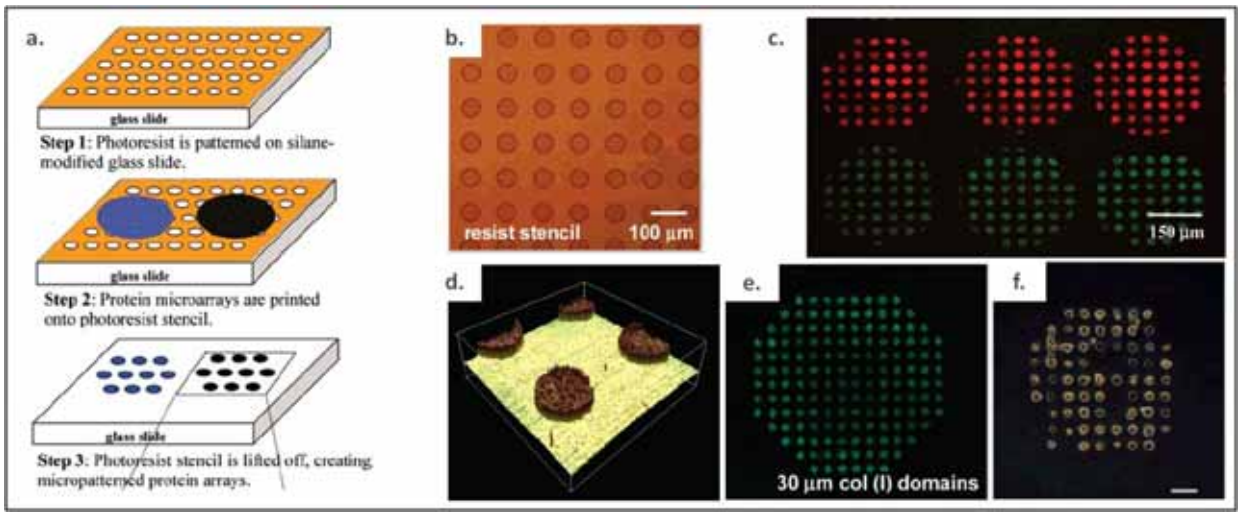


Figure 28 : Lift-off de protéines.

a. Principe ; **b.** Résine avec motifs ; **c.** Motifs de protéines marquées en fluorescence. Vert : collagène-FITC. Rouge : fibronectine-Alexa555 ; **d.** Image AFM d'un motif de collagène ; **e.** Motifs de collagène révélés par interaction avec un anticorps marqué ; **f.** Motifs de collagène révélés par interaction avec des cellules hépatiques : une cellule par spot en moyenne [134].

I.2.3.c. Ecoulement dirigé dans des réseaux microfluidiques

La méthode la plus répandue pour le transport de liquides d'un endroit vers un autre est l'utilisation de canaux. Grâce au développement des technologies de la microélectronique, il est aujourd'hui possible de fabriquer des canaux de taille micrométrique ou nanométrique de n'importe quelle géométrie et dans des matériaux variés. Des actionneurs adaptés ont été développés ainsi que toutes sortes de vannes, débitmètres, mélangeurs, réacteurs, régulateurs de température, etc… Ce domaine en pleine expansion, appelé microfluidique, est un élément clé dans la miniaturisation des analyses biologiques.

Dès 1998, des chercheurs britanniques et américains ont proposé d'utiliser des canaux ouverts pour réaliser des motifs peptidiques sur une surface [135]. Les canaux sont moulés en creux dans un timbre de PDMS, puis celui-ci est appliqué sur la surface de dépôt. L'étanchéité est assurée par le contact entre le timbre et la surface. Un traitement hydrophile de l'intérieur des canaux favorise l'écoulement. Dans chaque canal peut être injecté une solution différente, ce qui permet d'obtenir simultanément des motifs de diverses molécules. Lorsque le timbre est retiré, seules les zones ayant été en contact avec le liquide présentent des biomolécules.

Cette méthode a été appliquée pour des tests immunologiques [136] et en particulier pour le diagnostic de la peste [137]. Dans ce cas, l'écoulement dans les canaux fluidiques de PDMS est utilisé à deux reprises : dans un premier temps pour immobiliser les sondes biologiques sur la surface (anticorps), et dans un deuxième temps pour faire circuler les échantillons à analyser. Le format choisi est un réseau de lignes. Les lignes d'anticorps sont réalisées dans une direction, puis les canaux sont placés dans une direction perpendiculaire et les solutions à analyser sont injectées. On obtient ainsi une matrice de carrés avec dans une direction les différentes sondes et dans l'autre direction les différents échantillons biologiques (figure 29). Ce type de test a d'abord été réalisé avec une détection par fluorescence, puis adapté à la SPR [138].

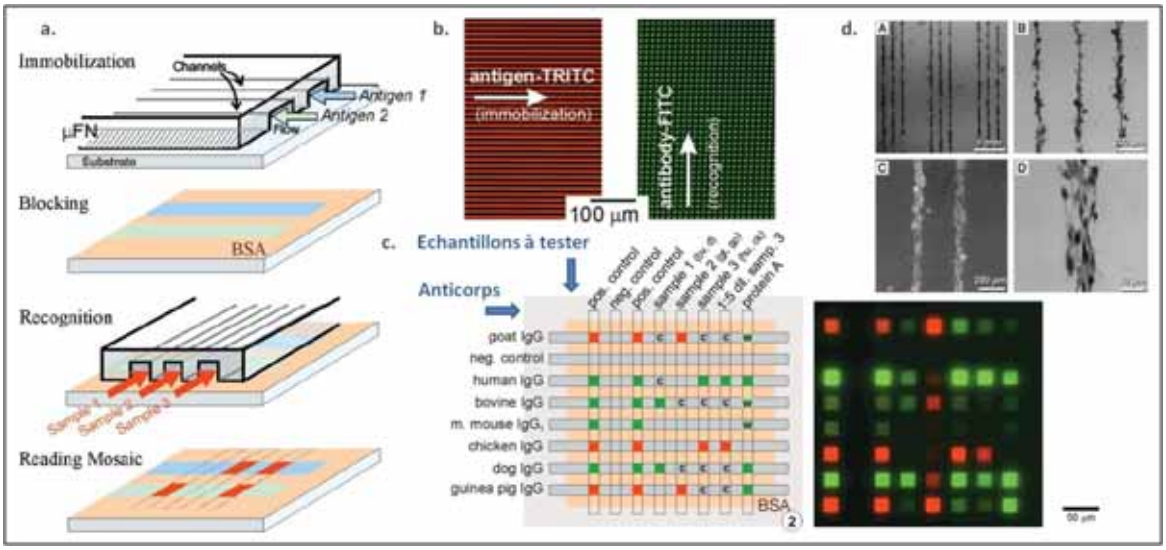


Figure 29 : Motifs réalisés par écoulement dans un réseau microfluidique en PDMS.
a. Principe de test immunologique en « mosaïque » ; **b.** Test avec deux fluorophores : mise en évidence de la qualité des motifs ; **c.** Test sur 8 anticorps de 8 échantillons marqués en fluorescence rouge (TRITC) ou verte (FITC) [136] ; **d.** Cellules endothéliales bovines immobilisées sur des motifs du peptide RGD. Adhésion et croissance selon une orientation contrôlée [135].

Dans le cas de l'adressage de liquide sur des biocapteurs, la microfluidique est la méthode reine, à condition que le réseau fluidique soit conçu en même temps que le capteur. Ceci peut nécessiter un design très complexe selon la fragilité du capteur et des structures qui l'entourent. Par exemple, Aubin *et al* ont disposé des microleviers dans des réacteurs indépendants reliés par des canaux [139]. D'autres approches consistent à coupler ces microleviers à des capillaires permettant de fonctionnaliser chacun individuellement [140] [141].

[135] : N. Patel, R. Padera, G.H.W. Sanders, S. Cannizzaro, M.C. Davies, R. Langer, C.J. Roberts, S.J.B. Tendler, P.M. Williams, et K.M. Shakesheff, *FASEB Journal*, 1998, **12**, 1447-1454
[136] : A. Bernard, B. Michel, E. Delamarche, *Anal. Chem.*, 2001, **73**, 8-12
[137] : C.A. Rowe, S.B. Scruggs, M.J. Feldstein, J.P. Golden, F.S. Ligler, *Anal. Chem.*, 1999, **71**,433-439
[138] : V. Kanda, J.K. Kariuki, D.J. Harrison, M.T. McDermott, *Anal.Chem.*, 2004, **76**, 7257.
[139] : K.L. Aubin, J. Huang, S.-M. Park, Y. Yang, M. Kondratovich, H.G. Craighead, B.R. Ilic, *J. Vac. Sci. Technol. B*, 2007, **25 (4)**, 1171-1174
[140] : R. McKendry, J. Zhang, Y. Arntz, T. Strunz, M. Hegner, H.P. Lang, M.K. Baller, U. Certa, E. Meyer, H.-J. Güntherodt, et C. Gerber, *PNAS*, 2002, **99 (15)**, 9783-9788
[141] : A.Bietsch, J. Zhang, M. Hegner, H. Peter Lang, et C. Gerber, *Nanotechnology*, 2004, **15**, 873-880

I.2.4. Adressage grâce à des surfaces préstructurées

Lorsqu'il n'est pas possible de déposer, imprimer ou acheminer les biomolécules à un endroit précis de la surface, une structuration préliminaire peut être réalisée pour que les molécules se dirigent préférentiellement vers les zones souhaitées. Le plus couramment, cette structuration est topographique, chimique, ou électrostatique.

I.2.4.a. Structuration topographique

L'une des façons les plus intuitives de confiner un liquide dans une zone précise d'une surface est d'y percer un puits. Le liquide peut alors être dispensé sur la totalité de la surface et il remplit les motifs en creux de la même façon qu'on remplit un bac à glaçons. A l'échelle du micron, cette technique a été utilisée sur divers substrats, gravés essentiellement par faisceaux d'électrons ou par ablation laser. Ce type de méthode convient particulièrement aux tests biologiques mettant en jeu un système de détection pouvant être focalisé sur les motifs, par exemple une détection optique par ondes planes [142], ou un système électrochimique [143]. Dans le cas contraire, des astuces doivent être trouvées pour éviter qu'une partie des biomolécules ne se fixe sur le bord des puits. La méthode la plus courante consiste à recouvrir ces zones d'une couche chimique qui repousse les biomolécules, par exemple à base de polyéthylène glycol [144] [145].

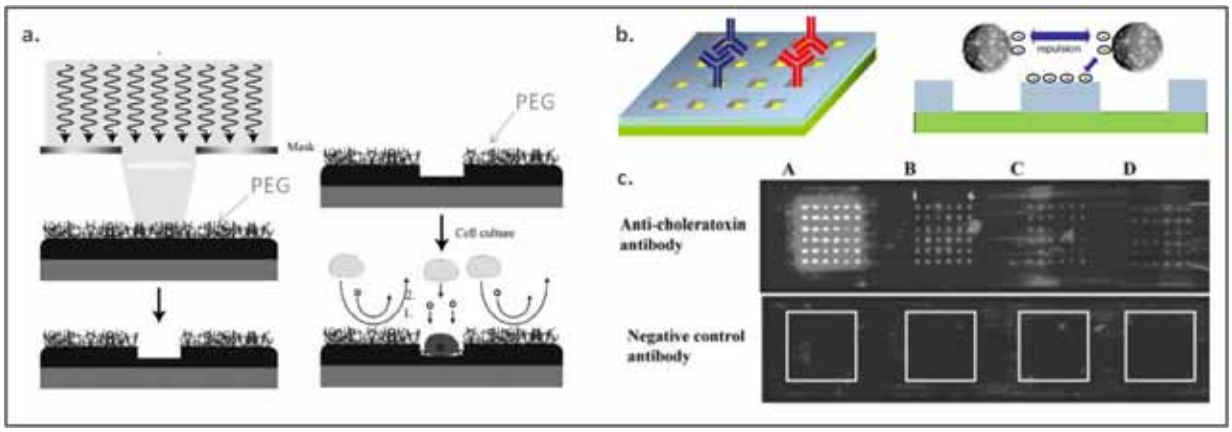


Figure 30 : Structuration topographique : surfaces à micropuits.
a. Réalisation de micro-puits par ablation laser pour réaliser une matrice de cellules isolées. PEG : polyéthylène glycol, utilisé pour éviter la fixation sur le bord des puits [144]. ; **b.** Test immunologique sur une surfacec à micropuits : schéma de principe. [145] ; **c.** Détection de la toxine cholérique dans des puits de quelques attolitres grâce à système d'ondes optiques planes [142].

[142] : S. Ghatnekar-Nilsson, L. Dexlin, C. Wingren, L. Montelius et C.A.K. Borrebaeck, *Proteomics*, 2007, **7**, 540–547
[143] : R.K. Reddy, M.G. Bothara, T.W. Barrett, J.Carruthers, et S. Prasad, IEEE Sensors Journal, **8 (6)**, 720-723
[144] : A.L. Hook, H. Thissen, J.P. Hayes, N.H. Voelcker, *Biosensors and Bioelectronics*, 2006, **21**, 2137–2145
[145] : H.Y. Lee, B.K. Lee, J.W. Park, H.S. Jung, J.M. Kim, T. Kawai, *Ultramicroscopy*, in press

Lorsque les biomolécules sont confinées dans des micro-puits, il est possible de les maintenir constamment en milieu liquide et donc d'éviter tout risque de perte d'activité. Cet avantage majeur a conduit certaines équipes à utiliser des surfaces structurées en combinaison avec divers systèmes de dépôt, par exemple un « électrospray » [146], une nanopipette ionique [147], ou une pipette à ultrasons [148].

I.2.4.b. Structuration chimique ou biochimique

Dans les techniques d'adressage présentées précédemment, les biomolécules étaient immobilisées grâce à une couche d'accroche déposée sur la totalité de la surface. Une autre méthode consiste à réaliser les motifs souhaités à partir de ces molécules d'accroche. Les techniques utilisées pour réaliser ces motifs sont les mêmes que celles présentées précédemment. Quelques unes de ces molécules chimiques et biochimiques utilisées comme couches d'accroche sont présentées au paragraphe I.3.

Généralement, les zones restées libres entre les motifs sont recouvertes d'une couche de passivation, qui évite la fixation non spécifique des biomolécules. Les plus courantes sont les dérivés de polyéthylène glycol, la BSA, les protéines de lait, ou l'ADN de sperme de saumon.

I.2.4.c. Structuration électrique

L'ADN, les protéines et les cellules étant des entités chargées, on peut les déplacer en utilisant un champ électrique. Ainsi, elles peuvent être dirigées vers des zones précises d'une surface en y plaçant des électrodes. Par exemple, Huang *et al* ont adressé des anticorps et des cellules sur des électrodes en les « attirant » à l'aide du champ généré [149] [150]. C'est aussi un jeu d'électrodes qui a été utilisé par Washizu *et al* pour isoler et étirer des brins d'ADN de façon localisée [151]. La fixation électrostatique d'ADN est détaillée au paragraphe I.3.1.b.

Les flux de liquide générés au voisinage des électrodes peuvent aussi permettre de déplacer des bioparticules [152]. Ce phénomène, appelé électro-osmose est exploité au LAAS-CNRS, pour développer un système permettant de diriger les biomolécules vers la zone active d'un capteur. Ce « bioconcentrateur » est un anneau placé autour de micromembranes résonantes utilisées comme biocapteur mécanique. En appliquant un courant alternatif de 500Hz, il a été démontré que des nanoparticules pouvaient être concentrées au niveau de la membrane [153]. Des optimisations sont en cours pour appliquer cette technique à des cellules puis à des entités plus petites comme l'ADN ou les protéines.

---

[146] : H.R.C. Dietrich, J. Knoll, L.R. van den Doel, G.W.K. van Dedem, P.A.S. Daran-Lapujade, L.J. van Vliet, R. Moerman, J.T. Pronk, et I.T. Young, *Anal. Chem.*, 2004, **76**, 4112-411

[147] : A. Bruckbauer, D. Zhou, D.-J. Kang, Y.E. Korchev, C. Abell, et D. Klenerman, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 6508-6509

[148] : P. Angenendt, L. Nyarsik, W. Szaflarski, J. Glökler, K.H. Nierhaus, H.Lehrach, D.J. Cahill, et A. Lueking, *Anal. Chem.*, 2004, **76**, 1844-1849

L'utilisation d'électrodes pour adresser des biomolécules est particulièrement intéressante lorsque ces mêmes électrodes sont utilisées pour la détection. Lorsque ce n'est pas le cas, une technique permettant de déposer localement des charges à l'aide d'une pointe d'AFM a été proposée. La surface doit d'abord être neutralisée électriquement à l'aide d'un pistolet électrostatique. La pointe est mise en contact avec la surface, conductrice, et une différence de potentiel est appliquée : des charges s'accumulent donc localement. Les biomolécules sont mélangées à une huile non conductrice, qui évite que les charges ne se dissipent. Lorsque l'émulsion de biomolécules est dispensée sur la surface, les vésicules éclatent au niveau des motifs chargés, et les biomolécules se déposent sur ces motifs. Des motifs d'avidine, de BSA et d'anticorps ont été réalisés par cette méthode, appelée Electric-Droplet-Lithography (EDL) [154] [155].

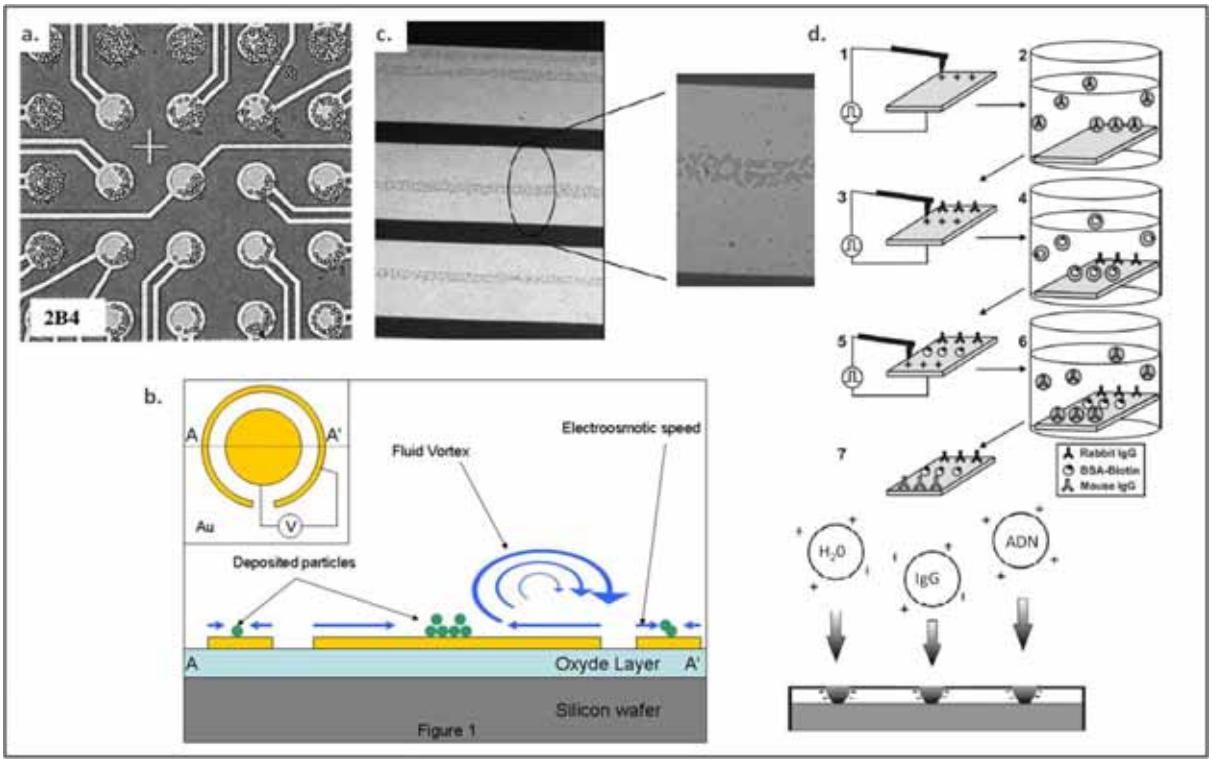


Figure 31 : Structuration électrique : électrodes, concentrateurs et EDL.
a. Adressage de cellules humaines sur des électrodes [150] ; **b.** Principe de l'électro-osmose appliqué à un bioconcentrateur [153] ; **c.** Concentration de cellules bactériennes par électro-osmose [152] ; **d.** Principe du dépôt par EDL [155], et détail sur l'utilisation d'une émulsion [154].

[149] : Y. Huang, K. L. Ewalt, M. Tirado, R. Haigis, A. Forster, D. Ackley, *Anal. Chem.*, 2001, **73**, 1549-1559
[150] : Y. Huang, S. Joo, M. Duhon, M. Heller, B. Wallace, et X. Xu, *Anal. Chem.*, 2002, **74**, 3362-3371
[151] : M. Washizu, O. Kurosawa, I. Arai, S. Suzuki, et N. Shimamoto, *IEEE Transactions on Industry Applications*, 1995, **31 (3)**, 447-456
[152] : J. Wu, Y. Ben and H.-C. Chang, *Microfluid Nanofluid*, 2005, **1**, 161
[153] : L. Tanguy, L. Nicu, *Journal of Applied Physics*, 2008, in press
[154] : N. Naujoks, A. Stemmer, *Microelectronic Engineering*, 2003, **67-68**, 736-741
[155] : E.M. Blanco, S.A. Nesbitt, M.A. Horton, et P. Mesquida, *Adv. Mater.*, 2007, **19**, 2469–2473

I.2.5. Une échelle particulièrement intéressante (1-20µm), une technique à développer : Bioplume

La figure 32 replace la plupart des techniques d'adressage décrites précédemment dans leur contexte en terme d'échelle. La taille des motifs réalisables peut ainsi être comparée aux résolutions des outils de visualisation les plus courants et aux tailles caractéristiques de divers éléments biologiques.

Les techniques les plus matures permettent de réaliser des motifs de quelques centaines de microns. C'est la taille caractéristique de la plupart des biopuces réalisées à partir de biomolécules pré-synthétisées, ou préparées à partir d'échantillons biologiques. Les outils de visualisation adaptés sont très largement développés.

A l'autre extrême, la lithographie douce et le dépôt par pointe d'AFM permettent d'atteindre des résolutions nanométriques. A cette échelle là, des études sur des biomolécules uniques ou sur de petits complexes protéiques sont envisageables, à condition de disposer d'un microscope à force atomique ou d'un microscope électronique à balayage pour les observer.

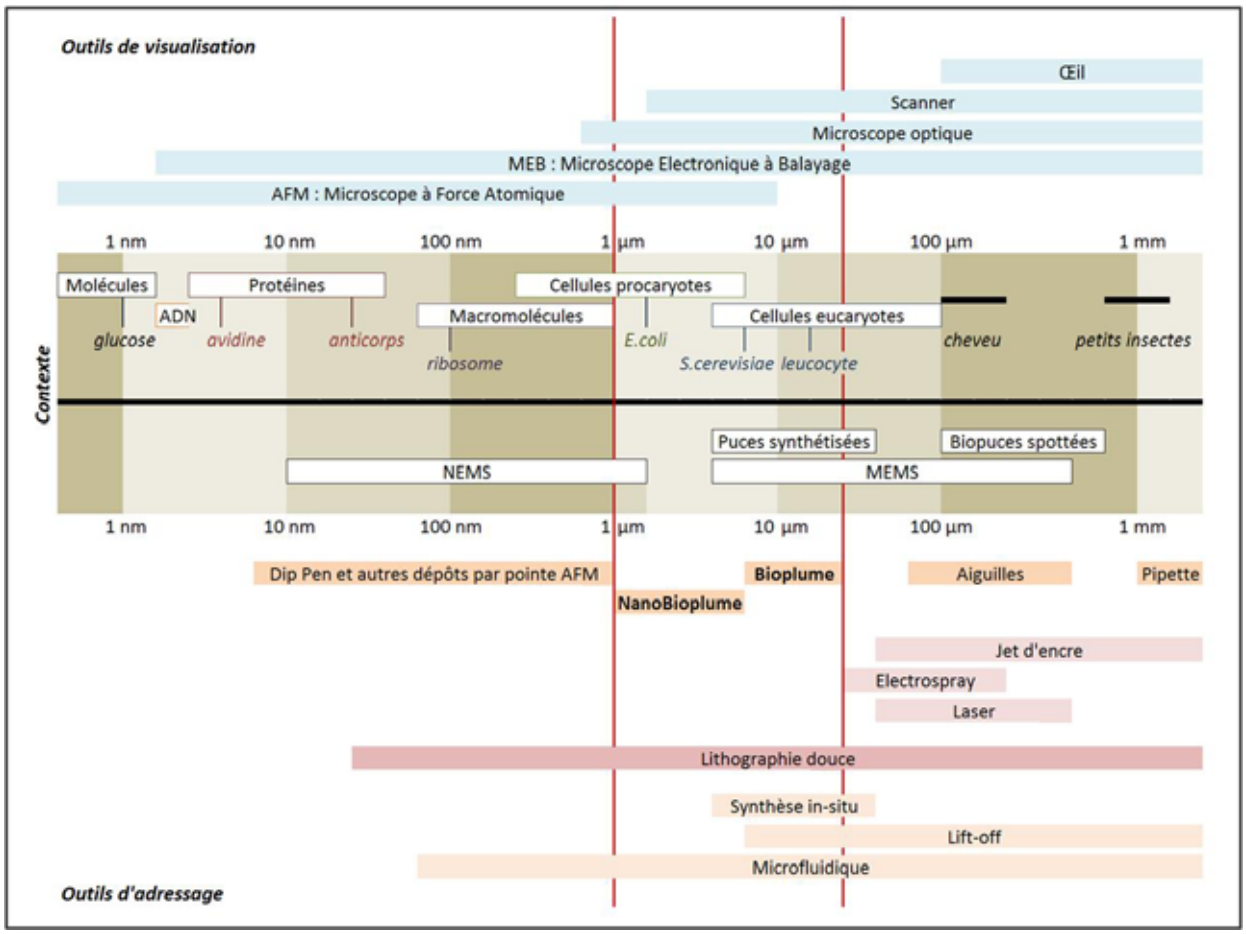


Figure 32 : Biopuces, biocapteurs, techniques d'adressage et outils de visualisation : comparaison des tailles caractéristiques.

Entre les deux se situe l'échelle 1-20µm, très peu étudiée car trop petite pour de premières applications immédiates et trop grande pour parler de « nano ». Pourtant, cette échelle est particulièrement intéressante. Tout d'abord, elle correspond exactement à la taille de la plupart des cellules, procaryotes et eucaryotes. Réaliser ainsi des motifs de 1-20µm peut permettre d'envisager la réalisation de sites d'accroche pour des cellules isolées. Dans le domaine des biopuces, réaliser des motifs de cette taille signifierait augmenter de 100 à 10000 fois les densités de spots, et réduire de 10^3 à 10^6 fois les quantités d'échantillons biologiques, tout en restant dans les limites de détection des microscopes optiques. Enfin, les biocapteurs récents sont de plus en plus petits pour des raisons d'intégrabilité ou de limite de détection, et l'échelle 1-20µm est tout à fait pertinente dans ce domaine.

Parmi les techniques permettant de réaliser des motifs de 1-20µm, le robot Bioplume développé au LAAS-CNRS apparaît comme une technique tout à fait avantageuse dans le cadre de la réalisation de biopuces ou de l'adressage de biocapteurs. La possibilité de contrôler précisément la force d'appui et la localisation des dépôts est un atout majeur, par rapport à la lithographie douce en particulier. En comparaison à des techniques purement microfluidiques, la versatilité est indéniable. Avant le début de cette thèse, seules la conception de Bioplume, sa fabrication et le dépôt de solutions modèles était entièrement validés. Les potentiels très encourageants de la technique ont donc conduit à orienter nos travaux vers l'utilisation de ce robot pour des dépôts de molécules biologiques.

I.3. Immobilisation de biomolécules sur des surfaces : un bref aperçu.

Immobiliser des biomolécules sur une surface ne signifie pas seulement faire en sorte qu'elles soient fixées correctement, mais aussi et surtout qu'elles restent fonctionnelles. En effet, protéines et ADN s'adsorbent très facilement sur une très grande variété de supports [156] [157]. Ce phénomène est même parfois gênant, car source de contamination et d'encrassement. Ainsi, dans le domaine des biocapteurs implantés, la question à résoudre est plutôt « comment éviter que des biomolécules « indésirables » ne se fixent sur les surfaces? ». Cependant, suite à l'adsorption, la grande majorité des biomolécules perdent leur conformation, et donc leur fonction biologique. Pour mieux conserver ces propriétés biologiques, un piégeage physique, une liaison covalente ou une liaison d'affinité sont mieux adaptées. Quelques unes de ces méthodes sont présentées ici. Les références bibliographiques sont rassemblées à la fin du chapitre.

I.3.1. Immobilisation par physisorption

I.3.1.a. Adsorption directe

L'adsorption directe de protéines sur des surfaces présente un intérêt lorsque ces protéines sont destinées simplement à réaliser une couche d'accroche sur laquelle seront ensuite immobilisées les protéines étudiées. C'est par exemple la méthode utilisée depuis presque quarante ans pour les tests immunologiques ELISA [158]. Les liaisons mises en jeu sont des interactions ioniques, des forces de van der Waals ou des interactions hydrophobes. Cependant, ces biomolécules directement adsorbées forment des couches non uniformes [159], et la perte d'activité biologique est importante. Une étude menée en 1997 sur des anticorps adsorbés directement sur du polystyrène a montré que seulement 20% d'entre eux étaient disponibles pour une interaction suite à ce type d'immobilisation [160]. De telles couches peuvent être utilisées aussi pour des tests préliminaires de sensibilité sur de nouveaux biocapteurs [161].

I.3.1.b. Liaison électrostatique

La fixation par liaison électrostatique a été développée aussi bien pour l'ADN que pour les protéines, en particulier à partir de polymères de poly-L-lysine. Dès 1986, Scopsi *et al* ont observé que des anticorps, et diverses protéines se fixaient facilement sur la poly-L-lysine ainsi que divers polymères peptidiques [162]. La poly-L-lysine est chargée positivement à pH neutre, ce qui attire les acides aminés chargés négativement ainsi que l'ADN, chargé négativement au niveau de ses groupements phosphates.

L'une des premières études d'expression des gènes par puce à ADN a ainsi été réalisée sur une lame de microscope recouverte de poly-L-lysine [163]. Certaines puces à protéines sont aussi réalisées sur ce type de support [164]. La fixation électrostatique est cependant sensible aux changements de pH et de conductivité.

Références en fin de chapitre

I.3.1.c. Piégeage physique

Afin de maintenir les biomolécules dans un environnement aqueux et d'éviter leur dénaturation, l'immobilisation dans une matrice poreuse est une solution efficace. Ainsi divers polymères ont été testés pour leur capacité à piéger les biomolécules. Par exemple des biopuces ont été réalisées sur **gel d'agarose** [165] [166], utilisé habituellement pour l'électrophorèse d'ADN [167] [168] et de protéines [169].

De même, l'équipe de Andrei Mirzabekov (Institut des Sciences de Moscou) a développé dès 1989 l'utilisation de **gels de polyacrylamide** pour des puces à ADN [170] [171] puis à protéines [172]. Ce support était jusqu'alors essentiellement connu pour la séparation de protéines [173]. La fonctionnalité des biomolécules ainsi piégées a été vérifiée en traçant des courbes d'associations antigène/anticorps et en mesurant l'activité de trois enzymes (HRP, phosphatase alcaline et β-D-glucuronidase) [174]. Cependant, l'un des inconvénients de l'immobilisation physique des biomolécules est le risque de désorption au cours des lavages. Pour éviter ce phénomène, la copolymérisation de l'acrylamide avec des protéines ou des oligonucléotides modifiés a été proposée [175] [176]. Au cours de cette copolymérisation, les biomolécules sont fixées de façon covalente dans les mailles du polymère.

Un autre polymère permettant simultanément un piégeage physique et une immobilisation covalente est le dextrane. Ce polysaccharide a été proposé comme couche d'accroche dès 1991 [177] et des protocoles d'immobilisation des biomolécules *via* les amines, les thiols, les aldéhydes ou la biotine ont été développés [178]. C'est cette technique qui a été adoptée en premier lieu par la société Biacore pour les analyses par SPR [179], ce qui explique son essor très important dans ce domaine [180] [181].

Des gels de silice ou sol-gels ont été également testés. Leur avantage majeur est leur transparence qui permet d'envisager des méthodes de visualisation optiques. Il a été démontré que l'activité des enzymes immobilisées dans ce type de gel était maintenue [182] [183] [184].

Enfin, des dépôts de biomolécules ont été réalisés sur des membranes de nitrocellulose ou de vinyle PVDF (PolyVinylidene DiFluoride), utilisées habituellement pour du buvardage ou de la filtration. L'utilisation pour des tests de type puce à ADN [185] ou puce à protéines [186] [187] a ainsi été proposée. La quantité de biomolécules piégées dans les pores des membranes est bien plus importante que celle déposée sur une lame de verre, ce qui peut être perçu comme un avantage dans le cas de tests à haute sensibilité [188].

I.3.2. Immobilisation par liaison covalente

Immobiliser les biomolécules grâce à une liaison covalente permet de s'assurer de la stabilité de la liaison avec la surface. Ceci est particulièrement intéressant dans le cas d'utilisations avec des lavages répétés, ou en cas de changement de pH [189]. Dans la grande majorité des expériences, la surface est traitée à l'avance pour introduire une molécule qui va servir d'intermédiaire. Mais dans certains cas, les biomolécules peuvent être couplées directement à la surface ou même synthétisées *in situ* dans le cas d'oligonucléotides courts ou de peptides.

Références en fin de chapitre

I.3.2.a. Synthèse in situ

La synthèse *in situ* est dérivée des techniques classiques de synthèse d'ADN et de peptides, adaptées de telle manière que les biomolécules soient produites directement de façon localisée sur la surface. Basée sur un principe de photoprotection/déprotection à travers des masques de photolithographie, cette technique a été largement détaillée au paragraphe I.2.3.a.

I.3.2.b. Couplage à l'aide de molécules intermédiaires

L'utilisation de molécules intermédiaires entre la surface et la biomolécule permet de découpler les étapes de préparation de la surface et d'immobilisation. Quelles que soient les conditions requises pour fonctionnaliser la surface, les conditions opératoires permettant la fixation finale de la biomolécule peuvent être ainsi simplifiées et réalisables en conditions moins contrôlées, par exemple dans le volume restreint de liquide adressé sur la surface.

Les molécules intermédiaires les plus couramment utilisées sont présentées figure 33. Ces molécules présentent deux fonctions réactives. La première (notée X et représentée verticalement) permet l'accroche sur la surface. La seconde (notée Y et réprésentée horizontalement) réagit avec les biomolécules à immobiliser.

- *Fixation des molécules intermédaires sur la surface : auto-assemblage d'alcanethiols , silanisation ou liaison Si-C*

Auto-assemblage, silanisation ou liaison Si-C sont loin d'être les seules techniques permettant de créer des couches réactives sur une surface, mais elles sont les plus largement utilisées dans le domaine des biopuces et des biocapteurs.

Dès 1993, Bertillsson *et al* ont décrit la formation spontanée de monocouches d'alcanethiols lorsque ceux-ci étaient mis en présence d'une surface d'or [190]. Cet auto-assemblage a été très largement étudié et pourtant aucune explication précise du mécanisme d'accroche des fonctions thiols sur l'or n'est admise [191]. Les molécules les plus courantes sont les acides mercaptoalcanoïques (MUA par exemple) et les mercaptoalkylamines (MUAM par exemple) qui présentent respectivement des fonctions réactives acide carboxylique ou amine. L'autoassemblage de thiols est particulièrement utilisé pour la détection par résonance plasmonique de surface, où une surface d'or est nécessaire.

Le format classique des biopuces actuelles est la lame de verre, disponible dans tout laboratoire, et compatible avec un grand nombre d'appareils pré-existants. L'oxyde de silicium qui compose le verre est aussi très couramment utilisé comme matériau isolant dans le domaine de la microélectronique. Les fonctionnalisations de surface à partir d'alcoxysilanes, réalisables sur SiO_2, ont donc été largement développées. La fixation covalente des silanes sur SiO_2 permet d'obtenir des monocouches dans des conditions optimisées [192]. La diversité des fonctions chimiques pouvant être introduites en bout de chaîne permet d'envisager diverses méthodes d'immobilisation des biomolécules.

L'immobilisation sur silicium non oxydé, à partir l'une liaison C-Si activée par UV a aussi été proposée [193], mais elle est beaucoup moins répandue.

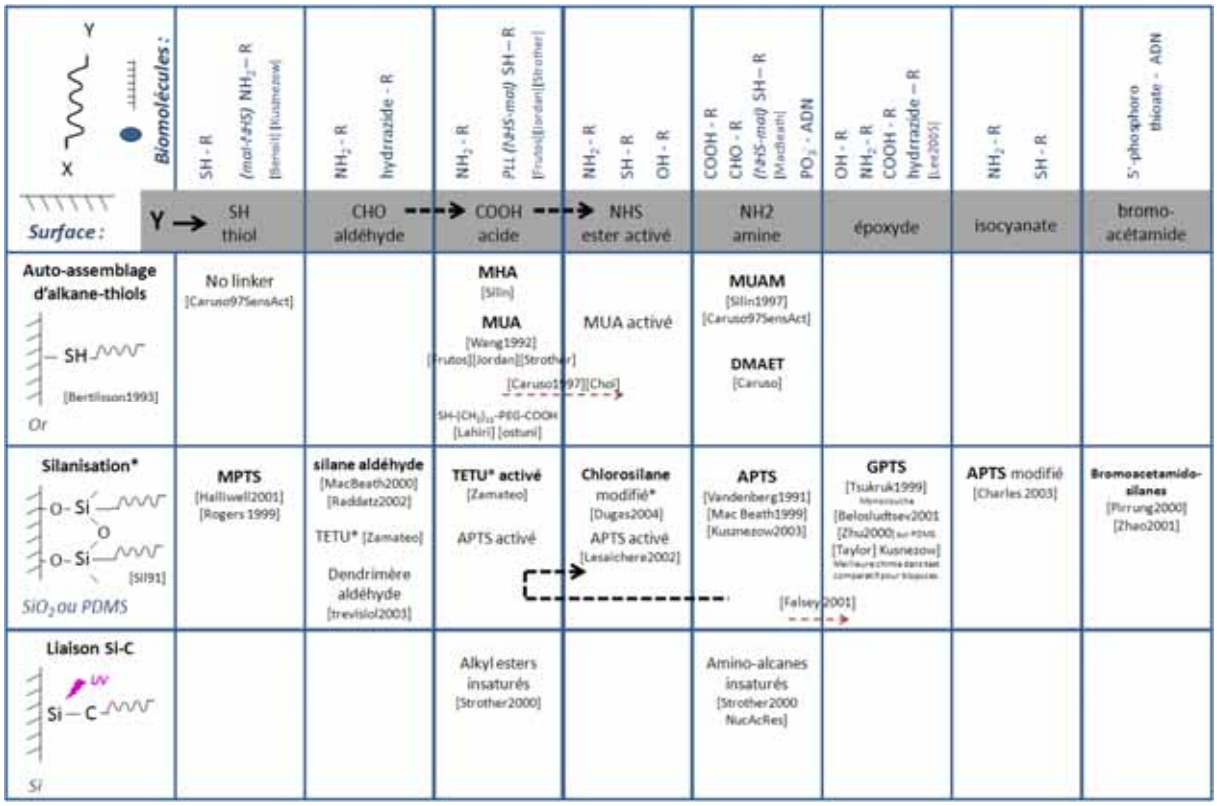


Figure 33 : Molécules intermédiaires permettant l'immobilisation de biomolécules par liaison covalente sur des surfaces.

* Silanisation à l'aide d'un chlorosilane ou d'un alkylsilane. Illustration : alkylsilane.

MHA : acide mercapto-hexadécanoïque ; MUA : acide mercapto-undécanoïque ; MUAM : mercapto-undécyl-amine ; DMAET : diméthylamino-éthanethiol ; TETU : Cl_3-Si-$(CH_2)_{10}$-COOH-CF_3 ; MPTS : mercaptopropyl-trichloro-silane ; APTS : aminopropyl-triéthoxy-silane ; GPTS : glycidoxypropyl-triméthoxy-silane ; mal : maléimide ; PLL : Poly-L-lysine. Références en fin de chapitre.

➢ *Fixation des biomolécules sur la couche intermédiaire*

Parmi les fonctions chimiques présentes à la périphérie des protéines, les plus couramment utilisées pour le couplage sur support solide sont les amines (N-terminale, résidus Lys), les thiols (résidus Cys) et éventuellement les acides carboxyliques (C-terminal, résidus Asp et Glu). Dans le cas de l'ADN, les phosphates sont parfois exploités, mais dans la majorité des cas, une fonction amine ou thiol est ajoutée en position 5' pour faciliter le couplage. Les liaisons réalisées sont majoritairement des amides, imines, thioéthers, ponts disulfures, hydrazides et isocyanates. Les diverses configurations sont présentées figure 33 et 34.

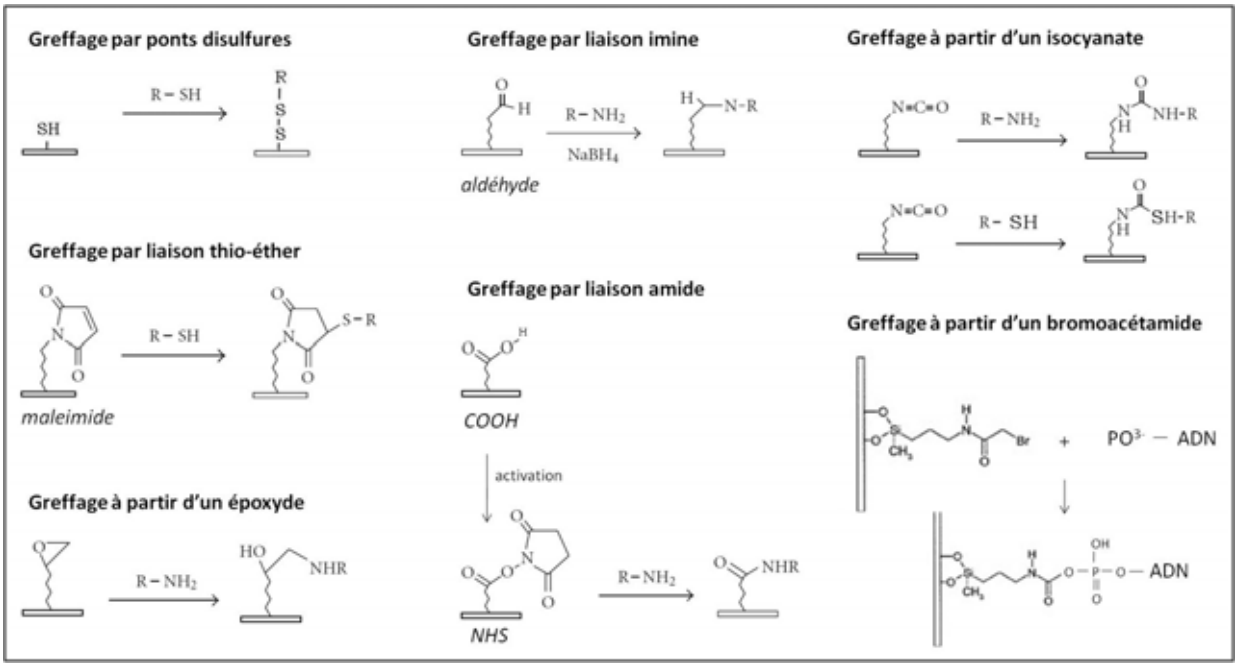


Figure 34 : Détail des principales méthodes de greffage de biomolécules par liaison covalente
Adapté de [194] [195] et [196]

➢ *Espaceurs : la clé de la sensibilité et de la spécificité*

Lorsqu'une biomolécule est immobilisée sur un support, ses interactions avec le support lui-même peuvent affecter ses propriétés biologiques. Pour éviter cela, un espaceur doit être ajouté entre la surface et la biomolécule [197]. Cet espaceur peut être une partie intégrante de la molécule intermédiaire utilisée, ou être ajouté comme une couche supplémentaire.

Dans le cas de l'ADN, une technique très simple consiste à ajouter une chaîne de **poly-thymine** en position 5', soit lors de la synthèse, soit grâce à une amplification à partir d'une amorce poly-T.

Lorsqu'il est inclus dans les molécules intermédiaires, l'espaceur est généralement constitué de simples **chaînes alkyles** (cf la plupart des molécules intermédiaires citées dans la figure 35). En conditions optimales, celles-ci s'organisent en couche dense grâce à des interactions hydrophobes. L'éloignement de la surface est ainsi assuré mais des problèmes de bruit de fond apparaissent car des interactions non spécifiques sont rendues possibles, en particulier avec les protéines. Pour pallier ce problème, des molécules présentant des chaînes de **polyéthylène glycol (PEG)** à la place des chaînes alkyles ont été proposées. Le PEG présente en effet la propriété de limiter l'adsorption non spécifique des protéines [198]. Une variété importante de PEG bi-fonctionnels a ainsi été développée [199], ce qui permet de les utiliser aussi comme couche supplémentaire suite à une silanisation [200] [201]. L'accroche de protéines grâce à ces PEG bifonctionnels a été largement documentée [202] [203] et il a été démontré que des anticorps ainsi immobilisés présentaient une biodisponibilité accrue [202]. Des copolymères de poly-L-lysine et de PEG ont aussi été développés [204], ce qui permet à la fois de profiter des possibilités de liaison *via* la poly-L-lysine et de contrôler la densité de PEG sur la surface [205].

Certains espaceurs permettent de surcroit d'augmenter la densité de fonctions réactives sur la surface. Ceci est obtenu grâce à des composés particuliers appelés dendrimères [206] [207] [208]. Leur structure polymérique permet d'immobiliser une plus grande quantité de biomolécules par unité de surface, ce qui conduit à une sensibilité accrue (figure 35). Par exemple, dans le cadre du programme Génopôle entre la Plateforme Biopuces de Toulouse et le Laboratoire de Chimie et de Coordination, il a été démontré qu'une cible oligonucléotidique pouvait être détectée à partir de 1pM [208]. La même expérience réalisée sur des lames commerciales (amines, aldéhydes ou époxydes) conduit à une sensibilité 10 fois moins importante (10pM) [209]. Il reste à vérifier que c'est également le cas pour des protéines, des sucres et de petits ligands.

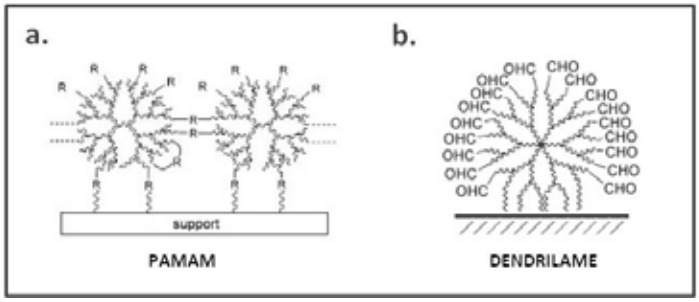


Figure 35 : Espaceurs de type dendrimère utilisés pour augmenter la densité de biomolécules sur la surface. a. [207] ; b. [208]

I.3.2.c. Couplage électrochimique

Les méthodes présentées précédemment consistent à activer la surface pour permettre la fixation des biomolécules. Le couplage électrochimique utilise l'approche inverse : ce sont les biomolécules qui sont couplées à une espèce électro-active. L'application d'une différence de potentiel dans la solution contenant les ADN ou les protéines activées initie une réaction électrochimique qui permet le couplage sur la surface. Parmi les méthodes de greffage électrochimique de biomolécules, on peut citer en particulier l'électrogreffage par oxydation de pyrrole [210] et la réduction électrochimique de sels de diazonium [211] [212].

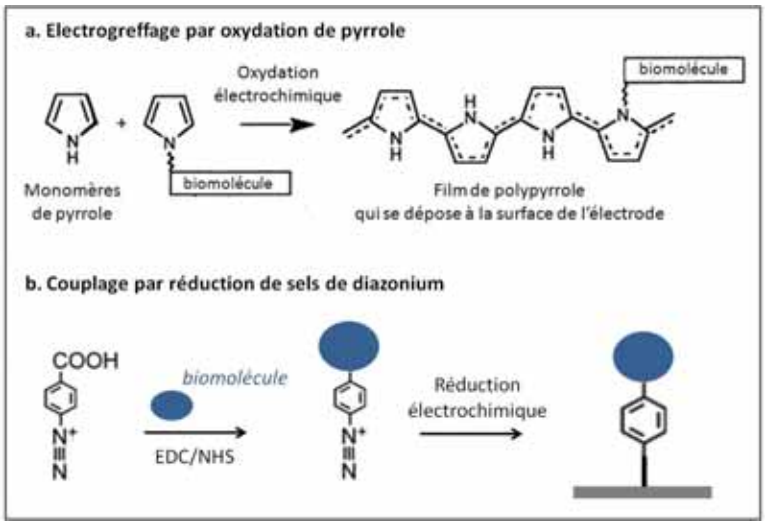


Figure 36 : Exemples de méthodes de greffage électrochimique

I.3.3. Immobilisation par liaison d'affinité

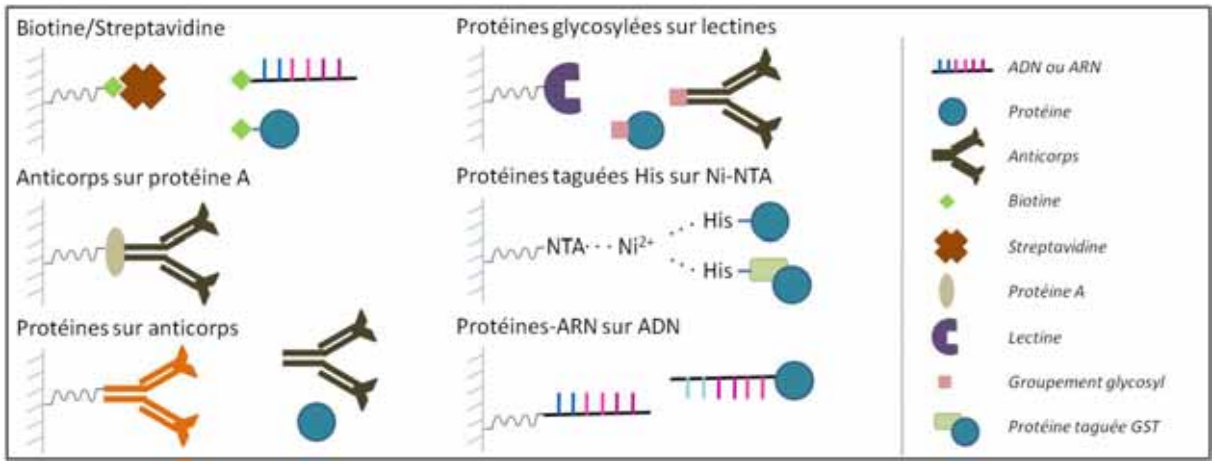


Figure 37 : Représentation schématique des principales liaisons d'affinité utilisées pour immobiliser des biomolécules sur des supports solides.

- *Biomolécules biotinylées sur streptavidine*

L'interaction entre la biotine et la streptavidine est l'une des plus robustes connues (10^{-15} M^{-1}). Or, la biotine peut être facilement couplée à l'ADN ou aux protéines par exemple après activation sous forme d'ester de succinimide. Ces biomolécules biotinylées peuvent donc être immobilisées de façon très stable sur une surface recouverte de streptavidine, ou de ses analogues avidine ou neutravidine. Les méthodes utilisées pour immobiliser la streptavidine elle-même sont celles présentées précédemment : assemblage de thiols biotinylés [213] [214], avec éventuellement ajout d'un intermédiaire PEG [215], silanisation [216], ou copolymère de poly-L-lysine et de polyéthylène glycol biotinylé (PLLgPEG) [217]. Chaque étape de ce protocole a été étudiée en détail par diverses méthodes. Afin d'obtenir une densité maximale de biomolécules immobilisées, il a été démontré que la surface ne doit pas être saturée, ni avec les molécules intermédiaires biotinylées, ni avec la streptavidine, ceci essentiellement pour des raisons d'encombrement stérique [213] [215] [216] [217]. L'application à la réalisation de puces à protéines [214] ou à la fonctionnalisation de biocapteurs [218] a été démontrée.

- *Anticorps sur protéine A*

L'inconvénient majeur dont souffrent toutes les méthodes citées précédemment est la difficulté à orienter les protéines immobilisées, à moins d'utiliser des chimies très élaborées [194]. Dans le cas particulier des anticorps, l'orientation peut être contrôlée en utilisant une couche de protéine A. Extraite de *Staphylococcus aureus*, cette protéine reconnaît spécifiquement le fragment constant des anticorps, ce qui garantit la disponibilité du fragment variable en vue d'une interaction [219] [220]. Cette propriété a été largement exploitée en immunologie [221] et son intérêt dans le cadre d'interactions de surface a été vérifié par QCM [222]. Afin d'augmenter encore la densité d'anticorps pouvant être ainsi immobilisés, une protéine A modifiée portant 5 domaines de liaisons au lieu d'un seul et des résidus Cys permettant une fixation simple sur or a été créée par ingénierie [223].

➢ *Protéines sur anticorps*

Lorsque l'orientation des protéines immobilisées doit être contrôlée, une simple couche d'anticorps spécifiques de ces protéines peut être utilisée [224]. Ces anticorps peuvent être simplement adsorbés sur la surface, comme c'est le cas pour tout test ELISA [158]. Statistiquement, un nombre suffisant d'anticorps adsorbés est orienté de façon à immobiliser la protéine d'intérêt. Lorsque la densité de protéines doit être optimisée, cet anticorps d'accroche peut être lui-même immobilisé par liaison covalente ou d'affinité. On peut aboutir ainsi à des systèmes de « sandwich » complexes.

➢ *Protéines glycosylées sur lectines*

La plupart des protéines, et en particulier les anticorps, sont glycosylées. Or ces groupements sont reconnus de façon spécifique par les protéines de la famille des lectines. Ces dernières ont donc été utilisées comme couche d'accroche [225] [226]. La partie glycosylée des anticorps étant située dans le fragment constant, une orientation correcte est obtenue par cette méthode.

➢ *Protéines taguées His sur Ni-NTA*

Dans le cadre des biopuces, les protéines servant de sondes sont parfois produites et purifiées à l'aide d'un « tag » histidine. Cette histidine peut ensuite être utilisée pour immobiliser ces molécules sur des surfaces de nickel. Pour des applications sur surface d'or il a été proposé de déposer un agent chélateur du nickel, l'acide nitriloacétique (NTA) [227]. De larges banques de protéines ont pu être immobilisées de cette façon [228].

➢ *Protéines-ARN sur ADN*

L'immobilisation d'ADN sous forme de biopuces ayant été largement étudiée avant que les puces à protéines ne se développent, des stratégies ont été proposées pour immobiliser des protéines sur des sondes ADN. Pour cela des protéines couplées à un fragment d'ARN ou d'ADN ont été produites à l'aide des techniques sophistiquées de génie génétique [229] [230].

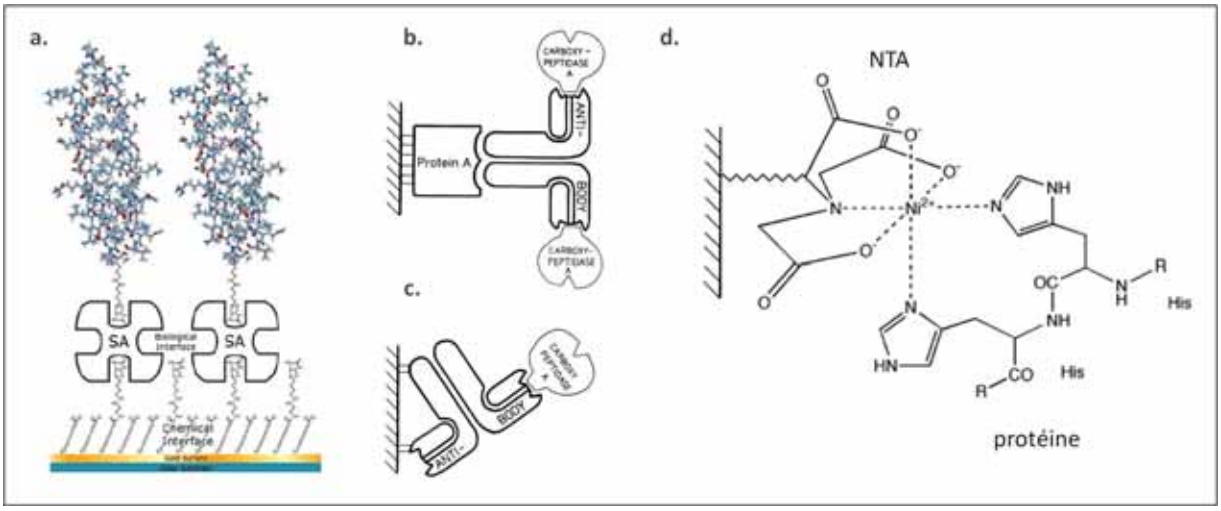


Figure 38 : Détail de quelques méthodes d'immobilisation par liaison d'affinité.
a. Protéines biotinylée sur streptavidine ; **b.** Anticorps sur protéine A ; **c.** Protéine sur anticorps ; **d.** Protéine taguée histidine sur Ni-NTA.

Références relatives à la partie I.3.1 : Immobilisation par physisorption

[156] : K.J. Catt, G.W. Tregear, H.G. Burger, C. Skermer, *Clin. Chim. Acta.*, 1970, **27(2)**, 267-79
[157] : L.A. Gearheart, H.J. Ploehn, et C.J. Murphy, *J. Phys. Chem. B*, 2001, **105**, 12609-12615
[158] : E. Engvall et P. Perlman, *Immunochemistry*, 1971, **8(9)**, 871-4
[159] : F. Caruso, E. Rodda, et D.N. Furlong, *Journal of colloid and interface science*, 1996, **178**, 104–115
[160] : J.E. Butler, P. Navarro, J. Sun, *Immunol Invest.*, 1997, **26(1-2)**, 39-54.
[161] : F. Höök, J. Vörös, M. Rodahl, R. Kurrat, P. Böni, J.J. Ramsden, M. Textor, N.D. Spencer, P. Tengvall, J. Gold, B. Kasemo, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2002, 24, 155-170

[162] : L. Scopsi, B.-L. Wang, L.-I. Larsson, *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 1986, **34 (11)**, 1469-1475

[163] : M. Schena, D. Shalon, R.W. David, P.O. Brown, *Science*, 1995, **270**, 467-470
[164] : B.B. Haab, M.J. Dunham, P.O. Brown, *Genome Biolog*, 2001, **2 (2)**

[165] : W. Hong, L. Jiong, L. Heping, L. Quanjun, M. Qian, W. Yijin, Z. Jijun, H. Nongyue, L. Zuhong, *Nucleic Acids Research*, 2002, **30 (12)**, 1228-1229
[166] : V. Afanassiev, V. Hanemann et S. Wölfl, *Nucleic Acids Research*, 2000, **28 (12)**, e66
[167] : C. Aaij et P. Borst, *Biochim. Biophys. Acta*, 1972, **269**, 192-200
[168] : D. H. Flint, R.E. Harrington, *Biochemistry*, 1972, **11 (25)**, 4858-64
[169] : C.-B. Laurell, *Analytical Biochemistry*, 1966, **15 (1)**, 45-52

[170] : K.R. Khrapko, Y.P. Lysov, A.A. Khorlin, I.B. Ivanov, G.M. Yershov, S.K. Vasilenko, V.L. Florentiev, A.D. Mirzabekov, *DNA Sequencing*, 1991, **1**, 375-388
[171] : G. Yershov, V. Barsky, A. Belgovskiy, E. Kirillov, E. Kreindlin, I. Ivanov, S. Parinov, D. Guschin, A. Drobishev, S. Dubiley, et A. Mirzabekov, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, **93**, 4913-4918,
[172] : D. Guschin, G. Yershov, A. Zaslavsky, A. Gemmell, V. Shick, D. Proudnikov, P. Arenkov et A. Mirzabekov, *Analytical Biochemistry*,1997, **250**, 203-211
[173] : M.J. Dunn et A.H.M. Burghes, *Trends in Analytical Chemistry*, 1983, **2 (9)**, 211-214
[174] : P. Arenkov, A. Kukhtin, A. Gemmell, S. Voloshchuk, V. Chupeeva, et A. Mirzabekov, *Analytical Biochemistry*, 2000, **278**, 123-131
[175] : A.Y. Rubina, E.I. Dementieva, A.A. Stomakhin, E.L. Darii, S.V. Pan'kov,V.E. Barsky, S.M. Ivanov, E.V. Konovalova, et A.D. Mirzabekov, *BioTechniques*, 2003, **34**, 1008-1022
[176] : A.V. Vasiliskov, E.N. Timofeev, S.A. Surzhikov, A.L.Drobyshev, V.V. Shick, et A.D. Mirzabekov, *BioTechniques*, 1999, **27**, 592-606

[177] : B. Johnsson, S. Löfas et G. Lindquist, Analytical Biochemistry, 1991, 198 (2), 268-277
[178] : B. Johnsson, S. Löfas, G. Lindquist, A. Edström, R.M. Müller Hillgren, A. Hansson, J. Mol. Recognit., 1995, 8 (1-2), 125-31
[179] : D.G. Myszka, Analytical Biochemistry, 2004, 329 (2), 316-323
[180] : S. Howell, M. Kenmore, M. Kirkland et R.A. Badley, Journal of Molecular Recognition, 1998, 11, 200–203
[181] : D.G. Myszka, T.A. Morton, M.L. Doyle, I.M. Chaiken, Biophys. Chem., 1997, 64 (1-3), 127-37

[182] : J. Livage, T.Coradin et C. Roux, *J. Phys.: Condens. Matter*, 2001, **13**, 673-69
[183] : G.L.G. Goring et J.D. Brennan, *J. Mater. Chem.*, 2002, **12**, 3400-340
[184] : J. Li, T. Peng, *Y. Pengc, Electroanalysis*, 2003, **15 (12)**, 1031-1037

[185] : B.A. Stillman, J.L. Tonkinson, *Biotechniques*, 2000, **29 (3)**, 630-635.
[186] : T.O. Joos, M. Schrenk, P. Höpfl, K. Kröger, U. Chowdhury, D. Stoll, D. Schörner, M. Dürr, K. Herick, S. Rupp, K. Sohn, H. Hämmerle, *Electrophoresis*, 2000, **21 (13)**, 2641-2650
[187] : H. Ge, *Nucleic Acids Research*, 2000, 28 (2), e3
[188] : T. Kukar, S. Eckenrode, Y. Gu, W. Lian, M. Megginson, J.-X. She, et D. Wu, *Analytical Biochemistry*, 2002, **306**, 50-54

Références relatives à la partie I.3.2 : Immobilisation par liaison covalente

[189] : J. Wang, L. M. Frostman, et M.D. Ward, *J. Phys. Chem.*, 1992, **96**, 5224-5228

[190] : L. Bertilsson et B. Liedberg, *Langmuir*, 1993, **9**, 141-149
[191] : M.M. Biener, J. Biener et C.M. Friend, *Langmuir*, 2005, **21**, 1668-1671
[192] : P. Silberzan, L. Léger, D. Ausserré, J.J. Benattar, *Langmuir*, 1991, **7**, 1647-1651

[193] : T. Strother, W. Cai, X. Zhao, R.J. Hamers, et L.M. Smith, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, **122**, 1205-1209
[194] : Q. Xu et K.S. Lam, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2003, **5**, 257-266
[195] : M.C. Pirrung, J.D. Davis, et A.L. Odenbaugh, *Langmuir*, 2000, **16**, 2185-2191
[196] : X. Zhao, S. Nampalli, A. J. Serino et S. Kumar, *Nucleic Acids Research*, 2001, **29 (4)**, 955-959

[197] : E. Southern, K. Mir, M. Shchepinov, *Nat. Genet.*, 1999, **21 (1 Suppl)**, 5-9.
[198] : Y. Mori, S. Nagaoka, H. Takiuchi, T. Kikuchi, N. Noguchi, H. Tanzawa, Y. Noishiki, *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs.*, 1982, **28**, 459-63.

[199] : S. Zalipsky, Bioconjugate Chem., 1995, **6**, 150-165
[200] : J. Piehler, A. Brecht, R. Valiokas, B. Liedberg, G. Gauglitz, *Biosensors & Bioelectronics*, 2000, **15**, 473-481
[201] : A. Ebner, F. Kienberger, C.M. Stroh, H.J. Gruber, P. Hinterdorfer , *Microscopy Research and Technique Volume*, 2001, **65 (4-5)**, 246-251
[202] : K. Holmberg, K. Bergström, M.-B. Stark, 1992. In : Harris, J.M. (Ed.), Poly(ethylene glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications. Plenum Press, New York
[203] : I.N. Topchieva, E.M. Sorokina, N.V. Efremova, A.L. Ksenofontov, et B.I. Kurganov, *Bioconjugate Chem.*, 2000, **11**, 22-29
[204] : N.-P. Huang, R. Michel, J. Voros, M. Textor, R. Hofer, A. Rossi, D.L. Elbert, J.A. Hubbell, et N.D. Spencer, *Langmuir*, 2001, **17**, 489-498.
[205] : R. Michel, S. Pasche, M. Textor, et D.G. Castner, *Langmuir*, 2005, **21 (26)**, 12327-12332

[206] : M. Beier et J.D. Hoheisel, *Nucleic Acids Research*, 1999, **27 (9)**, 1970-1977,
[207] : R. Benters, C.M. Niemeyer, et D. Wöhrle, *Chem. Biochem.*, 2001, **2**, 686-694
[208] : E. Trévisiol, V. Le Berre-Anton, J. Leclaire, G. Pratviel, A.-M. Caminade, J.-P. Majoral, J.M. François et B. Meunier, *New J. Chem.*, 2003, **27**, 1713-1719
[209] : V. Le Berre, E. Trévisiol, A. Dagkessamanskaia, S. Sokol, A.-M. Caminade, J.-P. Majoral, B. Meunier, J. Francois, *Nucleic Acids Research*, 2003, **31(16)**, e88

[210] : T. Livache, A. Roget, E. Dejean, C. Barthet, G. Bidan et R. Teoule, *Nucleic Acids Research*, 1994, 22, **15**, 2915-2921
[211] : M. Delamar, R. Hitmi, J. Pinson, J.-M. Savéant, *J. Am. Chem. Soc.*,1992, **114**, 5883-5884.
[212] : J.C. Harper, R. Polsky, D. R. Wheeler, S. M. Dirk, et S. M. Brozik, *Langmuir*, 2007, **23 (16)**, 8285-8287

Références relatives au tableau récapitulatif de la figure 33

[Bertilson1993] = [190]
[Caruso1997] : F. Caruso, E. Rodda, D.N. Furlong, V. Haring, *Sensors and Actuators B*, 1997, **41**, 189-197
[Silin1997] : V. Silin, H. Weetall et D.J. Vanderah, *Journal of Colloid and Interface Science*, 1997, **185**, 94–103
[Wang1992] = [189]
[Frutos1998] : A.G. Frutos, L.M. Smith, et R.M. Corn, J. Am. Chem. Soc., 1998, 120 (40), 10277-10282
[Jordan1997] : C.E. Jordan, A.G. Frutos, A.J. Thiel, et R.M. Corn, *Anal. Chem.*, 1997, **69**, 4939-4947
[Strother2000] : T. Strother, W. Cai, X. Zhao, R.J. Hamers, et L.M. Smith, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, **122**, 1205-1209
[Caruso1997] : F. Caruso, E. Rodda, et D.N. Furlong, *Anal. Chem.*, 1997, **69**, 2043-2049
[Choi2005] : S.H. Choi, J.W. Lee, S.J. Sim, *Biosensors and Bioelectronics*, 2005, **21**, 378-383
[Lahiri1999] : J. Lahiri, L. Isaacs, J. Tien, et G.M. Whitesides, *Anal. Chem.*, 1999, **71**, 777-790
[Ostuni1999] : E. Ostuni, L. Yan, G.M. Whiteside, *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, 1999, **15**, 3-30

[Silberzan1991] : P. Silberzan, L. Léger, D. Ausserré, J.J. Benattar, *Langmuir*, 1991, **7**, 1647-1651
[Halliwell2001] : C.M. Halliwell et A.E.G. Cass, *Anal. Chem.*, 2001, **73**, 2476-2483
[Rogers1999] : Y.-H. Rogers, P. Jiang-Baucom, Z.-J. Huang, V. Bogdanov, S. Anderson, et M.T. Boyce-Jacino1, *Analytical Biochemistry*, 1999, **266**, 23-30
[MacBeath2000] : G. MacBeath et S.L. Schreiber, *Science*, 2000, **289**, 1760-1763
[Raddatz2002] : S. Raddatz, J. Mueller-Ibeler, J. Kluge, L. Wäss, G. Burdinski, J.R. Havens, T.J. Onofrey, D. Wang, M. Schweitzer, *Nucleic Acids Research*, 2002, **30 (21)**, 4793-4802
[Zammateo2000] : N. Zammatteo, L. Jeanmart, S. Hamels, S. Courtois, P. Louette, L. Hevesi, et J. Remacle, *Analytical Biochemistry*, 2000, **280**, 143-150
[Trévisiol2003] : E. Trévisiol, V. Le Berre-Anton, J. Leclaire, G. Pratviel, A.-M. Caminade, J.-P. Majoral, J.M. François et B. Meunier, *New J. Chem.*, 2003, **27**, 1713-1719
[Dugas2004] : V. Dugas, G. Depret, Y. Chevalier, X. Nesmeb, É. Souteyrand, *Sensors and Actuators B*, 2004, **101**, 112-121
[Lesaicherre2002] : M.-L. Lesaicherre, M. Uttamchandani, G.Y.J. Chena, et S.Q. Yaoa, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2002, **12**, 2079-2083
[Vandenberg1991] : E.T. Vandenberg, L. Bertilsson, B. Liedberg, K. Udval, R. Erlandsson, H. Elwing, I. Lundström, *Journal of colloid and interface science*, 1991, **147 (1)**, 103-118
[MacBeath1999] : G. MacBeath, A.N. Koehler, et S.L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, **121**, 7967-7968
[Kusnezow2003] : W. Kusnezow, A. Jacob, A. Walijew, F. Diehl, J.D. Hoheisel, *Proteomics*, 2003, **3**, 254-264
[Falsey2001] : J.R. Falsey, M. Renil, S. Park, S. Li, et K.S. Lam, *Bioconjugate Chem.*, 2001, **12**, 346-353
[Tsukruk1999] : V.V. Tsukruk, I. Luzinov, et D. Julthongpiput, *Langmuir*, 1999, **15**, 3029-3032
[Belosludtsev2001] : Y. Belosludtsev, B. Iverson, S. Lemeshko, R. Eggers, R. Wiese, S. Lee, T. Powdrill et M. Hogan, *Analytical Biochemistry*, 2001, **292 (2)**, 250-256

[Zhu2000] : H. Zhu, J.F. Klemic, S. Chang, P. Bertone, A. Casamayor, K.G. Klemic, D. Smith, M. Gerstein, M.A. Reed, M. Snyder, *Nature Genetics*, 2000, **26**, 283-289
[Taylor] : S. Taylor, S. Smith, B. Windle et A. Guiseppi-Elie, *Nucleic Acids Research*, 2003, **31(16)**, e87
[Charles2003] : P.T. Charles, G.J. Vora, J.D. Andreadis, A.J. Fortney, C.E. Meador, C.S. Dulcey, et D.A. Stenger, *Langmuir*, 2003, **19**, 1586-1591
[Pirrung2000] : M.C. Pirrung, J.D. Davis, et A.L. Odenbaugh, *Langmuir*, 2000, **16**, 2185-2191
[Zhao2001] : X. Zhao, S. Nampalli, A. J. Serino et S. Kumar, *Nucleic Acids Research*, 2001, **29 (4)**, 955-959

[Strother2000] : T. Strother, W. Cai, X. Zhao, R.J. Hamers, et L.M. Smith, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, **122**, 1205-1209
[Strother2000NucAcRes] : T. Strother, R.J. Hamers et L.M. Smith, *Nucleic Acids Research*, 2000, **28 (18)**, 3535-3541

Références relatives à la partie I.3.3 : Immobilisation par liaison d'affinité

[213] : V.H. Pérez-Luna, M. J. O'Brien, K.A. Opperman, P.D. Hampton, G.P. Lopez, L.A. Klumb, et P.S. Stayton, J. Am. Chem. Soc., 1999, 121, 6469-6478
[214] : P. Pavlickova, N. Mejlhede Jensen, H. Paul, M. Schaeferling, C. Giammasi, M. Kruschina, W.-D. Du, M. Theisen, M. Ibba, F. Ortigao, et D. Kambhampati, *Journal of Proteome Research*, 2002, **1**, 227-231
[215] : L.S. Jung, K.E. Nelson, P.S. Stayton et C.T. Campbell, *Langmuir*, 2000, **16**, 9421-9432
[216] : L.M. Bonanno et L.A. DeLouise, *Langmuir*, 2007, **23**, 5817-5823
[217] : N.-P. Huang, J. Vörös, S.M. De Paul, M. Textor et N.D. Spencer, *Langmuir*, 2002, **18**, 220-230
[218] : C.A. Rowe, L.M. Tender, M.J. Feldstein, J.P. Golden, S.B. Scruggs, B.D. MacCraith, J.J. Cras, et F.S. Ligler, *Anal. Chem.*, 1999, **71**, 3846-3852

[219] : S. Werner et W. Machleidt, *Eur. J. Biochem.*, 1978, **90**, 99-105
[220] : D.M. Gersten, J.J. Marchalonis, *J. Immunol. Methods*, 1978, **24**, 305-309.
[221] : J. Langone, *J. Immunol. Methods*, 1982, **55**, 277
[222] : F. Caruso, E. Rodda et D. N. Furlong, *Journal of Colloid and Interface Science*, 1996, **178**, 104-115
[223] : S. Kanno, Y. Yanagida, T. Haruyama, E. Kobatake, M. Aizawa, *Journal of Biotechnology*, 2000, **76**, 207-214

[224] : Jaroslava Turkova, *Journal of Chromatography B*, 1999, **722**,11-31

[225] : J. Turková, L. Petkov, J. Sajdok, J. Kás, M.J. Benes, *J. Chromatogr.*, 1990, **2 (500)**, 585-93.

[226] : L.V. Pyrohova, M.F. Starodub, *Ukr Biokhim Zh.*, 2002, **74(2)**, 45-50.
[227] : J.F. Hainfeld, W. Liu, C.M.R. Halsey, P. Freimuth et R.D. Powel, *Journal of Structural Biology*, 1999, **127 (2)**, 185-198
[228] : H. Zhu, M. Bilgin, R. Bangham, D. Hall, A. Casamayor, P. Bertone, N. Lan, R. Jansen, S. Bidlingmaier, T. Houfek, T. Mitchell, P. Miller, R.A. Dean, M. Gerstein, M. Snyder, *Science*, 2001, **293**, 2101-2105
[229] : M. Kurz, K. Gu, A. Al-Gawari, et P. A. Lohse, *ChemBioChem*, 2001, **2 (9)**, 666-672
[230] : S. Weng, K. Gu, P.W. Hammond, P. Lohse, C. Rise, R.W. Wagner, M.C. Wright, R.G. Kuimelis, *Proteomics*, 2002, **2**, 48-57

Références bibliographiques citées dans la figure 5 : exemples de biocapteurs miniatures

[Fritz2000] : J. Fritz, M.K. Baller, H. P. Lang, H. Rothuizen, P. Vettiger, E. Meyer, H.-J. Güntherodt, Ch. Gerber, J.K. Gimzewski, *Science*, 2000, **288 (5464)**, 316-318
[Wu] : G. Wu, R.H. Datar, K.M. Hansen, T. Thundat, R.J. Cote, et A. Majumdar, *Nature Biotechnology*, 2001, **(19)**, 856-860
[McKendry2002] : R. McKendry, J. Zhang, Y. Arntz, T. Strunz, M. Hegner, H.P. Lang, M.K. Baller, U. Certa, E. Meyer, H.-J. Güntherodt, et C. Gerber, *PNAS*, 2002, **99 (15)**, 9783-9788
[Campbell2007] : G.A. Campbell, D. de Lesdernier, R. Mutharasan, *Sensors and Actuators B*, 2007, **127**, 376-382
[Nicu2005] : L. Nicu, M. Guirardel, F. Chambosse, P. Rougerie, S. Hinh, E. Trévisiol, J.-M. Francois, J.-P. Majoral, A.-M.Caminade, E. Cattan, C. Bergaud, *Sensors and Actuators B*, 2005, **110**, 125-136
[Ayela2007] : C. Ayela, F. Vandevelde, D. Lagrange, K. Haupt, L. Nicu, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2007, **46(48)**, 9271-4
[Rabe2003] : J. Rabe, S. Büttgenbach, J. Schröder, et P. Hauptmann, IEEE Sensors Journal, 2003, 3 (4), 361-368
[Seo2007] : J.H. Seo , L. Betancor, K.S. Demirci , A. Byun, J. Spain, O. Brand, *Proceedings of 14th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators, and Microsystems conference (Transducers 07)*, 2007, **1737**
[Stubbs2002] : D.D. Stubbs, W.D. Hunt, S.H. Lee, D.F. Doyle, *Biosensors and Bioelectronics*, 2002, **17**, 471-477
[Park2002] : S.-J. Park, T.A. Taton, C.A. Mirkin, *Science*, 2002, **295**, 1503
[Dummond2003] : T.G. Dummond, M.G. Hill, J.K. Barton, Nat. Biotechnol., 2003, 21, 1192-1199
[Reddy2008] : R.K. Reddy, M.G. Bothara, T.W. Barrett, J. Carruthers, et S. Prasad, *IEEE Sensors Journal*, 2008, **8 (6)**
[Li 2008] : S. Li, S. Szegedi, E. Goluch, et C. Liu, *Anal. Chem.*, 2008, **80**, 5899-5904

[Ward2002] : W.K. Ward, L.B. Jansen, E. Anderson, G. Reach, J.-C. Klein, G.S. Wilson, *Biosensors & Bioelectronics*, 2002, **17**, 181-189
[Umek2002] : R.M. Umek, S.W. Lin, J. Vielmetter, R.H. Terbrueggen, B. Irvine, C.J. Yu, J.F. Kayyem, H. Yowanto, G.F. Blackburn, D.H. Farkas et Y.-P. Chen, *Biosensors & Bioelectronics*, 2002, **17**, 181-189
[Fritz2002] : J. Fritz, E.B. Cooper, S. Gaudet, P.K. Sorger, et S.R. Manalis, *PNAS*, 2002, **99 (22)**, 14142-14146
[Cui2001] : Y. Cui, Q. Wei, H. Park, C.M. Lieber, *Science*, 2001, **293 (5533)**, 1289-1292
[Chen2004] : R.J. Chen, H.C. Choi, S. Bangsaruntip, E.Yenilmez, X. Tang, Q. Wang, Y.-L. Chang, et H. Dai, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 1563-1568
[Vo-Dinh1999] : T. Vo-Dinh, J.P. Alarie, N. Isola, D. Landis, A.L. Wintenberg, and M.N. Ericson, *Anal. Chem.*, 1999, **71**, 358-363
[Chediak 2004] : J.A. Chediak, Z. Luoa, J. Seob, N. Cheungc, L.P. Leed et T.D. Sands, *Sensors and Actuators A*, 2004, **111**, 1-7
[Bruckbauer2004] : A. Bruckbauer, D. Zhou, D.-J. Kang, Y.E. Korchev, C. Abell, et D. Klenerman, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 6508-6509
[Ghatnekar2007] : S. Ghatnekar-Nilsson, L. Dexlin, C. Wingren, L. Montelius et C.A.K. Borrebaeck, *Proteomics*, 2007, **7**, 540-547
[Stokes] : D.L. Stokes, T. Vo-Dinh, *Sensors and Actuators B*, 2000, **69**, 28-36.
[Yan2007] : F. Yan et T. Vo-Dinh, *Sensors and Actuators B*, 2007, **121**, 61-66
[Cau2008] : J.-C. Cau, H. Lalo, J.-P. Peyrade, C. Vieu, C. Séverac, " Procédé de recherche d'au moins un analyte dans un milieu susceptible de le contenir", brevet ref 15788FR, 2008

Chapitre II

Chapitre II : Adressage de biomolécules sur des surfaces actives : comment réduire les quantités nécessaires ?

Les échantillons biologiques utilisés pour des analyses biologiques sur biopuces ou sur biocapteurs sont souvent disponibles en très petites quantités. Il convient donc d'imaginer des méthodes permettant d'adresser des quantités réduites de ces échantillons précieux sur les supports d'analyse, qu'il s'agisse des biomolécules immobilisées ou des extraits à analyser.

II.1. Bioplume : des spots 10 fois plus petits

Le robot Bioplume présenté au paragraphe I.2.1.a. permet de réaliser des dépôts de liquides sous la forme de spots de 10 à 20µm de diamètre. Or les spots obtenus par les robots de dépôts commerciaux utilisés classiquement pour la production de puces à ADN ou à protéines ont des diamètres de l'ordre de 100 à 300µm [1] [2]. Le dépôt à l'aide de Bioplume permet donc de gagner un facteur 10 en taille, ce qui signifie réduire 1000 fois les volumes d'échantillons biologiques. Développer les applications biologiques de cet outil paraît donc particulièrement intéressant.

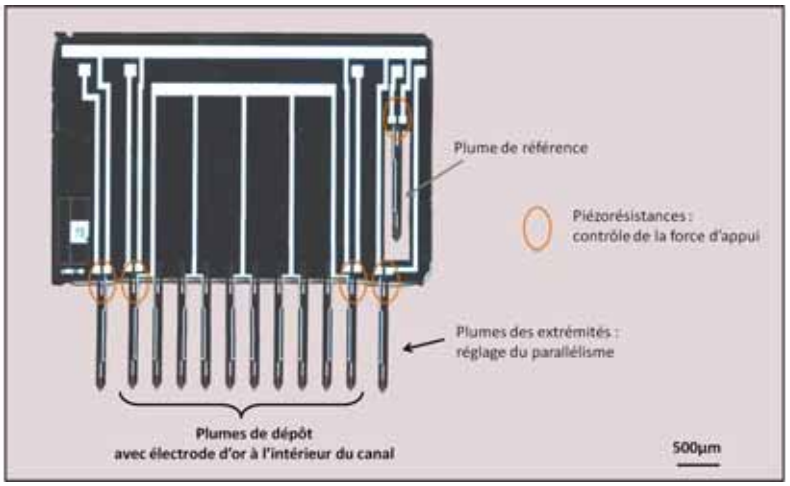


Figure 1 : Vue des microleviers (ou plumes) utilisés pour le dépôt par contact à l'aide du robot Bioplume (rappel du paragraphe I.2.1.a).

II.1.1. Utilisation du robot Bioplume pour des dépôts de molécules biologiques

Les premiers tests de dépôt de molécules biologiques à l'aide de Bioplume ont été réalisés en collaboration avec la Plateforme Biopuces de Toulouse [3], puis par Thierry Leïchlé et Emeline Descamps au LAAS-CNRS [4]. Des spots d'ADN de 10µm de diamètre ont été obtenus sur surface d'or et l'interaction avec l'ADN complémentaire a permis une détection en fluorescence. Des spots d'anticorps ont également été réalisés et visualisés grâce à l'interaction avec l'anticorps complémentaire marqué avec le fluorophore FITC.

[1] : www.arrayit.com
[2] : www.biorad.com

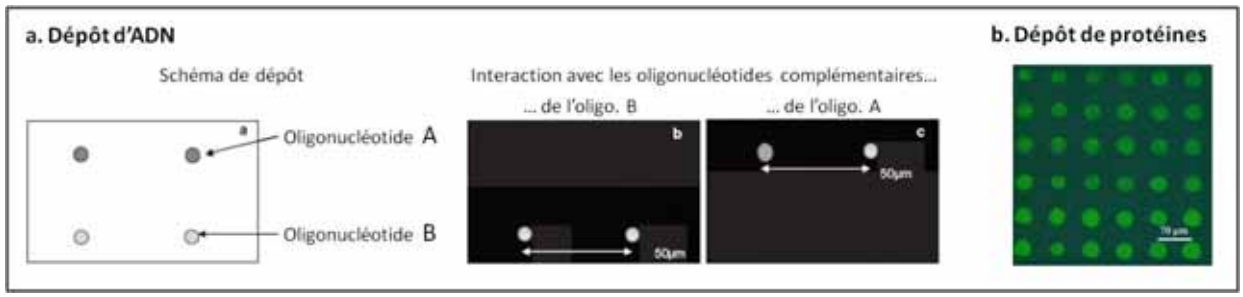


Figure 2 : Tests préliminaires de dépôt d'ADN et de protéines à l'aide de Bioplume
a. Dépôt d'oligonuclétides et visualisation par hybridation avec les oligonucléotides complémentaires [4]
b. Interaction anticorps/anticorps visualisée à l'aide du fluorophore FITC [3]

Ces résultats très encourageants ont permis d'envisager de réaliser des tests de type biopuces en déposant, à l'aide de Bioplume, des oligonucléotides ou des protéines sur des lames de verre pré-fonctionnalisées.

Le protocole choisi pour cette expérience préliminaire a été mis au point à la Plateforme Biopuces de Toulouse et il compte parmi ceux utilisés classiquement pour la production de biopuces. Des oligonucléotides synthétiques de petite taille ont été utilisés : l'un deux, noté 35mer-NH_2 porte une fonction amine permettant l'immobilisation sur dendrimères aldéhydes ; l'autre, noté 15mer-Cy5 est son complémentaire marqué en fluorescence. Les étapes décrites ci-après sont illustrées sur la figure 1 du chapitre I.

L'oligonucléotide 35mer-NH_2 est déposé à l'aide de Bioplume sur une dendrilame (cf paragraphe I.3.2.b et figure I.35), et du tampon seul est déposé comme témoin négatif. La lame est ensuite immergée dans une solution de $NaBH_4$ qui stabilise la liaison covalente de l'oligonucléotide aminé sur les fonctions aldéhydes. Après un rinçage à l'eau, les spots sont incubés dans une solution contenant l'oligonucléotide complémentaire 15mer-Cy5. Une série de lavages permet ensuite d'éliminer toute fixation non spécifique du 15mer-Cy5 sur la surface. La figure 2 présente l'image obtenue après lecture de la lame par un scanner équipé de filtres permettant de détecter la fluorescence à 635nm (Cy5) et à 532nm (Cy3).

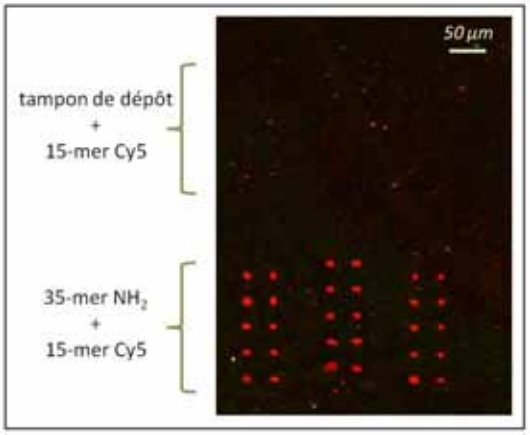


Figure 3 : Hybridation ADN/ADN selon un protocole classique de type biopuce réalisé avec Bioplume.

[3] : P. Belaubre, M. Guirardel, G. Garcia, J.B. Pourciel, V. Leberre, A. Dagkessamanskaia, E. Trévisiol, J.M. François et C. Bergaud, *Applied Physics Letters*, 2003, **82 (18)**, 3122-3124
[4] : E. Descamps, T. Leïchlé, B. Corso, S. Laurent, P. Mailley, L. Nicu, T. Livache, et C. Bergaud, *Advanced Materials*, 2007, **19**, 1816-1821

On observe bien des matrices de spots fluorescents, qui traduisent l'hybridation du 15mer-Cy5 sur les spots de 35mer-NH_2. L'absence de signal dans la zone où a été déposé le témoin négatif confirme qu'il s'agit bien d'une interaction biologique.

Ce résultat montre qu'**il est possible de réaliser un protocole classique de type puce à ADN en utilisant le robot Bioplume**. Cependant, dans cette configuration préliminaire, les 12 plumes d'une barrette déposent la même solution. Afin de pouvoir exploiter le nombre important de plumes pour déposer plusieurs solutions en parallèle, une puce de chargement a été développée.

II.1.2. Parallélisation des dépôts en utilisant une puce fluidique dédiée

Pour charger les douze plumes avec des liquides différents, deux approches sont possibles : soit un système intégré à la barrette de plumes permet d'acheminer les solutions jusqu'au canal de chaque plume, soit les plumes sont trempées dans un système externe. C'est cette seconde solution qui a été choisie car elle évite tout souci de colmatage au niveau des plumes elles-mêmes.

La puce fluidique permettant de charger les plumes avec diverses solutions a été fabriquée au CNM-CSIC à Barcelone [5]. Elle présente dix réservoirs micrométriques dont les dimensions ont été spécialement conçues pour qu'une plume puisse être plongée dans chacun d'eux (200µm de côté, 525µm de profondeur, espacement 120µm ; figure 4b). Ces réservoirs sont alimentés par des micro-canaux depuis trois puits suffisamment grands pour que les solutions puissent y être pipetées. Le remplissage des canaux est assuré par capillarité. La figure 4.d montre que trois liquides différents peuvent bien être ainsi chargés dans les microréservoirs.

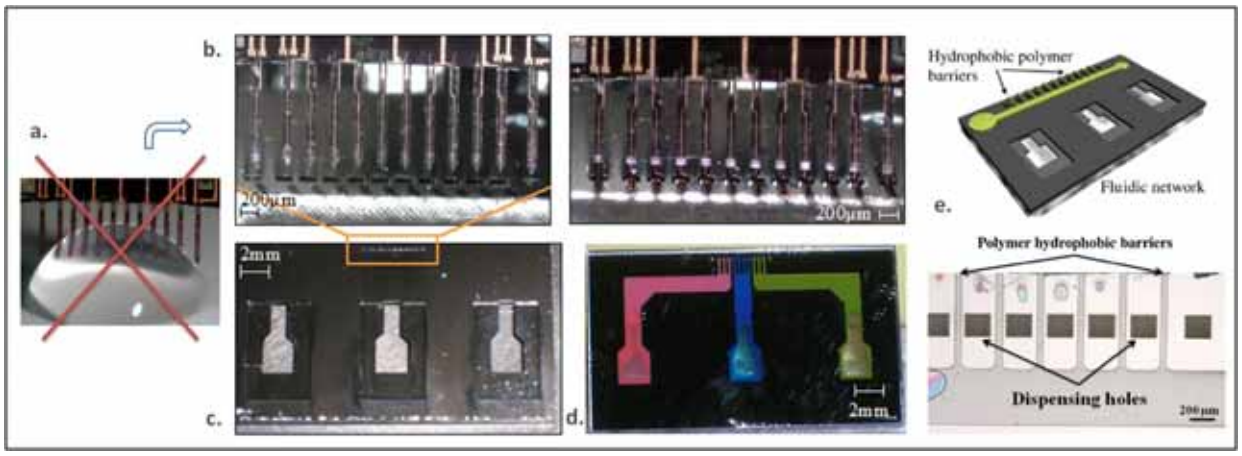


Figure 4 : Puce fluidique permettant de charger les plumes avec trois solutions différentes.
a. Ancien système de chargement par trempage dans une goutte de liquide ; **b.** Trempage des plumes dans les microréservoirs ; **c.** Vue de dessus de la puce fluidique montrant les 3 puits de chargement et les 10 microréservoirs ; **d.** Vue de dessous de la puce montrant les microcanaux remplis de trois encres différentes ; **e.** Barrières hydrophobes.

[5] : C. Martin, A. Llobera, T. Leïchlé, G. Villanueva, A. Voigt, V. Fakhfouri, J.Y. Kim, N. Berthet, J. Bausells, G. Gruetzner, L. Nicu, J. Brugger, F. Perez-Murano, Microelectronic Engineering, 2008, 85, 972-975.

La fabrication de la puce s'appuie sur les techniques classiques de microfabrication : les canaux et réservoirs sont réalisés par gravure ionique de silicium, puis ils sont fermés en fixant une couche de pyrex. Pour éviter tout mélange des solutions par débordement de liquide lors du trempage des plumes, des barrières hydrophobes ont été ajoutées entre les microréservoirs. Ces barrières sont réalisées par moulage du polymère hydrophobe dans un timbre de PDMS [5].

La fonctionnalité de cette puce de chargement a été testée pour des dépôts de solutions fluorescentes dans un premier temps, puis appliquée au dépôt d'ADN et de protéines.

II.1.2.a. Solutions fluorescentes

Pour vérifier qu'il n'y a pas de mélange d'un microréservoir à l'autre, trois solutions contenant des fluorophores différents ont été déposées en parallèle : une solution d'oligonucléotides marqués avec de la cyanine 5 (Cy5 ; fluorophore rouge), une avec de la cyanine 3 (Cy3 ; fluorophore vert), et un mélange à parts égales des deux solutions précédentes. La figure 5a montre les spots obtenus après trempage des plumes dans les microréservoirs contenant les trois solutions décrites ci-dessus, puis dépôt sous forme de matrices de 40 spots (4*10). Chaque matrice correspond aux spots effectués par une seule aiguille. On observe bien, de gauche à droite, 3 matrices vertes, 4 rouges et 3 jaunes ce qui confirme que **le processus de chargement et de dépôt a correctement fonctionné**. Le signal jaune correspond à la superposition des signaux de fluorescence rouge et vert.

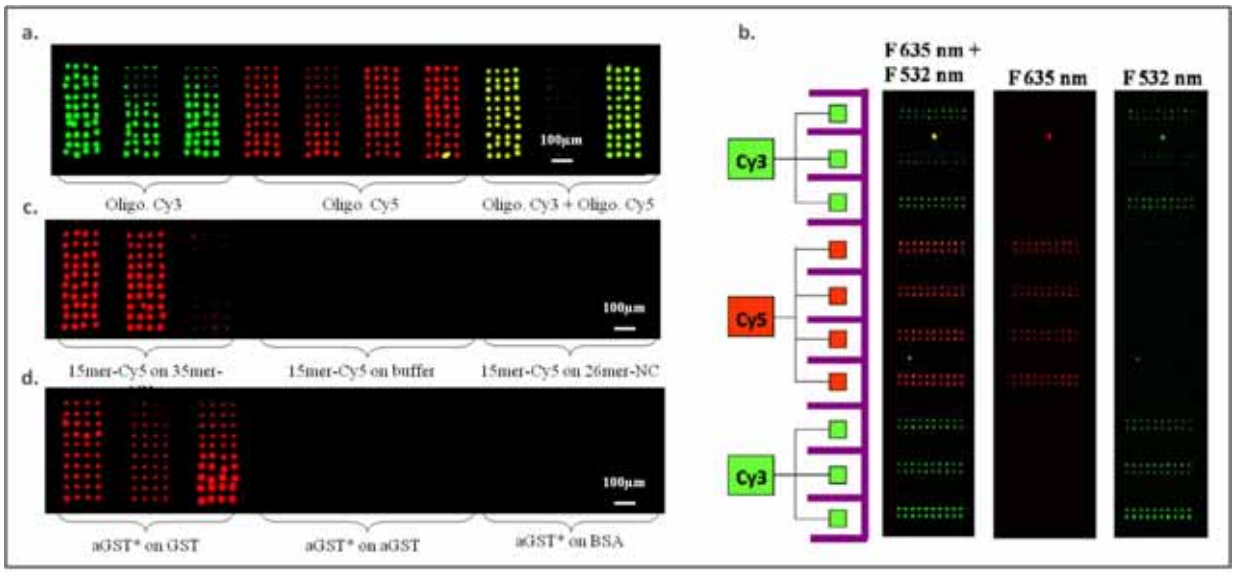


Figure 5 : Validation de la puce fluidique pour le dépôt de solutions fluorescentes, d'oligonucléotides et de protéines.

a. et b. Oligonucléotides marqués avec les fluorophores Cy3 ou Cy5 dans Na_2HPO_4 0,1M pH9, 25% glycérol

c. Oligonucléotide marqué 15mer-Cy5 hybridé sur son complémentaire 35mer-NH_2 déposé en même temps que les contrôles négatifs : oligonucléotide non complémentaire « 26-mer-NC » et tampon seul.

d. Anticorps anti-GST marqué avec de l'AlexaFluor®647 (100µg/mL dans tampon Corning, 25% glycérol) fixé sur la protéine GST déposée en même temps que les contrôles négatifs : BSA et anti-GST non marqués.

Images en fluorescence : scanner Axon à 635nm (rouge) et 532nm (vert) ;PMT600. Dépôts sur dendrilame.

Afin de confirmer l'absence de contamination, une seconde expérience a été réalisée. Cette fois, la solution contenant les oligonucléotides-Cy5 a été chargée dans les 4 microréservoirs centraux et la solution contenant les oligonucléotides-Cy3 dans les 6 microréservoirs latéraux. Aucun signal jaune n'apparaît et la décomposition des signaux rouge et vert confirme qu'il n'y a pas eu de mélange des solutions (figure 5b).

L'étape suivante dans la validation de l'utilisation de la puce fluidique consiste à déposer des biomolécules et à vérifier que ce mode de chargement n'affecte pas leur fonction biologique.

II.1.2.b. Oligonucléotides

Les deux puits latéraux de la puce de chargement sont remplis par deux solutions d'oligonucléotides différents (35mer-NH_2 et 26mer-NC) et la solution de tampon seule est chargée dans le puits central. Après écoulement de ces solutions dans les micro-canaux jusqu'aux microréservoirs, les plumes sont chargées et des matrices de 40 spots sont réalisées sur une lame de verre aldéhyde (dendrilame). La fonction amine ajoutée aux oligonucléotides assure leur immobilisation sur ce support. La liaison covalente est stabilisée par une réduction à l'aide d'une solution de $NaBH_4$. La lame est ensuite incubée dans une solution d'oligonucléotide marqué Cy5 (15mer-Cy5) complémentaire du 35mer-NH_2. Sur la figure 5c, on observe bien un signal de fluorescence pour les trois matrices de gauche, qui confirme l'**hybridation correcte du 15mer-Cy5 sur le 35mer-NH_2**. Dans le même temps, l'absence de signal sur les deux contrôles négatifs confirme une fois de plus qu'il n'y a pas eu de mélange des solutions.

II.1.2.c. Protéines

Dans une dernière expérience, la possibilité d'utiliser la puce fluidique pour le chargement de protéines est testée, avec pour modèles l'albumine de sérum bovin (BSA), la glutathion-S-transférase (GST) et l'anticorps anti-GST. Après chargement, dépôt et immobilisation de ces trois protéines, les spots sont recouverts d'une solution d'anticorps anti-GST marqués en fluorescence. L'apparition du signal fluorescent au niveau des matrices de gauche confirme que **l'interaction anti-GST*/GST a bien eu lieu.** De plus les contrôles négatifs sont corrects (figure 5d).

L'utilisation de la puce fluidique pour le dépôt d'oligonucléotides ou de protéines en vue d'une interaction est donc validée. Il est ainsi possible de déposer trois solutions différentes simultanément à l'aide de Bioplume. En utilisant les mêmes techniques de fabrication, il serait possible de réaliser une puce fluidique permettant de charger chaque levier avec une solution différente, ce qui correspondrait à dix dépôts différents en parallèle (on ne compte pas les plumes extérieures servant à l'alignement). Cependant, il est intéressant de réaliser plusieurs spots de la même biomolécule avec des plumes différentes pour pouvoir tenir compte de la variabilité de géométrie des plumes lors de l'analyse des résultats.

II.2. De la chambre d'hybridation à l'interaction « spot-dans-spot »

Comme vu précédemment, il est possible, en utilisant le robot Bioplume, d'adresser les biomolécules « sondes » sur la surface sous la forme de spots de 10µm, soit dix fois plus petits qu'avec les robots classiques. La quantité de molécules à immobiliser (sondes) est ainsi divisée mille fois. Pour aller plus loin vers l'économie de matériel biologique, il serait intéressant de réduire aussi la quantité de biomolécules nécessaires pour l'interaction (cibles). Diverses configurations permettant de réduire le volume de liquide utilisé pour l'interaction biologique ont été testées. Elles sont présentées sur la figure 6 et détaillées dans les paragraphes suivants. Afin de mettre au point ces méthodes d'interaction en volumes réduits, l'hybridation ADN/ADN a été choisie, pour sa robustesse et la disponibilité de protocoles bien établis. L'application à des interactions protéine/protéine a été réalisée dans un deuxième temps.

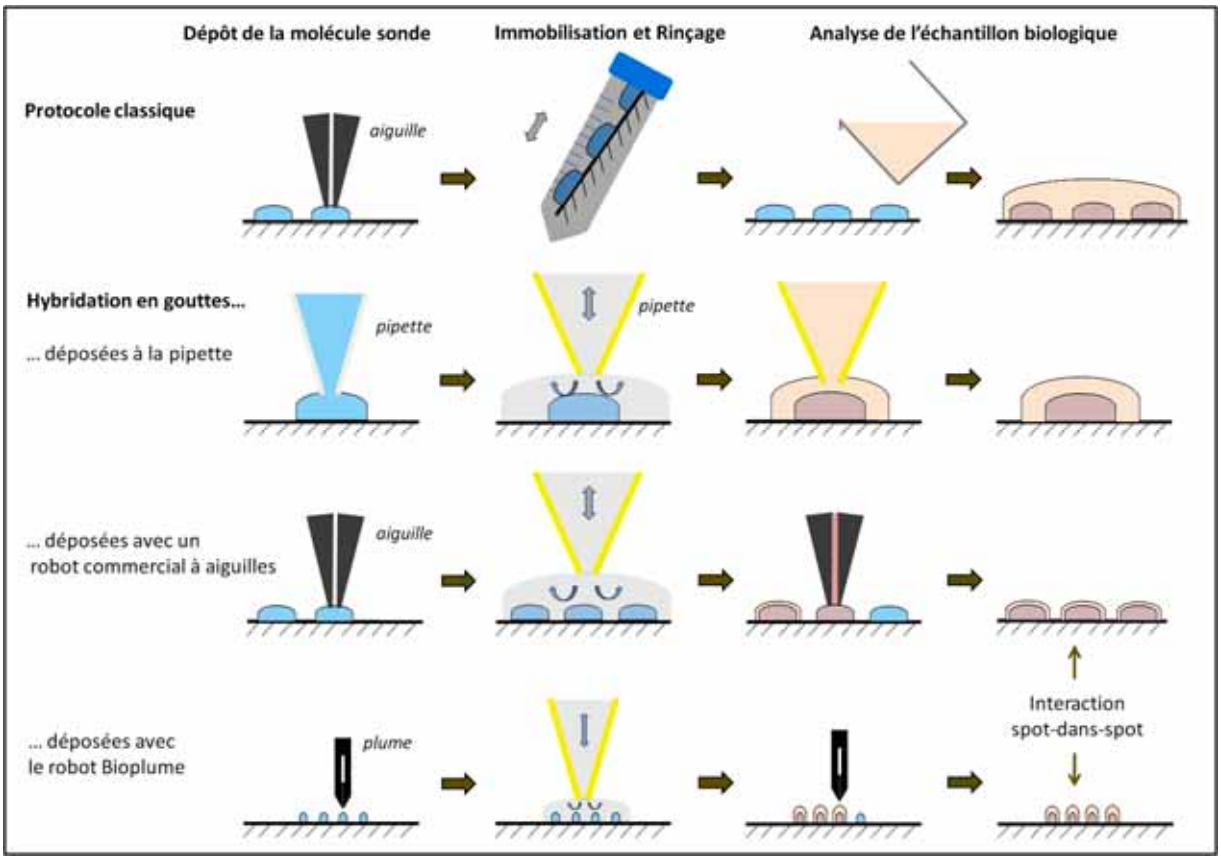


Figure 6 : Représentation schématique des diverses configurations testées pour réduire le volume nécessaire à l'interaction biologique (ADN/ADN ou protéine/protéine).

II.2.1. Hybridation classique en chambre d'hybridation

Dans le protocole utilisé classiquement pour tous les tests sur biopuces, la lame de verre est entièrement recouverte d'une solution contenant l'échantillon à analyser. Le volume de cet échantillon varie de 100µL à 2mL selon les chambres d'hybridation utilisées. Les chambres d'hybridation les plus simples sont des boîtes hermétiques, qui peuvent être immergées dans un bain-marie afin de contrôler la température d'hybridation. Dans ce cas, une lamelle de plastique est placée sur la lame de verre pour retenir le liquide. Il existe aussi des systèmes automatisés où la lame est déposée sur des supports chauffants et où une circulation permanente du liquide sur la lame est assurée, par exemple par un flux d'air [6] [7].

Pour réduire les quantités d'échantillons biologiques, l'idée de réaliser les interactions dans des gouttes, déposées à la pipette dans un premier temps, puis en utilisant un robot de dépôt, a été testée.

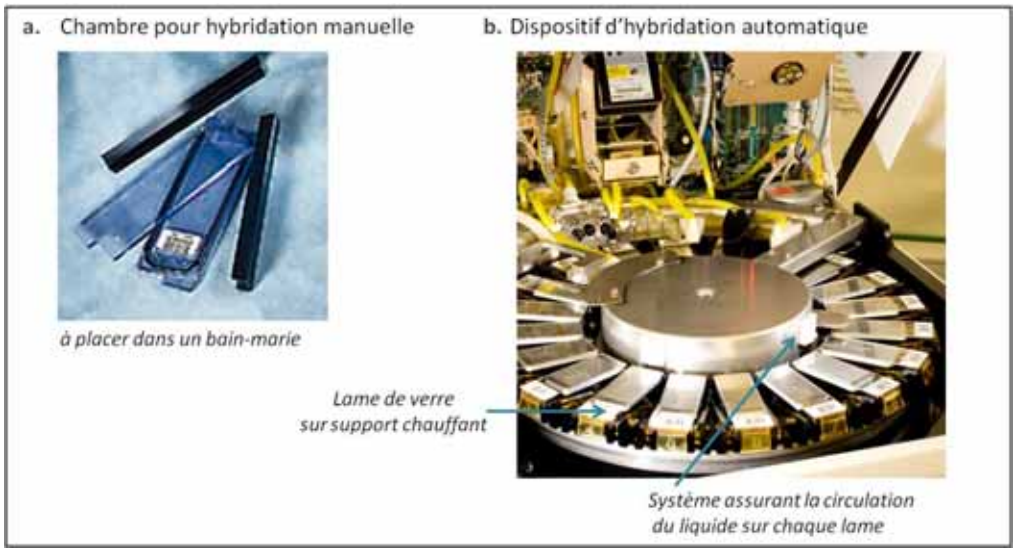


Figure 7 : Deux exemples de chambres d'hybridation utilisées pour la production de biopuces.

II.2.2. Mise au point de l'hybridation en gouttes

Les premiers tests d'hybridation en gouttes ont été réalisés sur des lames commerciales fonctionnalisées avec des époxydes, reconnues dans le domaine des puces à ADN.

II.2.2.a. Gouttes déposées à la pipette sur spots de 0,2µL.

Des gouttes d'oligonucléotides 35mer-NH_2 ont été déposées sur une lame de verre époxyde à l'aide d'une micropipette « 0,2-2µL ». Pour cela, un volume de 0,2µL de solution est prélevé, puis le cône de la pipette est mis en contact avec la surface où une goutte est déposée. L'auto-fluorescence du tampon permet d'observer la correcte réalisation de ces spots (figure 8a).

[6] : www.ventanamed.com
[7] : www.arrayit.com

Après immobilisation, une goutte de 5µL de solution de lavage et de saturation a été déposée sur chaque spot, ce qui correspond à la zone sombre observée figure 8b. Enfin l'oligonucléotide complémentaire 15mer-Cy5 marqué en fluorescence a été déposé sous la forme de deux gouttes suffisamment grandes pour recouvrir 6 spots. Tous les lavages ont été réalisés en changeant la solution à la pipette et en faisant circuler le liquide par aspiration/refoulement. La figure 8c montre qu'un signal de fluorescence a bien été obtenu pour les 4 spots de 35mer-NH_2 et non pour les 2 spots de tampon seul (témoin négatif), ce qui confirme à la fois que l'hybridation a eu lieu et que les lavages en gouttes ont été efficaces. D'autre part, la présence de la zone sombre autour des spots confirme que le blocage à l'éthanolamine a bien évité l'adsorption non spécifique du 15mer-Cy5.

L'hybridation mais aussi toutes les étapes de blocage et de lavages peuvent donc être réalisées dans des gouttes déposées à la pipette plutôt que par immersion. Ce résultat permet donc d'envisager un test similaire sur des spots réalisés par un robot de dépôt.

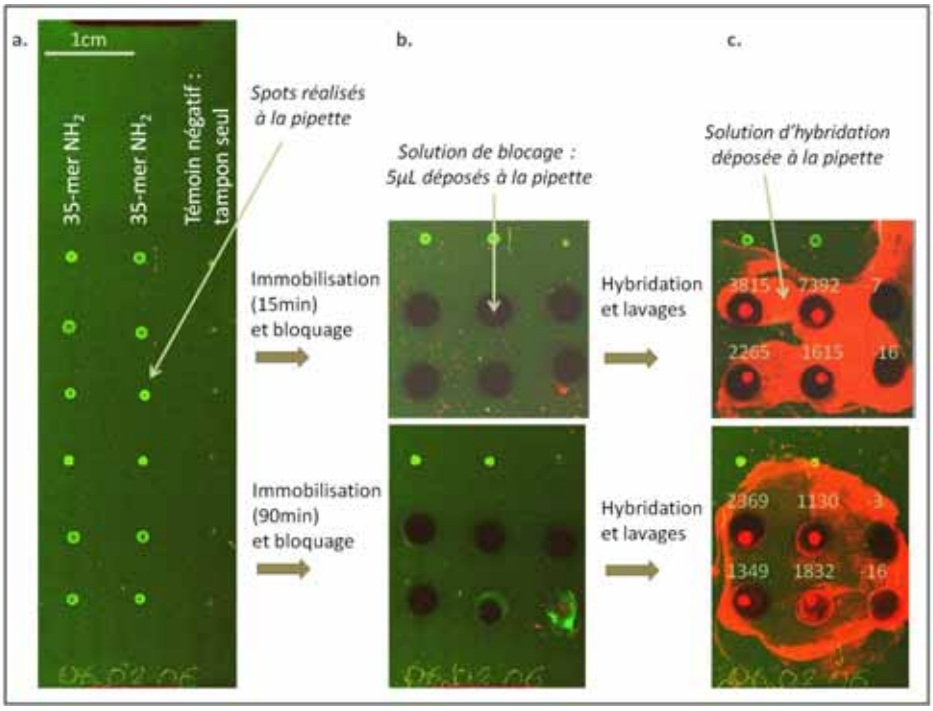


Figure 8 : Hybridation en gouttes sur spots réalisés à la pipette.

a. Oligonucléotide 35mer-NH_2 à 50µM dans Na_2HPO_4 0,1M pH9 sur lame époxyde. Témoin négatif : tampon seul. Immobilisation 15min (haut) ou 90min (bas).

b. Solution de saturation : éthanolamine 200mM dans Na_2HPO_4 0,1M pH9 ; puis lavage à l'eau milliQ.

c. Hybridation avec l'oligonucléotide complémentaire 15mer-Cy5 à 100nM dans le tampon SSC 3X, 0,3% SDS. Lavages : SSC 1X, 0,1% SDS, puis SSC 0,1X, puis eau milli Q. Séchage à l'air comprimé.

Images en fluorescence : scanner Axon à 635nm (rouge) et 532nm (vert). PMT 700/700. Valeurs indiquées : F635-B635, avec B635= 80-300.

II.2.2.b. Gouttes déposées à l'aide du robot commercial Chipwriter Pro : technique « spot-dans-spot ».

➢ *Test de faisabilité*

Le robot de dépôt utilisé est le modèle Chipwriter Pro commercialisé par la société BioRad. Deux matrices de 10 spots de l'oligonucléotide 35mer-NH_2 ont été réalisées en deux zones distinctes de la lame. Comme témoin négatif, deux matrices de 10 spots de tampon seul ont été déposées à côté des précédentes. Chaque zone spottée comprend ainsi 20 spots, espacés de 600µm, ce qui correspond à une surface 5mm^2 environ. Après immobilisation, une goutte de solution de blocage a été déposée sur chaque zone de manière à recouvrir entièrement les 20 spots. Au bout de 30min, cette solution a été pipetée et remplacée par de l'eau, et ceci a été répété suffisamment de fois afin d'obtenir un lavage correct. La lame n'ayant pas été déplacée durant cette étape de blocage et de lavage, on peut supposer que la réutilisation du programme de dépôt précédent peut permettre de superposer une seconde solution sur les spots. Pour le vérifier, une solution de l'oligonucléotide complémentaire 15mer-Cy5 a été déposée de cette manière, incubée 15min, puis la lame a été lavée, toujours par dépôt et aspiration de gouttes directement sur la zone spottée.

La figure 9 présente l'image obtenue après lecture au scanner en fluorescence. On observe sur chaque zone 20 spots de 300µm environ, faiblement fluorescents. Au centre de 10 d'entre eux, un spot plus petit (100µm de diamètre) et beaucoup plus intense apparaît : ceci correspond à l'hybridation du 15mer-Cy5 sur le 35mer-NH_2. Ce résultat montre d'une part que **les spots ont été correctement superposés**, et d'autre part que **l'hybridation a lieu dans le volume réduit correspondant à une goutte déposée par le robot Chipwriter Pro**.

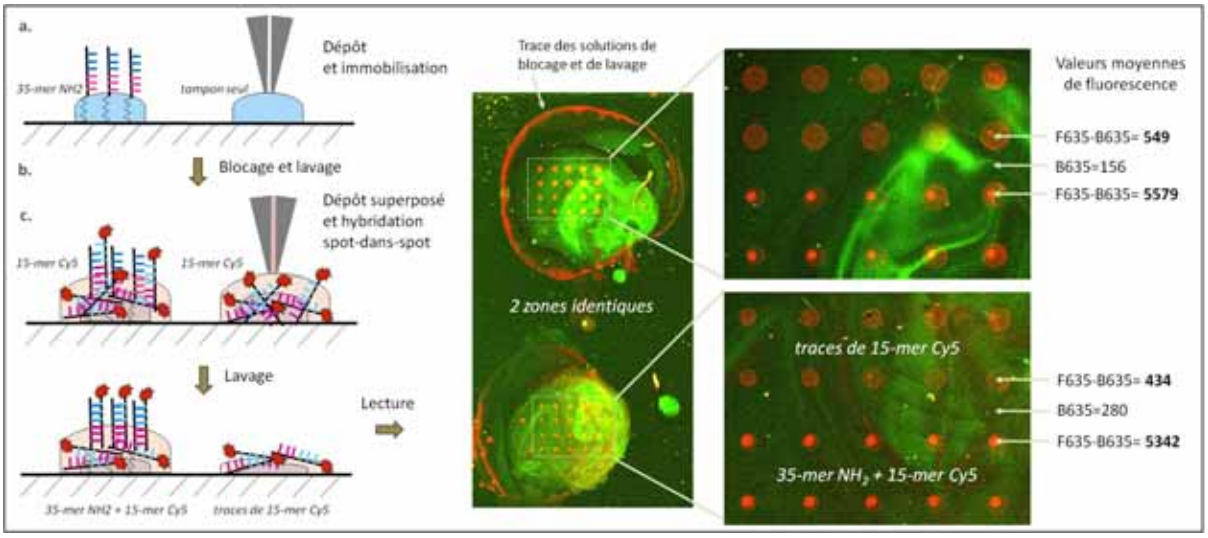


Figure 9 : Hybridation spot-dans-spot sur lame époxyde. Dépôt au robot Chipwriter Pro.

a. Oligonucléotide 35mer-NH_2 à 50µM dans Na_2HPO_4 0,1M pH9 sur lame époxyde. Témoin négatif : tampon seul.

b. Solution de blocage : éthanolamine 200mM dans Na_2HPO_4 0,1M pH9 ; puis lavage à l'eau milliQ.

c. Hybridation avec l'oligonucléotide complémentaire 15mer-Cy5 à 100nM dans tampon SSC 3X, 0,3% SDS, à température ambiante. Lavages : SSC 1X, 0,1% SDS, puis SSC 0,1X, puis eau milli Q. Séchage à l'air comprimé.

Dépôts d'oligonucléotides réalisés avec le robot Chipwriter Pro ; blocages et lavages réalisés à la pipette sans déplacer la lame de verre.

Images en fluorescence : scanner Axon à 635nm (rouge) et 532nm (vert). PMT 700/700. Les traces vertes correspondent à l'auto-fluorescence des tampons de lavage.

Les spots de grande taille, présents aussi bien sur les témoins négatifs que sur les spots d'intérêt traduisent l'adsorption non spécifique de 15mer-Cy5 sur la surface. Pour éliminer ce signal, un lavage plus prononcé devrait être mis au point. L'objectif suivant étant de réduire encore la taille des gouttes en utilisant le robot Bioplume, la solution choisie a été plutôt de changer de chimie de surface et d'opter pour une dendrilame, qui garantit à la fois un bruit de fond faible et une très haute sensibilité.

Avant de passer à ce format miniaturisé, une optimisation de la composition du tampon d'hybridation a été réalisée, dans le but de s'assurer du correct recouvrement des spots et de tester l'effet de l'ajout de glycérol. Ce dernier est en effet nécessaire pour éviter que les solutions ne sèchent au cours du dépôt de très petits volumes.

- *Optimisation du tampon d'hybridation*

Le tampon d'hybridation influence à la fois les paramètres biologiques et physiques de l'hybridation. Sur le plan biologique, sa composition influe sur l'interaction entre les brins d'ADN : par exemple la présence de cations en solution stabilise l'interaction en écrantant les charges négatives des groupements phosphates. Sur le plan physique, plus le tampon est hydrophile, plus les gouttes sont larges. Or la morphologie des spots a une importance : il faut s'assurer que les spots d'oligonucléotide 15mer-Cy5 recouvrent bien les spots d'oligonucléotide 35mer-NH_2. D'autre part, l'ajout de glycérol contracte les gouttes et ralentit leur assèchement.

Les influences de la nature du tampon et de la concentration en glycérol sont évaluées au cours de la même manipulation. Deux tampons sont testés : le tampon commercial « Pronto Short Oligo Hybridization Buffer" de la société Corning, et le tampon SSC 3X, 0.3% SDS utilisé précédemment. A chacun de ces tampons sont ajoutés 0, 15% ou 25% de glycérol.

L'oligonucléotide 35mer-NH_2 est déposé sous forme de 6 matrices de 10 spots sur une dendrilame. Des matrices de tampon seul sont déposées en même temps comme témoins négatifs. L'ensemble des spots est ensuite recouvert d'une solution de NaBH4, déposée à la pipette. Cette étape permet de stabiliser la liaison covalente de l'oligonucléotide aminé avec les fonctions aldéhydes de la dendrilame. Après rinçage, chacune des solutions d'oligonucléotide 15mer-Cy5 est déposée sous la forme d'une matrice de 30 spots superposée à l'une des six matrices réalisées précédemment. L'image en fluorescence acquise à cette étape permet d'observer la morphologie des spots selon le tampon d'hybridation. La lame est ensuite lavée pour observer la qualité du signal d'hybridation (figure 10).

On peut noter sur l'image avant lavage que, sans glycérol, des aggrégats se forment dans les gouttes d'oligonucléotide fluorescent. Dans le cas du tampon commercial (sans glycérol) aucun signal d'hybridation n'est observable sur l'image après lavage. Ceci peut être attribué à un séchage trop rapide, qui peut d'ailleurs être observé à l'œil nu.

Dans tous les autres cas, un signal d'hybridation est obtenu, ce qui confirme la correcte superposition des spots et la qualité de ces cinq tampons. On peut donc conclure que **le glycérol n'empêche pas l'hybridation**, et que **sa présence est même nécessaire pour éviter que les solutions d'hybridation ne sèchent**.

D'autre part, le signal résiduel correspondant à une adsorption non spécifique de 15mer-Cy5 est négligeable, ce qui confirme la pertinence du choix d'une dendrilame comme support.

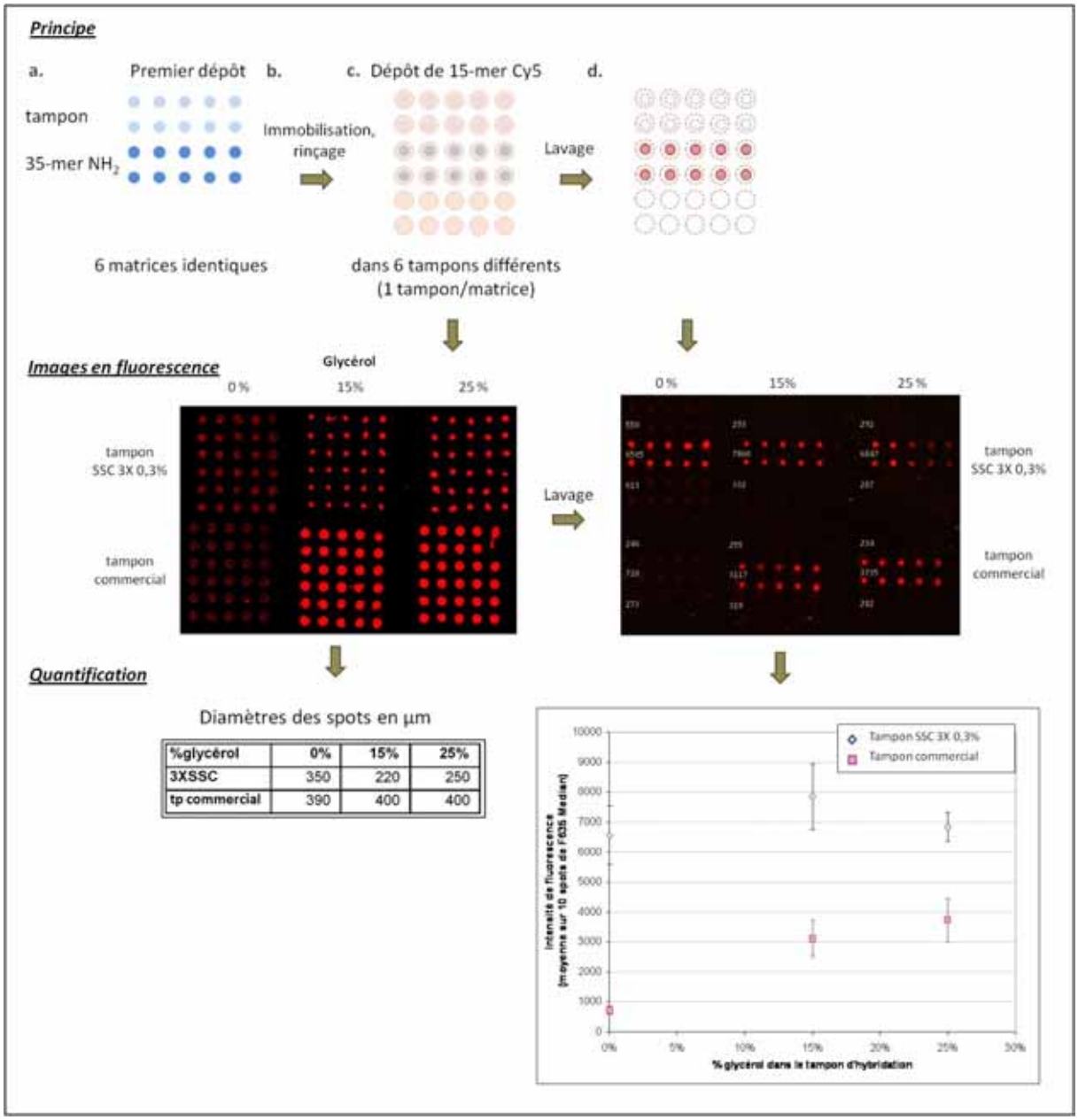


Figure 10 : Optimisation du tampon pour l'hybridation spot-dans-spot sur dendrilame.
Dépôt au robot Chipwriter Pro.

a. Oligonucléotide 35mer-NH_2 à 50µM dans Na_2HPO_4 0,1M pH9 sur dendrilame. Témoin négatif : tampon seul.
b. Immobilisation : NaBH4 3,5mg/mL, puis rinçage à l'eau milliQ.
c. Hybridation avec l'oligonucléotide complémentaire 15mer-Cy5 à 500nM dans tampon SSC 3X, 0,3% SDS ou dans tampon commercial contenant 0%, 15% ou 25% de glycérol. Température ambiante.
d. Lavages : SSC 1X, 0,1% SDS, puis SSC 0,1X, puis eau milli Q. Séchage à l'air comprimé.
Images en fluorescence : scanner Axon à 635nm (rouge) et 532nm (vert). PMT 700/500, logiciel Genepix.

En ce qui concerne les deux tampons testés, on observe que le tampon commercial donne des gouttes plus étalées, mais en contrepartie le signal d'hybridation est plus faible, ce

qui est logique puisque la densité surfacique d'oligonucléotides fluorescents diminue lorsque la taille des spots augmente. Pour les expériences suivantes, il conviendra donc de **choisir si le paramètre le plus critique est la superposition des spots (tampon commercial) ou l'intensité du signal (tampon SSC 3X 0,3%SDS)**.

Les témoins négatifs réalisés dans cette expérience ont permis de montrer que le signal résiduel dû à l'adsorption sur une surface vierge est négligeable par rapport au signal d'hybridation. Pour aller plus loin il convient de vérifier que cette hybridation est spécifique.

- *Vérification de la spécificité d'hybridation*

L'expérience précédente a été répétée, en ajoutant simplement un témoin négatif supplémentaire : un oligonucléotide non complémentaire du 15mer-Cy5, spotté en même temps que le 35mer-NH_2. Après immobilisation, rinçage, hybridation spot-dans-spot et lavage, le signal fluorescent n'a été conservé que pour les spots contenant 15mer-Cy5 et 35mer-NH_2. Aucune fluorescence résiduelle du 15mer-Cy5 n'est observable sur les spots d'oligonucléotide non complémentaire. Ceci indique que le 15mer-Cy5 ne s'hybride pas sur l'oligonucléotide non complémentaire : **la configuration spot-dans-spot n'empêche pas de conserver la spécificité de l'hybridation.**

Cette série d'expériences montre qu'il est possible de réaliser un test d'hybridation ADN/ADN dans un volume limité aux quelques picolitres d'une goutte déposée par un robot à aiguille. En comparaison avec un test de type biopuce où un volume de 200µL à 2mL est nécessaire (pour la même concentration), ceci représente une **réduction de la quantité d'échantillon biologique d'un facteur 10^6 à 10^9** selon le nombre de spots concernés. Pour aller encore plus loin, nous avons cherché à savoir si cette technique d'hybridation spot-dans-spot pouvait être encore miniaturisée jusqu'à l'échelle de spots déposés à l'aide du robot Bioplume.

II.2.2.c. Gouttes déposées à l'aide de Bioplume

- *Test de nettoyage des aiguilles*

La précision nécessaire pour parvenir à réaliser une hybridation dans deux spots superposés déposés par Bioplume exige d'utiliser la même barrette de plumes pour les deux séries de dépôts. Il convient donc de vérifier en premier lieu que les plumes peuvent être nettoyées afin d'éviter toute contamination entre deux dépôts successifs de molécules différentes.

Pour cela, les plumes ont été chargées soit avec une solution de fluorophore Cy3, soit avec du tampon seul. Après chaque série de dépôt, les plumes ont été trempées simplement dans une goutte d'eau et légèrement agitées. L'efficacité de cette méthode a été évaluée en calculant le pourcentage de contamination selon l'équation suivante :

$$\%\,Contamination = \frac{Fluor.\ tp.\ déposé\ avec\ plumes\ contaminées - Autofluor.\ tp}{Fluor.\ Cy\ 3/5}$$

Les résultats obtenus sur 140 spots déposés par 7 plumes différentes montrent qu'un lavage de 5min permet de réduire à 4% le pourcentage de contamination (figure 11). La répétition de cette expérience avec cette fois le fluorophore Cy5 indique qu'ajouter 10 min de lavage supplémentaire n'améliore pas significativement ce résultat. Une troisième expérience montre que pour atteindre des pourcentages de contamination inférieurs à 1% avec un lavage dans l'eau, une durée de 1h est nécessaire. Dans ce cas, il serait préférable de mettre au point une solution de lavage plus élaborée, en ajoutant par exemple de la soude (0,1M) ou un détergent (SDS 1%). Cependant, ce type de produit n'a pas été utilisé dans les expériences présentées ci-après car le taux de contamination résiduelle était suffisamment réduit pour ces premières mises au point.

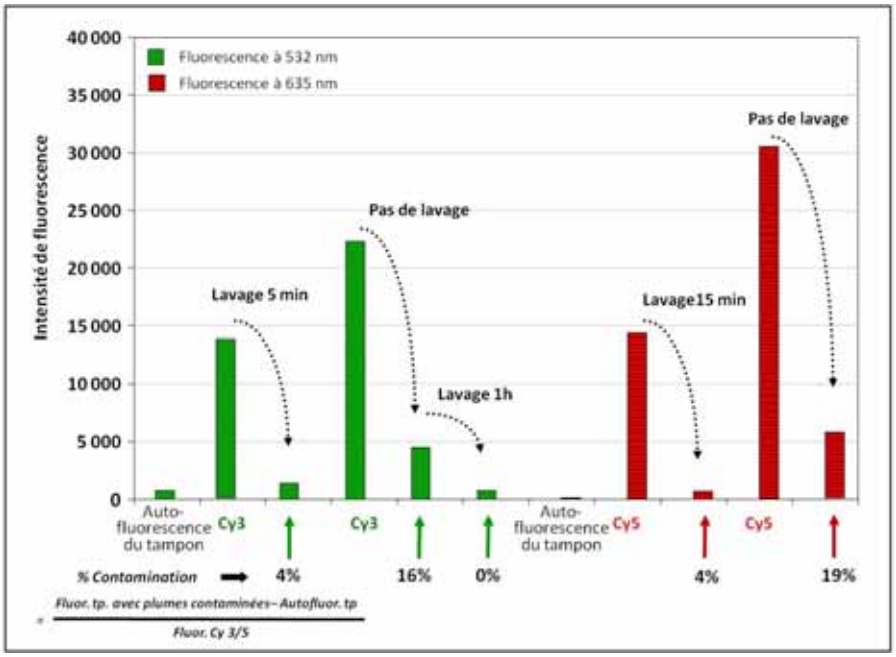


Figure 11 : Pourcentages de contamination obtenus suite au dépôt successif de solutions fluorescentes et de tampon seul, en rinçant les plumes dans une goutte d'eau entre chaque série de dépôts.

Les valeurs représentées sont des moyennes sur 140 spots déposés par 7 aiguilles différentes. Les écarts-types représentent 5 à 25% du signal en raison de la petite taille des spots par rapport à l'utilisation standard du logiciel d'analyse (format de biopuce classique).

- *Test d'alignement*

Le deuxième point à vérifier en vue de réaliser une hybridation spot-dans-spot à l'aide de Bioplume est la possibilité de déposer deux fois au même endroit malgré l'échelle réduite. Un test de superposition a donc été réalisé, en utilisant des oligonucléotides marqués par deux fluorophores de couleurs différentes : Cy5 (rouge) et Cy3 (vert). Une matrice de 20 spots de l'oligonucléotide-Cy5 a été réalisée, puis les plumes ont été rincées 5min dans l'eau et rechargées avec l'oligonucléotide-Cy3. Une seconde matrice de 20 spots a ensuite été réalisée, en décalant la position de dépôt de 500µm de telle manière que les 10 premiers spots soient réalisés sur une zone vierge de la lame et les 10 suivants soient superposés avec les spots déposés précédemment. La figure 12 montre l'image obtenue en fluorescence pour 3 aiguilles adjacentes. L'apparition d'un signal jaune pour les 10 spots centraux est caractéristique de la superposition des signaux rouge et vert, ce qui est confirmé en analysant

l'image avec deux filtres séparés. Ce résultat confirme qu'il est possible de réaliser des spots superposés avec Bioplume. La résolution spatiale est difficile à estimer et semble être de l'ordre de celle du scanner, c'est-à-dire de 5µm environ. D'autre part, la qualité de signal de fluorescence vert obtenu sur lame vierge confirme que le rinçage des plumes de 5min avec de l'eau a été suffisant.

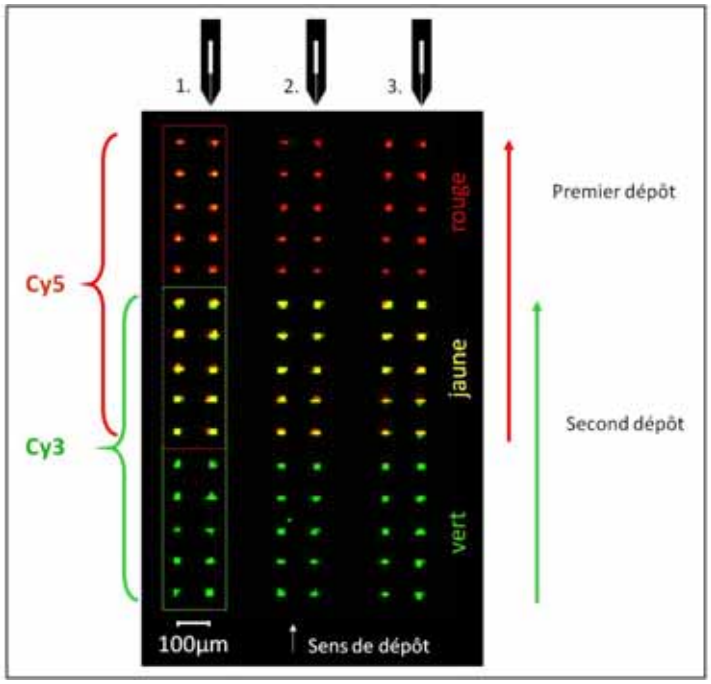


Figure 12 : Réalisation de spots superposés à l'aide de Bioplume.
Cy5 = oligonucléotide 15mer-Cy5 ; Cy3 = oligonucléotide 15mer-Cy3. Image : scanner Axon.

La résolution spatiale de Bioplume permettant de réaliser des spots superposés, un test d'hybridation spot-dans-spot peut être effectué.

➢ *Hybridation « spot-dans-spot » avec Bioplume*

Le test d'hybridation spot-dans-spot est réalisé selon le protocole mis au point précédemment à l'aide du robot Chipwriter Pro. Les différentes étapes sont rappelées sur la figure 13.

Dans un premier temps, du tampon seul est déposé comme témoin négatif sous la forme de matrices de 10 spots dans deux zones distinctes (fig.13, n°1 et n°2). L'oligonucléotide 35mer-NH_2 est ensuite déposé dans deux autres zones (fig.13, n°4 et n°5) et les coordonnées de tous les points de dépôt sont sauvegardées. Les plumes sont rincées avec de l'eau et pendant ce temps, une solution de $NaBH_4$ est déposée sur les spots pour stabiliser la liaison covalente des oligonucléotides sur la surface. Au cours de cette étape, les précautions prises pour éviter tout mouvement de la lame (à quelques microns près) sont extrêmement importantes. Le second dépôt est ensuite réalisé, cette fois en chargeant les plumes avec l'oligonucléotide complémentaire 15mer-Cy5. Deux matrices sont réalisées sur une partie vierge de la lame (fig.13, n°3 et n°6), une sur des spots de tampon seul (fig.13, n°2) et la dernière sur les spots d'intérêt contenant le 35mer-NH_2 (fig.13, n°5). Après hybridation, la lame est lavée pour éliminer toute adsorption non spécifique de l'oligonucléotide fluorescent.

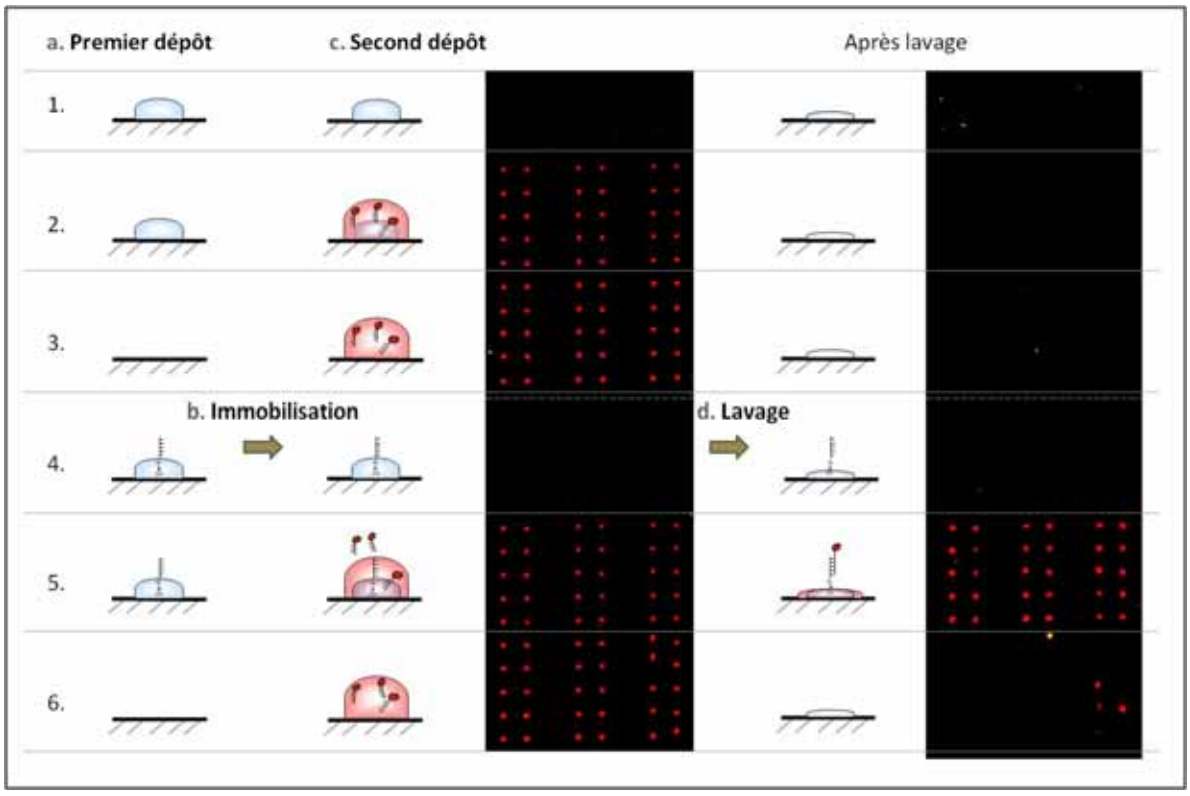


Figure 13 : Hybridation spot-dans-spot à l'échelle du robot Bioplume (spots de 10µm de diamètre)
a. Oligonucléotide 35mer-NH_2 à 50µM dans Na_2HPO_4 0,1M pH9, 25% glycérol sur dendrilame. Témoin négatif : tampon seul.
b. Stabilisation : $NaBH_4$ 3,5mg/mL, puis rinçage à l'eau milliQ.
c. Hybridation avec l'oligonucléotide complémentaire 15mer-Cy5 à 500nM dans le tampon commercial contenant 25% de glycérol. Température ambiante.
d. Lavages : SSC 3X 0,3%SDS puis SSC 1X 0,1% SDS, puis SSC 0,1X, puis eau milli Q. Séché à l'air comprimé.
Images en fluorescence : scanner Axon.

Les images prises avant et après ce lavage montrent que le 15mer-Cy5 ne s'est hybridé que dans la zone où le 35mer-NH_2 avait été précédemment déposé (fig.13, n°5). Ce signal correspond donc bien à une hybridation dans les spots superposés.

Ceci confirme que **l'hybridation ADN/ADN peut avoir lieu dans le volume correspondant à une seule goutte déposée par Bioplume, soit quelques dizaines de femtolitres.** Le concept de **l'hybridation spot-dans-spot est donc bien miniaturisable** jusqu'à l'échelle de spots de 10 à 20µm de diamètre.

Suite à ces conclusions, une série d'expériences a été menée pour savoir si des interactions protéine/protéine pouvaient être réalisées également dans des gouttes superposées.

II.2.3. Adaptation de la technique « spot-dans-spot » avec Bioplume aux puces à protéines

Pour mettre au point un protocole d'interaction spot-dans-spot appliqué aux protéines, deux molécules modèles ont été choisies : la protéine GST (glutathion-S-transférase), robuste et disponible commercialement, et l'anticorps spécifique de cette protéine marqué en fluorescence, noté « anti-GST* ». La dendrilame a été conservée comme support, mais l'étape de fixation au $NaBH_4$ a été supprimée pour ne pas risquer de dénaturer les protéines.

De la même manière que précédemment, les compositions des tampons utilisés pour le dépôt et pour l'interaction ont été étudiées en détail, et en particulier l'influence de l'ajout de glycérol. Ces paramètres sont en effet cruciaux lorsque les volumes sont réduits à quelques femtolitres. Pour ces expériences préliminaires, les spots ont été réalisés avec le robot commercial à aiguilles Chipwriter Pro.

II.2.3.a. Influence du glycérol dans le tampon de dépôt

Pour éviter que les liquides déposés à l'aide de Bioplume ne sèchent instantanément, il est nécessaire d'y ajouter 10% de glycérol minimum [8]. L'influence de cet ajout de glycérol sur la qualité d'immobilisation d'une protéine sur dendrilame est inconnue. Pour l'évaluer, huit tampons de dépôt contenant des pourcentages de glycérol de 0,2% à 10% sont préparés. Une solution de protéine GST est réalisée dans chacun de ces tampons, puis chaque solution est déposée sous la forme d'une matrice de 8 spots. Après immobilisation, la lame est immergée dans une solution de BSA dans le but de saturer toutes les fonctions aldéhydes n'ayant pas réagi. Une solution d'anticorps anti-GST fluorescent est ensuite incubée sur tous les spots. Finalement, la lame est lavée pour éliminer toute fixation non spécifique d'anticorps anti-GST (anti-GST*) et lue au scanner en fluorescence. Sur la figure 14 sont représentées les intensités de fluorescence obtenues en fonction de la concentration en glycérol dans le tampon de dépôt de la GST.

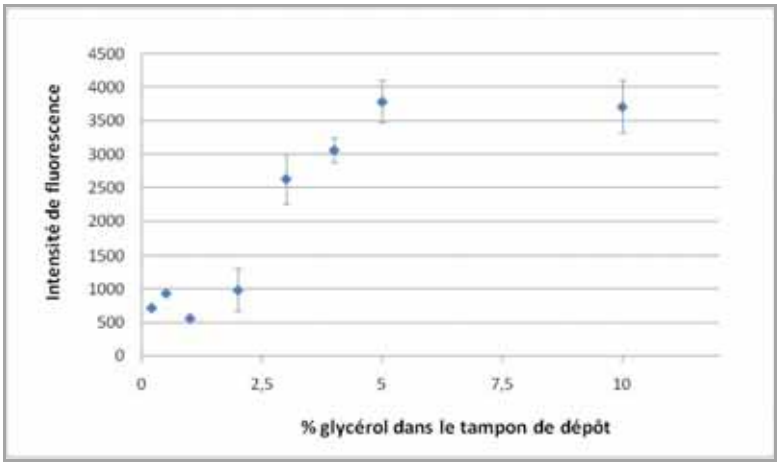


Figure 14 : Intensité de fluorescence pour une interaction anti-GST*/GST en fonction de la concentration de glycérol dans le tampon de dépôt de la GST.

- Dépôt de GST à 100µg/mL dans $NaHCO_3$ pH 8,5 contenant 0,2% à 10% glycérol.
- Immobilisation et blocage: PBS Tween 0,1% contenant 20mg/mL de BSA, puis rinçage au PBS.
- Incubation d'anticorps anti-GST marqué en AlexaFluor®647 dilué 1/1000 dans PBS avec additif « ChipHybe ».
- Lavages : PBS Tween 0,1%, NaCl 850mM, puis PBS Tween 0,1%, puis PBS. Séché à l'air comprimé.
- Images en fluorescence : scanner Axon. Les valeurs représentées sont les médianes calculées sur 8 spots.

On observe que la fluorescence augmente avec la concentration de glycérol. Ceci peut être attribué à deux phénomènes. D'une part, le pouvoir humectant du glycérol ralentit le séchage des gouttes déposées, et donc le temps de réaction permettant l'immobilisation des biomolécules est d'autant plus allongé. Cet effet peut cependant être partiellement contrebalancé par l'augmentation de viscosité de la solution qui peut ralentir la cinétique d'immobilisation si celle-ci est limitée par la diffusion des protéines vers la surface. D'autre part, cette augmentation du signal d'interaction anti-GST*/GST, peut être expliquée par l'effet stabilisant du glycérol pour les protéines [9]. Certains auteurs attribuent cette stabilisation à une diminution du volume interne des protéines et à une augmentation de leur rigidité, sans qu'il y ait changement de conformation [10] [11].

Une expérience supplémentaire a montré que la concentration de glycérol peut être augmentée jusqu'à 25% sans que la fixation de GST ne soit affectée. Dans la perspective d'un dépôt de protéines avec Bioplume, **10 à 25% de glycérol peuvent donc être ajoutés dans le tampon de dépôt de la GST sans incidence sur les résultats.** Si l'expérience devait être étendue à une plus large variété de protéines, ce résultat mériterait d'être validé de nouveau, pour vérifier qu'il n'est pas spécifique à la protéine GST.

II.2.3.b. Choix du tampon pour une interaction « spot-dans-spot »

Lorsque l'interaction est réalisée dans une chambre d'hybridation automatisée, le tampon utilisé classiquement est du PBS auquel une solution commerciale nommée « ChipHybe » est ajoutée. Un premier test d'interaction spot-dans-spot a été réalisé en déposant une solution d'anticorps anti-GST (anti-GST*) préparée dans ce tampon sur des spots de GST, de BSA ou sur une lame vierge. Dans les trois cas, l'anti-GST* reste fixé sur la surface, ce qui traduit une interaction non spécifique.

Pour obtenir un signal d'interaction spécifique, six tampons sont testés. Trois d'entre eux sont préparés à partir de PBS contenant 25% de glycérol (figure 15, tp n°4), auquel a été ajouté soit l'additif commercial « ChiHybe » (fig.15, tp n°5), soit le tensioactif Tween à 0,1% (fig.15, tp n°6). Les trois autres tampons sont préparés à partir d'une solution commerciale nommée « Reaction Buffer » (fig.15, tp n°7), à laquelle sont ajoutés 25% de glycérol (fig.15, tp n°2) et l'additif « ChiHybe » (fig.15, tp n°3). Une solution d'anti-GST* est préparée dans chacun de ces tampons.

Le test d'interaction spot-dans-spot est ensuite réalisé. La protéine GST est déposée sous la forme d'une matrice de 56 spots (14*4), en même temps que de la BSA et du tampon seul comme témoins négatifs. Après immobilisation, l'excédent de protéines est rincé en utilisant une pipette et en prenant soin de ne pas faire bouger la lame

[8] : Emeline Descamps, Miniaturisation des techniques de structuration de substrat par électropolymérisation de pyrrole : application aux biopuces et à l'électronique moléculaire, 209p, Thèse, Electrochimie, Université Joseph Fourier, Grenoble, 2008

[9] : K. Gekko et S.N. Timasheff, *Biochemistry*, 1981, **20**, 4667-4676

[10] : S.N. Timasheff, *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 1993, **22**, 67-97

[11] : A. Priev, A. Almagor, S. Yedgar, et B. Gavish, *Biochemistry,* 1996, **35**, 2061-2066

Chacune des 6 solutions d'anticorps anti-GST fluorescent est ensuite déposée en matrice de 8 spots (2*4), superposés avec les spots précédents. Une septième matrice est réalisée sur une zone vierge de la lame de verre. L'image obtenue en fluorescence après lavage et lecture au scanner est présentée sur la figure 15.

Pour quatre des tampons testés, un signal fluorescent est présent à la fois sur les spots d'intérêt et sur les témoins négatifs : on retrouve ici l'absence de spécificité observée précédemment. En particulier, cette fixation non spécifique d'anti-GST* a lieu lorsque le tampon ne contient pas de glycérol.

En revanche, **une interaction spot-dans-spot spécifique est obtenue avec le tampon commercial (avec ou sans additif) et pour le tampon PBS contenant 0,1% de Tween**. On peut supposer que les agents tensioactifs contenus dans ces trois tampons limitent les interactions hydrophobes entre l'anticorps et les dendrimères présents sur la lame, et évite ainsi sa fixation non spécifique.

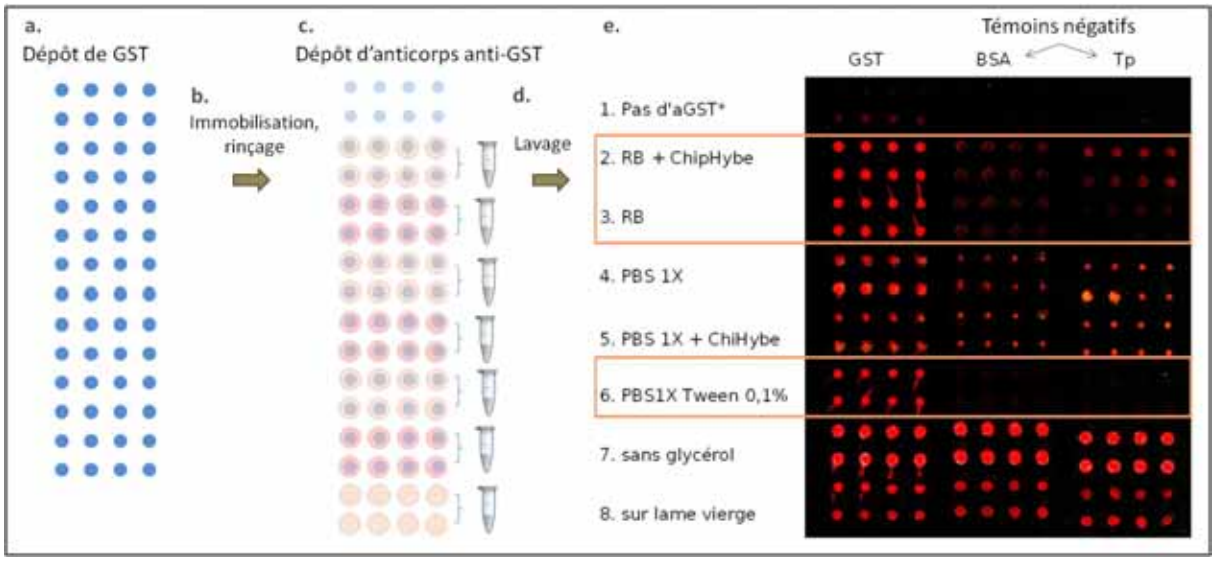


Figure 15 : Test de divers tampons pour l'interaction spot-dans-spot de protéines sur dendrilame.

a. Dépôt de GST à 100µg/mL dans $NaHCO_3$ pH 8,5 ; 25% glycérol. Témoins négatifs : BSA dans $NaHCO_3$ pH 8,5 ; 25% glycérol et tampon seul
b. Immobilisation : PBS, Tween 0,1%, puis rinçage au PBS. Liquides déposés à la pipette.
c. Dépôt d'anticorps anti-GST marqué en AlexaFluor®647 dilué 1/1000 dans 6 tampons différents (n°8 = n°2)
d. Lavages : PBS Tween 0,1%, NaCl 850mM, puis PBS Tween 0,1%, puis PBS. Séché à l'air comprimé.
Images en fluorescence : scanner Axon.

Pour le test d'interaction spot-dans-spot à l'échelle de gouttes déposées par Bioplume présenté ci-après, c'est le tampon commercial RB contenant l'additif ChipHybe qui a été choisi, car c'est celui qui a donné les résultats les plus reproductibles au cours de 16 manipulations similaires.

II.2.3.c. Interaction de protéines spot-dans-spot avec Bioplume

Le protocole mis au point pour l'interaction spot-dans-spot de protéines à l'échelle de gouttes déposées par le robot à aiguille Chipwriter Pro a été testé en utilisant cette fois le robot Bioplume. Comme précédemment pour les oligonucléotides, des précautions importantes ont été prises pour éviter tout mouvement de la lame qui entraînerait une mauvaise superposition des spots.

La protéine GST a été déposée sous forme de matrices de 20 spots, en même temps que de la BSA utilisée comme témoin négatif. Après immobilisation, une solution de PBS contenant de la BSA a été déposée à la pipette sur les spots afin de saturer les fonctions aldéhydes n'ayant pas réagi. L'anticorps anti-GST marqué en fluorescence a ensuite été déposé, en utilisant les mêmes coordonnées de points de dépôt que précédemment pour obtenir la superposition des spots. La lame a enfin été lavée pour éliminer toute fixation non spécifique de l'anticorps. La lecture de la lame avant et après ce dernier lavage montre que l'anticorps anti-GST s'est fixé spécifiquement sur les spots de GST (figure 16).

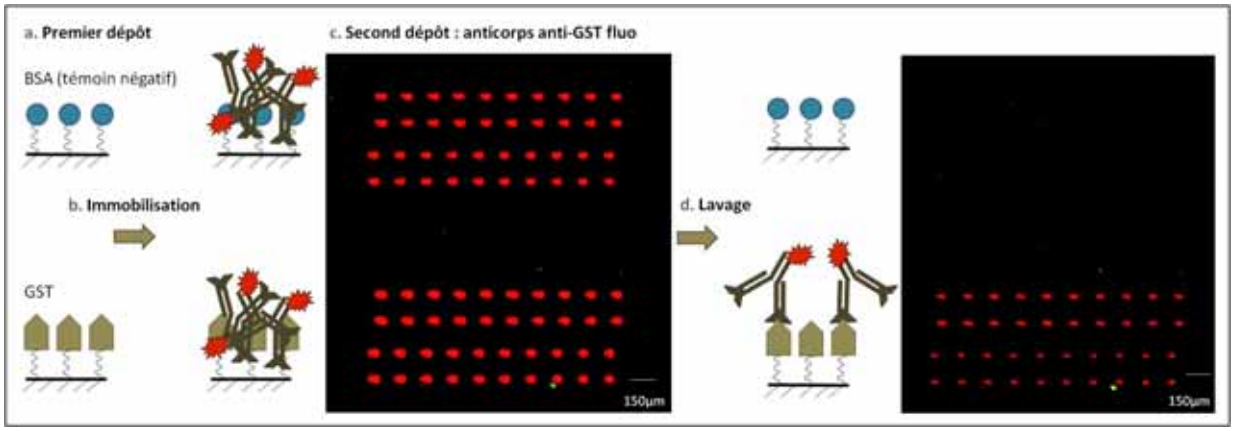


Figure 16 : Interaction de protéines spot-dans-spot : dépôts réalisés au robot Bioplume.

a. Dépôt de GST à 100µg/mL dans $NaHCO_3$ pH 8,5 ; 25% glycérol. Témoin négatif : BSA dans $NaHCO_3$ pH 8,5 ; 25% glycérol
b. Immobilisation et blocage: PBS, Tween 0,1% contenant 20mg/mL de BSA, puis rinçage au PBS. Solutions déposées sur les spots à l'aide d'une pipette avec précaution, afin d'éviter tout déplacement de la lame.
c. Dépôt d'anticorps anti-GST marqué en AlexaFluor®647 dilué 1/1000 dans le tampon commercial Reaction Buffer, ChipHybe (Pronto) contenant 25% de glycérol.
d. Lavages : PBS Tween 0,1%, NaCl 850mM, puis PBS Tween 0,1%, puis PBS. Séchage à l'air comprimé.
Images en fluorescence : scanner Axon à 635nm.

L'application de la configuration spot-dans-spot à l'interaction de protéines est donc validée.

Conclusion chapitre 2

Les expériences présentées dans ce chapitre ont permis de montrer qu'il est possible d'adresser des biomolécules sur des surfaces avec une **précision de quelques microns,** à l'aide du robot Bioplume. En adressant successivement plusieurs solutions au même endroit, des **interactions ADN/ADN et protéine/protéine** ont été réalisées **dans des volumes de quelques dizaines de femtolitres**. Cette configuration, appelée **interaction spot-dans-spot** permet de **réduire de 10^9 à 10^{12} fois* le volume d'échantillon biologique** nécessaire pour un test sur biopuce.

Par ailleurs, la réduction de la taille des spots de 100-300µm à 10-20µm permet d'**augmenter de 100 fois la densité de dépôts**. Ceci peut permettre soit d'adresser un plus large éventail de molécules sondes sur une surface équivalente, soit de déposer le même nombre de sondes sur une surface plus petite et de miniaturiser ainsi l'ensemble de la puce. Le format spot-dans-spot permet en outre de tester plusieurs échantillons biologiques simultanément à condition d'avoir déposé suffisamment de fois la même molécule sonde. Une application envisageable serait par exemple le screening pharmaceutique à haut débit : il s'agit de tester de façon systématique des molécules dites « candidats médicaments » sur tous les marqueurs biologiques de maladies identifiés. Ces tests sont réalisés à l'heure actuelle en plaques de microtitration, c'est-à-dire dans des volumes de plusieurs dizaines de microlitres.

Ces résultats permettent aussi d'envisager d'utiliser le robot Bioplume pour adresser des molécules biologiques sur la surface active de biocapteurs miniatures. La possibilité de déposer tour-à-tour des solutions différentes peut être appliquée aux étapes successives de fonctionnalisation, saturation, rinçage, interaction et lavage. Le contrôle de la force de contact intégré au système de dépôt est un atout majeur dans ce domaine, où les surfaces actives sont souvent fragiles.

Pour réaliser des biopuces intégrées ou pour utiliser des biocapteurs miniatures, les biomolécules doivent non seulement être adressées dans des volumes réduits, mais aussi immobilisées sur la surface active. Dans les expériences présentées au cours de ce chapitre, l'immobilisation était réalisée grâce à des chimies de surface mises au point pour le format des lames de verre. Ces méthodes sont également applicables à la fonctionnalisation collective de dispositifs peu fragiles, pouvant en particulier être immergés. L'adaptabilité de ces techniques à de petits volumes réactionnels et à des environnements délicats, comme c'est le cas pour la plupart des biocapteurs, est étudiée dans le chapitre suivant.

* : 10^6 à 10^9 fois si l'interaction spot-dans-spot est réalisée non pas avec le robot Bioplume mais avec un spotteur commercial classique.

Chapitre III

Chapitre III : Immobiliser des biomolécules sur des surfaces : quelle chimie pour une adaptation à des volumes réactionnels réduits et à un environnement fragile et complexe ?

Une large variété de méthodes permettant d'immobiliser des acides nucléiques ou des protéines sur des surfaces a été décrite, en particulier pour des formats de biopuces sur lames de verre et pour des biocapteurs macroscopiques (cf paragraphe I.3). Lorsque les dimensions de ces dispositifs sont réduites, les volumes réactionnels utilisables sont limités à quelques microlitres. Par ailleurs, les surfaces sont alors intégrées dans des systèmes complexes comportant des éléments fragiles. Ce chapitre présente l'analyse de cinq chimies de surface dans le but d'évaluer leurs contraintes de mise en œuvre et leurs performances en termes de sensibilité, de spécificité d'immobilisation, et de reproductibilité. Le but final est d'évaluer leur faisabilité dans le cas particulier de volumes de réaction réduits, et d'environnement fragile et complexe. La méthode identifiée comme la plus facilement miniaturisable a ensuite été utilisée pour la fonctionnalisation, avec des biomolécules, de deux biocapteurs de petite taille.

Comme dans le chapitre précédent, ce sont des biomolécules modèles qui sont utilisées. En effet, l'intérêt du travail se situe dans la mise en place des diverses techniques d'immobilisation, ce qui nécessite une validation à l'aide d'interactions biologiques connues.

III.1. Identification des contraintes de mise en œuvre de cinq méthodes d'immobilisation

III.1.1. La chimie des dendrimères : performante mais difficilement adaptable à un format miniature

Les dendrilames utilisées dans les tests présentés précédemment sont extrêmement performantes en termes de sensibilité et de ratio signal/bruit, que ce soit pour des puces à ADN ou pour des puces à protéines. Ces surfaces sont préparées par silanisation d'une lame de verre avec un amino-alkylsilane, puis greffage des dendrimères sur ces fonctions amines. Le solvant utilisé pour cette dernière étape est le tétrahydrofurane (THF). Dans le cas de la fonctionnalisation de lames de verre dans des bains de quelques décilitres, la volatilité de ce solvant ne pose pas de problème majeur. En revanche, il est difficilement envisageable de travailler avec des volumes réduits à l'échelle du microlitre, car l'évaporation serait trop rapide pour que la réaction ait lieu. Par ailleurs, le THF dissous la plupart des matériaux plastiques, et demanderait donc une vigilance particulière en cas d'utilisation pour fonctionnaliser la surface de biocapteurs intégrés à un système complexe. Malgré ses performances pour la fonctionnalisation collective de systèmes peu fragiles, cette méthode ne répond donc pas à la problématique particulière de la fonctionnalisation de petites surfaces intégrées. D'autres solutions doivent donc être envisagées.

III.1.2. Silanisation de SiO_2 avec un époxysilane.

La silanisation de surfaces d'oxyde de silicium (SiO_2) a été très largement étudiée et plusieurs études comparatives concluent que les époxy-silanes donnent parmi les meilleurs résultats en termes d'intensité du signal et de qualité du bruit de fond [1] [2]. C'est donc cette chimie qui a été testée en premier lieu.

III.1.2.a. Principe

La molécule la plus communément utilisée pour la préparation de surfaces à fonctions époxydes par silanisation est le glycidoxy-propyl-triméthoxysilane (GPTS). Cet alkylsilane réagit avec les fonctions hydroxyles de la surface de silice, activée sous la forme SiOH (par plasma d'oxygène ou bain piranha par exemple). Des liaisons Si-O-Si se forment aussi entre les chaînes adjacentes, ce qui participe à la stabilisation de la couche. Il est préférable que cette réaction soit réalisée en conditions anhydres pour éviter que l'eau ne réagisse avec le site électrophile de l'époxyde.

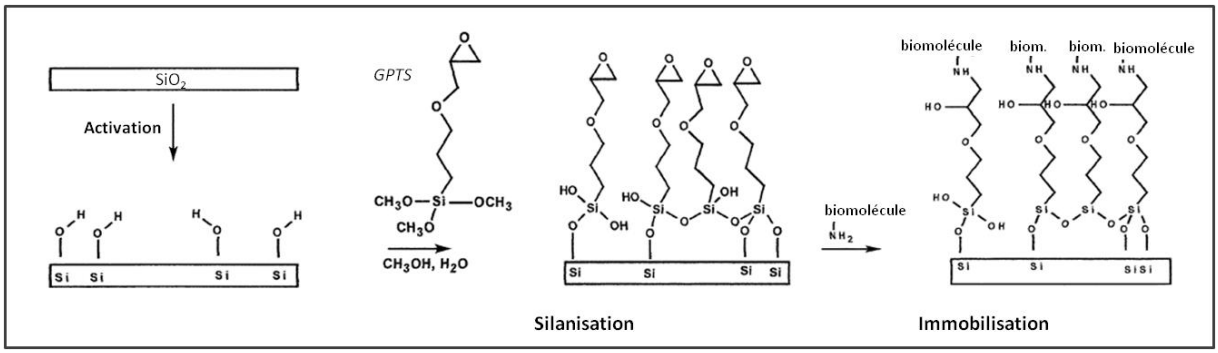


Figure 1 : Fixation de GPTS sur une surface de SiO_2. Adapté de [4]

III.1.2.b. Résultats préliminaires avec un protocole simplifié

➢ *Choix d'un protocole de silanisation*

Le tableau de la figure 2 présente divers protocoles proposés pour la silanisation de SiO_2 à l'aide de GPTS.

Référence	GPTS	Solvant	Catalyseur	Température	Temps	Conditions
Moorcroft *et al* [3]					10h	*Phase vapeur*
Macanovic *et al* [4]	1%	Éthanol	DIEA		4h	
Cloarec et al [5]	10%	Xylène	DIEA	70°	4h	N_2
Lamture *et al* [6]		Xylène		80°		
Wong *et al* [7]		Toluène anhydre			16h	
WongKrull *et al* [8]	30%	Toluène anhydre	DIEA	110°	24h	Ar
Tsukruk *et al* [9]	0,1 à 1%	Toluène anhydre			10s à 24h	N_2

0,5% minimum sinon agrégats

10min minimum pour surface homogène (AFM)

Figure 2 : Tableau récapitulatif de divers protocoles de fixation de GPTS sur SiO_2.

[1] : H. Zhu, J.F. Klemic, S. Chang, P. Bertone, A. Casamayor, K.G. Klemic, D. Smith, M. Gerstein, M.A. Reed, M. Snyder, *Nature Genetics*, 2000, **26**, 283-289
[2] : S. Taylor, S. Smith, B. Windle et A. Guiseppi-Elie, *Nucleic Acids Research*, 2003, **31(16)**, e87

Dans le premier protocole (Moorcroft *et al* [3]) la réaction est réalisée en phase vapeur, ce qui permet d'obtenir une couche particulièrement homogène. Cependant cette méthode n'est réalisable que si les équipements spécifiques sont disponibles. Dans tous les autres protocoles, la fonctionnalisation est donc réalisée en phase liquide. Trois solvants ont été proposés : le xylène, le toluène anhydride et l'éthanol absolu. Afin d'accélérer la réaction, certains auteurs chauffent le milieu réactif, et/ou ajoutent un catalyseur basique, la diisopropyl-éthylamine (DIEA). Les concentrations de GPTS utilisées varient de 0,1 à 30% *v/v*. Une étude a montré qu'une concentration minimale de 0,5% est nécessaire pour obtenir une couche homogène. Enfin trois protocoles sur les six présentés en phase liquide sont réalisés sous azote ou sous argon.

Dans un souci de simplicité de mise en œuvre, la fonctionnalisation en phase liquide a été choisie, dans l'éthanol absolu et à température ambiante. Pour s'assurer de la correcte fixation du GPTS une étape de cuisson a été ajoutée. Après un premier test avec 2% de GPTS et 0,2% de catalyseur DIEA, l'influence de ces deux paramètres ainsi que celle de la cuisson ont été évaluées.

- *Puce à ADN et à protéines sur surface silanisée selon le protocole non optimisé*

Un tout premier test de silanisation a été réalisé sur deux morceaux de silicium découpés dans une plaquette de 4 pouces oxydée en surface. Ces surfaces ont été nettoyées et activées dans un plasma d'oxygène, puis plongées dans une solution de GPTS à 2% *v/v* dans l'éthanol absolu contenant 0,2% *v/v* de catalyseur DIEA. Au bout de 2h, les surfaces ont été rincées à l'éthanol absolu, séchées avec de l'azote, et placées pendant 30 min sur une plaque chauffante à 100°C.

Deux de ces surfaces ont ensuite été utilisées pour réaliser respectivement un test de puce à ADN ou un test de puce à protéine. L'oligonucléotide 35mer-NH_2 et la protéine GST ont été déposés sous la forme de matrices de 10 spots à l'aide du robot à aiguilles Chipwriter Pro. Des témoins négatifs ont été déposés simultanément : P1N et P3N pour les oligonucléotides ; BSA et anti-GST pour les protéines. Après immobilisation, saturation de la surface par une solution de BSA, et rinçage, les spots d'oligonucléotides ont été recouverts d'une solution de 15mer-Cy5 déposée à la pipette. Une solution d'anticorps anti-GST marqué en fluorescence (anti-GST*) a été déposée sur les spots de protéines. A la fin de l'incubation, les deux surfaces ont été lavées, séchées, et observées grâce à un scanner en fluorescence. Les images obtenues, présentées figure 3, montrent qu'une hybridation spécifique du 15mer-Cy5 a eu lieu sur les spots de 35mer-NH_2. De même une interaction spécifique de l'anti-GST* sur les spots de GST est observée. Aucun signal n'apparaît sur les spots de témoins négatifs. Ces résultats montrent que la silanisation a assuré l'immobilisation des oligonucléotides et des protéines utilisés comme sondes. Leur conformation a été suffisamment conservée pour qu'une interaction spécifique ait lieu.

Cependant, **l'intensité des signaux obtenus est faible par rapport aux tests réalisés précédemment sur des lames commerciales** (cf chapitre 1). En effet, le photomultiplicateur a dû être réglé au maximum d'amplification pour réaliser les images présentées figure 3. **Deux hypothèses** peuvent être émises pour expliquer la faible intensité de ce signal. Soit **la**

couche chimique n'est pas suffisamment homogène et la quantité de biomolécules fixées est bien plus faible que précédemment ; soit il existe un **phénomène optique** dû à l'utilisation d'une plaquette de silicium oxydée sur quelques centaines de nanomètres en surface plutôt qu'une lame de verre. L'oxyde de silicium étant transparent alors que le silicium réfléchit la lumière, il est probable que l'épaisseur d'oxyde a une influence sur la mesure. Pour tester les trois hypothèses décrites ci-dessus, l'influence des paramètres de silanisation a été étudiée, à la fois sur lame de verre et sur plaquette de silicium oxydée en surface.

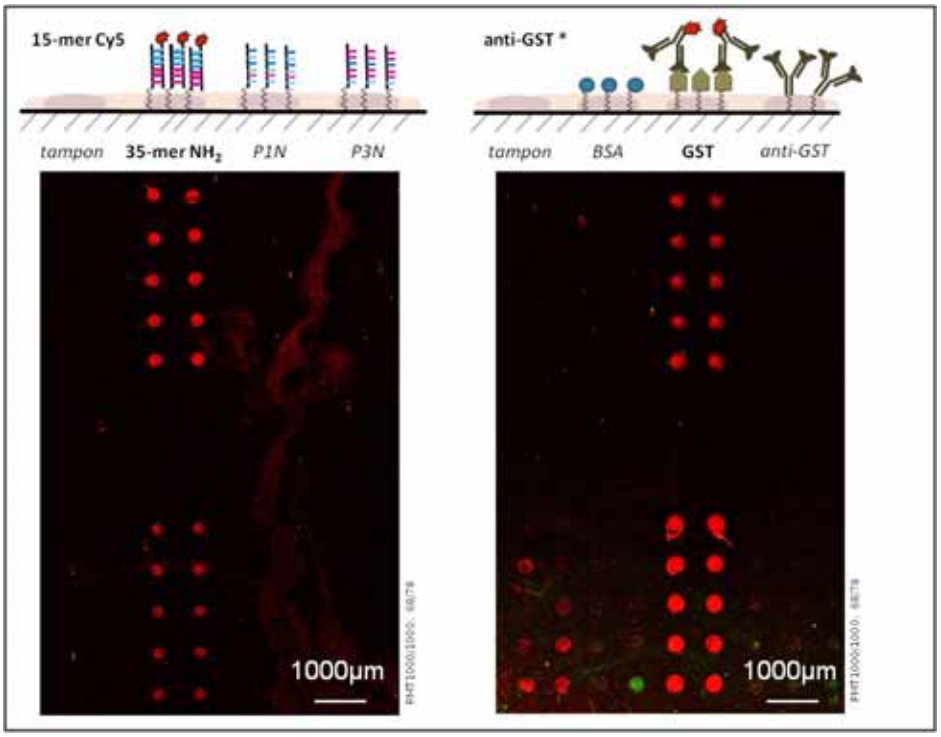


Figure 3 : Puces à ADN et à protéine sur SiO_2 silanisé avec GPTS : protocole non optimisé.

- Clivage d'une plaquette de silicium oxydée en surface (oxyde thermique, 300nm) pour obtenir des morceaux de 2,5*2,5cm.
- Rinçage à l'eau distillée puis nettoyage plasma O_2, 1000mL/h, 300W, 5min.
- **Silanisation** : GPTS 2%, DIEA 0,2% dans éthanol absolu. 2h. ; **Lavage** : éthanol absolu, 3 fois 5min ; **Cuisson** : 30min à 100°C
- **Dépôt des biomolécules**
  - 35mer-NH_2 à 50µM dans Na_2HPO_4 0,1M pH9, glycérol 25%. Témoins négatifs : tampon seul, et oligonucléotides P1N et P3N.
  - GST à 100µg/mL dans $NaHCO_3$ pH 8,5 glycérol 25%. Témoins négatifs : tampon seul, BSA et anticorps anti-GST
- Immobilisation puis blocage dans une solution de BSA à 20mg/mL dans PBS.
- **Interaction** - 15mer-Cy5 à 100nM dans tampon commercial
  - anti-GST* dilué 1/1000 dans tampon commercial
- **Lavages** - SSC 3X 0,3%SDS puis SSC 1X 0,1% SDS, puis SSC 0,1X, puis eau milli Q. Séché à l'air.
  - PBS Tween 0,1%, NaCl 850mM, puis PBS Tween 0,1%, puis PBS. Séché à l'air comprimé.

[3] : M.J. Moorcroft, W.R.A. Meuleman, S.G. Latham, T.J. Nicholls, R.D. Egeland, E.M. Southern, *Nucleic Acids Research*, 2005, **33 (8)**, e75
[4] : A. Macanovic, C. Marquette, C. Polychronakos, M.F. Lawrence, Nucleic Acids Research, 2004, **32 (2)**, e20
[5] : J.P. Cloarec, N. Deligianis, J.R. Martin, I. Lawrence, E. Souteyrand, C. Polychronakos and M.F. Lawrence, *Biosensors and Bioelectronics*, 2002, **17 (5)**
[6] : J.B. Lamture, K.L. Beattie, B.E. Burke, M.D. Eggers, D.J. Ehrlich, R.Fowler, M.A. Hollis, B.B. Kosicki, R.K. Reich, S.R. Smith, R.S. Varma et M.E. Hogan, *Nucleic Acids Research*, 1994, **22 (11)**, 2121-2125
[7] : I. Wong, C.-M. Ho, *Proceedings of the 19th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems*, 2006, Istanbul, Turquie
[8] : A.K.Y. Wong, U.J. Krull, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2005, **383**, 187-200
[9] : V.V. Tsukruk, I. Luzinov, et D. Julthongpiput, *Langmuir*, 1999, **15**, 3029-3032

III.1.2.c. Etude de l'influence des paramètres

- *Concentration en GPTS et type de catalyse*

Les influences de la concentration en GPTS et du type de catalyse sur la qualité de la silanisation ont été testées au cours de la même expérience, à la fois sur des lames de verre et sur des morceaux de plaquette de silicium oxydé. Pour cela, huit solutions ont été préparées dans de l'éthanol absolu, contenant 0, 2, 5 ou 10% de GPTS, auquel a été ajouté soit un catalyseur acide (acide acétique), soit un catalyseur basique (DIEA). Une lame de verre et un morceau de plaquette Si/SiO_2 ont été plongés dans chacune de ces solutions (figure 4a) après avoir été activés par plasma d'oxygène. La cuisson et le lavage ont ensuite été effectués comme décrit précédemment.

Afin d'évaluer la qualité de la silanisation, une interaction ADN/ADN a été réalisée sur chacune des surfaces préparées. L'oligonucléotide 35mer-NH_2 a été déposé sous forme de matrices de 9 spots. Après immobilisation et blocage, les spots ont été immergés dans une solution de l'oligonucléotide complémentaire 15mer-Cy5. La fluorescence obtenue après interaction et lavage a été mesurée pour chacune des 16 surfaces. Sur la figure 4c sont représentées les intensités moyennes calculées pour les 9 spots de chaque matrice, desquelles a été soustraite l'intensité moyenne du bruit de fond (fixation non spécifique de 15mer-Cy5 sur la surface). Les valeurs représentées correspondent donc à la fixation spécifique de 15mer-Cy5 sur 35mer-NH_2.

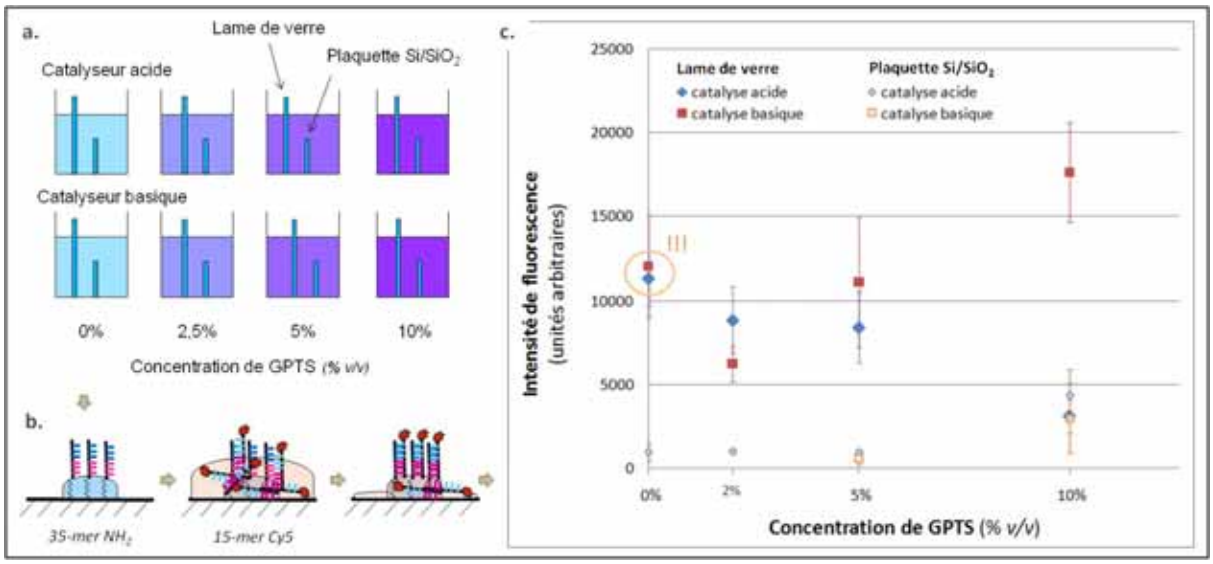


Figure 4 : Signal d'hybridation ADN/ADN obtenu sur des surfaces à fonctions époxydes préparées selon divers protocoles de silanisation, pour évaluer les influences du catalyseur et de la concentration en GPTS.

a. Silanisation de 8 lames de verre et 8 morceaux de plaquette de Si oxydée sur 300nm (oxyde thermique), traitées au plasma O_2 à 1000mL/h et 300W pendant 5min. Répartition dans 8 solutions contenant 0, 2, 5 ou 10% de GPTS et 0,2% d'un catalyseur acide ou basique (acide acétique ou DIEA), dans l'éthanol absolu, pendant 2h. Lavage : éthanol absolu, 3 fois 5min. Cuisson : 30min à 100°C
b. Test de type puce à ADN :
Dépôt au robot à aiguilles Chipwriter Pro de 35mer-NH_2 à 50µM dans Na_2HPO_4 0,1M pH9, glycérol 25%. Immobilisation puis blocage dans une solution de BSA à 20mg/mL dans PBS.
Incubation avec 15mer-Cy5 à 100nM dans tampon SSC 3X, 0,3% SDS, 25% glycérol.
Lavages : SSC 3X 0,3%SDS puis SSC 1X 0,1% SDS, puis SSC 0,1X, puis eau milli Q. Séché à l'air.
c. Lecture au scanner en fluorescence et quantification grâce au logiciel Genepix.
Valeurs représentées = (fluorescence moyenne sur 9 spots) - (bruit de fond moyen)

Les résultats obtenus sont particulièrement surprenants : en effet, les signaux d'hybridation parmi les plus importants sont obtenus sur les surfaces témoins n'ayant pas été silanisées. Plus précisément, toutes les étapes ont été réalisées identiquement sur ces surfaces comme sur les autres, mais lors de la silanisation elles ont été trempées dans de l'éthanol contenant seulement le catalyseur, et pas de GPTS. Ceci signifie qu'**une quantité importante de 35mer-NH_2 s'est fixée dans une conformation permettant l'hybridation, indépendamment du greffage de GPTS sur la surface**. Les oligonucléotides sont donc fixés de façon non spécifique sur la surface, mais le nombre de ceux qui sont orientés de façon à interagir avec l'oligonucléotide complémentaire est suffisant pour que cette hybridation soit détectée. Dans ces conditions, **il est difficile de tirer de ces expériences une conclusion fiable** quant à l'influence de la concentration en GPTS et du type de catalyseur sur la qualité de la silanisation.

Par ailleurs, on observe de nouveau que les signaux obtenus sur les morceaux de plaquette Si/SiO_2 sont beaucoup plus faibles que sur lame de verre. Pour déterminer si ce résultat provient d'une différence de réactivité ou d'un phénomène optique, une molécule fluorescente a été déposée simultanément sur plusieurs lames de verres et plusieurs morceaux de plaquette Si/SiO_2. Les gouttes fluorescentes ont été scannées directement après dépôt et sans aucun traitement ni lavage, ce qui permet d'observer uniquement l'influence de paramètres optiques. L'analyse réalisée sur 378 spots déposés sur 14 surfaces a montré que **la fluorescence mesurée est systématiquement plus faible sur les morceaux de plaquette de Si/SiO_2, et ceci de 40 à 200 fois**. Les signaux de fluorescence subissent donc une atténuation lorsque la mesure est réalisée non pas sur une lame de verre mais sur une couche de SiO_2 de faible épaisseur se trouvant sur un matériau réfléchissant (Si). **La faible intensité obtenue lors des expériences précédentes sur plaquette de Si/SiO_2 s'explique donc partiellement par un phénomène optique**.

Pour évaluer la pertinence des bons résultats d'hybridation obtenus sur lames non silanisées, l'expérience a été répétée, en testant cette fois simultanément l'intérêt de l'étape de cuisson. Des expériences complémentaires menées au LAAS-CNRS (J.C. Cau) ont montré que 2% *v/v* de GPTS étaient suffisants et que le catalyseur n'était pas nécessaire : ce sont donc ces paramètres qui ont été choisis.

- *Cuisson*

L'influence de la cuisson sur la qualité de la silanisation a été testée au cours d'une expérience semblable à la précédente. Pour simplifier l'étape de lecture en fluorescence, ce test n'a pas été réalisé sur des morceaux de plaquette Si/SiO_2 mais plutôt sur des lames de verre.

Quatre lames ont donc été activées par plasma d'oxygène, puis deux d'entre elles ont été plongées dans une solution de GPTS à 2% *v/v* dans l'éthanol absolu. Les deux autres, utilisées comme témoins négatifs, ont été placées simultanément dans un bain d'éthanol absolu ne contenant pas de GPTS. Au bout de 2h d'incubation, les lames de verre ont été rincées à l'éthanol absolu, puis l'étape de cuisson de 30min à 100°C a été réalisée sur une des surfaces silanisées et une des surfaces témoins. Les deux autres lames n'ont pas été cuites.

Ces quatre surfaces, ainsi qu'une lame époxyde commerciale, ont ensuite été utilisées pour réaliser un test d'hybridation d'ADN. Le protocole suivi est le même que celui décrit précédemment. Les signaux de fluorescence obtenus pour 80 spots répartis sur deux zones de la lame hybridées séparément sont présentés figure 5.

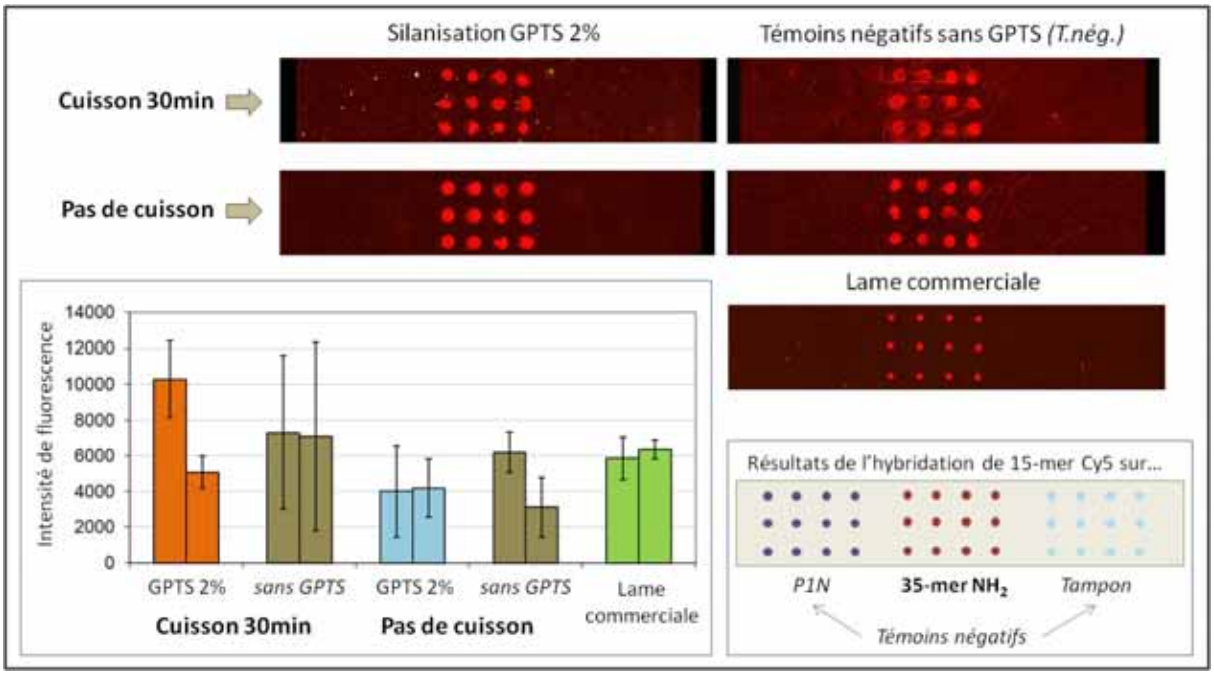


Figure 5 : Signal d'hybridation ADN/ADN obtenu sur des surfaces époxydes préparées selon divers protocoles de silanisation, pour évaluer l'influence de l'étape de cuisson.

Silanisation : 4 lames de verre traitées au plasma O_2 à 1000mL/h et 300W pendant 5min.
Incubation dans une solution de GPTS à 2% *v/v* dans l'éthanol absolu, pendant 2h. Témoins négatifs : incubation dans de l'éthanol absolu.
Lavage : éthanol absolu, 3 fois 5min.
Cuisson : 30min à 100°C pour une lame silanisée et une lame témoin. Pas de cuisson pour les deux autres lames.
Test de type puce à ADN :
Dépôt au robot à aiguilles Chipwriter Pro de 35mer-NH_2 à 50µM dans Na_2HPO_4 0,1M pH9, glycérol 25%. Témoins négatifs : tampon seul, et oligonucléotide P1N
Immobilisation puis blocage dans une solution de BSA à 20mg/mL dans PBS.
Incubation avec 15mer-Cy5 à 100nM dans tampon commercial contenant 25% de glycérol.
Lavages : SSC 3X 0,3%SDS puis SSC 1X 0,1% SDS, puis SSC 0,1X, puis eau milli Q. Séché à l'air.
Lecture au scanner en fluorescence et quantification grâce au logiciel Genepix.
Valeurs représentées = moyenne sur 40 spots des valeurs de (fluorescence-bruit de fond local)

De nouveau, un signal d'hybridation spécifique est obtenu pour toutes les lames, silanisées ou non. L'absence de signal sur les spots d'ADN non complémentaire « P1N » montre que l'interaction de 15mer-Cy5 avec 35mer-NH_2 est bien une reconnaissance biologique. **L'oligonucléotide 35mer-NH_2 a donc été de nouveau immobilisé dans une conformation permettant l'hybridation, indépendamment de la fixation de GPTS. Ces résultats ne permettent donc pas d'évaluer l'influence de la cuisson sur la silanisation.**

Un contrôle supplémentaire a été réalisé sur une lame vierge, simplement nettoyée au plasma d'oxygène. Cette fois, aucun signal d'hybridation n'a été visualisable. Les résultats observés sur les lames non silanisées ne sont donc pas reproductibles.

L'intensité de fluorescence obtenue sur les quatre surfaces préparées est comparable à celle mesurée sur la lame commerciale. Par contre les spots ont des formes beaucoup plus régulières sur cette dernière ; ils sont aussi plus petits, et le bruit de fond est beaucoup moins important. Ceci montre que l'état de surface obtenu avec le protocole de silanisation que nous avons testé est différent de celui d'une lame époxyde commerciale. Il est probable que ces lames produites en grandes quantités soient silanisées en phase vapeur, car l'homogénéité de la couche fonctionnelle peut ainsi être contrôlée. Cette technique est cependant difficile à mettre en œuvre dans un laboratoire non spécialisé.

III.1.2.d. Doutes sur la reproductibilité de la méthode dans ces conditions

Les tests présentés ont été réalisés en fonctionnalisant des surfaces d'oxyde de silicium par le silane époxyde GPTS, selon un protocole choisi pour sa simplicité de mise en œuvre. Plusieurs variantes de ce protocole ont été testées, et dans tous les cas une immobilisation de l'oligonucléotide 35mer-NH_2 a été obtenue. En effet une interaction avec l'oligonucléotide complémentaire 15mer-Cy5 a pu être observée.

Cependant, cet oligonucléotide a été immobilisé aussi efficacement sur les surfaces utilisées comme témoins négatifs, ne portant pas le silane GPTS. D'autre part, l'observation de la morphologie des spots et de la qualité du bruit de fond montre que l'état de surface obtenu est moins satisfaisant que celui d'une lame époxyde commerciale.

D'autres tests menés en parallèle au LAAS-CNRS avec le même type de protocole ont donné des résultats similaires [10]. Dans la plupart des cas, une immobilisation correcte a été obtenue, mais la qualité de la couche de silane et des signaux mesurés était très variable d'une expérience à l'autre.

Cette observation n'est pas décrite dans les articles de référence sur la silanisation par GPTS [4] [6] [8] [9]. En effet, la démarche de ces auteurs consistait à étudier la nature des surfaces silanisées ou la transduction à partir des biomolécules immobilisées sur ces surfaces, mais les témoins sur surface vierge ne sont pas présentés.

Les expériences que nous avons réalisées ne permettent donc pas de relier les signaux d'hybridation à la qualité de la silanisation. Les paramètres du protocole de silanisation en phase liquide n'ont donc pas pu être optimisés. La seule certitude est que la qualité des surfaces silanisées obtenues est moins bonne que celle de leur équivalent commercial, dont on ne connaît pas le protocole de fabrication.

La reproductibilité des résultats pourrait probablement être améliorée en utilisant une silanisation en phase vapeur qui permet d'obtenir des couches homogènes. Cependant, cette méthode nécessite des équipements spécialisés, et elle paraît difficilement adaptable à la fonctionnalisation sélective de surfaces de taille réduite.

Pour obtenir des éléments de comparaison, d'autres chimies de surface ont été testées, dont en premier lieu l'auto-assemblage d'alcanethiols.

---

[10] : Jean-Christophe Cau, *Biodétection optique sans marquage basée sur la diffraction de motifs moléculaires submicroniques*, Thèse, Sciences de la matière, Université de Toulouse, 2008

III.1.3. Auto-assemblage d'alcanethiols sur surface d'or

III.1.3.a. Principe

Sur une surface d'or, les alcanethiols s'auto-assemblent pour former des monocouches fonctionnelles [11]. Ces molécules permettent ensuite la fixation par liaison covalente de protéines ou d'oligonucléotides modifiés. L'une des méthodes les plus documentées consiste à utiliser l'acide mercapto-undécanoïque (MUA) [12] [13] [14]. Cette chaîne de 11 atomes de carbone présente une extrémité thiol (SH) qui permet l'auto-assemblage sur surface d'or. A l'autre extrémité, la fonction acide carboxylique (COOH) permet la fixation de biomolécules par liaison amide, après une activation sous forme d'ester de succinimide. Les réactifs utilisés pour cette activation sont le N-Ethyl-N'-(3-Dimethylaminopropyl) Carbodiimide (EDC) et le N-hydroxy-succinimide (NHS).

Dans l'exemple présenté figure 6, des anticorps sont immobilisés sur une couche auto-assemblée de MUA. La surface est ensuite saturée grâce à une solution d'éthanolamine : cette petite molécule réagit avec les fonctions réactives encore disponibles sur la surface. Une interaction avec les antigènes peut alors être réalisée.

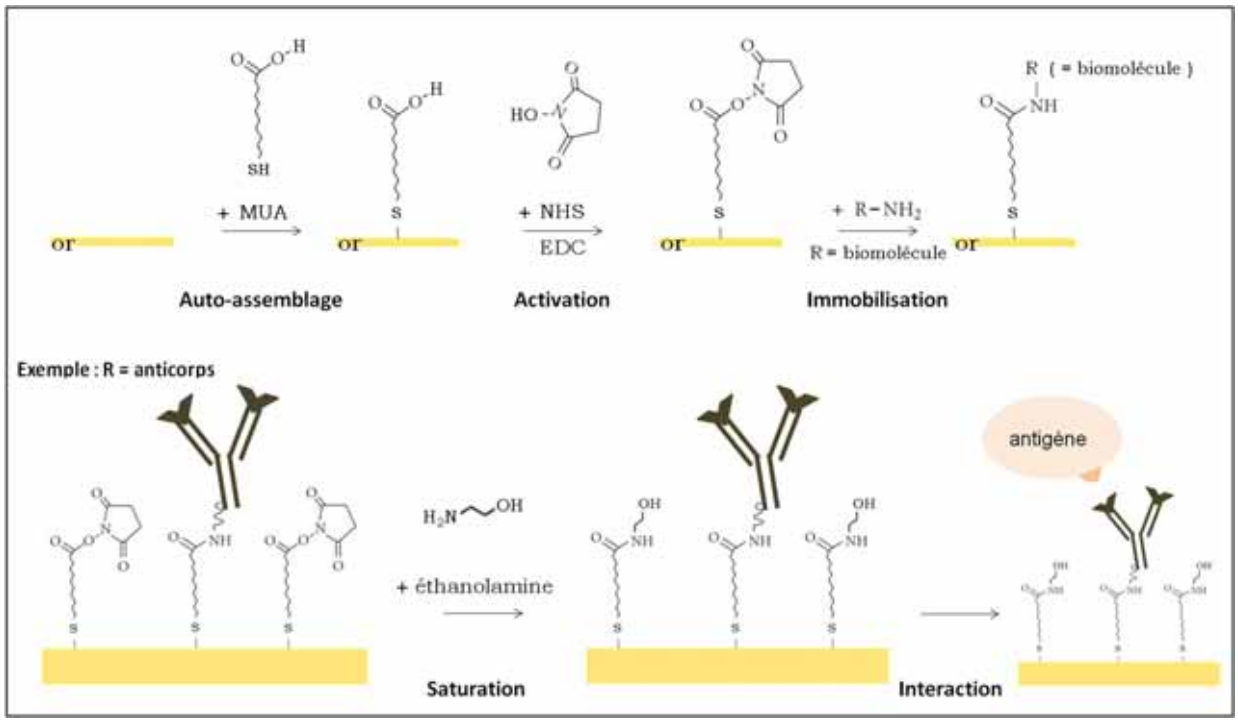


Figure 6 : Immobilisation de biomolécules sur couche auto-assemblée d'acide mercapto-undécanoïque (MUA).

[11] : L. Bertilsson et B. Liedberg, *Langmuir*, 1993, 9, 141-149
[12] : F. Caruso, E. Rodda, D.N. Furlong, V. Haring, *Sensors and Actuators B*, 1997, 41, 189-197
[13] : S.H. Choi, J.W. Lee, S.J. Sim, *Biosensors and Bioelectronics*, 2005, 21, 378-383
[14] : J.W. Lee, S.J. Sima, S.M. Choa, J. Lee, *Biosensors and Bioelectronics*, 2005, 20,1422-1427

III.1.3.b. Méthode de validation de la couche chimique

Dans la série d'expériences présentée ci-après, la surface fonctionnalisée est celle d'un quartz recouvert d'une mince couche d'or. Ce quartz est utilisé comme biocapteur, ce qui permet de valider la qualité de la couche auto-assemblée en mesurant en temps réel la fixation d'anticorps puis la détection d'antigènes. Cette technique est détaillée ci-après.

- *La QCMd ou microbalance à quartz.*

En 1959, Sauerbrey a montré que la fréquence de résonance d'un quartz est inversement proportionnelle à la masse déposée à sa surface [15], soit l'équation suivante :

$$\Delta f = -nC_f f_0^2 \left(\frac{\Delta m}{A} \right)$$

où Δf est la variation de fréquence de résonance, n est l'ordre de l'harmonique, C_f est la constante de Sauerbrey, f_0 est la fréquence de résonance fondamentale du quartz, Δm est la variation de masse, et A est la surface active du quartz.

Cette observation a été exploitée pour mettre au point des capteurs de masse ou microbalances à quartz. La possibilité de réaliser des mesures en milieu liquide a permis d'utiliser ces microbalances comme biocapteurs : dans ce cas, la reconnaissance biologique se traduit par un ajout de masse et donc une baisse de la fréquence de résonance. Parallèlement, la formation de couches de molécules à la surface du quartz modifie la propagation des ondes acoustiques générées par celui-ci. Ce phénomène, appelé dissipation, renseigne sur les propriétés viscoélastiques de la couche de biomolécules, et en particulier sur sa perméabilité aux molécules d'eau. Ainsi l'une des toutes premières utilisations de microbalances à quartz pour des applications en biologie a été l'étude de la sphère d'hydratation de protéines [17]. Depuis, cette technique s'est très largement développée, par exemple pour des études d'interactions entre biomolécules (ADN/ADN, protéine/protéine, protéine/sucre…), pour la détection de toxines, de virus et de bactéries, ou pour la caractérisation de membranes lipidiques. Une grande partie de ces applications est détaillée dans la revue [18].

[15] : G. Sauerbrey, *Zeitschrift für Physik.*, 1959, **155**, 206-222

[16] : www.qsense.com

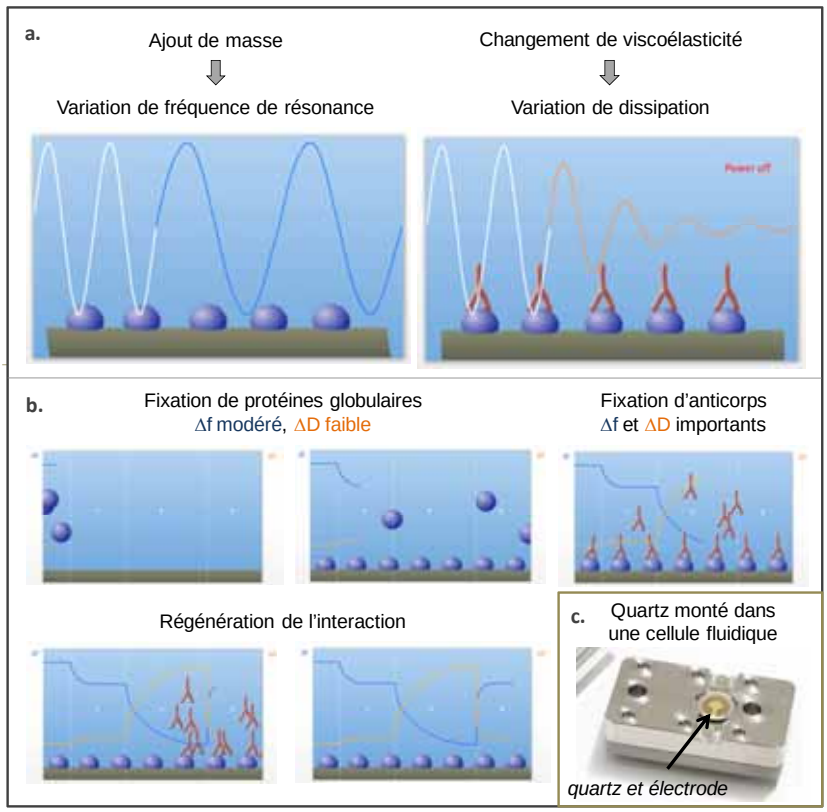


Figure 7 : Principe de la microbalance à quartz. Adapté de [16]

a. Représentation schématique de l'influence du greffage de biomolécules sur les oscillations résonantes d'un quartz.

b. Exemples de variations de fréquence et de dissipation lors de la fixation de protéines globulaires, puis d'anticorps, et enfin lors de la régénération de cette interaction.

c. Photographie d'un quartz monté dans une cellule fluidique. Sur le dessus du quartz, on distingue l'électrode servant à l'actionnement et à la détection des signaux de résonance.

La très large variété d'application de la microbalance à quartz témoigne de sa fiabilité pour l'observation d'interactions biologiques. C'est pourquoi cette technique a été retenue pour évaluer la qualité des couches auto-assemblées pour l'immobilisation de biomolécules. Par ailleurs, ce système constitue un modèle à grande échelle par rapport aux micromembranes résonantes développées au LAAS-CNRS. En effet le principe de fonctionnement de ces biocapteurs miniatures est également basé sur la relation entre la fréquence de résonance du système et sa masse.

Les expériences ont été réalisées sur le dispositif commercialisé par la société Qsense, qui permet de mesurer la fréquence de résonance et la dissipation sur quatre quartz montés dans des chambres fluidiques indépendantes. Toutes les analyses ont été réalisées sur la 7ème harmonique, qui permet un bon compromis entre sensibilité et stabilité du signal.

- *Biomolécules modèles utilisées*

Cette étude est réalisée en collaboration avec Thomas Alava du LAAS-CNRS. Les biomolécules choisies comme modèles sont des anticorps obtenus dans le cadre de cette collaboration et caractérisés précédemment (résultats non montrés).

[17] : L. Reinisch, R.D. Kaiser, J. Krim, *Phys. Rev. Lett.*, 1989, **63 (16)**, 1743-1746

[18] : M.A. Cooper et V.T. Singleton, *Journal of Molecular Recognition*, 2007, **20 (3)**, 154-184

➢ *Protocole expérimental et exemple de résultat*

L'auto-assemblage de MUA sur les quartz d'or est réalisé selon un protocole connu [19]. Dans un premier temps, les surfaces sont **nettoyées** pour éliminer toute trace de matière organique. Ceci est réalisé en trois étapes : d'abord les quartz sont rincés avec un solution de trichloréthylène, puis de l'acétone puis de l'eau distillée. Ensuite, ils sont placés dans un plasma d'oxygène ; et enfin ils sont plongés dans un bain appelé « piranha » préparé en mélangeant à parts égales de l'eau oxygénée et de l'acide sulfurique.

L'étape d'**auto-assemblage** est réalisée en plongeant les quartz dans une solution de MUA à 5mM dans l'éthanol, contenue dans un bécher. Au bout de 12h minimum, les quartz sont rincés à l'éthanol et à l'eau distillée, puis montés dans les cellules fluidiques et connectés aux électrodes d'excitation et de mesure. Ces chambres sont alimentées en solutions à l'aide d'une pompe péristaltique et sont régulées en température.

La première solution injectée est du tampon HEPES, et un flux constant est maintenu jusqu'à **stabilisation** des signaux de fréquence de résonance et de dissipation. Ensuite, une solution d'EDC (200mM) et de NHS (50mM) permettant l'**activation** des fonctions acide carboxylique est injectée pendant 30min. Un exemple de graphique obtenu à partir de cette étape est présenté figure 8. La circulation de la solution de NHS et d'EDC sur le quartz se traduit par une baisse de la fréquence de résonance et une augmentation de la dissipation, mais ces signaux reviennent à leur niveau initial lorsque du tampon HEPES est à nouveau injecté. Ce phénomène révèle la sensibilité du système aux variations de composition et de viscosité des solutions. Pour cette raison, avant d'immobiliser les anticorps, une solution de PBS est injectée jusqu'à stabilisation du signal. Cette étape est cependant limitée à une dizaine de minutes compte tenu de l'instabilité des esters activés.

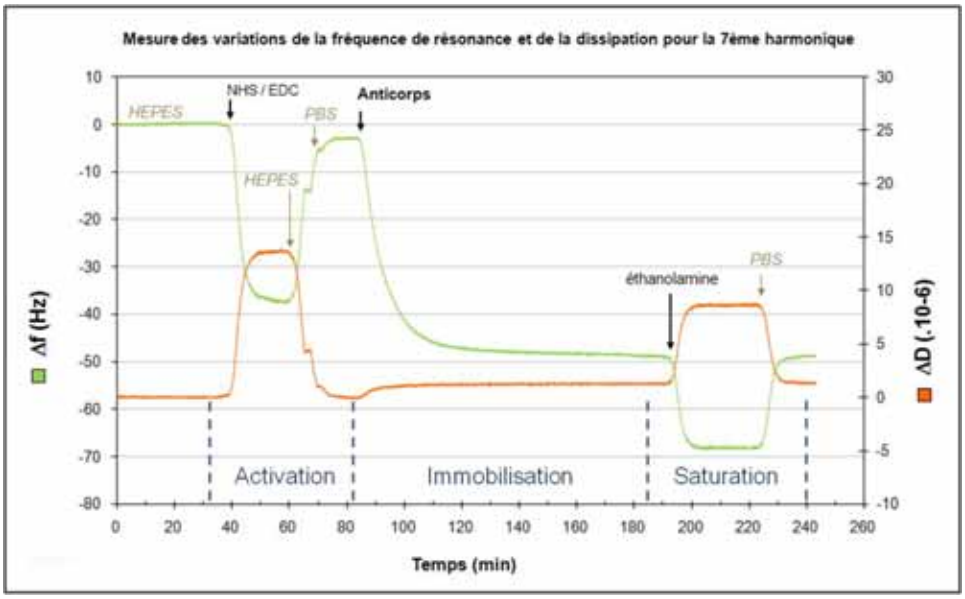


Figure 8 : Exemple de graphique obtenu lors de l'immobilisation d'anticorps sur couche auto-assemblée de MUA. Mesure par microbalance à quartz des variations de la fréquence de résonance (Δf) et de la dissipation (ΔD).

[19] : C. Ayela, F. Roquet, L. Valera, C. Granier, L. Nicu, M. Pugnière, *Biosensors and Bioelectronics*, 2007, **22**, 3113–3119

La fixation des anticorps sur la couche auto-assemblée de MUA se traduit par une baisse de la fréquence de résonance et une hausse de la dissipation. Cette étape a fait l'objet d'une optimisation détaillée au paragraphe III.1.3.c.

Enfin, pour **saturer** les fonctions réactives encore présentes à la surface, une solution d'éthanolamine (1M) est injectée. La fixation de cette molécule n'entraîne pas de variation durable des signaux, en raison de sa petite taille. C'est la réaction de la fonction amine sur les esters de succinimide restants qui permet la saturation (cf figure 6)

III.1.3.c. Optimisation de l'étape d'immobilisation

L'étape d'immobilisation est optimisée en utilisant trois concentrations d'anticorps. Dans un premier temps, l'observation des variations de fréquence de résonance permet de comparer les quantités d'anticorps fixées. Ensuite l'injection des antigènes à des concentrations croissantes permet de déterminer la concentration optimale pour détecter l'interaction avec la meilleure sensibilité.

Cette première étude est réalisée en utilisant des anticorps dirigés contre la bactérie sporulante (Gram négative) *Bacillus atropheus*, notés « anti-Ba ».

Trois solutions d'anticorps anti-Ba sont préparées aux concentrations : 25, 50 et 100µg/mL, et injectées sur trois quartz fonctionnalisés comme décrit précédemment. Une solution d'anticorps dirigés contre l'ovalbumine (anti-ova) est injectée simultanément sur un quatrième quartz qui sert de témoin négatif. L'antigène *Bacillus atropheus* est ensuite injecté sur les quatre quartz, en utilisant successivement des solutions contenant de 0,1 à 1000. 10^6 spores/mL. Les variations de fréquence de résonance observées au cours de ces deux étapes sont présentées figure 7.

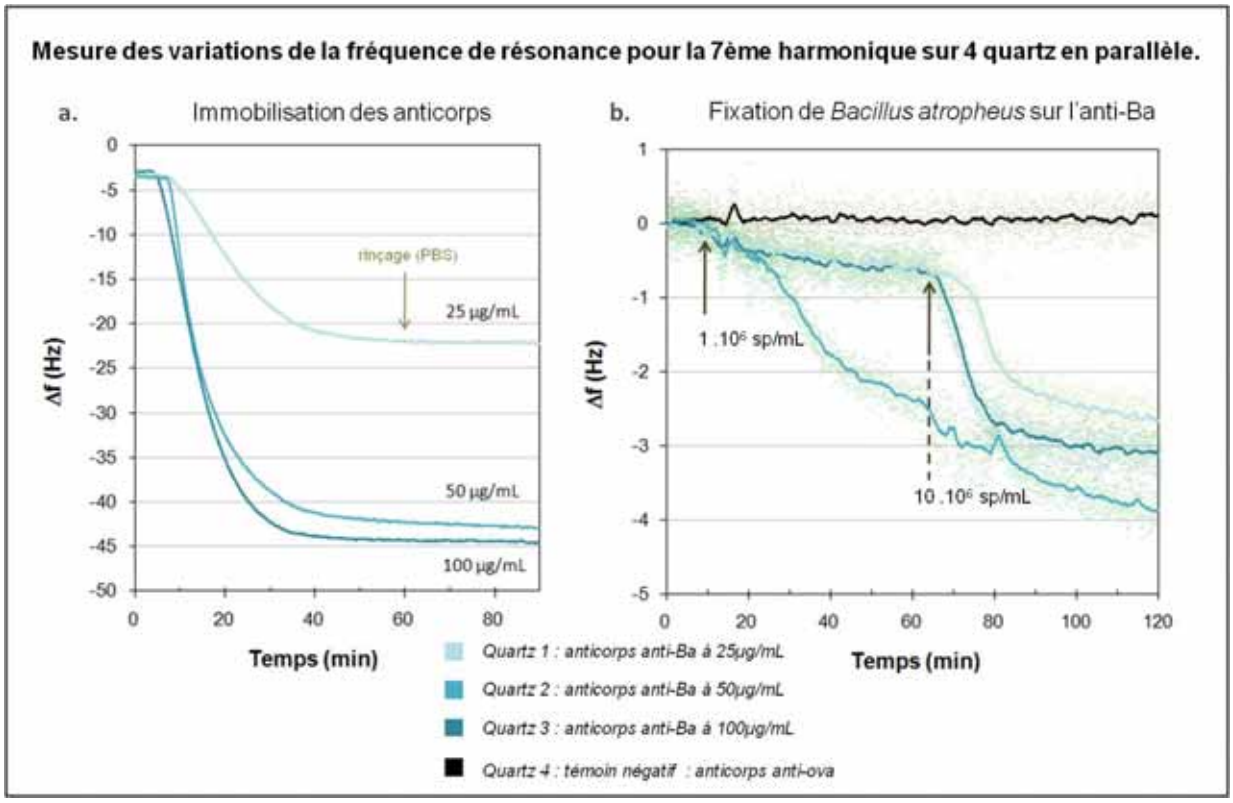


Figure 7 : Immobilisation d'anticorps dirigés contre *Bacillus atropheus* et détermination de la concentration optimale.

Nettoyage de la surface d'or des quartz : rinçage trichloréthylène, acétone, eau, puis plasma O_2 (1000 mL/h, 300W, 5min), puis bain piranha (50% H_2SO_4/ 50% H_2O_2 *v/v*)
Auto-assemblage : solution de MUA à 5mM dans l'éthanol, 12h dans l'obscurité, rinçage à l'éthanol : dans un bécher.
Montage des quartz dans le système QCMd-E4, et injection de tampon HEPES jusqu'à stabilisation du signal.
Activation : injection d'une solution d'EDC (200mM) et de NHS (50mM) préparée dans du tampon HEPES
Rinçage tampon HEPES puis injection de tampon HEPES.
Immobilisation : injection de solutions d'anticorps anti-Ba à 25, 50 ou 100µg/mL et d'anticorps anti-ova à 50µg/mL, préparées dans du tampon PBS. Incubation jusqu'à stabilisation du signal puis rinçage au PBS.
Saturation de la surface : injection d'une solution d'éthanolamine à 1M pH 8,5
Interaction : injection de solutions de *Bacillus atropheus* dans PBS, à 0,1 .10^6 sp/mL (non montré), puis 1 .10^6 sp/mL, puis 10. 10^6 sp/mL
Graphiques : en trait plein, signal moyen ; en couleur claire, tous les points de mesure.
Graphique a : Etape d'immobilisation des anticorps
Graphique b : Détection de *B. atropheus* à 1 .10^6 sp/mL, puis à 10. 10^6 sp/mL. Les courbes représentent les variations de fréquence par rapport à t_0 pris comme origine commune. L'instant t_0 précède de quelques minutes l'injection de *B. atropheus* sur les quartz.

L'immobilisation des anticorps se traduit par une baisse de la fréquence de résonance de l'ordre de 20Hz pour une solution à 25µg/mL et de 40Hz à partir de 50µg/mL. Ceci suggère que la concentration de 25µg/mL n'est pas suffisante pour que les anticorps recouvrent la totalité de la surface du quartz. Après un rinçage pendant 1h avec une solution de PBS, aucune augmentation de fréquence n'est observée, ce qui démontre que **les anticorps ont bien été immobilisés sur la couche auto-assemblée de MUA**.

De plus, l'interaction spécifique de *Bacillus atropheus* avec l'anti-Ba est détectée, ce qui indique que **les anticorps sont immobilisés dans une conformation permettant l'interaction avec l'antigène contre lequel ils sont dirigés**. Même si l'interaction est détectée dès la concentration de 1.10^6 spores/mL sur les trois quartz fonctionnalisés avec

l'anti-Ba, la variation de fréquence de résonance la plus importante correspond à la solution d'anticorps à 50µg/mL.

En ce qui concerne la concentration de 25µg/mL, ce résultat rejoint l'observation précédente et confirmerait que la surface du quartz n'a pas été suffisamment recouverte par les anticorps. Pour la concentration de 100µg/mL au contraire, on peut supposer que des effets d'encombrement stérique limitent l'accessibilité aux sites de reconnaissance. Ainsi, l**a concentration de 50µg/mL apparaît comme le meilleur compromis entre recouvrement de la surface et limitation de l'encombrement stérique.** C'est donc cette valeur qui a été choisie.

III.1.3.d. Validation de l'interaction pour 4 couples anticorps/antigène

- *Interaction dans un milieu propre*

L'expérience présentée précédemment démontre la possibilité d'immobiliser l'anticorps « anti-Ba » sur une couche auto-assemblée de MUA, dans une conformation permettant une interaction avec *Bacillus atropheus*. **Pour confirmer la validité de cette méthode, le même protocole a été appliqué à d'autres anticorps, dirigés contre de nouveaux antigènes** : une protéine, l'ovalbumine ; la bactérie modèle *Escherichia coli*, et un virus, Cydia pomonella granulosis virus (CpGV). Ce virus est utilisé comme insecticide en particulier dans les vergers de pommiers, car il infecte les parasites de cet arbre.

Les anticorps sont immobilisés selon le protocole décrit précédemment, puis les antigènes sont injectés en utilisant des solutions de concentration croissante. Cette méthode séquentielle ne permet pas d'établir la relation entre la variation de fréquence et la concentration en antigènes, mais elle permet d'évaluer la concentration minimale détectable, ce qui donne une indication sur la sensibilité. Pour évaluer la spécificité de l'interaction, les antigènes sont injectés simultanément sur un quartz fonctionnalisé avec un anticorps non spécifique. Les variations de fréquence de résonance obtenues pour l'ensemble de ces tests sont rassemblées figure 8.

		Ovalbumine	Virus CpGV	*B.atropheus*	*E.coli*
Dilution	Concentration de la solution mère	1 mg/mL	1,1.10^9 gr./mL	1,4.10^9 sp./mL	2,4.10^9 ufc/mL
10^{-4}	Variation de fréquence	0 Hz	0 Hz	0 Hz	0 Hz
10^{-3}		**-1.4 Hz**	0 Hz	**-1 Hz**	0 Hz
10^{-2}		-6.3 Hz *(-1.7 Hz)*	0 Hz	-7.5 Hz	**-2.8 Hz**
10^{-1}		-11.5 Hz *(-4 Hz)*	**-1.1 Hz**	-10.7 Hz *(-1.2 Hz)*	-12.6 Hz *(-1.2 Hz)*

Figure 8 : Variations de fréquence de résonance enregistrées sur microbalance à quartz lors de l'interaction de quatre antigènes avec les anticorps spécifiques immobilisés sur une couche auto-assemblée de MUA.

On peut noter en premier lieu que **les quatre interactions ont pu être détectées**, ce qui confirme la **fiabilité** du protocole d'immobilisation et sa **reproductibilité pour divers anticorps**. Les limites de détection sont de 1µg/mL pour l'ovalbumine, de $1{,}1.10^8$granules/mL pour le virus CpGV, de $1{,}4\ .10^6$spores/mL pour *Bacillus atropheus*, et de 24.10^6 ufc/mL pour *E. coli*.

Ce dernier résultat est comparable à celui obtenu par X. Su et S. Li, qui ont détecté *E. coli* à partir de 1.10^6 cfu/mL à l'aide d'une microbalance à quartz commercialisée par la société Q-sense [20]. La chimie utilisée dans cette étude est d'ailleurs également un auto-assemblage d'alcanethiols à fonctions acides carboxyliques.

Pour ce qui est des autres espèces, la comparaison n'est pas aisée car de nombreux laboratoires développent eux-mêmes leur système de microbalance, en ajoutant des dispositifs d'amplification du signal afin d'abaisser les seuils de détection. Par exemple, les auteurs cités précédemment ont développé un résonateur piézoélectrique qui permet de détecter *E. coli* dès la concentration de $1.\ 10^3$ cfu/mL [21].

Suite à ces résultats encourageants, les mêmes tests de détection ont été répétés, en diluant les antigènes à détecter non plus dans du tampon PBS mais dans un échantillon contenant diverses entités biologiques, appelé « bruit de fond atmosphérique ». Ceci permet d'évaluer plus précisément la spécificité de reconnaissance entre l'antigène et l'anticorps immobilisé.

- *Interaction dans « bruit de fond atmosphérique » : test de spécificité.*

Pour préparer du « bruit de fond atmosphérique », une grande quantité d'air est aspirée dans un lieu public, et les entités biologiques et minérales qu'il contient sont dissoutes dans un liquide appelé « tampon de collecte ». Cet échantillon contient donc un mélange de micro-organismes, de virus, de protéines et de matières minérales de natures et de quantités aléatoires. Cette méthode de prélèvement est utilisée en particulier dans les domaines de l'environnement et de la biodéfense, pour vérifier la qualité de l'air. Pour parvenir à détecter ensuite une entité biologique particulière diluée dans un tel mélange, le système utilisé doit être particulièrement spécifique. Ceci a été testé sur les quartz fonctionnalisés par auto-assemblage de MUA.

Ainsi, des dilutions des antigènes présentés précédemment ont été réalisées dans du bruit de fond atmosphérique, soit pur, soit dilué dix fois dans le tampon de collecte. Ensuite, des tests d'interaction ont été réalisés selon le même protocole que précédemment.

La figure 9 présente les variations de fréquence de résonance enregistrées lors du test d'interaction sur l'anticorps dirigé contre *Bacillus atropheus.* L'injection de bruit de fond atmosphérique (dilué dix fois) se traduit par une baisse de fréquence de 1Hz, ce qui indique qu'une petite quantité de matière se fixe de façon non spécifique sur la surface. Malgré cela, *Bacillus atropheus* est détecté dès la concentration de $1{,}4\ .10^6$ spores/mL, comme dans les tests réalisés dans du tampon « propre ». Dans du bruit de fond atmosphérique pur, le même résultat a été obtenu, et ceci également pour l'ovalbumine et la bactérie *E. coli*.

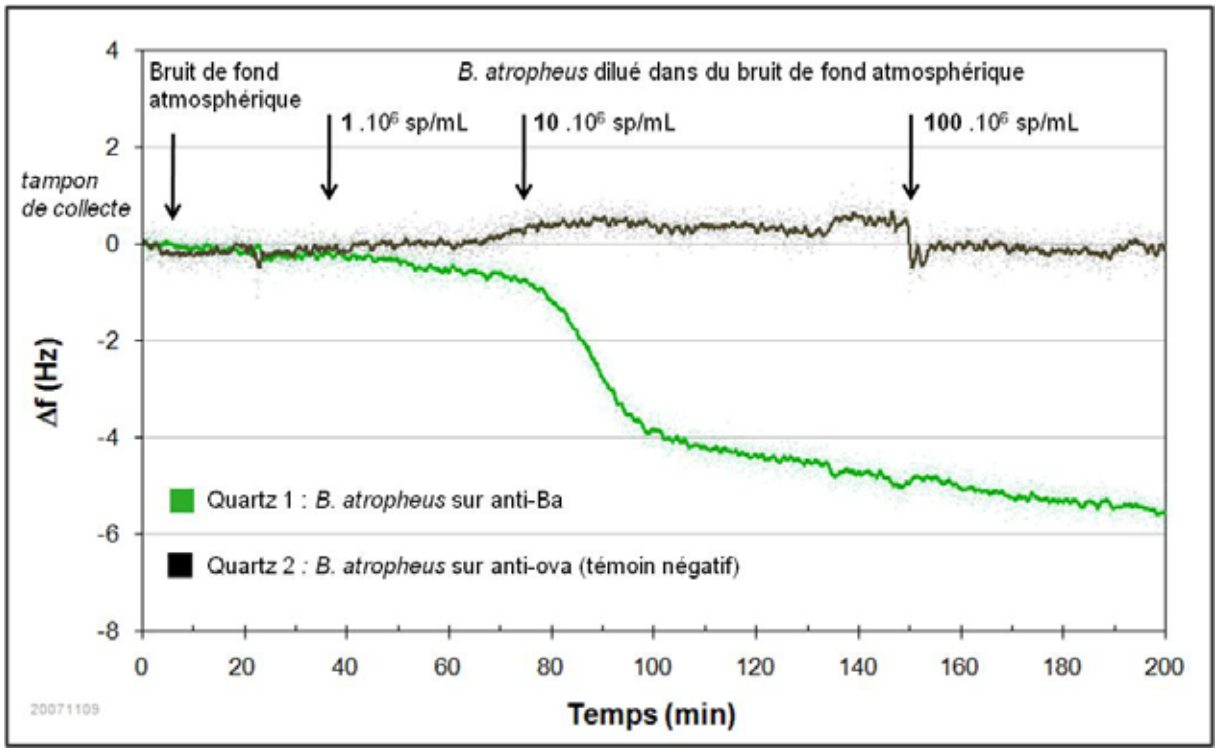


Figure 9 : Interaction de *Bacillus atropheus* sur l'anticorps anti-BA dans un échantillon de bruit de fond atmosphérique à partir des variations de fréquence de résonance enregistrées sur une microbalance à quartz.

Nettoyage de la surface d'or de deux quartz : rinçage trichloréthylène, acétone, eau, puis plasma O_2 (1000 mL/h, 300W, 5min), puis bain piranha (50% H_2SO_4/ 50% H_2O_2 *v/v*)
Auto-assemblage : solution de MUA à 5mM dans l'éthanol, 12h dans l'obscurité, rinçage à l'éthanol : dans un bécher.
Montage des quartz dans le système QCMd-E4, et injection de tampon HEPES jusqu'à stabilisation du signal.
Activation : injection d'une solution d'EDC (200mM) et de NHS (50mM) préparée dans du tampon HEPES
Rinçage tampon HEPES puis injection de tampon HEPES.
Immobilisation : injection d'une solution d'anticorps anti-Ba à 50 µg/mL sur un quartz et d'une solution d'anticorps anti-ova à 50µg/mL, sur l'autre quartz. Solutions préparées dans du tampon PBS. Incubation jusqu'à stabilisation du signal puis rinçage au PBS.
Saturation de la surface : injection d'une solution d'éthanolamine à 1M pH 8,5.
Stabilisation dans le bruit de fond atmosphérique : injection de tampon de collecte jusqu'à stabilisation du signal, puis d'un échantillon de bruit de fond atmosphérique, dilué dix fois dans du tampon de collecte.
Détection : injection de solutions *Bacillus atropheus* dans PBS, à 1 .10^6 sp/mL, puis 10 .10^6 sp/mL, puis 100. 10^6 sp/mL préparées dans du bruit de fond atmosphérique dilué dix fois dans du tampon de collecte.
Graphiques : en trait plein, signal moyen ; en couleur claire, tous les points de mesure.

Les anticorps immobilisés sur une couche de MUA ont donc pu interagir de façon spécifique avec les antigènes dilués dans un milieu complexe. Le bilan de ces tests est présenté figure 10.

[20] : X.L. Su et Y. Li, Trans. ASAE, 2005, **48 (1)**, 405-413.
[21] : X.L. Su et Y.B. Li, *Biosensors Bioelectronics*, 2004, **19 (6)**, 563-574.

Dilution	Concentration de la solution mère	Ovalbumine	*Bacillus atropheus*	*Escherichia coli*
		1 mg/mL	$1{,}4.10^9$ spores/mL	$2{,}4.10^9$ cfu/mL
10^{-3}	Variation de fréquence	**-2,5 Hz**	**-0,5 Hz**	0 Hz
10^{-2}		-4 Hz *(-0,5 Hz)*	**-2,5 Hz**	**-1,7 Hz**
10^{-1}		-10,5 Hz *(-6,5 Hz)*	-3 Hz *(-0,2 Hz)*	-7 Hz *(-4 Hz)*
Echantillon de bruit de fond atmosphérique (maximum observé)			-1 Hz	

Figure 10 : Variations de fréquence de résonance enregistrées sur microbalance à quartz lors des tests de détection de trois antigènes dilués dans un échantillon de bruit de fond atmosphérique pur. Anticorps immobilisés sur une couche auto-assemblée de MUA. Entre parenthèses : valeurs enregistrées sur le quartz utilisé comme témoin négatif, sur lequel est immobilisé un anticorps ne reconnaissant pas cet antigène.

Que les tests de détection soient réalisés dans du tampon PBS ou dans du bruit de fond atmosphérique, une **fixation non spécifique** des antigènes sur la surface est observée **pour les concentrations les plus élevées**. On peut supposer qu'il s'agit d'une interaction hydrophobe entre les entités biologiques et les chaines alkyles du MUA. Ceci pourrait conduire à des résultats faussement positifs dans le cas d'analyse de solutions concentrées. Pour limiter ce type d'interaction, il pourrait être intéressant d'ajouter un espaceur polyéthylène glycol, comme l'on proposé les équipes de J. Lahiri et E. Ostuni [22] [23].

En conclusion, quatre anticorps ont été immobilisés sur une couche auto-assemblée de MUA, dans une conformation suffisamment correcte pour permettre l'interaction avec quatre antigènes, à la fois dans des conditions modèles (antigènes purifiés) et dans des conditions se rapprochant d'une analyse réelle d'échantillon prélevé dans l'environnement (antigènes dilués dans du bruit de fond atmosphérique).

L'étape d'auto-assemblage, réalisée sur un quartz utilisé comme biocapteur, ne présente pas de difficulté particulière de mise en œuvre. Cependant, dans le cas d'une miniaturisation, un agent évitant l'évaporation devrait être ajouté, car le solvant utilisé est de l'éthanol.

Dans le cas de solutions d'antigènes concentrées, une fixation non spécifique sur la surface a été observée. Pour améliorer cet aspect, de nouveaux tests peuvent être envisagés avec un polyéthylène glycol portant à la fois une fonction thiol et une fonction acide carboxylique.

Dans le paragraphe suivant, c'est précisément une chimie où le polyéthylène glycol est utilisé comme espaceur qui est présentée.

III.1.4. Immobilisation par l'intermédiaire du polymère PLLgPEG-biotine

III.1.4.a. Principe

Le polyéthylène glycol (PEG) est utilisé depuis les années 1980 pour limiter l'adsorption de protéines sur des surfaces [24]. Par ailleurs, ses extrémités peuvent être modifiées pour porter des fonctions réactives qui permettent de l'employer comme bras espaceur pour l'immobilisation de biomolécules [25]. Il a été démontré que des anticorps ainsi immobilisés sur une brosse de polymère présentaient une biodisponibilité accrue [26].

Dans ce contexte, l'équipe de Marcus Textor de l'ETH de Zurich a proposé d'utiliser un copolymère de poly-L-lysine et de PEG portant des fonctions biotines (PLLgPEG-biotine) comme molécule de liaison entre une surface et des biomolécules (figure 11) [27].

La poly-L-lysine est chargée positivement, ce qui permet une fixation par liaison électrostatique avec toute surface portant des charges négatives, par exemple de la silice activée par plasma d'oxygène. Les chaînes de poly-L-lysine s'orientent donc vers la surface, tandis que les chaînes de PEG s'organisent perpendiculairement, en brosse de polymère. Un groupement biotine a été ajouté à l'extrémité de certaines de ces chaînes pour permettre la fixation de streptavidine, et ensuite de toute biomolécule biotinylée. La densité de chaînes PEG biotinylées par rapport aux chaînes libres est optimisée pour limiter l'encombrement stérique et conserver les propriétés du PEG contre l'adsorption non spécifique.

Cette technique a été testée pour la fonctionnalisation de surface de quartz utilisés en tant que microbalance, comme décrit dans le paragraphe précédent. En revanche, ces quartz ne sont pas recouverts d'or mais d'une couche de SiO_2. Les couples antigène/anticorps étudiés sont également les mêmes que précédemment.

Le principe d'immobilisation des anticorps par l'intermédiaire du polymère PLLgPEG-biotine est présenté figure 11. Dans un premier temps, le PLLgPEG-biotine est immobilisé par liaison électrostatique sur la surface de SiO_2 activée par plasma d'oxygène. De la neutravidine est ensuite utilisée comme intermédiaire pour fixer des anticorps secondaires biotinylés. Ces anticorps secondaires sont dirigés contre des marqueurs du lapin : ils reconnaissent donc les anticorps d'intérêt (dirigés contre les antigènes), qui sont extraits de sérum de lapins immunisés.

La totalité de ces étapes est réalisée par injections successives des solutions dans les chambres fluidiques du système de microbalance à quartz Qsense. Un exemple des variations de fréquence observées est donné figure 12. Le protocole adopté est résumé dans la légende de cette figure.

---

[22] : J. Lahiri, L. Isaacs, J. Tien, et G.M. Whitesides, Anal. Chem., 1999, 71, 777-790
[23] : E. Ostuni, L. Yan, G.M. Whiteside, Colloids and Surfaces B : Biointerfaces, 1999, 15, 3-30

[24] : Y. Mori, S. Nagaoka, H. Takiuchi, T. Kikuchi, N. Noguchi, H. Tanzawa, Y. Noishiki, *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs.*, 1982, **28**, 459-63.
[25] : S. Zalipsky, *Bioconjugate Chem.*, 1995, **6**, 150-165
[26] : K. Holmberg, K. Bergström, M.-B. Stark, 1992. In : Harris, J.M. (Ed.), Poly(ethylene glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications. Plenum Press, New York
[27] : N.-P. Huang, J. Vörös, S.M. De Paul, M. Textor, et N.D. Spencer, *Langmuir*, 2002, **18**, 220-230

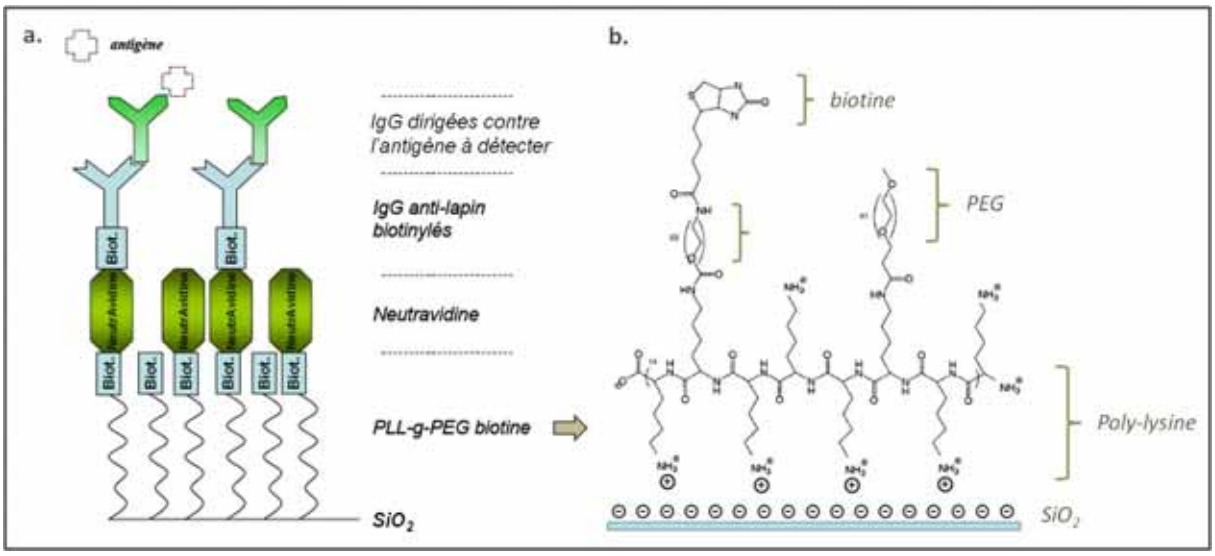


Figure 11 : Schéma de principe de l'immobilisation d'anticorps sur une couche de PLLgPEG-biotine (a), et détail de la structure de ce polymère (b).

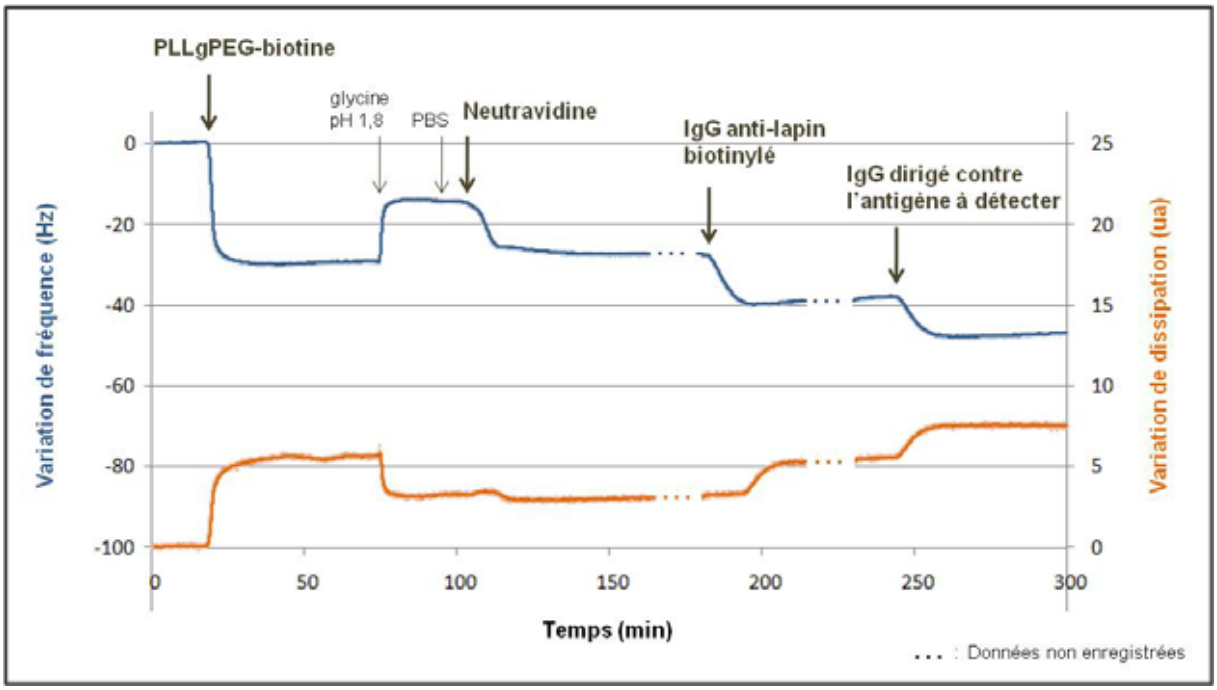


Figure 12 : Variations de la fréquence de résonance et de la dissipation enregistrées sur microbalance à quartz, au cours de l'immobilisation d'anticorps sur une couche de PLLgPEG-biotine, par l'intermédiaire de neutravidine et d'un anticorps secondaire (anti-lapin) biotinylé.

Un quartz SiO_2 est activé par un traitement au plasma O2, à 1000mL/h et 300W pendant 5min, puis monté dans le système fluidique. Les solutions suivantes sont ensuite injectées successivement à un débit constant de 10µL/min :

- PLLgPEG biotine à 1mg/mL dans tampon HEPES. Rincé 5min avec une solution de glycine à pH 1,8 pour éliminer tout agrégat et obtenir ainsi une couche homogène. Rincé ensuite au PBS
- Neutravidine à 50µg/mL dans tampon PBS
- Anticorps secondaire biotinylé dirigé contre les marqueurs du lapin (IgG anti-lapin), à 50µg/mL dans tampon PBS
- Anticorps dirigé contre l'antigène à détecter, à 50µg/mL dans tampon PBS.

- *III.1.4.b. Etude des interactions antigène/anticorps*

Une fois les anticorps immobilisés sur les quartz fonctionnalisés à l'aide de PLLgPEG-biotine, les antigènes ont été injectés en utilisant comme précédemment des solutions de concentration croissante. Les résultats, présentés figure 13, montrent que **trois interactions antigène/anticorps ont pu être détectées**, sur les anticorps dirigés contre l'ovalbumine, *Bacillus atropheus* et *Escherichia coli*. Ceci confirme que **les anticorps ont été correctement immobilisés sur la couche de PLLgPEG**. Aucune fixation non spécifique n'est observée, même avec les solutions les plus concentrées, ce qui peut être attribué à la présence de chaînes de polyéthylène glycol.

Cependant les variations de fréquence de résonance sont plus faibles que lorsque les anticorps sont fixés sur une couche auto-assemblée de MUA, et les limites de détection d'*E. coli* et *B. atropheus* sont donc plus élevées. Par ailleurs, le virus CpGV n'a pas pu être détecté. Ce résultat suggère que **l'empilement de plusieurs couches de molécules intermédiaires réduit au final la densité d'anticorps disponibles pour reconnaître les antigènes**. En effet, pour chaque étape, le recouvrement de la surface ne peut pas être tout à fait total, malgré les efforts d'optimisation. Le rendement global est donc d'autant plus faible que les étapes sont nombreuses.

		Ovalbumine	Virus CpGV	*B. atropheus*	*E.coli*
Dilution	Concentration de la solution mère	1 mg/mL	$1{,}1.10^9$ gr./mL	$1{,}4.10^9$ sp./mL	$2{,}4.10^9$ ufc/mL
10^{-4}	Variation de fréquence	0 Hz	0 Hz	0 Hz	0 Hz
10^{-3}		**-2,8 Hz**	0 Hz	0 Hz	0 Hz
10^{-2}		-3,4 Hz	0 Hz	**-2,2 Hz**	**-2.2 Hz**
10^{-1}		-3,6 Hz	0 Hz	-4,9 Hz	-4,9 Hz

Figure 13 : Variations de fréquence de résonance enregistrées sur microbalance à quartz lors de l'interaction de quatre antigènes avec les anticorps spécifiques immobilisés sur une couche de PLLgPEG. Aucune variation de fréquence n'a été mesurable sur les quartz utilisés comme témoins négatifs.

Pour conclure, la fonctionnalisation de surface SiO_2 par le polymère PLLgPEG permet d'obtenir de **très bons résultats en termes de spécificité**. Il aurait donc été intéressant de répéter les tests de détection des antigènes dans du bruit de fond atmosphérique, mais ceci n'a pas été réalisé pour des raisons de disponibilité des échantillons.

En terme de sensibilité, cette technique est moins performante que l'auto-assemblage d'alcanethiols, probablement à cause du nombre important d'étapes intermédiaires.

Enfin, du point de vue de la mise en œuvre, aucune difficulté particulière n'apparaît, même si le **nombre élevé d'étapes** rend le protocole fastidieux. Pour améliorer ces deux derniers points, la production d'anticorps biotinylés dirigés contre les antigènes peut être

proposée. Ceci éliminerait l'étape de fixation des anticorps secondaires dirigés contre les marqueurs de lapin.

Par ailleurs, **la miniaturisation est facilement envisageable** car tous les solvants utilisés sont aqueux.

Dans les quatre techniques présentées jusqu'ici, la surface est fonctionnalisée dans un premier temps, puis les biomolécules y sont adressées et immobilisées. Ces étapes de préparation de la surface sont plus ou moins nombreuses et fastidieuses selon les méthodes choisies. Une autre approche consiste à adresser et immobiliser les biomolécules simultanément. C'est par exemple le cas de pour l'électrodépôt de polypyrrole qui est étudié dans le paragraphe suivant.

III.1.5. Immobilisation et adressage simultanés par électrochimie localisée : polymérisation de pyrrole

III.1.5.a. Polymérisation de pyrrole et électrodépôt

Le polypyrrole est un polymère (semi)conducteur obtenu par oxydation électrochimique du monomère pyrrole. Plusieurs équipes ont proposé de l'utiliser pour immobiliser des biomolécules, que ce soit par adsorption physique [28], par greffage covalent [29], ou par incorporation directe dans le polymère [30] [31]. L'équipe de Thierry Livache du laboratoire CREAB du CEA de Grenoble a mis au point une autre méthode, basée sur la copolymérisation de monomères de pyrrole et d'oligonucléotides greffés à des unités pyrrole *via* un bras espaceur [32]. Cet espaceur permet d'éloigner l'ADN de la surface et d'augmenter ainsi sa disponibilité. Le protocole a été mis au point essentiellement sur surface d'or, sur laquelle le copolymère précipite lorsque la chaîne polymérisée atteint une taille critique et devient insoluble. L'adhérence du polypyrrole sur l'or peut être expliquée par un phénomène de délocalisation des électrons [33].

Plus récemment, ce principe a été adapté à l'immobilisation de protéines. Dans ce cas, une unité pyrrole est greffée à l'extrémité N-terminale des protéines, également *via* un bras espaceur [34] [35].

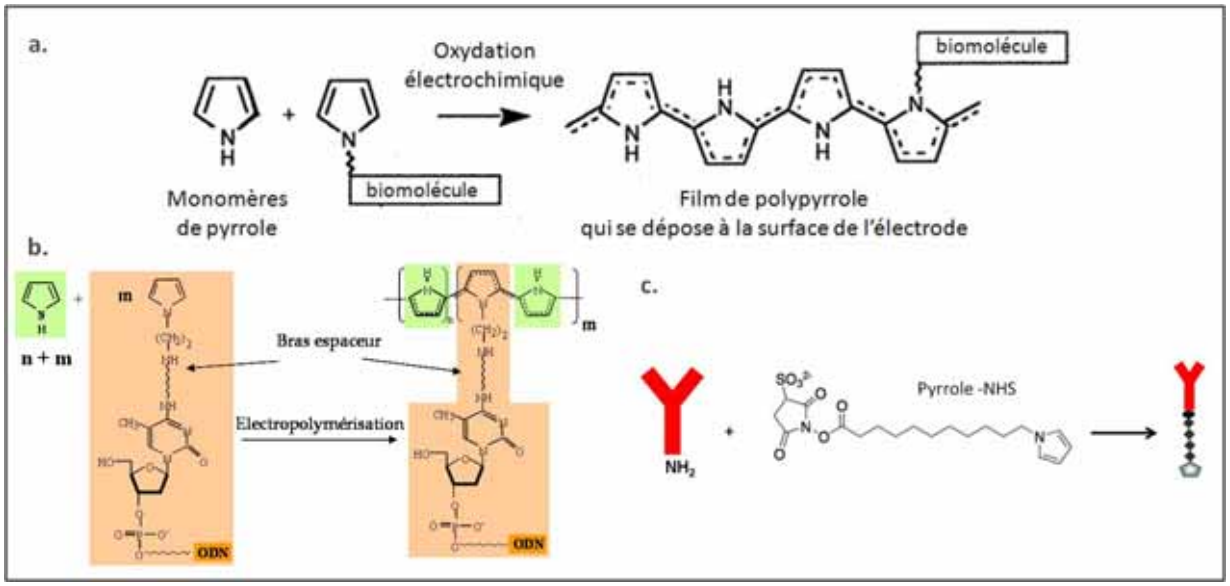


Figure 14 : Immobilisation de biomolécule par électropolymérisation de pyrrole.

a. Principe général, adapté de [32]

b. Immobilisation d'un oligonucléotide sur lequel un nucléoside-pyrrole-phosphoramidite a été introduit en 5' [33]

c. Immobilisation d'un anticorps à l'aide de N-hydroxysuccinimidyl 6-(pyrrol-yl)-caproate (« pyrrole-NHS »).

[28] : B. Saouid, N. Jammul, M.L. Abel, M. Chehimi, G. Dodin, *Synthetic Metals*, 1997, **87**, 97-103

[29] : F. Garnier, H. Korri-Youssoufi, P. Srivastava, B. Mandrand, T. Delair, *Synthetic Metals*, 1999, **100**, 89-94

[30] : J. Wang, M. Jiang, A. Fortes, B. Mukherjee, *Analytical Chimica Acta*, 1999, **402**, 7-12

[31] : J. Wang, M. Jiang, *Langmuir*, 2000, **16**, 2269-2274

[32] : T. Livache, A. Roget, E. Dejean, C. Barthet, G. Bidan et R. Teoule, *Nucleic Acids Research*, 1994, 22, **15**, 2915-2921

[33] : Emeline Descamps, Miniaturisation des techniques de structuration de substrat par électropolymérisation de pyrrole : application aux biopuces et à l'électronique moléculaire, 209p, Thèse, Electrochimie, Université Joseph Fourier, Grenoble, 2008

[34] : L. Grosjean, B. Cherif, E. Mercey, A. Roget, Y. Levy, P. Noel Marche, M.-B. Villiers, T. Livache, *Analytical Biochemistry*, 2005, **347**, 193-200

Pour aller plus loin, l'équipe de Thierry Livache a proposé de réaliser simultanément l'adressage des biomolécules et leur immobilisation par électropolymérisation. Dans ce cas, la chambre d'électrochimie est constituée simplement par la goutte déposée. Dans un premier temps, ceci a été réalisé en adaptant un fil de platine à l'intérieur d'un cône de micropipette. Les spots ainsi obtenus ont des diamètres de l'ordre de 800µm. Ces premiers tests ont permis de caractériser les plots en terme d'épaisseur du film de polymère et d'efficacité d'hybridation de l'ADN [36] [37]. Dans un deuxième temps, la technique a été adaptée au dépôt par aiguilles, c'est-à-dire pour réaliser des spots de 200µm de diamètre environ. Ce travail a abouti à la fabrication du robot Polypotter et à sa commercialisation par la société Genoptics.

Enfin Emeline Descamps du laboratoire CREAB du CEA Grenoble et Thierry Leïchlé du LAAS-CNRS ont montré que cette technique pouvait être miniaturisée en utilisant le robot Bioplume [38]. Cette méthode particulièrement attractive dans le cadre de l'immobilisation de biomolécules sur des surfaces réduites a été étudiée en détail et fait l'objet des paragraphes suivants.

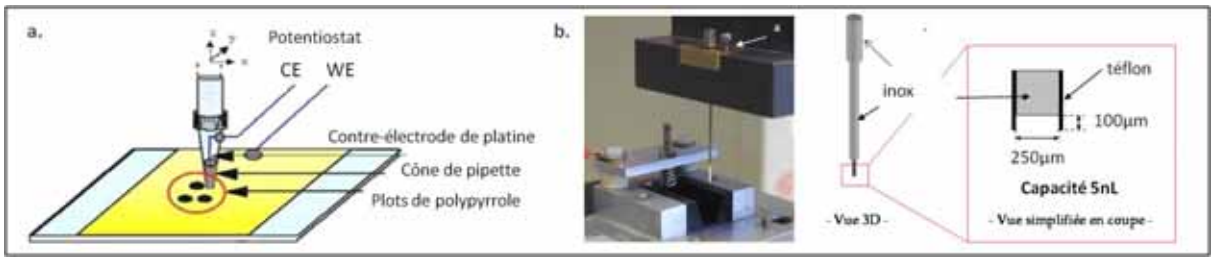


Figure 15 : Electrodépôt de biomolécules à l'aide d'une pipette ou d'une aiguille.
a. Pipette modifiée pour intégrer un fil de platine ; b. Aiguille creuse pour électrochimie.

III.1.5.b. Electrodépôt adapté au robot Bioplume

- *Principe*

Comme vu précédemment, le robot Bioplume permet de déposer des gouttes de liquide de 10 à 20µm de diamètre à l'aide de microleviers (ou plumes) réalisés par les techniques de fabrication issues de la microélectronique (cf paragraphe I.2.1.a. et chapitre II).

Au cours des étapes d'optimisation des plumes, une électrode d'or a été intégrée à l'intérieur du canal. L'utilisation de Bioplume pour des tests d'électrodépôt a ainsi pu être envisagée. Dans un premier temps, le concept a été validé en déposant du cuivre, puis il a été appliqué à l'immobilisation d'ADN par électropolymérisation de pyrrole [38]. Pour évaluer la difficulté de mise en œuvre de cette technique, nous l'avons testée dans le cas du dépôt d'anticorps.

[35] : E. Suraniti, E. Sollier, R. Calemczuk, T. Livache, P. N. Marche, M. B. Villiers, Y. Roupioz, *Lab on Chip*, 2007, **7**, 1206
[36] : T. Livache, H. Bazin, P. Caillat, A. Roget, *Biosensors and Bioelectronics*, 1998, **13**, 629-634
[37] : T. Livache, B. Fouque, A. Roget, J. Marchand, *Analytical Biochemistry*, 1998, **255**, 188-194
[38] : E. Descamps, T. Leïchlé, B. Corso, S. Laurent, P. Mailley, L. Nicu, T. Livache, et C. Bergaud, *Advanced Materials*, 2007, **19**, 1816–1821

Le schéma de principe est présenté figure 16. Le dépôt est réalisé sur une surface conductrice. Cette surface est le siège de la réaction de polymérisation, et elle est donc appelée électrode de travail. La contre-électrode, qui sert à fermer le circuit électrique, est l'électrode d'or intégrée à la plume. Pour éviter tout court-circuit, cette électrode n'arrive pas jusqu'à l'extrémité de la plume. **La réaction électrochimique a lieu dans le volume de liquide constitué par la goutte déposée, c'est-à-dire quelques dizaines de femtolitres.** Ce volume réduit ne permet pas d'intégrer d'électrode de référence : toutes les réactions sont donc réalisées à différence de potentiel imposée entre l'électrode de travail et la contre-électrode. Concrètement, la sortie du potentiostat devant être reliée à l'électrode de référence est court-circuitée avec la contre-électrode. Ce sont ensuite les réactions les plus probables du point de vue thermodynamique qui ont lieu et qui équilibrent les courants à chaque électrode. Dans notre cas, la réaction ayant lieu à l'électrode de travail est l'oxydation du pyrrole (pour des temps courts), tandis que l'hydrolyse de l'eau a lieu à la contre-électrode. Des études précédentes ont montré que l'absence d'électrode de référence n'affecte pas la qualité du film de polypyrrole.

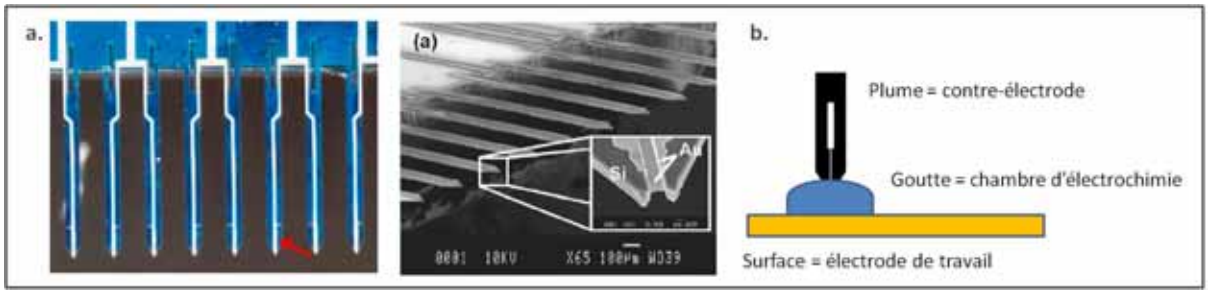


Figure 16 : Electrodépôt avec Bioplume
a. Images au microscope optique et au MEB d'une barrette de plumes, montrant l'électrode d'or
b. Schéma de principe de l'électrodépôt.

➢ *Contrôle par chrono-ampérométrie*

Le processus de dépôt électrochimique est contrôlé par chrono-ampérométrie : à l'aide d'un potentiostat, une différence de potentiel est appliquée entre la surface et la plume, et simultanément, les variations de courant au cours du temps sont enregistrées. Tous les courants mesurés correspondent à la somme des courants circulants dans les 10 plumes centrales.

La figure 17 présente un exemple de chrono-ampérogramme obtenu en mode impulsionnel. Dans ce cas, l'expérience peut être divisée en trois phases. Tout d'abord, une différence de potentiel nulle est maintenue entre les électrodes, puis une impulsion de 2V est appliquée (temps t_0), et enfin la différence de potentiel est de nouveau ramenée à zéro (temps t). Au temps t_0, on observe un pic de courant dû à la formation de la double couche électrique sur la surface. La valeur maximale de ce courant n'est pas significative car elle correspond à une limitation instrumentale. On observe ensuite une diminution du courant qui correspond à la consommation du pyrrole par la réaction électrochimique. Il a été démontré précédemment que cette courbe correspond à une cinétique en $(1/\sqrt{t})$, ce qui correspond à l'équation de Cottrell et indique qu'il y a un appauvrissement en pyrrole à proximité de la surface. Enfin, au temps t, la décharge de la double couche électrique se traduit par un pic négatif de courant. Le copolymère de polypyrrole est également réduit. Cette méthode implusionelle a été utilisée

pour déterminer les temps de polymérisation optimaux. En revanche, dans le cas de la réalisation d'une matrice, il est préférable de travailler en mode continu.

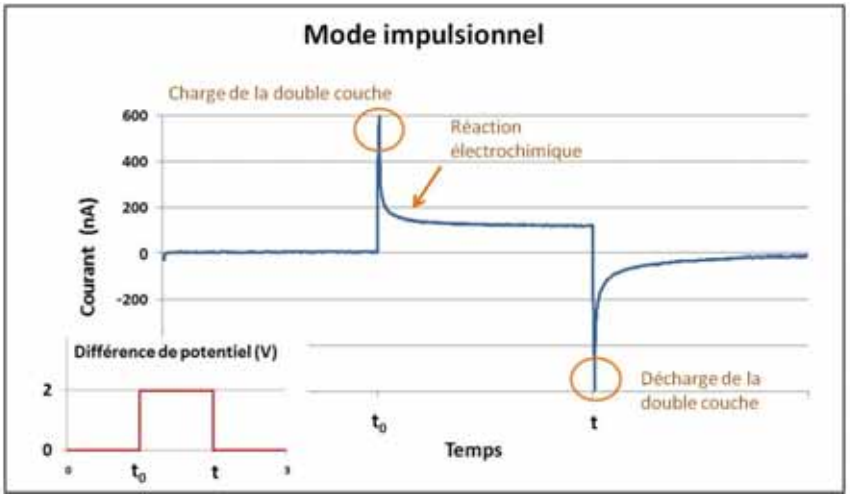


Figure 17 : Exemple de chrono-ampérogramme obtenu en mode impulsionnel

L'électrodépôt en mode continu consiste à appliquer une différence de potentiel constante de 2V entre la surface et la plume, et à réaliser ensuite plusieurs dépôts successivement. Le circuit n'étant fermé que lorsque la plume est en contact avec la surface, c'est le temps de dépôt qui détermine la durée de la réaction électrochimique. Un exemple de chrono-ampérogramme obtenu dans ce cas est présenté figure 18. Pour chaque spot, on observe comme précédemment le pic de charge de la double couche électrique, puis la chute de courant liée à l'électropolymérisation. Le retour à un courant nul après chaque spot correspond à une mesure en circuit ouvert. On observe également un pic supplémentaire à l'instant où le contact entre les plumes et la surface est rompu. Ce pic correspond d'une part à un enrichissement de la solution en pyrrole dû au mouvement de convexion entrainé par le déplacement de la plume. D'autre part, le décrochage entraîne un rééquilibrage du système électrochimique, qui peut également expliquer ce pic.

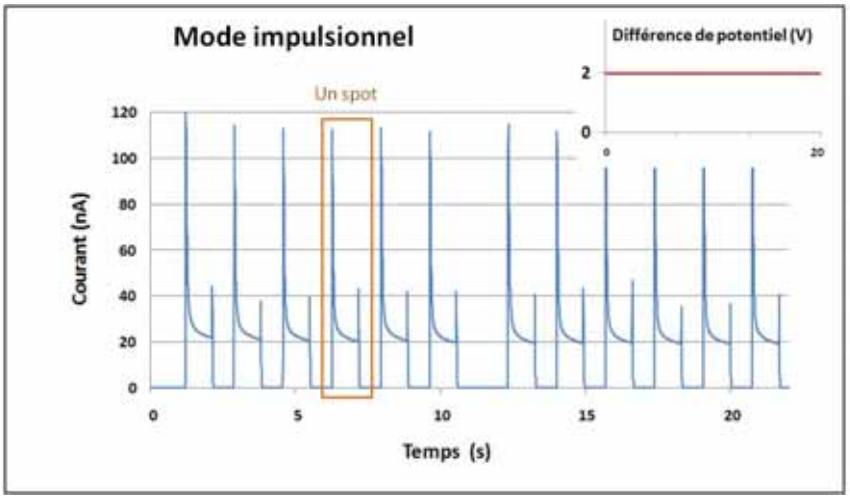


Figure 18 : Exemple de chrono-ampérogramme obtenu en mode continu

La qualité du montage est également vérifiée en observant le comportement du système en circuit ouvert. Lorsque les électrodes sont plongées dans l'électrolyte, elles se

mettent spontanément au potentiel d'équilibre, qui dépend de la nature de l'électrode et de la composition de la solution. Comme les deux électrodes sont en or, la différence entre les potentiels d'équilibre est proche de zéro. Lorsque ces électrodes sont reliées au potentiostat et que la valeur de « 0V par rapport au potentiel de circuit ouvert » est appliquée comme différence de potentiel de consigne, il ne doit donc pas y avoir de courant généré. L'observation contraire indique la présence d'un court-circuit.

III.1.5.c. Electrodépôt d'anticorps avec Bioplume : validation en fluorescence

Les tests d'électrodépôt d'anticorps avec Bioplume se sont déroulés en deux temps. D'abord, les paramètres de dépôt ont été optimisés à l'aide d'anticorps modèles (ou immunoglobulines G, ou IgG) permettant une visualisation en fluorescence, puis la technique a été appliquée au dépôt d'anticorps dirigés contre des marqueurs membranaires de lymphocytes B et T.

Les paramètres de dépôt sont testés à l'aide d'anticorps issus de sérum de lapin sur lesquels des unités pyrroles ont été greffées. L'immobilisation de ces anticorps est évaluée en réalisant une interaction avec un anticorps secondaire biotinylé, dirigé contre des anticorps issus du lapin (IgG anti-lapin biotine). L'interaction est révélée à l'aide de streptavidine couplée à une protéine fluorescente, la phycoérythrine (SAPE). Un anticorps humain portant une unité pyrrole est utilisé comme témoin négatif.

Les anticorps ont été déposés sur des lames de verre recouvertes d'une mince couche d'or (55nm). Des matrices de 64 spots sont réalisées, en appliquant un potentiel continu de 2V entre la surface et les plumes. Dans ce cas, la durée de polymérisation correspond au temps de contact des plumes sur la surface d'or. Deux concentrations d'anticorps (1µM et 5µM) sont testées ainsi que 4 temps de contact (25, 50, 75 et 310ms). Après le dépôt, la surface est rincée avec du PBS, saturée avec une solution de BSA, puis incubée successivement avec l'anticorps secondaire « anti-lapin-biotine » puis avec la SAPE.

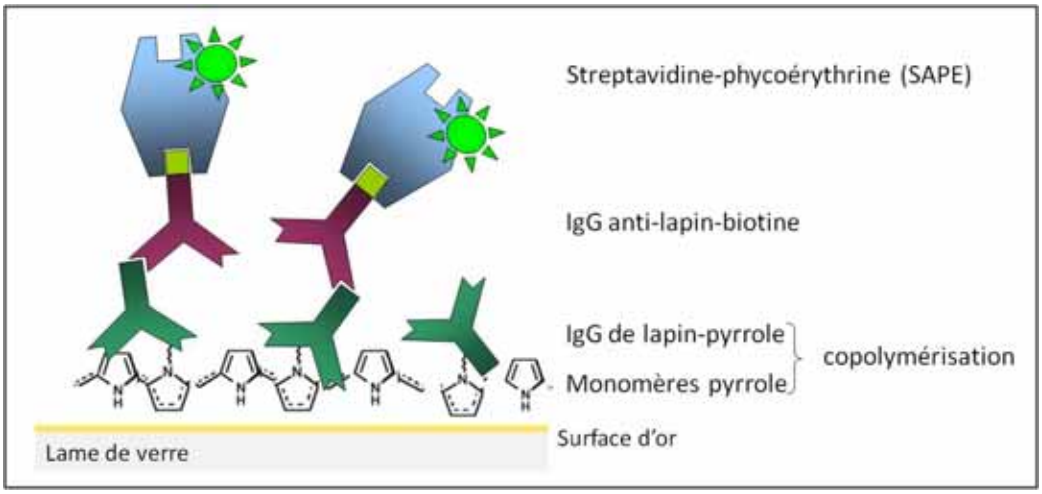


Figure 19 : Schéma de l'interaction utilisée pour valider l'immobilisation d'anticorps sur une surface d'or par électropolymérisation.

La figure 20 présente les résultats obtenus en fluorescence pour un temps de contact de 50ms. On observe bien un **signal spécifique sur les matrices d'anticorps de lapin, ce qui confirme que celui-ci a été correctement immobilisé**.

Les matrices d'anticorps humains utilisés comme témoins négatifs apparaissent plus sombres que le bruit de fond car les images sont réalisées de manière à obtenir le contraste maximal. Le signal non nul du bruit de fond correspond à l'adsorption non spécifique de protéines, dont en partie la SAPE, qui est plus importante sur la surface d'or vierge que sur les zones fonctionnalisées. Le chrono-ampérogramme enregistré au cours du dépôt confirme qu'il y a bien eu circulation d'un courant lors de la réalisation de chacun des spots (figure 20b).

Le signal obtenu avec des solutions à **5µM** d'anticorps est plus intense qu'à 1µM (contraste* 1,5 fois meilleur) et les spots sont beaucoup plus homogènes. C'est donc cette concentration qui a été choisie. Par ailleurs, l'analyse de l'ensemble des spots montre qu'une durée de polymérisation de **50ms** est suffisante pour obtenir des spots homogènes de façon reproductible (résultats non détaillés). C'est donc cette valeur qui a été retenue.

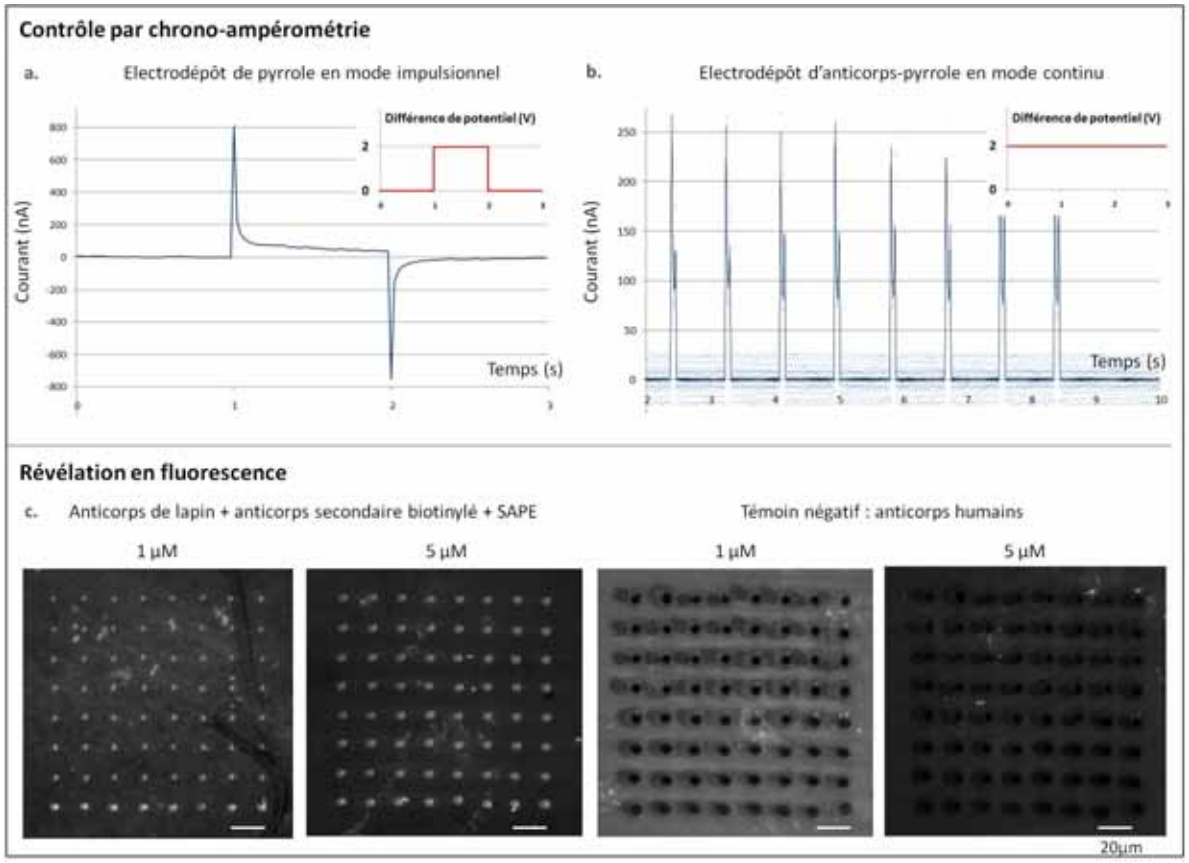


Figure 20 : Electrodépôt d'anticorps par polymérisation de pyrrole : contrôle par chrono-ampérométrie (a/b) et révélation en fluorescence.

a. Plumes chargées avec une solution de pyrrole à 50mM dans du tampon F et mises en contact avec une lame recouverte d'or. Application ensuite d'une impulsion de 2V pendant 1s.

b. Plumes chargées avec une solution contenant 50mM de pyrrole et 5µM d'IgG humains-pyrrole, préparée dans du tampon F. Réalisation d'une matrice de spots, en appliquant un potentiel de 2V en continu. Temps de contact = temps de polymérisation = 50ms.

c. Dépôt en mode continu sur une lame de verre recouverte d'or, de solutions contenant des monomères de pyrrole à 50mM, et des anticorps-pyrrole à 1µM ou 5µM. Les plumes sont rincées à l'eau entre chaque dépôt.

- Rinçage de la surface au tampon PBS, puis saturation avec une solution de BSA à 1% (m/v) dans du PBS.
- Incubation avec une solution d'anticorps secondaire biotinylé dirigé contre des marqueurs de lapin (IgG anti-lapin biotine), au 1/1000ème de la solution commerciale dans du tampon PBS, pendant 15min ; puis rinçage au tampon PBS.
- Révélation avec une solution de SAPE à 5% dans tampon PBS. Rinçage avec du PBS et visualisation au microscope en fluorescence à travers une lamelle de verre. Images pour temps de contact = temps de polymérisation = 50ms.

* Le contraste est calculé comme le rapport F/(F-B), avec F l'intensité de fluorescence du spot et B l'intensité de fluorescence du bruit de fond.

Ces expériences préliminaires ont montré qu'il était possible d'adresser et d'immobiliser des anticorps sous forme de matrices de spots de 10µm de diamètre espacés de 20µm, en combinant l'électropolymérisation du pyrrole et le dépôt à l'aide du robot Bioplume. Pour aller plus loin, cette méthode a été appliquée au dépôt d'anticorps dirigés contre des lymphocytes, dans le but d'obtenir des matrices de cellules isolées.

III.1.5.d. Electrodépôt d'anticorps comme sites d'accroche de cellules isolées

Les interactions cellule/cellule et cellule/surface sont impliquées dans divers mécanismes biologiques, en particulier la réponse immunitaire [39], la division cellulaire [40], ou la différenciation de cellules souches [41]. Elles sont aussi étudiées pour des travaux d'ingénierie des tissus. Ainsi, depuis une quinzaine d'années, une large variété de microsystèmes dédiés à l'analyse cellulaire a été développée [42]. La taille réduite de ces systèmes permet d'envisager des études sur un nombre limité de cellules, et l'intérêt de travailler sur des cellules uniques est ainsi apparu. Ceci permet par exemple de tenir compte de l'hétérogénéité phénotypique des populations cellulaires [42]. Il est intéressant d'immobiliser les cellules à étudier sur une surface, afin d'avoir une approche en 2D plutôt qu'en solution ou en 3D, ou pour réaliser plusieurs analyses en parallèle. Les cellules les plus fréquemment immobilisées sont celles qui adhèrent spontanément sur les surfaces. Or ce n'est pas le cas des cellules sanguines, dont l'étude présente pourtant un intérêt majeur [43]. Pour immobiliser ces cellules non-adhérentes, il a été proposé de fonctionnaliser la surface avec des protéines ou des peptides reconnaissant des biomolécules présentes sur la membrane externe des cellules [44].

L'équipe de Yoann Roupioz du laboratoire CREAB du CEA de Grenoble a utilisé cette approche pour immobiliser des lymphocytes B et T sur des motifs d'anticorps monoclonaux, plus précisément des spots de 700µm de diamètre [35]. Des motifs de plus petite taille (10-20µm) ont été obtenus par microimpression dans l'équide de H. Kim, mais cette méthode n'est pas adaptée à la capture multiplexée de divers types cellulaires [45]. En collaboration avec Yoann Roupioz, la possibilité de réaliser à l'aide du robot Bioplume des motifs micrométriques contenant des anticorps dirigés contre les lymphocytes B et T a donc été testée. La valeur ajoutée recherchée par rapport aux expériences de Kim *et al* ne réside pas dans la taille des motifs mais plutôt dans la possibilité de déposer des molécules différentes dans les divers plots.

Les cibles membranaires contre lesquelles les anticorps sont dirigés sont la protéine CD90 pour les lymphocytes T et la protéine IAb pour les lymphocytes B. Ces anticorps monoclonaux ont été couplés à une unité pyrrole par réaction avec du pyrrole-NHS pour pouvoir réaliser un électrodépôt.

---

[39] : D. J. Irvine, J. Doh, B. Huang, *Curr. Opin. Immunol.*, 2007, **19**, 463

[40] : M. Thery, A. Jimenez-Dalmaroni, V. Racine, M. Bornens, F. Julicher, *Nature*, 2007, **447**, 493

[41] : A. Khademhosseini, L. Ferreira, J. Blumling, J. Yeh, J.M. Karp, J. Fukuda, R. Langer, *Biomaterials*, 2006, **27**, 5968

[42] : J. El-Ali, P. K. Sorger, K. F. Jensen, *Nature*, 2006, **442**, 403

[43] : M. Toner, D. Irimia, *Annu. Rev. Biomed Eng*, 2005, **7**, 77

[44] : Y. Soen, D. S. Chen, D. L. Kraft, M. M. Davis, P. O. Brown, *PLoS Biol.*, 2003, **1**, E65

[45] : H. Kim, J. Doh, D. J. Irvine, R. E. Cohen, P. T. Hammond, *Biomacromolecules*, 2004, **5**, 822

Une solution contenant des monomères de pyrrole et l'anticorps-pyrrole dirigé contre la protéine IAb (anti-IAb-pyrrole) est déposée à l'aide du robot Bioplume, sous la forme de matrices de 64 spots espacés de 20µm. Après avoir rincé les plumes, l'anticorps-pyrrole dirigé contre la protéine CD90 (anti-CD90-pyrrole) est déposé comme témoin négatif. Un potentiel de 2V a été appliqué en continu pour permettre la fixation des anticorps par électropolymérisation. Après le dépôt, la surface est rincée au PBS et conservée à 4°C dans une solution contenant des antibiotiques pour éviter toute contamination bactérienne.

Les lymphocytes B utilisés proviennent de cultures cellulaires préparées dans le laboratoire de Patrice Marche à l'Institut Albert Bonniot de Grenoble (unité INSERM U823). Leur taille moyenne, estimée à l'aide d'un appareil de comptage automatique de cellules, est de l'ordre de 15µm. Juste avant de réaliser l'interaction avec ces cellules, la surface spottée est saturée avec une solution de BSA puis rincée abondamment avec du PBS puis avec le milieu de culture. Une solution contenant 2.10^6 cellules/mL est ensuite préparée et incubée sur les spots pendant 30min. Finalement, la surface est rincée avec précaution avec du milieu de culture, et observée au microscope.

Les images en microscopie présentées figure 21 montrent que **les lymphocytes se sont fixés de façon spécifique sur les motifs d'anticorps anti-IAb**. Ceci confirme que **ces anticorps sont immobilisés dans une conformation qui n'altère pas leurs propriétés de reconnaissance biologique**.

Grâce à l'adaptation de la taille des motifs d'anticorps à la taille des lymphocytes, une seule cellule est fixée sur chaque spot. Ainsi **une matrice ordonnée de lymphocytes B est obtenue**. Le taux de sites non occupés, calculé sur l'ensemble des matrices, s'élève à 9%, ce qui est moins élevé que celui observé par l'équipe de H. Kim pour des motifs de taille comparable réalisés par impression (23%) [45].

La possibilité d'organiser ainsi des cellules (adhérentes ou non-adhérentes) sur une surface ouvre des perspectives d'applications variées. Par exemple, l'effet de molécules actives peut être testé de façon individuelle sur chaque cellule, ce qui permet d'observer la variabilité des réponses d'une cellule à l'autre ou de réaliser des tests multiplexés. Les cellules ainsi organisées peuvent également être transfectées individuellement. Les interactions entre cellules peuvent aussi être étudiées en fonction de la distance qui les sépare, ou en fonction de modifications des paramètres environnementaux.

Des expériences complémentaires sont en cours avec des solutions contenant un mélange de lymphocytes B et T, pour évaluer leur spécificité de fixation sur les motifs d'anticorps. Dans ce cas, la méthode pourrait alors être utilisée pour l'analyse et le tri cellulaire.

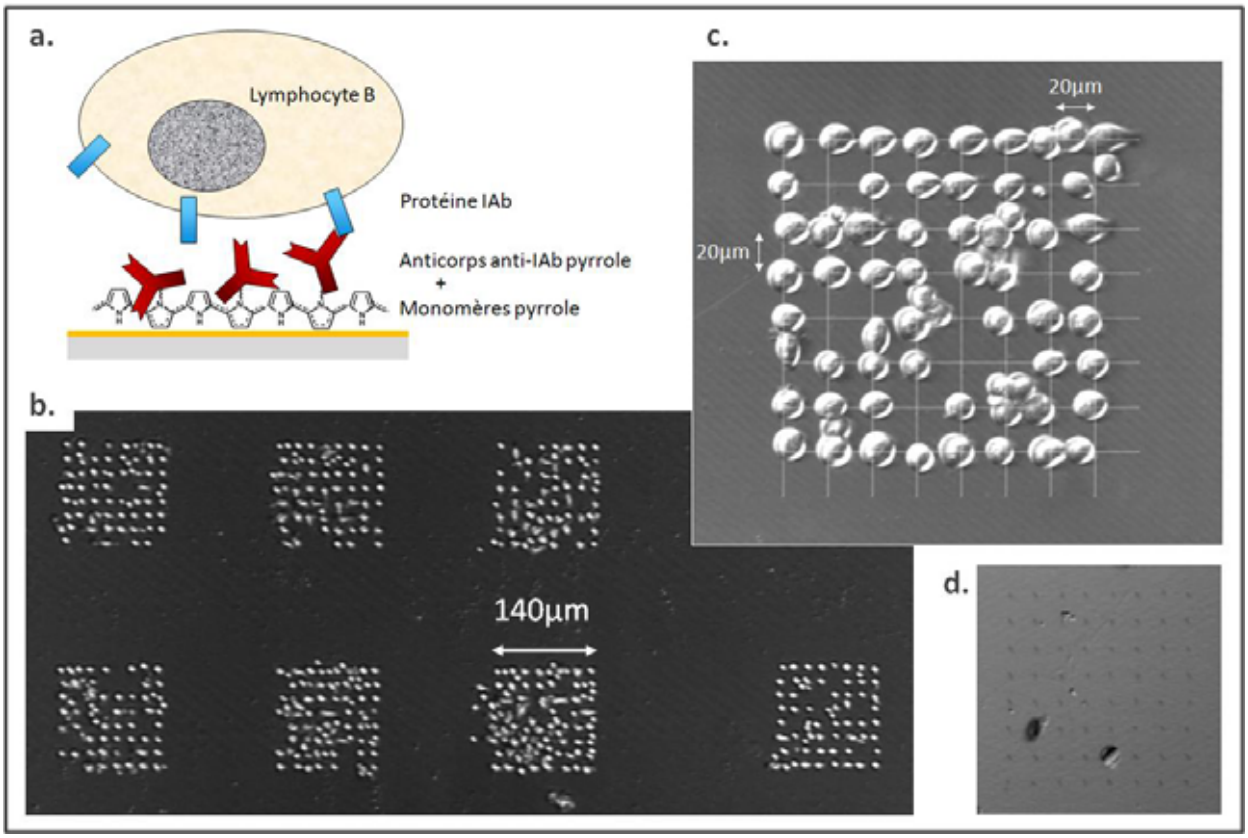


Figure 21 : Matrices de cellules isolées (lymphocytes B) immobilisées sur des plots d'anticorps (anti-IAb) électrodéposés.

a. Principe de la reconnaissance entre l'anticorps immobilisé et la protéine Iab, de la membrane externe des lymphocytes B
b. Images au microscope de lymphocytes fixés sur des plots d'anticorps, sous forme de matrices de cellules isolées.
c. Zoom sur une matrice, et vérification de l'alignement des lymphocytes
d. Témoin négatif : plots d'anticorps dirigés contre une protéine de la membrane de lymphocytes T

- Dépôt en mode continu de solutions contenant des monomères de pyrrole à 50mM, et des anticorps-pyrrole dirigés contre la protéine IAb à 5µM, dans du tampon F. Les plumes sont rincées à l'eau entre chaque dépôt. Temps de contact : 50ms. Différence de potentiel : 2V.

A la fin du dépôt la surface est rincée au tampon PBS, et stockée à 4°C dans du tampon PBS/antibiotiques.

- Saturation de la surface avec une solution de BSA à 1% (m/v) dans du PBS, puis rinçage avec du PBS, puis du milieu de culture.

- Incubation pendant 30min d'une solution de lymphocytes B à 2. 10^6 cellules/mL préparée dans du milieu de culture, puis rinçage avec ce même milieu.

Pour conclure sur la méthode d'immobilisation elle-même, l'avantage majeur est la **possibilité de réaliser l'électrodépôt dans des volumes réduits à quelques dizaines de femtolitres**, en particulier à l'aide du robot Bioplume. La **simultanéité de l'adressage et de l'immobilisation des biomolécules** évite également les étapes de pré-fonctionnalisation du support, et permet d'envisager l'immobilisation sur des surfaces réduites ou des structures fragiles.

La contrainte la plus importante réside dans la nécessité d'avoir accès à un contact électrique, à la fois sur la surface de dépôt et au niveau du système d'adressage. Par ailleurs, le greffage d'unités pyrrole sur les biomolécules à déposer constitue une étape de préparation supplémentaire.

III.1.6. Bilan sur les contraintes de mise en œuvre des cinq méthodes d'immobilisation abordées

L'analyse des cinq méthodes d'immobilisation présentée dans ce chapitre a permis d'identifier les contraintes spécifiques à chacune, en particulier en termes de nature des supports, de modifications chimiques à ajouter aux biomolécules, de volatilité des solvants, ou de temps de réalisation de chaque étape. Ces éléments sont récapitulés dans le tableau ci-après, ainsi que les études qui ont pu être réalisées sur les diverses surfaces fonctionnalisées. En effet, dans les cinq cas, une immobilisation des biomolécules a été effectivement obtenue, et ceci dans une conformation permettant une reconnaissance biologique.

La chimie des dendrimères est particulièrement performante pour des études de type biopuces de par sa sensibilité importante et la très bonne qualité du bruit de fond. Cependant, l'utilisation de THF comme solvant limite son utilisation à des volumes conséquents et interdit la mise en contact avec des matières plastiques.

La silanisation à l'aide de GPTS a été testée en phase liquide, mais le manque de reproductibilité des résultats suggère que la silanisation en phase gazeuse serait plus efficace. Cette méthode largement décrite nécessite cependant un équipement spécialisé.

L'auto-assemblage d'alcanethiols et l'immobilisation à l'aide de PLLgPEG-biotine ont permis d'étudier en temps réel les interactions entre des anticorps et quatre types d'entités biologiques (protéine, virus, bactérie végétative et bactérie sporulante), ceci à l'aide d'un système de microbalance à quartz. La réalisation de tests comparables sur les deux types de surface a permis de montrer que la sensibilité de détection est meilleure lorsque les anticorps sont immobilisés sur une couche auto-assemblée de MUA. En revanche, la spécificité est plus importante pour une fixation par l'intermédiaire de PLLgPEG-biotine, ce qui peut être attribué aux propriétés des chaînes de PEG, connues pour éviter les adsorptions non spécifiques.

Enfin la polymérisation de pyrrole a permis d'immobiliser des anticorps sur des surfaces d'or, reconnus comme sites d'accroche par des cellules non-adhérentes. Cette technique est contraignante car une différence de potentiel doit pouvoir être appliquée entre le support à fonctionnaliser et une électrode plongée dans la solution contenant les biomolécules à immobiliser. Dans le contexte des travaux présentés ici, c'est pourtant cette méthode qui s'est avérée pouvoir répondre le mieux à la problématique de l'immobilisation sur des surfaces de petite taille et en environnement fragile. En effet, il a été démontré que la réaction électrochimique pouvait être réalisée au cours du dépôt de gouttes à l'aide du robot Bioplume, c'est-à-dire dans des volumes de quelques dizaines de femtolitres. La simultanéité des étapes d'adressage et d'immobilisation apparait également comme un atout majeur dans le cadre de fonctionnalisations délicates.

Ainsi, cette méthode d'électrochimie localisée adaptée au robot Bioplume a été choisie pour adresser et immobiliser des biomolécules sur deux types de biocapteurs : d'abord des prismes de SPRi, puis des fibres optiques. Ces études sont présentées dans le paragraphe suivant.

			Dendrimères	Silanisation GPTS	Auto-assemblage de MUA	Adsorption de PLLgPEG-biotine	Electropolymérisation de pyrrole
Contraintes de mise en œuvre	**Surface**	**type**	SiO_2 (activé SiOH)	SiO_2 (activé SiOH)	Au	SiO_2	Au, ITO
		pré-traitement	NaOH, éthanol	plasma O_2	nettoyage si nécessaire	plasma O_2	nettoyage si nécessaire
	Solvants		éthanol, THF	éthanol	éthanol	tampon aqueux	tampon aqueux
	Biomolécules sondes : fonction réactive		NH_2 (à ajouter pour ADN)	NH_2 (à ajouter pour ADN)	NH_2 (à ajouter pour ADN)	biotine (ou b. intermédiaire-biotine)	pyrrole à greffer sur ADN et protéines
	Etapes (durée)	**Fixation des biomolécules**	silanisation APTS (12h) cuisson (3h) greffage du dendrimère (7h) immob. des b. (30min-2h) stabilisation $NaBH_4$ (30min-3h)	silanisation GPTS (2h) cuisson (30min) immob. des b. (30min)	auto-assemblage (12h) activation NHS/EDC (20min) immob. des b. (40-90 min)	PLLgPEG-biotine (30min) traitement glycine (1-5 min) incubation neutravidine (30min) (b. intermédiaire-biotine) (40min) immob.des b. (40 min)	immob. des b. par électropolymérisation (50ms)
		Saturation	saturation (30min)	saturation (15-30min)	saturation (30min)		saturation (15 min)
	Contraintes particulières		pas de matière plastique en présence du THF	réaction en conditions anhydre ; stockage à l'abri de l'humidité			contact électrique sur la surface possibilité de plonger une contre-électrode dans la solution contenant les b. à immobiliser
Méthodes de validation	**Biomolécules modèles immobilisées**		ADN : 35-mer NH_2, P1N, P3N Protéines : GST, BSA, anticorps anti-GST		Anticorps : anti-Ba, anti-ova, anti-CpGV, anti-E.coli		Anticorps : anti-Iab, antiCD90, anti-H, anti-lapin biotine
	Test de reconnaissance		Biopuce avec détection en fluorescence		Interaction sur microbalance à quartz		Biopuce (fluo.), puis fixation de cellules (microscope)
	Résumé des résultats		Sensibilité la plus haute et bruit de fond le plus bas parmi 10 lames commerciales ([LB] et confirmé dans chap.1)	Souci de reproductibilité pour ce protocole en milieu liquide	Détection des interactions antigène/anticorps, pour divers types d'antigènes (cellules, protéine, virus)		Réalisation de matrices de cellules isolées, immobilisées sur des plots d'anticorps de 10µm de diamètre
	Contexte		*Plateforme biopuces de Toulouse*		*Collaboration avec T. Alava (LAAS-CNRS)*		*Coll. avec Y. Roupioz (CEA Grenoble)*

Figure 22 : Récapitulatif des contraintes de mise en œuvre des cinq méthodes d'immobilisation évaluées.

Immob des b. = Immobilisation des biomolécules

III.2. Electrochimie localisée adaptée à Bioplume : validation de la pertinence de la méthode pour l'adressage et l'immobilisation de biomolécules sur des biocapteurs de petite taille.

III.2.1. Electrodépôt d'anticorps sur prismes de SPRi

III.2.1.a. Principes de la SPR et de la SPRi

La résonance plasmonique de surface (SPR) est une technique de détection des interactions biologiques basée sur une transduction optique, proposée en 1983 par B. Liedberg et C. Nylander [46]. Les molécules biologiques sondes sont immobilisées sur un support transparent recouvert d'une fine couche d'or. Un rayon lumineux est dirigé sur cette couche d'or à travers le prisme, et le rayon réfléchi est collecté par une caméra. Pour un angle d'incidence particulier, appelé angle de résonance, l'intensité du rayon réfléchi est beaucoup plus faible que celle du rayon incident. Ce phénomène est dû à une dissipation d'énergie par résonance des plasmons à la surface de l'or. Or cet angle de résonance dépend entre autres de l'indice optique du milieu à l'interface avec le film d'or. Ainsi, lorsqu'une reconnaissance biologique a lieu, l'angle de résonance est modifié (cf figure 23). L'intérêt majeur de cette méthode est la possibilité de visualiser l'interaction en temps réel et de mesurer ainsi les constantes d'association et de dissociation. Par ailleurs, aucun marquage n'est nécessaire, ni en fluorescence, ni en radioactivité, ce qui simplifie la préparation des échantillons.

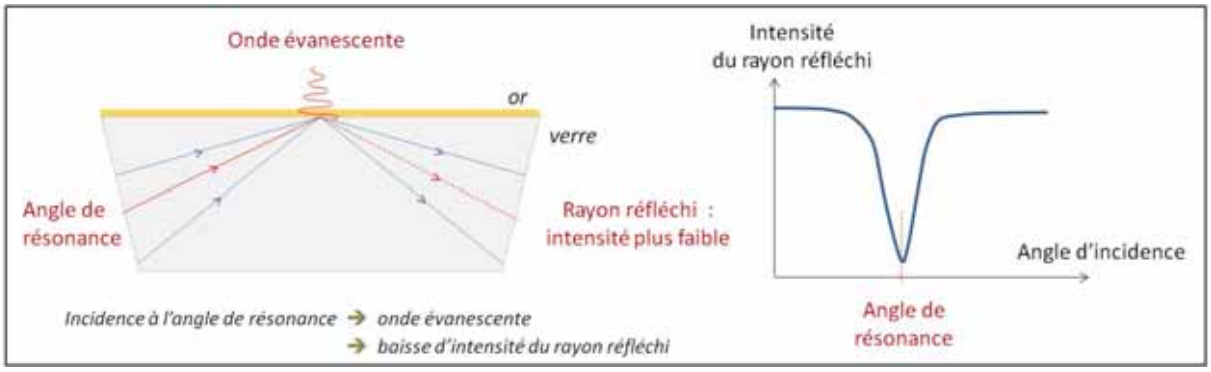


Figure 23 : Principe de la détection d'interactions biologiques par résonance plasmonique de surface (SPR)

L'un des appareils de mesure des interactions biologiques les plus courants est celui mis au point et commercialisée par la société suédoise Biacore, rachetée en 2006 par General Electrics [47]. Dans ce cas, la surface d'or est placée dans un système fluidique dans lequel sont injectés successivement les solutions de fonctionnalisation de la surface, les biomolécules à immobiliser, puis l'échantillon biologique à analyser. Ainsi une seule molécule sonde peut être immobilisée sur chaque surface.

Pour pouvoir détecter plusieurs interactions simultanément, l'imagerie SPR (SPRi) a été mise au point. Dans ce cas, les biomolécules sondes sont adressées à la surface du prisme sous la forme de spots réalisés à l'aide d'un robot à aiguilles. La mesure est réalisée à angle d'incidence fixe, et l'interaction est visualisée comme une variation de l'intensité réfléchie (cf figure 24) [48]. Ainsi, chaque spot est considéré comme une zone de mesure indépendante.

La surface sur laquelle sont immobilisées les molécules sondes est limitée à moins d'1cm^2, car elle est éclairée avec un seul faisceau lumineux incident. Cette taille réduite permet aussi de limiter le volume de liquide utilisé pour l'interaction biologique. En utilisant un robot de dépôt à aiguilles, le nombre de spots pouvant être réalisés sur cette zone est de 50 à 1000 selon le type d'aiguilles. Il est donc intéressant de réaliser des spots de plus petit diamètre afin d'augmenter le nombre d'interactions réalisées simultanément. Pour cela, la possibilité de réaliser un dépôt sur un prisme de SPRi à l'aide du robot Bioplume a été évaluée.

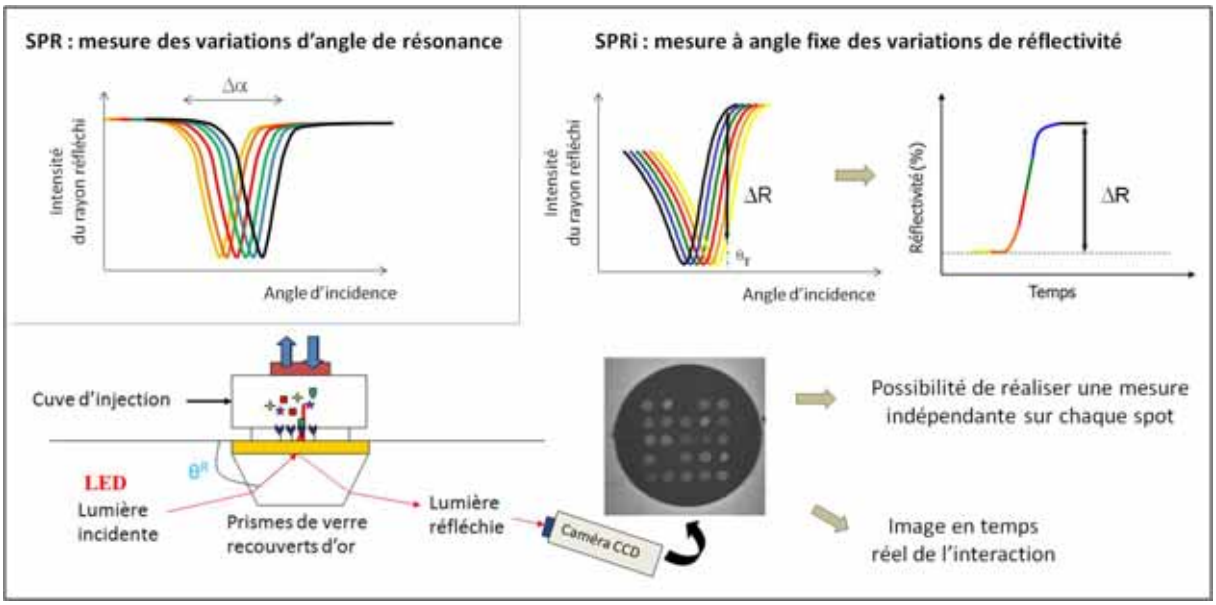


Figure 24 : Imagerie SPR (SPRi) : détection multiplexée en enregistrant indépendamment les signaux pour chaque spot (réalisés à l'aide d'un robot à aiguilles).

III.2.1.b. Test de faisabilité

Un prisme de SPRi est fixé sur la zone porte-échantillon du robot Bioplume, et immobilisé à l'aide de cales fixées par un ruban adhésif. Le contact électrique est réalisé à l'aide d'adhésif conducteur (en cuivre), fixé avec précaution au bord du prisme. Pour limiter les distances de déplacement, la surface utilisée pour le chargement des plumes est également surélevée.

Des plumes sont ensuite chargées avec une solution contenant des monomères de pyrrole et mises en contact avec la surface du prisme. Un test d'électrodépôt en mode impulsionnel a été réalisé, et le chrono-ampérogramme obtenu (figure 25) montre qu'il y a effectivement circulation d'un courant indiquant que le contact électrique est correct. Ceci a été confirmé en réalisant plusieurs dépôts successifs, en mode continu cette fois. De nouveau, le chrono-ampérogramme obtenu est comparable à ceux observés dans les expériences sur un support classique.

[46] : B. Liedberg, C. Nylander, I. Lundström, *Sensors and Actuators*, 1983, **4**, 299-304
[47] : M. Malmqvist, *Nature*, 1993, **361**, 186-187
[48] : P. Guedon, T. Livache, F. Martin, F. Lesbre, A. Roget, G. Bidan, et Y. Levy, *Anal. Chem.*, 2000, **72**, 6003-6009

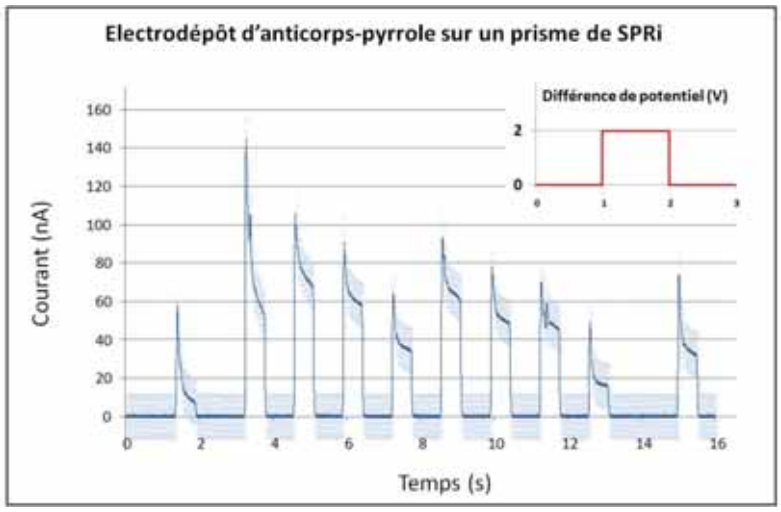


Figure 25 : Chrono-ampérogramme enregistré au cours de l'électrodépôt d'anticorps-pyrrole sur un prisme de SPRi.

Plumes chargées avec une solution contenant des monomères de pyrrole à 50mM et les anticorps humains-pyrrole à 5µM dans le tampon F. Dépôt d'une matrice de spots en appliquant un potentiel continu de 2V. Temps de contact : 500ms. Contact électrique réalisé avec un ruban adhésif conducteur.
En trait continu : signal moyen ; en couleur claire : tous les points de mesure.

La **faisabilité de l'électrodépôt sur prismes de SPRi** ayant ainsi été **démontrée**, un test de dépôt d'anticorps dirigés contre des lymphocytes B a été réalisé. Ainsi, la possibilité de visualiser en temps réel la fixation des cellules sur les plots d'anticorps a pu être testée.

III.2.1.c. Détection en temps réel par SPRi de la fixation de cellules isolées sur des plots d'anticorps réalisés par électrochimie localisée avec Bioplume

Une solution contenant des monomères de pyrrole et des anticorps-pyrrole dirigés contre la protéine IAb a été déposée à l'aide de Bioplume sur un prisme de SPRi, en appliquant un potentiel continu de 2V. Les plumes sont rincées, et réutilisées pour déposer des solutions d'anticorps-pyrolles humains et d'anticorps-pyrroles dirigés contre la protéine CD90. Ces deux anticorps sont utilisés comme témoins négatifs. Toutes ces solutions sont déposées sous la forme de matrices de 64 spots espacés de 20µm. A la fin du dépôt, le prisme est rincé au PBS et stocké à 4°C dans une solution de PBS contenant des antibiotiques.

L'interaction est réalisée au laboratoire CREAB du CEA de Grenoble, dans un système de SPRi avec cuve ouverte. Avant de réaliser l'incubation avec les cellules, une image du prisme est réalisée : les trois types de matrices sont visibles sur cette image (cf figure 26c), ce qui confirme la fixation des anticorps. La visualisation de ces matrices carrées sous la forme de rectangles est due à une déformation propre au montage optique. Une grille de détection est alignée sur ces matrices : ceci signifie que les signaux provenant de chaque matrice sont ensuite enregistrés de façon indépendante.

Une solution (500µL) de lymphocytes B à 5.10^5 cellules/mL est ensuite injectée et les variations d'intensité du signal SPR sont enregistrées. Ce graphique est présenté figure 26e, et montre que **la fixation spécifique des lymphocytes B sur les plots d'anticorps anti-IAb peut être suivie en temps réel**. Aucune variation de signal n'est observable sur les plots de

témoins négatifs, ce qui confirme la spécificité de l'interaction observée. Les cellules immobilisées sont également visibles directement sur l'image enregistrée par la caméra CCD (figure 26d), ce qui est l'un des avantages de la SPRi par rapport à la SPR.

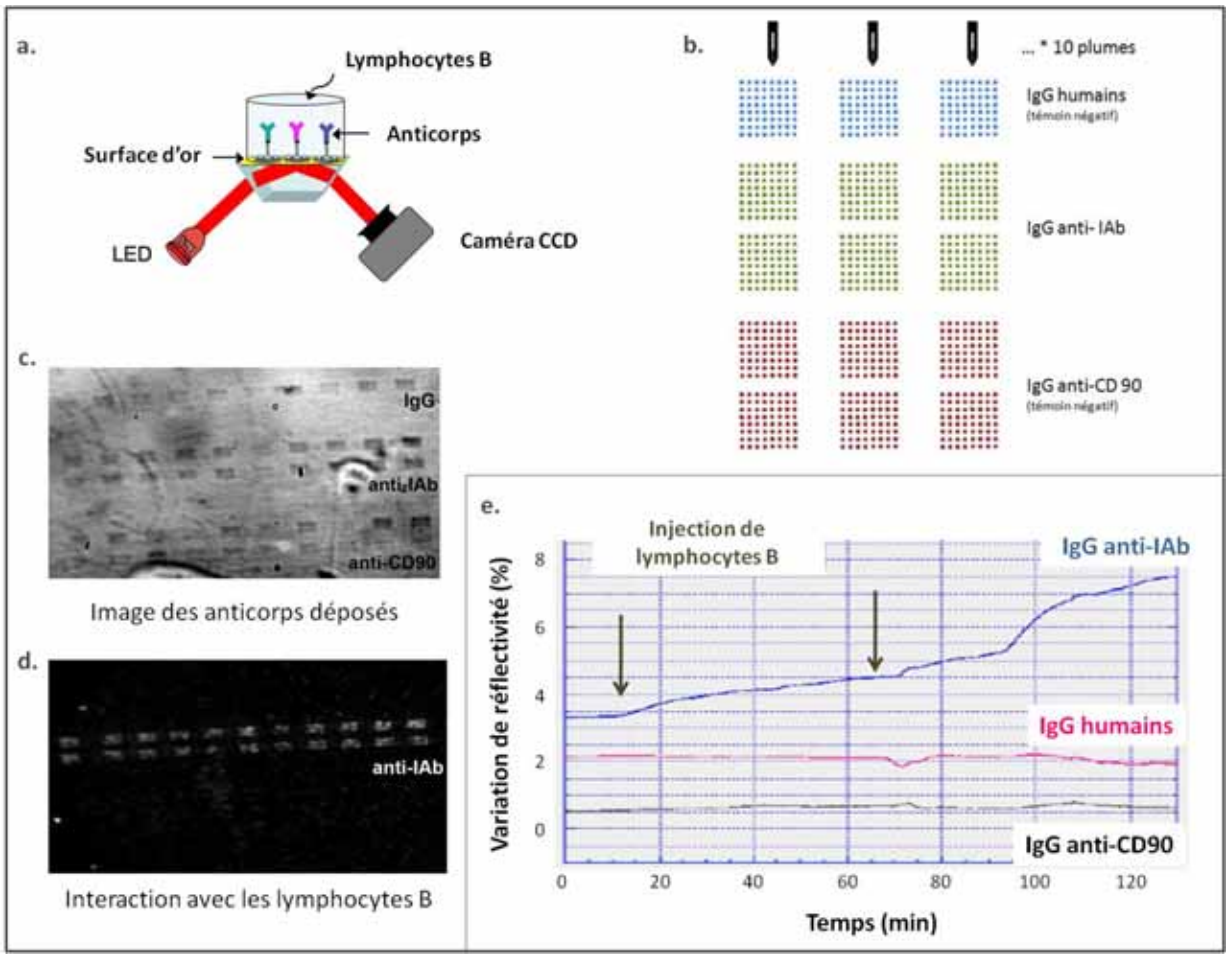


Figure 26 : Détection par SPRi de la fixation de lymphocytes B sur des plots d'anticorps anti-IAb.

a. Schéma de principe
b. Plan de dépôt des anticorps
c. Image SPR des plots d'anticorps
d. Image SPR des lymphocytes B fixés spécifiquement sur des plots d'anticorps anti IAb
e. Variations temporelles du signal de réflectivité sur les plots d'anticorps anti-IAb (bleu), les plots d'anticorps anti-CD90 (rose) et les plots d'anticorps humains (noir).

- Dépôt en mode continu sur un prisme recouvert d'une fine couche d'or, de solutions contenant des monomères de pyrrole à 50mM, et des anticorps-pyrrole 5µM, dans du tampon F. Les plumes sont rincées à l'eau entre chaque dépôt. Temps de contact : 50ms. Différence de potentiel : 2V.
A la fin du dépôt le prisme est rincé au tampon PBS, et stocké à 4°C dans du tampon PBS/antibioques.
- Visualisation de l'interaction grâce à un système de SPRi avec cuve ouverte. Après avoir choisi l'angle de travail et défini les zones d'acquisition, une solution contenant des lymphocytes B à 5.10^5 cellules/mL est injectée. Chaque zone d'acquisition correspond à une matrice de 64 spots.

Cette expérience a permis de démontrer que des dépôts d'anticorps pouvaient être réalisés par électrochimie localisée sur la surface d'un prisme de SPRi à l'aide du robot Bioplume. Ceci a ensuite permis d'observer en temps réel la fixation de cellules sur les plots d'anticorps. Grâce au système d'imagerie, l'absence de fixation sur les plots d'anticorps utilisés comme témoins négatifs a pu être visualisée simultanément.

Sur les images des matrices enregistrées par la caméra CCD, les spots sont trop rapprochés pour être visibles individuellement, car il y a recouvrement des signaux plasmons. Par contre, on distingue sans problème les cellules isolées fixées sur les spots dits de « préblot ». Ces spots sont réalisés avant le dépôt en matrices, pour éliminer l'excédent de liquide dans les plumes. Ils sont éloignés de 600µm du point de dépôt de la matrice et peuvent donc être repérés aisément (non montré). Cette observation suggère que les spots composant une matrice pourraient être visualisés de façon individuelle en adaptant l'espacement des dépôts. Des travaux ont également été engagés au laboratoire CREAB du CEA de Grenoble pour améliorer la résolution latérale du système optique, dont la valeur théorique actuelle est de 6µm. Cette résolution dépend essentiellement de quatre facteurs : la nature des matériaux utilisés pour générer l'onde de plasmons et leur épaisseur, la longueur d'onde du faisceau lumineux, la taille des lentilles, et le nombre de pixels de la caméra CCD.

Ces études seront poursuivies dans le cadre du projet NeuroPiez, dans lequel sont impliquées en particulier les équipes de Yoann Roupioz (CREAB, CEA Grenoble) et de Liviu Nicu (LAAS-CNRS).

III.2.2. Electrodépôt d'ADN sur la section de fibres optiques

III.2.2.a. Utilisation de fibres optiques en tant que biocapteurs

Parallèlement à leur essor dans le domaine des télécommunications, les fibres optiques ont été utilisées dès les années 50 pour observer des milieux peu accessibles comme le corps humain ou des réacteurs d'avion. Ainsi, l'un des premiers endoscopes à base de fibres optiques souples a été mis au point par Basil Hirshowitz pour réaliser des observations gastro-intestinales [49]. Dans le domaine de l'endoscopie, la fibre optique a été utilisée d'abord comme outil d'observation directe, puis adaptée à la transmission de signaux de fluorescence [50], d'électroluminescence [51], et plus récemment de spectroscopie Raman. Cette dernière méthode permet d'identifier des molécules grâce à une analyse spectrale. Il est cependant nécessaire de structurer la surface du détecteur de signal de Raman, de façon à obtenir une amplification grâce à un phénomène de résonance électromagnétique [52].

Pour obtenir cette structuration à l'extrémité d'une fibre optique, Stokes *et al* ont proposé une fonctionnalisation avec des nanoparticules d'alumine recouvertes d'une couche d'argent. La détection de petites molécules dans des échantillons aqueux a ainsi été obtenue, et une application à l'analyse des nappes phréatiques a été proposée [53].

[49] : B.I. Hirschowitz, *Am. J. Dig. Dis.*, 1963, **8**, 389-95
[50] : D.S. Hubbard, M. P. Houlne, G.E. Kiefer, K. McMillan, D.J. Bornhop, *Bioimaging*, 1998, **6**, 63-70
[51] : A. Chovin, P. Guarrigue, I. Manek-Hönninger, N. Sojic, *Nano Letters*, 2004, **4**, 1965-1968
[52] : M. Fleischman, P.J. Hendra, A.J. McQuillan, *Chem. Phys. Lett.*, 1974, **26**, 163-166
[53] : D. Stokes, T. Vo-Dinh, *Sensors and Actuators B*, 2000, **69**, 28-36

L'équipe de Neso Sojic de l'ISM de Bordeaux a mis au point une autre méthode, qui permet d'obtenir un réseau de nano-pointes sur la section d'une fibre (figure 27) [54]. Ce qui est ici appelé « fibre » est un faisceau de 6000 fibres optiques individuelles de 3-4µm de diamètre chacune, retenues par une gaine de 350µm de diamètre. Les nano-pointes sont obtenues par gravure chimique à l'acide fluorhydrique, en tirant profit des différences de vitesse de gravure des divers matériaux qui constituent le réseau de fibres. Ces structures sont ensuite recouvertes d'un film d'or réalisé par évaporation (épaisseur 40nm). L'efficacité de cette méthode de structuration pour obtenir un signal en spectroscopie Raman a été démontrée en utilisant un benzène-thiol comme molécule modèle.

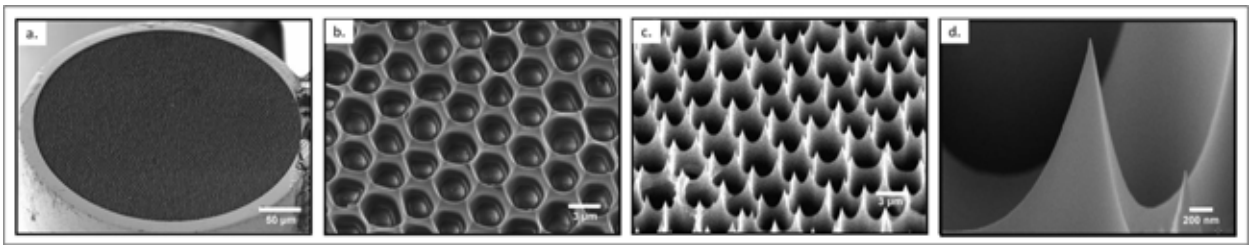


Figure 27 : Images au MEB de la section d'une fibre optique structurée avec des nano-pointes [54]
a. Vue d'ensemble de la section d'une fibre ; **b.** Vue de plusieurs fibres individuelles ; **c.** Détail des nanopointes, situées à l'intersection entre les fibres individuelles ; **d.** Détail d'une seule nanopointe (rayon de courbure 20nm)

Quel que soit le type d'analyse réalisé en endoscopie, il peut être intéressant d'utiliser les diverses fibres individuelles assemblées dans la même gaine pour réaliser des mesures multiplexées. Dans le cas de la détection de biomolécules, il faudrait pour cela pour déposer plusieurs molécules sondes différentes à l'extrémité d'une même fibre. Ceci est particulièrement ambitieux compte-tenu de la taille réduite de la section de la fibre (350µm de diamètre), et de la présence de nano-pointes à sa surface. L'idée d'utiliser le robot Bioplume pour cet adressage délicat a été proposée par Emeline Descamps et testée au LAAS-CNRS.

III.2.2.b. Mise au point d'un support pour fixer les fibres

Les tous premiers tests de dépôt ont été réalisés en fixant simplement une fibre optique dans de la pâte adhésive. Ceci a permis de démontrer qu'il est possible d'aligner une plume du robot avec la fibre, et de contrôler l'approche suffisamment précisément pour réaliser des dépôts. Cependant, la pâte adhésive étant déformable, l'alignement entre la plume et la fibre n'est conservé que pendant quelques minutes, ce qui ne permet pas d'envisager plusieurs dépôts successifs (par exemple avec deux molécules différentes). Pour remédier à cela, un support dédié a été conçu et fabriqué. Il permet d'immobiliser une fibre en position verticale et s'insère directement dans la glissière porte-échantillon du robot. Des photographies du montage sont présentées figure 28.

[54] : V. Guieu, F. Lagugné-Labarthet, L. Servant, D. Talaga, et N. Sojic, *Small*, 2008, **4 (1)**, 96-99

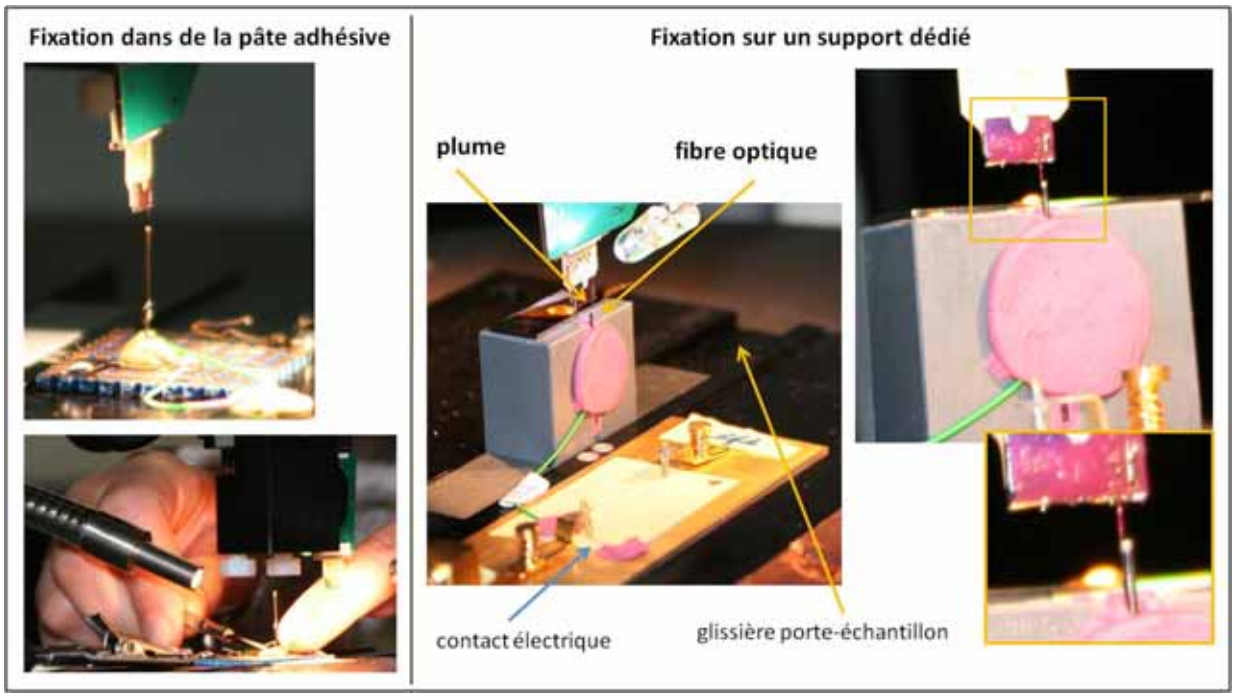


Figure 28 : Vues du montage permettant de réaliser des dépôts sur la section d'une fibre optique à l'aide du robot Bioplume.

III.2.2.c. Electrodépôt d'ADN sur fibre optique plate

Malgré la taille réduite de la surface de dépôt, un contact avec la couche d'or est réalisé sur chaque fibre grâce à un fil de cuivre enroulé sur la gaine. Ceci permet donc d'envisager l'utilisation du greffage électrochimique à l'aide de pyrrole pour immobiliser des oligonucléotides sur la section de la fibre. Dans un premier temps, cet électrodépôt a été testé sur une fibre non structurée, dont la section est aplanie par trois polissages successifs avec des rugosités de 5µm, puis 1µm puis 0,3µm.

Une solution contenant des monomères de pyrrole et l'oligonucléotide-pyrrole « Zip6-pyrrole » est préparée, et chargée dans une seule plume. Pour cela, une barrette ne contenant plus qu'un seul levier au lieu de 12 est utilisée. La plume est ensuite mise en contact avec la fibre et un test d'électrodépôt en mode impulsionnel est réalisé. Le chrono-ampérogramme obtenu montre qu'une oxydation électrochimique a bien eu lieu (figures 29a et 29b), ce qui signifie que **le contact électrique entre le fil de cuivre et la surface d'or est correct**. Les valeurs de courant sont plus faibles que dans les expériences présentées précédemment, car la mesure ne prend en compte qu'une seule plume au lieu d'additionner les courants dans dix plumes.

Des tests de dépôt de plusieurs spots sous forme de matrices sont ensuite réalisés. Dans ce cas, un potentiel constant de 2V est appliqué et le temps de polymérisation est déterminé par le temps de dépôt. La figure 29c montre que **plusieurs matrices indépendantes ont pu être obtenues sur la même fibre**. Ceci confirme l'efficacité du support pour fixer la fibre de façon stable, et permet d'envisager de déposer successivement plusieurs molécules différentes.

Au cours d'un autre test, le nombre maximal de spots pouvant être réalisés sur la même fibre a été évalué. Si on réalise une estimation théorique, en prenant une marge de 25µm en bord de fibre et en choisissant un espace interspot de 15µm, on trouve un nombre maximal de 314 spots. Sur la figure 29d, on peut voir que **300 spots environ ont pu être effectivement déposés sur la section d'une seule fibre**.

Enfin, la qualité de l'immobilisation des oligonucléotides déposés est évaluée, en réalisant une interaction avec l'oligonucléotide complémentaire biotinylé, qui permet une révélation avec la streptavidine-phycoérythrine (fluorescente). A la fin de chaque séquence de dépôt, la fibre est donc rincée à l'eau distillée puis séchée. Juste avant de réaliser l'interaction, la surface spottée est saturée avec le « milieu d'hybridation ». L'incubation avec l'oligonucléotide complémentaire Zip6-biotine est réalisée dans ce même « milieu d'hybridation », dans lequel le bout de la fibre est plongé. Au bout de 15 min, la surface est rincée et les spots sont recouverts d'une solution de SAPE qui se fixe sur les séquences hybridées. Après un dernier rinçage, la fibre est séchée et observée à l'aide d'un microscope à fluorescence. Les images obtenues (fiigure 30e) confirment que **l'oligonucléotide Zip6-pyr a été correctement immobilisé sur la section de la fibre**, c'est-à-dire dans une conformation permettant une reconnaissance biologique.

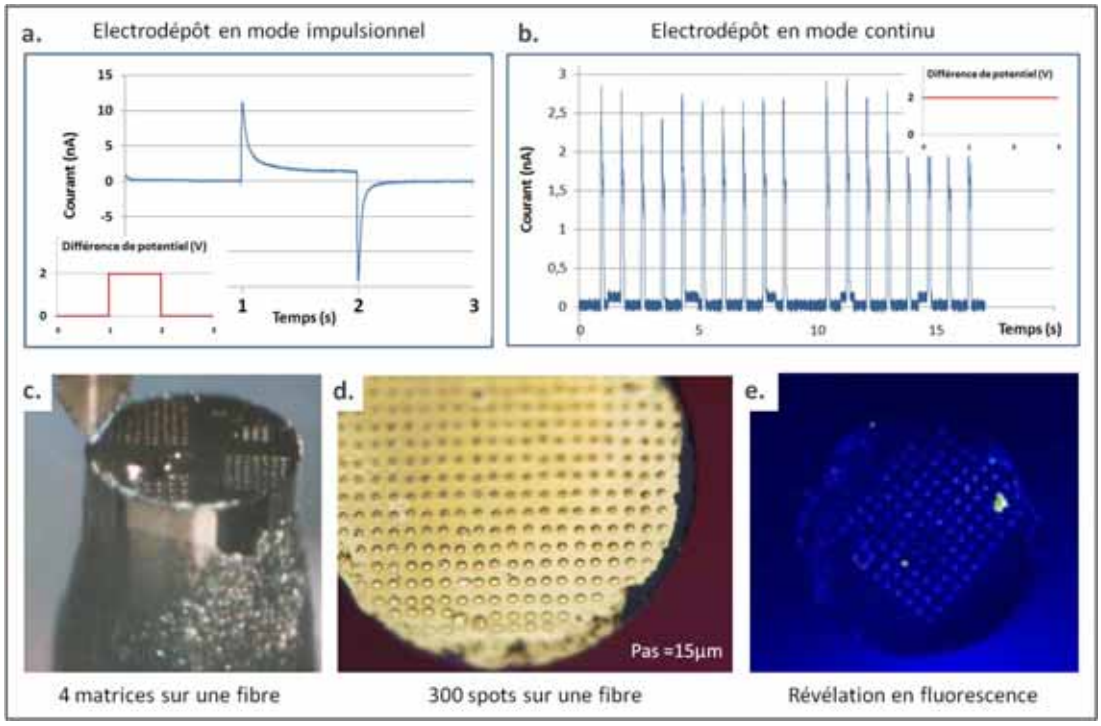


Figure 29 : Electrodépôt d'oligonucléotide-pyrrole sur la section d'une fibre optique plate.

a. Chrono-ampérogramme en mode impulsionnel. Plumes en contact avec la surface de la fibre.

b. Chrono-ampérogramme lors de la réalisation de plusieurs dépôts successifs, en mode continu.

c. Image d'une plume et d'une fibre au cours du dépôt de quatre matrices indépendantes sur la même fibre.

d. Image au microscope d'une fibre sur laquelle une matrice de 300 spots a été réalisée.

e. Image des spots en fluorescence, après interaction avec l'oligonucléotide complémentaire, et révélation SAPE.

La solution utilisée contient des monomères de pyrrole à 200mM et l'oligonucléotide-pyrrole Zip6-pyr à 5µM dans l' « électrolyte B ». Après le dépôt, la fibre est rincée à l'eau distillée et séchée.

Révélation en fluorescence : blocage de la surface avec le « milieu d'hybridation », puis incubation avec l'oligonucléotide complémentaire biotinylé « Zip6c-biotine » pendant 15min dans le « milieu d'hybridation », puis rinçage avec le tampon de rinçage. Enfin, révélation avec une solution de SAPE à 10% dans le tampon de rinçage. Visualisation avec un microscope en fluorescence. Montage électrique optimisé pour minimiser le bruit électromagnétique (cf paragraphe IV.2.1.a.)

Suite à ces résultats encourageants, des tests similaires ont été réalisés sur une fibre structurée.

III.2.2.c. Electrodépôt d'ADN sur fibre optique structurée

Comme vu précédemment, la structuration de la surface des fibres optiques est indispensable pour pouvoir envisager une détection par spectroscopie Raman. Il est donc intéressant de tester si le dépôt de biomolécules sur la section d'une fibre à l'aide de Bioplume présenté précédemment est adaptable à une fibre structurée.

Les fibres utilisées pour ce test présentent des nano-pointes réalisées par gravure à l'acide fluorhydrique (cf figure 27) et recouvertes soit d'or, soit d'ITO. Cet alliage allie une très bonne conductivité à une transparence bien meilleure que celle de l'or, ce qui est appréciable pour des mesures optiques.

Des dépôts d'une solution contenant des monomères de pyrrole et l'oligonucléotide-pyrrole « Zip6-pyr » sont réalisés en mode continu sur ces deux types de fibres. Juste après chaque séquence de dépôt, les spots sont observés au microscope. Les images obtenues (figure 30) montrent que les spots ont des formes moins régulières que lors du dépôt sur une surface plane, ce qui est dû aux interactions de surface entre le liquide avec les nano-pointes. En moyenne, chaque spot recouvre 3 à 5 fibres isolées, ce qui signifie qu'une moyenne sur 3 à 5 mesures par spot pourrait être réalisée dans le cadre d'une détection par transmission (spectroscopie Raman par exemple).

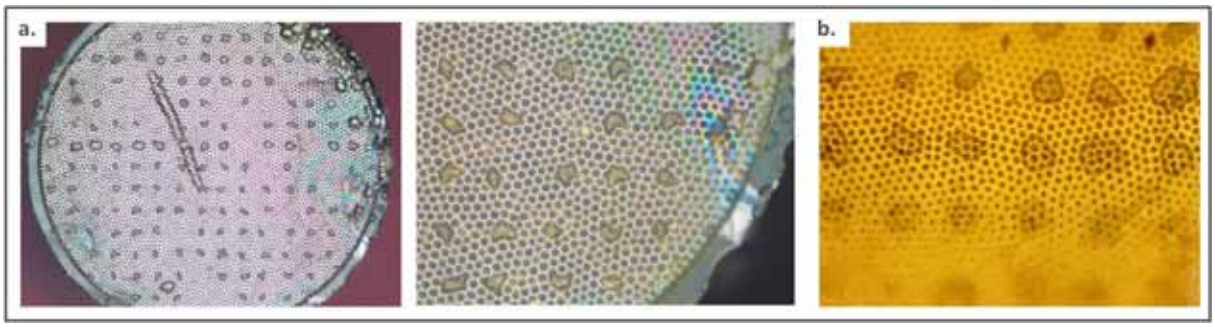


Figure 30. Electrodépôt d'oligonucléotide-pyrrole sur la section d'une fibre optique structurée avec des nanopointes.
a. Fibre recouverte d'ITO ; **b.** Fibre recouverte d'or.
La solution utilisée contient des monomères de pyrrole à 200mM et l'oligonucléotide-pyrrole Zip6-pyr à 5µM dans l'électrolyte B.

La faisabilité d'un dépôt de biomolécules sous la forme de spots de 10µm de diamètre environ à l'extrémité d'une fibre optique structurée ayant été démontrée, des études plus complètes peuvent être envisagées, en particulier en élargissant le test à plusieurs biomolécules déposées sur la même fibre, puis en développant la détection par spectroscopie Raman. Ceci fait l'objet d'un projet nouveau en cours d'élaboration.

Conclusion chapitre 3

L'objectif de l'étude présentée dans ce chapitre était d'évaluer la faisabilité dans des conditions particulières de méthodes d'immobilisation connues. Ces conditions sont celles imposées par la miniaturisation et l'intégration des biopuces et des biocapteurs dans des systèmes complexes : les volumes réactionnels doivent donc pouvoir être faibles, et l'immobilisation réalisée dans un environnement fragile.

Cinq méthodes parmi celles les plus couramment utilisées pour la fonctionnalisation collective de surfaces peu fragiles ont été sélectionnées.

Malgré ses performances en termes de sensibilité et de spécificité, la chimie des dendrimères telle qu'elle a été décrite ne répond pas au cas particulier étudié, en raison de la volatilité du solvant THF et de son incompatibilité avec les matières plastiques.

La **silanisation** à l'aide de GPTS a été mise en œuvre, mais il s'est avéré difficile d'obtenir des résultats reproductibles avec le protocole utilisé.

L'**auto-assemblage** d'alcanethiols et l'immobilisation sur **polymère** de PLLgPEG ont été comparés dans le cadre d'études sur microbalance à quartz. Les deux méthodes ont permis d'immobiliser les biomolécules de façon efficace et peu de contraintes ont été identifiées. Dans le contexte de l'étude, l'auto-assemblage d'alcanethiols a permis de mieux répondre aux exigences de sensibilité, tandis que la spécificité était meilleure sur PLLgPEG.

Enfin l'immobilisation par **électropolymérisation de pyrrole** a été mise en place et réalisée de façon localisée à l'aide du robot Bioplume. Cette adaptation a permis de montrer que le volume réactionnel correspondant à une seule goutte déposée était suffisant. Par ailleurs, la réalisation simultanée de l'immobilisation et de l'adressage représente un gain de temps considérable. L'inconvénient majeur de la technique réside dans l'accessibilité à un contact électrique sur la surface. Cette limitation est peu importante dans le domaine des biocapteurs miniatures, qui peuvent être recouverts d'une couche conductrice au cours de leur fabrication.

Afin de valider entièrement sa pertinence, la méthode d'électrodépôt appliquée au robot Bioplume a ensuite été utilisée pour adresser des biomolécules sur deux biocapteurs de petite taille : des prismes de SPRi et des fibres optiques. Dans les deux cas, la possibilité de réaliser des motifs de 10µm de diamètre a permis de répondre au problème de la détection simultanée de plusieurs interactions.

En ce qui concerne l'**imagerie SPR**, la densité de biomolécules peut être ainsi augmentée jusqu'à 10^6 spots/cm^2 et donc une détection multiplexée sur une plus large variété de sondes est envisageable (plusieurs centaines de milliers).

Dans le cas des **fibres optiques**, le diamètre de la surface active est réduit cette fois à 350µm. L'utilisation de l'électrodépôt adapté à Bioplume a permis néanmoins d'adresser 300 gouttes indépendantes sur la section d'une de ces fibres, et d'immobiliser simultanément les biomolécules contenues dans la solution déposée. Ces premiers résultats ouvrent la voie à une étude plus large sur la détection de biomolécules par spectroscopie Raman en endoscopie.

L'électropolymérisation de pyrrole à l'aide du robot Bioplume permet donc de répondre simultanément aux deux problématiques de l'adressage et de l'immobilisation dans le cas de surfaces réduites, d'environnements fragiles, ou de quantités limitées d'échantillons biologiques. Pour aller plus loin dans l'étude de l'électrochimie localisée appliquée à ce robot, deux autres aspects ont été étudiés. Dans un premier temps, des tests d'électro-désorption ont été réalisés, c'est-à-dire en utilisant une réaction électrochimique non plus pour fixer des molécules sur une surface mais pour favoriser leur désorption localisée. Dans un deuxième temps, un nouveau changement d'échelle a été testé, grâce à des plumes nouvellement mises au point pour réaliser des spots de 1-2µm de diamètre, soit encore 10 fois plus petits. Enfin des microélectrodes dédiées aux analyses électrochimiques à l'aide de Bioplume ont été concues, fabriquées et validées. Les résultats de ces trois études sont présentés dans le chapitre 4.

Chapitre IV

Chapitre IV : Pour aller plus loin avec Bioplume comme outil d'électrochimie localisée : électro-désorption et miniaturisation

Nous avons montré précédemment que le robot Bioplume pouvait être utilisé non seulement pour adresser des molécules sur des surfaces, mais aussi pour les immobiliser, en réalisant simultanément une réaction électrochimique localisée dans la goutte de solution déposée, c'est-à-dire dans un volume de quelques dizaines de femtolitres. Ce chapitre présente trois nouveaux aspects de l'électrochimie localisée appliquée au robot Bioplume : d'abord l'électrodésorption, ensuite la miniaturisation, et enfin l'utilisation de microélectrodes concues et fabriquées spécialement pour ce type d'application.

IV.1. Electrodésorption localisée : étude sur le polymère PLLgPEG

Le copolymère de poly-L-lysine et de polyéthylène glycol PLLgPEG a été présenté dans le chapitre 3 pour son utilisation en tant que couche de liaison entre un support solide et une biomolécule. Dans ce cas particulier, une terminaison biotine avait été greffée sur une partie des chaînes de PEG. Plus couramment, le PEG, non modifié, est utilisé pour éviter l'adsorption non spécifique de protéines ou de cellules sur une surface. Le PLLgPEG est donc utilisé dans le domaine des biocapteurs pour protéger les zones où aucune adsorption ne doit avoir lieu. La fixation du PLLgPEG sur le support est assurée par une interaction électrostatique entre les groupements de lysine chargés positivement et le matériau solide dont la charge globale est négative (électrons délocalisés sur l'oxygène).

L'équipe de Janös Vörös de l'ETH de Zurich, a montré que ce polymère pouvait être désorbé d'une surface par application d'un potentiel positif [1]. Le test a été réalisé sur des électrodes en oxyde d'indium dopé à l'étain (ITO), placées dans une chambre fluidique de 60µL dans laquelle sont également plongés un fil de platine (contre-électrode) et une électrode de référence en argent. Du PLLgPEG marqué en fluorescence a été adsorbé sur ces électrodes de façon uniforme : l'application d'un potentiel de +1,8V pendant 24s a permis d'obtenir une désorption de 90% du polymère. Ceci a été vérifié en adsorbant une protéine fluorescente sur la surface ainsi libérée (cf figure 1). Les applications développées par la suite concernent la délivrance de protéines et la structuration de films de cellules initiés par application d'un potentiel de surface [2] [3].

Pour expliquer ce phénomène de désorption les auteurs émettent plusieurs hypothèses. D'une part, ils supposent que l'application d'un potentiel positif crée une accumulation de charges positives en surface du solide qui entraîne une répulsion électrostatique. D'autre part, les auteurs pensent que l'accumulation d'ions H^+ due à l'électrolyse de l'eau pourrait écranter les charges de la poly-L-lysine. Ceci est discutable en raison de la mobilité importante de ces ions. Par contre, nous pensons que l'électrolyse peut entraîner la formation de bulles d'O_2 qui créent une distanciation physique entre la surface et le polymère. La possibilité qu'il y ait également une oxydation des amines nous paraît également intéressante à vérifier.

IV1.1. Tests d'électrodésorption localisée de PLLgPEG avec Bioplume

IV.1.1.a. Essais préliminaires

Les premiers tests d'électrodésorption localisée à l'aide de Bioplume ont été réalisés sur des surfaces d'oxyde de titane (TiO_2), à l'aide de PLLgPEG marqué en fluorescence. Plus précisément, deux fluorophores ont été testés : la rhodamine (TRITC) et la fluorescéine (FITC). Ces PLLgPEG modifiés sont commercialisés par la société suisse Surface Solutions.

Les surfaces d'oxyde de titane sont préparées en utilisant comme support des plaquettes de silicium. D'abord, une oxydation thermique de la surface de silicium est réalisée, pour obtenir une couche isolante de SiO_2 et éviter toute fuite de courant dans la plaquette. Ensuite, du titane est déposé par évaporation, puis recuit sous atmosphère O_2 pour obtenir de l'oxyde de titane en surface (cf figure 3). Les plaquettes sont ensuite découpées en échantillons de 2,5*0,75cm : ces dimensions permettent de plonger entièrement chaque échantillon dans un tube de 2mL.

Des surfaces d'ITO ont également été préparées : dans ce cas, l'étape d'oxydation thermique du silicium est identique, puis l'ITO est déposé par pulvérisation cathodique. Ces deux oxydes métalliques ont été choisis pour leur intérêt dans le domaine des biocapteurs. En effet, le TiO_2, semi-conducteur de type N, est biocompatible et donc utilisé par exemple pour des expériences en présence de cellules. L'ITO est lui utilisé le plus souvent dans les systèmes photo-électrochimiques ou optoélectroniques, car il présente la particularité d'être à la fois conducteur et transparent.

L'électrolyte utilisé pour réaliser l'électrodésorption est le tampon HEPES, utilisé classiquement pour réaliser des solutions de PLLgPEG, auquel a été ajouté du glycérol (25% *v/v*) pour permettre le dépôt avec Bioplume sans risque d'évaporation.

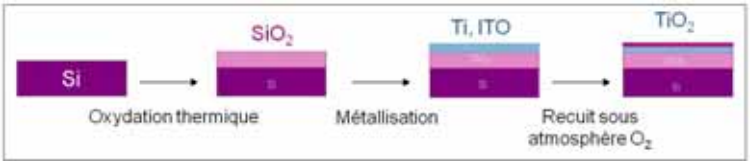


Figure 3 : Préparation des surfaces de TiO_2 et d'ITO.

Les tests préliminaires sont réalisés selon le protocole suivant. Dans un premier temps, les surfaces de TiO_2 et d'ITO sont nettoyées et activées par plasma d'oxygène, puis plongées dans un tube contenant une solution de PLLgPEG-FITC ou de PLLgPEG-TRITC. Au bout de 30 min d'incubation, les échantillons sont rincés au tampon HEPES puis à l'eau, et séchés à l'air comprimé. Ils sont ensuite placés sur la zone porte-échantillons du robot Bioplume, et un contact électrique vers l'électrode de travail du potentiostat est réalisé.

Les plumes, reliées à la contre-électrode du potentiostat, sont alors chargées avec une solution d'électrolyte et mises en contact avec la surface. Une différence de potentiel est alors appliquée pendant une durée contrôlée par le potentiostat et le courant résultant est enregistré (chrono-ampérogramme). La surface est ensuite rincée avec une solution d'HEPES, puis avec de l'eau et enfin observée au microscope en fluorescence.

La figure 4 présente les chrono-ampérogrammes obtenus sur une surface de TiO_2, en appliquant des impulsions de potentiels de +2V ou de -2V. Dans les deux cas, on observe l'accumulation de charges à la surface, puis la consommation de ces charges à courant constant, et enfin le pic de décharge de la double couche électrique. Ceci confirme que le contact électrique est assuré par la solution d'HEPES contenant 25% de glycérol. Cependant, ces résultats ne suffisent pas pour conclure sur la présence ou non d'une réaction électrochimique spécifique à une éventuelle désorption de PLLgPEG. En effet, les courants obtenus sont particulièrement faibles, et difficiles à mesurer précisément avec ce montage expérimental. D'autre part, il est possible que l'électrolyse de l'eau ait lieu également à ces potentiels.

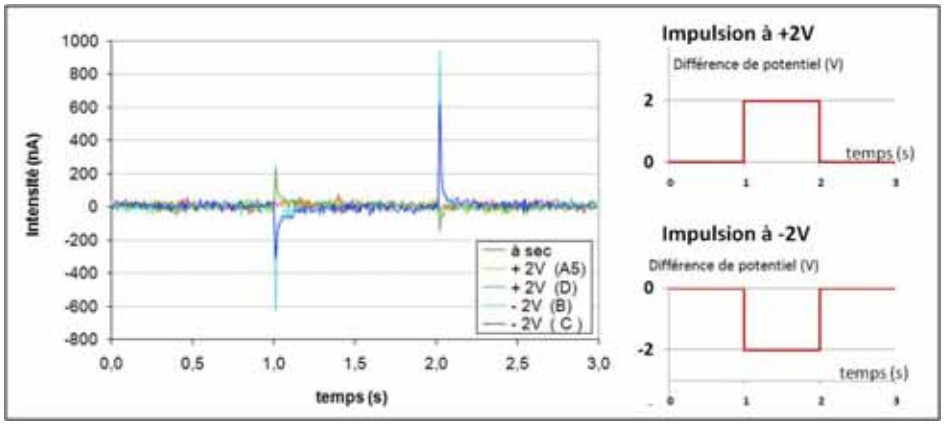


Figure 4 : Chrono-ampérogrammes enregistrés au cours des tests préliminaires de désorption localisée de PLLgPEG avec Bioplume sur surface de TiO_2.

Surface de TiO_2 nettoyée par plasma O_2 (1000mL/h, 300W, 5min), puis plongée dans une solution de PLLgPEG-TRITC à 1mg/mL préparée dans du tampon HEPES pendant 30min. Rinçage au tampon HEPES, puis à l'eau et séchage à l'air comprimé. Connexion de la surface à l'électrode de travail du potentiostat.

Plumes (reliées à la contre-électrode du potentiostat) chargées avec du tampon HEPES contenant 25% de glycérol et mises en contact avec la surface. Application d'une impulsion de potentiel de +2V ou de -2V pendant 1s et mesure du courant obtenu. Electrode de référence reliée à la contre-électrode.

En ce qui concerne l'observation au microscope, la présence d'un signal uniforme sur toute la surface recouverte de PLLgPEG-FITC ou de PLLgPEG-TRITC atteste de la **correcte adsorption du polymère**. Par contre, **aucune disparité pouvant correspondre à une désorption localisée n'a pu être observée, quels que soient le potentiel appliqué, la durée de l'impulsion, ou le type de surface (TiO_2 ou ITO)**. Le repérage de motifs suffisamment contrastés est d'autant plus difficile que les intensités de fluorescence sont faibles, en particulier sur l'ITO. Ceci peut être attribué à un phénomène de transfert d'énergie dans ces oxydes métalliques, car l'application du même protocole d'adsorption sur des surfaces de SiO_2 donne des signaux de fluorescence beaucoup plus intenses. Cette désactivation de fluorescence (ou quenching) à la proximité de surfaces de TiO_2 ou d'ITO a été décrite par plusieurs auteurs [4] [5] [6].

Pour pouvoir poursuivre l'étude, il apparaît donc nécessaire d'optimiser le système de visualisation en fluorescence.

[4] : W.J.E. Beek et R.A.J. Janssen, *Advanced functional materials*, 2002, **12 (8)**, 519-525

[5] : A. Kathiravan | V. Anbazhagan | M. Asha Jhonsi | R. Renganathan, *Zeitschrift für Physikalische Chemie*, 2007, **221 (7)**, 941-948

[6] : H. Yamada, H. Imahori, Y. Nishimura, I. Yamazaki, T.K. Ahn, S.K. Kim, D. Kim, et S. Fukuzumi, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 9129-9139

IV.1.1.b. Optimisation du système de visualisation en fluorescence

Pour exalter les signaux de fluorescence et pouvoir ainsi détecter plus facilement des chutes de signal localisées, trois points sont améliorés : la méthode d'observation, le fluorophore lui-même, et l'outil de détection de la fluorescence.

- *Utilisation des gouttes de liquide comme lentilles*

Dans les expériences décrites précédemment, les gouttes d'électrolytes utilisées pour réaliser l'électrodésorption sont rapidement recouvertes d'une solution de rinçage, pour éviter que le PLLgPEG désorbé ne s'adsorbe de nouveau. Au cours d'un nouveau test sur une couche de PLLgPEG-TRITC, les gouttes déposées ne sont pas rincées, mais observées directement au microscope en fluorescence. Les images obtenues sont présentées figure 5. On note que **le signal de fluorescence est beaucoup plus important au niveau des gouttes que sur les zones sèches de la surface**. On peut alors supposer que ces gouttes agissent comme des lentilles et permettent ainsi de mieux visualiser la couche de PLLgPEG-fluo sur laquelle elles sont déposées. Un test complémentaire permet de vérifier que l'électrolyte n'émet pas de fluorescence rouge, et qu'il s'agit donc bien d'un phénomène optique. Cette méthode d'observation est donc adoptée pour les tests suivants.

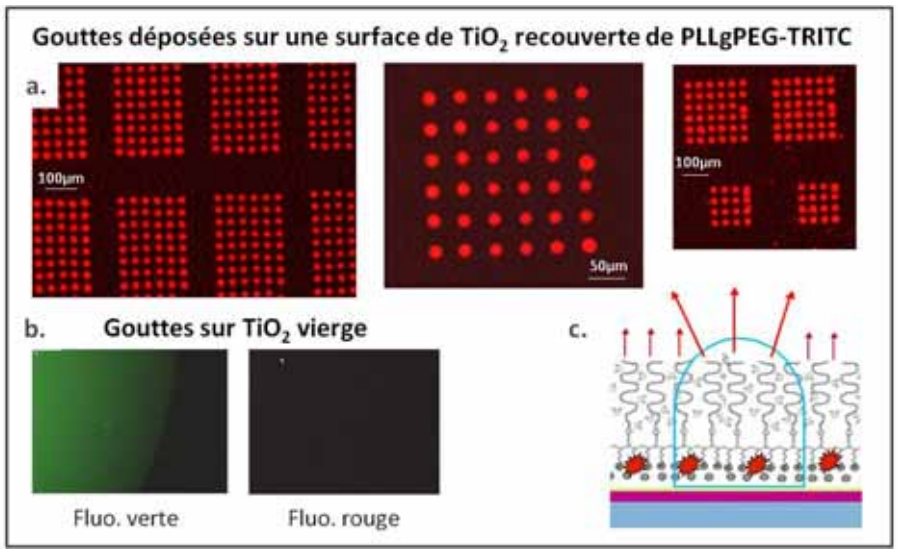


Figure 5 : Observation de la couche de PLLgPEG-fluo à travers les gouttes déposées jouant le rôle de lentilles.

a. Surface de TiO_2 nettoyée par plasma O2 (1000mL/h, 300W, 5min), puis plongée dans une solution de PLLgPEG-TRITC à 500µg/mL préparée dans du tampon HEPES pendant 30min. Rinçage au tampon HEPES, puis à l'eau et séchage à l'air comprimé. Dépôt de tampon HEPES contenant 25% de glycérol avec le robot Bioplume sur cette surface, et observation au microscope en fluorescence.

b. Témoin : dépôt à la pipette de tampon HEPES contenant 25% glycérol sur une surface de TiO_2. L'image en fluorescence verte permet de situer le bord du dépôt, et l'image en fluo. rouge de la même zone confirme que le tampon HEPES lui-même ne fluoresce pas à cette longueur d'onde.

c. Interprétation : rôle de lentille des gouttes.

➢ *Augmentation de la brillance et de la photostabilité du PLLgPEG-fluo*

Les fluorophores de la gamme des Alexa sont connus pour leur brillance et leur photostabilité accrue par rapport aux fluorophores conventionnels comme la rhodamine ou la fluorescéine [7]. Ces fluorophores sont disponibles commercialement sous la forme d'esters de succinimide, ce qui permet un couplage avec des molécules portant des fonctions amines. Un marquage de PLLgPEG avec ce type de fluorophore est donc possible.

L'AlexaFluor®647 a été choisi, car sa fluorescence dans le rouge permet de le visualiser indépendamment des traces éventuelles de tampons (HEPES ou PBS) qui fluorescent dans le vert. Les longueurs d'ondes d'absorption et d'émission sont les mêmes que celles de la cyanine 5 (Cy5), ce qui permet également d'utiliser les systèmes de lecture avec amplification du signal conçus pour les biopuces (voir paragraphe suivant).

Le couplage avec du PLLgPEG non fluorescent a été réalisé en adaptant un protocole utilisé habituellement pour le marquage de protéines.

➢ *Lecture avec un système d'amplification*

Les scanners utilisés pour lire les biopuces comportent un système d'amplification du signal de fluorescence émis. Pour augmenter la sensibilité de détection, il peut donc être intéressant d'utiliser ce système de lecture plutôt qu'un microscope en fluorescence.

Les scanners disponibles à la Plateforme Biopuces de Toulouse sont conçus pour la lecture de lames de verre, d'épaisseur standard. Pour scanner des échantillons préparés sur des plaquettes de silicium, une **adaptation du plan focal** a été nécessaire. Pour cela, le focus du scanner a été réglé au maximum (+200µm), puis les échantillons ont été collés sur une lame de verre, et des cales ont été ajoutées sur les bords de cette lame pour modifier la distance à l'objectif du scanner. Des images de ces étapes d'optimisation sont présentées figure 6.

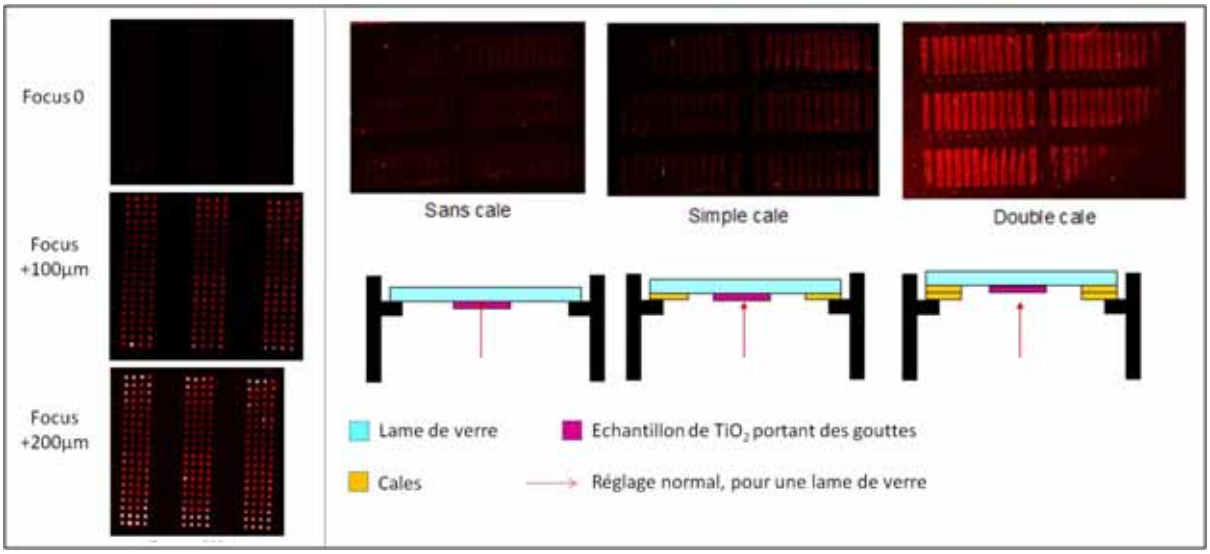


Figure 6 : Adaptation du plan focal pour pouvoir lire un échantillon de TiO_2 à l'aide un scanner conçu pour des lames de verre : réglage du focus et ajout de cales.

[7] : N. Panchuk–Voloshinaa, R.P. Hauglanda, J. Bishop–Stewarta, M.K. Bhalgata, P.J. Millarda, F. Maoa, W.-Y. Leunga, et R.P. Hauglanda, *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 1999, **47**, 1179-1188

Après avoir modifié ces trois aspects du protocole de visualisation, un nouveau test d'électrodésorption a été réalisé.

IV.1.1.c. Observation d'une chute locale de fluorescence

Pour limiter les phénomènes de transfert d'énergie lumineuse, ce test est réalisé sur une surface de TiO_2 plutôt que d'ITO.

La surface est activée par plasma d'O_2 puis plongée dans une solution de PLLgPEG-AlexaFluor®647. Au bout de 30min d'incubation, elle est rincée au tampon HEPES puis à l'eau, séchée, placée sur le robot et connectée au potentiostat.

Les plumes sont ensuite chargées avec du tampon HEPES contenant 25% de glycérol, et des dépôts sont réalisés en mode continu, sous la forme de 6 matrices de 88 spots. Au cours de chaque dépôt, un potentiel de 0, +2V ou -2V est appliqué. Des temps de contact de 0,5 à 10s sont testés, ce qui correspond aux durées d'électrodésorption. L'observation des chrono-ampérogrammes montre que le contact électrique est correct pour tous les spots. Les valeurs de courant mesurées sont indiquées dans le tableau de la figure 7.

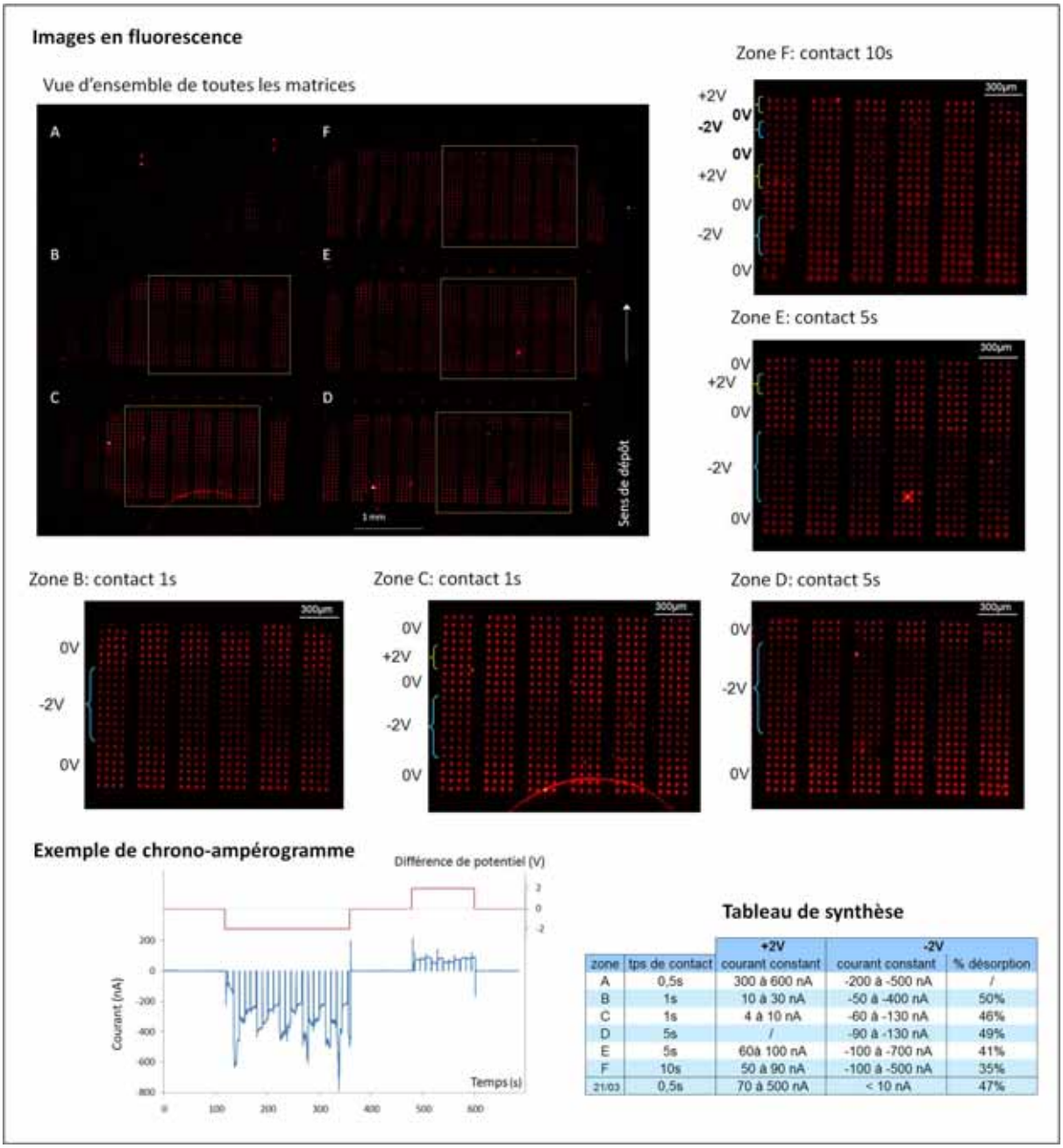
La surface est ensuite lue au scanner sans rinçage préalable des gouttes déposées, et en adaptant le plan focal comme décrit précédemment. L'image obtenue est présentée figure 7. **Pour chaque matrice, on observe une zone où les spots sont plus sombres, qui correspond à l'application d'un potentiel de -2V**. La mesure des intensités de fluorescence à l'aide du logiciel Genepix permet de montrer que **cette chute de fluorescence est de l'ordre de 50%**. Par ailleurs elle ne semble pas corrélée à la durée d'application du potentiel (cf tableau figure 7). Ce calcul est réalisé en comparant la fluorescence moyenne des spots réalisés en appliquant -2V à la fluorescence moyenne des spots à 0V.

Pour les gouttes déposées en appliquant un potentiel de +2V en revanche, aucune variation significative ne peut être observée.

Ce résultat est surprenant, car la désorption de PLLgPEG a été observée par l'équipe de J. Vörös en réalisant une oxydation, c'est-à-dire en appliquant un potentiel positif.

Par ailleurs, des expériences complémentaires seraient nécessaires pour savoir si la chute de fluorescence observée à potentiel négatif correspond effectivement à une désorption du PLLgPEG ou à une réduction du fluorophore lui-même.

Une étude plus détaillée des réactions électrochimiques pouvant avoir eu lieu au cours de ces expériences a donc été réalisée, en utilisant en particulier la voltamétrie cyclique. Ceci est présenté dans le paragraphe suivant.



zone	tps de contact	+2V courant constant	-2V courant constant	% désorption
A	0,5s	300 à 600 nA	-200 à -500 nA	/
B	1s	10 à 30 nA	-50 à -400 nA	50%
C	1s	4 à 10 nA	-60 à -130 nA	46%
D	5s	/	-90 à -130 nA	49%
E	5s	60à 100 nA	-100 à -700 nA	41%
F	10s	50 à 90 nA	-100 à -500 nA	35%
21/03	0,5s	70 à 500 nA	< 10 nA	47%

Figure 7 : Test de désorption localisée de PLLgPEG : observation d'une chute de fluorescence lors de l'application de potentiels de -2V dans une goutte déposée sur du PLLgPEG-AlexaFluor®647 (support TiO_2).

- Surface de TiO_2 nettoyée par plasma O_2 (1000mL/h, 300W, 5min), puis plongée pendant 30min dans une solution de PLLgPEG-AlexaFluor®647 à 500µg/mL préparée dans du tampon HEPES. Rinçage au tampon HEPES, puis à l'eau et séchage à l'air comprimé. Dépôt de tampon HEPES contenant 25% de glycérol avec le robot Bioplume sur cette surface, en mode continu, en appliquant des potentiels de 0, +2V ou -2V, et en réglant le temps de contact à 0,5, 1, 5 ou 10s.
- Observation au scanner en fluorescence sans sécher les gouttes. Les spots rouges observés correspondant donc à la couche de PLLgPEG-Alexa vue à travers les gouttes déposées.
- Quantification des intensités de fluorescence à l'aide du logiciel Genepix et calcul du pourcentage de chute de fluorescence, noté %désorption selon l'équation :

% désorption : $(1 - \text{fluo moyenne}_{\text{spots à } -2V} / \text{fluo moyenne}_{\text{spots à } 0V}) * 100$

- Mesure sur chaque chrono-ampérogramme du courant stable obtenu après le pic capacitif, noté « courant constant »

IV1.2. Etude de la désorption de PLLgPEG par voltampérométrie cyclique

IV.1.2.a. Principe de la voltampérométrie cyclique et montage expérimental

La voltampérométrie cyclique est une méthode d'analyse des réactions électrochimiques basée sur l'observation des variations du courant lors du balayage de diverses valeurs de potentiel. Un voltampérogramme est ainsi réalisé en appliquant une rampe de potentiel à une vitesse constante, et en enregistrant les variations temporelles du courant. Immédiatement après, un balayage de retour au potentiel initial est effectué, en général à la même vitesse. Les valeurs du courant sont ensuite représentées en fonction des valeurs de potentiel, et un graphique de forme cyclique est obtenu.

Un exemple de voltampérogramme est présenté figure 8, dans le cas d'une réaction électrochimique réversible, en régime de diffusion pure, en supposant que la solution ne contient à l'instant initial que la forme réduite du couple oxydant/réducteur. Au cours du balayage de potentiel dans le sens positif, cette espèce est oxydée, ce qui se traduit par un pic de courant. Au cours du balayage retour, la réaction inverse se produit, pour obtenir de nouveau la forme réduite. La courbe retour n'est pas identique à la courbe aller car le balayage de potentiel induit une modification de la composition de la couche de diffusion.

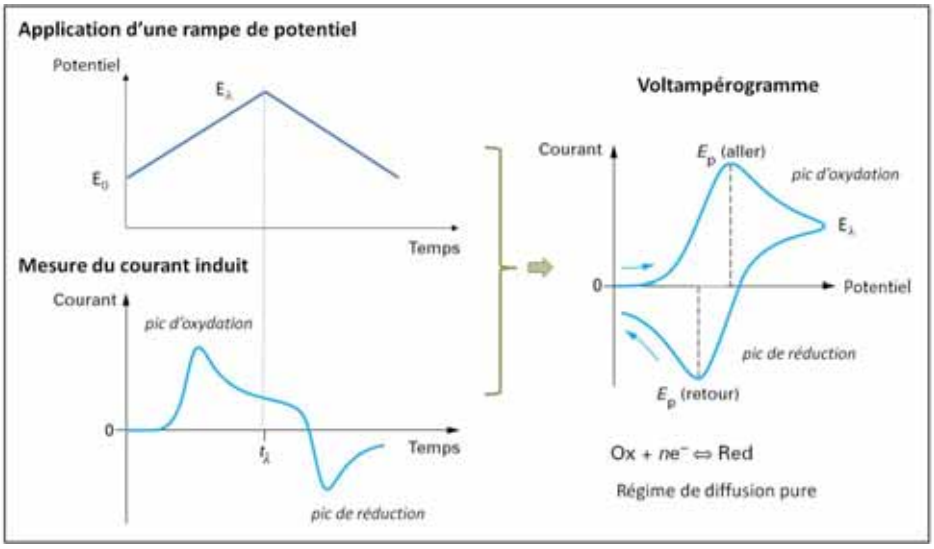


Figure 8 : Exemple de voltampérogramme, en régime de diffusion pure. Adapté de [8]
« Potentiel » = potentiel à l'électrode de travail, c'est-à-dire sur la surface, comparé au potentiel de l'électrode de référence (cf annexe 1).

Pour pouvoir analyser correctement les voltampérogrammes, il est nécessaire de contrôler la valeur du potentiel par rapport à un potentiel de référence connu. Un montage à trois électrodes doit donc être réalisé. Ceci n'est pas possible dans la configuration utilisée jusqu'ici, c'est-à-dire avec le robot Bioplume.

L'étude voltampérométrique de la désorption de PLLgPEG a donc été réalisée sur un dispositif à plus grande échelle, en utilisant une cuve d'électrochimie pouvant contenir plusieurs millilitres de solution. Une fois montés dans ce dispositif, les échantillons de TiO_2 constituent le fond de la cellule d'électrochimie, et leur surface est reliée à l'électrode de travail d'un potentiostat. Dans la solution sont ensuite plongés un fil de platine qui sert de

contre-électrode et une électrode de référence Ag/AgCl. Un schéma du montage est présenté figure 9.

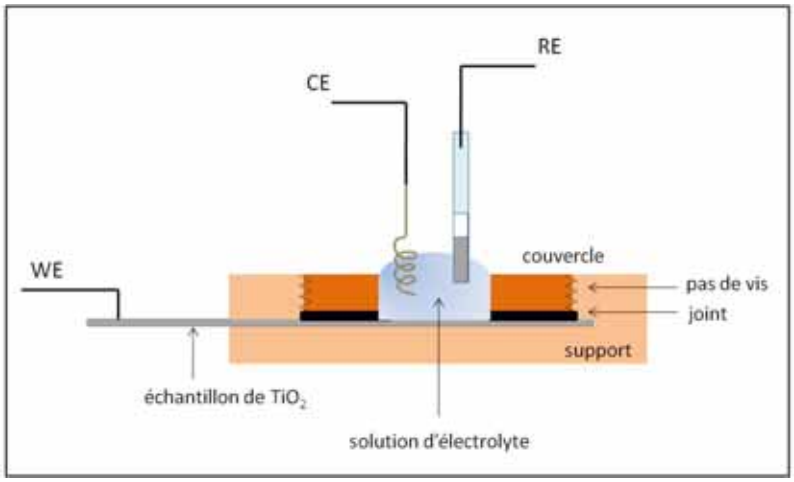


Figure 9 : Montage à trois électrodes utilisé pour l'étude de la désorption de PLLgPEG par voltampérométrie cyclique.

IV.2.2.b. Effet du tampon HEPES et du glycérol

Avant de commencer l'étude de désorption, un test préliminaire est réalisé sur une surface vierge de TiO_2, pour déterminer la forme du voltampérogramme et l'influence des composants de l'électrolyte lui-même.

La figure 10 montre les voltampérogrammes obtenus avec du tampon HEPES seul, puis en y ajoutant 25% *v/v* de glycérol.

La chute de courant observée pour les potentiels les plus faibles correspond à l'électrolyse de l'eau.

L'épaulement présent aux alentours de -1,3V peut être attribué à une réduction de la pipérazine contenue dans le tampon HEPES. En effet, une expérience complémentaire montre que cet épaulement n'est pas présent si on remplace le tampon HEPES par du tampon phosphate (résultat non montré). De plus la réduction de cette espèce à des potentiels proches de cette valeur a été observée précédemment par Laurent *et al* au laboratoire CREAB du CEA de Grenoble (résultats non publiés).

On note que **l'ajout de glycérol a pour effet de diminuer la valeur moyenne du courant enregistré**. Ce phénomène a été observé précédemment [9] et peut s'expliquer par une uniformisation des densités de charges à la surface, due au caractère humectant du glycérol.

Ce test préliminaire montre que le montage expérimental est correct, et que des voltampérogrammes pourront être tracés dans une fenêtre de potentiel supérieure à -1,5V. Un épaulement à -1,3V dû à la réduction d'un composé contenu dans l'électrolyte sera vraisemblablement présent de façon systématique dans les expériences suivantes.

[8] : F. Bedioui, Voltampérométrie : théorie et mise en œuvre expérimentale, *Techniques pour l'ingénieur*, **2 (126)**, 1-21

[9] : Emeline Descamps, Miniaturisation des techniques de structuration de substrat par électropolymérisation de pyrrole : application aux biopuces et à l'électronique moléculaire, 209p, Thèse, Electrochimie, Université Joseph Fourier, Grenoble, 2008

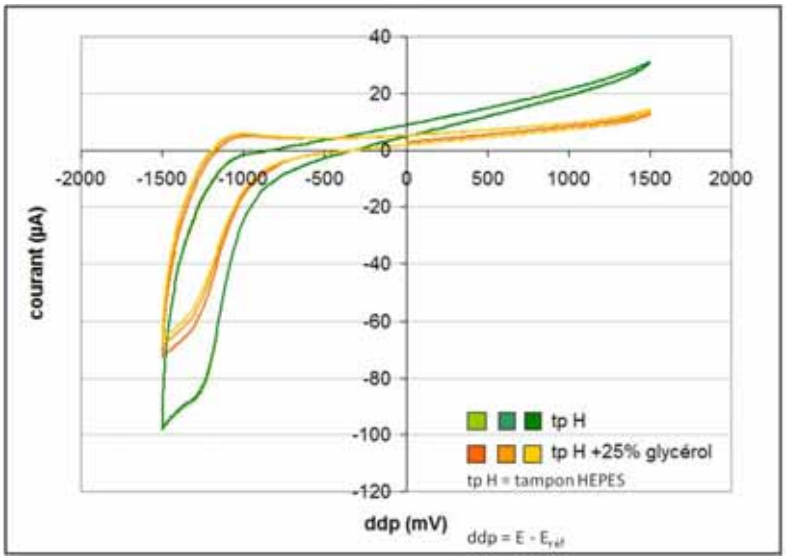


Figure 10 : Voltampérogrammes cycliques pour une solution de tampon HEPES, sur une surface de TiO_2 utilisée comme électrode de travail.

Montage électrochimique :

Surfaces de TiO_2 placées dans une cellule d'électrochimie et reliées à l'électrode de travail d'un potentiostat. Cuve remplie de tampon HEPES (seul ou contenant 25% de glycérol), dans laquelle sont plongés un fil de platine (contre-électrode) et une électrode de référence Ag/AgCl.

Tracé du voltampérogramme :

Application de trois cycles de potentiel de -1,5V à +1,5V à vitesse constante de 100mV/s, et mesure du courant induit.

IV.2.2.c. Etude en visualisation directe

Dans un premier temps, on cherche à savoir si la désorption de PLLgPEG se traduit par l'apparition d'un pic caractéristique sur le voltampérogramme.

Trois types de surfaces sont étudiées : du TiO_2 recouvert de PLLgPEG, du TiO_2 vierge qui sert de témoin négatif, et du TiO_2 recouvert de PLLgPEG-FITC. Ce marquage en fluorescence permet non seulement de contrôler la correcte adsorption du PLLgPEG sur l'ensemble de la surface, mais aussi l'éventuelle désorption au niveau de la zone immergée dans la cuve d'électrochimie.

L'une après l'autre, les surfaces sont montées dans la cellule d'électrochimie, puis la cuve est remplie d'électrolyte, et deux cycles de +1,5 à -1,5V sont réalisés. Entre chaque expérience, la cellule, la contre-électrode et l'électrode de référence sont rincées à l'eau déionisée.

Les voltampérogrammes obtenus sont rassemblés figure 11. Le tracé obtenu sur la surface recouverte de PLLgPEG est identique à celui sur la surface vierge de TiO_2. Pourtant, la surface recouverte de PLLgPEG-FITC, préparée simultanément et selon le même protocole, est bien fluorescente, ce qui montre que le polymère est bien adsorbé sur la surface. **Aucun pic pouvant être attribué à une réaction électrochimique responsable de la désorption de PLLgPEG n'est donc visualisable directement.**

En revanche, **pour la surface recouverte de PLLgPEG-FITC, un pic de réduction à -0,95V$_{/Ag/AgCl}$ apparaît**. Ce pic étant spécifique à la présence du fluorophore, on peut supposer qu'il correspond à la réduction de ce dernier. Par ailleurs, la **réduction de FITC** à un potentiel de -0,88V$_{/Ag/AgCl}$ a été décrite par Moreira *et al* au cours d'une analyse avec une autre méthode électrochimique, la voltampérométrie à redissolution (AdSV) [10], ce qui vient renforcer cette hypothèse. Dans ce cas, la chute de fluorescence observée lors des tests de désorption réalisés avec le robot Bioplume pourrait être due également à une dégradation du fluorophore AlexaFluor®647. La structure de ce fluorophore n'est pas disponible publiquement, et donc la comparaison structurale avec le FITC n'est pas possible. Les tests avec le robot Bioplume devront donc être repris en utilisant une autre méthode pour mettre en évidence la désorption de PLLgPEG, par exemple en adsorbant une espèce fluorescente sur les zones libérées.

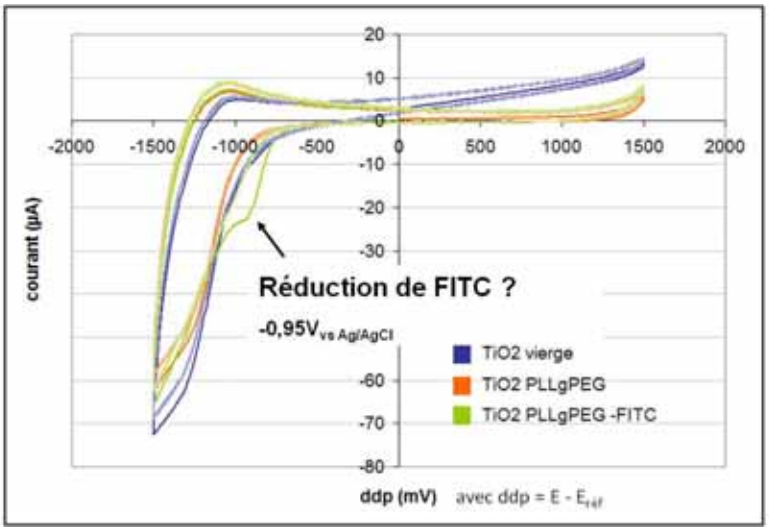


Figure 11 : Etude directe par voltampérométrie cyclique de surfaces recouvertes de PLLgPEG ou de PLLgPEG-FITC.

Préparation des surfaces :

Rinçage de 3 échantillons de TiO_2 à l'eau, puis à l'éthanol et enfin de nouveau à l'eau.

Incubation d'un échantillon dans une solution de PLLgPEG, et d'un autre échantillon dans une solution de PLLgPEG-FITC. Solutions à 500µg/mL préparées dans du tampon HEPES contenant 25% *v/v* de glycérol.

Montage électrochimique :

Surfaces de TiO_2 placées dans une cellule d'électrochimie et reliées à l'électrode de travail d'un potentiostat. Cuve remplie de tampon HEPES contenant 25% de glycérol, dans laquelle sont plongés un fil de platine (contre-électrode) et une électrode de référence Ag/AgCl.

Tracé du voltampérogramme :

Application de deux cycles de potentiel de -1,5V à +1,5V à vitesse constante de 100mV/s, et mesure du courant induit.

Ce test n'ayant pas permis de visualiser directement la désorption de PLLgPEG, un test complémentaire est réalisé, en utilisant cette fois une sonde électrochimique. Ceci peut permettre de visualiser un changement de l'état de surface de façon indirecte.

[10] : J.C. Moreira, C.-F.J. Law et A.G. Foggt., Analyst, 1989, 114, 1607

IV.2.2.d. Etude avec une sonde électrochimique (Ru^{3+})

- *Principe*

L'étude à l'aide d'une sonde électrochimique consiste à observer l'évolution du tracé du voltampérogramme d'un couple oxydo-réducteur modèle (sonde) en fonction des modifications de l'état de surface de l'électrode de travail. Dans cette étude, la sonde choisie est le ruthénium hexa-amine $Ru(NH_2)_6$, dont les formes oxydée et réduite sont Ru^{3+} et Ru^{2+} aux potentiels utilisés.

- *Validation de la méthode sur surface d'or puis sur TiO_2*

Dans un premier temps, le tracé du voltampérogramme obtenu lors des réactions d'oxydation de Ru^{2+} et de réduction de Ru^{3+} est réalisé sur une surface d'or. Ce test sur un métal inerte permet de valider la méthode avant de passer sur TiO_2.

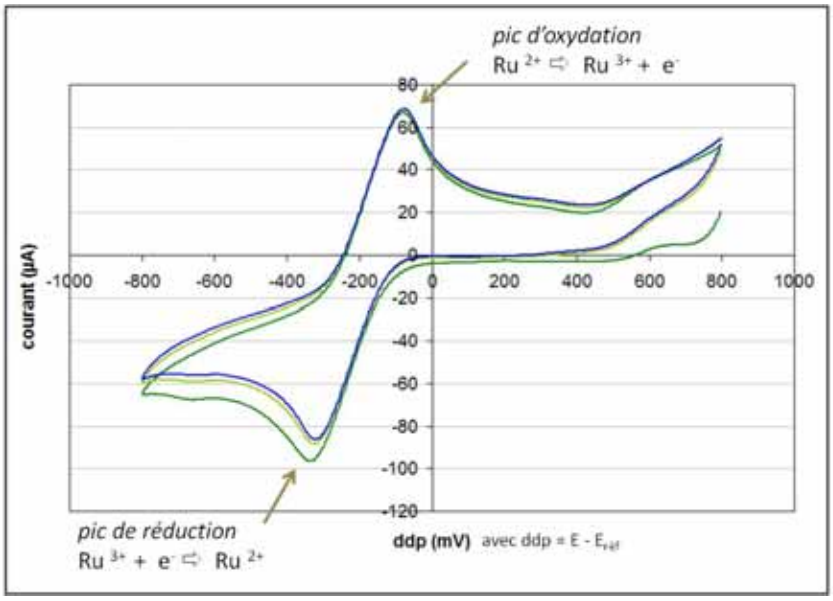


Figure 12 : Voltampérogramme obtenu avec une solution de ruthénium, en utilisant une surface d'or comme électrode de travail.

Le tracé obtenu confirme que la solution de ruthénium à une concentration de 5mM dans le tampon HEPES permet de visualiser correctement les pics d'oxydation et de réduction. Le même test est donc réalisé sur TiO_2 (figure 13). Cette fois, le pic d'oxydation n'est pas visualisable, et on observe une diminution du courant de réduction au cours des cycles successifs. Ceci signifie que **la réaction d'oxydation n'a pas lieu sur TiO_2**. La forme réduite n'est pas régénérée, et la solution s'appauvrit donc en Ru^{3+} ce qui explique que le pic de réduction soit de plus en plus faible.

L'absence de réaction d'oxydation sur TiO_2 peut s'expliquer par le caractère semi-conducteur de ce matériau. Ce phénomène, détaillé dans l'ouvrage de Krishnan Rajeshvar [11], se traduit par l'impossibilité de réaliser le transfert électronique de la solution vers l'électrode de TiO_2.

[11] : K. Rajeshwar, Fundamentals of semiconductor electrochemistry and photoelectrochemistry, *Encyclopedia of electrochemistry*, Weinheim, edited by S. Licht, 2001, Chapter 1, p 3-53, Wiley-VCH

Ceci peut expliquer pourquoi aucune désorption de PLLgPEG n'a été observée au cours des tests avec Bioplume, lorsqu'un potentiel positif était appliqué. Finalement, les réactions oxydatives qui sont la cause de la désorption du polymère dans les expériences décrites par Janös Vörös ne peuvent probablement pas avoir lieu sur TiO_2. Pour rappel, ces expériences avaient été réalisées sur surface d'ITO, qui est un conducteur et non un semi-conducteur.

Malgré ces observations, l'étude des déplacements des pics du ruthénium est poursuivie, en se limitant obligatoirement aux réactions de réduction.

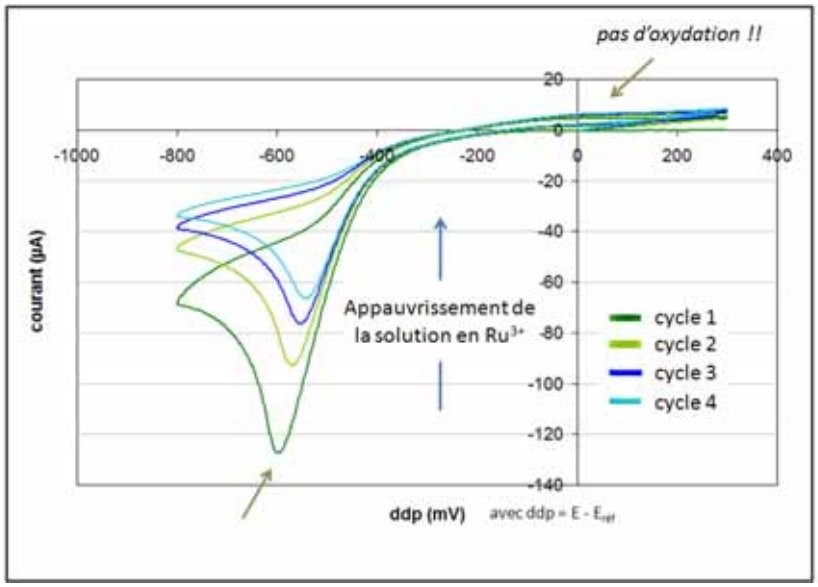


Figure 13 : Voltampérogramme obtenu avec une solution de ruthénium, en utilisant une surface de TiO_2 comme électrode de travail.

➢ *Etude des déplacements des pics du ruthénium*

Une modification de l'état de surface de l'électrode de travail (ici la surface de TiO_2) peut se traduire sur le voltampérogramme de la sonde électrochimique ruthénium par un déplacement du potentiel auquel le pic de réduction apparaît et par une diminution du courant.

L'expérience est réalisée de la façon suivante (figure 14) : une surface de TiO_2 est recouverte de PLLgPEG puis montée dans la cellule d'électrochimie, qui est remplie d'électrolyte (tampon HEPES contenant 25% de glycérol). Un cycle de potentiel est appliqué dans une fenêtre étroite, c'est-à-dire de 0 à -0,8V. La solution d'électrolyte est alors retirée, et remplacée par une solution de ruthénium. Un cycle de potentiel de 0 à -0,8V est appliqué, ce qui permet d'obtenir le tracé initial du voltampérogramme « sonde ».

La solution de ruthénium est alors retirée, la cellule est rincée plusieurs fois au tampon HEPES, et remplie de nouveau d'électrolyte. Un nouveau cycle est appliqué, en agrandissant cette fois la fenêtre de potentiel jusqu'à -1V. Ensuite, la cellule est de nouveau vidée, rincée, remplie avec la solution de ruthénium et le voltampérogramme « sonde » est tracé de nouveau (toujours de 0 à -0,8V).

Ces étapes sont ensuite répétées en agrandissant progressivement la fenêtre de potentiel, jusqu'à -2V.

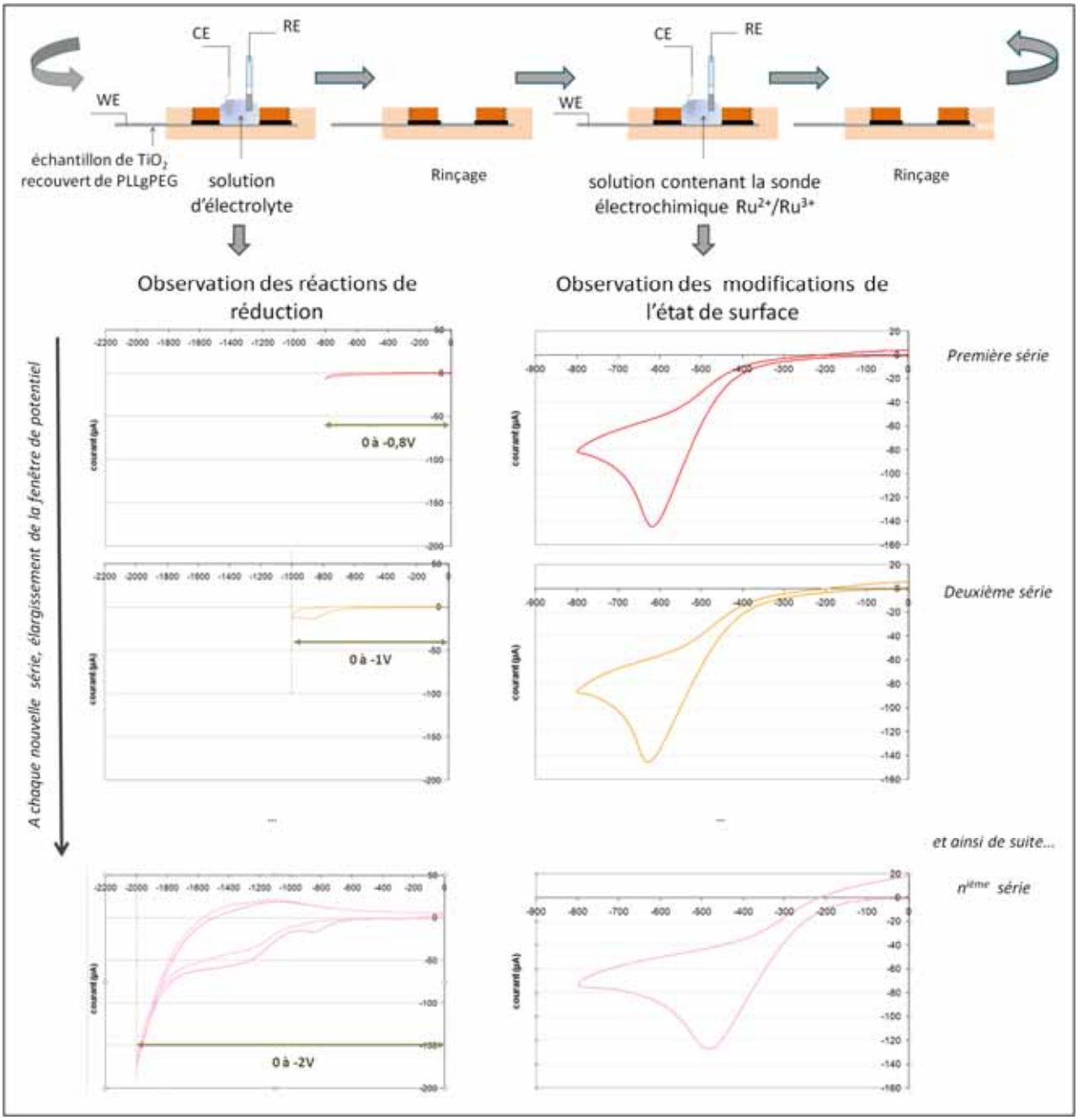


Figure 14 : Protocole d'étude des déplacements du pic de réduction du ruthénium

Montage : surface de TiO_2 placée dans une cellule d'électrochimie et reliée à l'électrode de travail d'un potentiostat. Dans la cellule sont plongés également un fil de platine (contre-électrode) et une électrode de référence Ag/AgCl.
a. Cellule remplie de tampon HEPES contenant 25% de glycérol (= électrolyte). Application d'un cycle de potentiel entre 0 et xV avec x variant de -0,8V à -2V à chaque nouvelle série de test.
b. Rinçage au tampon HEPES
c. Cellule remplie de solution de ruthénium à 5mM préparée dans du tampon HEPES contenant 25% de gléycérol. Application d'un cycle de potentiel entre 0 et -0,8V, et observation des déplacements du pic de réduction.
d. Rinçage.
Les étapes a, b, c, d sont répétées autant de fois que nécessaire pour balayer une fenêtre de potentiel allant [0 ; -0,8V] à [0 ; -2V].

Le protocole est ensuite entièrement repris avec une surface de TiO_2 vierge, qui sert de témoin négatif. Tous les voltampérogrammes obtenus sont rassemblés figure 15.

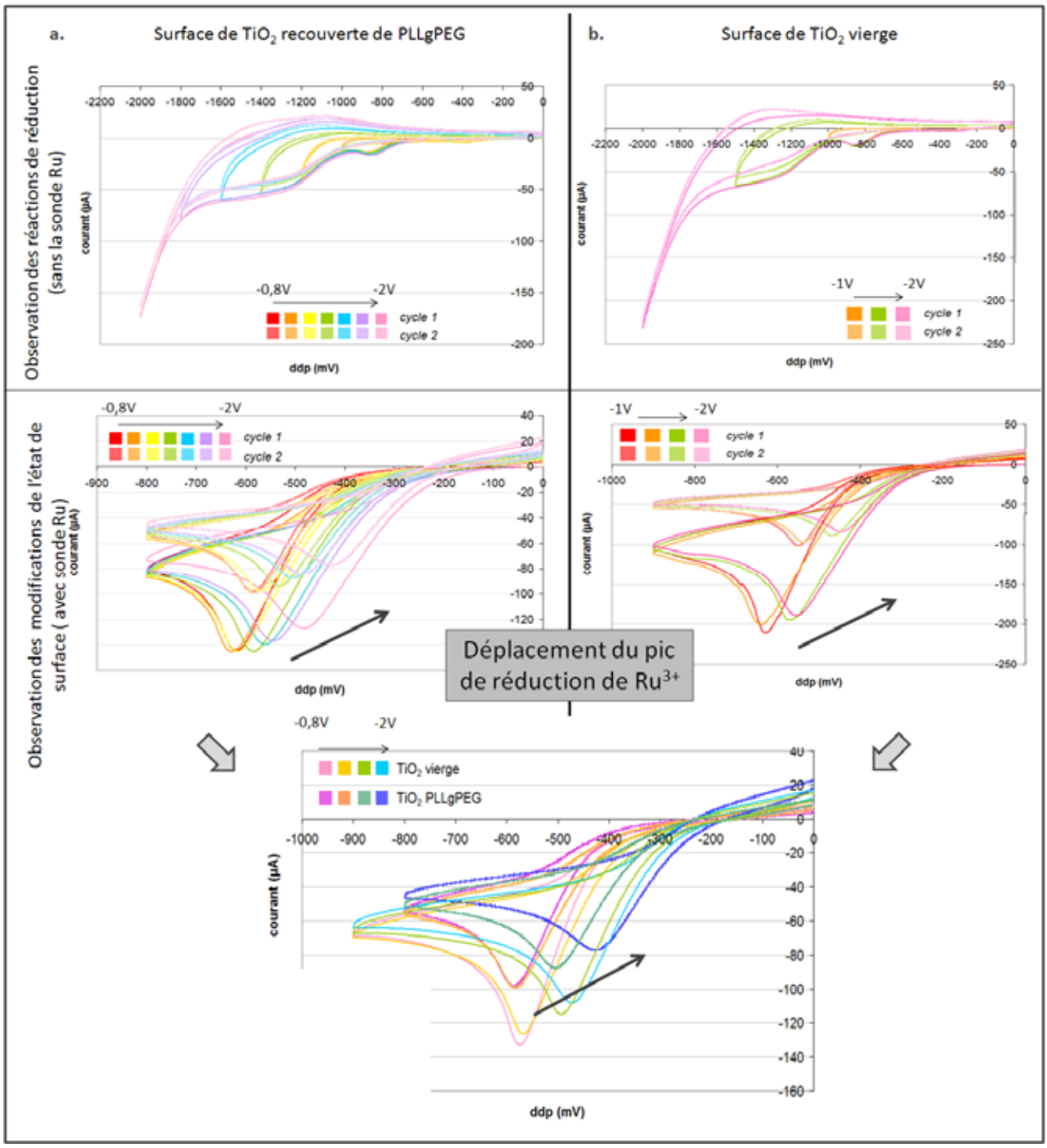


Figure 15 : Déplacement du pic de réduction du ruthénium au fur et à mesure de réactions de réduction de -0,8V à -2V sur une surface de TiO_2 recouverte de PLLgPEG.

a. - Surface de TiO_2 rincée à l'eau, puis à l'éthanol et enfin de nouveau à l'eau, puis plongée dans une solution de PLLgPEG à 500µg/mL préparée dans du tampon HEPES contenant 25% *v/v* de glycérol.

- Montage : surface de TiO_2 placée dans une cellule d'électrochimie et reliée à l'électrode de travail d'un potentiostat. Dans la cellule sont plongés également un fil de platine (contre-électrode) et une électrode de référence Ag/AgCl.

- Solution de ruthénium utilisée comme sonde électrochimique : 5mM dans du tampon HEPES contenant 25% de glycérol (= électrolyte).

- Protocole d'étude : cf figure 14.

b. Même expérience sur une surface de TiO_2 vierge.

Si on observe d'abord les voltampérogrammes réalisés sans la sonde ruthénium, on note systématiquement la présence d'un pic à -0,8V. Ce pic ne peut pas être attribué comme

précédemment au fluorophore FITC, car du PLLgPEG non fluorescent est utilisé, et la cellule d'électrochimie a été soigneusement nettoyée suite aux expériences avec ce fluorophore. Il est par contre probable qu'il s'agisse de la réduction de l'oxygène dissous dans la solution, qui est très communément visualisable à ces valeurs de potentiel.

L'épaulement à -1,3V, attribué précédemment à la réduction de la pipérazine du tampon HEPES, est également présent. Comme précédemment, aucune différence particulière n'apparait lorsque la surface est recouverte de PLLgPEG par rapport à une surface vierge.

En ce qui concerne les voltampérogrammes réalisés avec la sonde ruthénium, on peut observer que les tracés sont superposés tant que les tests de réduction sont réalisés à des potentiels supérieurs à -1,4V. Au-delà, le pic de réduction de Ru^{3+} se déplace vers les potentiels croissants, et le courant est de moins en moins important. Le même comportement est observé sur la surface de TiO_2 vierge et sur la surface recouverte de PLLgPEG.

On peut donc conclure **qu'une modification de l'état de surface du TiO_2 a lieu à partir de -1,3 ou -1,4V, et ceci indépendamment de la présence de PLLgPEG**.

Deux hypothèses peuvent être émises : soit c'est la réduction de la pipérazine, observée aux mêmes potentiels, qui modifie la surface de TiO_2 ; soit une modification du TiO_2 lui-même peut avoir lieu. En effet, le diagramme de Pourbaix du titane (figure 16) montre qu'à pH7 et à 25°C, le TiO_2 peut se transformer en Ti_2O_3 à partir de -1V/$_{ESH}$ et en Ti^{2+} à partir de -1,4V/$_{ESH}$ [12]. Ces valeurs correspondent à -1,2V et -1,6V en référence à l'électrode Ag/AgCl, ce qui est proche des potentiels auxquels le déplacement du pic de la sonde électrochimique est observé. Cette modification du titane en Ti_2O_3 ou en Ti^{2+} concorderait également avec le changement d'aspect de la surface observé suite aux expériences de voltampérométrie cyclique : en effet celle-ci devenait légèrement plus brillante et de contact adhésif.

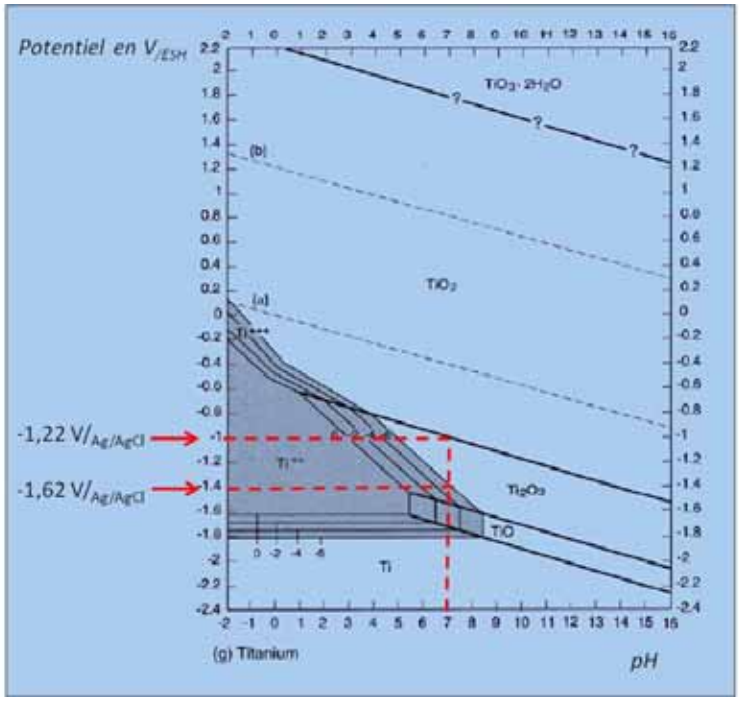


Figure 16 : Diagramme de Pourbaix du titane [12]

Etabli à 25°C, ce diagramme, indique les formes possibles du titane à pH et potentiel donnés, mais pas les vitesses de transition d'une forme à l'autre.

[12] : M. Pourbaix, Atlas of Electrochemical Equilibria in Aqueous Solutions, 1966, Pergamon Press

Dans les expériences réalisées avec Bioplume, il est également possible que de telles modifications de la surface de TiO_2 elle-même aient eu lieu, mais ceci ne peut pas être vérifié en raison de l'absence d'électrode de référence

Pour conclure, cette étude par voltampérométrie cyclique a permis de soulever plusieurs pistes de réflexion.

En premier lieu, l'impossibilité de réaliser une réaction d'oxydation sur TiO_2 a été mise en évidence. Ceci explique en partie que la désorption n'ait pas pu être visualisée lors des expériences avec Bioplume lorsqu'un potentiel positif était appliqué, alors que c'était les conditions décrites par J. Vörös. Les études de désorption de PLLgPEG devront donc être reprises sur un oxyde métallique conducteur, par exemple l'ITO. Une autre alternative peut consister à activer le titane par photochimie [11].

Ensuite, plusieurs hypothèses sur les phénomènes pouvant avoir eu lieu lors de l'application de potentiels négatifs ont été émises :

- une réduction de la pipérazine contenue dans le tampon HEPES (-1,3V/$_{Ag/AgCl}$)
- une réduction du fluorophore FITC, pouvant éventuellement induire une perte des propriétés de fluorescence (-0,8V/$_{Ag/AgCl}$)
- une modification de la surface de TiO_2 en Ti_2O_3 voire en ions Ti^{2+} (environ -0,8V et -1,4V/$_{Ag/AgCl)}$

Une étude plus complète serait nécessaire pour tester ces hypothèses. En ce qui concerne l'aspect applicatif, une nouvelle méthode de visualisation de la désorption devra être mise en place, par exemple en utilisant des molécules marquées pouvant se greffer sur les zones libérées (protéines fluorescentes par exemple). Des tests complémentaires ont montré que ceci est possible en utilisant la streptavidine-phycoérythrine (données non présentées).

IV.2. Miniaturisation de l'électrodépôt de polypyrrole : NanoBioplume

Le système NanoBioplume a été développé par Daisuké Saya à partir de la technologie Bioplume, dans le but de réduire la taille des dépôts de 10-20µm à 1-2µm. Ceci a été obtenu en prolongeant les plumes par une pointe beaucoup plus fine, obtenue par gravure anisotrope selon les plans cristallins inclinés du Si (110) (figure 17) [13].

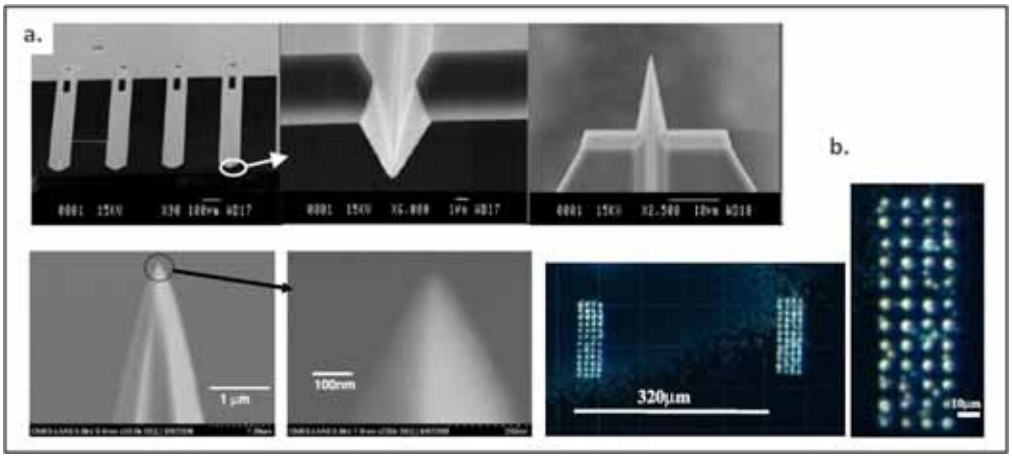


Figure 17 (rappel Figure 19 chap 1) : Plumes à pointes nanométriques, ou « nanoplumes ».
a. Images au MEB et zoom sur la pointe. Noter le rayon de courbure de 100nm seulement;
b. Spots d'eau contenant 25% de glycérol obtenus avec NanoBioplume [13].

Dans les expériences présentées ci-après, ces plumes à pointes nanométriques ont été testées pour des applications à l'électrodépôt par polymérisation de pyrrole. Sur le plan fondamental, la réussite de ces expériences prouverait qu'une réaction électrochimique peut être réalisée dans une cellule de quelques attolitres constituée par la goutte déposée. Sur le plan appliqué, ceci montrerait que la méthode permet d'adresser des biomolécules à une densité supérieure de 100 fois à celle du robot Bioplume.

Pour y parvenir, des adaptations techniques ont été nécessaires, en particulier au niveau de la connectique et du contrôle de l'appui des plumes sur la surface.

IV.2.1. Adaptation de NanoBioplume au dépôt par électrochimie

IV.2.1.a. Réduction du bruit sur les signaux de chrono-ampérométrie

Afin de contrôler le processus d'électrodépôt, il est intéressant de pouvoir observer l'intensité du courant généré en fonction des potentiels appliqués. Ce contrôle chrono-ampérométrique a été réalisé dans les expériences présentées au chapitre 3 à l'aide d'un montage électrique non optimisé, les courants mesurés étant suffisamment importants. En revanche, des tests préliminaires avec les nanoplumes ont montré que cette réduction de taille de la contre-électrode induit une baisse de l'intensité des courants à mesurer. Il est alors indispensable de réduire le bruit électromagnétique sur les signaux enregistrés par le potentiostat, pour pouvoir visualiser les courants électrochimiques.

[13] : D Saya, T Leïchlé, J.-B. Pourciel, C. Bergaud et L. Nicu, *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 2007, **17**, 1-5

Dans un premier temps, la connectique a été entièrement remplacée pour utiliser uniquement des câbles et des connecteurs coaxiaux. Ensuite, les sorties du potentiostat permettant le branchement de la contre-électrode et de l'électrode de référence ont été court-circuitées directement au niveau du connecteur DB15 de l'appareil, puisqu'il n'est pas possible de réaliser un montage à trois électrodes avec Bioplume. Le système d'éclairage du robot a été également remplacé par deux diodes électroluminescentes, qui émettent beaucoup moins de rayonnements parasites, car elles sont alimentées en courant continu et non alternatif. Enfin, toutes les masses des appareils qui entourent la zone de dépôt ont été reliées entre elles, puis à la terre.

Ce nouveau montage a été testé avec des plumes classiques pour déposer une solution de monomères de pyrrole en appliquant un potentiel de 2V, d'abord en mode impulsionnel, puis en mode continu. Les chrono-ampérogrammes obtenus sont présentés figure 18. La comparaison avec les chrono-ampérogrammes enregistrés pour des conditions de dépôt similaires avec le montage initial prouve l'efficacité des modifications réalisées. **Le bruit de fond est en effet réduit d'un facteur 10, soit de 5nA à 0,5nA.** Cette optimisation a été également utile pour les expériences de dépôt sur fibre optique présentées au chapitre 3, car l'utilisation d'une seule plume au lieu de dix réduit le courant global mesuré (cf paragraphe III.2.2.c et figure 29).

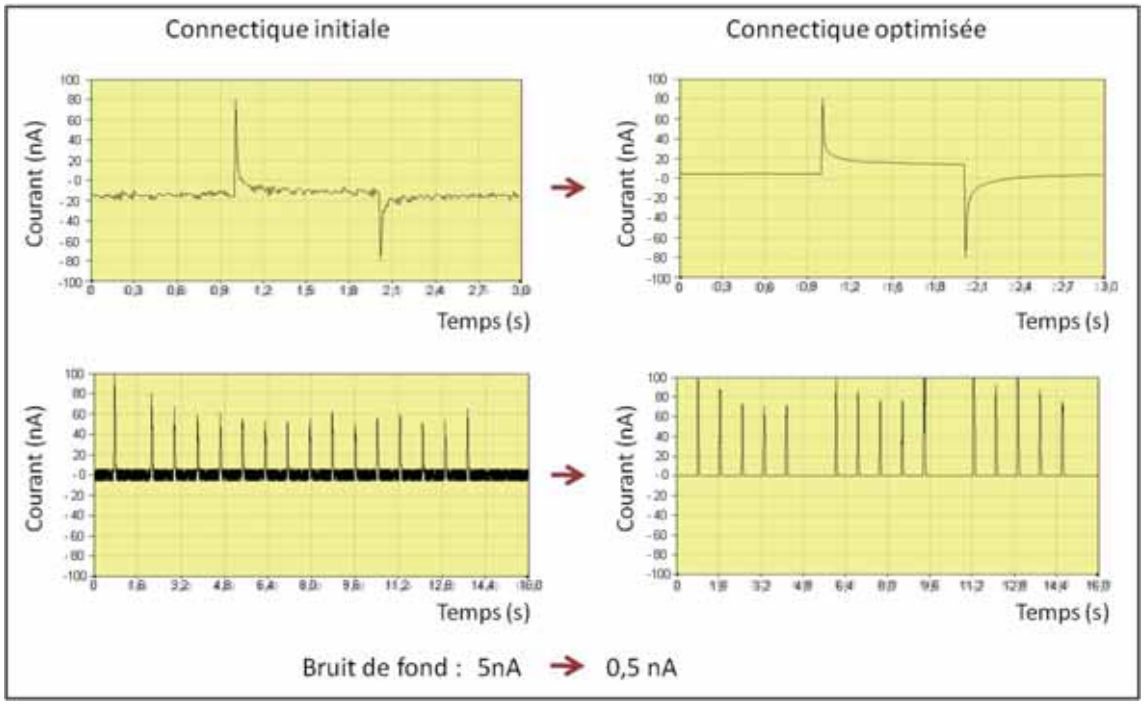


Figure 18 : Réduction du bruit de fond sur les signaux de chrono-ampérométrie : chrono-ampérogrammes avant et après modifications du montage électrique.

IV.2.1.b. Adaptation du logiciel de dépôt automatique avec contrôle de la force d'appui

Le logiciel permettant de contrôler les déplacements du robot Bioplume peut être utilisé selon deux modes distincts : un mode métrique et un mode potentiométrique. En mode métrique, l'appui des plumes correspond à une distance fixe par rapport à la surface. Par exemple un point de référence est réglé 10µm au dessus de la surface, puis la réalisation d'un spot consiste à déplacer les plumes de 20µm vers le bas. Dans ce cas, un appui de 10µm est obtenu pour chaque spot, aux défauts de planéité de la surface près. En mode potentiométrique, la force d'appui des plumes sur la surface est mesurée à l'aide des piézorésistances présentes à l'encastrement des plumes. La déformation des plumes au contact avec la surface se traduit par une variation de résistivité des piézorésistances, qui est convertie en différence de potentiel et amplifiée à l'aide d'une carte électronique dédiée. Ainsi la réalisation d'un spot consiste à déplacer les plumes vers le bas jusqu'à obtenir la différence de potentiel correspondant à la force d'appui souhaitée.

Les plumes classiques sont suffisamment flexibles pour être appuyées de 10 à 40µm sur la surface sans risque de casse, et sans modification significative de la taille des spots [14]. Le mode de dépôt métrique peut donc être utilisé, même sur une surface présentant des défauts de planéité de quelques microns. En revanche, avec les plumes à pointes nanométriques, l'appui ne peut excéder 2-3µm. Dans ce cas, il est indispensable d'utiliser le mode potentiométrique. Le logiciel permettant le contrôle des déplacements a donc été adapté pour limiter les forces d'appui pouvant être exercées sur les plumes.

Des dépôts en mode potentiométrique ont ensuite été réalisés avec des nanoplumes. L'observation de ces dernières au microscope avant et après une séquence de dépôt montre que les modifications réalisées sur le logiciel permettent d'éviter l'endommagement des nanopointes (figure 19).

[14] : T. Leïchlé, D. Saya, J.-B. Pourciel, F. Mathieu, C. Bergaud, et L. Nicu, *IEEE NTC Review on Advances in Nano/Micro Engineered and Molecular Systems*, 2006, **1**, 337

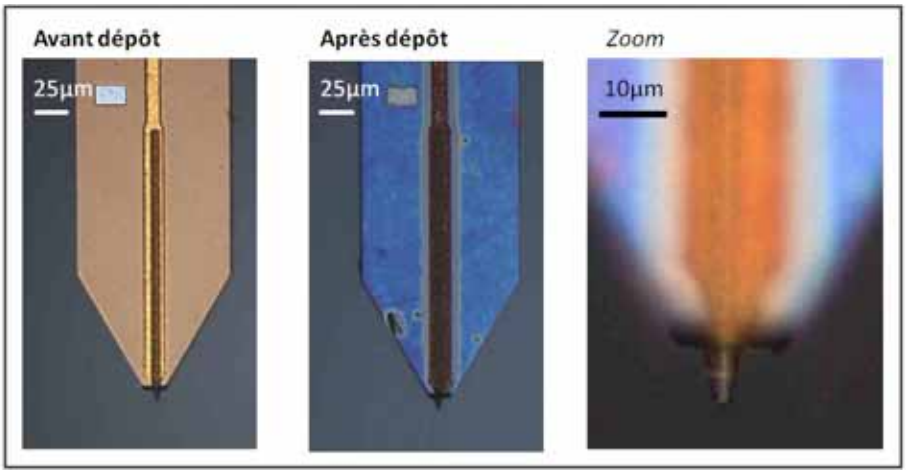


Figure 19 : Images au microscope des nanoplumes avant et après une séquence de dépôt en mode potentiométrique avec le logiciel modifié pour limiter la force d'appui.

IV.2.1.c. Influence de la polarisation des piézorésistances sur les signaux de chrono-ampérométrie

Au cours des expériences de validation du robot Bioplume, les piézorésistances et les électrodes d'or présentes dans le canal n'ont jamais été utilisées simultanément. Or, comme vu précédemment, dans le cas d'un dépôt à l'aide de nanoplumes, le contrôle de la force d'appui à l'aide des piézorésistances est obligatoire. Il convient donc de vérifier l'influence que peuvent avoir ces deux entités l'une sur l'autre.

Pour cela, des dépôts de solutions contenant des monomères de pyrrole ont été réalisés en modifiant progressivement la tension de polarisation de piézorésistances. Pour chaque dépôt, les nanoplumes ont été positionnées au contact d'une surface d'or, puis une impulsion de potentiel a été appliquée entre l'électrode intégrée aux plumes et la surface. Les chrono-ampérogrammes obtenus sont présentés figure 20a. On observe que pour une polarisation des piézorésistances strictement inférieure à 3V, le tracé du chrono-ampérogramme est translaté vers le haut. Ceci signifie qu'un courant de fuite s'ajoute au courant électrochimique. Par ailleurs, en dessous de 2V, le signal électrochimique est totalement perturbé.

Pour confirmer cette observation, un test supplémentaire est réalisé. Les nanoplumes sont chargées de solution de monomères de pyrrole, mises en contact avec la surface, et la valeur de la différence de potentiel appliquée entre l'électrode et la surface est fixée à 0V. La tension de polarisation des piézorésistances est alors diminuée linéairement de 4V à 1V, puis augmentée de nouveau. La courbe de courant obtenue lors de cette expérience est présentée figure 20b. De nouveau, on observe l'apparition d'un courant de fuite, pour des valeurs de polarisation des piézorésistances inférieures à 2,8V environ. Le plateau observé pour les valeurs de polarisation les plus faibles correspond à une saturation du système de mesure.

Pour les expériences réalisées par la suite, la tension de polarisation des piézorésistances a donc été choisie de manière a éviter l'apparition de ce courant de fuite.

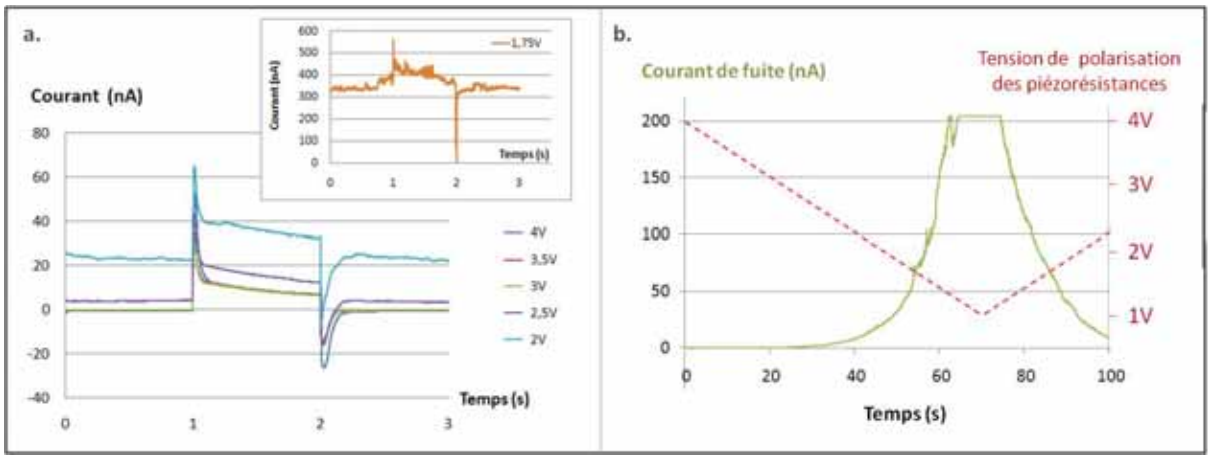


Figure 20 : Influence de la tension de polarisation des piézorésistances sur le courant électrochimique

a. Tension de polarisation des piézorésistances réglée à 4V ; 3,5V ; 3V ; 2,5V ; 2V ou 1,75V. Plumes chargées avec une solution de monomères de pyrrole à 20mM dans du tampon F, et positionnées au contact d'une surface d'or. Application d'une impulsion de +2V pendant 1s.

b. Plumes chargées avec une solution de monomères de pyrrole à 20mM dans du tampon F, et positionnée au contact d'une surface d'or. Application d'une différence de potentiel de 0V à l'aide du potentiostat, et modification linéaire de la tension de polarisation des piézorésistances.

IV.2.2. Electrodépôt de cuivre avec NanoBioplume

Les tous premiers tests d'électrochimie avec Bioplume avaient consisté à réaliser des plots de cuivre métallique à partir d'une solution ionique de $CuSO_4$ [15]. L'avantage de ce système modèle est la facilité de révélation des dépôts de cuivre. Ceux-ci sont en effet visibles directement au microscope optique, et peuvent être observés plus en détail au MEB ou par AFM. Pour évaluer la faisabilité d'un dépôt par électrochimie à l'aide de NanoBioplume, cette expérience modèle a donc été répétée, en reprenant exactement les mêmes conditions de manipulation, décrites ci-après.

Une solution de $CuSO_4$ à 150mM est préparée directement à partir de la forme saline, pesée et diluée dans de l'eau contenant 10% de glycérol. Les plumes sont chargées de cette solution, mises en contact avec la surface, et une impulsion de potentiel de -1,9V est appliquée pendant 1s. Sur le chrono-ampérogramme obtenu (figure 21a), on peut visualiser l'accumulation de charges, leur consommation par une réaction de réduction, et la décharge de la double couche électrique. Ceci confirme que **le montage électrique est correct, et que la solution ionique assure bien le contact électrique**.

Dans un deuxième temps, un dépôt de plusieurs spots successifs est réalisé en mode continu, avec des temps de contact de 0 à 120s, correspondant à ceux testés avec les plumes classiques (figure 21b). A la fin de la séquence de dépôt, les spots sont rincés à l'eau et observés au microscope. Les images (figure 21c), confirment qu'il y a bien eu un dépôt de cuivre, ce qui confirme que **la réaction électrochimique a bien eu lieu**.

[15] : T. Leïchlé, L. Nicu, E. Descamps, B. Corso, P. Mailley, T. Livache, C. Bergaud, 2006, Applied Physics Letters, **88**, 254108

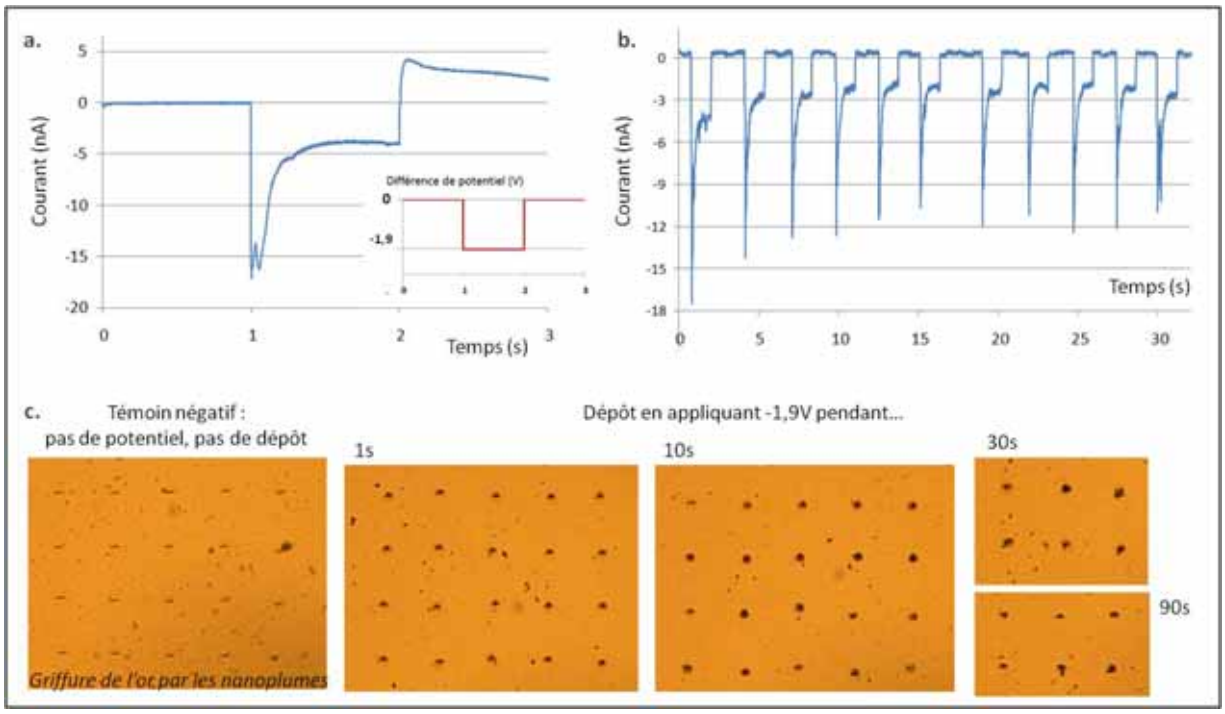


Figure 21 : Dépôt de cuivre par électrochimie à l'aide de NanoBioplume

Solution de $CuSO_4$ à 150mM dans de l'eau contenant 10% de glycérol.

a. Chrono-ampérogramme pour la réalisation d'un seul spot en mode impulsionnel. Impulsion de potentiel de -1,9V pendant 1s.

b. Chrono-ampérogramme pour la réalisation de plusieurs spots en mode continu. Potentiel constant de -1,9V ; temps de contact 1s.

c. Image au microscope de plots de cuivre réalisés en mode continu, avec des temps de réaction (= temps de contact) de 0 à 120s.

Pour étudier plus en détail la morphologie des spots en fonction du temps de contact, une observation au MEB est réalisée. Les images (figure 22) montrent que le dépôt de cuivre recouvre la totalité de la surface du spot dès le temps de réaction de 1s. Ceci n'était pas le cas avec les plumes de taille classique, pour lesquelles un temps de réaction de 90s minimum était nécessaire. Pour des temps de réaction supérieurs à 1s, on note la **formation d'amas de cuivre ou de structures dendritiques de formes variées. Ceci entraîne l'apparition de courts-circuits**, visualisables sur les chrono-ampérogrammes (non montrés) : en effet ces structures en 3 dimensions peuvent entrer directement en contact avec l'électrode d'or des plumes. Pour tous les plots, on observe aussi très nettement l'impact des nanoplumes sur l'or, qui est beaucoup plus ductile que le silicium dans lequel sont fabriquées les plumes.

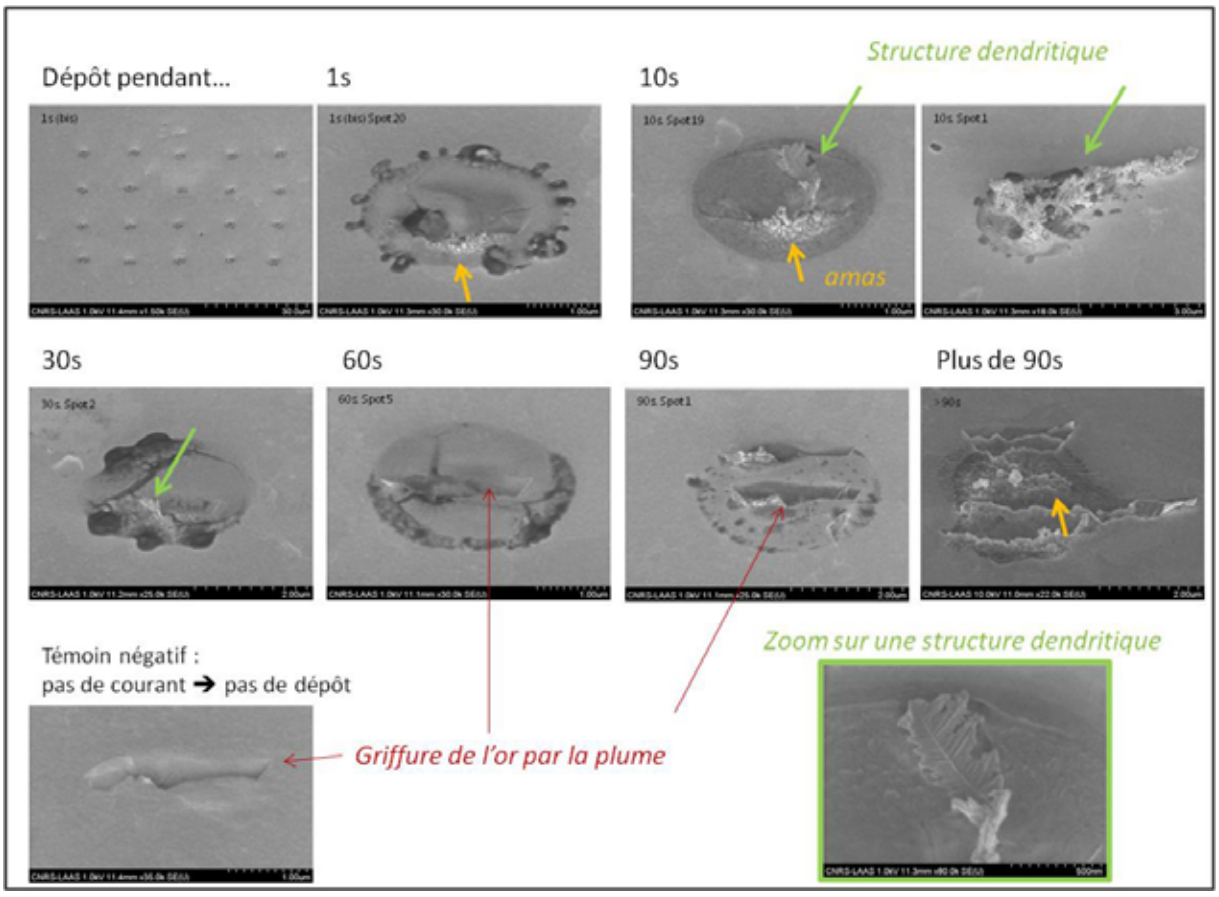


Figure 22 : Images au MEB de plots de cuivre réalisés par électrochimie à l'aide de NanoBioplume
Solution de $CuSO_4$ à 150mM dans de l'eau contenant 10% de glycérol. Potentiel -1,9V.

Cette expérience préliminaire a permis de montrer **qu'il est possible de réaliser une réaction électrochimique dans une goutte de quelques attolitres déposée à l'aide de NanoBioplume**. L'application au dépôt de biomolécules par électropolymérisation de pyrrole est donc envisageable. Pour cela, un oligonucléotide-pyrrole a été choisi comme modèle, car cette molécule est robuste et le protocole de révélation bien établi.

IV.2.3. Electrodépôt d'oligonucléotides-pyrrole avec NanoBioplume

Le protocole de dépôt et de révélation adopté est le suivant : dans un premier temps, l'extrémité des nanoplumes est plongée dans un bain piranha (mélange d'H_2O_2 et d'H_2SO_4), qui élimine toute trace de matière organique et rend leur surface plus hydrophile. Ceci facilite le chargement par capillarité et le dépôt.

Les nanoplumes nettoyées sont ensuite montées sur le robot, et chargées avec une solution contenant des monomères de pyrrole et l'oligonucléotide pyrrole « Zip6-pyr ». Le parallélisme et le point de dépôt sont réglés avec précaution, puis une matrice de spots est déposée, en appliquant un potentiel continu de +2V entre les électrodes et la surface d'or (figure 23a). Chaque spot est réalisé en mesurant la force d'appui des plumes sur la surface. Le temps de contact minimum est alors de 150ms, qui correspond au temps d'approche entre le premier instant où les nanopointes touchent la surface et l'instant où l'appui correspond à la

valeur de consigne. Ce temps pourrait être raccourci en modifiant les conditions d'approche dans le logiciel de pilotage. Une fois la séquence de dépôt terminée, la surface est observée au microscope (figure 23b), ce qui confirme qu'une matrice de spots de 2µm espacés de 10µm a bien été déposée.

Immédiatement après, les spots sont recouverts d'une solution permettant de saturer la surface. L'hybridation avec l'oligonucléotide complémentaire biotinylé « Zip6c-biotine » est ensuite réalisée. Au bout de 15min, la surface est rincée avec du tampon PBS, puis les spots sont révélés par incubation avec une solution de streptavidine-phycoérythrine (SAPE). Afin d'observer au microscope en fluorescence, la surface est très soigneusement rincée avec du tampon PBS, et une lamelle de verre est déposée sur la zone où se trouvent les spots.

La figure 23d montre que les spots d'oligonucléotides sont très nettement visibles en fluorescence, ce qui prouve que **le « Zip6-pyr » a bien été immobilisé sur la surface, et ceci dans une conformation permettant l'hybridation avec son complémentaire « Zip6c-biotine »**.

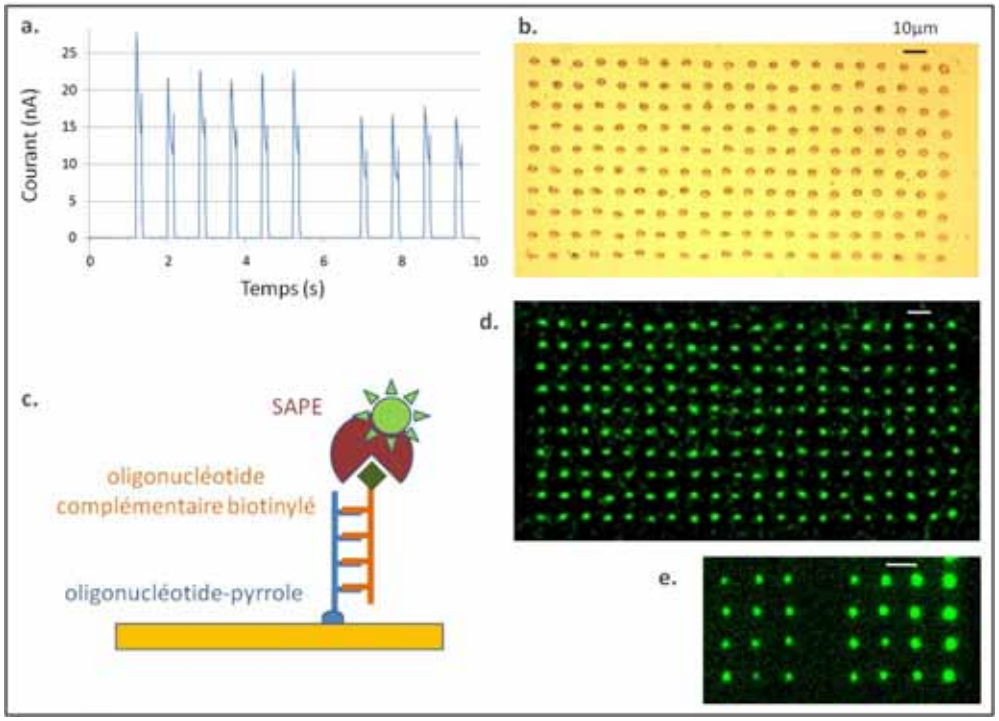


Figure 23 : Electrodépôt d'oligonucléotide-pyrrole avec NanoBioplume

a. Chrono-ampérogramme obtenu au cours du dépôt (mode continu, +2V) ; **b**. Image des spots au microscope ; **c.** Principe de révélation ; **d.** Image au microscope en fluorescence. **e.** Répétition de l'expérience.

- Dépôts réalisés sur une lame de verre recouverte d'or.
- Nanoplumes nettoyées au piranha avant le dépôt : H_2O_2 25% / H_2SO_4 75% *v/v*
- Solution contenant des monomères de pyrrole à 20mM et l'oligonucléotide-pyrrole « Zip6-pyr » à 2µM préparée dans du tampon F.
- Dépôt avec contrôle de la force d'appui, temps de contact 150ms (= temps de polymérisation)
- Saturation avec une solution d'ADN de sperme de saumon préparée dans du tampon phosphate 50mM, pendant 15min.
- Hybridation avec l'oligonucléotide complémentaire biotinylé « Zip6c-biotine », à 100nM dans la même solution, pendant 15min, à 37°C. Rinçage au tampon PBS.
- Révélation avec une solution de SAPE diluée 10 fois dans du tampon PBS, pendant 15min. Rinçage (5 fois) au PBS. Sur la dernière goutte de PBS est placée une lamelle de verre pour pouvoir observer au microscope en fluorescence.

Cette expérience a été répétée en ajoutant des spots d'oligonucléotides non complémentaires, utilisés comme témoins négatifs. L'immobilisation de l'oligonucléotide-pyrrole a de nouveau été observée (figure 23e), et la spécificité d'hybridation a été vérifiée.

Une interaction spécifique ADN/ADN a donc été obtenue à l'échelle de spots de 2µm, ce qui représente une réduction de taille de 100 fois par rapport au format des puces à ADN classiques. En développant cette technique, la densité de dépôts pourrait donc être multipliée d'un facteur 10^4, ce qui permet d'anticiper la réduction de taille des surfaces à adresser.

Sur le plan fondamental, la possibilité de réaliser une réaction électrochimique à l'échelle de l'attolitre ouvre des possibilités nouvelles d'investigation, avec par exemple une étude des effets de confinement ou de diffusion dans la couche mince constituée par la goutte. Par exemple les espèces intermédiaires de la réaction électrochimique peuvent être détectées, collectées ou quantifiées dans cette couche particulière [16].

Les points délicats concernent essentiellement la maîtrise de la force d'appui et le bruit mécanique autour de la zone de dépôt (courants d'airs, vibrations). Les variations de température doivent également être prises en compte car elles entrainent une déformation des leviers jusqu'à quelques centaines de nanomètres. Du point de vue de la détection, des efforts doivent être réalisés pour faciliter le repérage des spots sur la surface de dépôt.

Une des solutions peut consister à réaliser les dépôts sur une surface structurée, avec plusieurs zones indépendantes repérables. Ceci a été testé sur des microélectrodes, dont la fabrication est détaillée dans le paragraphe ci-après.

IV.3. Fabrication d'un système de microélectrodes adapté à Bioplume

A l'exception des expériences sur fibres optiques, les tests d'électrochimie localisée appliquée à Bioplume décrits précédemment ont été réalisés sur des surfaces dites « pleine plaque », c'est-à-dire sans structuration particulière. Or l'un des intérêts de la miniaturisation apportée par Bioplume et NanoBioplume est de pouvoir adresser des surfaces de très petites tailles, typiquement des microélectrodes. Pour pouvoir étudier plus en détail cet aspect, un système simplifié de microélectrodes adapté au robot a été fabriqué. Plusieurs diamètres d'électrodes ont été testés, dont les plus petits sont de 20µm, ce qui correspond à la taille maximale d'un spot déposé avec des plumes sans nanopointes. Ces microélectrodes sont destinées en premier lieu à étudier les limites de précision d'alignement des plumes sur des structures préexistantes. Elles peuvent également être utilisées pour faciliter la localisation des spots lors d'expériences pour lesquelles le système de visualisation n'est pas encore optimisé.

[16] : C. Amatore, S. Szunerits et L.Thouin, *Electrochemistry Communications*, 2000, 2 (4), 248-253

IV.3.1. Design des microélectrodes

Le système de microélectrodes a été conçu de telle manière que pour une barrette de 12 plumes, chaque électrode puisse être placée sous une plume. Ceci signifie que l'espacement entre les électrodes est le même que celui entre les plumes (figure 24a).

Lors du lancement du projet, le matériau choisi pour les électrodes a été le titane, bien qu'il ait été montré plus tard que pour des expériences d'électrochimie, des inconvénients apparaissent avec cet oxyde métallique à cause de son caractère semi-conducteur. Quoi qu'il en soit, ce choix n'a pas d'impact sur la conception et la fabrication des microélectrodes, dont la nature pourra être modifiée ultérieurement.

Pour simplifier au maximum le dispositif, toutes les électrodes sont interconnectées. Ainsi, elles reposent toutes sur une même couche uniforme d'or, qui est protégée au niveau des espaces inter-électrodes par une couche isolante d'oxyde de silicium (cf schéma figure 24b). Un accès à cette couche d'or est aménagé au niveau d'un plot de contact, pour permettre la connexion électrique.

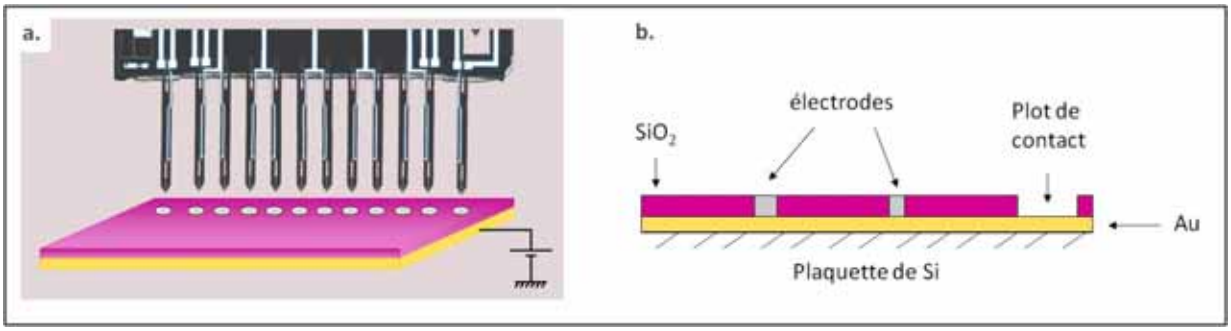


Figure 24 : Croquis sommaires du système de microélectrodes montrant les choix de conception.
a. Objectif : une électrode par plume
b. Vue en coupe : électrodes interconnectées *via* la couche d'or pleine plaque.

Les microélectrodes sont placées sur une puce dont les dimensions sont adaptées au porte-échantillon du robot, et sont également telles que la puce puisse être immergée entièrement dans un tube de 2mL. Chaque puce comporte quatre jeux d'électrodes, comprenant chacun 4 tailles différentes 100µm, 75µm, 50µm et 20µm. Ces électrodes étant dédiées à des études d'électrochimie, appliquées par exemple à l'immobilisation de biomolécules, il est probable que des étapes de lavage soient réalisées suite au dépôt. Pour pouvoir rincer les microélectrodes sans que le liquide ne risque d'entrer en contact avec les connexions électriques, des barrières hydrophobes sont ajoutées. Ces barrières entourent la zone où se trouvent les microélectrodes, et des contre-réservoirs sont également prévus en cas de débordement du liquide.

Sur chaque puce se trouve également un plot de contact permettant d'établir la connexion électrique vers les microélectrodes, ainsi qu'une mire qui permet d'aligner les motifs au cours des différents niveaux de fabrication.

La fabrication collective sur une plaquette de silicium de 4 pouces permet de produire 24 puces simultanément (cf figure 25).

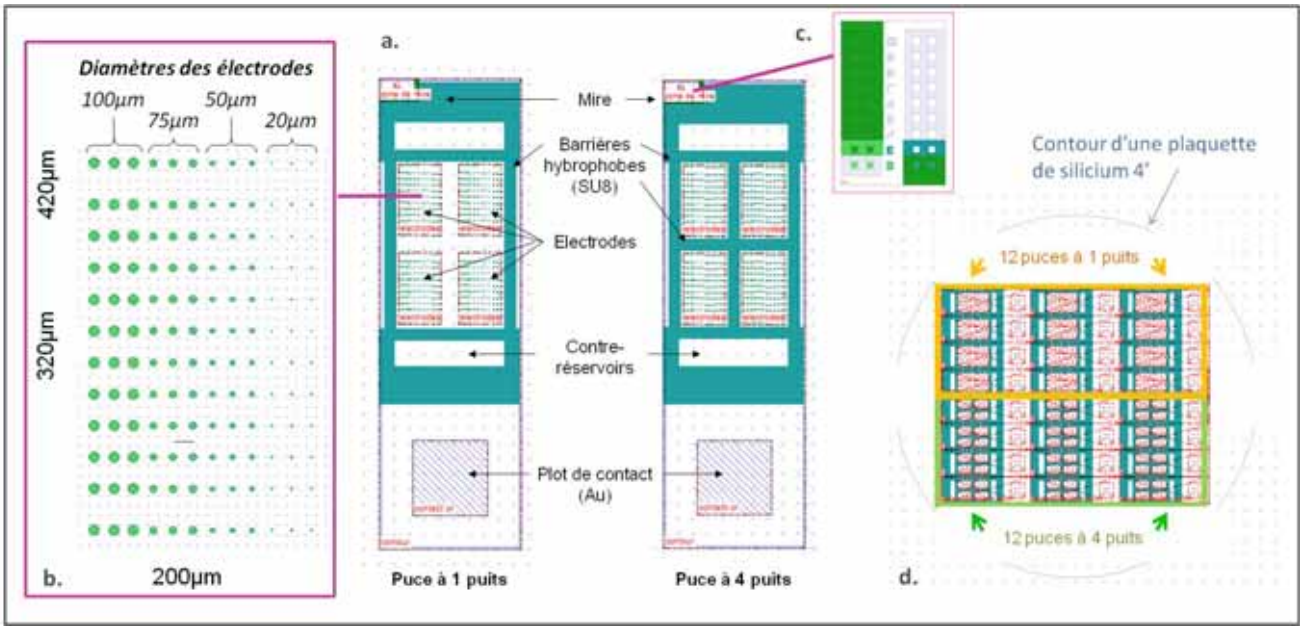


Figure 25 : Design d'une puce, comprenant quatre jeux de microélectrodes.
Images extraites du logiciel de dessin des masques de photolithographie (Clewin) avec 3 les niveaux superposés.
a. Vue d'ensemble d'une puce
b. Zoom sur un jeu d'électrode
c. Zoom sur une mire
d. Vue d'une plaquette de silicium complète, comportant 24 puces.

IV.3.2. Procédé de fabrication

La fabrication des puces à microélectrodes comporte une préparation préliminaire des plaquettes, puis trois niveaux de photolithographie.

La photolithographie est utilisée pour les étapes nécessitant la définition de motifs. Son principe repose sur l'utilisation d'une résine photosensible : une irradiation par des UV modifie les propriétés de la résine de façon à ce que les parties irradiées restent ou soient dissoutes au moment du développement (résine positive ou négative). L'irradiation est réalisée à travers un masque comportant les motifs à reporter sur la résine.

Les étapes principales du procédé sont présentées figure 26 et détaillées dans les paragraphes suivants.

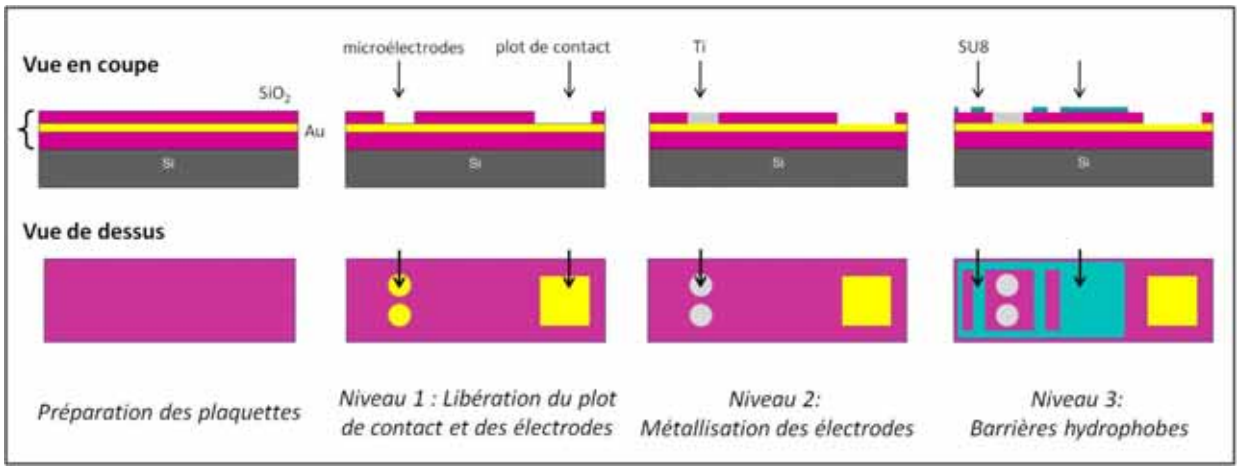


Figure 26 : Etapes principales du procédé de fabrication des microélectrodes

IV.3.2.a. Préparation des plaquettes

Les supports utilisés sont des plaquettes de silicium dopé positivement (SiP), de 4 pouces de diamètre et de 525µm d'épaisseur. Les trois premières étapes du procédé de fabrication sont réalisées sur la totalité de la surface de cette plaquette, sans définition de motifs.

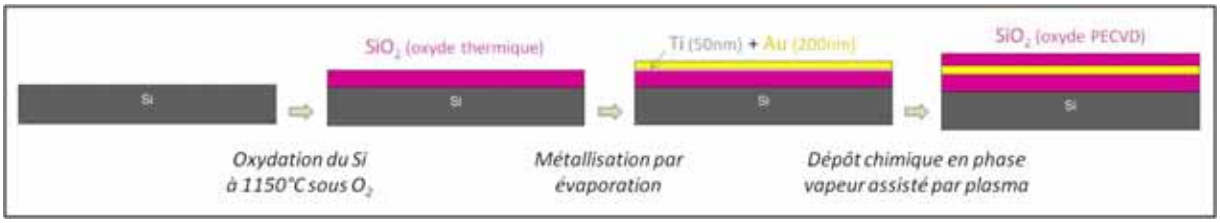


Figure 27 : Etapes de préparation des plaquettes de silicium

D'abord la surface de silicium est oxydée à 1150°C sous atmosphère d'oxygène, pour obtenir une couche de SiO_2 isolante (dit « oxyde thermique »). Ceci permet d'éviter toute fuite de courant entre la couche conductrice d'or (réalisée juste après) et la plaquette qui sert de support. Juste avant l'oxydation, la plaquette est nettoyée dans un bain d'H_20_2 et d'H_2SO_4 puis dans un bain d'acide fluorhydrique (méthode « RCA »), pour éliminer les impuretés et l'oxyde natif, et pouvoir ainsi contrôler l'épaisseur de la couche de SiO_2 obtenue (300nm ici).

Dans un second temps, la couche conductrice d'or permettant d'interconnecter les électrodes est déposée. L'adhérence de l'or sur l'oxyde de silicium n'est pas suffisante pour obtenir un film stable. Pour y remédier, une couche de titane est ajoutée entre le SiO_2 est l'or. Ces deux métaux sont déposés par évaporation : le métal est placé dans un creuset et porté à 850°C (Au) ou 1100°C (titane), sous vide, ce qui provoque son évaporation. La plaquette est placée en face du creuset et les atomes métalliques s'y déposent en une couche homogène. Les épaisseurs choisies sont de 50nm pour le titane et 200nm pour l'or.

Enfin, cette couche d'or est protégée par une nouvelle couche isolante de SiO_2, réalisée cette fois par dépôt chimique en phase vapeur assisté par plasma (PECVD). Dans ce cas, le SiO_2 est obtenu à plus basse température (200°C), par réaction en phase vapeur entre du silane (SiH_4) et de l'oxygène ionisés. Pour limiter la porosité de la couche obtenue et augmenter ses propriétés isolantes, le dépôt est réalisé en trois fois, avec une étape de stabilisation sous vide entre chaque cycle de dépôt. Ainsi les pores ne sont pas alignés et les électrons diffusent moins facilement dans le matériau.

IV.3.2.b. Niveau 1 : Libération du plot de contact et des motifs des microélectrodes

Le premier niveau de lithographie a pour but de définir les contours des microélectrodes et du plot de contact. Ceci est réalisé en gravant la couche supérieure de SiO_2 pour laisser apparaître la couche d'or.

Pour réaliser les motifs, la plaquette est enduite d'une résine positive (AZ1529), recuite, insolée à travers le masque de niveau 1 et développée. La résine est ainsi dissoute au niveau

des motifs des électrodes et du plot de contact, qui doivent être gravés. Après vérification au microscope de la correcte résolution des motifs, la résine est stabilisée par recuit.

La gravure de l'oxyde de silicium peut être réalisée par deux méthodes : soit en phase liquide à l'aide d'acide fluorhydrique (gravure anisotrope), soit par réaction ionique dans un plasma de CF_4 (gravure RIE, isotrope). Les deux méthodes ont été testées et les résultats sont détaillés au paragraphe IV.3.3.a. La qualité de la gravure est vérifiée au microscope et par test de conductivité, puis la résine est dissoute à l'acétone et la plaquette est nettoyée au plasma d'oxygène.

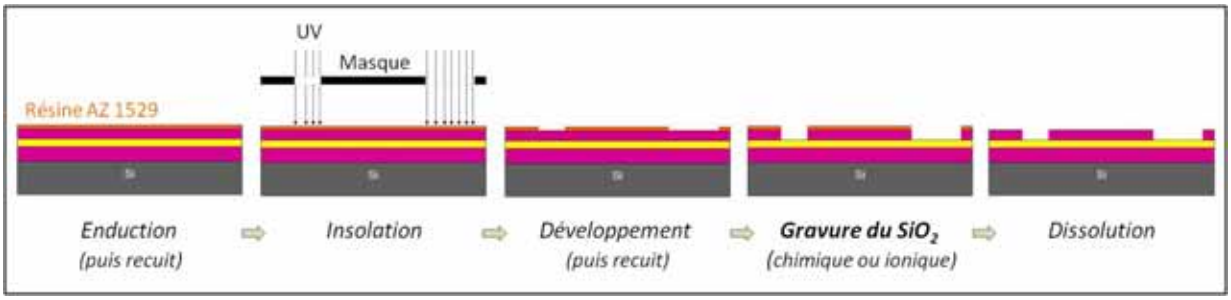


Figure 28 : Niveau 1 : Gravure de la couche supérieure de SiO_2 pour libérer le plot de contact et les contours des électrodes.

IV.3.2.c. Niveau 2 : Métallisation des microélectrodes

L'étape suivante consiste à déposer du titane dans les motifs réalisés précédemment, par la méthode du « lift-off ».

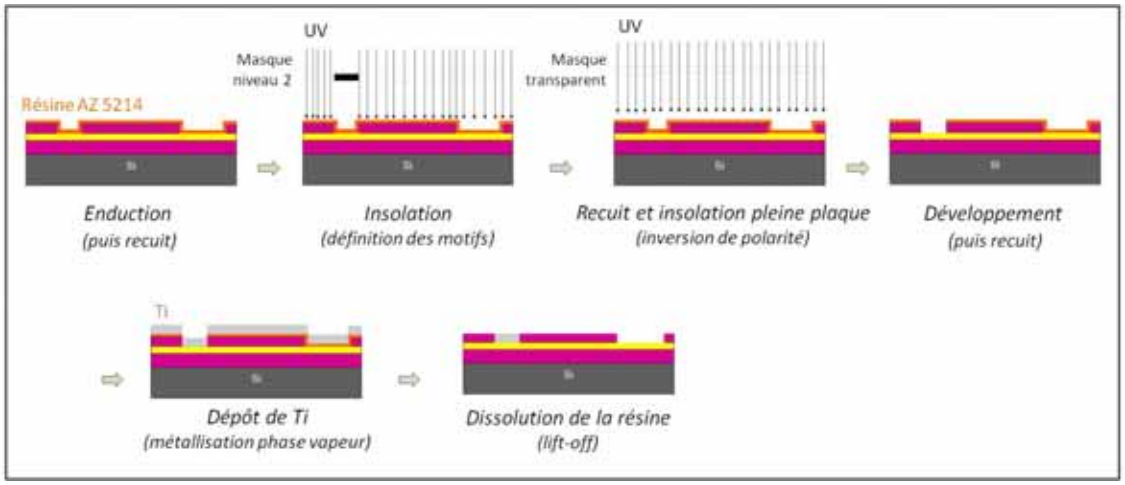


Figure 29 : Métallisation des microélectrodes par lift-off

La plaquette est enduite cette fois d'une résine réversible (AZ 5214), c'est-à-dire une résine négative dont la polarité peut être inversée par un recuit et une insolation supplémentaires (elle devient alors positive). L'intérêt est d'obtenir des flancs inversés qui facilitent le décollement de la résine lors de la dernière étape.

L'insolation est ensuite réalisée à travers le masque de niveau 2, puis la résine est recuite et insolée de nouveau sur la totalité de sa surface, ce qui permet d'obtenir l'inversion

de polarité. Plus précisément, cette deuxième insolation est réalisée à travers un masque entièrement transparent. Après un dernier recuit, le développement est effectué, et la résine est alors dissoute au niveau des motifs correspondant aux électrodes.

Du titane est alors déposé par évaporation sur l'ensemble de la plaquette, c'est-à-dire à la fois dans les logements prévus pour les microélectrodes mais aussi sur la résine qui protège tout le reste de la plaquette. La dernière étape, particulièrement délicate, consiste à dissoudre la résine, ce qui soulève le métal partout où il est inutile.

IV.3.2.d. Niveau 3 : Réalisation des barrières hydrophobes

Le troisième niveau de photolithographie permet de réaliser les barrières hydrophobes à l'aide de la résine négative SU8. L'une des particularités de cette résine est de pouvoir être déposée en couche épaisse tout en permettant de réaliser des motifs. L'épaisseur choisie pour les barrières hydrophobes est de 50µm.

L'enduction de cette résine est réalisée en deux temps en raison de sa viscosité importante. Elle est ensuite laissée au repos quelques minutes, puis recuite, ce qui permet de relâcher les contraintes et d'obtenir une couche plus uniforme. Après insolation à travers le masque de niveau 3, le développement est réalisé, et cette fois, ce sont les zones non insolées qui sont dissoutes. La résine est ensuite recuite selon un cycle de montée en température et de refroidissement précis, qui permet d'assurer son adhésion définitive sur la plaquette.

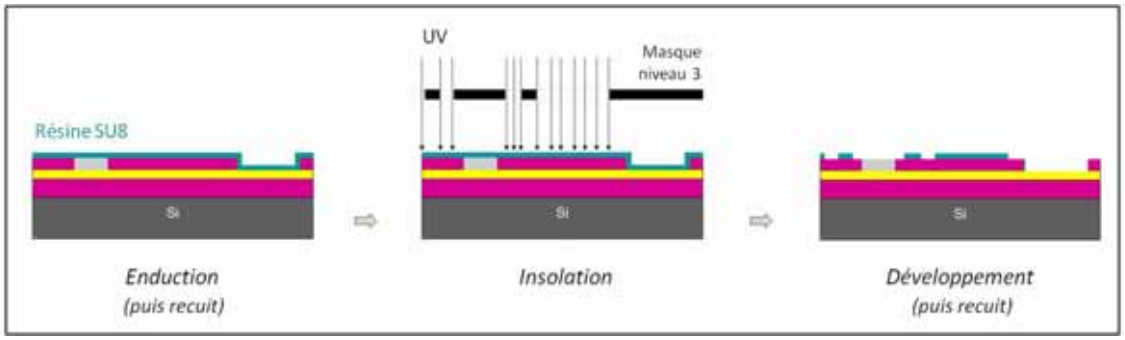


Figure 30 : Niveau 3 : Réalisation des barrières hydrophobes en résine épaisse SU8.

IV.3.3. Mise au point et fabrication d'un premier lot de puces.

IV.3.3.a. Gravure du SiO_2 : anisotropie et problèmes d'adhérence.

Lors du premier test de fabrication, une anomalie est apparue à l'étape de gravure du SiO_2, correspondant au niveau 1 de photolithographie. En effet, les motifs obtenus ne correspondaient pas à ceux définis sur la résine : leur contour n'était pas droit mais de forme indistincte et légèrement crénelée (figure 31). Pour expliquer cela, deux hypothèses ont été formulées : soit l'adhérence du SiO_2 sur l'or n'était pas correcte, soit la gravure, réalisée par attaque chimique à l'acide fluorhydrique n'avait pas été arrêtée suffisamment tôt et s'était propagée sous la résine (gravure anisotrope).

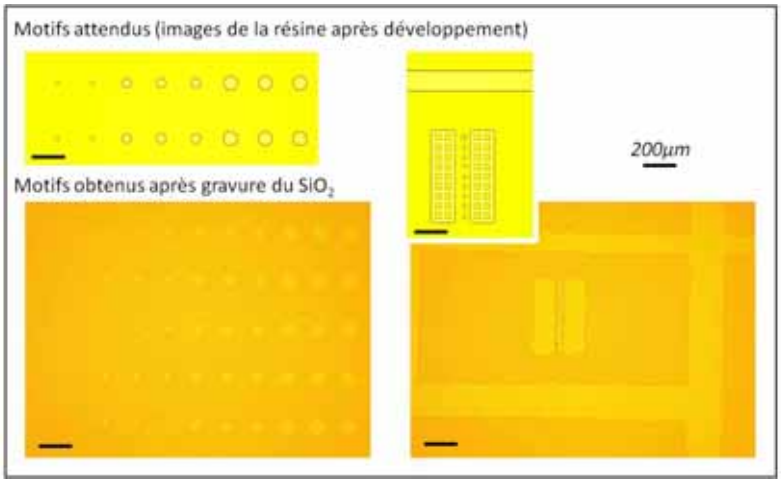


Figure 31 : Anomalies de forme des motifs suite à l'étape de gravure du SiO_2.

Dans un premier temps, un nouveau lot de plaquettes a été préparé, car un doute a été émis sur la qualité du dépôt de SiO_2 par PECVD. En effet, la surface présentait une irisation irrégulière, pouvant faire penser qu'une goutte de liquide s'était formée au cours du procédé et qu'elle avait laissé une trace en glissant sur la surface. Ce phénomène a été observé plusieurs fois jusqu'à ce que le bâti de dépôt soit entièrement démonté et nettoyé.

Dès qu'un oxyde conforme a été obtenu, un nouveau test de gravure a été réalisé, mais les anomalies sur la forme des motifs sont de nouveau apparues. Deux solutions ont alors été proposées. D'une part, pour favoriser l'adhérence du SiO_2 sur l'or, une couche peu épaisse de titane peut être ajoutée entre l'oxyde et le métal. D'autre part, pour éviter les effets de sous-gravure par l'acide fluorhydrique, la gravure isotrope par réaction ionique (RIE) peut être utilisée.

Ces deux approches ont été testées en utilisant quatre plaquettes, ce qui permet de réaliser tous les couples de conditions (cf figure 32). Dans les quatre cas, des motifs corrects ont été obtenus.

Dans le cas de la gravure RIE, il ne peut pas y avoir de sous-gravure puisque la réaction est unidirectionnelle. Par contre, un décollement du SiO_2 aurait pu se produire, en particulier pour la plaque sans titane. Ceci n'a pas été observé, sauf sur les bords de la plaquette.

En ce qui concerne la gravure chimique, le point critique est la durée de réaction. La présence de la couche de titane facilite ce contrôle, car lorsque cette couche est gravée pour laisser apparaître l'or, un changement de couleur est nettement visible sur les motifs les plus gros. En l'absence de titane, la réaction a été réalisée en plusieurs étapes de 30s pour éviter la sous-gravure. En effet, la durée théorique de la réaction peut être calculée à partir de l'épaisseur d'oxyde et de la vitesse de gravure, mais la durée réelle est difficilement reproductible. Elle dépend de l'accessibilité du réactif à l'intérieur des motifs de plus petite taille. Pour favoriser la mouillabilité des petits motifs, la plaquette peut être rincée abondamment à l'eau avant d'être plongée dans la solution d'acide fluorhydrique.

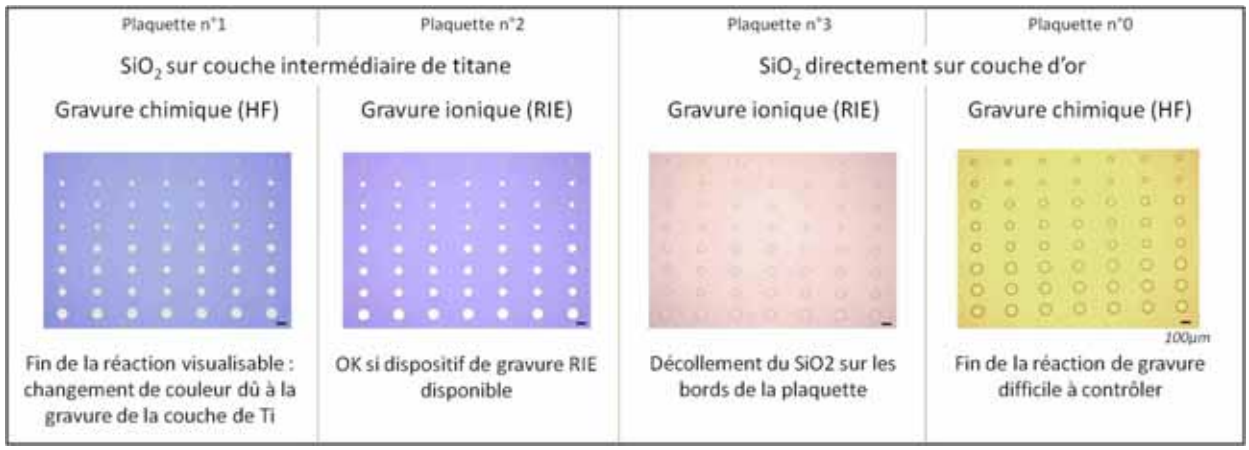


Figure 32 : Test de deux méthodes pour obtenir un contour correct des motifs lors de la gravure du SiO_2 : ajout d'une couche de Ti et gravure isotrope RIE.

En conclusion, **l'ajout d'une couche de titane permet d'éviter le décollement du SiO_2** sur le pourtour de la plaquette, **et facilite également la gravure chimique**, plus simple à mettre en œuvre que la gravure RIE. Du point de vue pratique, le contraste de couleur est bien plus important que lorsque le SiO_2 est directement déposé sur l'or, ce qui facilite les contrôles de chaque étape de fabrication, mais aussi l'utilisation des microélectrodes obtenues en fin de procédé. En effet, il est beaucoup plus facile d'aligner les plumes sur les microélectrodes lorsque celles-ci ont une couleur nettement différente.

IV.3.3.b. Lift-off de titane et ultrasons

L'étape de lift-off, qui permet de métalliser les électrodes avec du titane, est particulièrement délicate. En effet, la résine doit être dissoute de façon à éliminer le métal sur toutes les zones où il est inutile, sans pour autant endommager les motifs. Cette dissolution est réalisée en plongeant la plaquette dans un bain d'acétone, pendant 30min au minimum.

Le premier test de lift-off, réalisé sur la plaquette n°1, a montré que des fragments de résine se redéposent dans les creux correspondant aux microélectrodes. En effet le dépôt de Ti, de 100nm d'épaisseur, n'affleure pas à la surface des creux, de 300nm de profondeur. Pour éliminer ces fragments de résine, la plaquette a été plongée dans un bain d'eau et soumise à des ultrasons pendant 2min. Malheureusement, ceci a également provoqué le décollement de près de la moitié des électrodes de titane, laissant de nouveau apparaître l'or (figure 33).

Pour la seconde plaquette (n°3), la durée de traitement aux ultrasons a été réduite à 30s, mais de nouveau la moitié des électrodes sont endommagées.

Finalement, la dernière plaquette (n°2) a été laissée plus longtemps dans l'acétone (2h), ce qui a évité le recours aux ultrasons. Dans ce cas, les électrodes sont préservées.

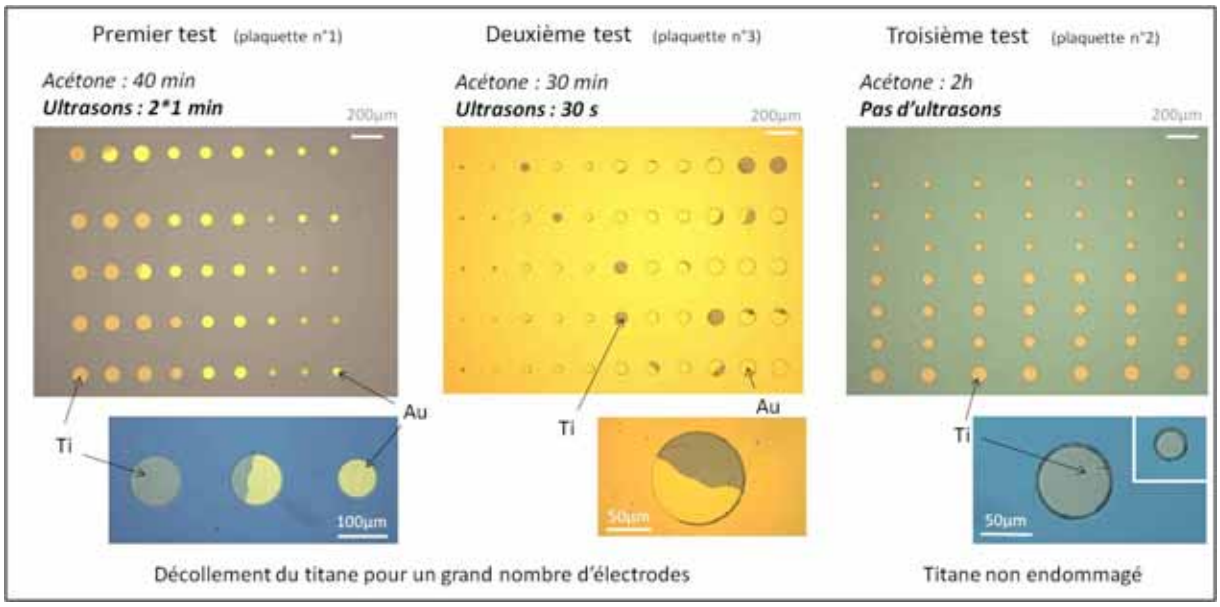


Figure 33 : Images au microscope des électrodes à la fin du lift-off : l'utilisation d'ultrasons provoque un décollement du titane.

IV.3.3.c. Résultats pour le premier lot après réalisation des barrières hydrophobes

La réalisation de barrières hydrophobes sur les trois plaquettes du premier lot n'a pas posé de problème particulier. L'épaisseur de résine obtenue, mesurée par ellipsométrie, est de 52µm. Au final, 72 puces sont obtenues, dont 24 avec des microélectrodes en titane, et une quarantaine avec un mélange d'électrodes de titane et d'électrodes « vides » qui laissent apparaître une surface d'or, et quelques unes avec des « électrodes d'or » seulement. Ces dernières ont été utilisées pour réaliser un premier test d'alignement des plumes sur les électrodes de 100µm.

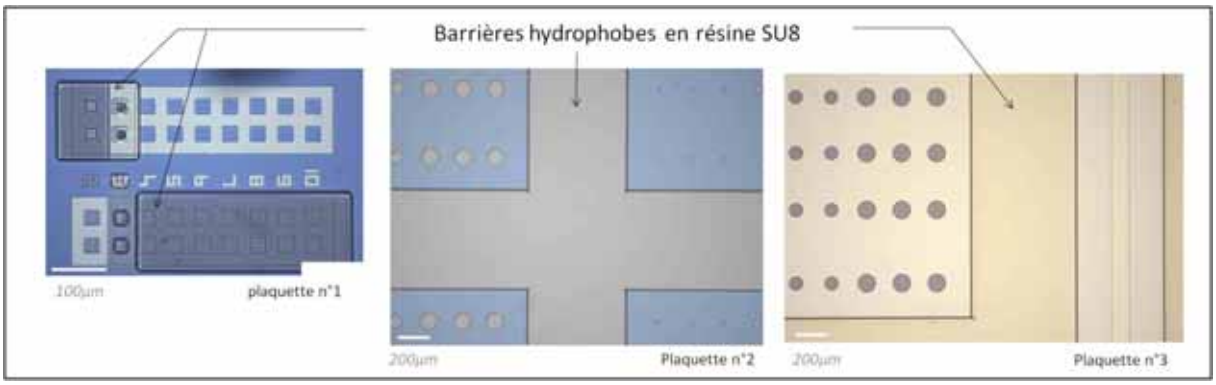


Figure 34 : Images des barrières hydrophobes en résine SU8

Malgré le faible rendement final, ces premiers tests ont permis de mettre au point le procédé de fabrication, qui pourra être utilisé ultérieurement, en modifiant éventuellement la nature du métal constituant les électrodes.

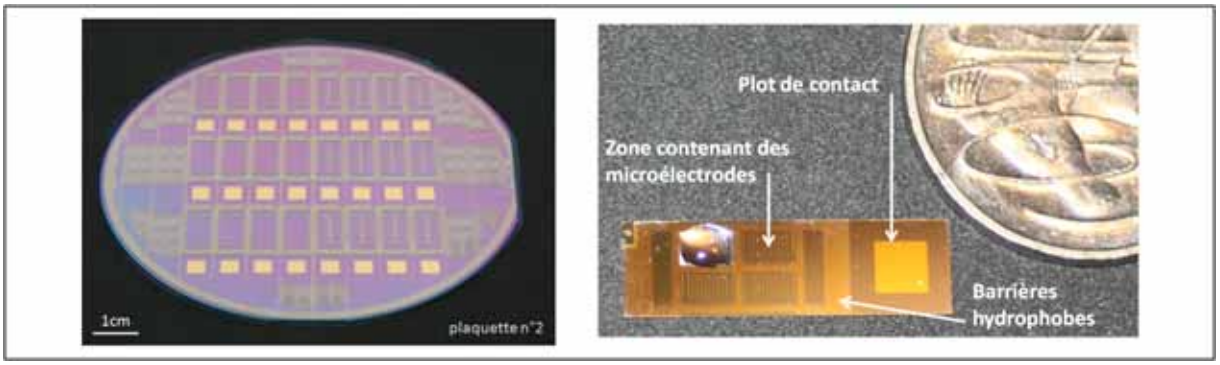


Figure 34 : Vues d'ensembles d'une puce et d'une plaquette complète à la fin du procédé de fabrication.

IV.3.4. Validation des microélectrodes : électro-dépôt d'ADN.

Un test d'électrodépôt à l'aide de Bioplume sur les microélectrodes a été réalisé. Le modèle choisi est l'adressage d'ADN par polymérisation de pyrrole. Les microélectrodes utilisées sont donc celles dont la couche de Ti s'était décollée lors du traitement aux ultrasons.

La puce comportant les microélectrodes est placée sur le porte-échantillon du robot et connectée au potentiostat au niveau du plot de contact en or. Les plumes sont ensuite approchées des microélectrodes et alignées en utilisant le contrôle visuel à l'aide de la caméra. La lumière est réglée de manière à visualiser à la fois les plumes, leur reflet, et le bord des microélectrodes. Le point le plus délicat est l'alignement en rotation selon l'axe vertical (angle θ).

Les plumes sont ensuite chargées avec une solution contenant des monomères de pyrrole et neuf spots sont réalisés en mode continu, en appliquant un potentiel de +2V. Le chrono-ampérogramme obtenu (figure 35a) montre que la connexion électrique est correcte, c'est à dire que **les microélectrodes et le plot de contact sont bien fonctionnels**.

Les plumes sont ensuite déplacées de 200µm de façon à être alignées avec la rangée de microélectrodes suivantes. Une solution contenant des monomères de pyrrole et l'oligonucléotide-pyrrole « Zip9-pyr » est déposée sur ces électrodes, sous la forme de nouveau d'une matrice de 9 spots.

Enfin, une solution témoin contenant des monomères de pyrrole et l'oligonucléotide-pyrrole « Zip2-pyr » est déposée sur une troisième rangée de microélectrodes.

La puce est ensuite observée au microscope, ce qui permet de vérifier qu'une matrice de 9 spots est bien présente sur chacune des microélectrodes des trois rangées utilisées. **L'alignement des plumes sur les microélectrodes est donc correct**, et dans le cas de microélectrodes de 100µm, la réalisation de 9 spots est possible.

Le jeu de microélectrodes sur lequel les dépôts ont été réalisés est ensuite recouvert d'une solution de saturation. A cette occasion, **la fonctionnalité des barrières hydrophobes est vérifiée, c'est-à-dire que la goutte de solution de saturation est bien maintenue par le contour de résine SU8** (figure 35e). Au bout de 10min, cette goutte est remplacée par une solution contenant l'oligonucléotide biotinylé « Zip9c-biotine », complémentaire de « Zip9-

pyr », et la puce est placée dans une étuve à 37°C pendant 15min. La puce est ensuite rincée au tampon PBS et l'hybridation est révélée à l'aide d'une solution fluorescente de streptavidine-phycoérythrine. Au bout de 15min, un rinçage abondant au PBS est réalisé, une lamelle est placée sur la puce et le tout est observé au microscope en fluorescence.

L'image obtenue (figure 35f) montre qu'**un signal fluorescent est bien présent au niveau de la rangée d'électrodes correspondant au dépôt de « Zip9-pyr ».** Les emplacements des tests négatifs sont nettement identifiables puisqu'il s'agit des électrodes adjacentes, ce qui permet de vérifier sans aucune ambiguïté la spécificité de l'interaction.

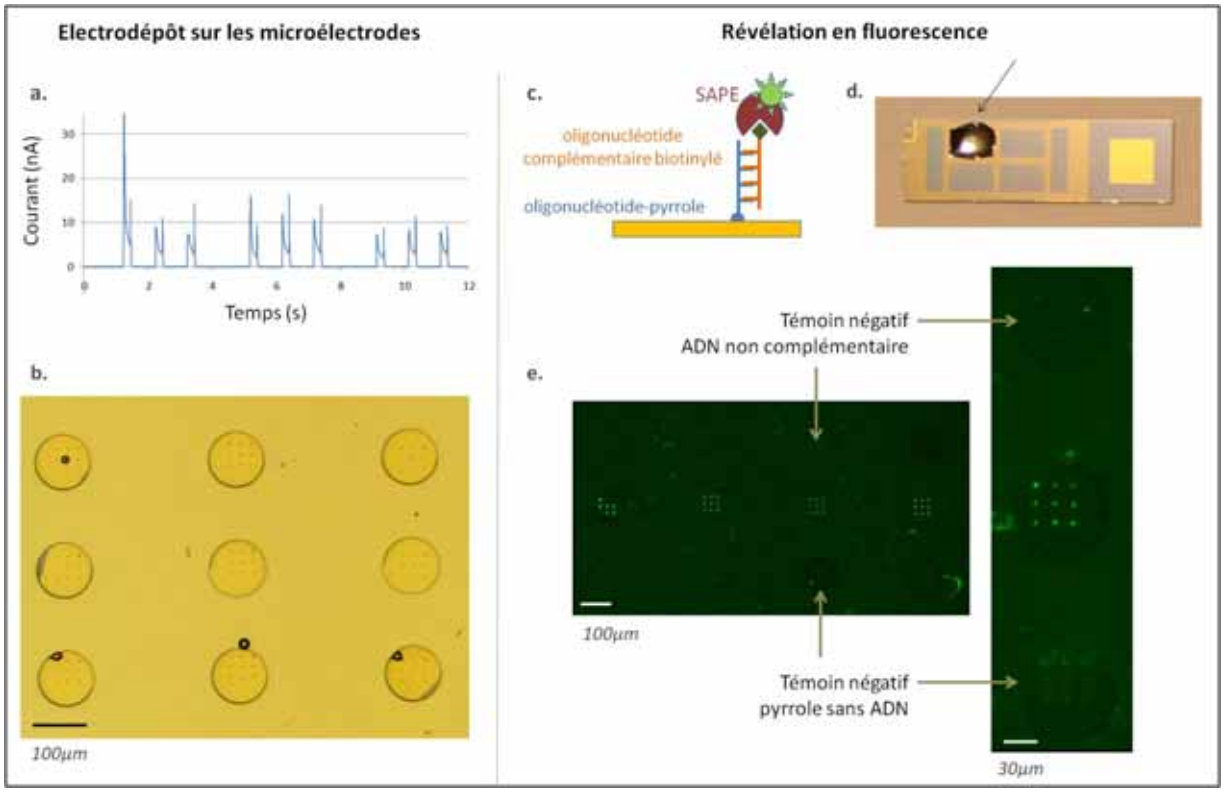


Figure 35 : Electrodépôt d'oligonucléotides-pyrrole sur des « microélectrodes d'or ».

a. Chrono-ampérogramme lors du dépôt en mode continu d'une solution de pyrrole à 20mM dans tampon F. Potentiel appliqué : +2V

b. Image au microscope de 3 rangées d'électrodes (de haut en bas) sur lesquelles des spots ont été réalisés

c. Révélation par fluorescence (SAPE)

d. Image d'une goutte de solution de saturation déposée sur les microélectrodes spottées, et retenue par les barrières hydrophobes.

e. Image en fluorescence des 3 rangées d'électrodes, après hybridation et interaction avec la SAPE.

- Les microélectrodes utilisées sont parmi celles où le Ti s'est décollé pour laisser apparaître la couche d'or (plaquette n°3). La puce est connectée au potentiostat au niveau du plot de contact.

- Solutions déposées (préparées dans du tampon F) :

Première rangée (en bas sur la figure) : monomères de pyrrole à 20mM

Seconde rangée (au milieu) : monomères de pyrrole à 20mM et l'oligonucléotide-pyrrole « Zip9-pyr » à 20µM

Troisième rangée (en haut) : monomères de pyrrole à 20mM et l'oligonucléotide-pyrrole « Zip2-pyr » à 20µM

- Saturation : solution d'ADN de sperme de saumon préparée dans du tampon phosphate 50mM, 15min

- Hybridation : solution contenant l'oligonucléotide biotinylé « Zip9c-biotine », complémentaire de « Zip9-pyr » à 100nM dans la solution de saturation. 15min à 37°C. Rinçage au tampon PBS.

- Révélation : solution de SAPE diluée 10 fois dans du tampon PBS, 15min. Rinçage (5 fois) au PBS.

Une lamelle de verre est placée sur la dernière goutte et la puce est observée au microscope en fluorescence.

Pour conclure, ce premier test a permis de valider l'utilisation des microélectrodes pour un test d'électrochimie localisée réalisé avec le robot Bioplume. **L'intérêt des microélectrodes pour favoriser la localisation des spots sur la surface** a été mis en évidence, ce qui peut être particulièrement intéressant pour la mise au point des prochains tests d'électrochimie localisée, en particulier avec NanoBioplume. La précision d'alignement des plumes sur des structures préexistantes a également permis d'envisager de réaliser des dépôts sur une puce à électrodes spécifique, dédiée à des applications en neurologie, utilisée par des collaborateurs.

Les tests suivants, concernant l'alignement sur les électrodes de plus petite taille auront lieu dans les mois à venir.

Conclusion chapitre 4

Au cours des expériences présentées dans ce chapitre, trois nouvelles pistes de développement de l'électrochimie localisée appliquée à Bioplume ont été ouvertes : d'abord l'électrodésorption du polymère PLLgPEG ; ensuite la miniaturisation à l'aide de plumes à nanopointes (NanoBioplume) ; et enfin le dépôt sur des microélectrodes conçues et fabriquées spécialement pour ce type d'études. Les tests réalisés ont permis de mettre en évidence les points critiques et de proposer des solutions permettant de poursuivre chaque projet de façon plus détaillée.

Une présentation des perspectives de recherche pouvant constituer la suite de ce travail fait l'objet de la partie suivante.

Bilan et Perspectives

Bilan et Perspectives

Le contexte dans lequel ce travail de thèse s'est inscrit est celui des biopuces et des biocapteurs. Ces deux domaines, en très forte expansion depuis les quinze dernières années, évoluent dans le sens de la miniaturisation. Une problématique commune se dégage alors : elle concerne d'une part l'adressage et d'autre part l'immobilisation des biomolécules sur des structures devenant de plus en plus petites et intégrées dans des environnements de plus en plus complexes.

Parmi les méthodes d'adressage proposées par de nombreuses équipes, le robot Bioplume a été retenu pour la pertinence de l'échelle concernée (1-50µm) et le fort potentiel pressenti de la technique.

Cinq méthodes d'immobilisation, choisies parmi une bibliographie abondante, ont ensuite été mises en œuvre, ce qui a permis d'appréhender les performances et les contraintes de chacune. La chimie du pyrrole est alors apparue particulièrement intéressante. Grâce à son adaptabilité au robot Bioplume, elle permet d'apporter une solution efficace à la fois en terme d'adressage et en terme d'immobilisation. Ainsi les biomolécules peuvent être déposées sous la forme de motifs de 5-20µm sans traitement préalable du support, car la réaction d'immobilisation est réalisée simultanément au dépôt.

Cette méthode électrochimique a été retenue pour deux applications : d'abord la réalisation de matrices de cellules isolées, avec détection par SPR, puis le dépôt sur la section de fibres optiques.

Enfin, trois nouvelles pistes dans le domaine de l'électrochimie localisée adaptée à Bioplume ont été explorées : l'électrodésorption, la miniaturisation des gouttes, et l'électrodépôt sur des microélectrodes dédiées.

Les principaux résultats obtenus au cours de ces études sont rassemblés dans le tableau ci-dessous, dans lequel sont également indiquées les perspectives envisagées. Ces points sont détaillés dans les pages suivantes.

Bioplume							
Développement technique	**Validation pour appli. biopuces**	**Développement de nouvelles applications**					
		Cellules isolées	**Fibres optiques**	**Electrodésorption**	**NanoBioplume**	**Microélectrodes**	
Dépôt multiplexé (puce de chargement) Superposition des dépôts : réduction des quantités de matériel biologique (spot -dans-spot) Alignement sur des structures : fibres optiques, microélectrodes Limitation du bruit électromagnétique	Dépôt d'ADN, de protéines et d'anticorps : biomolécules modèles Surfaces pré-fonctionnalisées ou surfaces vierges conductrices, avec immobilisation par électrochimie. Tests de spécificité sur 2-3 témoins	Plots d'anticorps dirigés contre des cellules non-adhérentes (10µm) Immobilisation de lymphocytes B : une cellule par plot. Obtention de matrices cellules isolées Visualisation par SPRi de la fixation des lymphocytes.	Dépôt sur la section de fibres optiques, planes et structurées 300 spots par fibre, plusieurs matrices indépendantes Bio-fonctionnalité des biomolécules déposées vérifiée en fluorescence.	Voltampérométrie cyclique : études des réactions pouvant avoir lieu Identification des points délicats liés à la miniaturisation	Miniaturisation du dépôt couplé à l'électrochimie : spots de 2µm (aL) Electrodépôt de cuivre et observation MEB Electrodépôt d'ADN et visualisation en fluorescence	Conception et fabrication de microélectrodes interconnectées Electrodépôt d'ADN et visualisation en fluorescence	**Résultats**
Prototype industriel pour biopuces à haute densité (NanoBioChips) Nouveau design des barrettes de plumes Adaptation logiciel Optimisation du chargement et des lavages Electronique plus robuste	Généralisation sur une large gamme de biomolécules différentes : projet en cours avec une banque d'anticorps Application à des problématiques biologiques	Test de spécificité avec plusieurs types cellulaires. Immobilisation sur des microélectrodes.	Test de spécificité Généralisation à un nombre important de biomolécules Détection en transmission, et isolation des signaux provenant de fibres isolées	Reprendre les tests sur surface d'ITO, en oxydation. Visualisation indirecte : fixation d'une molécule fluorescente dans les zones libérées	Electrodépôt de protéines (à 2µm) Gamme plus large de biomolécules Utiliser une méthode facilitant la localisation des spots sur la surface (microélectrodes)	Electrodépôt sur les électrodes les plus petites Utilisation pour localiser facilement les spots : témoins négatifs, révélation non optimisée	**Perspectives à court terme**
Robot installé sur une plateforme de production de biopuces à façon		Immobilisation dirigée de neurones : croissance des dendrites, influence de la distance intercellulaire, ... Tests de type "puce à cellules uniques » Imagerie (AFM)	Mise en place de la détection par effet SERS Application à une problématique biologique Endoscopie	Adressage de biomolécules dans les zones libérées et réalisation d'une interaction bio. Obtention d'une plaque de microtitration miniature Application sur les microélectrodes : adressage individualisé	Dépôt multiplexé sur des surfaces de 10-50µm Etude fondamentale de l'électrochimie à l'échelle du femtolitre (effets de confinement, diffusion, etc...)	Nouvelles puces avec un autre métal que le titane (selon applications) Système modèle pour le projet NeuroPiez : immobilisation de neurones sur des capteurs piézo.	**Perspectives à long terme**

En tout premier lieu, les travaux conduits au cours de la thèse ont permis de poursuivre la validation de Bioplume pour des applications de type biopuces. Plusieurs biomolécules ont ainsi été déposées parmi lesquelles des oligonucléotides, des protéines et des anticorps. Les surfaces utilisées ont été dans un premier temps des lames de verre fonctionnalisées avec une couche chimique permettant l'immobilisation des biomolécules. L'utilisation de l'électrochimie a ensuite permis de réaliser des dépôts sur des surfaces conductrices non traitées : lames de verre recouvertes d'or, prismes de SPRi, fibres optiques et microélectrodes. L'utilisation de modèles biologiques robustes a été nécessaire pour cette première étape nécessitant des ajustements techniques. La poursuite immédiate du travail doit consister à généraliser la méthode à une gamme plus variée de biomolécules, puis à la tester pour répondre à des problématiques biologiques. Une banque d'anticorps sera utilisée pour les prochaines expériences, qui débuteront fin 2008.

Les développements techniques majeurs ayant eu lieu au cours de la thèse concernent le dépôt multiplexé à l'aide d'une puce de chargement, l'alignement sur des structures comme des fibres optiques ou des microélectrodes, et la réalisation de spots superposés. Ceci a permis de mettre en place la méthode d'interaction « spot-dans-spot », qui réduit d'un facteur 10^9 à 10^{12} les quantités de matériel biologique par rapport au format de biopuces classique. Cette méthode peut être appliquée par exemple au criblage pharmaceutique à haut débit, qui consiste à tester un grand nombre de molécules dites « candidats médicaments » sur des marqueurs biologiques d'une maladie.

Un porte-échantillon et une connectique dédiés aux expériences d'électrochimie ont également été développés, dans le but de réduire le bruit de fond électromagnétique et de visualiser ainsi des courants électrochimiques dans la gamme 1-10nA.

Les licences d'exploitation du robot Bioplume ayant été rachetées par la société MicroBioChips*, un nouveau prototype est en cours de conception et de fabrication. L'objectif est d'obtenir un automate pour la réalisation de biopuces à haute densité, contenant plusieurs dizaines de milliers de biomolécules différentes. Pour y parvenir, un travail d'optimisation technique a été engagé : il concerne les étapes de chargement, de lavage, et d'alignement des plumes, mais aussi les vitesses de déplacement, d'approche et d'appui. De nouvelles fonctions seront ajoutées au logiciel de pilotage pour permettre un fonctionnement autonome du robot depuis les réservoirs contenant les biomolécules jusqu'aux biopuces finales. Les cartes électroniques seront également optimisées en termes de robustesse.

Au-delà des biopuces proprement dites, de nouvelles pistes d'application ont été explorées. Tout d'abord, des matrices de cellules isolées ont été réalisées, en mettant à profit la correspondance entre la taille des motifs obtenus à l'aide de Bioplume et la taille des cellules eucaryotes (10µm). Ainsi des lymphocytes B ont été incubés sur des plots d'anticorps disposés en matrice, et la fixation d'une cellule par plot a permis d'obtenir une organisation en 2D de ces lymphocytes. Dans un futur immédiat, ces expériences seront reprises en incubant simultanément des cellules de plusieurs types, afin de vérifier la spécificité de fixation. Ceci pourra ensuite être appliqué au tri cellulaire.

*MicroBioChips a acquis une licence exclusive et mondiale du brevet "dispositif de dépôt localisé d'au moins une solution biologique" déposé par le LAAS - CNRS.

A plus long terme, des tests d'immobilisation de neurones sont envisagés, en collaboration avec l'équipe de Serge Picaud de l'Institut de la Vision de Paris. L'organisation en 2D des neurones permettrait d'étudier l'influence de la distance intercellulaire sur la mise en place des connexions neuronales, et éventuellement de guider la croissance des dendrites.

Des expériences de type « puces à cellules » sont également envisageables. Ceci permettrait d'étudier la réponse à divers stimuli de chaque cellule, et ainsi d'obtenir une répartition statistique, en tenant compte de la variabilité phénotypique sur une même population cellulaire. Les applications peuvent être par exemple l'étude de l'influence de médicaments, l'identification de récepteurs cellulaires ou la transfection appliquée à une seule cellule.

Enfin, la possibilité d'immobiliser des cellules (même non adhérentes) sur une surface à une position bien définie est intéressante pour l'imagerie à très haute résolution, par exemple par AFM. Cette technique récente offre de nouvelles possibilités d'observation des structures cellulaires, ce qui explique son développement important ces dix dernières années [1] [2]. Par exemple, Dague *et al* ont utilisé cette technique pour observer la paroi du champignon microscopique *Aspergillus fumigatus* [3] [4].

Une seconde application originale de Bioplume concerne le dépôt sur la section de fibres optiques, utilisable en endoscopie. La mise en place d'un système de fixation et de connexion électrique a permis de réaliser jusqu'à 300 dépôts sur la même fibre, en utilisant l'immobilisation électrochimique des biomolécules. La fonctionnalité des ADN ainsi déposés a été vérifiée en fluorescence, par réflexion. L'étape suivante consisterait à déposer plusieurs biomolécules sur la même fibre pour réaliser des tests de reconnaissance multiplexés. La détection en transmission pourra ensuite être mise en place, afin d'isoler les signaux provenant de chaque fibre individuelle, donc de chaque spot.

L'objectif à plus long terme est d'utiliser ce système dans un cas clinique, pour la détection de marqueurs biologiques en endoscopie. Pour cela, les travaux sur la détection de biomolécules par effet SERS en milieu aqueux à l'aide d'une fibre optique devront être poursuivis. Ces pistes de travail font l'objet d'un projet en cours d'élaboration, qui rassemble les équipes de Neso Sojic (IMN Bordeaux), Pascal Mailley (CREAB, CEA Grenoble) et Liviu Nicu (LAAS-CNRS) ainsi que la société MicroBioChips.

La possibilité de réaliser une réaction électrochimique dans une goutte déposée par Bioplume a été ensuite appliquée à l'électrodésorption de PLLgPEG, technique décrite par l'équipe de Janös Vörös de l'ETH de Zurich. Il s'agit d'utiliser l'électrochimie non plus pour immobiliser des entités mais au contraire pour retirer localement de la matière d'une surface entièrement recouverte de polymère. Les tests réalisés ont permis d'identifier les points délicats liés à la mise en œuvre de cette expérience : réaction de réduction de fluorophore aux potentiels négatifs, impossibilité de réaliser une oxydation sur titane, difficultés de visualisation de la désorption. Des solutions ont été proposées et pourront être testées dans la poursuite de l'étude, en particulier l'utilisation d'ITO à la place du titane et la visualisation indirecte en adsorbant une molécule fluorescente dans les zones libérées.

Dans un second temps, il peut être envisagé d'adresser des biomolécules dans les puits de 10-20µm de diamètre aménagés dans le PLLgPEG. En réalisant ensuite une interaction dans ces puits, une plaque de microtitration miniature serait obtenue. La désorption localisée de PLLgPEG pourrait également être utilisée pour adresser individuellement des microélectrodes.

Un autre développement récent concernant la technologie Bioplume a été la fabrication de plumes prolongées par des pointes nanométriques, qui permettent de diminuer la taille des spots jusqu'à 1-2µm. L'utilisation de ces « nanoplumes » pour réaliser des expériences d'électrochimie localisée a été mise au point. Le dépôt de cuivre a d'abord été choisi comme modèle, puis la méthode a été appliquée à l'électrodépôt d'oligonucléotides-pyrrole.

Il serait intéressant d'étendre ces expériences au dépôt de protéines-pyrrole, puis à une gamme plus large de biomolécules. Pour ces nouvelles expériences, l'utilisation d'un système facilitant le repérage des spots paraît indispensable. En effet, lorsque les images sont peu contrastées, il n'est pas aisé de visualiser des spots de 2µm de diamètre sur une surface de plusieurs cm^2. Les microélectrodes dont la conception et la fabrication ont été décrites au chapitre 4 peuvent être utilisées pour cela.

A plus long terme, l'une des applications de NanoBioplume pourrait être le dépôt de plusieurs molécules sur des surfaces de 10-50µm. Une étude plus fondamentale des effets du confinement sur la réaction électrochimique est également envisagée.

En dernier lieu, des microélectrodes dédiées aux études d'électrochimie localisée appliquée à Bioplume ont été conçues. Le procédé de fabrication a été mis au point et quelques puces ont été obtenues, contenant chacune 376 microélectrodes. Les premiers tests de dépôt sur ces microélectrodes ont été concluants et ont démontré en particulier l'intérêt des électrodes pour repérer plus facilement les spots de témoins négatifs. Cet aspect sera exploité pour les futurs dépôts avec NanoBioplume, dont l'observation est délicate. Selon les applications envisagées, de nouvelles électrodes pourront être fabriquées en remplaçant le titane par un autre matériau. Ceci pourrait être opportun dans le cadre du projet NeuroPiez, dont l'objectif est d'immobiliser des neurones sur des capteurs piézoélectriques pour étudier la propagation des potentiels d'action. Un tel système de microélectrodes simplifié pourrait être utilisé pour les tests de mise au point de l'immobilisation des neurones et pour l'étude de l'interaction cellule/métal, avant de passer au cas réel avec les capteurs piézoélectriques.

Au-delà du bilan scientifique, l'objectif de formation au travail pluridisciplinaire, à l'origine du choix de cette thèse, a été entièrement rempli. Les travaux décrits montrent la diversité des disciplines mises en jeu : biochimie, électrochimie, microfabrication, électronique et biologie. C'est grâce au partenariat avec des spécialistes de chaque domaine que les résultats présentés ont pu être obtenus. Cette expérience de travail à l'interface entre diverses disciplines et impliquant de nombreux acteurs a débouché sur une embauche par la société MicroBioChips. C'est dans ce cadre que les expériences futures décrites dans ces pages seront mises en œuvre.

---

[1] : Y.F. Dufrêne et D. J. Müller, *Nat. Nanotech.*, 2008, **3**, 261-269.

[2] : P. Parot, Y.F. Dufrêne, P. Hinterdorfer, C.L. Grimellec, D. Navajas, J.-L. Pellequer et S. Scheuring, *Journal of Molecular Recognition*, 2007, **20 (6)**, 418-431

[3] : E. Dague, Y. Gilbert, C. Verbelen, G. Andre, D. Alsteens, Y.F. Dufrêne, *Yeast*, 2007, **24 (4)**, 229-237

[4] : E. Dague, D. Alsteens, J.-P. Latge, Y. Dufrene, *Biophys. J.*, 2008, **94**, 1-5

Matériel et Méthodes

Matériel et Méthodes

Pour faciliter la lecture de ce manuscrit, la plupart des méthodes utilisées ont été décrites au fur et à mesure. Les éléments plus précis qui n'étaient pas indispensables à la compréhension des résultats sont rassemblés dans ces quelques pages.

Tampons et milieux

- Tampon phosphate : Na_2HPO_4 0,1M pH9
- Tampon carbonate : $NaHCO_3$ 1M pH8,5
- Tampon d'hybridation commercial : "Pronto Short Oligo Hybridization buffer". *Corning*
- Additif ChipHybe. *Corning*
- SSC : Saline Sodium Citrate. 0,3M citrate de sodium, 3M NaCl. *Sigma-Aldrich* (France)
- SDS : Sodium Dodécyl Sulfate ($CH_3(CH_2)_{11}OSO_3Na$). *EuroMedex*
- Glycérol. *Sigma-Aldrich* (France)
- Tris-HCl : 1,3M pH 8,8 : 3,94g de Tris base *(VWR Prolabo)* dans 25mL d'eau. pH ajusté à 8,8 avec une solution d'acide chlorhydrique (HCl) à 2,5M.
- PBS : Phosphate Buffer Saline (tampon phosphate salé) : deux compositions équivalentes (II.2.3, III.1.2, III.1.3, III.1.4) : Na_2HPO_4 5mM, NaH_2PO_4 3mM, NaCl 140mM, pH 7,4 (III.1.5, III.2.1, III.2.2, IV) : NaCl 137mM ; KCl 3mM ; KH_2PO_4 1,5mM ; $NaHPO_4$ 8mM, pH7,2.
- Tween. *Sigma Aldrich*
- HEPES : 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, solution à 1M. *Fluka*

  Tampon HEPES : 10mM HEPES 150mM NaCl, pH 7.4
- Tampon F: NaH_2PO_4 50mM, NaCl 50mM, glycérol 10%. Conductivité ajustée à 70(±5). Solution filtrée et dégazée.
- Electrolyte B :
- Tampon de collecte : PBS contenant 0,1% *v/v* de Tween. Obtenu dans le cadre de la collaboration avec T. Alava (LAAS-CNRS).
- DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium, milieu de culture de cellules eucaryotes. Composition : cf [1].
- Milieu de culture des lymphocytes : DMEM complémenté avec 10% de sérum de veau fétal
- « Milieu d'hybridation » : tampon phosphate 50mM contenant de l'ADN de sperme de saumon. Obtenu dans le cadre de la collaboration avec Emeline Descamps (ISM Bordeaux)

Solvants :

- Ethanol : absolu pour silanisation (VWR), technique (*Rockwood*)
- Trichloréthylène. *Rockwood*
- Acétone. *OM Group*
- Eau : eau déminéralisée et filtrée « milliQ ». UHQ, *USF Elga, Veolia Water*

Produits

- Ethanolamine-HCl : solution à 1M, pH 8,5. *Biacore AB*
- Na_2HPO_4 : phosphate de sodium. *Prolabo VWR*
- NaH_2PO_4 : phosphate de sodium. *Prolabo VWR*
- NaCl : chlorure de sodium. *Prolabo*
- $NaBH_4$: borohydrure de sodium. *Sigma*
- GPTS : glycidoxy-propyl-triméthoxysilane. *Aldrich*
- MUA : acide mercapto-undécanoïque ($SH-(CH_2)_{10}-COOH$). *Sigma Aldrich.*
- NHS : N-hydroxy-succinimide. *Fluka*
- EDC : N-Ethyl-N'-(3-Dimethylaminopropyl)carbodiimide. *Fluka*
- AlexaFluor®647-NHS : fluorophore AlexaFluor®647 couplé à un ester de N-hydroxy-succinimide. *Molecular Probes*
- Monomères de pyrrole : obtenus dans le cadre de la collaboration avec Yoan Roupioz (CREAB, CEA Grenoble)
- Ruthénium hexa-amine $Ru(NH_2)_6$: *Sigma*
- CuSO4 : *Sigma*
- H_2O_2 : eau oxygénée 30%. *OM Group*
- H_2SO_4 : acide sulfurique 96%. *OM Group*
- HF : acide fluorhydrique 50%. *Rockwood.*
- RT2 : acide sulfochromique. *VWR*

Matériel biologique : biomolécules et cellules

- **Oligonucléotides**

Synthétisés par la méthode classique des phosphoramidites par Eurogentec (Seraing, Belgique) ou Opéron (Allemagne).

35mer-NH_2 : 5′-NH_2-GTGATCGTTGTATCGAGGAATACTCCGATACCATT-3′

26mer NC : 5′-NH_2-CATTTAGTTGGACGTTGTCACATTTA-3′

15mer-Cy5 : 5′-Cy5-AATGGTATCGGAGTA-3′

15mer-Cy3 : 5′-Cy3-CATATTCGACGGCATC-3′

P1N : 5'-NH_2-CATTTAGTTGGACGTTGTCACATTTA-3'

P3N : 5'-NH_2-AACTTCCGATTCCCAGTCCATT-3'

Obtenus dans le cadre des collaborations avec le laboratoire CREAB du CEA de Grenoble :

Zip2-pyr : 5'-pyr-$(T)_{10}$-CAGC-ACCT-GACC-ATCG-ATCG-CAGC-3'

Zip6-pyr : 5'-pyr-$(T)_{10}$-GACCGGTATGCGACCTGGTATGCG-3'

Zip9-pyr : 5'-pyr-$(T)_{10}$-GACCATCGTGCGGGTAGGTAGACC-3'

Zip2c : 5'-GCTG-CGAT-CGAT-GGTC-AGGT-GCTG-3'

Zip6c-biotine : 5'-biotine-CGCATACCAGGTCGCATACCGGTC-3'

Zip9c-biotine : 5'-biotine-GGTCTACCTACCCGCACGATGGTC -3'

- **Protéines**

* GST : Glutathion-S-transférase. 40,5 U/mg. Sigma-Aldrich (France)
* BSA : albumine de sérum bovin. Sigma-Aldrich (France)
* Neutravidine : *Sigma*
* SAPE : streptavidine-R-phycoérythrine. Solution à 1mg/mL dans un tampon contenant 0,1M NaPi ; 0,1M NaCl ; 2mM azide à pH7,5. *Molecular Probes*.

- **Anticorps**

* anti-GST : anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine GST. Sigma-Aldrich (France)
* anti-GST-AlexaFluor®647 : préparé par marquage d'anti-GST avec AlexaFluor®647 (cf protocole ci-dessous)
* anti-Ba : anticorps dirigés contre *B. atropheus*, préparés par immunisation de lapins et purifiés. Obtenus dans le cadre de la collaboration avec T. Alava (LAAS-CNRS).
* anti-ova : anticorps dirigés contre l'ovalbumine, préparés par immunisation de lapins et purifiés. Obtenus dans le cadre de la collaboration avec T. Alava (LAAS-CNRS).
* IgG anti-lapin biotinylé : anticorps dirigés contre des anticorps issus du lapin, produits par immunisation de chèvres, purifiés par affinité. *Sigma, ref 8895*
* IgG de lapin-pyrrole : préparé à partir de l'IgG *Sigma Aldrich, ref I5006* et de pyrrole-NHS. Obtenu dans le cadre de la collaboration avec Y. Roupioz (CREAB, CEA, Grenoble)

∗ IgG anti-IAb : anticorps dirigés contre la protéine IAb, présente à la surface des lymphocytes B. *BD Biosciences*

IgG anti-IAb-pyr : préparé à partir d'anti-IAb *(BD Biosciences)* et de pyrrole-NHS. Obtenu dans le cadre de la collaboration avec Y. Roupioz (CREAB, CEA, Grenoble)

∗ IgG anti-CD90 : anticorps dirigés contre la protéine CD90, présente à la surface des lymphocytes T. *BD Biosciences*

IgG anti-CD90-pyr : préparé à partir d'anti-IAb (*BD Biosciences)* et de pyrrole-NHS. Obtenu dans le cadre de la collaboration avec Y. Roupioz (CREAB, CEA, Grenoble)

∗ IgG humains : anticorps extraits de sérum humain. *Sigma Aldrich, réf I4506*

IgG humains-pyr : préparés à partir d'IgG humains (*Sigma Aldrich) et* de pyrrole-NHS. Obtenus dans le cadre de la collaboration avec Y. Roupioz (CREAB, CEA, Grenoble)

➢ **Cellules**

∗ *Bacillus atropheus* : bactérie Gram négative sporulante. Solution à $1{,}4.10^9$ spores/mL obtenue dans le cadre de la collaboration avec T. Alava (LAAS-CNRS)

∗ Lymphocytes B : issues de cultures cellulaires préparées par l'équipe de Patrice Marche à l'Institut Albert Bonniot de Grenoble (unité INSERM U823)

➢ **Bruit de fond atmosphérique** : échantillon d'air prélevé dans un lieu public et dont le contenu solide est dissous dans du tampon de collecte. La part microbienne dans cet échantillon s'élève à 0,07 CFU/litre d'air. Prélèvement à l'aide du cyclone « MK1 cyclone sampler » (Biotrace International UK). Echantillons obtenus dans le cadre de la collaboration avec T. Alava (LAAS-CNRS).

Biopolymère PLLgPEG : copolymère de Poly-lysine et de PolyEthylène Glycol.

∗ PLLgPEG : PLL (20 kDa) couplé au PEG (2 kDa) selon un ratio g tel que (unités Lys /chaînesPEG) = 3.5. *Surface Solutions GmbH, Suisse*

∗ PLLgPEG-biotine : PLL (20 kDa) couplé au PEG (2 kDa) selon un ratio g tel que (unités Lys /chaînesPEG) = 3.5, avec 20% de chaînes PEG (3,4kDa) portant des fonctions biotine. *Surface Solutions GmbH, Suisse*

∗ PLLgPEG-FITC : PLL (20 kDa) couplé au PEG (2 kDa) selon un ratio g tel que (unités Lys /chaînesPEG) = 3.5 ; FITC couplé au PLL. *Surface Solutions GmbH, Suisse*

∗ PLLgPEG-TRITC : PLL (20 kDa) couplé au PEG (2 kDa) selon un ratio g tel que (unités Lys /chaînesPEG) = 3.5 ; TRITC couplé au PLL. *Surface Solutions GmbH, Suisse*

∗ PLLgPEG AlexaFluor®647 : préparé à partir de PLLgPEG et d'AlexaFluor®647-NHS.

Méthodes de marquage des biomolécules

- **Marquage de l'anticorps anti-GST :**

L'AlexaFluor®647-NHS (6 µl in DMSO) est mélangé à une solution d'anticorps anti-GST (100 µg) préparée dans du tampon carbonate. La solution est incubée 1h à température ambiante dans le noir sur une table agitante, puis stoppée en ajoutant du tampon Tris-HCl (14 µl, 1 M, pH 8.8). Le mélange est incubé 1 h à température ambiante puis une nuit à 4°C.

L'anticorps marqué (140µL) est ensuite purifié sur colonne d'exclusion de taille (NanoSep, *Molecular Probes*). La qualité du marquage est vérifiée par spectrophotométrie (ND-1000. *Nanodrop*).

- **Marquage AlexaFluor®647 du PLLgPEG :**

L'AlexaFluor®647-NHS lyophilisé est resuspendu dans 100µL DMSO, puis une solution est préparée en mélangeant 648µL de PLLgPEG à 5,4mg/mL et 65µL d'AlexaFluor®647-NHS/DMSO. Le mélange est incubé 6h à température ambiante dans le noir, sur table agitante. La réaction est ensuite stoppée en ajoutant 100µL de Tris-HCl (incubation 45min). Le PPLgPEG marqué AlexaFluor®647 est ensuite purifié sur colonne d'exclusion de taille (NanoSep, *Molecular Probes*). Trois colonnes (deux fois 30K, puis 100K) ont été utilisées successivement pour raison de colmatage.

- **Marquage pyrrole :** selon protocole décrit dans [2].

Supports :

- Lames époxydes : Nexterion Slide E, *Schott*
- Dendrilames : lames préparées par Emmanuelle Trévisiol (Plateforme Biopuces) selon protocole décrit dans [3]
- Lames recouvertes d'or : *Schott, Suisse*
- Plaquette de sillicium (SiP) : *Bt electronics*
- Plaquette SiO_2 : préparée par oxydation thermique d'une plaquette de silicium
- Plaquette TiO2 : préparée par oxydation thermique d'une plaquette de silicium puis métallisation par évaporation de titane

Outils de dépôt

- Robot de dépôt pour la réalisation de biopuces : Chipwriter Pro. *Biorad*
- Bioplume : robot de dépôt à l'aide de microleviers de sillicium développé au LAAS-CNRS. Voir paragraphe I.2.1.a.

Outils d'observation

* Scanners : Axon 4100A et Axon 4000A (Axon Instruments), équipés des filtres spécifiques pour CY3 et Cy5. Analyse des images et quantification : logiciel Genepix 6.0. Ce logiciel permet d'aligner des grilles de cercles sur les images des spots. L'intensité de chaque spot est calculée comme la moyenne (ou la médiane) des intensités de chaque pixel, divisée par la surface du spot.
* Microscopes : Olympus BX51, équipé de la caméra Olympus DP12 ; ou Leica
* Microscope en fluorescence : Olympus IX70 équipé de la caméra Andore iQ.
* MEB : *Hitachi* S4800 avec système d'analyse EDX

Méthodes et outils de nettoyage et d'activation des surfaces

* Plasma O_2. *Tepla* 300
* Mélange « piranha » : H_20_2 50% ; H_2SO_4 50% *v/v*
* Méthode RCA : bain de « piranha » puis d'acide fluorhydrique (HF)

Matériel et méthodes spécifiques

➢ **Microbalance à quartz**

* Système de mesure de la fréquence de résonnance et de la dissipation sur quatre quartz en parallèle « Q-Sense E4 ». *Qsense, Suède*
* Pompe péristaltique : réglée à 10µL/min sauf mention contraire. High Precision Multichannel Dispenser. *Ismatic*
* Quartz or et SiO_2. *Qsense, Suède*

➢ **Electrochimie**

* Potentiostat :
- pour les expériences avec Bioplume : PG580, *Princeton Applied Research*
- pour les expériences de voltampérométrie cyclique : AutoLab PGstat30, *EcoChemie*

* Fil de platine : *Goodfellow*
* Electrode de référence Ag/AgCl : préparée au laboratoire
* Cellule d'électrochimie : préparée au laboratoire

➢ **Fibres optiques**

* Fibres optiques : *Sumitomo Electric Industries,* ref : IGN-035/06
* Méthode de structuration : gravure HF comme décrit dans [4]

- Méthode de fonctionnalisation or : évaporation sur l'extrémité de la fibre (section et gaine)
- Méthode de connexion : fixation d'un fil de cuivre sur la partie de la gaine métallisée à l'aide d'une peinture. Technique développée à l'ISM de Bordeaux.

Microfabrication

- Résines :
  Résine positive AZ1529. *Az*
  Résine réversible AZ5214. *Az*
  Résine négative SU8. *Microchem*
- Enduction de résine : tournette *Gyrset* ou module automatique EVG 120
- Solution de développement : AZ developper. *Az*
- Plaques chauffantes : *Electronic Micro Systems LTD* (plaques simples) ou *Suss Microtec* (plaques avec rampes en montée et descente)
- Etuve HMDS. *Yes*
- Profilomètre mécanique : *Tencor* P1
- Fours pour oxydation thermique : *AET Technologies, Grenoble*
- Dépôt de SiO_2 par PECVD : *STS*
- Métallisation Au et Ti : *Varian* 3616
- Insolation : aligneur double faces MA 150, semi automatique équipé d'une lampe de 350W. *Suss Microtec*

[1] : http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Product-Technical-Resources/media_formulation.180.html
[2] : L. Grosjean, B. Cherif, E. Mercey, A. Roget, Y. Levy, P. Noel Marche, M.-B. Villiers, T. Livache, *Analytical Biochemistry*, 2005, **347**, 193–200
[3] : E. Trévisiol, V. Le Berre-Anton, J. Leclaire, G. Pratviel, A.-M. Caminade, J.-P. Majoral, J.M. François et B. Meunier, *New J. Chem.*, 2003, **27**, 1713–1719
[4] : V. Guieu, F. Lagugné-Labarthet, L. Servant, D. Talaga, et N. Sojic, *Small*, 2008, **4 (1)**, 96-99

Communications scientifiques

Liste des communications scientifiques

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont fait l'objet des publications suivantes :

Publications dans un journal à comité de lecture :

- **N. Berthet-Duroure**, T. Leïchlé, J.-B. Pourciel, C. Martin, J. Bausells, E. Lora-Tamayo, F. Perez-Murano, J.-M. François, E. Trévisiol, L. Nicu, *Biomedical Microdevices*, 2008, **10(4)**, 479-87.
- C. Martin, A. Llobera, T. Leïchlé, G. Villanueva, A. Voigt, V. Fakhfouri, J.Y. Kim, **N. Berthet**, J. Bausells, G. Gruetzner, L. Nicu, J. Brugger, F. Perez-Murano, *Microelectronic Engineering*, 2008, **85**, 972-975.
- T. Alava, **N. Berthet-Duroure**, C. Ayela, M. Pugnière, Y. Morel, P. Rameil, Y.Tauran, ·E. Trévisiol, L. Nicu, Parallel acoustic detection of biological warfare agents surrogates by means of piezoelectric immunochips, soumis dans *Analytical and Bioanalytical Chemistry*
- Y. Roupioz, L. Nicu, **N. Berthet-Duroure**, C. Bergaud, P. Mailley, T. Livache, Antibody Surface Addressing for Individual Non-Adherent Living Cell Capture and Organization, soumis dans *Small*

Communications orales :

- **N. Berthet-Duroure**, D. Saya, F. Mathieu, J-B. Pourciel, P. Mailley, L. Nicu, Bioélectrochimie localisée à l'aide du robot Bioplume, Colloque du groupe français de bioélectrochimie, 2008, Lacanau (France)
- T. Alava, **N. Berthet**, C. Ayela, F. Vandevelde, K. Haupt, M. Pugnière, P. Rameil, Y. Morel et L. Nicu, Using QCM-D system to shape the biosensing future, Qsense users metting, 2007, Toulouse (France)

Communications par poster :

- **N. Berthet-Duroure**, D. Saya, F. Mathieu, J-B. Pourciel, E. Trévisiol, J. François, P. Mailley, L. Nicu, Miniaturization of electrochemical-assisted DNA deposition using NanoBioplume system, *Proceedings of NanoBioEurope 2008 conference*, 2008, Barcelone (Spain).
- Y. Roupioz, T. Leïchlé, E. Descamps, P. Mailley, **N. Duroure**, C. Bergaud, T. Livache, et L. Nicu, Micro-electrochemical Functionalization of Biochips with Pyrrole-modified Molecular Probes : A Versatile Route toward densely grafted Microarrays, *Proceedings of "Biosensors 2008" conference*, 2008, Shangai (China).
- **N. Berthet**, T. Leïchlé, E. Trévisiol, J.-B. Pourciel, D. Saya, C. Bergaud, L. Nicu, et J.-M. François, Spot-in-spot hybridization of oligonucleotides addressed on glass slide by a microcantilever based device, *Proceedings of "MicroTAS 2006" conference,* 2006, Tokyo (Japan).
- **N. Berthet**, T. Leïchlé, E. Trévisiol, J.-B. Pourciel, D. Saya, C. Bergaud, L. Nicu, et J. M. François, Hybridation spot dans spot d'oligonucléotides déposés sur lames de verre en utilisant le robot Bioplume, 22ème Journée Chimie-Biologie, Toulouse, France

Annexes

Annexe 1 : Notions fondamentales d'électrochimie

Adapté de F. Bedioui, Techniques pour l'ingénieur [A]

Réaction électrochimique

Considérons une solution contenant le couple oxydo-réducteur (Red/Ox) tel que :

$Ox + ne^- \Leftrightarrow Red.$

Le potentiel de la solution est alors défini par la loi de Nernst et s'écrit :

$$\mathbf{E = E_0 + RT/nF \ln (C_{ox}/C_{Red})}$$

- en considérant un comportement idéal des constituants en solution et une force ionique tels qu'on peut remplacer leur activité par leur concentration.
- avec E_0 : constante appelée potentiel normal vrai
  F : constante de Faraday,
  n : nombre d'électrons,
  R : constante des gaz parfaits,
  T : température absolue,
  Cox et CRed : concentrations des espèces Ox et Red en solution.

Lorsqu'une électrode est plongée dans la solution contenant le couple Red/Ox, elle prend le potentiel d'équilibre E écrit précédemment $E_{éq} = E_0 + RT/nF \ln (C_{ox}/C_{Red})$

La production d'une réaction électrochimique nécessite la réalisation de conditions rendant le potentiel d'électrode différent du potentiel d'équilibre, c'est-à-dire l'établissement d'un surpotentiel d'électrode $\eta = E - E_{éq}$. Ceci provoque une évolution du système oxydoréducteur tendant au rétablissement d'un nouvel état d'équilibre. La solution va alors tendre à prendre le potentiel imposé, en modifiant les rapports des concentrations entre Red et Ox :

- Si $\eta > 0$, C_{ox}/C_{Red} va augmenter, c'est-à-dire qu'une partie du réducteur passe à l'état oxydé par la réaction d'oxydation $Red - n\ e^- \Rightarrow Ox$.
  Cela se réalise par un transfert d'électrons dans le sens solution → électrode

- Si $\eta < 0$, C_{ox}/C_{Red} va diminuer, c'est-à-dire qu'une partie de l'oxydant va se réduire par la réaction de réduction $Ox + n\ e^- \Rightarrow Red$.
  Cela se réalise par un transfert d'électrons dans le sens électrode → solution

Annexe 2 : Publications