



Développement d'un système à ondes acoustiques pour le suivi rhéologique de la polymérisation de protéines. Application à la maladie d'Alzheimer.

Pierre Didier

► To cite this version:

Pierre Didier. Développement d'un système à ondes acoustiques pour le suivi rhéologique de la polymérisation de protéines. Application à la maladie d'Alzheimer.. Electronique. Université Paris Saclay (COMUE), 2017. Français. NNT: 2017SACLN016 . tel-01552757

HAL Id: tel-01552757

<https://theses.hal.science/tel-01552757>

Submitted on 3 Jul 2017

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.

NNT : 2017SACLN016

THESE DE DOCTORAT
DE
L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY
PREPAREE A
“L'ECOLE NORMALE SUPERIEURE DE CACHAN
(ECOLE NORMALE SUPERIEURE PARIS-SACLAY)”

ECOLE DOCTORALE N° 575
Electrical, optical, bio-physics and engineering

Spécialité de doctorat
Electronique et Optoélectronique, Nano et Microtechnologies

Par

Monsieur Pierre Didier

Développement d'un système à ondes acoustiques pour le suivi rhéologique de la polymérisation de protéines. Application à la maladie d'Alzheimer.

Thèse présentée et soutenue à Cachan, le 08 juin 2017 :

Composition du Jury :

Mme France LE BIHAN	Professeur à l'Université de Rennes 1	Présidente
M. Marc DUQUENNOY	Professeur à l'Université de Valenciennes	Rapporteur
Mme Latifa FAKRI-BOUCHET	Maître de Conférences, HDR à l'INSA de Lyon	Rapporteur
Mme Marie FRENEA-ROBIN	Maître de Conférences à l'Université Claude Bernard Lyon 1	Examinatrice
M. Pascal LARZABAL	Professeur à l'IUT de Cachan	Directeur de thèse
M. Stéphane SERFATY	Professeur à l'Université de Cergy-Pontoise	Co-encadrant de thèse
Mme Florence RAZAN	Maître de Conférences, HDR à l'ENS Rennes	Co-encadrante de thèse
M. Emmanuel CAPLAIN	Maître de Conférences à l'Université Cergy Pontoise	Invité

Remerciements

Cette thèse a été effectuée au sein du groupe de recherche Instrumentation et Imagerie (II) du Laboratoire des Systèmes et Applications des Technologies de l'Information et de l'Energie (SATIE). Je souhaiterais tout d'abord remercier Monsieur Pascal LARZABAL, directeur du SATIE, pour m'avoir permis d'effectuer ce travail au sein du laboratoire, et également d'avoir accepté de superviser ce travail en tant que directeur de thèse.

Je tiens également à remercier Messieurs Stéphane SERFATY et Emmanuel CAPLAIN, en leur qualité de co-encadrant pour leurs conseils, discussions et disponibilités tout au long de ce travail de thèse.

J'adresse tout particulièrement mes sincères remerciements à Madame Florence RAZAN pour son accueil, sa disponibilité, sa patience, ses conseils et la confiance qu'elle a su m'accorder pendant toutes ces années et qui m'a permis de découvrir le monde de la recherche et de développer des compétences dans le domaine de la microélectronique.

Mes remerciements vont à Madame France LE BIHAN d'avoir accepté de juger la qualité de ce travail en participant et en présidant mon jury de thèse.

Je remercie vivement Madame Latifa FAKRI-BOUCHET, ainsi que Monsieur Marc DUQUENNOY, pour avoir consacré du temps à la lecture de ce document en tant que rapporteurs de ce travail. De même, je remercie Madame Marie FRENEA-ROBIN pour avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse en tant qu'examinatrice.

Je tiens à remercier l'ensemble des chercheurs du laboratoire SATIE que j'ai pu côtoyer, je pense notamment aux membres du site de Cergy-Pontoise avec Madame Magalie MICHIEL et Messieurs Jean Yves Le HUEROU, Pascal GRIESMAR, Nicolas WILKIE-CHANCELLIER, Loïc MARTINEZ et Régis BESSE pour leur constante bienveillance à mon égard, et leurs aides et avis pour mener à bien mes investigations de recherche.

Je remercie également Monsieur Christian DELAMARCHE, du laboratoire IGDR, pour son aide et ses conseils permanents pour mener à bien mes expérimentations en biologie, domaine qui m'était plus qu'étrange et étranger au commencement de cette thèse.

Je voudrais également remercier Madame Claude NOGUES, du laboratoire LBPA, de m'avoir initié à la chimie de surface et la SPRI, autres domaines obscures auxquels j'ai pu me

confronter dans ces travaux de recherche.

Un grand merci à Mesdames Helene MAILLARD et Cécile BAUDET, ainsi que Monsieur Jean François COULON de l'ECAM Rennes pour leur disponibilité lors des phases de caractérisation morphologique de mes capteurs. A ce titre, je remercie également Madame Nathalie COULON de l'IETR.

Ce travail a été réalisé en majorité à l'ENS Rennes au sein du département Mécatronique, c'est pourquoi j'aimerais remercier toutes les personnes qui ont, de près ou de loin, contribué à sa réalisation. Pour ne citer qu'eux : Régis, Yann, Olivier, Philippe, Philippe, Séb Hache, Fabrice, Patrick, Marielle, Georges, Bernard, Martinus, Sébastien, Albin, Christine.

Je voudrais également remercier tous mes amis et collègues, avec qui j'ai passé de très bons moments pendant toute la durée de ce travail, que ce soit dans le cadre professionnel ou à titre personnel et qui m'ont permis de pleinement m'épanouir durant cette tâche. Je pense ainsi à Antoine [Muller 2017], Melaine [Desvaux 2017], Clyde [Midelet 2017], Amaury [Dalla Monta 2017], Aurélie, Régis, Mathieu, Fabienne ou encore Isabelle.

Je remercie également ma famille, mes parents, pour m'avoir fait partager leur joie de vivre et de m'avoir soutenu dans mes efforts pendant ces trois dernières années.

Enfin, je tiens à remercier Maïté pour m'avoir accompagné, soutenu et surtout supporté dans les bons moments comme dans les moments plus difficiles...et je pense en particulier à la phase de rédaction. Merci !

Table des matières

REMERCIEMENTS.....	3
TABLE DES MATIERES	5
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	7
GLOSSAIRE.....	15
INTRODUCTION.....	17
CHAPITRE I : LA MALADIE D'ALZHEIMER : VERS UNE DETECTION PRECOCE 21	
I.1 INTRODUCTION.....	22
I.2 MECANISME INITIAL DES MALADIES CONFORMATIONNELLES	25
I.3 MATIERE MOLLE ET TECHNIQUES DE CARACTERISATION ASSOCIEES	26
I.4 SYSTEMES INSTRUMENTAUX ASSOCIES A LA DETECTION DE LA MALADIE D'ALZHEIMER ET AU SUIVI DE POLYMERISATION DE PROTEINES.....	28
I.4.1 Détection de la maladie d'Alzheimer	29
I.4.2 Suivi de polymérisation	30
I.5 RHEOLOGIE ET GRANDEURS PHYSIQUES	38
I.6 ECHELLE D'INVESTIGATION ET MICRO-RHEOLOGIE	38
I.7 CONCLUSION	44
I.8 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	45
CHAPITRE II : CONCEPTION ET FABRICATION DE TRANSDUCTEURS TSM 49	
II.1 CONCEPTION DU CAPTEUR TSM A UNE ELECTRODE.....	50
II.1.1 Caractérisation de la composition chimique.....	52
II.1.2 Caractérisation électrochimique	53
II.1.3 Caractérisation morphologique.....	57
II.1.4 Caractérisation physico-chimique : énergies d'activation.....	60
II.1.5 Caractérisation de la propagation de l'onde acoustique	62
II.2 OPTIMISATION DU DESIGN POUR UN CAPTEUR A UNE ELECTRODE	65
II.2.1 Intérêt et paramètres optimisés	65
II.2.2 Résultats de l'optimisation	66
II.2.3 Caractérisation du capteur optimisé	69
II.3 DEVELOPPEMENT D'UN CAPTEUR MULTI-ELECTRODES	75
II.3.1 Etat de l'art et design d'un capteur TSM multi-électrodes.....	76
II.3.2 Développement d'un capteur multi-électrodes.....	78
II.4 CONCLUSION	92
II.5 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	93
CHAPITRE III : SUIVI DE POLYMERISATION DE PROTEINES AVEC UN CAPTEUR UNE ELECTRODE	95
III.1 SUIVI DE LA POLYMERISATION DE LA PROTEINE TAU.....	96
III.1.1 Le peptide VQIVYK	96
III.1.2 Suivi des paramètres viscoélastiques du peptide VQIVYK à 22°C.....	97
III.1.3 Effet de la température sur la cinétique de polymérisation.....	104
III.1.4 Effet de la salinité du tampon sur la polymérisation.....	106
III.2 SUIVI DE POLYMERISATION DU PEPTIDE A β	108
III.2.1 Mécanismes d'agrégation du peptide A β	108
III.2.2 Suivi rhéologique de la polymérisation du peptide A β	110

III.3	DETECTION EN MILIEU COMPLEXE	112
III.3.1	<i>Milieux physiologiques pour les biomarqueurs.....</i>	<i>113</i>
III.3.2	<i>Sensibilité du capteur aux caractéristiques du milieu</i>	<i>114</i>
III.4	DETECTION AVEC LE TRANSDUCTEUR A TROIS ELECTRODES	117
III.5	CONCLUSION	119
III.6	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	120
CONCLUSION GENERALE		123
ANNEXE A		127
A.1	DIAGNOSTIC ACTUEL DE LA PATHOLOGIE.....	127
A.1.1	<i>Critères DSM-IV-TR.....</i>	<i>127</i>
A.1.2	<i>Critères NINCDS-ADRDA.....</i>	<i>129</i>
A.2	EVALUATION DE LA MALADIE :.....	130
A.2.1	<i>Evaluation clinique de la maladie d'Alzheimer.....</i>	<i>130</i>
A.2.2	<i>Evaluation paraclinique de la maladie.....</i>	<i>132</i>
A.3	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	132
ANNEXE B		134
B.1	MICRO-RHEOLOGIE	134
B.1.1	<i>Modélisation des fluides viscoélastiques, lien entre contrainte et déformation</i>	<i>134</i>
B.1.2	<i>Module complexe de cisaillement.....</i>	<i>137</i>
B.2	PRINCIPE DE MESURE DU MICRORHEOMETRE	137
B.2.1	<i>Instrumentation.....</i>	<i>137</i>
B.2.2	<i>Modélisation des interactions entre le capteur et le matériau</i>	<i>139</i>
B.2.3	<i>De la mesure de l'impédance du quartz aux paramètres viscoélastiques</i>	<i>142</i>
ANNEXE C		144
C.1	ORIGINE DES DEGENERESCENCES NEUROFIBRILLAIRE	144
C.1.1	<i>Structure de la protéine tau.....</i>	<i>144</i>
C.1.2	<i>Agrégation de la protéine tau</i>	<i>145</i>
C.2	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	147
ANNEXE D		149
D.1	PROCEDE DE FABRICATION	149
D.1.1	<i>Environnement de travail</i>	<i>149</i>
D.1.2	<i>Fabrication</i>	<i>149</i>

Table des illustrations

FIGURE I-1. COUPE DE LA PARTIE SUPERIEURE DU CORTEX, METTANT EN AVANT LA PRESENCE DE PLAQUES (EN NOIR) DANS LE CORTEX CEREBRAL (EN GRIS) [1].	22
FIGURE I-2. COUPE HISTOLOGIQUE DU CERVEAU. A GAUCHE CERVEAU SAIN, A DROITE, CERVEAU ATTEINT PAR LA MALADIE D'ALZHEIMER [ALZHEIMER'S ASSOCIATION].	23
FIGURE I-3. A GAUCHE, ACCUMULATION EXTRACELLULAIRE DU PEPTIDE AB. A DROITE, DEGENERESCENCE NEUROFIBRILLAIRE ISSUE DE LA PROTEINE TAU.	24
FIGURE I-4 : STRUCTURE 3D D'UNE FIBRILLE. (A ET B) DIAGRAMMES EN FORME DE RUBAN DE LA STRUCTURE DE NOYAU DES RESIDUS 17 A 42 ILLUSTRANT LA NATURE INTERMOLECULAIRE DES INTERACTIONS INTER-VOIES. LES MOLECULES INDIVIDUELLES SONT COLOREES. PAR EXEMPLE, LE MONOMERE A L'EXTREMITE IMPAIRE EST REPRESENTÉ EN CYAN. LES CHAINES SONT INDIQUEES PAR DES FLECHES, LA STRUCTURE SECONDAIRE NON REGULIERE EST INDIQUEE PAR DES LIGNES. DANS B, LES LIAISONS INTERMOLECULAIRES ENTRE RESIDUS (ICI D23 ET K28) SONT INDIQUEES PAR DES LIGNES EN POINTILLES, ET LES LIAISONS FORMEES PAR LA MOLECULE CENTRALE SONT MISES EN EVIDENCE PAR DES RECTANGLES. (C) LA POLARITE DE SURFACE DE CONTACT DE VAN DER WAALS ET LE DIAGRAMME DE RUBAN A L'EXTREMITE IMPAIRE DU PROTOFILAMENT COMPRENANT LES RESIDUS 17-42. LES FEUILLETS SONT INDIQUEES PAR DES FLECHES CYAN ET LA STRUCTURE SECONDAIRE NON REGULIERE EST INDIQUEE PAR DES LIGNES GRISES. LES CHAINES LATERALES D'ACIDE AMINE HYDROPHOBES, POLAIRES, CHARGEES NEGATIVEMENT ET POSITIVEMENT SONT REPRESENTÉES RESPECTIVEMENT EN JAUNE, VERT, ROUGE ET BLEU. LES PLAQUES SUPERFICIELLES POSITIVEMENT ET NEGATIVEMENT CHARGEES SONT REPRESENTÉES RESPECTIVEMENT EN BLEU ET ROUGE, ET TOUTES LES AUTRES SONT REPRESENTÉES EN BLANC. (D) SIMULATION SUPERIEURE D'UNE FIBRINE CONSTITUEE DE QUATRE PROTOFILAMENTS COLORES INDIVIDUELLEMENT AVEC UNE RESOLUTION DE 2 NM. POUR FAIRE CORRESPONDRE LA TORSION EXPERIMENTALE DU PROTOFILAMENT DE LA FIBRILLE MONTREE DANS E, UN ANGLE DE TORSION DE 0,45 ° PAR MOLECULE A ÉTÉ SIMULÉ. (E) DEUX EXEMPLES DE MICRO-IMAGERIE CRYO-ELECTRONIQUE DE FIBRILLES (BARRE D'ECHELLE, 50 NM) [18].	26
FIGURE I-5. MICROSTRUCTURES DES MATERIAUX COMPLEXES DE LA FAMILLE DES MATIERES MOLLES. A - FIBRES AMYLOÏDES ; B - MOUSSE ELASTOMERE; C - GEL COLLOÏDAL; D - EMULSION D'HUILE DANS DE L'EAU.	27
FIGURE I-6. SCHEMATISATION DES TECHNIQUES DE DOSAGE IMMUNO-ENZYMATIQUE ELISA [35].	29
FIGURE I-7. SCHEMA DE PRINCIPE DU SUIVI DE L'AGREGATION DU PEPTIDE AB42 PAR SPR GRACE A UNE SURFACE FONCTIONNALISEE DE DEXTRANE [43].	31
FIGURE I-8. VARIATION DE L'ANGLE DE REFRACTION OBTENU LORS DU SUIVI DE POLYMERISATION, EN GRIS SUIVI SANS FONCTIONNALISATION DE SURFACE, EN NOIR, SUIVI AVEC SURFACE FONCTIONNALISEE. CORRELATION PAR DES MICROGRAPHIES AFM.....	32
FIGURE I-9. SCHEMA DE PRINCIPE D'UN BIOCAPTEUR THERMIQUE [44].	33
FIGURE I-10. DETECTION AVEC DES MICROPOUTRES D'AGREGATS AMYLOÏDES A PARTIR DE SOLUTIONS D'INSULINE D'ORIGINE [50].	34

FIGURE I-11, UTILISATION DE CAPTEUR A ONDES ACOUSTIQUES DE SURFACE POUR LA DETECTION D'ESPECES BIOLOGIQUES. A GAUCHE, UN SCHEMA DE PRINCIPE D'UN CAPTEUR SAW EST PRESENTE. A DROITE, SUIVI DE LA VARIATION DE FREQUENCE LORS DE L'ACCROCHE DE PROTEINES A LA SURFACE DU RESONATEUR SAW FONCTIONNALISE PAR UNE COUCHE D'AMINODEXTRANE [54].	35
FIGURE I-12. CAPTEURS A ONDES TRANSVERSES HORIZONTALES. A GAUCHE, SCHEMA DE PRINCIPE D'UN CAPTEUR SH-SAW SERVANT A LA DETECTION DE L'HYBRIDATION DE BRINS D'ADN SUR UNE SURFACE D'OR METALLISEE. A DROITE, SUIVI FREQUENTIEL DU CAPTEUR A 5 AJOUTS (A, B, C, D, E) DE BRINS D'ADN [55].	36
FIGURE I-13. A GAUCHE, SCHEMA DE PRINCIPE DU CAPTEUR A ONDES DE LOVE. A DROITE, SUIVI DU COEFFICIENT S_{21} A LA FREQUENCE DE RESONANCE, EN FONCTION DU TEMPS ET DE LA CONCENTRATION EN D-SERINE.[56].	36
FIGURE I-14, A GAUCHE, SCHEMA DE PRINCIPE D'UN CAPTEUR A ONDES DE VOLUME POUR LE SUIVI DE POLYMERISATION DE PROTEINES. A DROITE, COMPARAISON DE LA REPONSE EN FREQUENCE DU CAPTEUR LORS DE L'INJECTION DE PROTEINE A SA SURFACE AVEC UN CAPTEUR FONCTIONNALISE (COURBE BLEUE) ET UN CAPTEUR NON FONCTIONNALISE (COURBE VERTE).	37
FIGURE I-15, MICROGRAPHIES AFM DE L'AGREGATION DE LA PROTEINE TAU A DIFFERENTES CONCENTRATIONS, 30 μ M, 60 μ M, 120 μ M, 240 μ M ET 480 μ M. MICROGRAPHIES REALISEES AU LBPA PAR CLAUDE NOGUES.	39
FIGURE I-16, SYNOPTIQUE DE LA CHAINE D'INSTRUMENTATION DU MICRORHEOMETRE.	41
FIGURE I-17, MESURES DES IMPEDANCES COMPLEXES OBTENUES A PARTIR DE L'ANALYSEUR DE RESEAU. EN ROUGE, SIGNAL MESURE D'UN CAPTEUR VIDE. EN BLEU, IMPEDANCE COMPLEXE ATTENUÉE APRES LA CHARGE DU CAPTEUR.	42
FIGURE I-18. ADMITTANCE DU QUARTZ DANS LE PLAN COMPLEXE CHARGE AVEC DES DEPOTS DE 200 μ L DE SOLUTION D'EAU/GLYCEROL A DIFFERENTS POURCENTAGES MASSIQUES DE GLYCEROL AUTOUR DE LA RESONANCE (6 MHz).	43
FIGURE II-1, A GAUCHE, SCHEMA DE PRINCIPE DU CAPTEUR A ONDES ACOUSTIQUES, A DROITE, IMAGES DE LA FACE SUPERIEURE ET ANTERIEURE DU CAPTEUR A ONDES ACOUSTIQUES....	51
FIGURE II-2, PHOTO D'UN CAPTEUR A UNE ELECTRODE SUR UN SUBSTRAT DE QUARTZ PIEZOELECTRIQUE COUPE AT (14 MM DE DIAMETRE, 270 μ M D'ÉPAISSEUR, SURFACE DE L'ELECTRODE 30 MM ²).	51
FIGURE II-3, MICROGRAPHIE MEB, OBSERVATION DE LA COUCHE SUPERIEURE D'OR DU SUBSTRAT METALLISE.	52
FIGURE II-4, SPECTRE RX DE LA COUCHE D'OR DE L'ECHANTILLON CARACTERISE.	52
FIGURE II-5, SCHEMA DU DISPOSITIF EXPERIMENTAL POUR LES MESURES DE VOLTAMMETRIE CYCLIQUE.	53
FIGURE II-6, SIGNAL DE L'ELECTRODE EN OR (ELECTRODE DE TRAVAIL) OBTENU PAR VOLTAMMETRIE CYCLIQUE (BALAYAGE DE POTENTIEL ENTRE - 1 V ET 1,5 V, VITESSE DE BALAYAGE 100 mV.s ⁻¹).	54
FIGURE II-7, SIGNAUX DE L'OR SUIVANT LE PROCESSUS DE METALLISATION. EN BLEU, LE SIGNAL POUR L'ECHANTILLON OBTENU PAR EVAPORATION, ET EN ROUGE LE SIGNAL OBTENU PAR PULVERISATION (BALAYAGE DE POTENTIEL ENTRE -1 ET 1,5 V, VITESSE DE BALAYAGE 100 mV.s ⁻¹).	55
FIGURE II-8, SIGNAL DE L'OR EN FONCTION DE L'ÉPAISSEUR ET LA SURFACE DE L'ELECTRODE. A GAUCHE, SIGNAUX EN FONCTION DE L'ÉPAISSEUR D'OR, A DROITE, SIGNAUX DE L'OR EN FONCTION DE LA SURFACE DES ELECTRODES (BALAYAGE DE POTENTIEL ENTRE -1 ET 1,5 V, VITESSE DE BALAYAGE DE 100 mV.s ⁻¹).	56
FIGURE II-9, INFLUENCE DE VITESSE DE BALAYAGE SUR UNE ELECTRODE D'OR RONDE DE 30 MM ² DE SURFACE. A GAUCHE, VOLTAMPEROGRAMME EN FONCTION DE LA VITESSE DE	

BALAYAGE. A DROITE, VARIATION DE L'INTENSITE IPIC EN FONCTION DE LA VITESSE DE BALAYAGE.....	57
FIGURE II-10, EFFET DES PLASMAS ARGON ET OXYGENE SUR LA TOPOLOGIE DE SURFACE DE QUARTZ METALLISES AVEC DES COUCHES Ti/AU.....	59
FIGURE II-11, EFFET DU PLASMA OXYGENE SUR LA SURFACE DE L'ECHANTILLON EN FONCTION DU TEMPS ET DE LA PUISSANCE DU TRAITEMENT DE SURFACE.	59
FIGURE II-12. VARIATION DE L'ENERGIE DE SURFACE EN FONCTION DE LA DUREE DE TRAITEMENT SUR TRANSDUCTEUR PIEZOELECTRIQUE POUR DES TRAITEMENTS DE SURFACE PAR PLASMA O ₂ A 30 ET 60 W ET PAR PLASMA AIR.....	61
FIGURE II-13. REPARTITION DES ENERGIES POUR UN TRAITEMENT DE SURFACE AU PLASMA OXYGENE A 60 W.....	62
FIGURE II-14, A GAUCHE, SCHEMA DU BANC DE VIBROMETRIE LASER. A DROITE, PHOTOGRAPHIE DU MONTAGE EXPERIMENTAL.....	63
FIGURE II-15, TRAITEMENT DU SIGNAL ASSOCIE LORS DE L'ETUDE DU COMPORTEMENT MECANIQUE DU CAPTEUR EN UTILISANT LA TECHNIQUE DE VIBROMETRIE LASER.....	63
FIGURE II-16, COMPORTEMENT MECANIQUE D'UN CAPTEUR A ONDES ACOUSTIQUES DE VOLUME POSSEDANT DES ELECTRODES ROND, (A) COMPORTEMENT SPATIO-TEMPOREL, (B) COMPORTEMENT SPATIO-FREQUENTIEL ET (C) EVOLUTION DU NOMBRE D'ONDE EN FONCTION DE LA FREQUENCE.	65
FIGURE II-17, A GAUCHE, SCHEMATISATION DE L'ELECTRODE OVALE AVEC SES PARAMETRES. A DROITE, MODELISATION PAR ELEMENTS FINIS DU CAPTEUR.	66
FIGURE II-18, PARTIES REELLE ET IMAGINAIRE EN FONCTION DE LA FREQUENCE POUR UN CAPTEUR VIDE. CHAMP DE DEPLACEMENT DE LA SURFACE DU QUARTZ AUX DIFFERENTES FREQUENCES, (A) 3 ^{EME} HARMONIQUE, (B) ET (C) MODES PARASITES LIES AUX ELECTRODES.	67
FIGURE II-19, OPTIMISATION DU PARAMETRE DELTA_F EN FONCTION DE LA LONGUEUR DE DEMI-GRAND AXE A DE L'ELLIPSE.	68
FIGURE II-20, TRANSDUCTEUR AVEC UNE ELECTRODE DE FORME ELLIPTIQUE. A GAUCHE, ELECTRODE DU DESSUS, A DROITE, ELECTRODE DU DESSOUS ET RETOUR DE PISTE POUR LA PRISE DE CONTACT.....	68
FIGURE II-21, A GAUCHE, PARTIES REELLES DES CAPTEURS EN FONCTION DE LA FREQUENCE POUR LES DESIGNS ROND ET ELLIPTIQUE D'ELECTRODES CHARGEES PAR UNE SOLUTION DE 90% EN MASSE DE GLYCEROL (EN ROUGE, ELECTRODE ELLIPTIQUE ET EN BLEU, ELECTRODE RONDE).A DROITE, PARTIES IMAGINAIRES DES CAPTEURS EN FONCTION DE LA FREQUENCE POUR DIFFERENTS DESIGNS D'ELECTRODE CHARGE PAR UNE SOLUTION DE 90% EN MASSE DE GLYCEROL (EN ROUGE, ELECTRODE ELLIPTIQUE ET EN BLEU, ELECTRODE RONDE).....	69
FIGURE II-22, A GAUCHE, SUIVI FREQUENTIEL DE L'ALTERNANCE DE DEPOTS/RETRAITS DE SOLUTION D'EAU DE DIFFERENTS VOLUMES. A DROITE, VARIATION DE FREQUENCE AVANT ET APRES DEPOT DE SOLUTION DE DIFFERENTS VOLUMES SUR LE CAPTEUR.	70
FIGURE II-23, MODULE VISQUEUX DE SOLUTIONS D'EAU / GLYCEROL A DIFFERENTS POURCENTAGE MASSIQUE D'EAU.	71
FIGURE II-24, A GAUCHE, MODULE VISQUEUX EN FONCTION DU POURCENTAGE MASSIQUE EN EAU DES SOLUTIONS. A DROITE, MODULE VISQUEUX PRATIQUE EN FONCTION DES VALEURS DE MODULE VISQUEUX DE LA LITTERATURE A DIFFERENTES TEMPERATURES ET DIFFERENTES SOLUTIONS D'EAU / GLYCEROL.	72
FIGURE II-25, COMPARAISON ENTRE LES VALEURS DE MODULES VISQUEUX DES TRANSDUCTEURS A ELECTRODE ELLIPTIQUE ET DES VALEURS THEORIQUES POUR DIFFERENTES SOLUTIONS D'EAU/GLYCEROL A UNE TEMPERATURE DE 25°C.	73
FIGURE II-26, VARIATION DE LA PARTIE REELLE ET IMAGINAIRE DU CAPTEUR NU EN FONCTION DE LA TEMPERATURE.	73

FIGURE II-27, DEPENDANCE DE L'ANGLE DE COUPE SUR LES COURBES FREQUENCE-TEMPERATURE DES QUARTZ EN COUPE AT. LA COUPE AT (ANGLE AUTOUR DE 35°10) PERMET DE GENERER DES ONDES DE CISAILLEMENT ET OFFRE LA MEILLEURE STABILITE EN FREQUENCE DANS UNE GAMME DE TEMPERATURE DE 0 A 50°C, REPRESENTEE EN ROUGE SUR LA FIGURE).	74
FIGURE II-28, MODULES VISQUEUX : RESULTATS OBTENUS A L'AIDE DU CAPTEUR COMMERCIAL Q-SENSE, DU CAPTEUR OPTIMISE COMPAREE AUX VALEURS DE LA LITTERATURE POUR DIFFERENTES SOLUTIONS D'EAU/GLYCEROL.	75
FIGURE II-29, A GAUCHE, PHOTOGRAPHIE D'UN MONTAGE MICRO FLUIDIQUE MULTI-QCM. A DROITE, VUE D'ENSEMBLE DU SYSTEME MONTE [84].	76
FIGURE II-30, A GAUCHE, SUIVI FREQUENTIEL DES MICROBALANCES LORS DU DEPOT D'UNE SOLUTION DE PBS. A DROITE, PHOTOGRAPHIES MONTRANT L'INJECTION DU TAMPON DANS LA CELLULE, AVEC (I) INJECTION DANS LE SYSTEME, (II) INJECTION SUR LA PREMIERE QCM, (III) INJECTION SUR LA DEUXIEME QCM ET (IV) INJECTION SUR LA DERNIERE QCM.	77
FIGURE II-31, A GAUCHE, SCHEMA DE PRINCIPE D'UN CAPTEUR MQCM. A DROITE, MESURE DE LA CONDUCTANCE AVANT ET APRES DEPOT SUR LA MICROBALANCE 1 [85].	77
FIGURE II-32, DESIGN DE CAPTEUR 3 ELECTRODES.	78
FIGURE II-33, SUIVI SPATIO-TEMPOREL DE LA PROPAGATION DES ONDES DANS LE CAPTEUR MUTLI-ELECTRODES NON OPTIMISE.	79
FIGURE II-34, IMAGES DES SIGNAUX SPATIO-FREQUENTIEL EN BASSE FREQUENCE.	80
FIGURE II-35, IMAGES DES SIGNAUX NOMBRE DE L'ONDE-FREQUENTIELS EN FONCTION DE LA FREQUENCE.	80
FIGURE II-36, A GAUCHE, COURBE DE DISPERSION THEORIQUE DU QUARTZ, A DROITE, COURBE DE DISPERSION EXPERIMENTALE POUR LE QUARTZ MULTI-ELECTRODES CARACTERISE.	81
FIGURE II-37, SCHEMA DES ELECTRODES COMPOSANT LE CAPTEUR MULTI-ELECTRODES.	81
FIGURE II-38, CONFIGURATION OPTIMISEE DES CAPTEURS MULTI-ELECTRODES EN FONCTION DES EPAISSEURS DES ELECTRODES DE GAUCHE, DU MILIEU ET DE DROITE.	82
FIGURE II-39, SCHEMA DES GRANDES ETAPES DU PROCESSUS DE FABRICATION POUR LA CREATION DE L'ELECTRODE SUR LA FACE RECTO. (A) ELECTRODE E1 ET CONNECTIQUES, (B) FABRICATION DE L'ELECTRODE E2, (C) FABRICATION DE L'ELECTRODE E3.	83
FIGURE II-40, A GAUCHE, PROCEDE DE FABRICATION DE LA PREMIERE ELECTRODE DE LA FACE RECTO DU CAPTEUR. A DROITE, CONTROLE PROFILOMETRIQUE DE L'EPAISSEUR DE L'ELECTRODE CREEE.	83
FIGURE II-41, A GAUCHE, PROTOCOLE EXPERIMENTALE POUR L'OBTENTION DE LA DEUXIEME ELECTRODE D'EPAISSEUR E2 DE LA FACE RECTO DU CAPTEUR. A DROITE, RELEVÉ PROFILOMETRIQUE POUR LE CONTROLE DE L'EPAISSEUR DE L'ELECTRODE FABRIQUEE.	85
FIGURE II-42, A GAUCHE, FABRICATION DE L'ELECTRODE E3 DE L'ELECTRODE DE LA FACE RECTO DU CAPTEUR. A DROITE, RELEVÉ PROFILOMETRIQUE POUR LE CONTROLE DE L'EPAISSEUR DE L'ELECTRODE FABRIQUEE.	85
FIGURE II-43, A GAUCHE, PROCEDE DE FABRICATION DE L'ELECTRODE VERSO ET DES CONNECTIQUES.	86
FIGURE II-44, A GAUCHE, PHOTOGRAPHIE DU CAPTEUR OBTENU, AU MILIEU ET A DROITE, ANALYSE PROFILOMETRIQUE 3D.	86
FIGURE II-45, SPECTRE FREQUENTIEL POUR LE CAPTEUR MULTI-ELECTRODES A VIDE.	87
FIGURE II-46, A GAUCHE, REPETABILITE DES MESURES A VIDE DU CAPTEUR MULTI-ELECTRODES. A DROITE, REPETABILITES DES MESURES APRES DES DEPOTS D'EAU A LA SURFACE DU CAPTEUR MULTI-ELECTRODES.	87
FIGURE II-47, VARIATIONS DES FREQUENCES DE RESONANCE DES TROIS PICS POUR DES DEPOTS DE SOLUTIONS D'EAU ET DE GLYCEROL.	88

FIGURE II-48, EFFET DU DEPOT DE SOLUTION D'EAU / GLYCEROL A 70%M DE GLYCEROL SUR LES DIFFERENTES ELECTRODES DU CAPTEUR MULTI-ELECTRODES	89
FIGURE II-49, PARTIE REELLE ET IMAGINAIRE DE L'IMPEDANCE DU CAPTEUR MULTI-ELECTRODES POUR DIFFERENTS CHARGEMENTS A SA SURFACE. EN ROUGE, MESURE A VIDE, EN BLEU, MESURE A L'EAU ET EN VERT MESURE D'UNE SOLUTION D'EAU / GLYCEROL A 60%M.....	90
FIGURE II-50, COMPARAISON DU MODULE VISQUEUX PRATIQUE OBTENU EN FONCTION DU MODULE VISQUEUX ISSU DE LA LITTERATURE DE DIFFERENTES SOLUTIONS D'EAU / GLYCEROL, EN FONCTION DU POURCENTAGE MASSIQUE D'EAU.	91
FIGURE III-1, MODELE DU PROCESSUS DE L'AGREGATION DU PEPTIDE VQIVYK.....	97
FIGURE III-2, SUIVI TEMPOREL DE L'IMPEDANCE DU QUARTZ (PARAMETRES R_C ET X_C) EN FONCTION DU DEPOT. DE 0 A 140 MIN, DEPOT DE 200 μ L D'EAU, DE 140 A 250 MIN DEPOT DE 200 μ L DE MOPS ET DE 250 A 400 MIN DEPOT DE LA SOLUTION PROTEIQUE.....	99
FIGURE III-3, MODULE ELASTIQUE G' DU PEPTIDE VQIVYK, EN FONCTION DU TEMPS ET PARAMETRE PAR LA CONCENTRATION DU PEPTIDE POUR UNE TEMPERATURE DE $T=22^\circ\text{C}$	100
FIGURE III-4, MODULE ELASTIQUE DES SOLUTIONS DE PEPTIDE EN FONCTION DE LEUR CONCENTRATION. REGRESSION REALISEE A PARTIR D'UNE SIGMOÏDE D'ASYMPTOTES $G' = 0$ ET LE $G' = G'$ (CONCENTRATION EXPERIMENTALE MAXIMALE).	100
FIGURE III-5, SUIVI CINETIQUE DE DU MODULE VISQUEUX DES SOLUTIONS PEPTIDIQUES (τ) EN FONCTION DU TEMPS ET DE LA CONCENTRATION PEPTIDIQUE ET DU TEMPS.	101
FIGURE III-6, MODELE DE CINETIQUE DE LA POLYMERISATION DE LA PROTEINE τ	102
FIGURE III-7, SCHEMA DE PRINCIPE DU SPECTROPHOTOMETRE DOUBLE FAISCEAU.	103
FIGURE III-8, SPECTRES D'ABSORBANCES 200-500 NM DE SOLUTIONS DE PROTEINE τ A DIFFERENTES CONCENTRATIONS.....	103
FIGURE III-9, MODULES VISQUEUX DES SOLUTIONS DE PEPTIDE VQIVYK A DIFFERENTES CONCENTRATIONS ET A DES TEMPERATURES DE 22 ET 37°C	105
FIGURE III-10, ELASTICITE MOYENNE DES SOLUTIONS DE PEPTIDE VQIVYK A DIFFERENTES CONCENTRATIONS POUR DEUX TEMPERATURES EXPERIMENTALES. REGRESSION REALISEE A PARTIR D'UNE SIGMOÏDE D'ASYMPTOTES $G' = 0$ ET LE $G' = G'$ (CONCENTRATION EXPERIMENTALE MAXIMALE).	105
FIGURE III-11, SUIVI CINETIQUE DES PARAMETRES VISCOELASTIQUES LORS DE LA POLYMERISATION DU PEPTIDE VQIVYK EN FONCTION DE DIFFERENTES SOLUTIONS DE TAMPON DE POLYMERISATION.	107
FIGURE III-12. SCHEMATISATION DE LA VOIE « NON-AMYLOÏDOGENIQUE » ET DE LA VOIE « AMYLOÏDOGENIQUE » A PARTIR DE LA GLYCOPROTEINE TRANSMEMBRANAIRE APP. ...	109
FIGURE III-13, HYPOTHESE DE LA CASCADE AMYLOÏDE [102].	110
FIGURE III-14, SUIVI CINETIQUE DU MODULE ELASTIQUE EN FONCTION DU TEMPS ET DE LA CONCENTRATION EN PEPTIDE $A\beta$	111
FIGURE III-15, SUIVI DE DU MODULE VISQUEUX DU PEPTIDE $A\beta$ EN FONCTION DU TEMPS ET DE LA CONCENTRATION EN PEPTIDE $A\beta$	112
FIGURE III-16, POSITIONNEMENT DU LCR DANS LE CERVEAU (ZONE BLEUE SUR LA COUPE) ET SENS DE CIRCULATION DE CE MILIEU COMPLEXE [109].....	113
FIGURE III-17, VARIATION DU MODULE ELASTIQUE (A GAUCHE) ET DU MODULE VISQUEUX (A DROITE) MOYENNE EN FONCTION DU POURCENTAGE DE HSA EN SOLUTION.....	115
FIGURE III-18, A GAUCHE, VARIATION DU MODULE ELASTIQUE MOYENNE DU SERUM BSA SUIVANT DIFFERENTES CONCENTRATIONS, A DROITE, VARIATION DE DU MODULE VISQUEUX DE DIFFERENTES SOLUTIONS DE SERUM BSA.	115

FIGURE III-19, A GAUCHE, SUIVI DU MODULE VISQUEUX EN FONCTION DES SOLUTIONS PROTEIQUES AU COURS DU TEMPS. A DROITE, MODULES VISQUEUX POUR LES DIFFERENTES SOLUTIONS.	116
FIGURE III-20, A GAUCHE, SUIVI DU MODULE VISQUEUX AU COURS DU TEMPS POUR LES DIFFERENTS DEPOTS DE SOLUTION DE PROTEINES TAU A LA SURFACE DES ELECTRODES. A DROITE, MODULE VISQUEUX G'' DES DIFFERENTES SOLUTIONS.	117
FIGURE III-21, PROCEDE EXPERIMENTAL DE DETECTION DE SOLUTIONS PROTEIQUES AVEC LE CAPTEUR MULTI-ELECTRODES.	118
FIGURE A-1, CRITERES DSM-IV-TR POUR LA DETERMINATION DE L'ETAT DEMENTIEL DU PATIENT.	129
FIGURE A-2, CRITERES NINCDS-ADRDA.	130
FIGURE B-3, MODELE MECANIQUE DE MAXWELL D'UN MATERIAU VISCOELASTIQUE ISOTROPE, CONSTITUE DE N BRANCHES DE MAXWELL EN PARALLELE.	135
FIGURE B-4, REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU MATERIAU DANS LE DOMAINE TEMPOREL..	136
FIGURE B-5, REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU MATERIAU VISCOELASTIQUE A CARACTERISER DANS LE DOMAINE SPECTRAL EN FONCTION DU MODULE COMPLEXE DE CISAILLEMENT. .	137
FIGURE B-6, CHAINE D'INSTRUMENTATION DU MICRORHEOMETRE.	138
FIGURE B-7, MESURE DE L'ADMITTANCE Y_e DU CAPTEUR LORS DE LA FORMATION D'UN YAOURT A PARTIR DE LAIT ACIDIFIE.	139
FIGURE B-8, MODELISATION ELECTRIQUE DU RESONATEUR TSM UTILISE DANS L'ETUDE.	140
FIGURE B-9, EFFET D'INERTIE LIEE AUX ASPERITES DANS LE CAS DES FLUIDES.	141
FIGURE B-10, SUIVI DES PARAMETRES R_{LOAD} ET X_{LOAD} A 6MHZ POUR UN LAIT LORS DE LA FORMATION DE YAOURT A $[GDL] = 26G.L^{-1}$, AVEC $[GDL]$ LA CONCENTRATION MOLAIRES EN GLUCONO- Δ -LACTONE.	143
FIGURE B-11, SUIVI DES PARAMETRES VISCOELASTIQUES G' (MODULE ELASTIQUE) ET G'' (MODULE VISQUEUX) LORS DE LA FORMATION D'UN YAOURT A PARTIR D'UN LAIT ACIDIFIE A 6MHZ.	143
FIGURE C-12. REPRESENTATION DES MICROTUBULES FIXES PAR LES PROTEINES TAU 3R (A GAUCHE) ET 4R (A DROITE).	144
FIGURE C-13, LISTES DES PRINCIPALES TAUOPATHIES.[118].....	145
FIGURE C-14, GENERATION DES DEGENERESCENCES NEURO-FIBRILLAIRES AVEC LA DEGRADATION DES PROTEINES TAU.	146
FIGURE C-15, PRODUCTION DES NFT A PARTIR DES FRAGMENTS DE PROTEINES TAU HYPERPHOSPHORYLES.	146
FIGURE D-16, CLASSIFICATION PARTICULIERE DE L'AIR EN SALLE BLANCHE SUIVANT LA NORME ISO 14644-1.	149
FIGURE D-17, A GAUCHE, BATI D'EVAPORATION PAR EFFET JOULE, A DROITE, VUE INTERIEUR DU BATI D'EVAPORATION.....	151
FIGURE D-18, A GAUCHE, VUE D'ENSEMBLE DU BATI DE PULVERISATION CATHODIQUE, A DROITE, DEPOT DE METAL A PARTIR DU BOMBARDEMENT D'UNE CIBLE METALLIQUE PAR PLASMA.	151
FIGURE D-19, ABAQUES DONNANT L'EPAISSEUR DE TITANE ET D'OR DEPOSE EN FONCTION DU TEMPS DE DEPOT.....	152
FIGURE D-20, SUBSTRAT DE QUARTZ (EN BLEU) METALLISE D'UNE COUCHE DE TI DE 30 NM D'EPAISSEUR (EN GRIS), ET D'UNE COUCHE D'OR DE 200 NM D'EPAISSEUR (EN JAUNE)...	152
FIGURE D-21, PRINCIPE DE LA PHOTOLITHOGRAPHIE.	153
FIGURE D-22, EFFET DE LA GRAVURE HUMIDE.....	154
FIGURE D-23, EFFETS DE LA GRAVURE SECHE.....	154
FIGURE D-24, GRAVURE DES COUCHES METALLIQUES ET NETTOYAGE DE SURFACE.	155

FIGURE D-25, EN HAUT, PROTOCOLE DE FABRICATION DE L'ELECTRODE ANTERIEURE, ET DU RETOUR DE PISTE. EN BAS, CAPTEUR FINAL OBTENU.....	156
---	-----

Glossaire

A : Absorbance
AFM : Atomic Force Microscope
 $A\beta 42$: peptide bêta-Amyloïde
BAW : Bulk Acoustic Wave
BSA : Bovin Serum Albumin
 C_{Caf} : Concentration d'assemblage final.
 C_{CAi} : Concentration critique d'assemblage.
 C_{CN} : Concentration critique de nucléation.
 Δf : Variation de fréquence entre de pic de résonance
DSM IV-TR : Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders Revision 4.
ELISA : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
 G^* : Module complexe de cisaillement.
 G' : Module élastique du matériau
 G'' : Module visqueux du matériau
HSA Human Serum Albumin
IDT : Interdigital transducer
LCR : Liquide Céphalo Rachidien
MMSE : Mini Mental State Evaluation.
MOPS : 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid
MQCM : Multichannel Quartz Crystal Microbalance.
NINCDS-ADRDA : National Institute of Neurological and Communication Disorders and Stroke - Alzheimer's Disease and Related Disorders Association.
PBS : Phosphate Buffer Saline
 R_a : Rugosité arithmétique moyenne
RIE : Reactive Ion Etching
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
SAN : Small-Angle X-Ray
SAW : Surface Acoustic Waves
SAX : Small-Angle X-ray
SH : Shear Horizontal
SPR : Surface Plasmon Resonance
 τ : Tubule-Associated Unit.
TEMP : Tomographie à émission monophotonique.
TEP : Tomographie par émission de positons.
TSH : Thyroïdostimuline hypophysaire.
TSM : Thickness Shear Modulus
ULS : Torche à plasma atmosphérique
 β APP : Glycoprotéine transmembranaire.

Introduction

L'amélioration des conditions de vie, qui a permis d'accroître la longévité des êtres humains, a mis en exergue l'apparition de pathologies liées au vieillissement encore jusque-là mal connues. La détermination et la compréhension des mécanismes intervenants dans ces nouvelles maladies constituent de fait un enjeu majeur tant d'un point de vue sociétal que scientifique. Cette thèse participe à l'étude des mécanismes intervenant dans les maladies conformationnelles et plus particulièrement la maladie d'Alzheimer. Ces pathologies résultent d'anomalies structurelles impliquant des protéines. Dans le cas de la maladie d'Alzheimer, c'est principalement la polymérisation des protéines *tau* et des peptides *bêta-Amyloïde* ($A\beta_{42}$) qui influent sur l'évolution de la maladie. La compréhension de ces mécanismes pour un diagnostic de ce type de pathologie est étroitement liée à la mise en œuvre de dispositifs de contrôle performants assurant un suivi in situ, ex-vivo et in vivo de l'auto-assemblage des protéines concernées.

Bien qu'une multitude de techniques expérimentales existent pour la détection d'éléments biologiques à des fins de diagnostic, elles ne permettent pas une caractérisation complète des grandeurs mises en jeu en raison de la complexité de leurs mécanismes d'évolution. Dans bien des cas, seules des informations sur la présence (ou non) des molécules cibles sont investiguées. Pourtant, en vue d'une détection précoce de la maladie voire d'un suivi de son évolution, ces systèmes biocompatibles doivent être sensibles aux interactions de ces analytes avec leur environnement à l'échelle macromoléculaire. Compte tenu des grandeurs physiques prédominantes à cette échelle, le développement d'un outil de détection permettant la détermination des propriétés mécaniques et électriques peut être pertinent. L'intérêt d'une telle technologie multimodale aurait l'avantage de diagnostiquer de façon précoce l'apparition des premiers signes distinctifs de la pathologie.

Pour y parvenir, un savoir-faire pluridisciplinaire propre à l'instrumentation est nécessaire. La mise au point d'un tel instrument s'appuie donc sur l'antériorité du laboratoire dans la mise au point de systèmes micro-rhéologiques à ondes ultrasonores pour l'investigation des matériaux complexes. Ce travail est donc consacré à l'étude d'un système instrumental permettant la détection de la protéine *tau* et du peptide *A β* intervenant dans la maladie d'Alzheimer. Le biocapteur mis au point à cet effet repose sur le suivi micro-rhéologique par ondes ultrasonores hautes fréquences (autour de quelque MHz) de fluides

complexes dans lesquels sont présents les éléments pathogènes tels que le sang ou encore le liquide céphalo-rachidien. Ce capteur est un résonateur piézoélectrique à ondes de volume de cisaillement dont les propriétés de résonance intrinsèques vont varier en fonction des propriétés mécaniques et électriques du fluide en contact. Une mesure par impédancemétrie du couple capteur/matériau investigué, associée à un modèle original de résolution du problème inverse des interactions ondes/fluide, permettent d'extraire les propriétés mécaniques dynamiques du fluide à l'échelle mésoscopique (de quelques dizaines de nanomètres à quelques micromètre). Le suivi du module de cisaillement complexe représentatif de l'élasticité dynamique G' et de la viscosité dynamique apparente du fluide, G'' vise ainsi à suivre les modifications structurelles dues au processus de polymérisation des protéines τ et $A\beta$.

Cette thèse s'articule donc autour de trois parties distinctes. Compte tenu des propriétés intrinsèques complexes des milieux investigués, les contraintes et évolutions structurelles liées à la maladie d'Alzheimer sont dans une première partie introduites. Un état de l'art des capteurs permettant de suivre plus particulièrement le processus de polymérisation de protéines est ensuite présenté. Le principe de mesure et la méthode permettant l'extraction des paramètres viscoélastiques des fluides complexes à caractériser seront explicités. Cette première partie permet in fine de justifier les contours de notre étude, en particulier les innovations instrumentales visées tant par le capteur développé que les grandeurs d'influence visées.

Le deuxième chapitre est donc consacré au développement et à l'optimisation de capteurs spécifiques mono-électrode et multi-électrodes. En effet, outre une forte sensibilité du capteur, une sélectivité des espèces biologiques pertinentes est nécessaire compte tenu du milieu complexe investigué. Ce chapitre détaillera plus particulièrement, les différentes étapes de développement du nouveau système de la conception à la caractérisation des propriétés mécaniques et électriques des transducteurs réalisés. Ce chapitre présentera enfin les travaux effectués concernant le développement d'un capteur multi-électrodes qui doit permettre à terme la détection simultanée des différents analytes biologiques.

Le dernier chapitre démontrera, par une étude in-vitro utilisant un nouveau capteur ultrasonore à une électrode, la capacité de notre système micro-rhéologique à suivre la polymérisation de protéines. Outre l'extraction des paramètres viscoélastiques pour différentes concentrations de solutions protéiques, le suivi des états conformationnels au cours de la polymérisation des protéines sera effectué. Une étude préliminaire du capteur à multi-

électrodes permettra de tracer les perspectives de cette première étude concluante.

Chapitre I : La maladie d'Alzheimer : vers une détection précoce

Sommaire

I.1	INTRODUCTION	22
I.2	MECANISME INITIAL DES MALADIES CONFORMATIONNELLES	25
I.3	MATIERE MOLLE ET TECHNIQUES DE CARACTERISATION ASSOCIEES	26
I.4	SYSTEMES INSTRUMENTAUX ASSOCIES A LA DETECTION DE LA MALADIE D'ALZHEIMER ET AU SUIVI DE POLYMERISATION DE PROTEINES	28
I.4.1	<i>Détection de la maladie d'Alzheimer</i>	29
I.4.2	<i>Suivi de polymérisation</i>	30
I.5	RHEOLOGIE ET GRANDEURS PHYSIQUES	38
I.6	ECHELLE D'INVESTIGATION ET MICRO-RHEOLOGIE	38
I.7	CONCLUSION	44
I.8	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	45

I.1 Introduction

Décrites pour la première fois en 1907 par le Docteur Alois Alzheimer [1], les pertes de mémoires, les démences, ainsi que la perte d'autonomie sont dès lors considérées comme la conséquence d'une pathologie de dégénérescence neurofibrillaire et non plus comme une fatalité du vieillissement normal de l'organisme humain. Le Docteur Alzheimer base ses observations après l'analyse de coupes histologiques mettant en avant la présence de plaques séniles à la surface des neurones et d'amas de plaques dans les neurones. Cette neuropathologie (voir Figure I-1) se caractérise alors par des modifications structurales du cerveau observables à l'œil nu ou au microscope après l'analyse de coupes histologiques *post-mortem*.

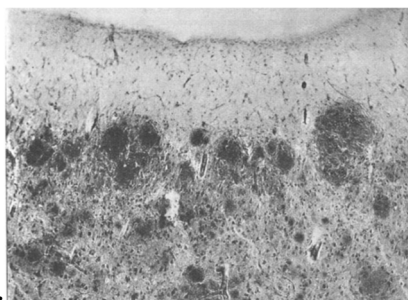


Figure I-1. Coupe de la partie supérieure du Cortex, mettant en avant la présence de plaques (en noir) dans le cortex cérébral (en gris) [1].

Bien que l'origine de la maladie reste difficilement établie, certains critères ont été identifiés comme étant des facteurs à risque au déclenchement de la maladie d'Alzheimer. Le principal facteur à risque est l'âge. Les personnes de 65 ans ont de nos jours 1 chance sur 20 de développer la maladie, au-delà de 85 ans la probabilité de développer la pathologie passe à 1 sur 4 [2]. L'état cardiovasculaire du patient est également un point important [3]. Ainsi, l'hypertension artérielle [4], l'hypercholestérolémie et l'obésité sont des facteurs aggravant. Le diabète de type 2 est aussi un facteur de risque majeur de la maladie d'Alzheimer [5]. Un patient atteint de la maladie d'Alzheimer a en effet des difficultés d'assimilation du glucose, et présente souvent les symptômes d'une personne diabétique. Enfin, les antécédents familiaux, les gènes spécifiques des éléments biologiques pathogènes de la maladie d'Alzheimer [6] et l'état socio-professionnel (niveau d'étude et niveau social) sont des facteurs de risque.

Compte tenu du manque de traitement efficace et de l'allongement de la durée de vie des personnes, cette maladie attire aujourd'hui toutes les attentions. Outre l'enjeu économique,

l'impact sociétal lié à la compréhension scientifique et médicale et de diagnostic précoce de cette maladie est majeur. Si l'on se réfère à une étude menée en 2011, le nombre de personnes atteintes par la maladie d'Alzheimer en France s'élevait à 900 000, avec 225 000 nouveaux malades diagnostiqués par an, soit environ un nouveau cas toutes les trois minutes. En France, la maladie d'Alzheimer représente moins de 2 % des personnes de moins de 65 ans, entre 2 et 4 % des personnes de plus de 65 ans, et le pourcentage de personnes touchées passe à 15 % à partir de 80 ans. Une légère disparité est cependant observée entre les hommes et les femmes, avec respectivement 40 et 60 % de malades déclarés, les femmes ayant une espérance de vie supérieure de 10 ans par rapport à celle des hommes [7]. Avec un taux de survie moyen de 8,5 ans à partir de l'annonce du diagnostic cette maladie est devenue la quatrième cause de mortalité en France derrière les tumeurs, les maladies cardiovasculaires et les accidents [8], et près de 25 millions de personnes touchées dans le monde. De plus ces chiffres devraient quadrupler d'ici à 2020, du fait de l'amélioration des conditions de vie et des techniques de soin, permettant à la population de vivre plus longtemps.

Cependant, grâce aux progrès des outils de diagnostic, il est possible de détecter de façon plus précise et de manière plus précoce la pathologie. Les récentes avancées dans le domaine du diagnostic ont permis par exemple de mettre en évidence et de caractériser les lésions à l'origine de la maladie d'Alzheimer à différentes échelles d'observations.

D'un point de vue macroscopique, il a été montré que le volume et le poids du cerveau diminue, de façon hétérogène, au cours de la maladie. Ces réductions de poids et de volume, visibles à la Figure I-2, sont cependant bien localisées et concentrées au niveau de l'hippocampe, de l'amygdale temporale et du lobe temporal [9].

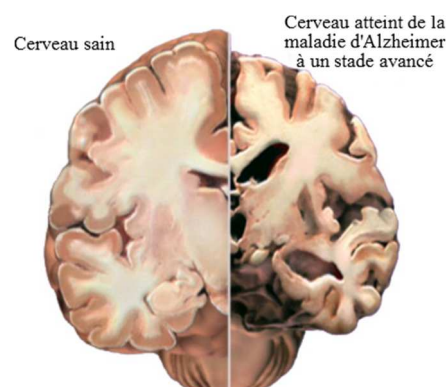


Figure I-2. Coupe histologique du cerveau. À gauche cerveau sain, à droite, cerveau atteint par la maladie d'Alzheimer [Alzheimer's Association].

Au niveau microscopique, le développement des techniques de caractérisation a non seulement permis de visualiser les structures fibrillaires saines (les axones) mais également

les structures fibrillaires anormales (lésions neurofibrillaires) à l'origine de la maladie d'Alzheimer[10], [11]. Ces techniques mettent en évidence la présence de différents types de lésions [12]. Des lésions dites positives qui se caractérisent par l'existence de plaques séniles entraînant des dégénérescences neurofibrillaires. Ces plaques séniles sont caractérisées par l'accumulation extracellulaire ou l'aggrégation et l'enchevêtrement de protéines *tau* et peptide bêta-amyloïde $A\beta$, comme le montre la Figure I-3.

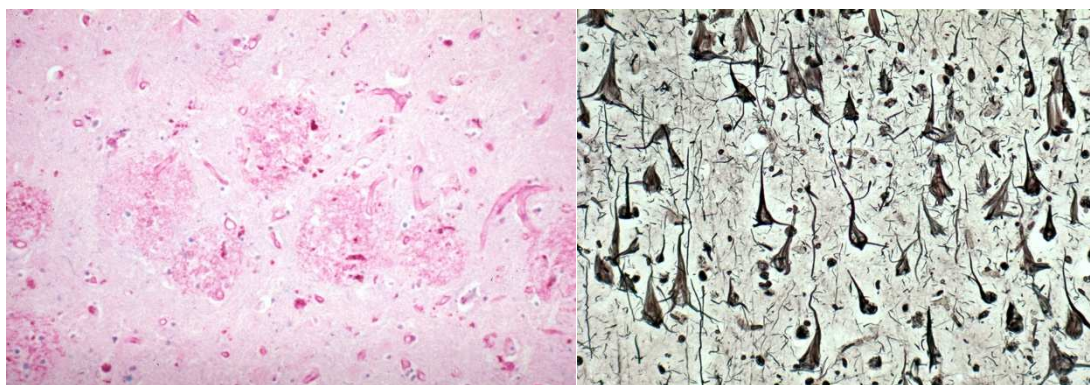


Figure I-3. A gauche, accumulation extracellulaire du peptide $A\beta$. A droite, dégénérescence neurofibrillaire issue de la protéine *tau*.

Ces effets entraînent par ailleurs des lésions dites négatives (conséquences directes des lésions positives) qui se traduisent par la perte des neurones et des liaisons synaptiques. L'enjeu de détection précoce et de compréhension de ces phénomènes biologiques réside alors dans le suivi non destructif de polymérisation de ces deux protéines.

Actuellement, le diagnostic « préclinique », c'est-à-dire sans symptôme, n'est possible que pour les formes génétiques héréditaires (1 % des cas). Afin de diagnostiquer la maladie d'Alzheimer, des critères de normes comportementales existent pour l'évaluation de l'état du patient et sont présentés en Annexe A. Mais aucun outil permettant de donner des indicateurs quantitatifs n'existe aujourd'hui. Les maladies conformationnelles dont la maladie d'Alzheimer sont étroitement liées au phénomène de la polymérisation de protéines. La compréhension de ces agrégations de protéines et la possibilité d'évaluer les stades de polymérisation ouvrirait des perspectives en termes de prédiction, de diagnostic et de thérapie. Ces travaux s'inscrivent dans cet objectif et focalisent l'étude sur la polymérisation de deux protéines liées à la maladie d'Alzheimer, la protéine *tau* et le peptide $A\beta$.

Dans la suite de ce chapitre, le contexte concernant les protéines et la matière molle à la base de la pathologie sera tout d'abord présenté. Un état de l'art sur les techniques actuelles permettant la détection d'espèces biologiques sera ensuite présenté. Enfin, le principe de la technique de détection par micro-rhéologie, que nous avons privilégiée, sera détaillé. Les

capteurs à ultrasons utilisés basés sur un mode de résonance *TSM* (Thickness Shear Modulus), feront l'objet d'une description de leur mode de fonctionnement, de leurs utilisations et du principe d'extraction des paramètres viscoélastiques des solutions cibles.

I.2 Mécanisme initial des maladies conformationnelles

La conformation spatiale des protéines dépend des sites de liaison disponibles et de leur positionnement spatial. Ceux-ci peuvent changer sans que leur composition biochimique varie. On sait aujourd'hui que ce phénomène de modification des protéines en particulier par des lipides est une voie importante du contrôle de l'activité cellulaire. Ce changement s'opère alors par un phénomène de transconformation post-traductionnelle (modification des rapports de voisinage des acides aminés d'une protéine, par fixation ou départ d'un ion ou d'un substrat). L'activité biologique de ces protéines modifiées dépend alors des espèces réactives et métaux fixés et des sites de fixation. Bien que l'ensemble des mécanismes ne soient pas totalement connus, il apparaît de manière schématique qu'une grande concentration de ces protéines conduit, dans un premiers temps, à la formation d'oligomères par agrégation de ces peptides. L'agrégation en chaîne de ces oligomères peut être à l'origine de la propagation de la nouvelle conformation d'une molécule modifiée à sa voisine impliquant des plaques caractéristiques présentes dans le cerveau de patients malades [13].

Par exemple les peptides $A\beta$ ont tendance à s'agréger sous forme de fibrilles pour ensuite former les plaques amyloïdes avec l'aide d'autres éléments environnants (métaux, autres protéines, ...) [14], [15]. Les propriétés d'hydrophobie dues à leur taille réduite précipitent le phénomène de polymérisation qui dépend également de la température, du pH et de la présence d'ions, ainsi que de la concentration en peptides. L'organisation structurale des oligomères créés est d'ailleurs assez ordonnée et dépend de la proportion en structure secondaire de feuillets β . Ces structures en feuillet interagissent par la suite pour s'associer en fibrilles torsadées ou elliptiques suivant les intermédiaires en jeu [16]. Ce type de structuration a été d'ailleurs visualisé en 3D par micro-imagerie cryo-électronique et reconstitué numériquement à partir de mesures RMN [17]. La Figure I-4 ci-après montre la structure 3D reconstituée d'une fibrille.

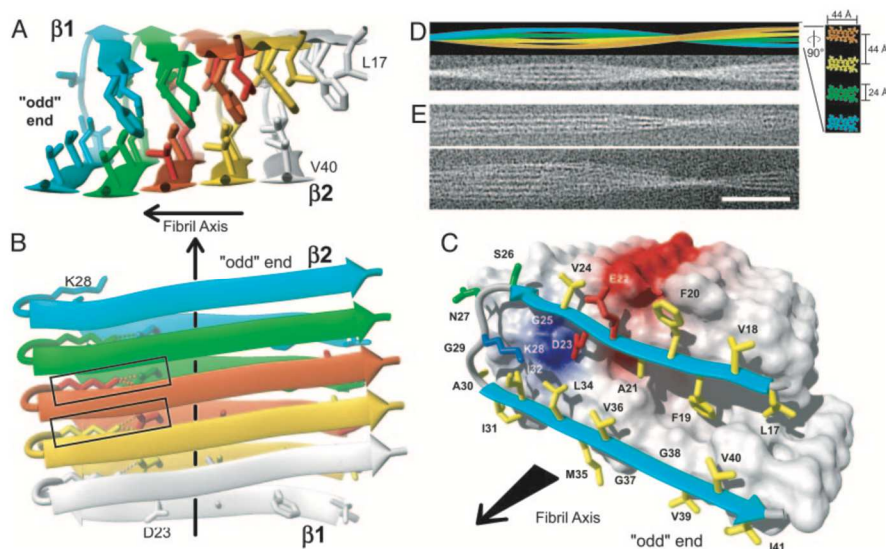


Figure I-4 : Structure 3D d'une fibrille. (A et B) Diagrammes en forme de ruban de la structure de noyau des résidus 17 à 42 illustrant la nature intermoléculaire des interactions inter-voies. Les molécules individuelles sont colorées. Par exemple, le monomère à l'extrémité impaire est représenté en cyan. Les chaînes sont indiquées par des flèches, la structure secondaire non régulière est indiquée par des lignes. Dans B, les liaisons intermoléculaires entre résidus (ici D23 et K28) sont indiquées par des lignes en pointillés, et les liaisons formées par la molécule centrale sont mises en évidence par des rectangles. (C) la polarité de surface de contact de van der Waals et le diagramme de ruban à l'extrémité impaire du protofilament comprenant les résidus 17-42. Les feuillettes sont indiqués par des flèches cyan et la structure secondaire non régulière est indiquée par des lignes grises. Les chaînes latérales d'acide aminé hydrophobes, polaires, chargées négativement et positivement sont représentées respectivement en jaune, vert, rouge et bleu. Les plaques superficielles positivement et négativement chargées sont représentées respectivement en bleu et rouge, et toutes les autres sont représentées en blanc. (D) Simulation supérieure d'une fibrine constituée de quatre protofilaments colorés individuellement avec une résolution de 2 nm. Pour faire correspondre la torsion expérimentale du protofilament de la fibrille montrée dans E, un angle de torsion de 0,45 ° par molécule a été simulé. (E) Deux exemples de micro-imagerie cryo-électronique de fibrilles (Barre d'échelle, 50 nm) [18].

I.3 Matière molle et techniques de caractérisation associées

Du fait de la structure des protéines dans leur milieu biologique, les milieux protéinés font partie des systèmes de la matière molle. La physique de la matière molle est un intermédiaire entre la physique des liquides et la physique des solides. Multiphasiques, leurs comportements peuvent répondre au cours de leur polymérisation aux lois de la physique des liquides mais également à la physique des solides [19]. Ce qui caractérise la matière molle, appelée aussi matériau complexe ou fluide complexe, est la capacité de cette dernière à se déformer sous un faible cisaillement puis à revenir à son état d'équilibre (caractère élastique de la matière).

L'organisation structurale des fluides complexes dépend des énergies d'interaction entre les objets élémentaires. Ces énergies d'interaction (interactions de Van der Waals, liaisons H ,

etc.) sont étroitement liées à l'énergie thermique à température ambiante [20]. Les effets enthalpiques, définissant la quantité de chaleur pour effectuer une transformation d'un système à pression constante tout au long d'un travail mécanique, sont proches des effets entropiques, qui définissent le degré de désordre moléculaire. De ce fait, ces systèmes complexes observent des modifications de structure sous l'effet de faibles variations environnementales (température, pression, concentration, pH , etc.) ou sous l'effet de faibles sollicitations extérieures (contraintes mécaniques, champ électrique, champ magnétique, etc.). Elle peut se trouver sous forme de suspensions colloïdales (incluant des cristaux liquides ou encore de fibres biologiques), de polymères incluant des brins d'*ADN* ou les fibres protéiques et des biofilms [21].

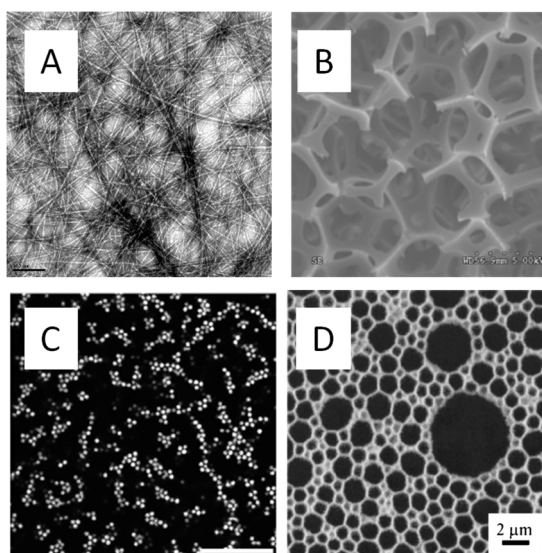


Figure I-5. Microstructures des matériaux complexes de la famille des matières molles. A - Fibres amyloïdes ; B - Mousse élastomère; C - Gel colloïdal; D - Emulsion d'huile dans de l'eau.

La compréhension des mécanismes intervenant dans les maladies conformationnelles telle que la maladie d'Alzheimer et leur diagnostic peuvent donc être reliés à des informations de structure à différentes échelles.

Pour une caractérisation morphologique, des techniques d'imagerie et de spectroscopie pour quantifier la matière molle sont généralement utilisées. Ainsi, les techniques de *RMN* (résonance magnétique nucléaire), de microscopie optique, infrarouge et acoustique ou de dispersion sont utilisées pour suivre l'évolution des propriétés structurales de la matière molle [22][23][24]. Ces techniques donnent accès à des informations structurales pendant les essais de caractérisation des matériaux. Les techniques de microscopie permettent de visualiser la structure dans le cas d'un matériau possédant deux phases non miscibles. Les techniques de

diffusion donnent des informations structurales à partir de l'existence d'un contraste entre des particules diffusantes et le milieu test. Elles permettent de mettre en avant des changements structuraux de façon temporelle du matériau lors de l'écoulement.

La détermination des dimensions structurales peut être effectuée également en utilisant les techniques de diffraction des rayons X ou Neutron aux petits et grands angles (SAX, SAN) [25][26].

La matière molle peut enfin être caractérisée par l'étude plus macroscopique de la déformation et de l'écoulement d'un fluide sous l'effet d'une contrainte : c'est la rhéologie. Le suivi des paramètres viscoélastiques donnant des caractéristiques précises sur l'état de la matière molle au cours de la polymérisation est alors visé. Des technologies de rhéologie conventionnelles haute amplitude et basse fréquence, comme les viscosimètres capillaires, rhéomètre à cellule de Couette, ou les rhéomètres rotatifs à interface plan-plan ou cône-plan sont alors privilégiées [27].

Le laboratoire a développé depuis plus d'une quinzaine d'années une technique de micro-rhéologie qui permet d'accéder à ces informations à l'échelle microscopique [28]–[30]. La transduction privilégiée pour le suivi des propriétés viscoélastiques de matériaux complexes est basée sur la propagation d'ondes de volume. Ce sont alors de petites amplitudes de contrainte et de déformation sinusoïdales à hautes fréquences, qui sont adaptées aux matériaux viscoélastiques entre solide et liquide. La technique s'appuie sur l'utilisation d'un capteur à ondes de cisaillement *TSM* résonant à une fréquence autour de quelques mégahertz et utilisé en émission/réception. Bien que le capteur *TSM* soit moins sensible que les résonateurs à ondes de surface *SAW*, il garantit une stabilité en fréquence et en température très importante. Sa simplicité de mise en œuvre le rend également très attractif par rapport aux techniques optiques malgré leurs grandes résolutions et le large spectre d'investigations possibles.

I.4 Systèmes instrumentaux associés à la détection de la maladie d'Alzheimer et au suivi de polymérisation de protéines

Si à l'heure actuelle, les coupes *post-mortem* [31] restent la technique la plus fiable pour l'établissement du diagnostic de la maladie d'Alzheimer, toutefois cette technique ne rentre

pas évidemment dans la course au diagnostic précoce. D'autres méthodes existent cependant pour mettre en avant la présence des marqueurs spécifiques et le suivi de la polymérisation des éléments pathogènes à l'origine de la maladie d'Alzheimer.

I.4.1 Détection de la maladie d'Alzheimer

Les coupes du cerveau humain sont effectuées pour mettre en avant la présence des tissus insolubles ou d'atrophie des zones du cerveau touché par la pathologie. La présence de la maladie peut également être mise en évidence par des analyses biologiques du liquide céphalo-rachidien. La principale technique de détection est le test *ELISA* (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) qui est une méthode immuno-enzymatique qui se base sur la visualisation d'une réaction antigène-anticorps, grâce à un agent coloré, produite par l'action sur un substrat d'une enzyme préalablement fixée à l'anticorps [32][33][34].

Trois tests sont assimilables à l'*ELISA*, l'*ELISA direct*, l'*ELISA* par compétition et l'*ELISA* en sandwich et sont présentés à la Figure I-6. La troisième technique est la plus utilisée pour la détection et le dosage d'antigène présent dans un fluide complexe ou dans un échantillon biologique. Pour cela, la plaque d'essai est recouverte par un anticorps de capture, qui se lie de façon spécifique à l'antigène d'étude quand celui-ci sera injecté dans les plaques d'essai. Une fois la liaison entre l'antigène et l'anticorps de capture effectuée, un anticorps de détection marqué avec une enzyme est fixé à l'antigène. Enfin une solution révélatrice est déposée et une réaction colorée est observée. L'intensité et les variations de la coloration peuvent être mesurées par l'utilisation d'un photomètre.

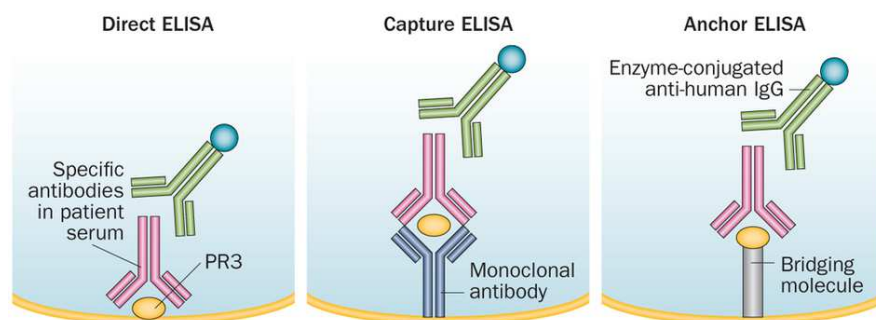


Figure I-6. Schématisation des techniques de dosage immuno-enzymatique *ELISA* [35].

Cependant, ces tests *ELISA* sont aujourd'hui peu fiables en terme de reproductibilité [36], et demeurent une technique très coûteuse (un kit de 96 puits vaut entre 500 et 900 €). De plus, elle est difficile à mettre en place, avec une forte dépendance par rapport à la température, au *pH* ou encore à l'éclairement, et ce, à cause de la réaction enzymatique en jeu.

L'*ELISA* et les coupes *post-mortem* représentent donc les deux principales possibilités en termes d'analyse en ce qui concerne la maladie d'Alzheimer. D'autres méthodes existent pour la détection et le suivi de polymérisation d'espèces biologiques variées, elles sont basées sur différents systèmes de transductions et sont présentées dans le paragraphe suivant.

I.4.2 Suivi de polymérisation

En ce qui concerne la détection d'espèces biologiques et notamment le suivi de polymérisation, quatre types principaux de transducteurs existent : optique, thermique, électrochimique et piézoélectrique.

- Les transducteurs optiques

Les transducteurs optiques se basent sur la génération d'un signal optique à partir du signal biologique d'origine. La majorité des capteurs optiques utilise des techniques d'absorption et de fluorescence. Les principales techniques expérimentales, qui sont utilisées pour la détection d'espèces biologiques sont l'interférométrie (mesure de la différence de parcours optiques entre deux faisceaux lumineux par des franges d'interférences), la résonance plasmon de surface [37]–[39] (mesure de la variation de l'indice de réfraction au voisinage de l'interface ligand/récepteur à la surface d'une couche métallique) et l'ellipsométrie [40], [41] (mesure des propriétés optiques de matériaux et d'épaisseur de couches minces par la détermination de la modification de l'état de polarisation d'une onde lumineuse après réflexion sur l'échantillon). Il a été montré qu'il était possible de suivre l'agrégation du peptide $A\beta_{42}$ (constituée de 42 acides aminés) par *SPR* (surface plasmon resonance) [42]. La Figure I-7 présente le système expérimental utilisé dans l'étude du suivi de l'agrégation d' $A\beta_{42}$. Le *SPR* permet la détection d'interactions biomoléculaires. Le principe de mesure repose sur la spectroscopie des plasmons de surface : une source polychromatique excite deux milieux d'indices de réfraction différents. Dans les conditions de réflexion totale, l'angle de résonance est étroitement lié à la densité du milieu. Les changements dans la densité changent directement l'indice de réfraction du milieu du champ évanescent qui fait varier à son tour l'angle de résonance. La réponse est proportionnelle à la masse des molécules qui se lient au ligand immobilisé sur la surface du biocapteur. Afin de suivre l'agrégation de la protéine, une surface recouverte d'or a été au préalable fonctionnalisée avec des greffages de fragments d' $A\beta_{42}$. Lors de l'injection de solutions protéiques, des agrégats se forment, modifiant les angles du faisceau incident et du faisceau réfléchi.

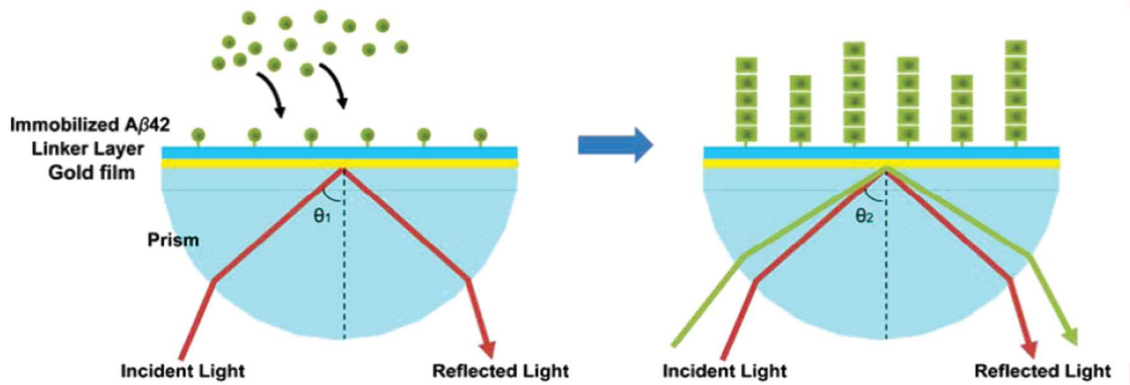


Figure I-7. Schéma de principe du suivi de l'agrégation du peptide $A\beta 42$ par SPR grâce à une surface fonctionnalisée de dextrane [43].

La Figure I-8 présente les résultats obtenus pour le suivi de l'agrégation des protéines. Dans un premier temps, les signaux sont identiques pour l'échantillon test et celui de référence. A partir d'une heure de traitement, la surface est rincée pour laisser place à l'injection d'une solution de peptide $A\beta 42$. Deux tendances sont ainsi observées. Dans le cas de la surface de contrôle, nous ne remarquons pas d'évolution du signal. Cependant, pour la surface d'or fonctionnalisée, l'angle de réfraction augmente au cours du temps. Cela s'explique par un changement de densité à la surface dû à l'agrégation des protéines contenues en suspension dans la solution injectée. Au bout de 12 h, l'expérience est arrêtée et la surface est rincée. Une dernière mesure est réalisée sur le banc avec les systèmes rincés, une différence est observée entre le système fonctionnalisé et le système de contrôle, où dans le premier cas, un signal de plus forte intensité est observé conséquence de la fonctionnalisation de la surface.

Malgré les nombreux avantages de la transduction par SPR, des limitations doivent être prises en compte : (i) la surface du transducteur ne peut qu'être un métal noble (l'or par exemple), (ii) la complexité de la physique de la résonance plasmonique de surface, (iii) la distance optique utilisable pour les analyses se limite à 300-500 nm pour une sensibilité du signal acceptable et limite l'étude à des molécules ou à des entités inférieures à 10-20 μm , (iv) le coût d'un tel système (50 k€).

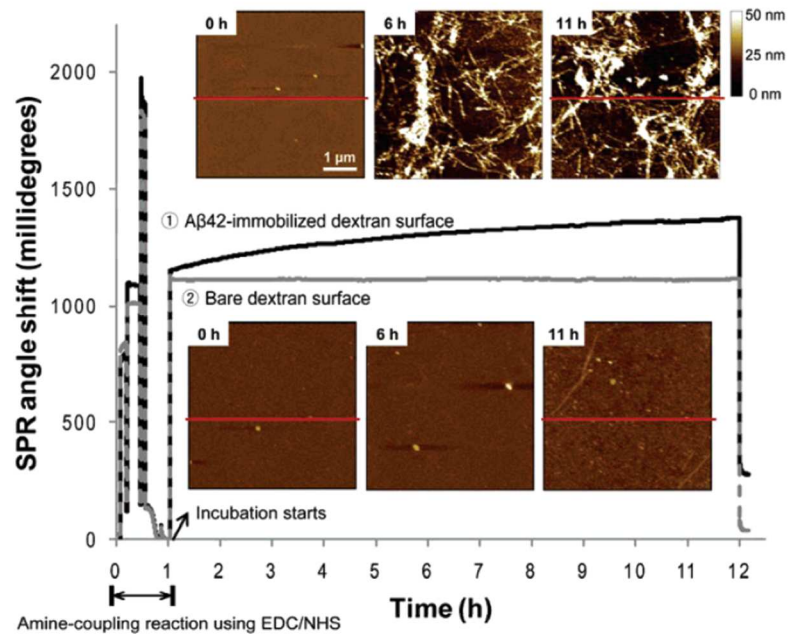


Figure I-8. Variation de l'angle de réfraction obtenu lors du suivi de polymérisation, en gris suivi sans fonctionnalisation de surface, en noir, suivi avec surface fonctionnalisée. Corrélation par des micrographies AFM.

- Les transducteurs thermiques

Les transducteurs thermiques, qui sont principalement des thermorésistances ou thermocouples, mesurent une variation de température à partir d'une variation d'enthalpie (énergie) et d'une capacité thermique massique, lors de réaction exo ou endothermique d'une réaction enzymatique [44]. L'inconvénient majeur de cette technique réside dans la forte présence de bruit de fond lors des mesures et qui sont dues aux variations thermiques du milieu, ce qui rend cette technique difficile à mettre en place, et par conséquent onéreuse. L'avantage réside dans sa bonne adaptation pour la réalisation de mesures en continu et à sa faible sensibilité à la lumière. La Figure I-9 schématise le montage expérimental d'un biocapteur thermique, dans lequel se trouve une enzyme au sein d'un réacteur. L'échantillon à caractériser est injecté dans le système avec une pompe et grâce à la variation de température engendrée par la réaction enzymatique, il sera possible de caractériser l'analyte.

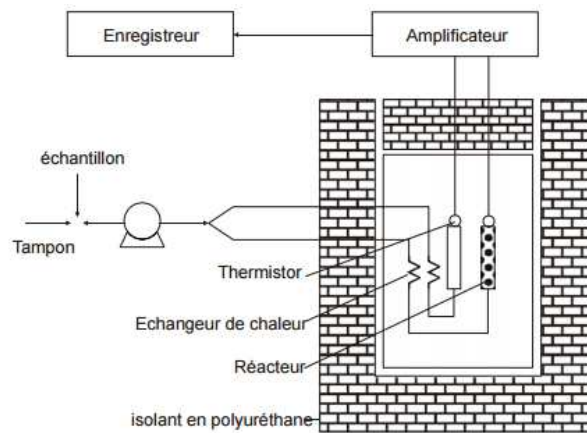


Figure I-9. Schéma de principe d'un biocapteur thermique [44].

- Les transducteurs électrochimiques

Les transducteurs électrochimiques se basent sur la génération d'une réaction d'oxydo-réduction ou d'une modification de conductivité électrique lors d'une modification du signal électrique pendant le dépôt d'une solution test à la surface du capteur. Ils sont composés de trois électrodes, l'électrode de travail, l'électrode de référence et la contre-électrode. A partir de ces trois électrodes, différentes mesures peuvent être effectuées, permettant de classer les transducteurs électrochimiques suivant leur mode de fonctionnement. Ainsi, les capteurs potentiométriques se basent sur la mesure d'une variation de tension à courant constant et les capteurs ampérométriques, mesurent une variation de courant à un potentiel fixé. Quant aux capteurs impédancemétriques, ils mesurent des variations de conductivité ou de capacité entre deux électrodes. En effet, l'impédance de surface est modifiée lorsque l'espèce à détecter est piégée dans la couche sensible où la conductivité varie suivant la teneur en ions de la solution. Ce type de transducteur est très largement utilisé en tant que biocapteurs du fait de la facilité de fonctionnement et de mise en application, cependant des travaux de modification de surface sont nécessaires afin d'augmenter leur sélectivité [45]–[48].

- Les transducteurs piézoélectriques

Les transducteurs piézoélectriques permettent de générer une déformation mécanique par application d'un potentiel aux bornes de l'élément piézoélectrique. Ainsi, différents capteurs ont été développés :

- Les micropoutres, ou microcantilevers [49], [50]. Les transformations chimiques sont mesurées par la déformation mécanique nanométrique de micropoutres. Dès l'adsorption de l'espèce à caractériser sur la micropoutre, cette dernière va fléchir et

va voir sa fréquence de résonance varier. Ainsi par mesure de la flexion et de la variation de fréquence, il devient possible de quantifier et de caractériser l'analyte. Malgré un seuil de détection très bas, l'utilisation en milieu liquide est limitée du fait de l'affection du facteur de qualité et de la qualité et de la précision du signal mesuré lors des essais de détection. La Figure I-10 illustre un essai de détection d'agrégats amyloïde qui utilise des micropoutres dont la surface est fonctionnalisée puis mise en contact avec des protéines amyloïdes. La courbe bleue représente la contrainte mécanique établie par la croissance des fibres amyloïdes. La réaction s'arrête à partir de 10 heures puis le signal se stabilise, correspondant à la fin de la croissance des éléments amyloïdes. Le signal en vert correspond au signal de référence, capteur dont la surface n'a pas été fonctionnalisée, il n'évolue pas avec l'injection des éléments amyloïdes.

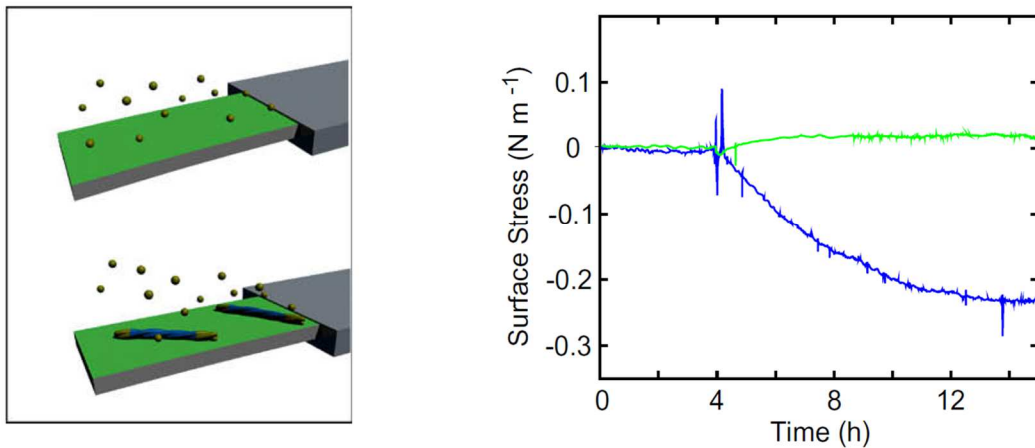


Figure I-10. Détection avec des micropoutres d'agrégats amyloïdes à partir de solutions d'insuline d'origine [50].

- Les capteurs à ondes acoustiques de surface (*SAW*) ou capteur à ondes de Rayleigh [51]–[53]. Des électrodes interdigitées déposées de façon coplanaire sur le substrat piézoélectrique vont permettre la propagation d'une onde acoustique de surface au travers d'une couche sensible. Ce type de capteur est caractérisé par sa stabilité et sa précision, cependant, l'inconvénient majeur de ce type de capteur est l'impossibilité de leur utilisation en milieu liquide. L'onde de Rayleigh est une onde dont la polarisation comporte une composante transverse verticale qui rayonne en présence de liquide. La Figure I-11 schématise dans la partie de gauche le principe du système. Il se compose d'un substrat piézoélectrique sur lequel sont déposées des électrodes en peignes interdigités (*IDT1* et *IDT2*). La surface du capteur est fonctionnalisée avec une couche d'aminodextrane carboxylé. La courbe (1) est la réponse fréquentielle de

l'injection d'une solution contenant des protéines sensibles à la couche d'accroche sur le résonateur *SAW*. La courbe (2) correspond à l'injection d'une solution de référence sans protéine sur le système.

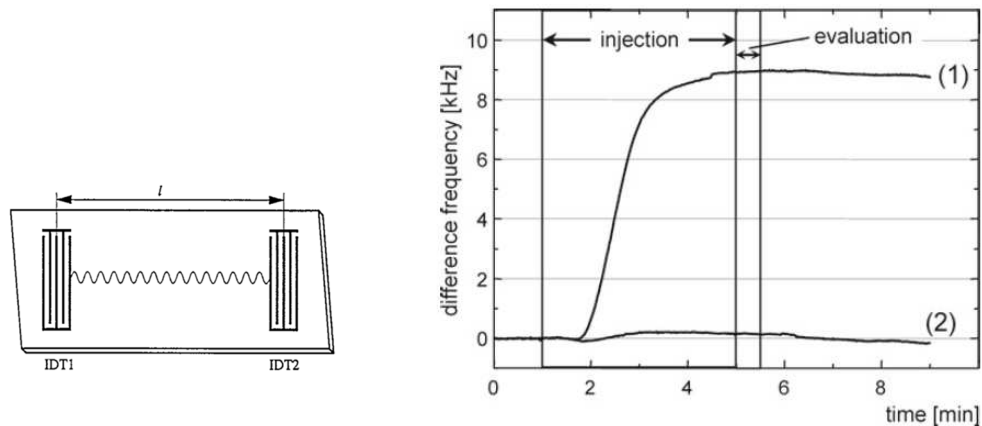


Figure I-11, Utilisation de capteur à ondes acoustiques de surface pour la détection d'espèces biologiques. A gauche, un schéma de principe d'un capteur SAW est présenté. A droite, suivi de la variation de fréquence lors de l'accroche de protéines à la surface du résonateur SAW fonctionnalisé par une couche d'aminodextrane [54].

Pour remédier au problème d'utilisation de ce type de capteur en milieu liquide, il est possible d'utiliser des capteurs dont les ondes générées ne comportent pas de composante verticale. Il s'agit des capteurs à ondes dites transverses horizontales (*TH* ou *SH* pour Shear Horizontal). Il existe trois types de capteurs utilisant ce type d'onde, à savoir, les capteurs à ondes de Bleustein - Gulyayev, les capteurs à ondes de plaque transverses horizontales et les capteurs à ondes de Love.

- Les capteurs à ondes transverses horizontales où les ondes se propagent par réflexion dans le substrat. L'énergie de l'onde est donc répartie sur tout le volume du substrat, ce qui aura pour effet de limiter la sensibilité. Pour remédier à ce problème, il est possible de réduire l'épaisseur du substrat de quartz, ce qui entraîne des complications de mise en œuvre et des limitations dans les techniques de fabrication. La Figure I-12 présente l'exemple d'un système basé sur les ondes transverses horizontales permettant la détection de brins d'*ADN* et le suivi des variations de fréquences (de l'ordre de 500 Hz) lors de l'agrégation.

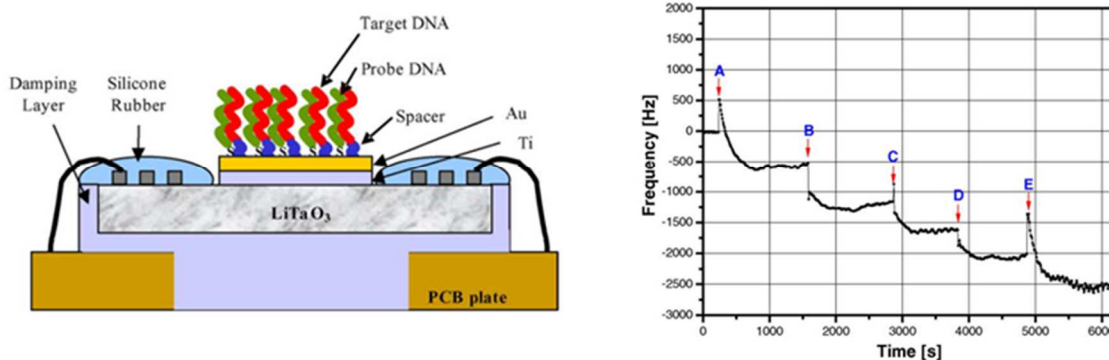


Figure I-12. Capteurs à ondes transverses horizontales. A gauche, schéma de principe d'un capteur SH-SAW servant à la détection de l'hybridation de brins d'ADN sur une surface d'or métallisée. A droite, suivi fréquentiel du capteur à 5 ajouts (A, B, C, D, E) de brins d'ADN [55].

- Les capteurs à ondes guidées ou capteur à ondes de Love. Cette technique repose sur l'ajout d'une couche guidante à la surface d'un capteur SAW et dans laquelle les ondes se propagent, et seront perturbées par l'ajout d'une couche sensible. L'intérêt de ce genre de capteurs réside dans la possibilité de contrôler l'épaisseur de la couche guidante. Les ondes peuvent ainsi être confinées dans un volume de faible épaisseur, ce qui augmente la sensibilité des capteurs. La Figure I-13 présente les variations du paramètre S_{21} lors du dépôt sur la couche sensible de différentes solutions de D-sérines représentatives d'une polymérisation.

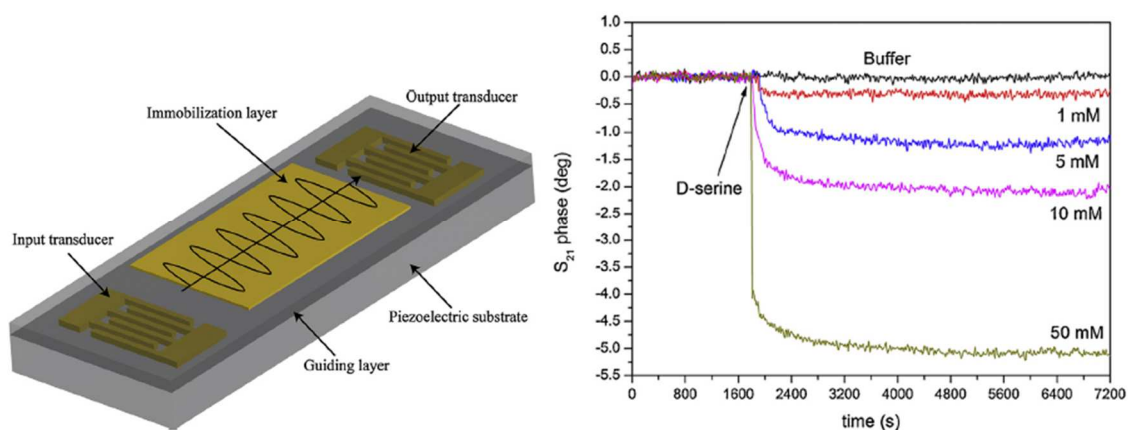


Figure I-13. A gauche, schéma de principe du capteur à ondes de Love. A droite, suivi du coefficient S_{21} à la fréquence de résonance, en fonction du temps et de la concentration en D-sérine.[56].

- Les capteurs à ondes de plaque, ou capteur à ondes de Lamb [53]. Dans ce type de capteur, l'onde générée par des peignes interdigités à la surface d'un élément piézoélectrique, va se propager dans son volume, permettant l'utilisation de ce type de transducteur pour la détection en milieu liquide mais rendant la sensibilité dépendante de l'épaisseur du substrat piézoélectrique. La faible épaisseur de l'élément piézoélectrique

rend ce système très complexe à fabriquer mais également très peu robuste dans le temps [57].

- Les capteurs à ondes acoustiques de volume (ou Bulk Acoustic Wave, pour *BAW*) [53], [58], [59], et dont la technique consiste à faire vibrer un élément piézoélectrique en appliquant un champ électrique alternatif aux bornes des électrodes disposées de chaque côté. Ils présentent un avantage majeur en termes de robustesse, de stabilité, de mise en œuvre ou encore d'utilisation. Ainsi, le champ d'application est large, puisqu'il peut être employé à la détection de gaz et de solide. La Figure I-14 montre un exemple du suivi de croissance de protéines par le suivi de la fréquence. Lorsque le capteur est fonctionnalisé par l'ajout de site de croissance à sa surface, une diminution de la fréquence est observée correspondant à l'adhésion de fibres aux sites de croissance (courbe bleue). En absence de site de croissance des fibres protéiques, aucune modification fréquentielle n'est observée (courbe verte).

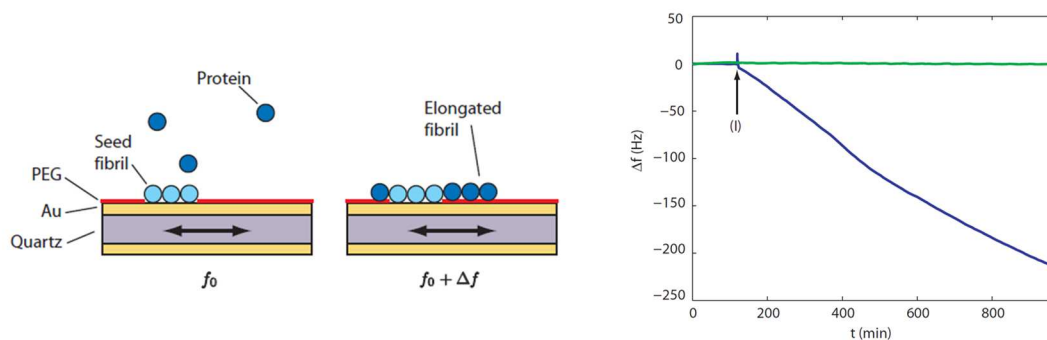


Figure I-14, A gauche, schéma de principe d'un capteur à ondes de volume pour le suivi de polymérisation de protéines. A droite, comparaison de la réponse en fréquence du capteur lors de l'injection de protéine à sa surface avec un capteur fonctionnalisé (courbe bleue) et un capteur non fonctionnalisé (courbe verte).

Ces capteurs permettent de suivre la cinétique d'une réaction biochimique. Ils ont également l'avantage de fonctionner avec de très faibles courants, ils peuvent dans certains cas être miniaturisés.

Si toutes les techniques présentées ci-dessus permettent le suivi de la polymérisation d'analyte complexe, comme des protéines, elles ne permettent pas de quantifier la polymérisation par des propriétés mécaniques. Les capteurs à ondes acoustiques de volume apportent une solution de suivi des caractéristiques viscoélastiques lorsqu'on mesure au-delà de la variation de fréquence le coefficient de réflexion complexe S_{11} . Il faut néanmoins prévoir une résolution du problème inverse par traitement du signal dédié. Dans ce cas, l'objectif est de caractériser l'évolution structurale des solutions par le suivi de l'évolution des

paramètres élastiques G' et visqueux G'' à l'échelle micrométrique. C'est cette méthode qui sera utilisée dans cette étude.

I.5 Rhéologie et grandeurs physiques

La rhéologie est une science à part entière qui se situe entre la physique des solides et la physique des liquides. Etymologiquement, elle est la science de l'écoulement (rheos = qui coule, logie = science de). Pour un fluide Newtonien, c'est-à-dire tout liquide pour lequel le module visqueux n'est pas affecté par la variation du taux de cisaillement, la vitesse de déformation est proportionnelle à la contrainte. Dans le cas d'un solide, la déformation est directement fonction de la contrainte. Dans le cas des matériaux viscoélastiques, le comportement du matériau étudié est une combinaison des deux cas précédemment évoqués. Les techniques de rhéologie proposent des outils adaptés à l'étude des propriétés de ce type de matériaux.

D'un point de vue mécanique, un matériau soumis à un ensemble de forces est susceptible de se déformer. La déformation du matériau s'effectue par glissement relatif des différentes couches, sans qu'il y ait transfert de matière d'une couche à l'autre, c'est le mouvement laminaire de cisaillement. Les appareils utilisés sont appelés rhéomètres, et permettent ainsi de déterminer les paramètres des matériaux en contact. En imposant une contrainte de cisaillement sinusoïdale, la contrainte de déformation déphasée est mesurée. Le rapport entre la contrainte et la déformation est appelé module complexe de cisaillement et noté G^* : la partie réelle de G^* , G' , est appelée module de conservation ou module élastique, la partie imaginaire de G^* , G'' , est quant à elle appelée module de perte ou module visqueux. G' est proportionnel à l'énergie élastique emmagasinée alors que l'énergie dissipée par frottement visqueux est proportionnelle à G'' . L'échelle d'investigation dépend alors de la fréquence d'excitation de la contrainte et de la déformation.

I.6 Echelle d'investigation et micro-rhéologie

Grâce aux progrès réalisés dans l'utilisation des techniques de résonance magnétique nucléaire (RMN), il a été possible d'accéder à des informations plus détaillées sur la structure

moléculaire du peptide $A\beta$ [60]–[62] et de la protéine *tau* [63].

Dans le cas d' $A\beta$, Les fibres sont composées généralement de deux protofilaments de 2 à 5 nm de diamètre qui se torsadent pour former une fibre de 7 à 13 nm d'épaisseur. Les brins β dans un feuillet β croisé sont espacés de 4,7 à 4,8 Å et les feuillets β sont espacés de 10 Å. Dans le cas de la protéine *tau*, les échantillons *post mortem* de tissus cérébraux de patients humains étudiés en microscopie électronique montrent que la protéine est constituée principalement de deux protofilaments enroulés l'un avec l'autre. La séparation des répétitions de l'enroulement est d'environ 75 à 80 nm et avec une épaisseur variant de 10 à 22 nm et un diamètre pour chaque brin d'environ 10 nm. La structure est semblable à un ruban enroulé avec une distance de séparation des brins de 80 nm. Sur la Figure I-15, réalisée par microscopie à force atomique (AFM), on peut observer les dimensions des structures conformationnelles des protéines pour différentes concentrations.

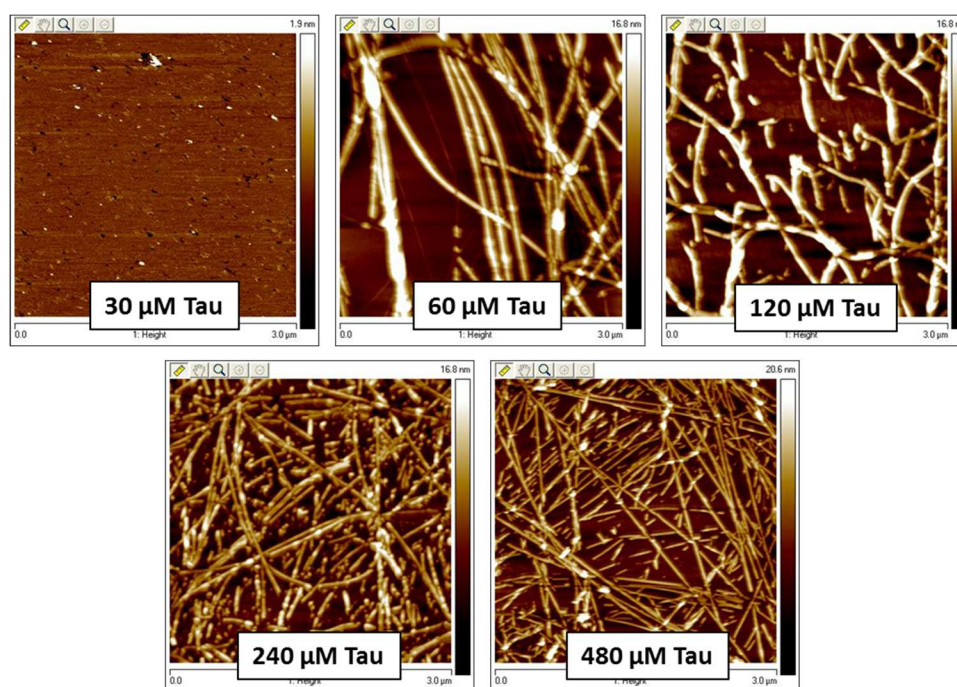


Figure I-15, Micrographies AFM de l'agrégation de la protéine tau à différentes concentrations, 30 μ M, 60 μ M, 120 μ M, 240 μ M et 480 μ M. Micrographies réalisées au LBPA par Claude Nogues.

Dans ce contexte, de nombreux travaux ont montré que l'évolution macroscopique d'un matériau est liée à son évolution mésoscopique. La structure moléculaire doit donc impacter les propriétés du milieu aux autres échelles. Par réciprocité une mesure à une échelle mésoscopique doit pouvoir fournir de riches informations sur la structure moléculaire.

Dans le cadre de cette étude, en prenant en compte l'échelle d'investigation du matériau étudié (mésoscopique voire microscopique), nous avons choisi une technique ultrasonore [29]. Elle utilise les propriétés classiques de la propagation d'une onde acoustique dans un

volume composé par deux milieux homogènes de caractéristiques différentes. A la surface de la séparation des deux milieux, une partie de l'onde incidente est réfléchi. Cette réflexion dépend des caractéristiques mécaniques et des paramètres influents des deux milieux (masse volumique, viscosité, élasticité, température, etc.). L'autre partie est transmise d'un milieu à l'autre et dépend également des caractéristiques des deux milieux [64].

En régime harmonique, ces milieux peuvent être caractérisés par leur impédance mécanique (respectivement Z_{a1} et Z_{a2}) qui correspond au produit de la masse volumique et de la vitesse de phase de l'onde propagée. A l'interface, on peut alors relier le coefficient de réflexion Γ (rapport entre l'onde incidente et l'onde réfléchi) aux impédances mécaniques par l'expression (1) :

$$\Gamma = \frac{Z_{a2} - Z_{a1}}{Z_{a2} + Z_{a1}} \quad (1)$$

Compte tenu de l'aptitude d'un solide ou d'un liquide à propager une onde mécanique, il devient alors possible de déterminer l'impédance mécanique d'un matériau quelconque en contact avec ce solide à l'aide du coefficient de réflexion. Si les caractéristiques acoustiques du solide sont parfaitement connues, la mesure de la réponse à une contrainte nous donne alors l'impédance mécanique du matériau en contact et par voie de conséquence nous informe sur l'onde transmise. Dans cette étude, nous avons fait le choix d'utiliser une cavité résonnante à très fort coefficient de qualité. L'évolution dans le plan complexe des paramètres mécaniques autour de la fréquence de résonance donne l'information sur le milieu en fonction de son évolution (en temps, en température par exemple).

L'élément résonant est un résonateur à quartz de coupe AT de forme circulaire et métallisé sur ses deux faces. L'angle de coupe (autour de 35°) permet de générer des ondes de cisaillement tout en offrant la meilleure stabilité en fréquence (de l'ordre de 10^{-8}) dans une gamme de températures de 0 à 50°C . Naturellement comme nous le verrons dans les chapitres suivants, ce capteur résonant doit être optimisé et adapté à nos études. Cela concernera notamment l'électrode qui permet l'excitation électrique, mais aussi le nombre d'électrodes à utiliser.

Pour mesurer le coefficient de réflexion, nous utilisons un analyseur de réseau. A partir de cette mesure, nous pouvons déterminer l'impédance électrique du quartz autour de sa fréquence de résonance (autour de 5 ou 6 MHz ou des multiples impairs de cette fréquence de résonance, notamment l'harmonique 3). A partir des équations de propagation des ondes

acoustiques, d'une part dans le quartz et d'autre part dans le matériau en contact, on peut retrouver le lien entre l'impédance électrique de charge Z_c et les impédances mécaniques à la surface de contact. Cette impédance électrique complexe Z_c est reliée à l'évolution des propriétés mécaniques du matériau. Ces propriétés sont extraites par un modèle électrique développé au laboratoire SATIE [13], selon l'équation (2), et qui est détaillé en Annexe B.

$$Z_c \propto \left(\sqrt{\frac{\rho(|G^*| + G')}{2}} \right) + j \left(\sqrt{\frac{\rho(|G^*| - G')}{2}} \right) \quad (2)$$

Afin d'assurer le suivi, le capteur est immergé dans une cellule contenant le matériau étudié. L'ensemble "cellule-capteur" est maintenu à température fixe de façon à minimiser les effets indésirables dus à la variation de température. Le principe de mesure est basé sur un générateur sinusoïdal de fréquence variable qui fournit 801 points de mesures (c'est à dire 801 fréquences autour de la fréquence de résonance). Une mesure d'impédance électrique est réalisée par réflectométrie, un coupleur directif sépare l'onde incidente de l'onde réfléchie par le milieu. Les mesures à intervalle de temps régulier, assurent le suivi de l'impédance électrique au cours de la formation du matériau. Un ordinateur permet l'automatisation de la mesure et l'enregistrement des données en fonction du temps (Figure I-16).

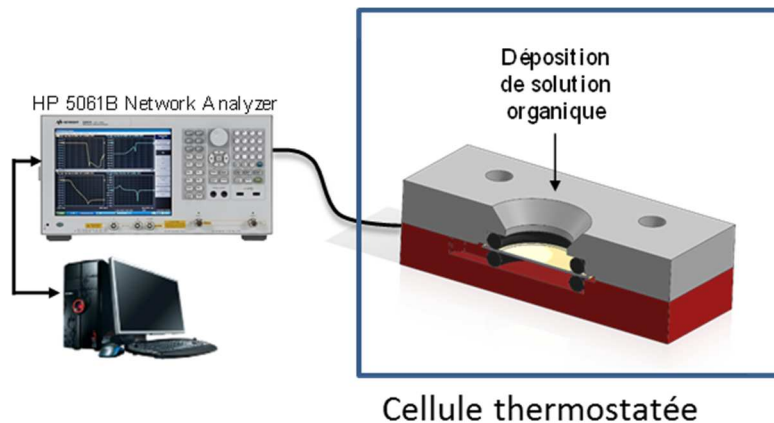


Figure I-16, Synoptique de la chaîne d'instrumentation du microrhéomètre.

A partir des réponses électriques du capteur à vide puis en charge au cours de l'évolution du matériau (Figure I-17), on peut en déduire, en particulier, l'impédance complexe $Z_c = R_c + j X_c$. Les parties réelle R_c et imaginaire X_c de l'impédance électrique liée aux effets viscoélastiques peuvent donc être isolées pour suivre l'évolution des propriétés viscoélastiques du matériau. Compte tenu du très fort coefficient de qualité ($Q > 100000$), les valeurs de l'impédance électrique du capteur sont extrêmement faibles et risquent d'être noyées dans le bruit. Il est possible de s'affranchir de ce problème en mesurant l'admittance

complexe du capteur pour plus de visibilité.

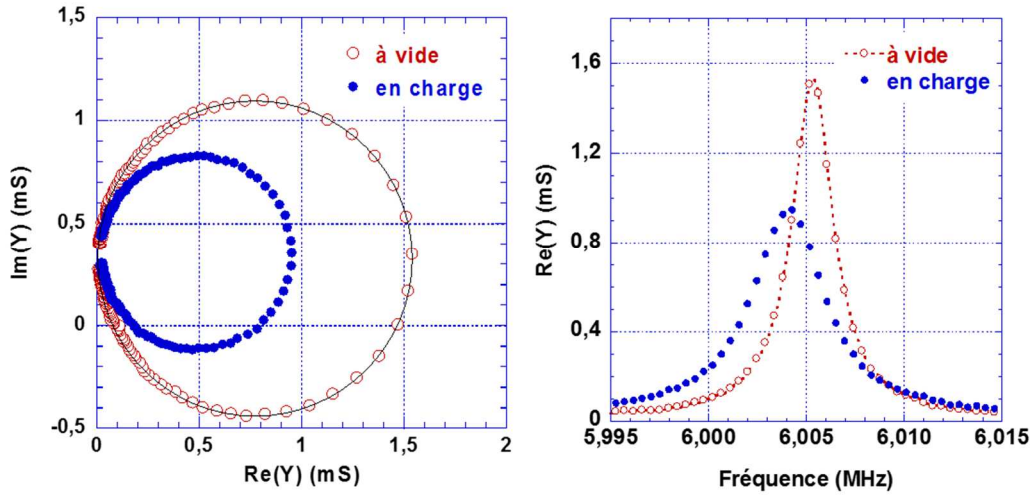


Figure I-17, Mesures des impédances complexes obtenues à partir de l'analyseur de réseau. En rouge, signal mesuré d'un capteur vide. En bleu, impédance complexe atténuée après la charge du capteur.

Grâce à la prise en compte des effets électriques dans notre modélisation, les valeurs R_c et X_c permettent de suivre les premières étapes du matériau en formation. Ces variables permettent d'accéder aux modules élastiques (G') et visqueux (G'') selon les équations suivantes :

$$G' = \frac{R_c^2 - X_c^2}{2K^2\rho_{\text{matériau}}} \quad (3)$$

$$G'' = \frac{R_c X_c}{2K^2\rho_{\text{matériau}}} \quad (4)$$

K est le coefficient de conversion électromécanique et $\rho_{\text{matériau}}$ la masse volumique du matériau (ou du milieu) en contact avec le quartz.

La mesure nécessite trois étapes :

Pour la première étape, le dispositif doit être calibré. Pour ce faire nous procédons à une compensation des pertes et du déphasage entre le capteur et l'analyseur de réseaux. Cette procédure classique en radiofréquences nécessite d'effectuer trois mesures sans capteur, celui-ci étant remplacé successivement par circuit ouvert puis par un court-circuit et enfin par une charge.

La seconde étape consiste à réaliser une mesure à vide (pas de milieu réactionnel) avec le transducteur piézoélectrique non chargé. Elle permet de déterminer les éléments électriques intrinsèques du quartz en fonction de la fréquence.

Enfin, la dernière étape consiste à réaliser la mesure du quartz chargé par le matériau à

analyser. La Figure I-18 montre la variation de l'admittance du quartz, lorsque des solutions d'eau/glycérol à des pourcentages massiques de glycérol variables sont déposées à sa surface. Chaque portion du cercle représente cette admittance pour une solution d'eau/glycérol. Entre la première solution à 0 % de glycérol (eau pure) et la dernière à 80 % de glycérol, le diamètre des cercles diminue avec un léger décalage de leur centre montrant une augmentation de l'amortissement et un décalage en fréquence.

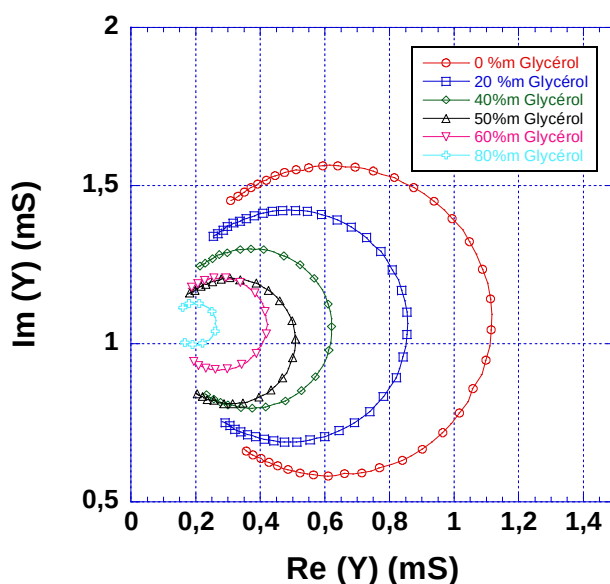


Figure I-18. Admittance du quartz dans le plan complexe chargé avec des dépôts de 200 μ L de solution d'eau/glycérol à différents pourcentages massiques de glycérol autour de la résonance (6 MHz).

Par substitution entre les paramètres électriques extraits du modèle de la 3^{ème} étape et ceux de la 2^{ème} étape, nous pouvons modéliser les paramètres mécaniques du matériau. A ce stade, nous avons la superposition de deux phénomènes physiques : l'effet de masse à la surface du quartz et les effets viscoélastiques du matériau. Pour discriminer ces deux effets, une mesure sur un matériau newtonien est effectuée et ainsi les paramètres élasticité G' et viscosités G'' peuvent être extraits.

I.7 Conclusion

Dans cette partie ont été présentés les mécanismes liés aux maladies conformationnelles et en particulier ceux liés à la maladie d'Alzheimer. Le dénominateur commun de ces maladies est la polymérisation de protéines. Disposer d'un concept permettant le suivi de ces matériaux faisant partie de la matière molle permettrait de comprendre les mécanismes intervenant dans ces maladies. Les capteurs à ondes de volume utilisés en microbalance ont conduit à l'application des ondes acoustiques dans le domaine des biocapteurs. Configurés en mode rhéomètre, ces capteurs à ondes de volume sont particulièrement adaptés au suivi des caractéristiques mécaniques d'un milieu liquide lors d'une polymérisation. En effet, ils permettent de mesurer l'impédance d'un système et d'extraire les paramètres viscoélastiques d'un matériau d'investigation. L'objectif de cette thèse est de démontrer la faisabilité d'un outil basé sur ce principe pour suivre la polymérisation des protéines et particulièrement celles qui sont des marqueurs de la maladie d'Alzheimer, et sera décomposé en différents axes de travail : l'optimisation et la fabrication d'un résonateur ainsi que sa caractérisation électrique et mécanique ; la conception et le développement d'un capteur à ondes à acoustique de volume multiélectrodes et enfin les essais de détection des analytes biologiques d'étude *in vitro*.

I.8 Références bibliographiques

- [1] A. Alzheimer, “Über eigenartige Krankheitsfälle des späteren Alters,” 1911.
- [2] B. C. Riedel, P. M. Thompson, and R. D. Brinton, “Age, APOE and Sex: Triad of Risk of Alzheimer’s Disease,” *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, vol. 160, pp. 134–147, 2016.
- [3] E. Stefanova *et al.*, “Vascular risk factors in Alzheimer’s disease - Preliminary report,” *J. Neurol. Sci.*, vol. 322, no. 1–2, pp. 166–169, 2012.
- [4] F. Forette *et al.*, “Prevention of dementia in randomised double-blind placebo-controlled Systolic Hypertension in Europe (Syst-Eur) trial,” *Lancet*, vol. 352, no. 9137, pp. 1347–1351, 1998.
- [5] Z. Arvanitakis, R. S. Wilson, J. L. Bienias, D. a Evans, and D. a Bennett, “Diabetes mellitus and risk of Alzheimer disease and decline in cognitive function.,” *Arch. Neurol.*, vol. 61, no. 5, pp. 661–666, 2004.
- [6] M. P. Ates, Y. Karaman, S. Guntekin, and M. A. Ergun, “Analysis of Genetics and Risk Factors of Alzheimer’s Disease,” *Neuroscience*, vol. 325, pp. 124–131, 2016.
- [7] Inserm, *Maladie d’Alzheimer : Enjeux scientifiques, médicaux et sociétaux.*, Inserm. 2007.
- [8] A. Aouba, M. Eb, G. Rey, G. Pavillon, and E. Jouglu, “Données sur la mortalité en France : principales causes de décès en 2008 et évolutions depuis 2000.,” *Bull. épidémiologique Hebd.*, vol. 22, pp. 249–255, 2011.
- [9] C. Duyckaerts and D. Dickson, “Neuropathology of Alzheimer’s Disease and its Variants,” in *Neurodegeneration: The Molecular Pathology of Dementia and Movement Disorders*, Wiley-Blackwell, 2011, pp. 62–91.
- [10] L. M. Bloudek, D. E. Spackman, M. Blankenburg, and S. D. Sullivan, “Review and meta-analysis of biomarkers and diagnostic imaging in Alzheimer’s disease.,” *J. Alzheimers. Dis.*, vol. 26, no. 4, pp. 627–45, 2011.
- [11] M. Ono, H. Watanabe, A. Kitada, K. Matsumura, M. Ihara, and H. Saji, “Highly Selective Tau-SPECT Imaging Probes for Detection of Neurofibrillary Tangles in Alzheimer’s Disease,” *Sci. Rep.*, vol. 6, p. 34197, Sep. 2016.
- [12] A. Serrano-Pozo, M. P. Frosch, E. Masliah, and B. T. Hyman, “Neuropathological Alterations in Alzheimer Disease,” *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, vol. 1, no. 1, pp. a006189–a006189, Sep. 2011.
- [13] L. Guilloreau, “Le complexe CuII Amyloïde-beta lie a la Maladie d’Alzheimer : Etude structurale, thermodynamique et reactivite,” Université Toulouse 3, 2007.
- [14] A. B. Clippingdale, J. D. Wade, and C. J. Barrow, “The amyloid-beta peptide and its role in Alzheimer’s disease.,” *J. Pept. Sci.*, vol. 7, no. 5, pp. 227–49, May 2001.
- [15] E. Karran, M. Mercken, and B. De Strooper, “The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer’s disease: an appraisal for the development of therapeutics.,” *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 10, no. September, pp. 698–712, 2011.
- [16] A. Clements, D. Allsop, D. M. Walsh, and C. H. Williams, “Aggregation and metal-binding properties of mutant forms of the amyloid Ab peptide of Alzheimer’s disease,” *J. Neurochem.*, vol. 66, no. 2, pp. 740–747, 1996.
- [17] T. Lührs *et al.*, “3D structure of Alzheimer’s amyloid-beta(1-42) fibrils.,” *Proc. Natl.*

- Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, no. 48, pp. 17342–7, Nov. 2005.
- [18] S. Laurent, M. R. Ejtehadi, M. Rezaei, P. G. Kehoe, and M. Mahmoudi, “Interdisciplinary challenges and promising theranostic effects of nanoscience in Alzheimer’s disease,” *RSC Adv.*, vol. 2, no. 12, p. 5008, 2012.
 - [19] M. Daoud and C. E. Williams, *Soft Matter Physics*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1999.
 - [20] J. Meglio, “La matière molle,” *Tech. l’ingénieur*, vol. 195, no. 1, pp. 1–9, 1994.
 - [21] É. Brézin and S. Balibar, *Demain, la physique*. Odile Jacob, 2004.
 - [22] R. Borsali and R. Pecora, *Soft Matter Characterization*. 2008.
 - [23] R. Garcia and R. Proksch, “Nanomechanical mapping of soft matter by bimodal force microscopy,” *Eur. Polym. J.*, vol. 49, no. 8, pp. 1897–1906, 2013.
 - [24] S. A. Hogan, I. B. O’Loughlin, and P. M. Kelly, “Soft matter characterisation of whey protein powder systems,” *Int. Dairy J.*, vol. 52, pp. 1–9, 2016.
 - [25] Y. Sen Sun, U. S. Jeng, Y. S. Huang, K. S. Liang, T. L. Lin, and C. S. Tsao, “Complementary SAXS and SANS for structural characteristics of a polyurethane elastomer of low hard-segment content,” *Phys. B Condens. Matter*, vol. 385–386 I, pp. 650–652, 2006.
 - [26] V. G. Sakai and A. Arbe, “Quasielastic neutron scattering in soft matter,” *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, vol. 14, no. 6, pp. 381–390, 2009.
 - [27] P. Coussot and C. Ancey, “Rheophysical classification of concentrated suspensions and granular pastes,” *Phys. Rev. E*, vol. 59, no. 4, pp. 4445–4457, 1999.
 - [28] E. Caplain, C. O. Ehssein, L. Martinez, S. Serfaty, P. Griesmar, and M. Gindre, “Gelation monitoring by quartz microbalance in pulse mode,” in *Ultrasonics Symposium, 2004 IEEE*, 2004, vol. 1, pp. 323–324.
 - [29] C. Ould-Ehssein *et al.*, “Ultrasonic monitoring of yoghurt formation by using AT-cut quartz: Lighting of casein micelles interactions process during the acidification,” *Ultrasonics*, vol. 44, pp. 875–879, 2006.
 - [30] E. Caplain, J.-M. Ringard, S. Serfaty, L. Martinez, N. Wilkie-Chancellier, and P. Griesmar, “Microrheological monitoring of life cycle of yeast cell *Saccharomyces Cerevisiae*,” in *Ultrasonics Symposium (IUS), 2011 IEEE International*, 2011, pp. 1514–1517.
 - [31] O. Colliot *et al.*, “Discrimination between Alzheimer disease, mild cognitive impairment, and normal aging by using automated segmentation of the hippocampus,” *Radiology*, vol. 248, no. 1, pp. 194–201, 2008.
 - [32] C. Luk, G. Giovannoni, D. R. Williams, A. J. Lees, and R. de Silva, “Development of a sensitive ELISA for quantification of three- and four-repeat tau isoforms in tauopathies,” *J. Neurosci. Methods*, vol. 180, pp. 34–42, 2009.
 - [33] M. El Mouedden, M. Vandermeeren, T. Meert, and M. Mercken, “Development of a specific ELISA for the quantitative study of amino-terminally truncated beta-amyloid peptides,” *J. Neurosci. Methods*, vol. 145, pp. 97–105, 2005.
 - [34] H. Mori *et al.*, “Tau in cerebrospinal fluids: establishment of the sandwich ELISA with antibody specific to the repeat sequence in tau,” *Neurosci. Lett.*, vol. 186, no. 2–3, pp. 181–183, Feb. 1995.
 - [35] E. Csernok and F. Moosig, “Current and emerging techniques for ANCA detection in

- vasculitis,” *Nat. Rev. Rheumatol.*, vol. 10, no. 8, pp. 494–501, 2014.
- [36] L. L. Jantzie, V. A. M. I. Tanay, and K. G. Todd, “Methods in immunochemistry,” *Handb. Neurochem. Mol. Neurobiol. Pract. Neurochem. Methods*, pp. 193–218, 2007.
- [37] E. Beleoken *et al.*, “SPRi-Based Strategy To Identify Specific Biomarkers In Systemic Lupus Erythematosus, Rheumatoid Arthritis and Autoimmune Hepatitis,” *PLoS One*, vol. 8, no. 12, pp. 1–10, 2013.
- [38] C. Nogues, H. Leh, C. G. Langendorf, R. H. P. Law, A. M. Buckle, and M. Buckle, “Characterisation of peptide microarrays for studying antibody-antigen binding using surface plasmon resonance imagery,” *PLoS One*, vol. 5, no. 8, pp. 1–6, 2010.
- [39] D. a. White, A. K. Buell, C. M. Dobson, M. E. Welland, and T. P. J. Knowles, “Biosensor-based label-free assays of amyloid growth,” *FEBS Lett.*, vol. 583, pp. 2587–2592, 2009.
- [40] J. P. Folkers, P. E. Laibinis, and G. M. Whitesides, “Self-Assembled Monolayers of Alkanethiols on Gold: Comparisons of Monolayers Containing Mixtures of Short- and Long-Chain Constituents with CH₃ and CH₂OH Terminal Groups,” *Langmuir*, vol. 8, pp. 1330–1341, 1992.
- [41] M. K. Mustafa, A. Nabok, D. Parkinson, I. E. Tothill, F. Salam, and A. Tsargorodskaya, “Detection of B-amyloid peptide (1-16) and amyloid precursor protein (APP770) using spectroscopic ellipsometry and QCM techniques: A step forward towards Alzheimers disease diagnostics,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 26, pp. 1332–1336, 2010.
- [42] X. R. Cheng, B. Y. H. Hau, A. J. Veloso, S. Martic, H.-B. Kraatz, and K. Kerman, “Surface Plasmon Resonance Imaging of Amyloid- β Aggregation Kinetics in the presence of Epigallocatechin gallate and Metals,” *Anal. Chem.*, 2012.
- [43] J. Ryu, H. Joung, M.-G. Kim, and C. B. Park, “Surface plasmon resonance analysis of Alzheimer’s beta-amyloid aggregation on a solid surface: from monomers to fully-grown fibrils,” *Anal. Chem.*, vol. 80, no. 7, pp. 2400–2407, 2008.
- [44] K. Ramanathan and B. Danielsson, “Principles and applications of thermal biosensors,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 16, no. 6, pp. 417–423, 2001.
- [45] J. V. Rushworth, A. Ahmed, H. H. Griffiths, N. M. Pollock, N. M. Hooper, and P. a. Millner, “A label-free electrical impedimetric biosensor for the specific detection of Alzheimer’s amyloid-beta oligomers,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 56, pp. 83–90, 2014.
- [46] T. H. S. Dhahi, U. D. a Bin Hashim, N. M. Ahmed, and a. Mat Taib, “A review on the electrochemical sensors and biosensors composed of nanogaps as sensing material,” *J. Optoelectron. Adv. Mater.*, vol. 12, pp. 1857–1862, 2010.
- [47] J. Kang, A. T. Hussain, M. Catt, M. Trenell, B. Haggett, and E. H. Yu, “Electrochemical detection of non-esterified fatty acid by layer-by-layer assembled enzyme electrodes,” *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 190, pp. 535–541, 2014.
- [48] D. Stan, C. M. Mihailescu, R. Iosub, C. Moldovan, M. Savin, and I. Baci, “Electrochemical studies of homogeneous self-assembled monolayers versus mixed self-assembled monolayers on gold electrode for ‘label free’ detection of heart fatty acid binding protein,” *Thin Solid Films*, vol. 526, pp. 143–149, 2012.
- [49] G. a. Campbell, M. B. Medina, and R. Mutharasan, “Detection of Staphylococcus enterotoxin B at picogram levels using piezoelectric-excited millimeter-sized cantilever sensors,” *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 126, pp. 354–360, 2007.

- [50] T. P. J. Knowles *et al.*, "Label-free detection of amyloid growth with microcantilever sensors.," *Nanotechnology*, vol. 19, p. 384007, 2008.
- [51] K. Lange, B. E. Rapp, and M. Rapp, "Surface acoustic wave biosensors: A review," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 391, no. 5, pp. 1509–1519, 2008.
- [52] M. V. Voinova, "On mass loading and dissipation measured with acoustic wave sensors," *J. Sensors*, p. 13, 2009.
- [53] E. Benes, M. Groschl, W. Burger, and M. Schmid, "Sensors based on piezoelectric resonators," *Sensors and Actuators A: Physical*, vol. 48, no. 1, pp. 1–21, 1995.
- [54] L. Kulinsky, Z. Noroozi, and M. Madou, "Microfluidic Diagnostics," *Methods Mol. Biol.*, vol. 949, no. 1, pp. 3–23, 2013.
- [55] Y. Hur, J. Han, J. Seon, Y. E. Pak, and Y. Roh, "Development of an SH-SAW sensor for the detection of DNA hybridization," *Sensors Actuators, A Phys.*, vol. 120, no. 2, pp. 462–467, 2005.
- [56] F. Di Pietrantonio *et al.*, "A Shear horizontal surface acoustic wave biosensor for a rapid and specific detection of d-serine," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 226, pp. 1–6, 2016.
- [57] M. J. Vellekoop, "Acoustic wave sensors and their technology," *Ultrason.*, vol. 36, no. 1–5, pp. 7–14, 1998.
- [58] R. Lanz, "Piezoelectric thin films for Bulk Acoustic Wave resonator applications: From processing to microwave filters," 2004.
- [59] B. Drafts, "Acoustic wave technology sensors," *IEEE Trans. Microw. Theory Tech.*, vol. 49, no. 4, pp. 795–802, 2001.
- [60] A. T. Petkova *et al.*, "A Structural Model for Alzheimer's β -Amyloid Fibrils Based on Experimental Constraints from Solid State NMR," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 99, no. 26, pp. 16742–16747, 2002.
- [61] A. T. Petkova, W. Yau, and R. Tycko, "Experimental Constraints on Quaternary Structure in Alzheimer's beta-Amyloid," *Biochemistry*, vol. 45, pp. 498–512, 2006.
- [62] A. K. Paravastu, R. D. Leapman, W.-M. Yau, and R. Tycko, "Molecular structural basis for polymorphism in Alzheimer's beta-amyloid fibrils.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 47, pp. 18349–18354, 2008.
- [63] S. Xu, K. R. Brunden, J. Q. Trojanowski, and V. M. Y. Lee, "Characterization of tau fibrillization in vitro," *Alzheimer's Dement.*, vol. 6, no. 2, pp. 110–117, 2010.
- [64] C. K. O'Sullivan and G. G. Guilbault, "Commercial quartz crystal microbalances - Theory and applications," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 14, no. 8–9, pp. 663–670, 1999.

Chapitre II : Conception et fabrication de transducteurs TSM

Sommaire

II.1	CONCEPTION DU CAPTEUR TSM A UNE ELECTRODE	50
II.1.1	<i>Caractérisation de la composition chimique</i>	52
II.1.2	<i>Caractérisation électrochimique.....</i>	53
II.1.3	<i>Caractérisation morphologique</i>	57
II.1.4	<i>Caractérisation physico-chimique : énergies d'activation</i>	60
II.1.5	<i>Caractérisation de la propagation de l'onde acoustique.....</i>	62
II.2	OPTIMISATION DU DESIGN POUR UN CAPTEUR A UNE ELECTRODE.....	65
II.2.1	<i>Intérêt et paramètres optimisés</i>	65
II.2.2	<i>Résultats de l'optimisation</i>	66
II.2.3	<i>Caractérisation du capteur optimisé.....</i>	69
II.3	DEVELOPPEMENT D'UN CAPTEUR MULTI-ELECTRODES.....	75
II.3.1	<i>Etat de l'art et design d'un capteur TSM multi-électrodes</i>	76
II.3.2	<i>Développement d'un capteur multi-électrodes</i>	78
II.4	CONCLUSION	92
II.5	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	93

Dans le chapitre précédent nous avons pu expliquer en quoi la polymérisation des protéines est un mécanisme pathologique commun aux maladies conformationnelles et en particulier à la maladie d'Alzheimer. La compréhension de ces mécanismes et *in fine* la possibilité de traitement sont intimement liées à l'existence d'outils permettant le suivi de ces réactions aux échelles micrométriques. Au vu des applications de diagnostic dans le domaine de la biologie, les capteurs à ondes de volume sont potentiellement pertinents car ils doivent permettre de suivre ces phénomènes dans un volume statistiquement significatif. Si les ondes utilisées comme vecteurs d'information sont des ondes de cisaillement, leurs modifications au cours de la propagation au sein d'un analyte donnent accès aux propriétés viscoélastiques à tout moment d'une cinétique. Par ailleurs, la détection de la formation des plaques qui découle de la pathologie est alors déterminante. Les capteurs TSM (Thickness Shear Mode) utilisés en tant que biocapteurs peuvent alors permettre de connaître l'avancement de la réaction et les constituants, laissant ainsi la possibilité d'un contrôle dynamique.

La réussite de mise au point d'un tel biocapteur suppose un contrôle des interactions à la surface du transducteur, c'est à dire à l'interface de l'électrode et du milieu investigué. Ces interactions déterminent la capacité du capteur à être sensible et sélectif. Elles dépendent de l'état de surface des électrodes, de leur constitution nécessitant éventuellement leur fonctionnalisation ou l'utilisation de plusieurs électrodes, et leur forme optimisant la génération des modes de cisaillement. L'objectif de ce chapitre consiste à étudier la sensibilité de ce type de capteur afin d'optimiser le biocapteur visé. Dans une première partie cette étude se focalisera sur un capteur à une électrode permettant de se concentrer sur l'effet de surface et de l'interaction naturelle des analytes avec l'or. La seconde partie développera un capteur multi-électrodes pour viser une détection multiple d'analytes de nature différente.

II.1 Conception du capteur TSM à une électrode

Le capteur étudié est un résonateur *TSM* (*Thickness Shear Mode*) utilisant un substrat de cristal de quartz (de coupe *AT*) excité par deux électrodes situées de part et d'autre du substrat. Afin de le mettre en œuvre, un retour de piste est réalisé sur la tranche du substrat pour permettre la prise de contact des deux électrodes du même côté du quartz. La Figure II-1 illustre une vue en coupe d'un capteur développé dans cette étude. On remarque sur le dessus du système l'électrode recto, sur laquelle seront effectués les dépôts lors des essais

expérimentaux. La prise de contact, l'alimentation du système et la récupération du signal sont effectuées à l'aide de pointes de touche à ressort.

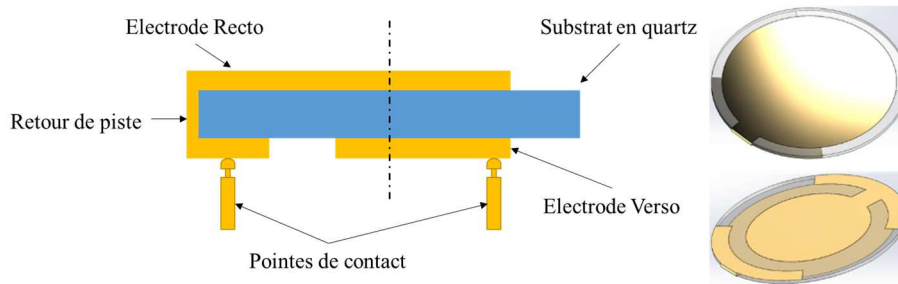


Figure II-1, à gauche, schéma de principe du capteur à ondes acoustiques, à droite, images de la face supérieure et antérieure du capteur à ondes acoustiques.

Nos capteurs ont été réalisés sur un substrat de quartz coupe *AT* d'un diamètre de 14 mm et d'une épaisseur de 270 μm . Les électrodes, quant à elles, sont composées d'une bicouche métallique de titane (30 nm) et d'or (200 nm). La fabrication a été réalisée dans la salle blanche du site de l'*ENS Rennes* en utilisant les techniques classiques en microfabrication présentée en Annexe D [65][66], permettant l'obtention de couches minces métalliques, et de créer les électrodes finales au design voulu par les étapes de photolithographie et de gravure. La Figure II-2 présente ainsi une photo des capteurs obtenus à la fin du procédé de fabrication.

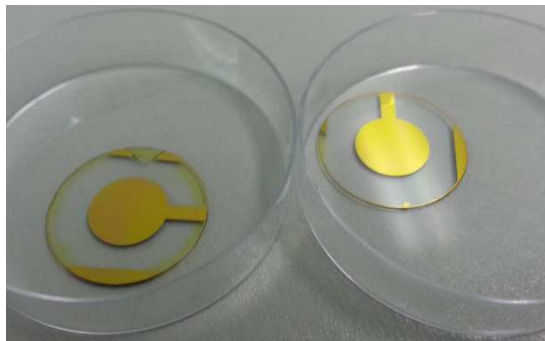


Figure II-2, Photo d'un capteur à une électrode sur un substrat de quartz piézoélectrique coupe *AT* (14 mm de diamètre, 270 μm d'épaisseur, surface de l'électrode 30 mm²).

Les capteurs sont ensuite caractérisés du point de vue électrochimique, morphologique, physico-chimique et mécanique. Ces phases de caractérisation ont pour rôle de valider le concept de fabrication des capteurs, mais également de caractériser l'état final des électrodes. Afin d'étudier les effets de surface, les caractéristiques de nos capteurs développés sont comparées à celles des meilleurs capteurs commerciaux dédiés au cisaillement de volume. Les capteurs de référence les plus pertinents sont les capteurs commerciaux de la marque *Q-sense®*.

II.1.1 Caractérisation de la composition chimique

La première étude réalisée a été de caractériser la composition chimique des capteurs réalisés. Pour cela, une analyse élémentaire par spectrométrie de rayons X a été réalisée sur des substrats métallisés par une couche de 30 nm de titane et une couche de 200 nm d'or, suivant le protocole expérimental présenté en Annexe D. La Figure II-3 présente une micrographie MEB de la surface de l'échantillon caractérisé, elle montre une surface homogène.

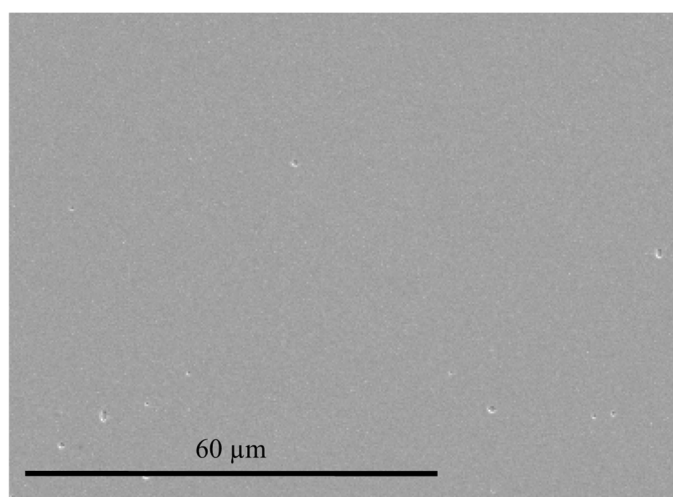


Figure II-3, Micrographie MEB, observation de la couche supérieure d'or du substrat métallisé.

L'analyse par spectrométrie de rayons X est effectuée à partir de la micrographie précédente, et le spectre obtenu est présenté à la Figure II-4. Les résultats montrent la présence majoritaire d'or sans trace de Ti, ce qui permet de conclure que le titane ne diffuse pas dans la couche d'or et que les dépôts sont homogènes.

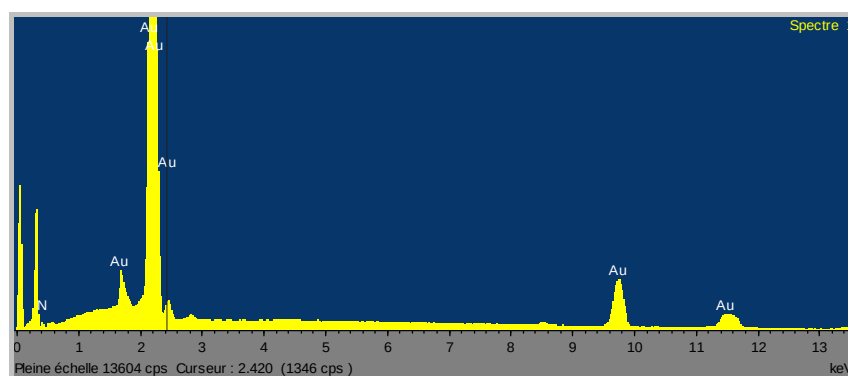


Figure II-4, Spectre RX de la couche d'or de l'échantillon caractérisé.

II.1.2 Caractérisation électrochimique

La seconde étude effectuée a été de caractériser électrochimiquement les électrodes du capteur afin d'évaluer la qualité du signal électrique de l'électrode d'or. Pour cela, un cycle de voltammétrie cyclique, consistant à la mesure d'une densité de courant à partir d'une variation de potentiel électrique contrôlée sur l'électrode, est réalisé [45], [48], [67]. La Figure II-5 donne le schéma du montage expérimental pour la réalisation d'une analyse par voltammétrie cyclique. Il se compose de trois électrodes : (i) l'électrode de travail qui est constituée par le capteur, (ii) l'électrode de référence (calomel saturé en chlorure de potassium), permet de contrôler le potentiel appliqué à l'électrode de travail, (iii) la contre électrode (en platine) permet de mesurer le courant dans la cellule électrochimique. La tension est appliquée à l'aide d'un potentiostat et une solution électrolytique, du *PBS (Phosphate Buffered Saline)*, qui est un tampon phosphate couramment utilisé dans les études électrochimiques, sert pendant les phases de caractérisation.

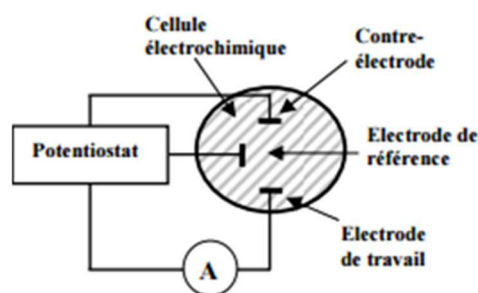


Figure II-5, Schéma du dispositif expérimental pour les mesures de voltammétrie cyclique.

Le balayage de potentiel est effectué entre -1 V et $1,5\text{ V}$, limites d'hydrolyse de l'eau. Une série de 5 cycles de balayage est effectuée pour obtenir une bonne réponse de la surface métallique à caractériser. En effet, le premier cycle servant d'activation de la surface et d'oxydation de cette dernière, les quatre cycles suivants servent à la prise mesure à proprement parlé de la densité de courant. Le voltamogramme ainsi obtenu est présenté à la Figure II-6. Nous pouvons remarquer que le signal est celui spécifique à l'or pur sans matériau ajouté [68]. Nous pouvons également constater l'absence de pic spécifique au titane, ce qui nous permet de confirmer l'homogénéité et la bonne qualité de la surface d'or fabriquée, et ce sans diffusion du titane dans la couche d'or.

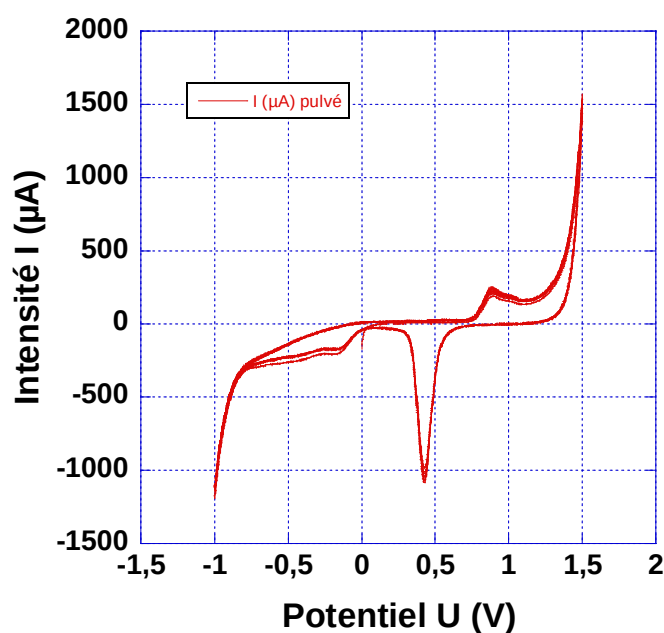


Figure II-6, Signal de l'électrode en or (électrode de travail) obtenu par voltammétrie cyclique (balayage de potentiel entre - 1 V et 1,5 V, vitesse de balayage 100 mV.s⁻¹).¹

II.1.2.1 Comparaison des dépôts d'or obtenus par pulvérisation cathodique et par évaporation par effet Joule

Afin de comparer la qualité de l'or obtenu suivant les deux procédés de dépôts, des voltamogrammes ont été effectués suivant les mêmes conditions expérimentales. Des lames de verre de microscope ont été métallisées pour obtenir des couches de titane et d'or avec des consignes d'épaisseurs répondant au cahier des charges pour la fabrication des capteurs (épaisseur de 30 nm de titane et de 200 nm d'or). Les signaux obtenus sont présentés à la Figure II-7. Nous pouvons remarquer que les deux signaux obtenus se superposent. L'absence de pics spécifiques au titane permet également de confirmer que la conductivité de l'or n'est pas diminuée par la couche de titane quel que soit le procédé de métallisation.

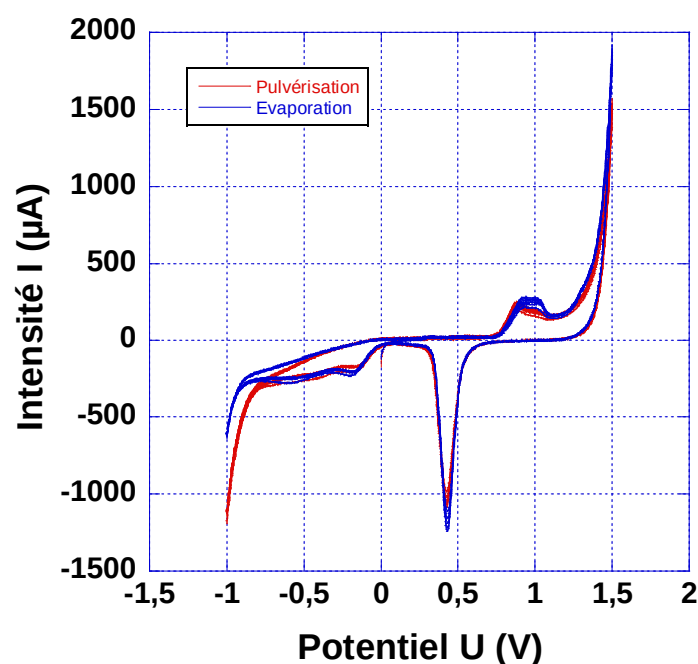


Figure II-7, Signaux de l'or suivant le processus de métallisation. En bleu, le signal pour l'échantillon obtenu par évaporation, et en rouge le signal obtenu par pulvérisation (balayage de potentiel entre -1 et 1,5 V, vitesse de balayage 100 mV.s^{-1}).

II.1.2.2 Effet de la surface et de l'épaisseur de l'électrode sur la qualité du signal de réponse

Afin d'étudier l'influence du design des électrodes, nous avons fait varier la surface des électrodes, mais également l'épaisseur de la couche d'or. Dans le cadre de l'étude sur les épaisseurs, seule l'épaisseur d'or sera modifiée, l'épaisseur de titane restera inchangée pour ne pas remettre en cause la cohésion des couches minces composant le capteur. La Figure II-8 met en évidence les signaux obtenus pour ces deux études. Dans un premier cas, nous pouvons remarquer que pour des épaisseurs d'or variant de 100 nm à 1 μm , une très faible variation de densité est observée. Dans le cadre des surfaces différentes, à savoir des surfaces variant entre 1 et 2 cm^2 . Les signaux ont la même tendance, cependant, une diminution de moitié du signal pour l'électrode de 1 cm^2 est observée par rapport à l'électrode deux fois plus grande. Ce qui est une conséquence normale de la modification de la surface des électrodes, puisque l'intensité mesurée est proportionnelle à la surface de l'électrode [69].

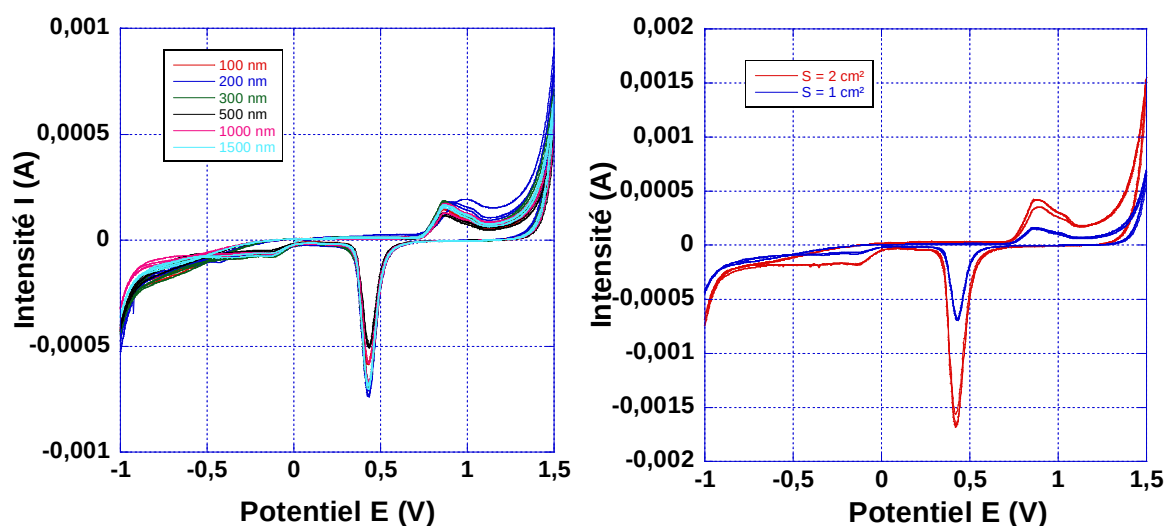


Figure II-8, Signal de l'or en fonction de l'épaisseur et la surface de l'électrode. A gauche, signaux en fonction de l'épaisseur d'or, à droite, signaux de l'or en fonction de la surface des électrodes (balayage de potentiel entre -1 et 1,5 V, vitesse de balayage de 100 mV.s⁻¹).

II.1.2.3 Effet de la vitesse de balayage

Pour identifier l'effet de la vitesse de balayage, des mesures ont été effectuées en installant des échantillons métallisés par pulvérisation cathodique dans une cellule de mesure électrochimique à trois électrodes remplie d'une solution électrolytique d'hexacyanoferrate de potassium. La vitesse de balayage va ainsi varier entre 12,5 mV/s à 100 mV/s. La Figure II-9 regroupe les courbes tracées à partir de la solution d'hexacyanoferrate de potassium pour les différentes vitesses de balayages. Quelle que soit la vitesse (12,5 ; 25 ; 50 et 100 mV/s), les courbes obtenues ont la même allure mais lorsque la vitesse diminue les pics sont moins prononcés, la couche de diffusion ayant moins de temps pour se développer et atteindre une forme hémisphérique. On retrouve les étapes caractéristiques de réduction et d'oxydation de l'hexacyanoferrate. On vérifie que la réponse du signal du capteur dépend linéairement de la vitesse de balayage, ainsi comme le montre la courbe de droite de la Figure II-9, qui donne l'évolution de l'intensité maximale mesurée pendant le balayage en potentiel I_{pic} en fonction de la vitesse de balayage. Cette étude électrochimique permet de caractériser de manière rapide les électrodes fabriquées et vérifier que la totalité de la surface de l'électrode est active. Ces mesures permettent notamment de vérifier rapidement l'indépendance des électrodes dans le cas d'un système multi-électrodes.

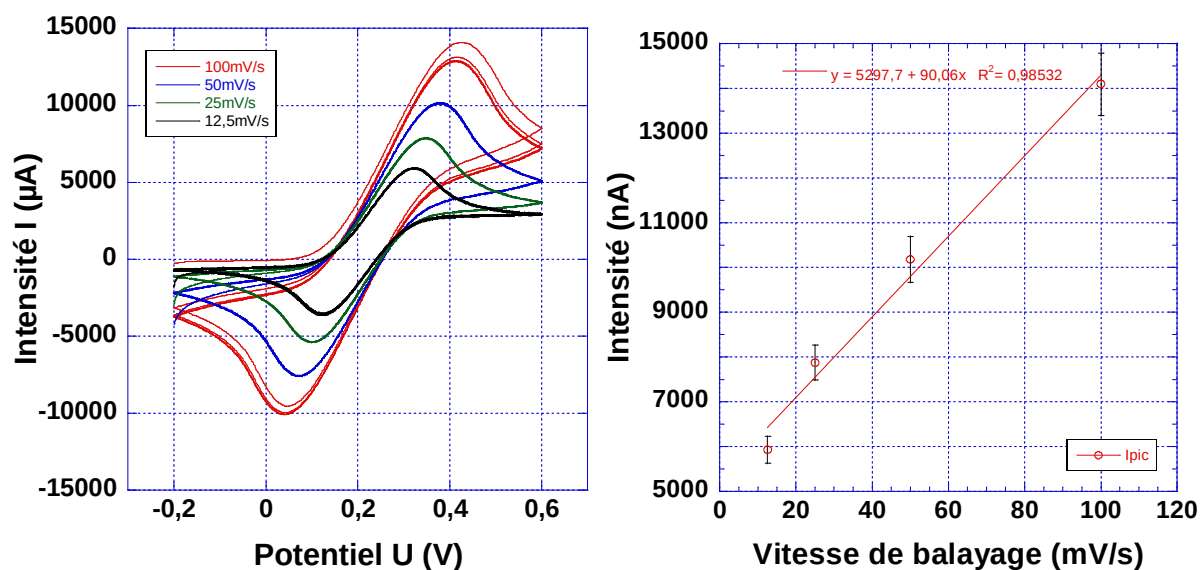


Figure II-9, Influence de vitesse de balayage sur une électrode d'or ronde de 30 mm² de surface. A gauche, voltampérogramme en fonction de la vitesse de balayage. A droite, variation de l'intensité I_{pic} en fonction de la vitesse de balayage.

II.1.3 Caractérisation morphologique

La qualité de la réponse du signal dépend de l'état morphologique de l'électrode. En effet, augmenter la rugosité permettra d'augmenter la surface d'échange entre l'électrode et l'analyte à caractériser mais peut diminuer la conductivité. Ainsi la rugosité de l'électrode doit être étudiée et un compromis doit être trouvé entre la rugosité de l'électrode et la réponse électrique de cette dernière. Dans cette partie seront présentés les résultats concernant la caractérisation topologique de la surface ainsi que son optimisation.

II.1.3.1 Méthode expérimentale

La rugosité R_a est par définition la moyenne arithmétique de toutes les ordonnées du profil à l'intérieur d'une longueur de balayage, exprimée en nm, elle est définie par (5)

$$R_a = \frac{1}{l} \int_0^l |y(x)| dx \quad (5)$$

Expérimentalement, la rugosité est obtenue grâce à un profilomètre à pointe diamantée qui se déplace latéralement sur une longueur définie de la surface de l'échantillon. Un capteur, solidaire de la pointe diamantée, détermine l'ordonnée de chaque point balayé en abscisse. Un traitement du signal permettra ainsi d'obtenir la valeur de rugosité R_a .

Le profilomètre utilisé pour cette caractérisation est un *Alpha-Step IQ* (KLA-Tencor).

Afin d'avoir une valeur de rugosité convenable, les longueurs de balayage sont comprises sur une plage allant de 500 μm à 1,5 mm.

II.1.3.2 Etude de la rugosité des échantillons.

Des profils de rugosité sont ainsi établis pour les substrats de quartz sans métallisation puis pour les dépôts des différentes couches métalliques composant l'électrode finale sur des plages de 500 μm . Le Tableau 1 présente les valeurs moyennes obtenues dans cette première étude, et sont déterminées à la suite d'une série de 10 mesures de rugosité sur les différents échantillons.

Nature de la surface	Valeur de rugosité moyenne (nm)
Nu	0,70
Dépôt de titane	0,77
Dépôt d'or	0,65

Tableau 1, Rugosité moyenne suivant l'état de surface.

Les couches de titane et d'or déposées ont une rugosité moyenne qui varie de 10 % avec le substrat nu.

II.1.3.3 Optimisation de la rugosité

Une des pistes pour l'amélioration de l'état de surface des électrodes, et donc à terme l'amélioration de la réponse électrique du capteur, est le traitement de surface des électrodes. L'effet escompté des traitements de surface est l'augmentation des aspérités de surface des électrodes, et donc l'augmentation de la surface d'échange entre les électrodes et les solutions biologiques à tester. Pour ce faire, des essais de modifications physiques de surface ont été mis en place en se basant sur la technologie de traitement de surface par plasma [70]. Le bâti de plasma utilisé, bâti RIE 300W du fabricant VAS, nous permet un contrôle des paramètres expérimentaux assurant une diversité de conditions expérimentales. Ainsi, il nous est possible de modifier la source de gaz du plasma, le temps de traitement, la pression dans l'enceinte du bâti ou encore la puissance du plasma. Le gaz utilisé dans cette étude est l'oxygène.

Une première étude a été de vérifier l'influence de la puissance des plasmas sur la surface. Pour cela, des traitements de surface ont été réalisés sur des échantillons métallisés en faisant varier la puissance de traitement entre 0 et 300 W avec des temps de traitement de 10 min. Pour quantifier l'effet du plasma, les surfaces traitées sont caractérisées par des mesures de rugosité. La Figure II-10 présente les résultats.

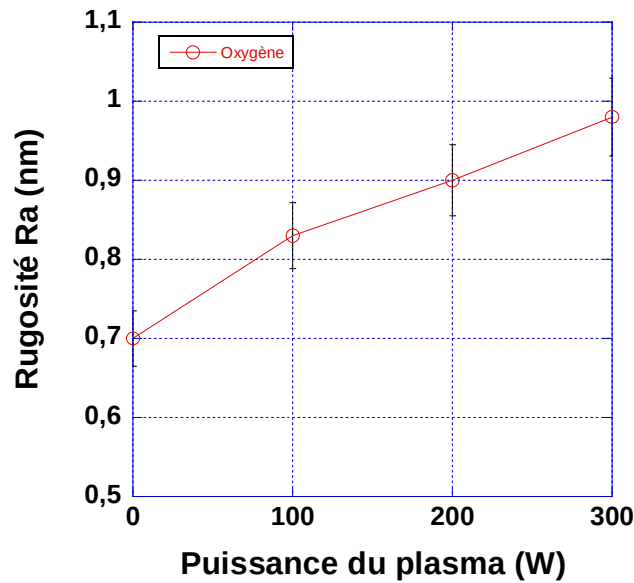


Figure II-10, Effet des plasmas argon et oxygène sur la topologie de surface de quartz métallisés avec des couches Ti/Au.

Nous pouvons remarquer une augmentation de la rugosité de près de 0,30 nm avec le plasma à l'oxygène. D'autres expériences faisant varier le temps de traitement et la puissance du plasma (Figure II-11), ont été menées avec le plasma oxygène. On voit que pour les deux valeurs de puissance de plasma, la rugosité des échantillons augmente à partir d'un temps de traitement de 10 min. Les valeurs limites n'ont pas été évaluées. Les modifications de surface observables dans le cas du plasma oxygène sont dus à la réaction chimique engendrée par l'oxygène sur la surface d'or.

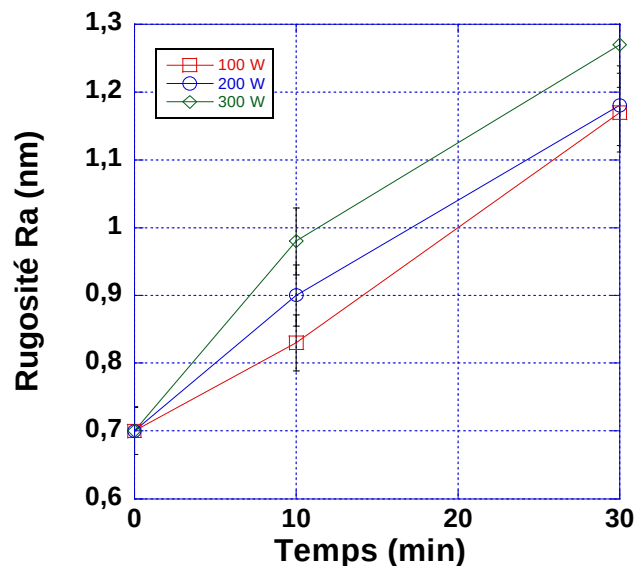


Figure II-11, Effet du plasma oxygène sur la surface de l'échantillon en fonction du temps et de la puissance du traitement de surface.

Cependant il a été observé que ces traitements de surface pouvaient affecter une autre

propriété physique, à savoir l'énergie de surface, c'est à dire le caractère hydrophile et hydrophobe. Afin d'évaluer les énergies d'activation, des analyses de mouillabilité avec la détermination de l'énergie de surface ont été réalisées.

II.1.4 Caractérisation physico-chimique : énergies d'activation

Les modifications de surface par plasma peuvent engendrer des changements topologiques et physiques de la surface des capteurs. Afin d'évaluer ces modifications physiques, des mesures d'énergie de surface ont été réalisées qui nous permettront de réaliser le traitement correspondant à une sensibilité maximale du capteur.

Dans un objectif de traitement non-invasif et biocompatible du substrat, les voies sèches (et particulièrement les procédés plasmas) ont été privilégiées dans la mise en œuvre des microcapteurs.

II.1.4.1 Technique de mesure

Un bâti *Plasma Cleaner* (Harrick)¹ et le bâti de *RIE*, précédemment présenté, ont permis de générer des plasmas pour traiter et graver les surfaces. Ce sont des techniques de modification de surface à basse pression où l'apport d'énergie est de type électrique radiofréquences à 13,56 MHz. Il s'agit d'entretenir une décharge basse pression, responsable de l'accélération des électrons et de l'ionisation des atomes et des molécules du gaz utilisé [71]. Une torche à plasma atmosphérique froid (*ULS*)² a également permis de traiter les surfaces (Collaboration avec l'*ECAM Rennes*).

La mouillabilité désigne le caractère hydrophile ou hydrophobe d'une surface. Afin de caractériser cette propriété pour un matériau donné, il s'agit de déposer une goutte d'un liquide polaire et d'un liquide non polaire, de volume déterminé, à la surface du substrat à caractériser, de mesurer les dimensions (diamètre et hauteur) de la goutte déposée et de déterminer la valeur de l'angle de contact et de l'énergie de surface à partir d'une régression linéaire du modèle d'Owens-Wendt [72]. Ce modèle tient compte d'un bilan énergétique décliné par une énergie polaire et une énergie dispersive. Ainsi, il est possible de caractériser les propriétés de la surface déposée par la mesure de l'énergie de surface après modification à l'aide du plasma. En vue d'une augmentation de la sensibilité finale du capteur, une optimisation de l'état de surface (par exemple pour faciliter le contact entre le substrat et la

¹ Avec le plasma Cleaner, les modifications de surface sont faites par plasma air à puissance constante ($P = 30 \text{ W}$) et source de gaz constante.

² Pour la torche, la distance surface-torche, la vitesse de déplacement et le nombre de passage sont ajustables.

couche déposée) devient alors possible par un apport régulé d'atomes intermédiaires comme l'oxygène [73], [74] ou l'azote [75].

II.1.4.2 Energie de surface pour différents traitements de surfaces

Afin d'optimiser la sensibilité des capteurs, des mesures d'énergies de surface modifiées avec différents traitements ont été réalisées sur les transducteurs (substrat de quartz 1 pouce, une électrode ronde sur chaque face de surface 18 mm^2). Par rapport à un traitement de surface par UV^3 , il apparaît clairement sur la Figure II-12 pour deux types de plasma, air et oxygène (à la même puissance), que les traitements plasmas augmentent l'énergie de surface et qu'une valeur optimale est atteinte à 11 minutes.

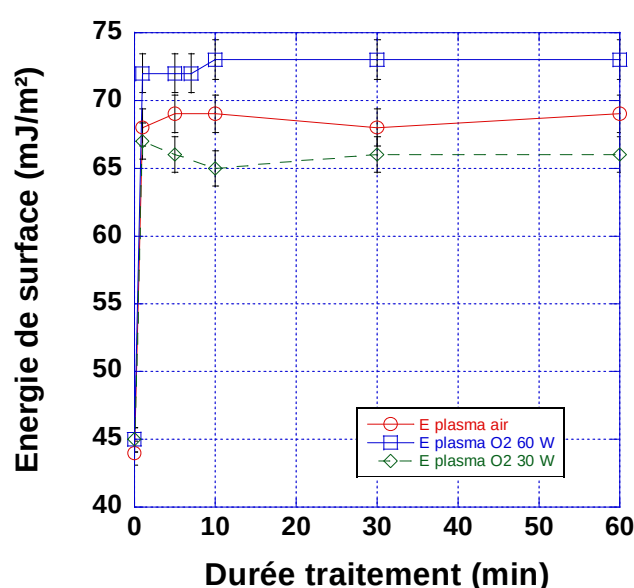


Figure II-12. Variation de l'énergie de surface en fonction de la durée de traitement sur transducteur piézoélectrique pour des traitements de surface par plasma O_2 à 30 et 60 W et par plasma air.

La Figure II-13 montre la répartition entre énergies polaires et dispersives (modèle d'Owens-Wendt) pour un traitement plasma Oxygène à 60 W et à différents temps de traitement. L'énergie dispersive apparaît constante et c'est l'énergie polaire qui varie en fonction du temps de traitement. C'est cette énergie qu'il convient d'adapter en fonction des propriétés de surface souhaitées.

³ Une autre possibilité permettant de modifier les interfaces et leurs énergies de surface est celle d'utiliser une lampe UV (de type NU-6 KL société Benda). Elle possède deux sources d' UV de longueur d'onde de 366 nm et 405 nm et une puissance nominale de 6W, dans notre cas.

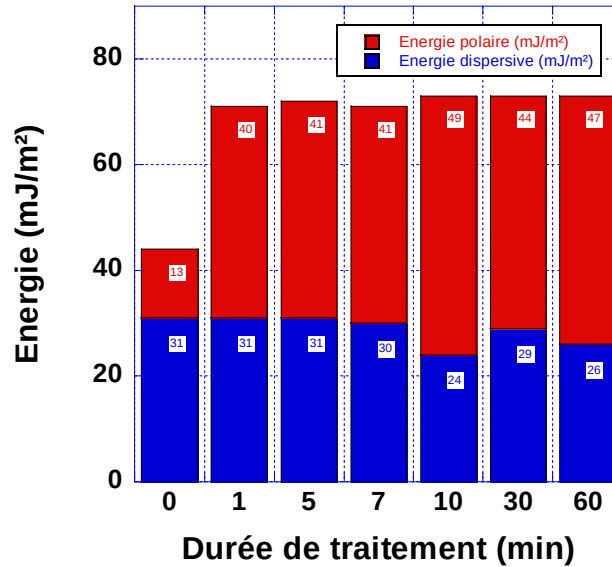


Figure II-13. Répartition des énergies pour un traitement de surface au plasma oxygène à 60 W.

Il apparaît ainsi qu'à partir de 10 min de traitement et pour un plasma d'une puissance de 60 W, les propriétés physiques, représentées par l'énergie de surface cessent d'évoluer et semble avoir atteint un maximum. Ainsi, dans la suite de ce travail de thèse, afin d'optimiser l'état de surface des capteurs, des traitements par plasma respectant les conditions expérimentales optimales ci-dessus seront effectués.

II.1.5 Caractérisation de la propagation de l'onde acoustique

L'un des points importants pour réaliser des capteurs à ondes acoustiques est de caractériser la propagation des ondes dans le quartz. En utilisant un système de mesure en vibrométrie laser associée à un traitement de signal dédié, les modes de vibrations peuvent être déterminés dans le quartz.

II.1.5.1 Banc de mesure de vibrométrie laser

La technique de vibrométrie laser permet de réaliser un balayage de la surface du transducteur afin de suivre la propagation des ondes au sein de ce dernier, tout en ayant un aspect non destructif, puisque cette technique utilise un laser n'affectant en rien la surface du capteur à caractériser [76], [77].

Le banc de mesure est constitué de différents systèmes pour la réalisation des mesures. En effet, cette technique de mesure, schématisée à la Figure II-14, consiste à *scanner* la surface du capteur avec le faisceau d'un vibromètre laser pendant que le quartz est excité par un générateur d'impulsion de tension. Le balayage du faisceau est réalisé par le montage de la

cible sur une platine permettant les translations dans le plan (X, Y) .

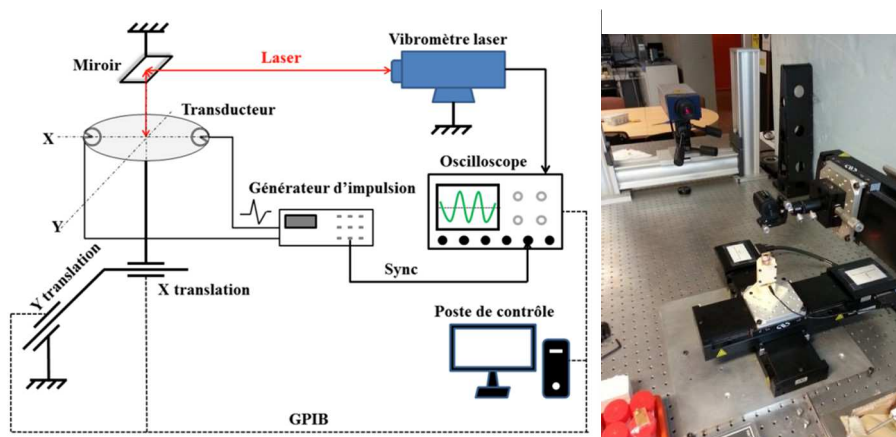


Figure II-14, A gauche, schéma du banc de vibrométrie laser. A droite, photographie du montage expérimental.

Chaque partie de ce banc peut être identifiée suivant sa fonction :

- Déplacement mécanique, qui est assuré par la platine motorisée permettant le balayage de la surface du quartz dans le plan (X, Y) ;
- Excitation du quartz, avec le générateur d'impulsion qui autorise l'excitation suivant deux modes spécifiques, en impulsion et en mode sinusoïde permanent ;
- Détection optique du signal. Dans cette partie, un faisceau laser est émis par un vibromètre laser, est envoyé sur le capteur puis réfléchi pour être de nouveau détecté par le vibromètre laser ;
- Acquisition des données. Cette partie est assurée par l'oscilloscope qui récupère le signal transmis par le vibromètre laser. Grâce à l'ordinateur qui contrôle l'oscilloscope, il va être possible de récupérer, traiter et analyser les données expérimentales.

A l'issue des mesures, un traitement des données par transformée de Fourier est réalisé pour pouvoir observer la réponse mécanique du transducteur étudié. Un balayage de la surface permet l'acquisition des signaux temporels $S(x, y, t)$. En réalisant une transformée de Fourier 1D du signal $S(x, y, t)$, le comportement fréquentiel des ondes de surface $W(x, y, \omega)$ est évalué. En réalisant une deuxième transformée de Fourier des signaux $W(x, y, \omega)$, le nombre d'onde $K(k_x, k_y, \omega)$ est extrait (Figure II-15).

$$S(x, y, t) \xrightarrow[t]{1D \text{ FFT}} W(x, y, \omega) \xrightarrow[x, y]{2D \text{ FFT}} K(k_x, k_y, \omega)$$

Figure II-15, Traitement du signal associé lors de l'étude du comportement mécanique du capteur en utilisant la technique de vibrométrie laser.

II.1.5.2 Cas d'un capteur à électrodes rondes

Une analyse comportementale du transducteur à électrodes rondes est effectuée. Afin d'obtenir une analyse complète du capteur, le balayage est effectué sur un carré de 15 x 15 mm de côté, permettant le balayage de la surface totale. Une largeur complète comprend 150 acquisitions, chaque acquisition étant faite par pas de 0,1 mm. De plus, la durée de détection est de 200 μ s avec un pas temporel de 20 ns ce qui permet d'avoir un nombre total de points d'acquisition de 10000.

La Figure II-16 montre l'ensemble des résultats pour un capteur possédant des électrodes rondes. Nous pouvons remarquer grâce à l'analyse spatio-temporelle la génération des ondes à partir de la frontière de l'électrode. Entre $t = 2 \mu$ s et $t = 2,25 \mu$ s, l'onde générée se propage dans deux directions spécifiques, la première dans le sens de la normale à la frontière, et la seconde dans le sens opposé. A partir des résultats (b), donnant le comportement spatio-fréquentiel, nous pouvons observer les différents modes de résonance en fonction de la fréquence. Les signaux donnant le nombre de l'onde permettent d'étudier les caractéristiques de dispersion des ondes générées et sont présentés en (c) de la Figure II-16. On constate ainsi que pour les fréquences présentées, les ondes se propagent dans toutes les directions, avec le même nombre d'onde K , puisque nous pouvons voir la formation d'un cercle dans le plan présenté.

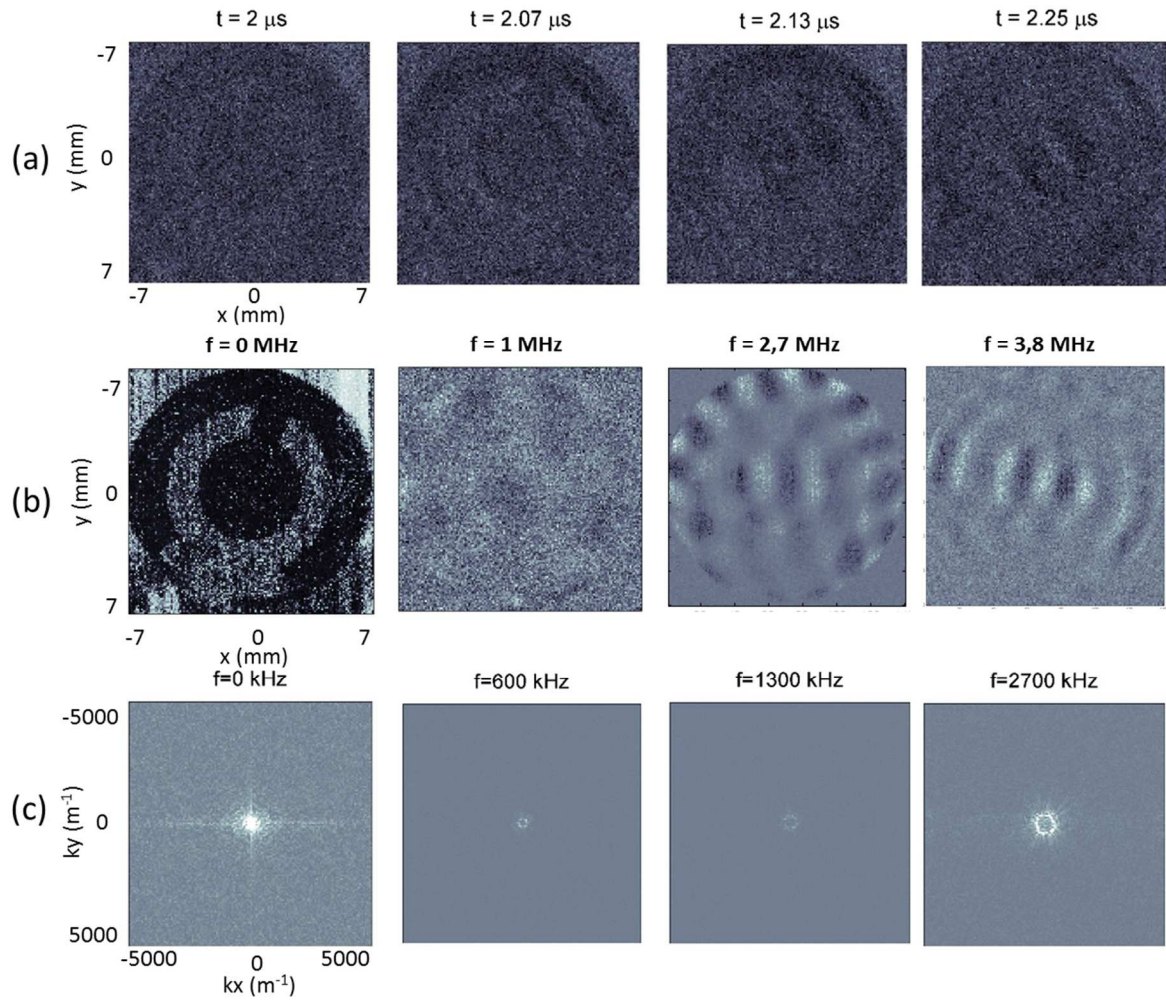


Figure II-16, Comportement mécanique d'un capteur à ondes acoustiques de volume possédant des électrodes rondes, (a) comportement spatio-temporel, (b) comportement spatio-fréquentiel et (c) évolution du nombre d'onde en fonction de la fréquence.

II.2 Optimisation du design pour un capteur à une électrode

II.2.1 Intérêt et paramètres optimisés

Après l'amélioration des caractéristiques du capteur avec l'optimisation des techniques de fabrication et de la surface de l'électrode, un point reste à optimiser : le design de l'électrode. Des études antérieures [78] ont montré que les formes permettant de maximiser le déplacement de l'amplitude de l'onde pour les électrodes étaient les formes elliptiques.

En considérant une électrode elliptique, de demi-petit axe b et de demi-grand axe a (Figure II-17 a) l'optimisation a été réalisée en faisant varier le paramètre a , tout en conservant constante l'aire A_0 de l'électrode avec une première contrainte sur l'obtention

d'une amplitude maximale de l'onde de cisaillement. Cette variation de paramètres a été effectuée avec le logiciel *COMSOL Multiphysics 5.2* dont les outils de modélisation ont été vérifiés préalablement par des confrontations entre le modèle et des expérimentations. Une idée du maillage est donnée en Figure II-17 b.

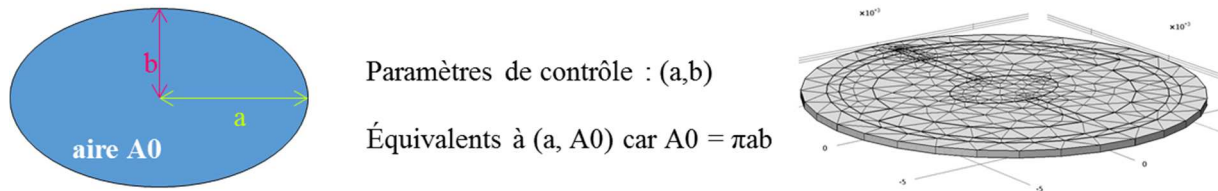


Figure II-17, A gauche, schématisation de l'électrode ovale avec ses paramètres. A droite, modélisation par éléments finis du capteur.

II.2.2 Résultats de l'optimisation

La simulation permet de tracer l'impédance du quartz (R_c et X_c) en fonction de la fréquence pour le système à vide et d'obtenir le champ de déplacement de la surface du quartz aux différentes fréquences. La Figure II-18 donne l'impédance électrique du système entre 17,9 MHz et 18,05 MHz. L'harmonique 3 est clairement identifiée à 17,94 MHz, deux autres pics correspondant aux deux modes suivants sont également visibles. Les figures (a), (b) et (c) de la Figure II-18 donnent également les champs de déplacement pour les différents modes.

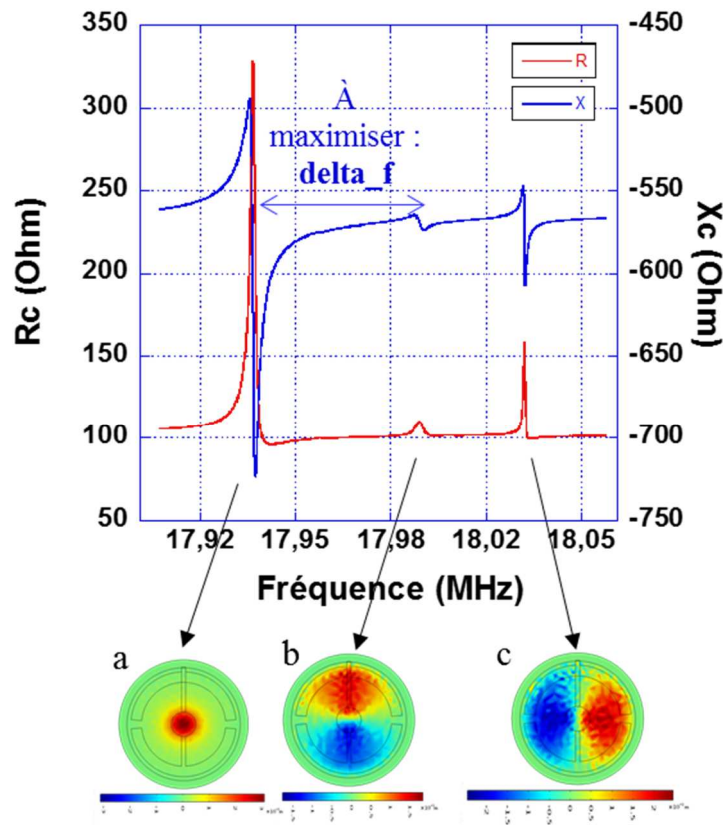


Figure II-18, Parties réelle et imaginaire en fonction de la fréquence pour un capteur vide. Champ de déplacement de la surface du quartz aux différentes fréquences, (a) 3^{ème} harmonique, (b) et (c) modes parasites liés aux électrodes.

Notons sur la Figure II-18 la variation de fréquence Δf , qui est la variation entre l'harmonique et le premier mode. Lors de l'optimisation des dimensions de l'électrode, la deuxième contrainte consistait à maximiser cette variation Δf afin d'éviter toute superposition des pics correspondant à la fréquence de résonance et les pics des modes parasites. Afin d'optimiser le paramètre de l'étude, plusieurs simulations ont été réalisées en faisant varier les paramètres géométriques des électrodes elliptiques du capteur. Ainsi, différentes surfaces A_0 d'électrodes ont été testées, avec des surfaces comprises entre 6.2 mm² et 50.3 mm². Puis, pour chaque valeur de surface A_0 , le demi-grand axe a varie de 0.5 mm à 5 mm, ce qui confère à l'électrode un aspect vertical pour les faibles valeurs de demi-grand axe et un aspect horizontal pour les valeurs plus importantes de demi-grand axe. Les résultats de l'optimisation sont présentés à la Figure II-19.

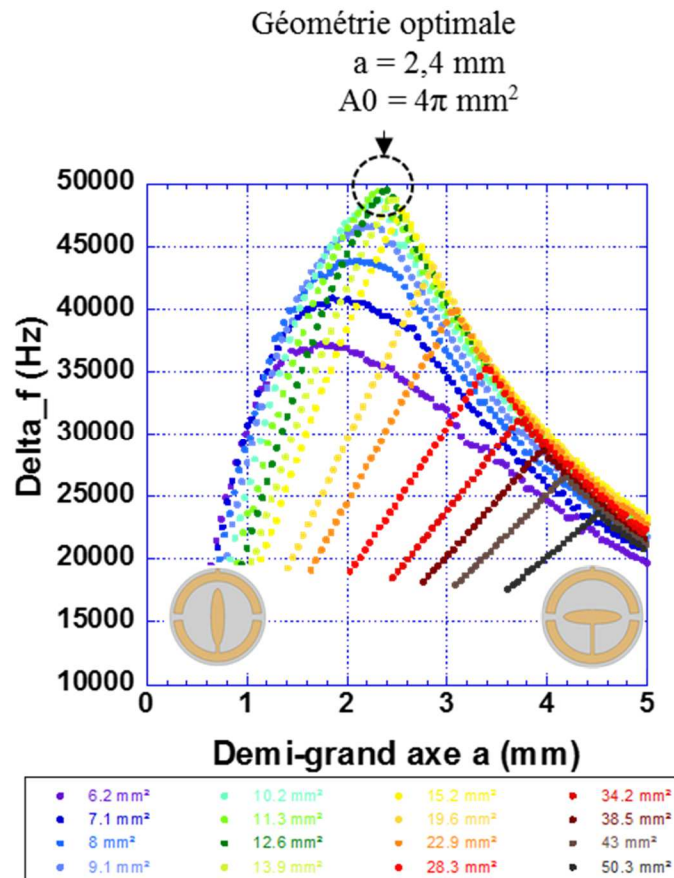


Figure II-19, Optimisation du paramètre Δf en fonction de la longueur de demi-grand axe a de l'ellipse.

Nous pouvons remarquer que chaque courbe présente un optimum, c'est-à-dire qu'un maximum de la valeur de Δf est atteint. Cependant, cet optimum varie fortement en fonction de l'aire de l'électrode. Ainsi, pour des aires comprises entre 6.2 et 11.3 mm², l'optimum de Δf croît. Le maximum de Δf est atteint pour une surface d'électrode de 12.6 mm², puis tend à décroître pour des surfaces strictement supérieures à 12.6 mm². Ainsi, pour présenter un design optimal, les capteurs doivent avoir des électrodes de 12.6 mm², avec un demi-grand axe a de 2.4 mm et un demi-petit axe b de 1.7 mm. La Figure II-20 schématise l'électrode aux dimensions optimisées.

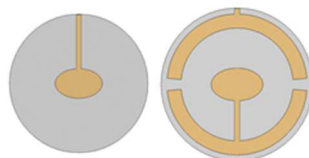


Figure II-20, Transducteur avec une électrode de forme elliptique. A gauche, électrode du dessus, à droite, électrode du dessous et retour de piste pour la prise de contact.

Les dimensions optimales déterminées, la fabrication d'un capteur correspondant aux caractéristiques optimales est réalisée et la comparaison entre un capteur à électrode ronde et électrode elliptique est effectuée. Pour cela, il s'agit de charger le capteur avec une solution

d'eau/glycérol et de mesurer les paramètres R_c et X_c en fonction de la fréquence pour chaque capteur en comparant les résultats obtenus pour les différents designs. La partie gauche de la Figure II-21 donne le relevé de la partie réelle en fonction de la fréquence pour le capteur optimisé et le capteur à électrode ronde, chargés avec une solution d'eau et de glycérol à 90 % en masse de glycérol. Une atténuation de l'harmonique 3 est observable mais elle est moins importante pour le design optimisé que pour électrode ronde. Sur la courbe de droite de la Figure II-21, il est présenté la partie imaginaire X_c de l'impédance pour les deux types d'électrodes. Il apparaît clairement que les deux pics de fréquence sont plus distincts dans le cas de l'électrode elliptique, et présentent des signaux de plus fortes intensités que pour le capteur possédant une électrode ronde, ce qui confirme l'obtention d'un signal de meilleure qualité pour le capteur dont le design a été optimisé que pour le design rond.

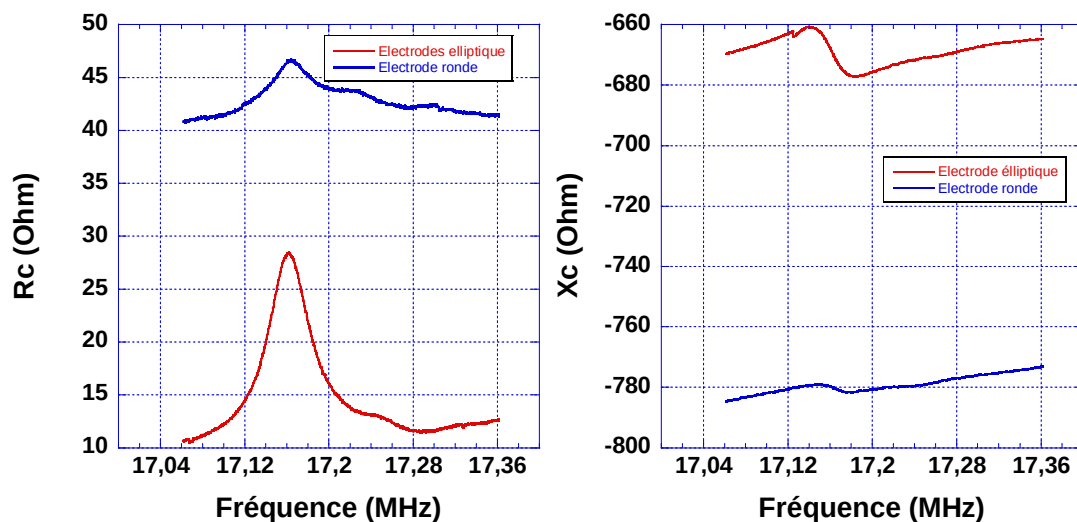


Figure II-21, à gauche, parties réelles des capteurs en fonction de la fréquence pour les designs rond et elliptique d'électrodes chargées par une solution de 90% en masse de glycérol (en rouge, électrode elliptique et en bleu, électrode ronde). À droite, parties imaginaires des capteurs en fonction de la fréquence pour différents designs d'électrode chargé par une solution de 90% en masse de glycérol (en rouge, électrode elliptique et en bleu, électrode ronde).

II.2.3 Caractérisation du capteur optimisé

II.2.3.1 Reproductibilité et répétabilité des mesures

La première campagne d'essai a été effectuée pour s'assurer du caractère répétable et reproductible des détectations du capteur fabriqué. Pour cela, des dépôts et retraits successifs de différents volumes d'eau (liquide de référence connu) ont été effectués à intervalles réguliers. La Figure II-22 nous donne le suivi fréquentiel de ces répétitions de dépôts/retraits à la surface du quartz. Dans le cadre du volume de 10 μ L (courbe rouge), après un suivi fréquentiel à vide pendant 2 min, 10 μ L d'eau sont déposés sur le capteur à l'aide d'une micropipette. Ce dépôt est maintenu pendant 20 minutes à la surface du quartz afin d'avoir

une stabilisation du système. Au bout de 20 min, l'eau est retirée pendant 5 min, puis un nouveau dépôt est effectué. Cette opération est répétée 4 fois de suite afin de vérifier le suivi fréquentiel en fonction de la charge et au cours du temps. Quatre séries de mesures ont été faites en faisant varier les volumes de dépôts entre 10 et 250 μL . Cependant, malgré des résultats moins fins, ces essais ont été réalisés à la fréquence fondamentale du capteur ($f_0 = 4.98 \text{ MHz}$) afin d'attester de la répétabilité des mesures, il n'est pas nécessaire de se placer à l'harmonique 3 ($f = 15 \text{ MHz}$). Nous pouvons remarquer que la fréquence de résonance varie avec le volume de dépôt jusqu'à 250 μL (qui est la limite du volume « infini »). Lors des phases de retrait, la fréquence de résonance revient à la fréquence initiale.

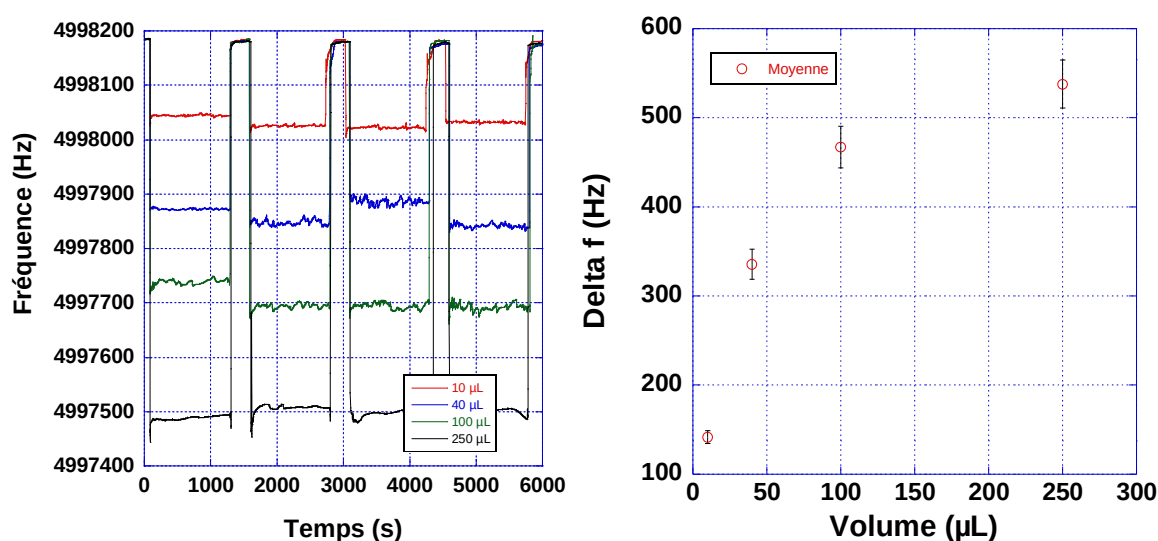


Figure II-22, A gauche, suivi fréquentiel de l'alternance de dépôts/retraits de solution d'eau de différents volumes. A droite, variation de fréquence avant et après dépôt de solution de différents volumes sur le capteur.

Ces essais de détection permettent de conclure quant au caractère reproductible et répétable des mesures.

II.2.3.2 Précision du capteur

Après avoir fabriqué et caractérisé les transducteurs, il est nécessaire de valider leur fonctionnement. Pour ce faire, des essais de détection de solution d'eau/glycérol, dont les caractéristiques viscoélastiques sont bien connues dans la littérature [79], ont été réalisés.

Dans le cadre de cette validation, différentes solutions d'eau/glycérol sont préparées en faisant varier le pourcentage massique de ces solutions. Ainsi une gamme de solutions comprise entre 0 et 80 % massique de glycérol a été choisie. Comme présenté dans le chapitre 1, les essais commencent par un dépôt d'eau jusqu'à stabilisation puis l'eau est retirée pour pouvoir déposer 200 μL de solution d'eau/glycérol. L'expérience est arrêtée au bout de 30 min de mesure après atteinte d'un palier de stabilisation. Les valeurs d'élasticité et

de viscosité moyenne sont déterminées en faisant la moyenne sur les 30 derniers points du palier. Les résultats ainsi obtenus sont présentés à la Figure II-23.

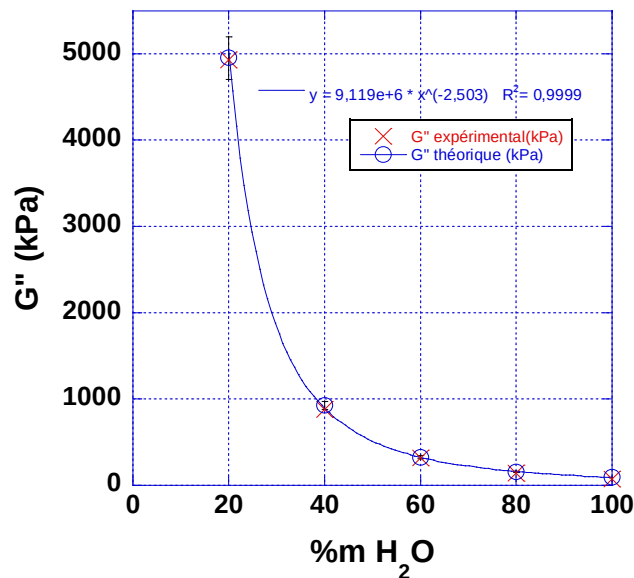


Figure II-23, Module visqueux de solutions d'eau / glycérol à différents pourcentage massique d'eau.

Comme le montre la Figure II-23, nous pouvons remarquer que le module visqueux diminue avec l'augmentation du pourcentage massique d'eau. Les valeurs de viscosité des différentes solutions d'eau/glycérol de la littérature servant à la comparaison entre le système conçu et les capteurs commerciaux sont issues des travaux de Cheng [79].

Il apparaît clairement que les valeurs de viscosité extraites des manipulations correspondent aux valeurs de références de la littérature. A partir de ce moment et de ces observations, le fonctionnement du capteur est validé.

D'autres campagnes d'essais permettant de caractériser le design elliptique, comme des essais de reproductibilité, de répétabilité ou encore traitant de l'influence de la température sur les mesures ont été réalisés. Le capteur développé étant amené à fonctionner à différentes températures, une étude en température a été menée.

II.2.3.3 Caractérisation en température

La vérification du comportement du capteur en température est effectuée en faisant des essais de détection de solutions d'eau/glycérol à différents pourcentages massiques en glycérol et à des températures comprises entre 15°C et 40°C. Les expériences sont effectuées suivant le protocole suivant :

- Mise en température du système et des solutions ;

- Dépôt de 200 μL d'eau jusqu'à stabilisation du signal de détection ;
- Retrait de l'eau et séchage à l'azote de la surface du capteur ;
- Dépôt de 200 μL de solution d'eau / glycérol sur la surface du capteur ;
- Maintien 30 min après stabilisation du signal ;

Cinq solutions sont utilisées pour le déroulement de cette analyse, où les pourcentages massiques en glycérol des solutions sont de 0, 25, 40, 50 et 75 % en masse. Après traitement de données, les valeurs moyennes de viscosité sont présentées à la Figure II-24, avec deux courbes. La courbe de gauche présente les valeurs de viscosité moyennes en fonction du pourcentage massique en eau des solutions aux différentes températures d'étude. A droite, une comparaison est faite entre les valeurs pratiques obtenues après expérimentations, et les valeurs de viscosité connues dans la littérature. Une corrélation entre les valeurs obtenues et les valeurs théoriques est observée.

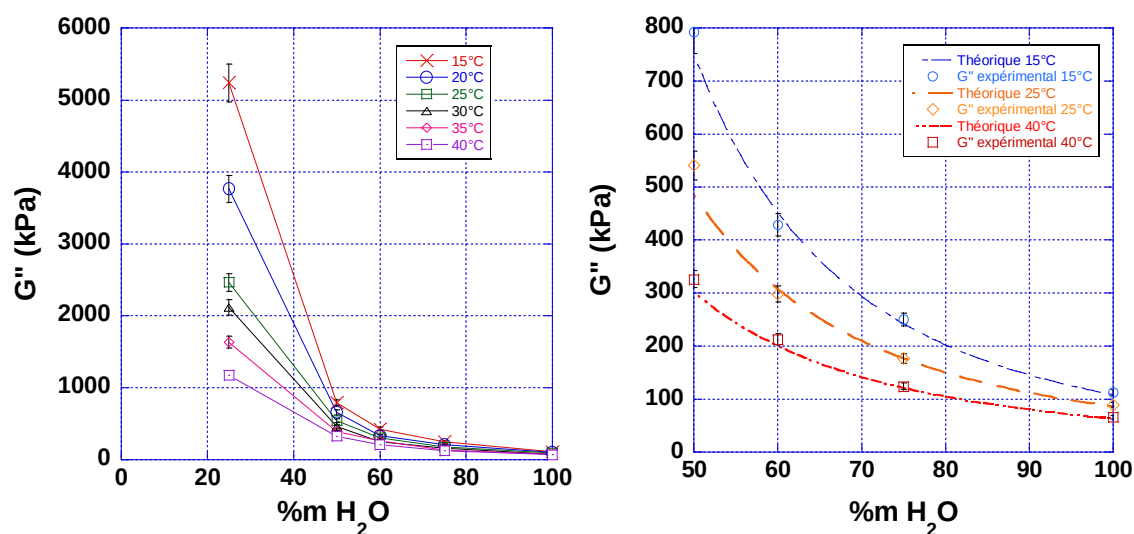


Figure II-24, A gauche, module visqueux en fonction du pourcentage massique en eau des solutions. A droite, module visqueux pratique en fonction des valeurs de module visqueux de la littérature à différentes températures et différentes solutions d'eau / glycérol.

Nous pouvons remarquer grâce à ces courbes que pour une série de mesure à la même température, le module visqueux des solutions évolue très fortement en fonction du pourcentage massique de glycérol en solution. En nous intéressant plus particulièrement à la série effectuée à 25°C, qui est la température à laquelle seront fait les essais de détection des solutions biologiques, et en comparant les valeurs déterminées pratiquement avec les valeurs théoriques, nous pouvons remarquer une très faible variation entre ces deux valeurs. Cette observation est illustrée à la Figure II-25, où sont représentées en rouge les valeurs pratiques obtenues lors des essais et en bleu les valeurs théoriques.

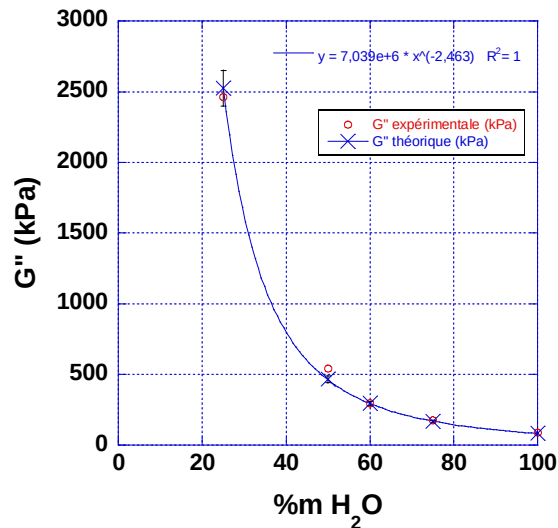


Figure II-25, Comparaison entre les valeurs de modules visqueux des transducteurs à électrode elliptique et des valeurs théoriques pour différentes solutions d'eau/glycérol à une température de 25°C.

Ainsi, nous pouvons remarquer que nous retrouvons des valeurs du module visqueux conformes aux valeurs de la littérature quelle que soit la température.

La Figure II-26 montre la variation des parties réelle et imaginaire du quartz nu à différentes températures.

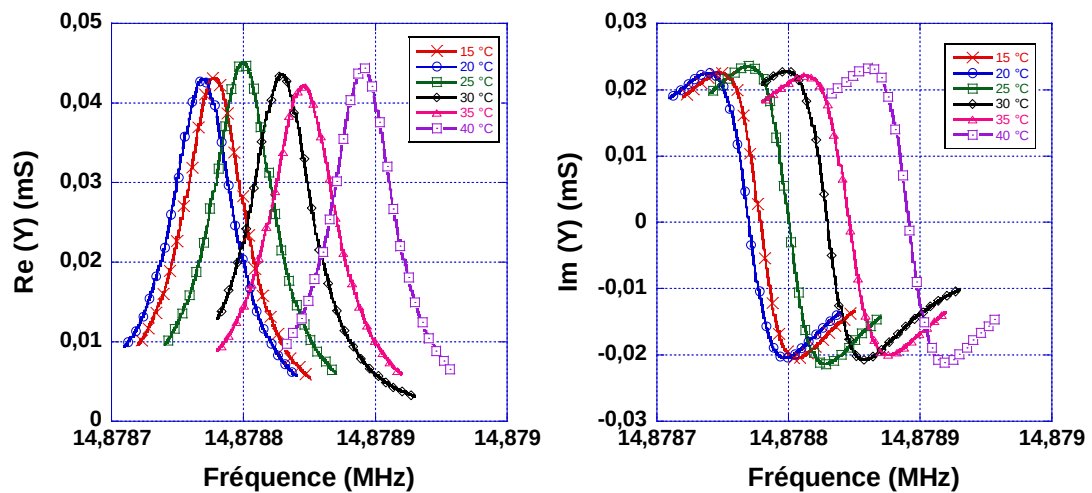


Figure II-26, Variation de la partie réelle et imaginaire du capteur nu en fonction de la température.

Nous pouvons remarquer un décalage de la fréquence de résonance vers la droite quand la température augmente, et qui s'illustre également par un décalage vers la droite des parties réelle et imaginaire du capteur. Comme l'a démontré Lu dans ses travaux [80], ce phénomène est intrinsèque à la coupe AT du quartz, suivant l'angle de coupe, et dont les propriétés dépendent de la température, et est illustré à la Figure II-27.

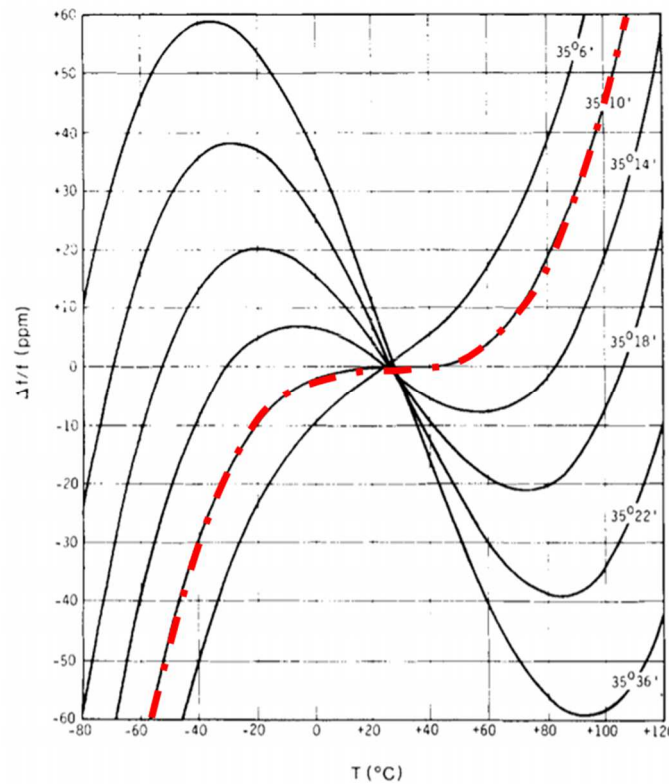


Figure II-27, Dépendance de l'angle de coupe sur les courbes fréquence-température des quartz en coupe AT. La coupe AT (angle autour de $35^{\circ}10'$) permet de générer des ondes de cisaillement et offre la meilleure stabilité en fréquence dans une gamme de température de 0 à 50°C , représentée en rouge sur la figure).

II.2.3.4 Comparaison entre le système commercial et le système fabriqué et optimisé

Les performances entre le système conçu et le système commercial existant sont comparées en observant les réponses de ces deux capteurs pour la détection et l'extraction du module visqueux pour différentes solutions d'eau/glycérol. Pour cela, une gamme de solutions d'eau/glycérol est préparée en faisant varier le pourcentage massique en glycérol. Afin de comparer les valeurs expérimentales, les essais sont effectués à 25°C afin de pouvoir les comparer avec les valeurs de la littérature.

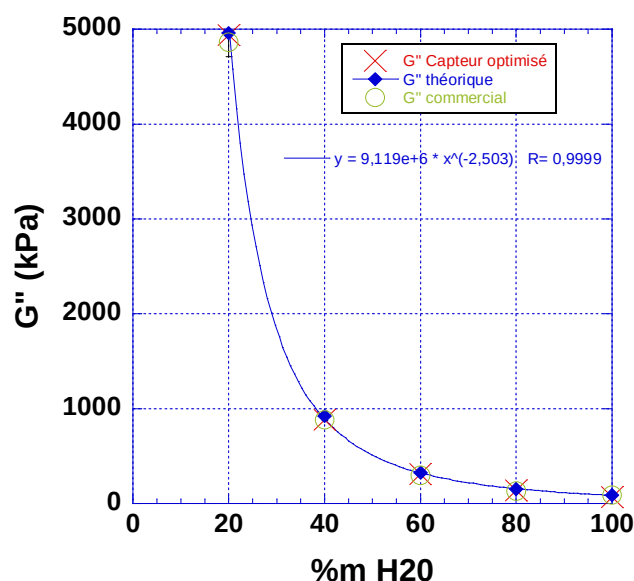


Figure II-28, Modules visqueux : résultats obtenus à l'aide du capteur commercial Q-sense, du capteur optimisé comparée aux valeurs de la littérature pour différentes solutions d'eau/glycérol.

La Figure II-28 montre la comparaison entre les valeurs du module visqueux déterminées en utilisant les deux technologies de capteur et celles de la littérature. Il apparaît clairement que les courbes se superposent, ce qui valide le fonctionnement des capteurs présentant des électrodes de forme elliptique.

Dans un premier temps, cette partie a permis de démontrer la faisabilité du développement d'un capteur à ondes acoustiques de volume à une électrode. Une deuxième étude de modélisation confirme que le design optimal d'un transducteur à une électrode est une ellipse et présente la fabrication et la caractérisation de ce nouveau transducteur.

Mais lorsqu'il s'agit de réaliser la détection simultanée de plusieurs analytes, il est nécessaire de développer des transducteurs avec plusieurs électrodes sur le même substrat. En ce qui concerne la maladie d'Alzheimer, la détection de deux biomarqueurs est nécessaire. La partie suivante sera donc l'objet du développement d'un transducteur à trois électrodes, une pour chaque biomarqueur et une électrode de référence.

II.3 Développement d'un capteur multi-électrodes

La maladie d'Alzheimer est caractérisée par la présence dans le cerveau de deux types de fibres biologiques qui conduisent aux dégénérescences neurofibrillaires. Si la faisabilité des transducteurs à une électrode est largement établie, l'utilisation de ce genre d'outil se limite à

la détection d'une seule espèce dans cette configuration. Le développement d'un outil de diagnostic se basant sur cette technologie, et permettant la détection simultanée en temps réel de ces différentes espèces, est donc très intéressant. Si ce genre de technologie est utilisée dans différents domaines de détection, elle reste cependant peu employée dans le domaine du diagnostic médical [81]–[83].

II.3.1 Etat de l'art et design d'un capteur TSM multi-électrodes

La fabrication d'un transducteur à une électrode est connue et maîtrisée mais celle d'un capteur multi-électrodes reste méconnue et très peu détaillée dans la littérature. Ainsi, la fabrication de ce genre de capteur sera l'objet d'un fort travail de développement et d'adaptation des techniques expérimentales de fabrication.

Si certains travaux montrent la faisabilité d'un dispositif à plusieurs électrodes indépendantes sur un même substrat [81]–[83], ces systèmes nécessitent le développement et l'adaptation des méthodes d'acquisition et de traitement de signaux complexes.

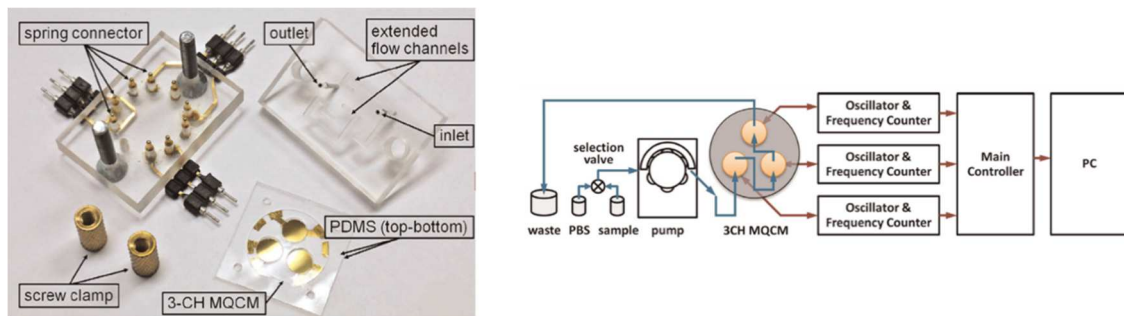


Figure II-29, A gauche, photographie d'un montage micro fluide multi-qcm. A droite, vue d'ensemble du système monté [84].

Comme le montre la Figure II-29, qui est un exemple de développement d'une microbalance à quartz multi-électrodes (MQCM), trois électrodes identiques sont fabriquées à la surface du substrat piézoélectrique, et sont toutes les trois reliées indépendamment des autres à des oscillateurs et fréquencesmètres pour pouvoir récupérer les signaux propres à chaque électrode. Le système est ainsi inséré dans une cellule micro fluide qui permettra l'injection de fluide tel que le montre le schéma de droite de la Figure II-29. Les solutions injectées seront ainsi déposées successivement sur les trois microbalances. La Figure II-29 montre le principe de mesure avec l'association des différents oscillateurs et fréquencesmètre pour la récupération des différents signaux provenant des trois microbalances. Une mesure expérimentale est donnée à la Figure II-30. Sur la figure (a), il est présenté le suivi fréquentiel au cours du temps lors de l'injection de PBS (Phosphate Buffer Saline) dans la cellule micro-

fluidique. Ces résultats peuvent être corrélés aux photographies présentées en (b) de la Figure II-30, et qui montrent l'avancée de la solution dans le système lors de son injection.

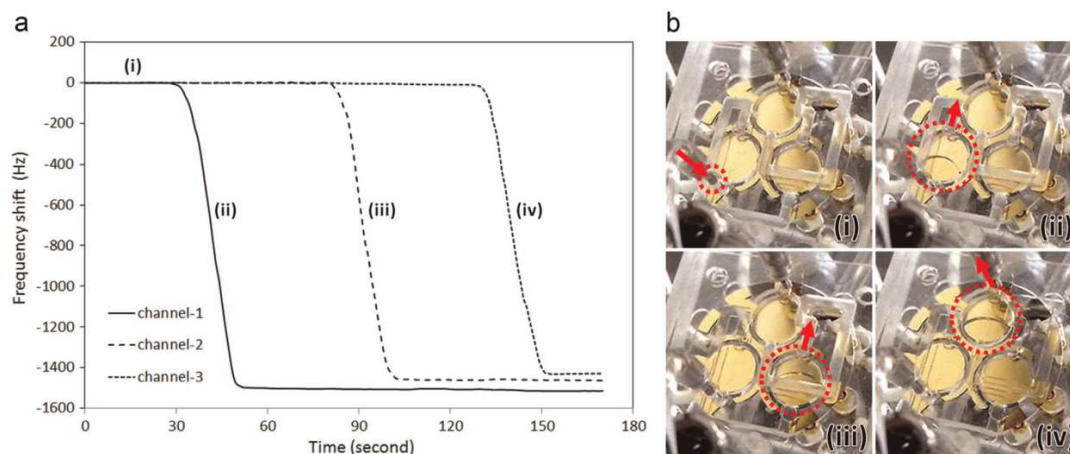


Figure II-30, A gauche, suivi fréquentiel des microbalances lors du dépôt d'une solution de PBS. A droite, photographies montrant l'injection du tampon dans la cellule, avec (i) injection dans le système, (ii) injection sur la première QCM, (iii) injection sur la deuxième QCM et (iv) injection sur la dernière QCM.

Dans d'autres systèmes de capteurs, les électrodes ont un gradient d'épaisseur conduisant à différentes fréquences de résonances mais elles sont reliées entre elles facilitant ainsi leur utilisation et leur mise en application en réduisant l'instrumentation. Plusieurs processus de fabrication existent afin d'obtenir un système multi-électrodes à des fréquences de résonance propres. Ainsi, comme le décrit Abe dans ses travaux [85], le gradient d'épaisseur est obtenu en gravant localement le substrat de quartz par plasma SF_6 (hexafluorure de soufre). Il obtient ainsi un système possédant des puits de différentes profondeurs sur lesquels seront déposées les électrodes. Un schéma de principe du montage est présenté à gauche de la Figure II-31.

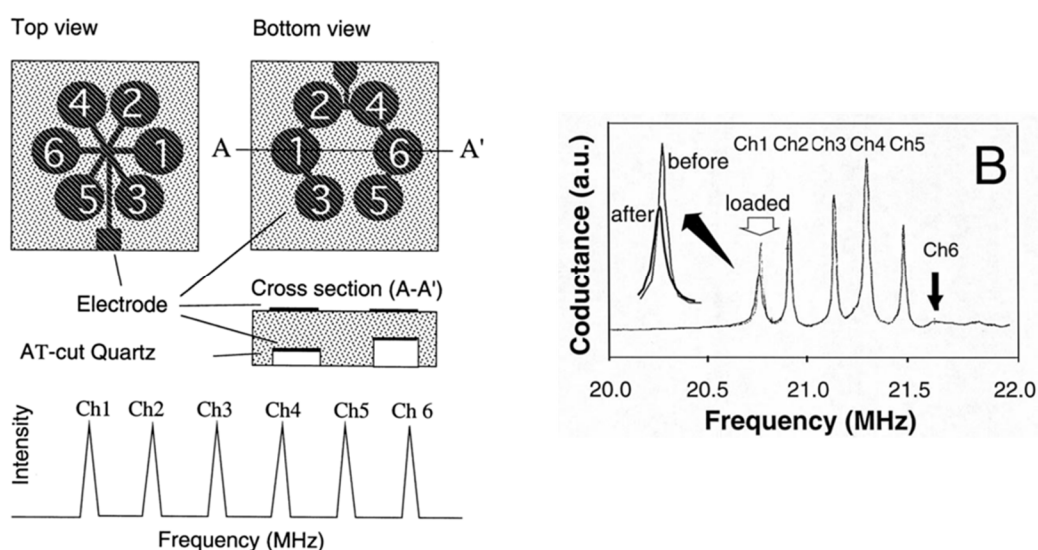


Figure II-31, A gauche, schéma de principe d'un capteur MQCM. A droite, mesure de la conductance avant et après dépôt sur la microbalance 1 [85].

Nous pouvons remarquer, grâce à la Figure II-31 (à droite), la différence du signal avant et après un dépôt d'une solution d'eau à la surface de la microbalance 1. Elle présente également une atténuation du pic correspondant à la microbalance 1 sans pour autant affecter les caractéristiques des autres balances présentes sur le système.

II.3.2 Développement d'un capteur multi-électrodes

La seconde voie de fabrication, qui est celle choisie dans cette étude, est le dépôt et la fabrication sur le substrat d'électrodes de différentes épaisseurs. L'avantage de cette voie de développement est l'obtention d'un système complexe ne nécessitant qu'une seule voie de mesure lors des expérimentations, simplifiant ainsi les essais.

Le capteur multi-électrodes développé est composé d'un substrat de quartz sur lequel sont déposées trois électrodes de chaque côté. Comme il a été expliqué plus tôt dans ce travail, la fréquence de résonance du capteur va dépendre des dimensions du quartz, mais également de celles de l'électrode. La pertinence des électrodes de forme elliptiques a été démontrée, néanmoins, il n'existe pas de système multi-électrodes elliptiques dans la littérature si bien que dans une première approche, nous avons préféré développer des systèmes avec des électrodes de forme rondes.

II.3.2.1 Comportement mécanique du capteur

Cette étude présente dans un premier temps les résultats des analyses de vibrométrie laser pour un capteur d'un design non optimisé, dont le motif est illustré à la Figure II-32, et qui s'inspire des designs de capteur multi électrodes présentés à la Figure II-29. L'apport d'une connectique circulaire est effectué et permet de relier les trois électrodes entre elles.



Figure II-32, Design de capteur 3 électrodes.

Le capteur développé est composé de trois électrodes d'épaisseurs différentes qui sont toutes reliées ensembles. Le motif étant symétrique, les électrodes de chaque côté du quartz sont similaires.

Afin de caractériser la propagation des ondes dans le quartz, des essais de caractérisation par vibrométrie laser ont été effectués sur les premiers capteurs multi-électrodes. Grâce à l'analyse temporelle, la propagation des ondes dans le quartz peut être établie. Nous pouvons

remarquer à l'instar de la Figure II-33 que les ondes de volume observées ne sont générées qu'à la frontière des électrodes, tant au niveau des électrodes circulaires qu'au niveau des connectiques rectangulaires et de l'anneau circulaire extérieur. Nous remarquons également la production de deux ondes à partir de la frontière, l'une dans le sens de la normale de la frontière, l'autre dans le sens opposé. Après $t = 21,2 \mu\text{s}$, les ondes se rencontrent au centre du quartz, et vont continuer à se propager dans le sens opposé. Ce qui nous permet de justifier le caractère non optimisé de ce motif est la superposition des ondes générées par l'anneau extérieur aux ondes générées par les électrodes, c'est pourquoi, dans les capteurs suivants l'anneau de contact est supprimé et les connectiques sont minimisées pour réduire les interférences.

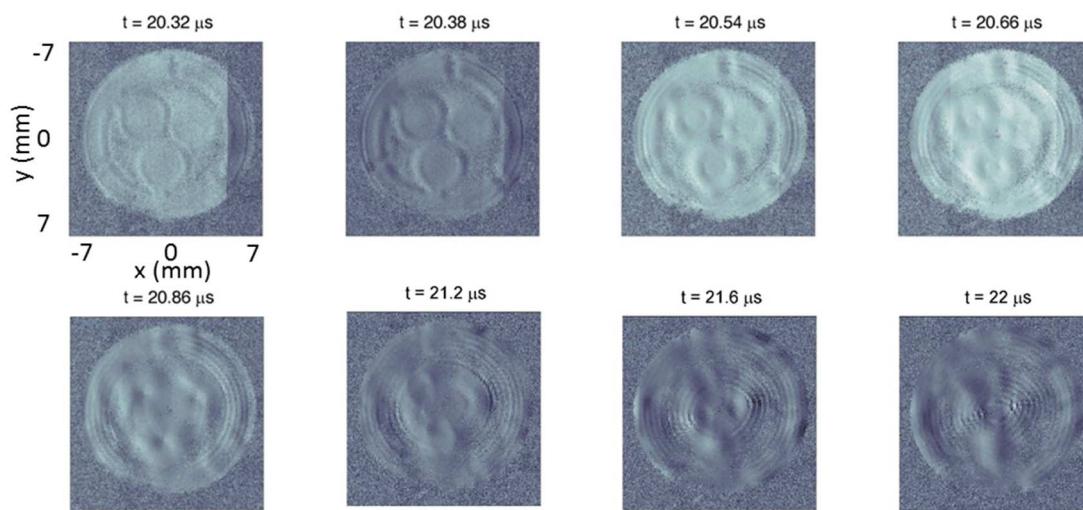


Figure II-33, Suivi spatio-temporel de la propagation des ondes dans le capteur multi-électrodes non optimisé.

Le comportement modal des ondes de surface générées sur le capteur est étudié grâce aux signaux spatio-fréquentiels après traitement de données par transformée de Fourier. La Figure II-34 présente les signaux spatio-fréquentiels en basse fréquence et pour les fréquences de résonance observées.

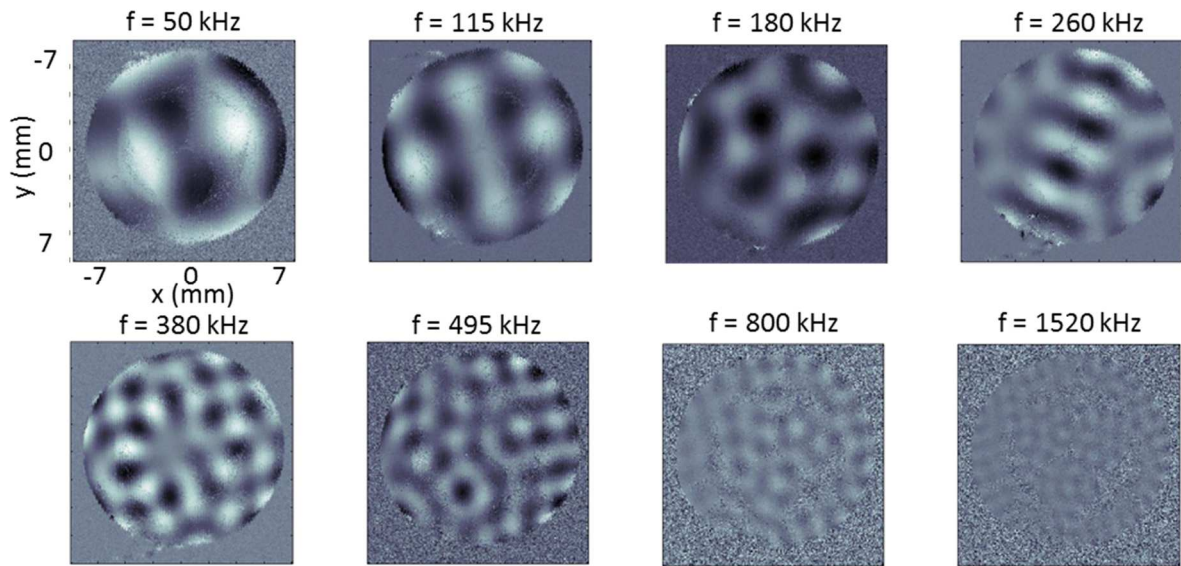


Figure II-34, Images des signaux spatio-fréquentiel en basse fréquence.

Par une deuxième transformée de Fourier (2D), on retrouve le nombre d'onde en fonction de la fréquence, ce qui permet d'étudier les caractéristiques de dispersion des ondes générées. On constate ainsi que pour les fréquences présentées, les ondes se propagent dans toutes les directions, avec le même nombre d'onde K , car nous pouvons observer un cercle dans le plan présenté. De plus, plus la fréquence va augmenter, plus l'amplitude du cercle va être grande.

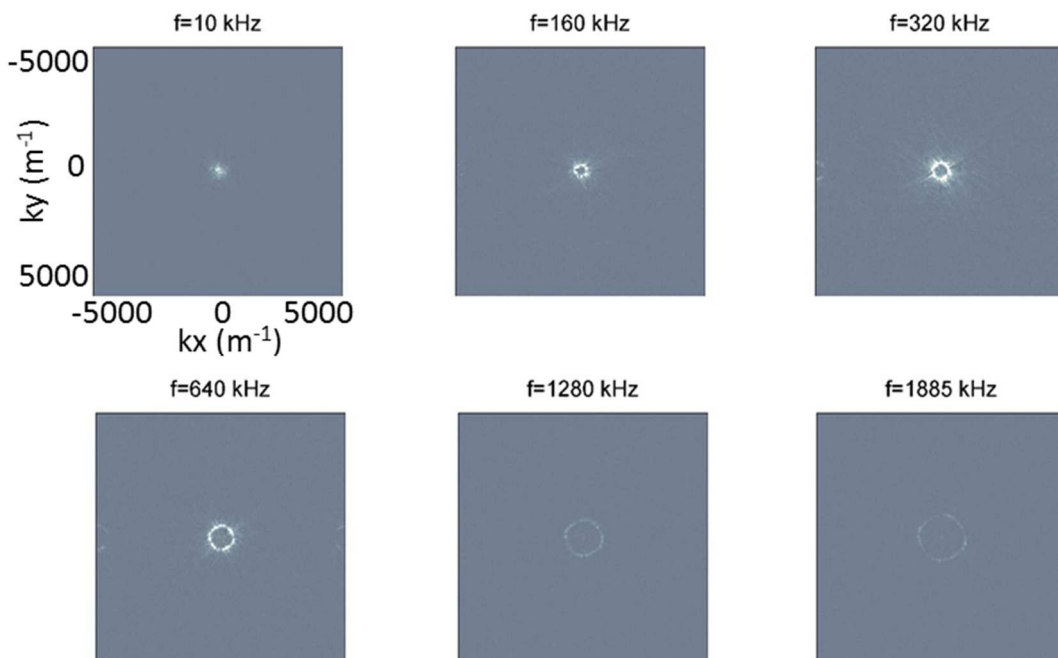


Figure II-35, Images des signaux nombre de l'onde-fréquentiels en fonction de la fréquence.

Cette observation est plus visible quand nous nous intéressons à la courbe de dispersion expérimentale en fonction de la courbe théorique qui est présentée à la Figure II-36. Ces

courbes expriment le nombre d'onde en fonction de la fréquence, et on peut noter la présence du mode de Lamb $A0$ sur la courbe expérimentale et qui semble proche de la courbe théorique.

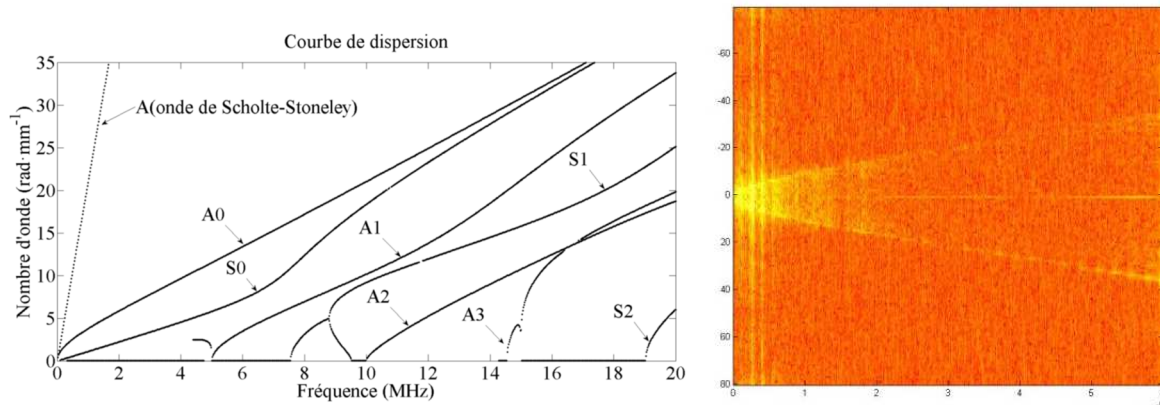


Figure II-36, à gauche, courbe de dispersion théorique du quartz, à droite, courbe de dispersion expérimentale pour le quartz multi-électrodes caractérisé.

Ces observations du comportement mécanique de cette version de capteur multi-électrodes nous ont amené à optimiser le design des électrodes. La première solution a été de supprimer l'anneau circulaire extérieur, qui est source de perturbation. De plus les électrodes sont placées de façons équidistantes et leurs connectiques respectives sont placées de façon à être parallèles. Pour cela, le contrôle du positionnement et de la distance centre à centre est primordiale. Dans ses travaux, Lu *et al.* [86] présente une étude sur l'espacement des électrodes, et l'effet de ce dernier sur la qualité du signal obtenu. Ainsi, nous prendrons soin que les électrodes soient suffisamment éloignées pour ne pas interagir entre elles. Cette étude complète de modélisation n'a pas été menée dans cette thèse mais elle est en cours de réalisation. Ainsi, le nouveau design du capteur est présenté à la Figure II-37.

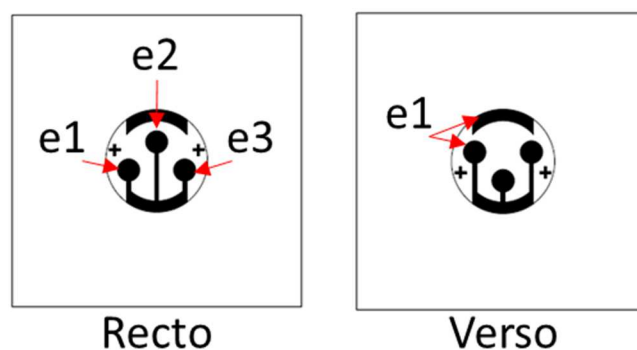


Figure II-37, Schéma des électrodes composant le capteur multi-électrodes.

Afin de générer une fréquence propre pour chaque électrode, nous avons fait le choix de créer un gradient d'épaisseur lors de la fabrication des électrodes. Ainsi, le capteur comprend trois électrodes d'épaisseurs $e1$, $e2$ et $e3$, telles que $e1 < e2 < e3$ (Tableau 2).

Dénomination électrode	Epaisseur consigne
e1 (électrode gauche)	230 nm
e2 (électrode milieu)	500 nm
e3 (électrode droite)	600 nm

Tableau 2, Epaisseur des trois électrodes fabriquées.

Une étude d'optimisation des épaisseurs des trois électrodes a été menée pour trouver la configuration optimale entre les trois électrodes. Une « fonction objectif » a été mise en place pour mener à bien cette optimisation. Elle a ainsi pour objectif d'optimiser :

- Le positionnement des trois pics de résonance, afin de les positionner de façon équidistante ;
- D'éviter la superposition des pics de résonance des modes plus complexe avec les modes principaux.

La Figure II-38 montre les valeurs optimales de la « fonction objectif » en fonction des épaisseurs des électrodes de gauche, du centre et de droite, où chaque point de la courbe est une configuration optimisée en épaisseur. Il s'agira par la suite de se mettre dans une configuration répondant à cette optimisation lors du développement d'un capteur multi-électrodes.

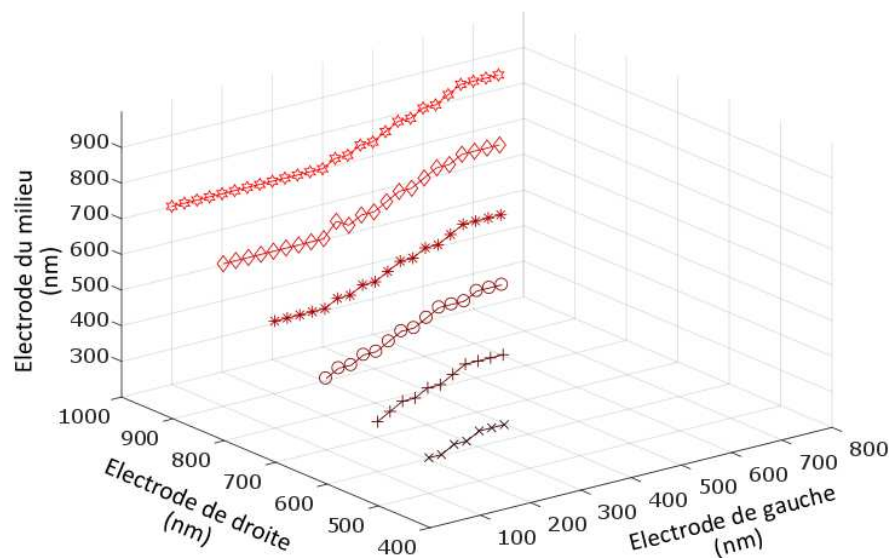


Figure II-38, Configuration optimisée des capteurs multi-électrodes en fonction des épaisseurs des électrodes de gauche, du milieu et de droite.

Ainsi, nous remarquons qu'en fixant l'électrode de gauche à 230 nm, étant l'épaisseur dont le protocole de fabrication a été optimisé dans la première partie de ce manuscrit de thèse, en prenant une électrode du milieu de 500 nm et une électrode de droite de 600 nm d'épaisseur,

le système sera dans une configuration optimale en épaisseur.

II.3.2.2 Processus de fabrication

Les électrodes sont fabriquées dans l'ordre de l'électrode $e1$ jusqu'à l'électrode $e3$. Sur la Figure II-39, les trois grandes étapes de fabrication sont représentées, éléments en noir représentant la partie en cours d'élaboration.

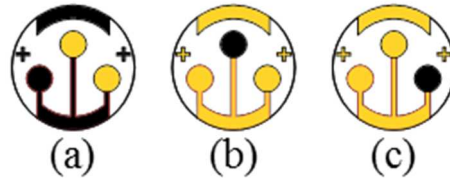


Figure II-39, Schéma des grandes étapes du processus de fabrication pour la création de l'électrode sur la face recto. (a) électrode $e1$ et connectiques, (b) fabrication de l'électrode $e2$, (c) fabrication de l'électrode $e3$.

a) Fabrication de l'électrode d'épaisseur $e1$

Afin de fabriquer l'électrode $e1$ et ses connectiques, il s'agit du procédé classique de microfabrication en salle blanche. Le protocole ainsi effectué est résumé avec la Figure II-40. Comme pour le capteur mono-électrode, la première attention a été portée pour le nettoyage de la surface pour une adhérence maximale. Une métallisation de la surface est ensuite effectuée par pulvérisation cathodique. La bicouche métallique ainsi créée est donc composée d'une sous couche de titane, d'une épaisseur de 30 nm et d'une électrode d'or d'une épaisseur de 200 nm. Avant la photolithographie, un film de résine photosensible de 2 μm d'épaisseur est déposé par *spin coating*. L'étape finale de ce processus de fabrication est la gravure chimique des métaux excédentaires puis le nettoyage de la surface.

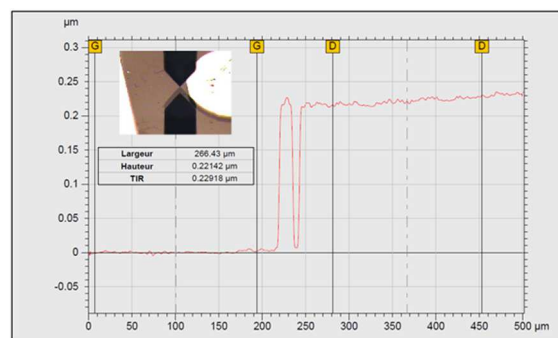
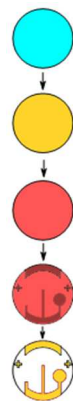


Figure II-40, à gauche, procédé de fabrication de la première électrode de la face recto du capteur. A droite, contrôle profilométrique de l'épaisseur de l'électrode créée.

L'électrode obtenue peut être caractérisée en épaisseur au moyen d'une mesure profilométrique. Pour cette caractérisation, un profilomètre *KLA* est utilisé. Le principe de cette mesure est le balayage de la surface par la pointe diamantée sur une longueur l , suivant

l'axe X , puis l'acquisition des coordonnées (X, Z) des points est effectuée, le relevé topographique est présenté à la droite de la Figure II-40. A partir des coordonnées entre la partie métallisée et la partie nue (non métallisée), il est possible d'obtenir la hauteur de marche. On remarque ainsi que l'électrode créée, pour une épaisseur consigne de 230 nm, a en réalité une épaisseur de 221 nm, soit 4 % d'erreur probablement due à la précision des bords.

b) Fabrication de l'électrode e2

Lors de la fabrication de la deuxième électrode du capteur, la technique conventionnelle ne peut être appliquée, puisqu'elle engendrerait une recouvrance de la surface totale du quartz, modifiant ainsi l'épaisseur de l'électrode $e1$. De plus, la cohésion entre deux bicouches métalliques n'étant pas optimum, le résultat final ne serait que très peu satisfaisant. Des risques de décollements et un état de surface non conforme au cahier des charges seraient très fortement probables. Il devient donc nécessaire que la deuxième phase de fabrication produise la deuxième électrode tout en recouvrant la partie du capteur déjà fabriquée et ne pas l'altérer.

Ainsi, le protocole expérimental se décompose en différentes étapes :

- Dépôt d'une couche de résine photosensible d'épaisseur 2 μm ;
- Insolation de la couche photosensible par photolithographie afin de créer le motif de l'électrode ;
- Développement de la résine insolée ;
- Métallisation par pulvérisation cathodique ;

A partir de la courbe de droite de la Figure II-41, une mesure de hauteur de marche est effectuée afin de contrôler le respect de l'épaisseur consigne $e2$. Nous remarquons que l'électrode $e2$ a une épaisseur de 492 nm pour une épaisseur consigne de 500 nm. De plus, cette mesure permet également de confirmer le protocole expérimental mis en place pour la fabrication des électrodes.

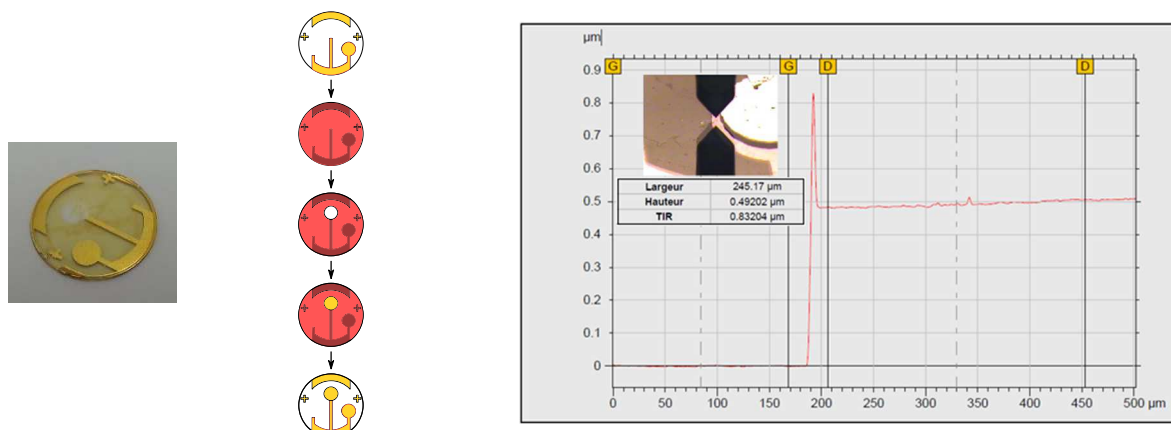


Figure II-41, à gauche, protocole expérimentale pour l'obtention de la deuxième électrode d'épaisseur e_2 de la face recto du capteur. A droite, relevé profilométrique pour le contrôle de l'épaisseur de l'électrode fabriquée.

c) Fabrication de l'électrode e3

Suivant le protocole expérimental décrit dans la partie I.4.2.2, la troisième électrode de la face recto du capteur sera fabriquée. La figure illustre le protocole expérimental effectué, avec les différentes étapes principales pour l'obtention du résultat final et donne également la valeur de l'épaisseur de l'électrode fabriquée grâce au relevé profilométrique. Nous mesurons une épaisseur de 592 nm pour une épaisseur consigne de 600 nm. Nous pouvons remarquer dans les cinquante premiers points pour la partie métallisée, des épaisseurs plus élevées que par rapport au milieu de l'électrode. Cela correspond à la frontière entre le substrat de quartz nu et le début de l'électrode métallisée et peut s'expliquer par un effet de bord lors de la fabrication des électrodes suivant le protocole utilisé.

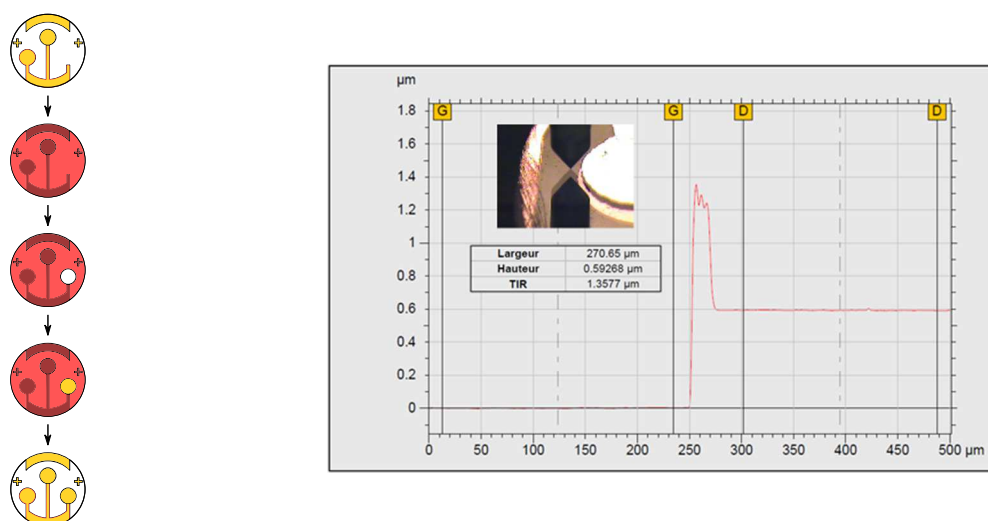


Figure II-42, à gauche, fabrication de l'électrode e3 de l'électrode de la face recto du capteur. A droite, relevé profilométrique pour le contrôle de l'épaisseur de l'électrode fabriquée.

d) Fabrication de l'électrode de la face verso du capteur et des connectiques

Une fois l'électrode de la face recto totalement produite, la deuxième étape majeure dans

la création du capteur est la production de l'électrode de la face verso et des connections permettant le report d'électrode. Pour cette électrode, le procédé classique de microfabrication peut être utilisé, cependant, des précautions sont à prendre pour protéger l'ensemble d'électrodes précédemment fabriqué. Pour cela, une couche de résine photosensible de 10 μm est déposée sur la surface du quartz.

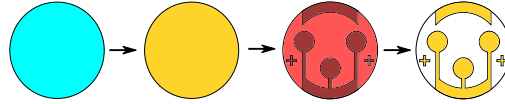


Figure II-43, A gauche, procédé de fabrication de l'électrode verso et des connectiques.

Une fois le capteur entièrement fabriqué, une étape de contrôle est effectuée tant au niveau de l'aspect général du capteur mais également au niveau des contacts électriques. Un contrôle électrique au niveau de l'électrode recto et de l'électrode verso est effectué. La Figure II-44 regroupe une photo d'ensemble du capteur, mais également des clichés obtenue grâce à un topographe 3D. Il s'agit de topographies 3D des deux faces du capteur. On voit sur le cliché du milieu la face verso du capteur, on remarque que l'ensemble des électrodes ont la même épaisseur puisqu'aucun gradient n'est observé. Cependant, nous remarquons un gradient pour le cliché de droite, qui est un cliché de la face recto, où sont présentes les électrodes $e1$, $e2$ et $e3$ et qui confirme les analyses profilométriques.

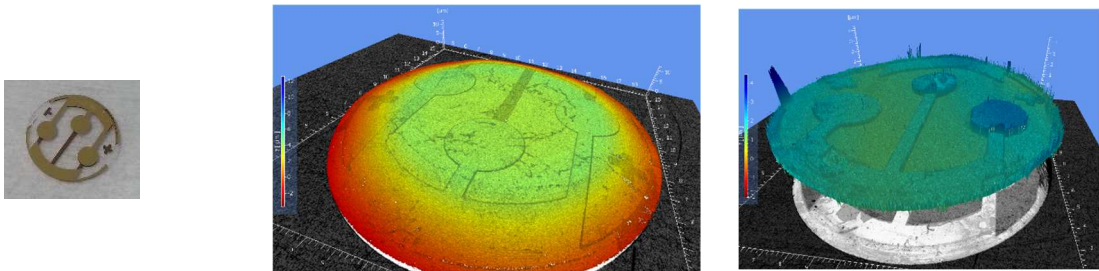


Figure II-44, A gauche, Photographie du capteur obtenu, au milieu et à droite, analyse profilométrique 3D.

II.3.2.3 Comportement électrique du capteur

Le capteur est caractérisé électriquement à partir de mesures de son admittance complexe $Re(Y)$ et $Im(Y)$ avec un analyseur de réseau. Les courbes sont présentées à la Figure II-45. La présence de trois pics de résonance à trois fréquences distinctes permet de confirmer le mode de fonctionnement du capteur multi-électrodes. Ainsi, pour l'électrode $e1$, qui est l'électrode de plus faible épaisseur, a une fréquence de 16.65 MHz, l'électrode $e2$ de 16.81 MHz, et l'électrode $e3$ a quant à elle une fréquence de 16.88 MHz. Nous observons une différence de fréquence plus faible entre l'électrode $e2$ et $e3$ que par rapport à $e1$ et $e2$, ce qui s'explique

par les épaisseurs choisies.

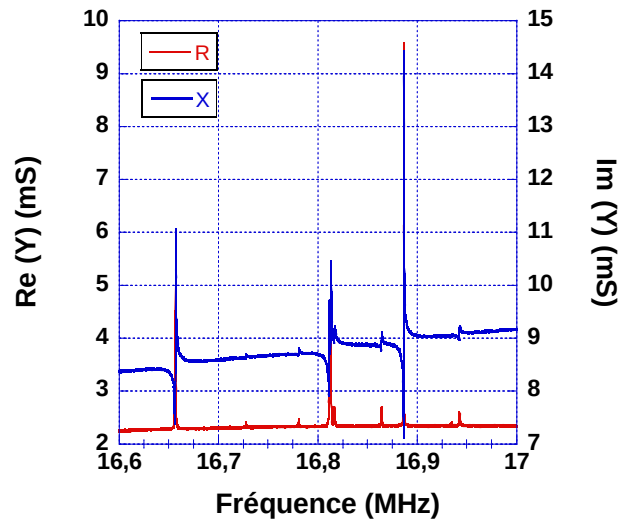


Figure II-45, Spectre fréquentiel pour le capteur multi-électrodes à vide.

L'état de ce signal électrique dépendra ensuite du dépôt effectué. L'objectif de ce capteur étant la détection simultanée des différentes espèces biologiques de la pathologie d'Alzheimer, il est nécessaire de vérifier et confirmer la capacité du capteur à détecter différentes espèces simultanément. Cela passe par le dépôt sur le capteur de différentes solutions de référence de glycérol.

II.3.2.4 Répétabilité et reproductibilité des mesures

Le caractère répétable des mesures du quartz est vérifié en réalisant à trois reprises la même mesure (dépôt d'eau). Les résultats sont présentés dans les courbes de la Figure II-46. On remarque que, sur quatre essais, les valeurs obtenues ne diffèrent que de 3%.

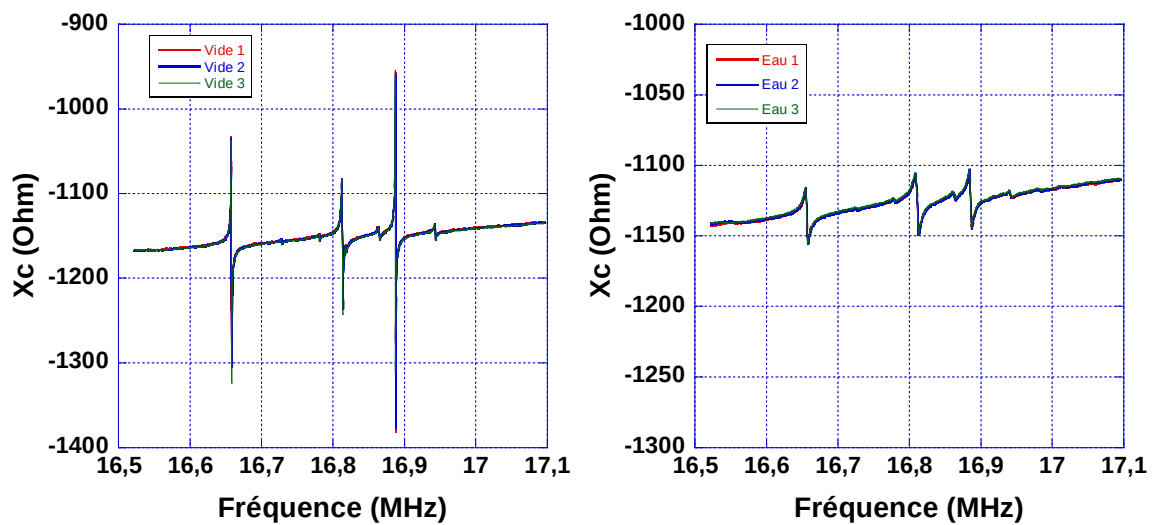


Figure II-46, à gauche, répétabilité des mesures à vide du capteur multi-électrodes. A droite, répétabilités des mesures après des dépôts d'eau à la surface du capteur multi-électrodes.

Les variations de fréquence, lors du dépôt de solutions sur le capteur, pour les différents pics sont présentées sur la Figure II-47. On peut remarquer que pour chaque solution, nous avons des variations de la fréquence de résonance identique à 5% près pour les trois électrodes.

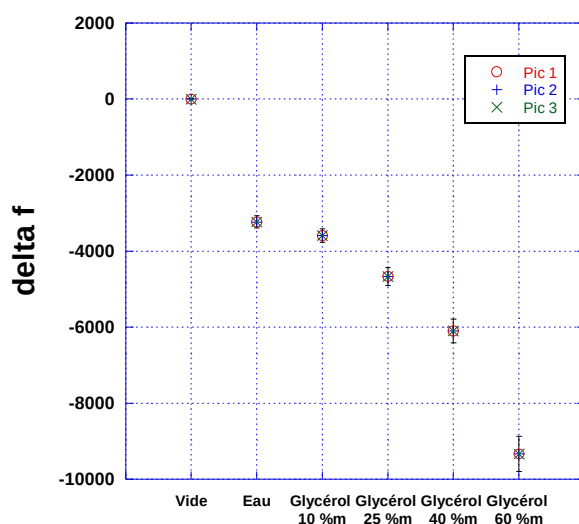


Figure II-47, Variations des fréquences de résonance des trois pics pour des dépôts de solutions d'eau et de glycérol.

II.3.2.5 Détection spécifique des électrodes

L'intérêt du développement de ce type de capteur multi-détections réside dans sa possibilité à détecter différentes espèces cibles de manière simultanée. Nous avons remarqué, grâce aux études précédentes, que la détection d'une espèce était possible en submergeant la totalité du capteur avec la solution test. Les trois électrodes étant ainsi chargées, nous avons une atténuation de l'ensemble du système. Cependant, dans le cas de ce travail de thèse, il a été prouvé que les éléments biologiques cibles (protéine *tau* et peptide *Aβ*) n'ont pas les mêmes propriétés physiques et mécaniques, ce qui nous permet d'affirmer que lors des essais de détection en milieu complexe, ces deux analytes biologiques n'auront pas le même impact sur les propriétés du capteur. Afin de se rapprocher de ce comportement et pour vérifier qu'il n'existe pas d'interférences, des dépôts successifs de 10 μ L d'une solution d'eau/glycérol à 70% en masse de glycérol sont effectués sur l'électrode de gauche, puis l'électrode du milieu et enfin l'électrode de droite. Nous pouvons voir les résultats obtenus sur la Figure II-48. Nous pouvons voir dans le cadre du dépôt sur l'électrode de gauche, nous avons une forte atténuation du signal, sans modifier les signaux propres aux autres électrodes. En injectant un autre volume de solution sur l'électrode du milieu, une atténuation du pic de résonance spécifique à l'électrode du milieu est observée. Enfin en chargeant totalement le quartz, nous remarquons une atténuation complète du signal, et ce de façon similaire entre les différentes

électrodes.

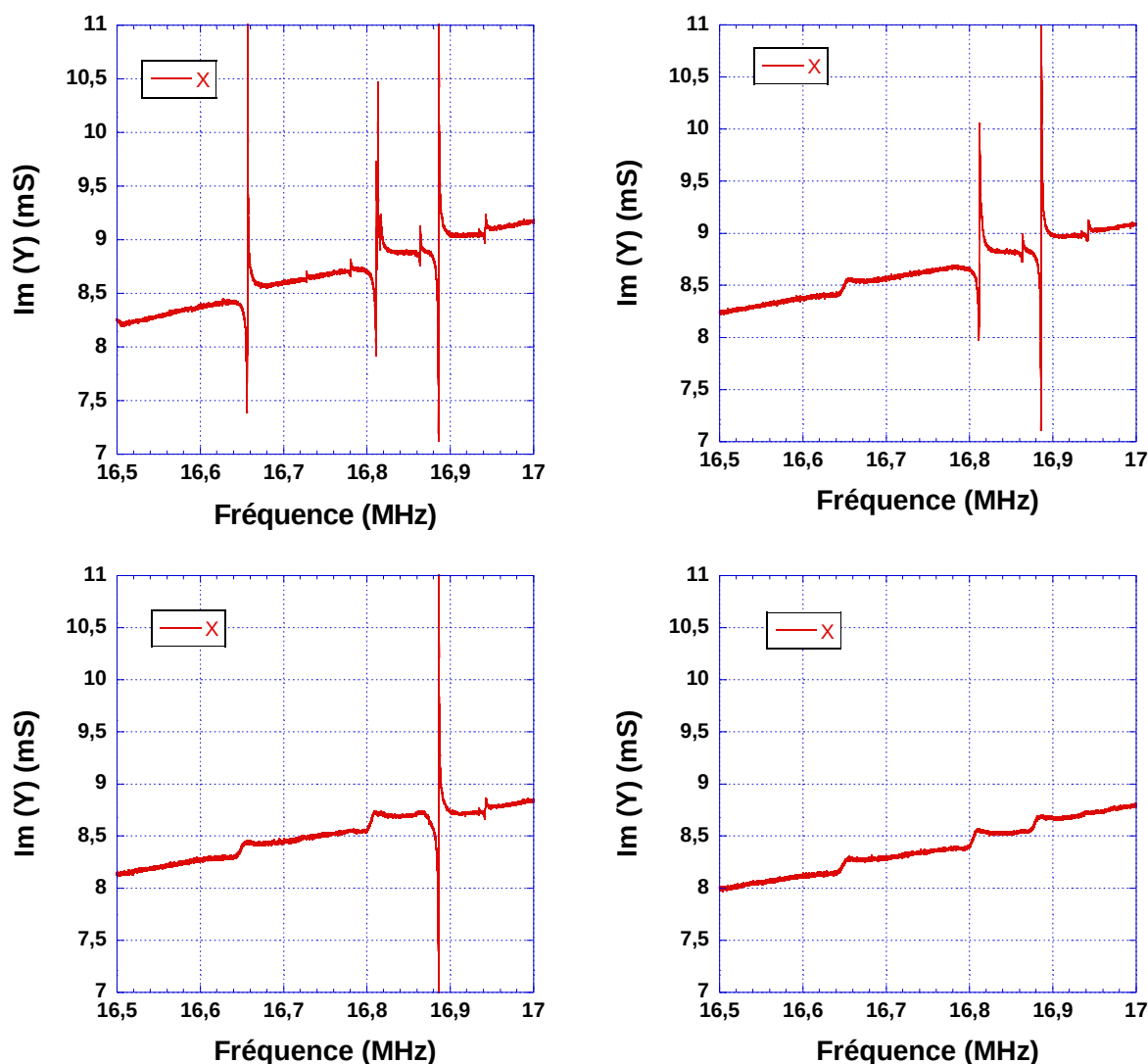


Figure II-48, Effet du dépôt de solution d'eau / glycérol à 70% de glycérol sur les différentes électrodes du capteur multi-électrodes

II.3.2.6 Protocole expérimental

Pour permettre la caractérisation du capteur, un protocole expérimental est mis en place. Ainsi, dans un premier temps une mesure à vide du quartz est effectuée. Puis 200 μL d'eau sont déposés sur la totalité de la surface du capteur, ce qui implique l'atténuation des trois pics de résonance sans distinction. La Figure II-49 montre un exemple des mesures effectuées pour la caractérisation du capteur. Dans ce cas précis, une solution d'eau/glycérol à 60 % en masse de glycérol. Nous pouvons remarquer une forte atténuation entre les mesures à vide et les mesures en charge, mais également entre la mesure correspondant au dépôt d'eau et la mesure correspondant au dépôt de glycérol. Cette série de mesure est effectuée pour cinq solutions différentes d'eau/glycérol dont les pourcentages en masse de glycérol sont de respectivement 0, 10, 25, 40 et 60 % en masse.

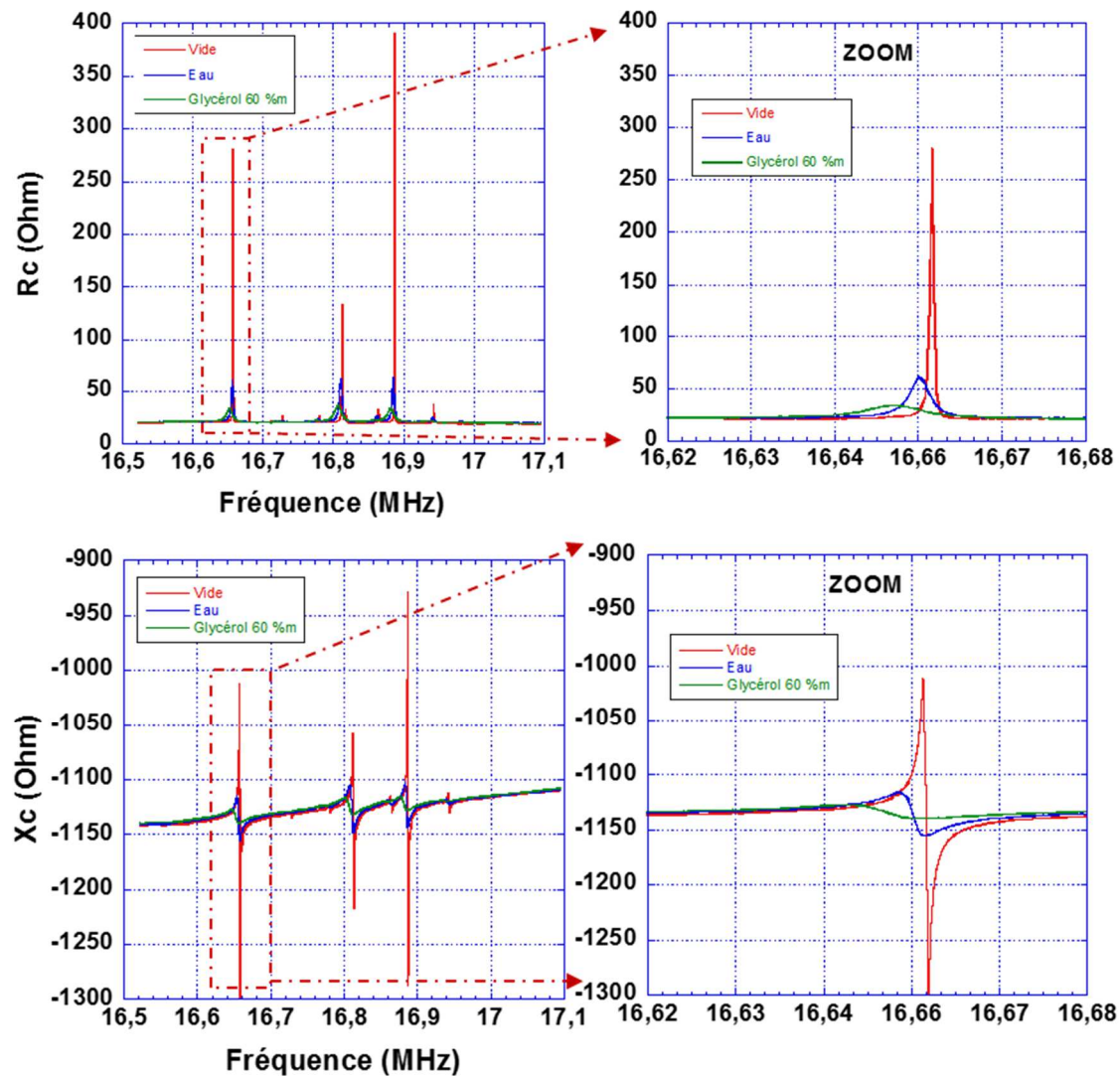


Figure II-49, Partie réelle et imaginaire de l'impédance du capteur multi-électrodes pour différents chargements à sa surface. En rouge, mesure à vide, en bleu, mesure à l'eau et en vert mesure d'une solution d'eau / glycérol à 60%.

Après traitement des données, la Figure II-50 montre les valeurs moyennes du module visqueux G'' pour chaque solution d'eau / glycérol déposée à la surface du quartz. Elles ont été obtenues après analyse des données des atténuations des signaux des trois pics de résonance.

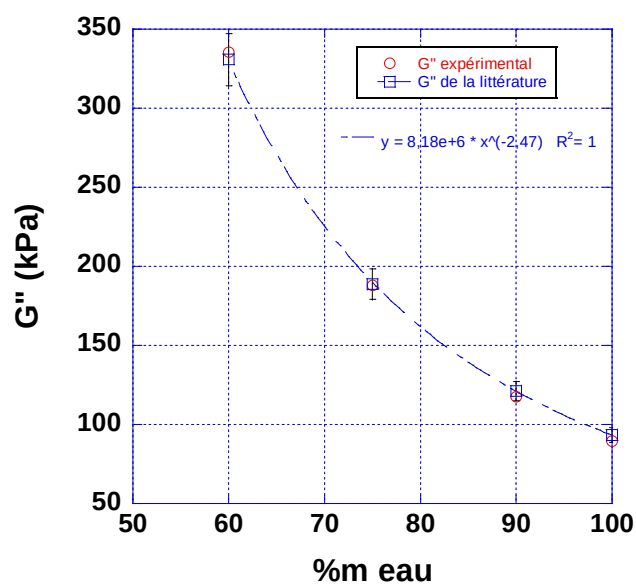


Figure II-50, Comparaison du module visqueux pratique obtenu en fonction du module visqueux issu de la littérature de différentes solutions d'eau / glycérol, en fonction du pourcentage massique d'eau.

Les valeurs expérimentales de viscosité tendent fortement vers les valeurs de la littérature ce qui confirme la capacité du capteur développé à détecter des solutions parfaitement connues et de caractéristiques contrôlées.

II.4 Conclusion

Dans ce chapitre, une étude sur l'optimisation d'un transducteur monoélectrode a été menée. L'objectif de cette partie était l'amélioration des propriétés électriques du capteur en optimisant la géométrie et les dimensions des électrodes. La campagne d'optimisation a permis d'obtenir un design d'électrodes optimisé de forme elliptique. En effet, après caractérisation électro-mécanique du capteur optimisé, de meilleures performances, et des amplitudes de signaux plus importantes sont observées par rapport aux autres designs testés sous les mêmes conditions expérimentales. De plus, un travail d'amélioration de la surface de l'électrode, et plus particulièrement de son état topographique, a été effectué, en optimisant les propriétés physico-chimiques de surface. Cette étude a été conduite en effectuant des modifications des énergies de surface mais également la rugosité des capteurs. Il en résulte l'obtention d'un protocole expérimental de modification de surface permettant d'obtenir le meilleur compromis état de surface/qualité du signal de sortie.

Afin d'augmenter la spécificité et permettre des mesures simultanément de différents analytes, des transducteurs à plusieurs électrodes ont été développés durant ces travaux de thèse. Le choix du nombre d'électrodes est justifié par le nombre d'analytes biologiques à détecter au cours de notre étude. La solution choisie est composée de trois électrodes, avec deux électrodes dédiées à la détection et au suivi d'évolution des protéines *tau* et *Aβ*, et une troisième électrode qui fait office de référence lors des mesures expérimentales. Les procédés technologiques pour la réalisation de prototypes ont été présentés. Les différentes caractérisations ont montré la faisabilité d'un tel système à détecter des analytes, en montrant le caractère répétable et reproductible des mesures, tout en assurant un caractère indépendant au fonctionnement des différentes électrodes du système. Ces résultats sont validés par la concordance des valeurs expérimentales avec les valeurs connues de la littérature lors d'expérimentations sur des solutions dont les propriétés physico-chimiques sont connues. Dans la suite de ce manuscrit de thèse, des essais de détection sont effectués en milieu biologique complexe pour confirmer la capacité du capteur mono-électrode dans un premier temps, et multiélectrodes dans un second temps, à détecter les protéines d'étude dans leurs différentes conformation 3D.

II.5 Références bibliographiques

- [45] J. V. Rushworth, A. Ahmed, H. H. Griffiths, N. M. Pollock, N. M. Hooper, and P. a. Millner, "A label-free electrical impedimetric biosensor for the specific detection of Alzheimer's amyloid-beta oligomers," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 56, pp. 83–90, 2014.
- [48] D. Stan, C. M. Mihailescu, R. Iosub, C. Moldovan, M. Savin, and I. Baci, "Electrochemical studies of homogeneous self-assembled monolayers versus mixed self-assembled monolayers on gold electrode for 'label free' detection of heart fatty acid binding protein," *Thin Solid Films*, vol. 526, pp. 143–149, 2012.
- [65] M. J. Madou, *Manufacturing Techniques for Microfabrication and Nanotechnology*. CRC Press, 2011.
- [66] A. Hierlemann, O. Brand, C. Hagleitner, and H. Baltes, "Microfabrication techniques for chemical/biosensors," *Proc. IEEE*, vol. 91, no. 6, pp. 839–863, 2003.
- [67] P. T. Kissinger and W. R. Heineman, "Cyclic voltammetry," *J. Chem. Educ.*, vol. 60, no. 9, pp. 9242–5, 1983.
- [68] A. J. Bard and L. R. Faulkner, *ELECTROCHEMICAL METHODS Fundamentals and Applications*. 1944.
- [69] P. H. Rieger, *Electrochemistry*. Cambridge: Cambridge University Press, 1994.
- [70] K. R. Williams, K. Gupta, and M. Wasilik, "Etch rates for micromachining processing - Part II," *J. Microelectromechanical Syst.*, vol. 12, no. 6, pp. 761–778, 2003.
- [71] E. Despiau-Pujo, "Gravure des semi-conducteurs III-V par plasmas inductifs chlorés," Ecole Polytechnique, 2009.
- [72] M. Żenkienwicz, "Methods for the calculation of surface free energy of solids," *J. Achiev. Mater. Manuf. Eng.*, vol. 24, no. 1, pp. 137–145, 2007.
- [73] K. W. Vogt, P. A. Kohl, W. B. Carter, R. A. Bell, and L. A. Bottomley, "Characterization of thin titanium oxide adhesion layers on gold: resistivity, morphology, and composition," *Surf. Sci.*, vol. 301, no. 1–3, pp. 203–213, Jan. 1994.
- [74] Y.-S. Lin and H.-M. Liu, "Enhanced adhesion of plasma-sputtered copper films on polyimide substrates by oxygen glow discharge for microelectronics," *Thin Solid Films*, vol. 516, no. 8, pp. 1773–1780, Feb. 2008.
- [75] M. Charbonnier and M. Romand, "Polymer pretreatments for enhanced adhesion of metals deposited by the electroless process," *Int. J. Adhes. Adhes.*, vol. 23, no. 4, pp. 277–285, Jan. 2003.
- [76] L. Martinez, J. Goossens, C. Glorieux, N. Wilkie-Chancellier, C. O. Ehssein, and S. Serfaty, "3D Gabor analysis of transient waves propagating along an AT cut quartz disk," *Ultrasonics*, vol. 44, pp. 1173–1177, 2006.
- [77] Y. Wang, N. Wilkie-Chancellier, L. Martinez, and S. Serfaty, "Electrodes geometry and surface waves generation on a quartz disk: experimental study," *11th French Congr. Acoust. (CFA 2012)*, pp. 659–663, 2012.
- [78] D. S. Ballantine Jr et al., *Acoustic Wave Sensors: Theory, Design, & Physico-Chemical Applications*. Academic press, 1996.
- [79] N. Cheng, "Formula for Viscosity of Glycerol-Water Mixture," pp. 3285–3288, 2008.
- [80] A. W. Czanderna and C. Lu, *Applications of Piezoelectric Quartz Crystal Microbalances*, vol. 7. 1984.
- [81] A. Tuantranont, A. Wisitsora-at, P. Sritongkham, and K. Jaruwongrungrunsee, "A review of monolithic multichannel quartz crystal microbalance: A review," *Anal. Chim. Acta*, vol. 687, pp. 114–128, 2011.

- [82] E. Zampetti, S. Pantalei, A. Macagnano, E. Proietti, C. Di Natale, and A. D'Amico, "Use of a multiplexed oscillator in a miniaturized electronic nose based on a multichannel quartz crystal microbalance," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 131, no. 1, pp. 159–166, 2008.
- [83] K. Seidler, M. Polreichová, P. a. Lieberzeit, and F. L. Dickert, "Biomimetic Yeast Cell Typing—Application of QCMs," *Sensors*, vol. 9, pp. 8146–8157, 2009.
- [84] K. Jaruwongrungee, U. Waiwijit, A. Wisitsoraat, M. Sangworasil, C. Pintavirooj, and A. Tuantranont, "Real-time multianalyte biosensors based on interference-free multichannel monolithic quartz crystal microbalance," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 67, pp. 576–581, 2015.
- [85] T. Abe and M. Esashi, "One-chip multichannel quartz crystal microbalance (QCM) fabricated by Deep RIE," *Sensors Actuators, A Phys.*, pp. 139–143, 2000.
- [86] F. Lu, H. P. Lee, P. Lu, and S. P. Lim, "Finite element analysis of interference for the laterally coupled quartz crystal microbalances," *Sensors Actuators, A Phys.*, vol. 119, no. 1, pp. 90–99, 2005.

Chapitre III : Suivi de polymérisation de protéines avec un capteur une électrode

Sommaire

III.1	SUIVI DE LA POLYMERISATION DE LA PROTEINE TAU.....	96
III.1.1	<i>Le peptide VQIVYK</i>	96
III.1.2	<i>Suivi des paramètres viscoélastiques du peptide VQIVYK à 22°C.....</i>	97
III.1.3	<i>Effet de la température sur la cinétique de polymérisation.....</i>	104
III.1.4	<i>Effet de la salinité du tampon sur la polymérisation.....</i>	106
III.2	SUIVI DE POLYMERISATION DU PEPTIDE A β	108
III.2.1	<i>Mécanismes d'agrégation du peptide Aβ.....</i>	108
III.2.2	<i>Suivi rhéologique de la polymérisation du peptide Aβ.....</i>	110
III.3	DETECTION EN MILIEU COMPLEXE.....	112
III.3.1	<i>Milieus physiologiques pour les biomarqueurs.....</i>	113
III.3.2	<i>Sensibilité du capteur aux caractéristiques du milieu</i>	114
III.4	DETECTION AVEC LE TRANSDUCTEUR A TROIS ELECTRODES	117
III.5	CONCLUSION	119
III.6	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	120

Dans ce chapitre, seront présentés les résultats de détections de protéines, particulièrement le suivi de polymérisation des protéines spécifiques à la maladie d'Alzheimer (*tau* et *Aβ*) avec un capteur à ondes acoustiques en mode rhéomètre tels que ceux développés et présentés dans le chapitre précédent. Les détections ont été réalisées sans fonctionnalisation de surface, c'est-à-dire que le capteur n'aura pas subi de traitement de surface pour augmenter de façon préférentielle sa sélectivité. Un suivi de la polymérisation avec un capteur à une électrode sera réalisé à température ambiante et comparé aux données de la littérature. Une étude similaire sera menée pour suivre la polymérisation de la protéine *Aβ*.

III.1 Suivi de la polymérisation de la protéine *tau*

III.1.1 Le peptide VQIVYK

Ce travail de thèse a été effectué en collaboration avec le laboratoire IGDR dans l'équipe Traduction et Repliement de l'université de Rennes 1 (Christian Delamarche), dont les travaux de recherches se focalisent sur la polymérisation de la protéine *tau*, et plus particulièrement sur une séquence peptidique de cette protéine, l'héxapeptide 306-VQIVYK-311. Il est constitué de l'enchaînement de six acides aminés, à savoir Valine-Glutamine-Isoleucine-Valine-Tyrosine-Lysine. Le choix de ce peptide est justifié par le fait qu'il est le peptide le plus petit capable de générer des fibres présentant des structures identiques aux fibres hélicoïdales (Paired Helical Filament) [87][88]. Les origines des dégénérescences neurofibrillaires, explicitant la structure de la protéine *tau* et le procédé d'agrégation menant à la formation des fibres pathologiques, sont présentées en Annexe C. La facilité de fibrillation de cet héxapeptide sans l'apport de produit inducteur, va permettre de simuler sous différentes conditions expérimentales la formation des fibres insolubles. Des modèles de la cinétique de polymérisation ont été établis en fonction de la concentration en espèce réactive en solution.

Les peptides utilisés dans cette étude sont des peptides synthétiques achetés chez la société *Genepep*®, ils sont fournis à l'état lyophilisé. Les peptides sont resuspendus dans de l'eau distillée et après dosage, le stock obtenu est à une concentration de 4,7 mM.

La veille des expérimentations, le stock initial de peptide est dilué pour avoir une concentration de 1 mM et conservé à 4°C pour une durée de 10 heures. Afin de préparer les

solutions de peptides, un tampon de polymérisation (*MOPS* 10 mM, *NaCl* 150 mM, pH = 7,2) mais également de l'eau distillé sont ajoutés.

III.1.2 Suivi des paramètres viscoélastiques du peptide *VQIVYK* à 22°C

Afin de simuler différentes étapes de la polymérisation du peptide *VQIVYK*, plusieurs solutions à des concentrations représentatives de chaque phase de la polymérisation (Figure III-1) sont déposées sur la surface du capteur. Trois phases peuvent ainsi être identifiées : la phase de nucléation, d'élongation et la phase de plateau. La phase de nucléation est l'étape de la formation de noyaux protéiques à partir des monomères. L'étape d'élongation marque un état transitoire dans la polymérisation des fibres biologiques. En effet, les noyaux vont s'autoagréger pour former des oligomères puis protofibrilles. Enfin, dans la phase de plateau, la formation de fibres matures sera le point d'orgue de la polymérisation. On atteint un équilibre dans la réaction, où fibres matures polymérisées cohabitent avec des noyaux protéiques non polymérisés.

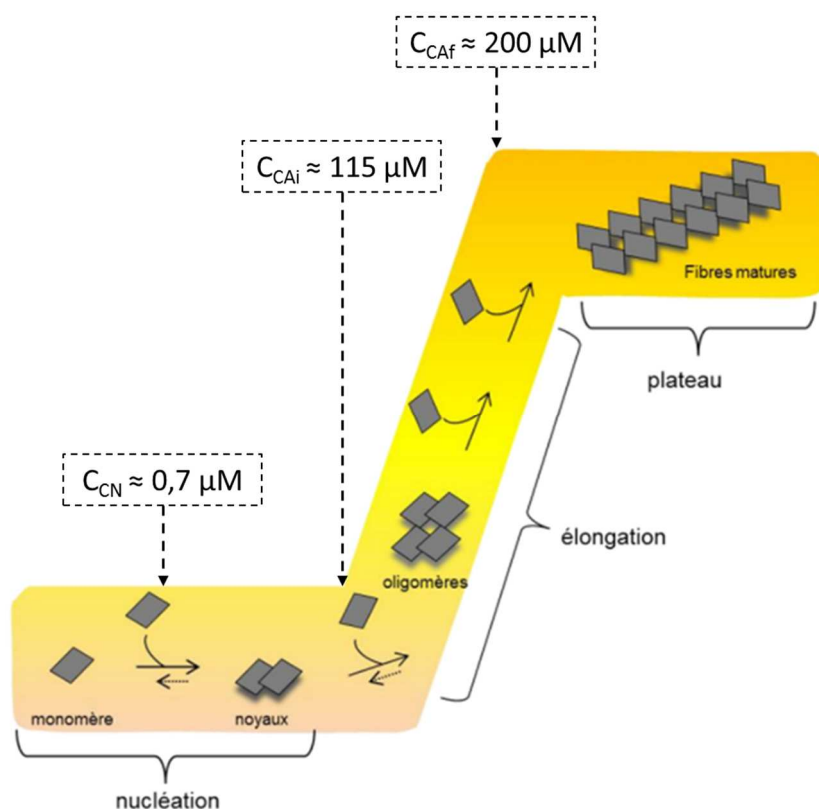


Figure III-1, Modèle du processus de l'agrégation du peptide *VQIVYK*.

Des études biologiques [89] ont permis de mettre en avant les concentrations critiques des changements de conformation des protéines en effectuant des dosages des solutions

protéiques aux différentes concentrations, et en couplant ces dosages à des analyses par microscopie électronique par transmission.

Ainsi, le modèle biologique de la cinétique de polymérisation est caractérisé par trois concentrations :

- la concentration critique de nucléation, C_{CN} , où les peptides libres vont former des noyaux de nucléation ;
- la concentration critique d'assemblage, C_{CAi} , qui est la concentration à partir de laquelle les noyaux de protéine vont s'assembler pour former des oligomères et protofibrilles ;
- la concentration C_{Caf} qui est la concentration d'assemblage à partir de laquelle la réaction rentre dans la phase de plateau.

Le Tableau 3 donne les concentrations représentatives de chaque stade de la polymérisation qui ont été choisies pour cette étude.

Concentration (μM)	Phase
30	Phase de nucléation
60	Phase de nucléation
120	Phase d'élongation
240	Phase de plateau
480	Phase de plateau

Tableau 3, Concentrations des solutions de peptide VQIVYK pour le suivi cinétique de la polymérisation.

Pour calibrer chaque expérimentation et afin de s'assurer du fonctionnement correct du capteur, une solution d'eau de 200 μL de volume est déposée à la surface du capteur pendant 140 min jusqu'à la stabilisation du système, comme le montre le cas présenté à la Figure III-2. Puis un dépôt de 200 μL de tampon de polymérisation est effectué à la suite du dépôt d'eau pure. C'est à partir de ce second dépôt (voir Figure III-2) que les signaux correspondant aux peptides pourront être comparés. Dès que le signal du le tampon de polymérisation est stable, il est retiré du système puis un échantillon de peptide est déposé et le suivi de la polymérisation des fibres débute. Le système de mesure permet de réaliser un suivi temporel de l'impédance complexe du capteur en fonction des dépôts qui sont effectués. C'est à partir de ces données, et au travers d'un traitement du signal dédié, que l'extraction des paramètres viscoélastiques sera réalisée.

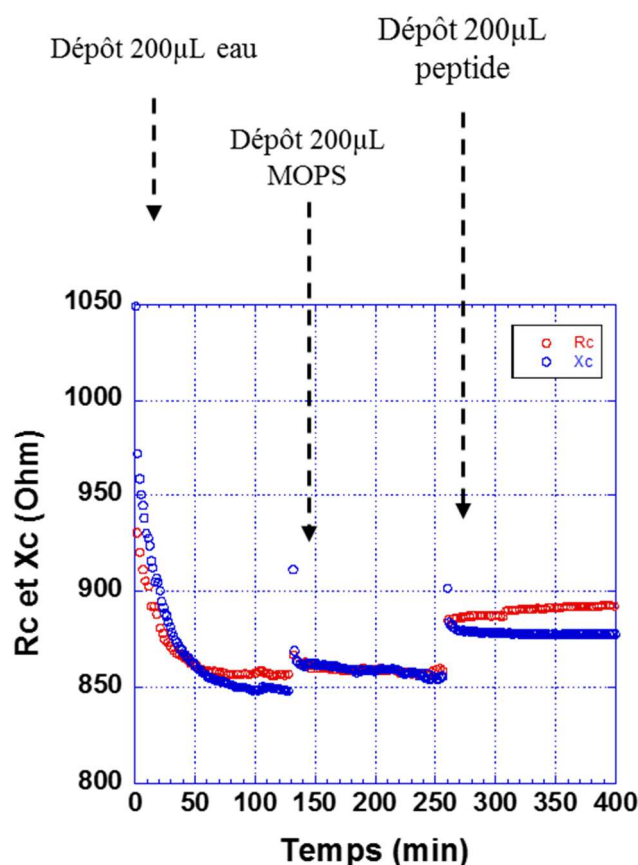


Figure III-2, Suivi temporel de l'impédance du quartz (paramètres R_c et X_c) en fonction du dépôt. De 0 à 140 min, dépôt de 200 μ L d'eau, de 140 à 250 min dépôt de 200 μ L de MOPS et de 250 à 400 min dépôt de la solution protéique.

Après extraction des paramètres viscoélastiques des solutions de peptide, nous obtenons la cinétique de fibrillation du peptide en fonction du temps pour chaque concentration (Figure III-3). Pour les concentrations les plus faibles, 30 et 60 μ M, qui correspondent à des concentrations en phase de nucléation, nous pouvons remarquer une très faible variation du module élastique de ces solutions. Ce qui s'explique par de très faibles changements de conformations des protéines d'étude. Pour la solution de 120 μ M de concentration, nous pouvons remarquer une forte variation du module élastique au cours du temps, qui va être spécifique de la formation de protofibrilles au cours de temps, à partir des noyaux protéiques. Enfin pour les concentrations les plus élevées (240 et 480 μ M), nous remarquons une très forte augmentation du module élastique au cours de temps jusqu'à atteindre une valeur palier, ce qui est spécifique de la polymérisation complète du système et de l'atteinte d'un équilibre biologique.

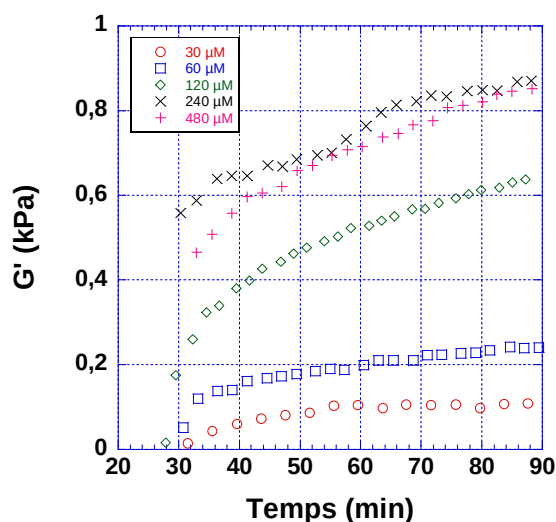


Figure III-3, Module élastique G' du peptide VQIVYK, en fonction du temps et paramétré par la concentration du peptide pour une température de $T=22^{\circ}\text{C}$.

La Figure III-4 présente le module élastique, à l'atteinte de la stabilisation du signal, des solutions de peptides en fonction de leur concentration. Il peut être remarqué que, pour les faibles concentrations entre 0 et 60 μM , le module élastique varie peu, de 0,1 à 0,2 kPa. Cela est confirmé par le fait qu'à ces concentrations le peptide est en phase de latence : hormis l'agglomération des peptides libres en noyaux, aucun autre changement de conformation n'est avéré. Pour la concentration intermédiaire (120 μM) correspondant à l'agglomération des noyaux en oligomères puis en protofibrilles, l'élasticité augmente, signe d'un changement de conformation. Enfin, pour les plus fortes concentrations, entre 240 μM et 480 μM , nous sommes purement dans la phase de plateau. Cela peut s'observer par le fait de la très forte, et très rapide augmentation du module élastique au cours du temps, jusqu'à atteindre un palier à 0,9 kPa.

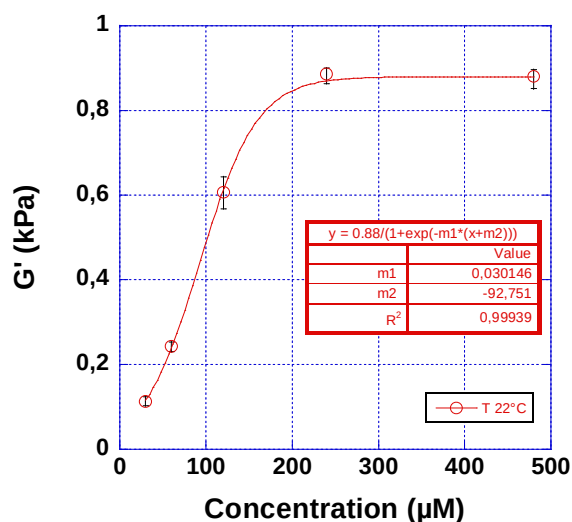


Figure III-4, Module élastique des solutions de peptide en fonction de leur concentration. Régression réalisée à partir d'une sigmoïde d'asymptotes $G' = 0$ et le $G' = G'$ (concentration expérimentale maximale).

Les données obtenues avec le capteur (Figure III-4) sont en adéquation avec le modèle biologique connu. Ces résultats permettent de valider le capteur comme outil permettant d'identifier les différents stades de la polymérisation de la protéine *tau*.

De plus, le capteur permet de quantifier la polymérisation en termes de module visqueux. L'augmentation du module visqueux peut être observée en fonction de la concentration protéique à la Figure III-5. Plus la concentration sera élevée, ce qui correspond à des états de fibrillation avancée (système composé de fibres matures), plus le module visqueux va augmenter jusqu'à atteindre un palier, correspondant à l'atteinte de l'équilibre du système biologique et de l'arrêt de sa polymérisation. Cela s'explique du fait du changement de conformation de la solution d'étude. Aux faibles concentrations, le système présente une structure quasiment similaire au tampon de polymérisation, du fait de l'unique présence de peptide libre en solution. Dès lors l'augmentation de la concentration, de la polymérisation des peptides en oligomères puis fibres matures va résulter l'augmentation de du module visqueux. Ces résultats, en conformité avec ceux obtenus par les biologistes [89], appuient encore la validité du système.

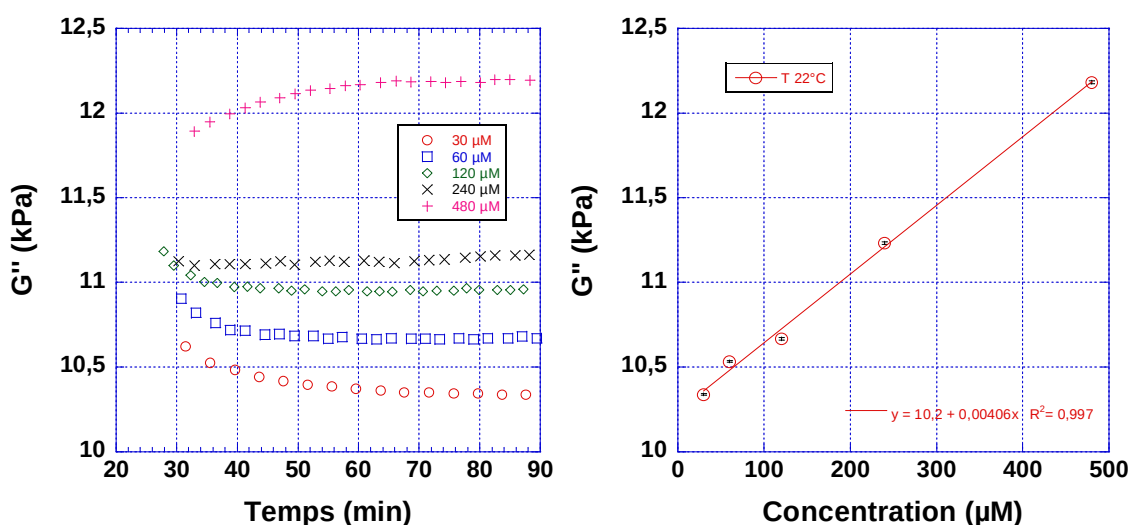


Figure III-5, Suivi cinétique de du module visqueux des solutions peptidiques (*tau*) en fonction du temps et de la concentration peptidique et du temps.

Les paramètres viscoélastiques extraits ont permis de retrouver les états du modèle de la protéine *tau*. Afin de vérifier les états de chaque solution déposée sur le capteur, des images *AFM* ont été réalisées et sont présentées Figure III-6. Elle présente un modèle de cinétique de la formation de fibre amyloïde en fonction de la concentration. La cinétique forme une sigmoïde qui, comme on l'a déjà vu Figure III-4, peut être décomposée en trois phases majeures, la phase de nucléation (ou phase de latence), la phase d'élongation et la phase de

plateau. Les monomères vont s'agréger entre eux pour former des noyaux de nucléation. Pendant la phase d'élongation, les noyaux vont continuer à s'assembler pour former des oligomères et des protofibrilles. Dès l'état de fibres matures obtenu, un équilibre est atteint ce qui nous place dans la dernière phase de croissance qui est la phase de plateau.

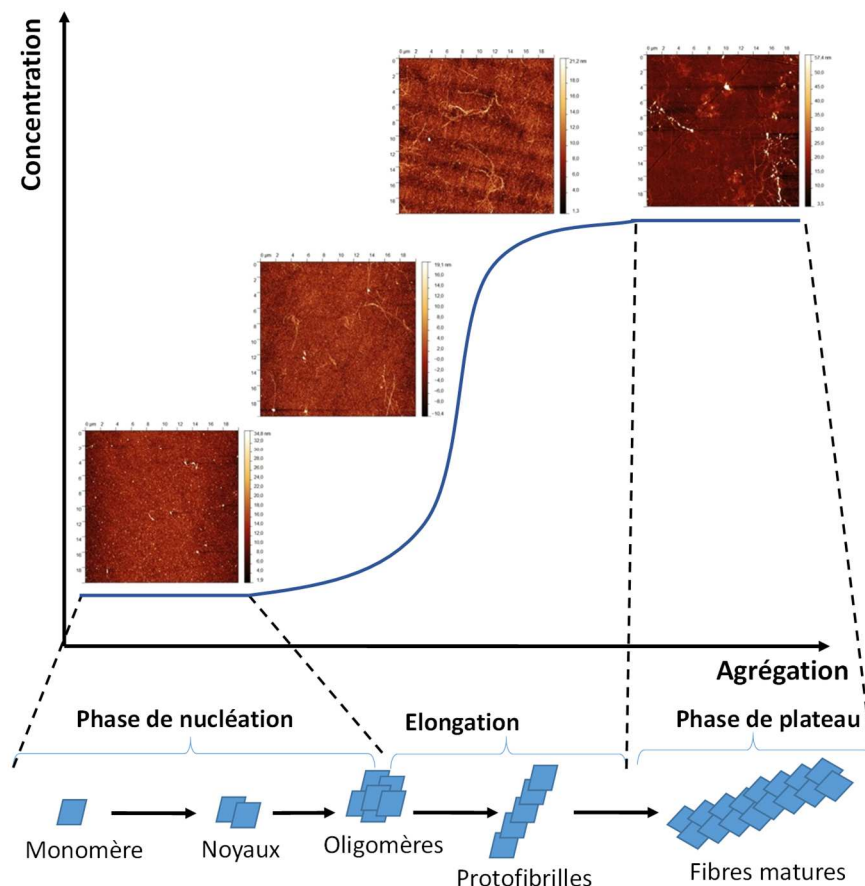


Figure III-6, Modèle de cinétique de la polymérisation de la protéine tau.

Les états initiaux et finaux, correspondant à des états noyaux et des états de fibres matures sont connus et très étudiés dans la littérature. Cependant les états intermédiaires restent très largement méconnus, puisque qu'ils vont dépendre de la séquence peptidique d'étude, mais également des conditions expérimentales, comme la température, la concentration, les milieux de culture, etc.

Les solutions protéiques ont également été vérifiées par des mesures de spectrophotométrie, méthode d'analyse qui permet de déterminer l'absorbance de solutions chimiques ou biologiques. L'absorbance (A) qui est la capacité d'une solution à absorber la lumière, dépend de la nature et de la concentration de la solution à caractériser, mais également de la longueur d'onde à laquelle elle est caractérisée. Pour réaliser ces mesures, la solution est insérée dans une cuve transparente, qui est parcourue par une lumière monochromatique d'intensité connue I_0 . A partir d'une mesure de l'intensité de la lumière

transmise I , il est possible d'extraire l'absorbance, telle que l'exprime l'équation (6) :

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) \quad (6)$$

Les mesures sont faites grâce à un spectrophotomètre double faisceau dont le schéma de principe est illustré à la Figure III-7.

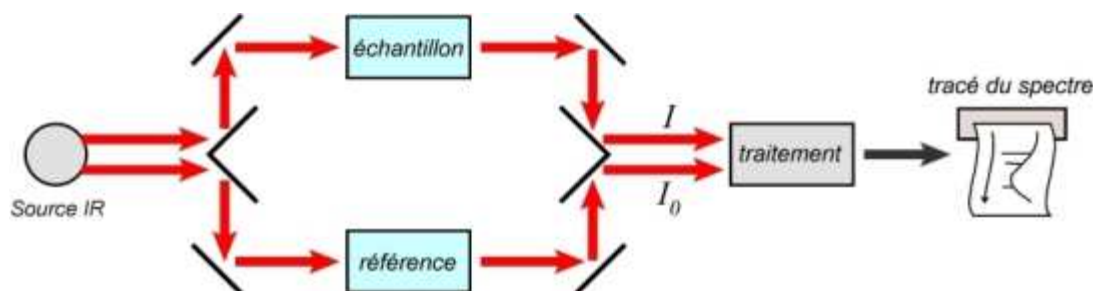


Figure III-7, Schéma de principe du spectrophotomètre double faisceau.

Les spectres ainsi obtenus sont présentés à la Figure III-8. Nous pouvons remarquer que plus la concentration en protéine *tau* est élevée, plus la turbidité des solutions augmente. Nous pouvons également remarquer à 200 nm un pic propre aux acides aminés du peptide, par exemple, le pic à 270 nm est la signature de l'acide aminé aromatique. De plus, nous pouvons remarquer que l'absorbance des solutions augmente avec la concentration des solutions à 350 nm, ceci est observable en comparant les mesures à 30, 120 et 240 μM .

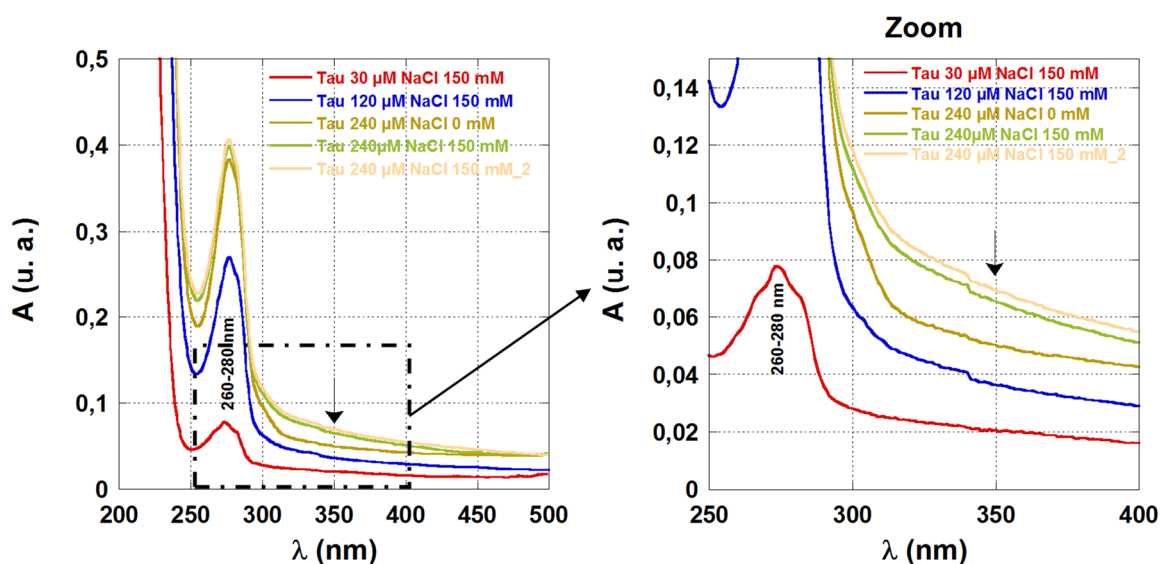


Figure III-8, Spectres d'absorbances 200-500 nm de solutions de protéine *tau* à différentes concentrations.

Grâce aux mesures de spectrophotométrie, l'effet de la concentration des peptides peut être confirmé. Ainsi, la solution à 240 μM de peptide possède une absorbance plus élevée que

les solutions de 30 et 120 μM . Un essai supplémentaire a été réalisé pour mettre en avant l'effet du *NaCl* sur le peptide. Pour cela, une solution de peptide à 240 μM de concentration est préparée sans *NaCl* en solution. Nous pouvons remarquer un signal plus faible de l'absorbance que pour les solutions de même concentration avec du sel en solution. Les deux méthodes de caractérisation des solutions ont bien permis de confirmer la teneur de chaque solution et contribue à la validation du capteur.

De nombreux paramètres influent sur les polymérisations, comme la température ou le taux de sel, ce sont ces variations qui seront présentées dans les parties suivantes.

III.1.3 Effet de la température sur la cinétique de polymérisation

La température est un des paramètres importants de l'environnement pouvant modifier la cinétique de polymérisation et le comportement des protéines [90], [91]–[93]. Afin de mettre en évidence l'impact de la température sur la polymérisation à la température du corps humain, une étude a été réalisée [94].

La Figure III-9 montre le module visqueux et l'élasticité moyenne en fonction de la concentration de peptides et pour les deux températures 22 et 37°C. On peut tout d'abord remarquer que le module visqueux augmente de façon linéaire avec la concentration peptidique, et ce quelle que soit la température d'expérimentation. Cependant, nous pouvons remarquer une augmentation globale des valeurs de viscosité pour une même concentration entre les deux températures. Il semblerait que les protéines, à une température plus élevée, présentent des viscosités supérieures quelle que soient leurs conformations structurales.

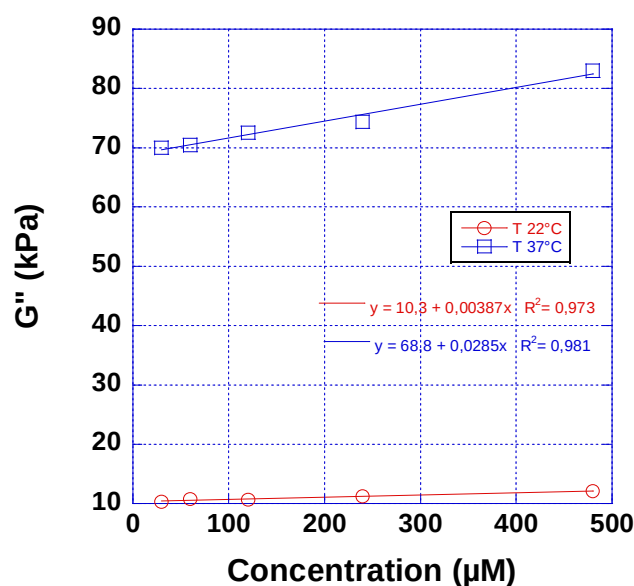


Figure III-9, Modules visqueux des solutions de peptide VQIVYK à différentes concentrations et à des températures de 22 et 37°C.

En s'intéressant à l'élasticité, il peut être établi que l'élasticité générale suivant la concentration en peptide en solution augmente également avec la température et ce de façon plus importante. Cependant, l'allure générale de la cinétique de polymérisation reste une sigmoïde, où l'on retrouve les phases de latence, les phases d'élongation et les phases de plateau. Cependant comme pour le module visqueux, l'élasticité présente des valeurs plus importantes à 37°C qu'à 22°C.

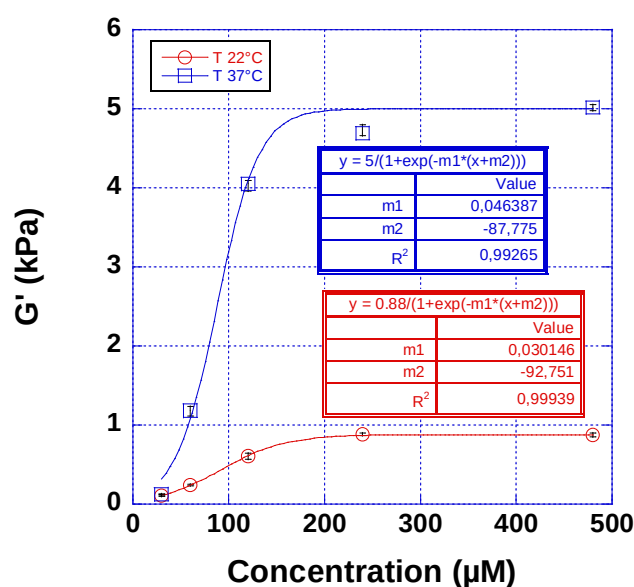


Figure III-10, Elasticité moyenne des solutions de peptide VQIVYK à différentes concentrations pour deux températures expérimentales. Régression réalisée à partir d'une sigmoïde d'asymptotes $G' = 0$ et le $G' = G'$ (concentration expérimentale maximale).

Il semble clair que la cinétique globale de la polymérisation n'est pas modifiée par l'augmentation de température. Par contre les paramètres viscoélastiques présentent des valeurs plus élevées montrant une modification des caractéristiques globales liées aux différences de conformations.

Ainsi, nous pouvons remarquer que la température modifie les paramètres viscoélastiques mais ne modifie pas la cinétique globale de la polymérisation des peptides *VQIVYK*. Ces résultats constituent une référence car les paramètres viscoélastiques sont pour la première fois établis à 37°C.

Cependant ce n'est pas l'unique facteur pouvant modifier la polymérisation des peptides en fibres matures. En effet, la polymérisation des peptides est induite par l'ajout de sel, qui est contenu dans le tampon de polymérisation.

III.1.4 Effet de la salinité du tampon sur la polymérisation

L'apport de sel *NaCl* contenu dans le tampon de fibrillation permet d'amorcer la réaction de polymérisation du peptide d'étude. En effet, sans sel, le peptide reste sous une forme de peptide libre et sa conformation structurale ne sera pas modifiée dans le temps. Pour cela, des essais ont été réalisés en faisant varier la concentration de *NaCl* dans le tampon de fibrillation. Les solutions de tampon de fibrillation avec des concentrations de *NaCl* différentes ont été réalisées à partir d'une solution de tampon *MOPS* sans sel dans lequel ont été rajoutés différents volumes de *NaCl* afin de procéder aux bonnes dilutions. Pour la réalisation de cette étude, les solutions de peptides *VQIVYK* ont une concentration de 120 μ M. Le choix de cette concentration est justifié par le fait que les peptides à cette concentration pourront former des oligomères suivant les conditions expérimentales.

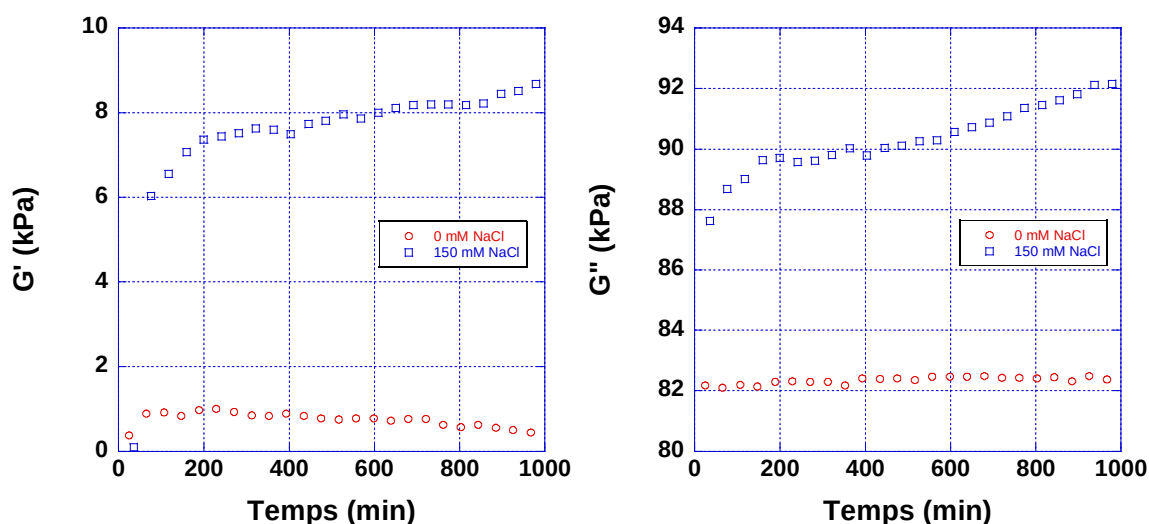


Figure III-11, Suivi cinétique des paramètres viscoélastiques lors de la polymérisation du peptide VQIVYK en fonction de différentes solutions de tampon de polymérisation.

La Figure III-11 permet de mettre en évidence l'action du *NaCl* sur la polymérisation du peptide VQIVYK. Nous pouvons remarquer que pour des échantillons de peptide solubilisé dans du tampon sans sel, la polymérisation n'est pas induite. On peut remarquer cela au fait que le module visqueux et l'élasticité ne varient pas au cours du temps. Ainsi, le peptide reste sous forme de peptide libre.

A partir du moment où du sel est présent en solution, la réaction de polymérisation est initiée du fait de l'augmentation des paramètres viscoélastiques des échantillons au cours du temps et de la cinétique caractéristique de la polymérisation. Comme le montre la courbe correspondant à l'échantillon protéique préparé avec une solution de *NaCl* à 150 mM.

Il apparaît clairement que le capteur à ondes acoustiques à une électrode en mode rhéomètre permet de suivre la polymérisation de la protéine *tau* à 22°C, de remonter aux conformations des protéines et de retrouver les modèles établis par les biologistes. Le module visqueux a également pu être déterminé quel que soit le stade de la polymérisation. Dans un deuxième temps, l'outil étant validé, il a pu être réalisé un suivi de polymérisation à 37°C montrant une cinétique similaire à celle réalisée à 22°C avec des paramètres viscoélastiques plus élevés, ces résultats représentent une réelle avancée dans la connaissance de cette polymérisation.

La maladie d'Alzheimer est étroitement liée à la détection et à la compréhension des phénomènes de polymérisation de deux protéines : la protéine *tau* qui a fait l'objet des parties précédentes et le peptide A β qui va faire l'objet de la suite.

III.2 Suivi de polymérisation du peptide $A\beta$

III.2.1 Mécanismes d'agrégation du peptide $A\beta$

III.2.1.1 Production du peptide $A\beta$

La protéine amyloïde $A\beta$, décrite pour la première fois en 1984 [95] comme étant responsable de la formation des plaques séniles, est le résultat du clivage de la glycoprotéine transmembranaire βAPP . Deux enzymes, la β -sécrétase et la γ -sécrétase, vont conjointement cliver βAPP et qui permettront d'obtenir de trois fragments protéiques, le fragment C-terminal, le fragment *N-terminal* ainsi que le peptide amyloïde $A\beta$ [15][96]. Dans un premier temps, la β -sécrétase va cliver la glycoprotéine βAPP du côté *N-terminal* au niveau de l'acide aminé 671, permettant la libération d'un fragment protéique soluble, $APPs-\beta$. Puis la γ -sécrétase va cliver, du côté *C-terminal*, la glycoprotéine βAPP au niveau des acides aminés 711 ou 713. Cela aura pour incidence de créer deux fragments protéiques, le peptide $A\beta$ 40 ou 42, suivant le site de clivage de la γ -sécrétase, et un fragment protéique intracellulaire. Le peptide $A\beta$ 42 va cependant s'agréger plus facilement, et sa production sera inhibée dès lors la maladie déclarée. Cette voie de production des peptides $A\beta$ est dite « amyloïdogénique » [97][98]. Il existe une voie non pathogène, dite « non-amyloïdogénique ». Dans cette seconde voie, l' α -sécrétase clive l' APP au niveau de l'acide aminé 687, qui sécrètera un fragment soluble dans le milieu cellulaire, l' $APP-\alpha$. Puis la γ -sécrétase va cliver le fragment résiduel encore maintenu dans la membrane cellulaire au niveau des acides aminés 711 ou 713. Il en résultera le relargage d'un fragment $p3$ non pathogène dans le milieu cellulaire [98][99].

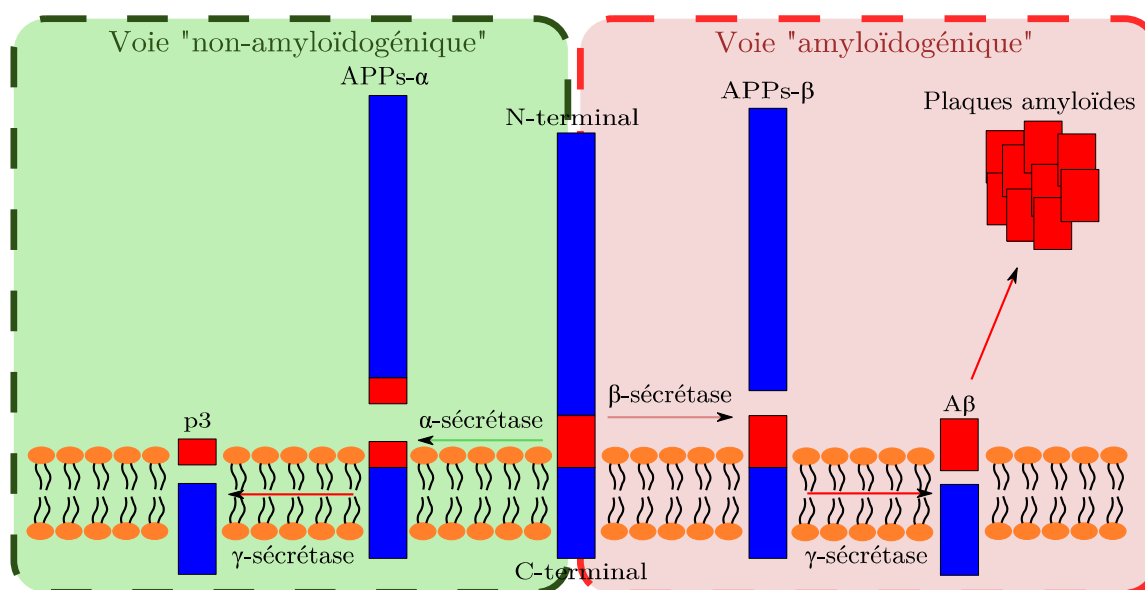


Figure III-12. Schématisation de la voie « non-amyloïdogénique » et de la voie « amyloïdogénique » à partir de la glycoprotéine transmembranaire APP.

Si dans sa forme non clivée, le peptide A β assure un rôle physiologique non pathogène, quand il se retrouve sous forme de peptide libre, il peut devenir toxique et induire la formation de plaque sénile entraînant la mort neuronale. En effet, certaines études ont pu mettre en avant la fonction de lien entre les fragments *N-terminal* et *C-terminal* qui eux ont des rôles biologiques bien spécifiques. Ainsi, lorsqu'il est présent en très faible quantité le peptide A β n'induit pas de dégénérescence. Cependant, la présence du peptide en plus grande concentration va provoquer des troubles biologiques qui seront à l'origine de la formation des oligomères, puis des plaques séniles.

III.2.1.2 Cascade amyloïde

Si l'agrégation du peptide A β conduit à l'apparition des phénomènes de pertes neuronales et synaptiques avec la polymérisation de la protéine *tau*, des études biologiques ont pu mettre en évidence que l'agrégation du peptide A β est le facteur déclenchant des signes d'apparition de la maladie d'Alzheimer. L'hypothèse principale expliquant l'accumulation des fragments de peptide et leurs modifications de structure conduisant aux neurodégénérescences est la cascade amyloïde. Cette cascade décrit les événements biologiques pouvant à terme être à l'origine de la mort neuronale.

L'agrégation de l'amyloïde- β se passe en plusieurs étapes faisant intervenir différents états structuraux tels que les feuillet β , les oligomères, les fibrilles et les plaques amyloïdes [101]. Ces différentes conformations ont un impact différent sur les neurones. Les fragments

$A\beta$ solubles vont s'agréger sous forme de feuillets β . Ces feuillets β vont produire les oligomères solubles qui auront un poids moléculaire plus élevé et qui formeront les fibres insolubles qui seront à l'origine des dépôts amyloïdes.

A partir des oligomères, il existe deux voies différentes pouvant amener à la mort neuronale, puis à la démence. Les oligomères, étant cytotoxiques, conduisent directement à la mort neuronale. Cependant, ils peuvent également produire des fibrilles puis des plaques amyloïdes, qui sous l'action d'une inflammation des neurones ou le démarrage des dégénérescences neurofibrillaires vont conduire à une mort neuronale puis à une démence.

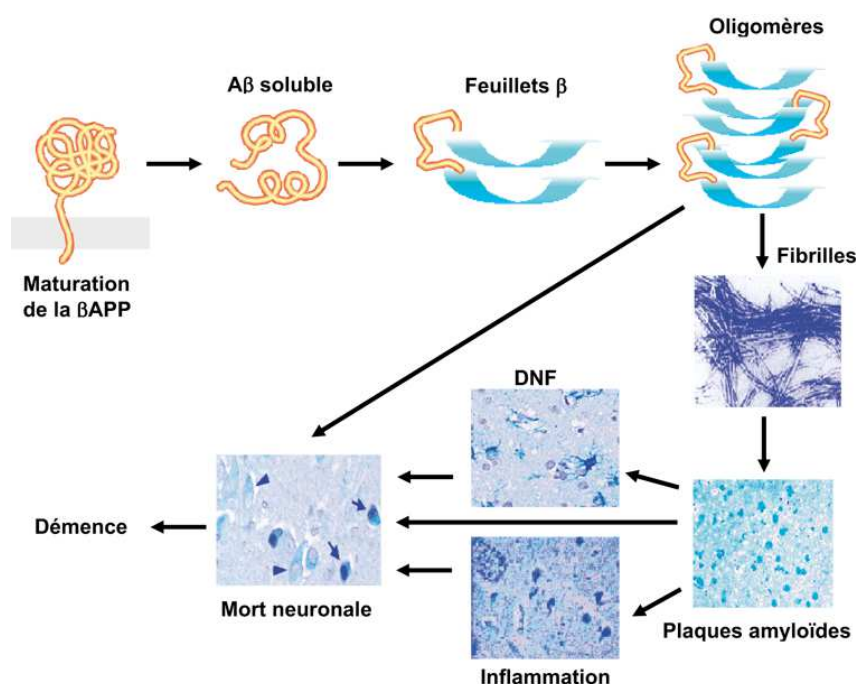


Figure III-13, Hypothèse de la cascade amyloïde [102].

III.2.2 Suivi rhéologique de la polymérisation du peptide $A\beta$

La partie précédente vient de montrer l'intérêt de s'intéresser au peptide $A\beta$ dans le cadre de la maladie d'Alzheimer. L'objectif de cette partie est de détecter les différentes concentrations des peptides $A\beta$, et de suivre la polymérisation de ces derniers pour la formation des feuillets β et des oligomères. Pour cela, des solutions de peptides $A\beta$ sont préparées en réalisant des dilutions des solutions avec de l'eau distillée pure pour obtenir les concentrations voulues.

Les concentrations choisies dans cette étude sont comprises dans une plage de 30 à 480 μM .

La Figure III-14 montre le suivi cinétique du module élastique en fonction du temps paramétré par la concentration en peptide $A\beta$. On peut remarquer pour les faibles concentrations en peptides une très faible variation du module élastique car le peptide $A\beta$ est encore sous forme de peptide soluble. Cependant à partir de 240 μM , nous pouvons observer l'augmentation du module élastique au cours du temps. Cela peut s'expliquer par la polymérisation du peptide $A\beta$ en feuillets β et en oligomères. De plus nous pouvons remarquer l'atteinte d'un palier à partir duquel l'état conformationnel des peptides et fibres formés, ne sera plus modifié. Grâce à la courbe de droite de la Figure III-14, nous remarquons également que la polymérisation du peptide $A\beta$ suit une tendance sigmoïdale avec l'obtention du palier maximale à 9 kPa.

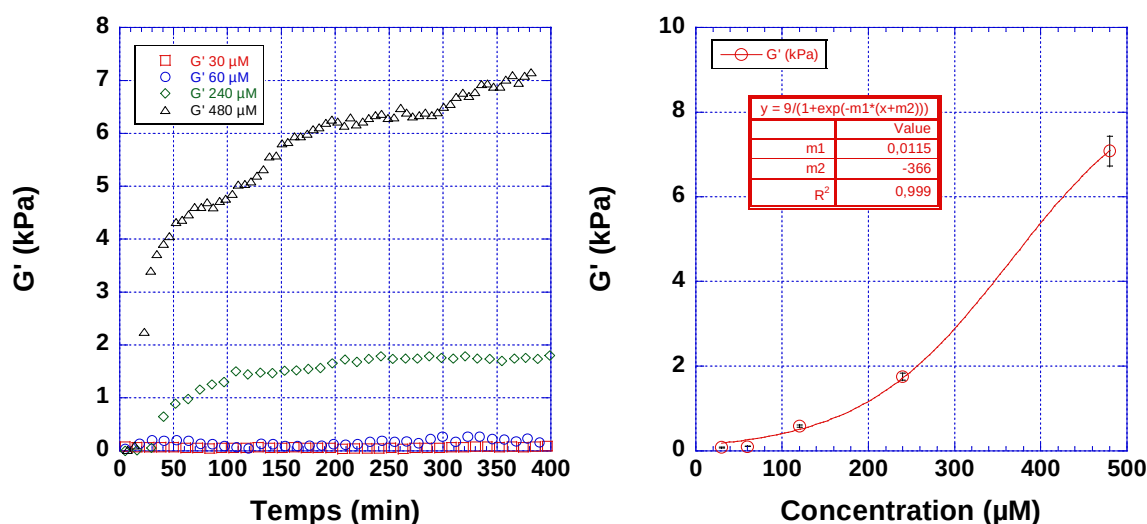


Figure III-14, Suivi cinétique du module élastique en fonction du temps et de la concentration en peptide $A\beta$.

La Figure III-15, décrivant l'évolution du module visqueux au cours du temps, va permettre également de confirmer les résultats précédents. En effet, nous pouvons remarquer que pour les plus faibles concentrations, nous n'avons pas de variation de viscosité, ce qui est significatif de la non modification de l'état structural des solutions peptidiques. Pour les concentrations les plus élevées, nous retrouvons une augmentation de du module visqueux au cours de temps, ce qui est révélateur de la formation des fibres, et plus particulièrement de l'agrégation des peptides libres entre eux.

Il est à souligner que cette étude constitue une première approche en matière de sensibilité du capteur car les concentrations de peptides testées pour $A\beta$ sont plus élevées que celles réellement présentes dans le milieu à tester.

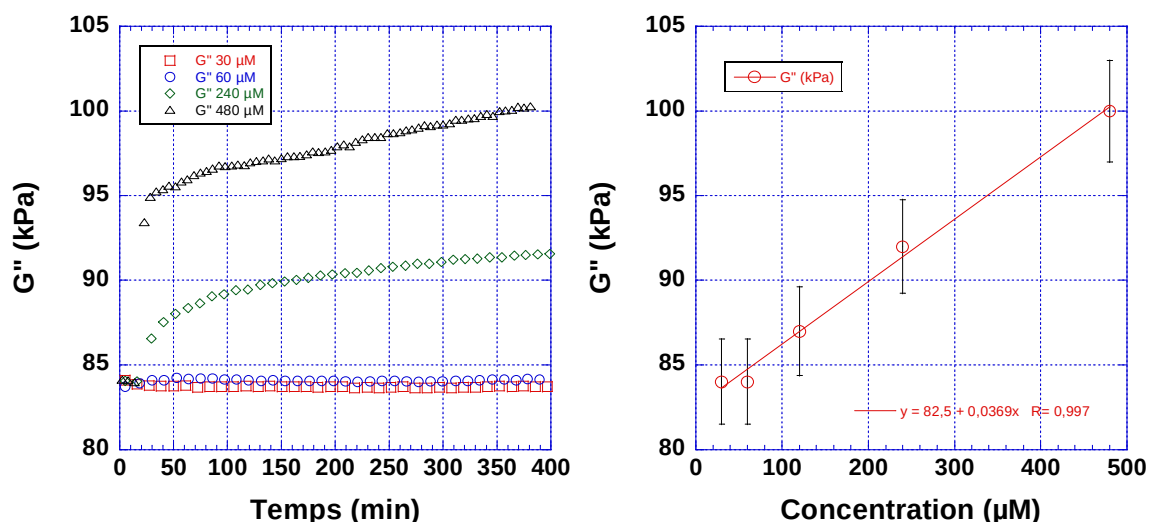


Figure III-15, Suivi de du module visqueux du peptide A β en fonction du temps et de la concentration en peptide A β .

Il apparaît clairement qu'il est possible avec le capteur à ondes acoustiques à une électrode ronde de suivre la polymérisation du peptide A β intervenant dans la maladie d'Alzheimer, et d'extraire à chaque instant les paramètres viscoélastiques. Il a été montré qu'il est possible de retrouver la cinétique représentée par des modèles biologiques pour les deux biomarqueurs que sont la protéine *tau* et le peptide A β à 22°C. Grace à cette validation du capteur, il a pu être réalisé un suivi de polymérisation de la protéine *tau* à 37°C jusqu'alors inconnu. Ces suivis de polymérisation des deux biomarqueurs de la maladie d'Alzheimer ont été réalisés dans des milieux simples, dans lesquels il n'y avait pas d'autres analytes. Or ces détections visent à être réalisées en milieu complexe où la protéine *tau* et le peptide A β sont présents parmi un nombre important d'analytes.

III.3 Détection en milieu complexe

Le capteur utilisé permet de mettre en évidence les différentes conformations des protéines à l'origine de la maladie d'Alzheimer. Ces résultats ont été obtenus in vitro, avec des solutions ne contenant que les protéines cibles. Cependant, la détection de ces espèces cibles doit être réalisée dans leur milieu physiologique, à savoir le liquide céphalo rachidien (LCR) et le plasma sanguin, ils vont être décrits dans la partie suivante.

III.3.1 Milieux physiologiques pour les biomarqueurs

Des études actuelles ont permis de mettre en évidence la présence des fibres amyloïdes et de la protéine *tau* dans le *LCR* et le sang [103][34], [104]–[106], ce qui constitue une des principales voies à explorer pour développer des outils de diagnostic pour détecter précocement la maladie d'Alzheimer. Dans cette partie, les deux milieux seront décrits puis des suivis en milieu complexes seront présentés.

III.3.1.1 Liquide céphalo rachidien

Le liquide céphalo rachidien, aussi appelé liquide cérébro-spinal est un fluide biologique complexe qui se trouve dans les méninges, et dans lequel est contenu le cerveau et la moelle spinale. Le *LCR* a pour principale fonction d'absorber et d'amortir les mouvements et les chocs qui risqueraient de causer des séquelles au cerveau. Le *LCR* a également une fonction biologique, ainsi il permettra également le transport des nutriments et hormones entre le cerveau et le système nerveux central. Il va ainsi participer à l'élimination des métabolites cérébraux et également à l'apport de nutriments aux cellules nerveuses et gliales. Ainsi, il permettra le maintien du *pH*, de la composition protéique et hormonales de l'environnement cellulaire [107][108].

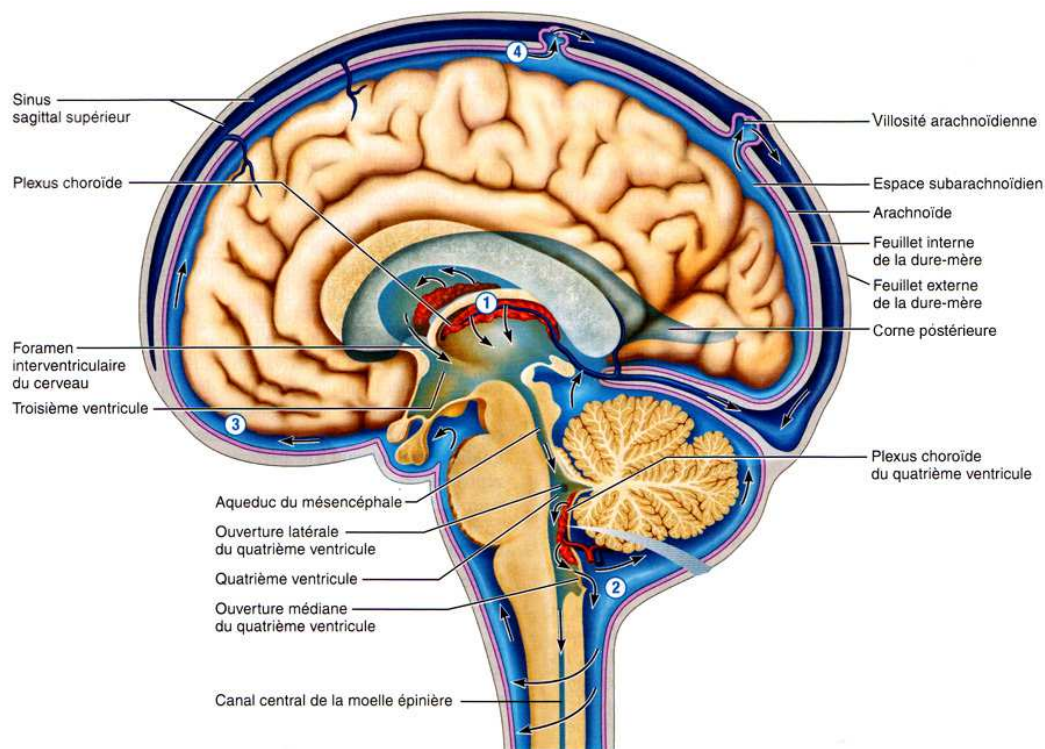


Figure III-16, Positionnement du *LCR* dans le cerveau (zone bleue sur la coupe) et sens de circulation de ce milieu complexe [109].

Chez l'adulte sain, le volume total de *LCR* est de 140 mL +/-30 mL, il est d'une couleur

transparente avec un taux de renouvellement de 170 mL par jour. Des études ont établi qu'avec sa circulation, le *LCR* ne ferait qu'un seul passage dans le cerveau. Il est composé à 99 % d'eau puis en moindre proportion en protéines (0,4 g/L), en glucose et en chlorures, ce qui fait que le *LCR* est proche en composition du plasma sanguin.

Dans le cadre de la maladie d'Alzheimer, la concentration en peptide *A β* aura tendance à diminuer et la concentration en protéine *tau* à augmenter. Cependant, la concentration de *tau* dans le sang est corrélée avec l'intensité de la dégénérescence neuronale et du dommage neuronal établi.

III.3.1.2 Plasma sanguin

L'intérêt de développer des outils de diagnostic à partir du sang est expliqué par le fait que chaque jour un certain volume de *LCR* passe dans la circulation sanguine et que dès le déclenchement de la pathologie, la frontière hémato-encéphalique est altérée, augmentant le flux de *LCR* dans le sang. Cependant la difficulté majeure pour l'utilisation du sang comme fluide de détection réside dans les très faibles concentrations des protéines cibles de la maladie d'Alzheimer. Cependant pour le moment, la sensibilité des outils de diagnostic basés sur ce fluide n'est que de 64 % par rapport à la sensibilité moyenne de 86 % des outils avec le *LCR*.

Avec les globules blancs, rouges et les plaquettes, le plasma sanguin est un des constituants du sang, et est, en particulier, le composant liquide du sang. Le plasma sanguin est composé d'eau, d'ions et de molécules transportés à travers l'organisme. On trouvera ainsi du glucose, des lipides mais également des protéines (dont les protéines cibles à la maladie d'Alzheimer), c'est également dans le plasma que circuleront les impuretés telles que les résidus de pesticides ou de métaux lourds, mais aussi les médicaments.

III.3.2 Sensibilité du capteur aux caractéristiques du milieu

III.3.2.1 Caractérisation des milieux complexes

La première étude réalisée concerne la détection de différentes concentrations de milieu complexe, du sérum pour permettre de quantifier et tester sensibilité du capteur. Pour cela, des solutions de *HSA*, pour *Human Serum Albumin* et de *BSA*, pour *Bovin Serum Albumin* sont utilisées. Afin de faire varier la concentration des sérums physiologiques, ils sont dilués dans le tampon de fibrillation utilisé pour la polymérisation de la protéine *tau*. Ainsi des expériences avec des dépôts de sérums pour des concentrations entre 10 % et 100 % ont été

réalisées. Les résultats sont présentés Figure 81.

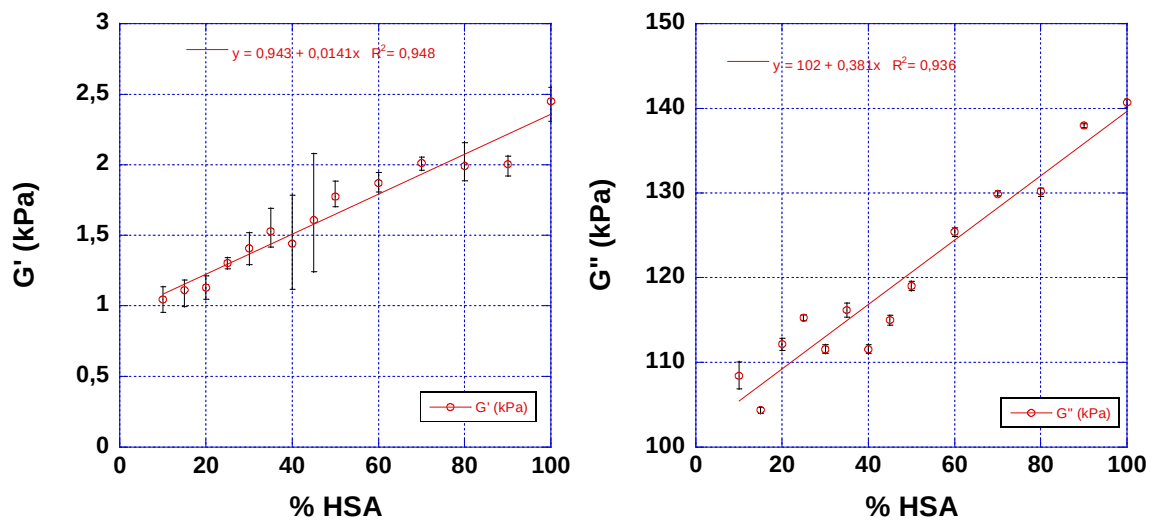


Figure III-17, Variation du module élastique (à gauche) et du module visqueux (à droite) moyenne en fonction du pourcentage de HSA en solution.

Nous pouvons remarquer que le module élastique et le module visqueux augmentent linéairement avec la concentration. Ce qui concorde avec les attentes, puisqu'à des concentrations élevées, le sérum est plus riche en protéines et éléments biologiques. De plus, l'effet du tampon lors des dilutions peut avoir des incidences néfastes sur la structure des éléments compris en solution. Dans le cadre du deuxième plasma testé, nous pouvons remarquer les mêmes tendances, avec l'augmentation du module visqueux et du module élastique avec la concentration en sérum, comme le montre la Figure III-18.

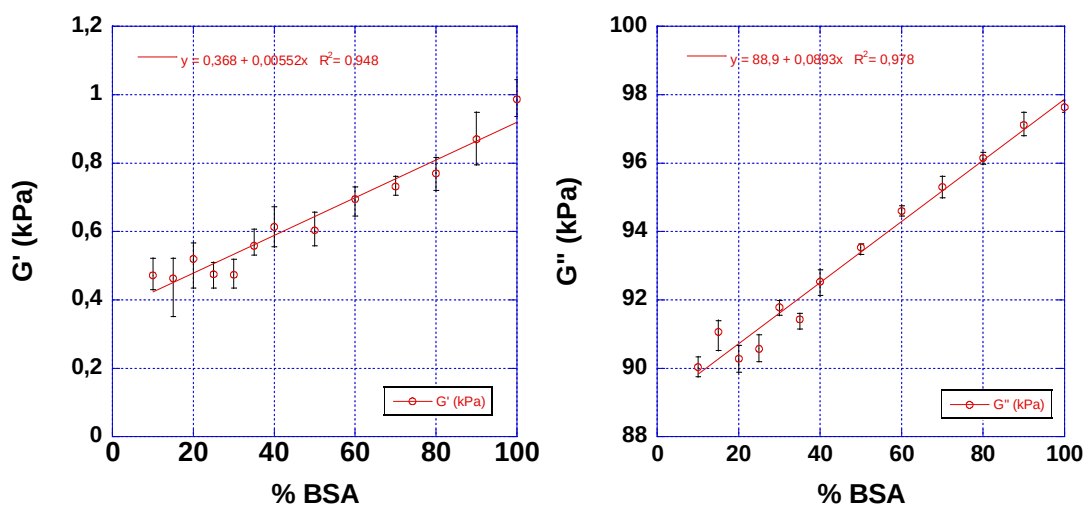


Figure III-18, A gauche, variation du module élastique moyenne du sérum BSA suivant différentes concentrations, à droite, variation de du module visqueux de différentes solutions de sérum BSA.

Ces résultats caractérisent la sensibilité du capteur aux variations des paramètres de milieux complexes.

III.3.2.2 Détection de protéines en milieu complexe

Des essais de détection de la protéine *tau* en milieu complexe ont été réalisés sans fonctionnalisation de surface avant de réaliser les mêmes expériences avec la fonctionnalisation. De plus, les solutions protéiques sont diluées dans le sérum HSA, le comportement étant connu dans le tampon biologique MOPS, les dilutions peuvent entraîner des modifications conformationnelles des fibres protéiques. La Figure III-19 présente ainsi les résultats obtenus pour quatre solutions : une solution pure de tampon HSA, une solution de tampon HSA diluée à 90 % dans du MOPS et deux solutions de protéines à 120 et 480 μM , préparées dans du sérum HSA à 10 %m massique dans du MOPS.

Nous pouvons ainsi remarquer une nette différence entre les deux solutions de tampon HSA pure et diluée. Nous remarquons ensuite des viscosités différentes pour les deux solutions protéiques. Cependant, une variation de 100 Pa est observée entre ces deux solutions, avec une viscosité plus importante pour la protéine la plus concentrée, qui s'explique par la présence de fibres protéiques matures en solutions, qui ne sont pas encore présentes dans la solution de 120 μM .

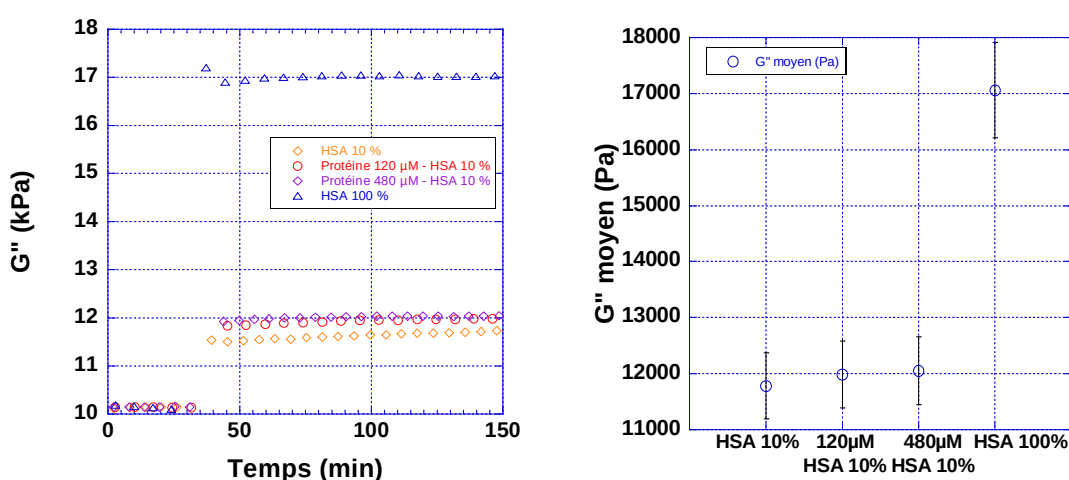


Figure III-19, A gauche, suivi du module visqueux en fonction des solutions protéiques au cours du temps. A droite, modules visqueux pour les différentes solutions.

La problématique de l'étude est le développement d'un outil de suivi de polymérisation des protéines qui sont aux origines des dégénérescences propres à la maladie d'Alzheimer. Comme il a été spécifié, il existe deux biomarqueurs protéiques qui peuvent être synonymes de cette pathologie. Le développement d'un outil de détection simultanée de ces deux analytes est nécessaire afin de rendre le système sélectif à une cible dans un milieu complexe qui en contient beaucoup, il passe par le développement d'un transducteur multi-électrodes comme

on l'a vu dans le chapitre précédent. Des premiers essais de suivi de différentes concentrations de protéines ont été réalisés sur les transducteurs multi-électrodes et sont présentés dans le paragraphe suivant.

III.4 Détection avec le transducteur à trois électrodes

Des essais préliminaires ont été réalisés sur les capteurs multiélectrodes fabriqués au cours de cette thèse afin de vérifier leurs sensibilités. Pour cela, des mesures à vide du système sont réalisées, afin de calibrer le système. Des volumes de 3 μL d'eau, sont déposés sur chaque électrode. Puis l'eau est retirée et deux dépôts de solutions de protéines *tau* aux concentrations extrêmes (30 et 480 μM) sont effectués. Des mesures de l'impédance du quartz, il est possible d'extraire les paramètres viscoélastiques des solutions. La Figure III-20 présente le module visqueux au cours du dépôt des solutions de protéines *tau* (à gauche) et ce même module visqueux (à droite) en fonction des différentes solutions. Il apparaît que les valeurs d'élasticité et de viscosité extraites correspondent à celles réalisées avec un transducteur à une électrode, validant le système multi électrodes. Cependant, des différences peuvent être constatées par rapport aux résultats trouvés avec le capteur mono-électrode. Ces différences peuvent s'expliquer par une concentration de tampon différente utilisée entre les deux études. En effet, le tampon MOPS utilisé dans cette dernière étude était cinq fois plus concentré que lors des essais antérieurs, modifiant la cinétique de polymérisation des protéines.

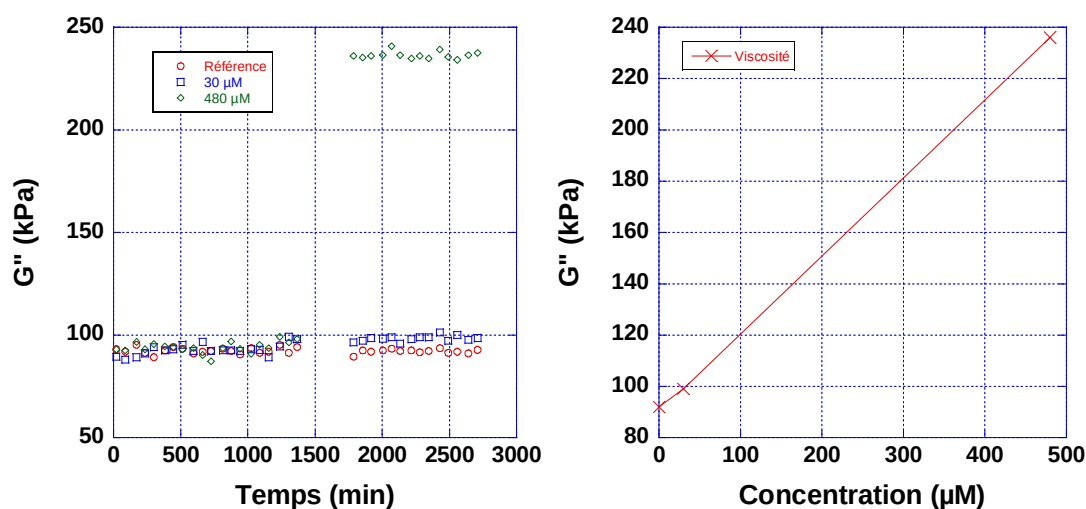


Figure III-20, A gauche, suivi du module visqueux au cours du temps pour les différents dépôts de solution de protéines tau à la surface des électrodes. A droite, module visqueux G'' des différentes solutions.

Une deuxième série de mesure a été effectuée en modifiant les conditions expérimentales. Comme le montre la Figure III-21, si dans un premier temps la solution de 30 μM a été déposée sur l'électrode du milieu et la solution de 480 μM a été déposée sur l'électrode de droite, les sites de dépôts ont été inversés dans le cas de la deuxième série de mesures. Le but de cette manipulation était la vérification du fonctionnement du capteur, mais également de montrer sa capacité à retrouver les mêmes résultats.

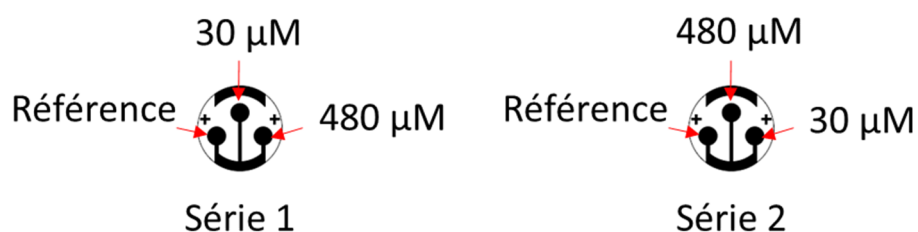


Figure III-21, Procédé expérimental de détection de solutions protéiques avec le capteur multi-électrodes.

Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 4. On remarque tout d'abord une très forte similitude des valeurs, avec des variations de viscosité entre 1 et 3 %, entre les deux séries de mesure. Ainsi, il est possible de conclure que le système à trois électrodes a une sensibilité du même ordre de grandeur que le capteur à une électrode, validant ainsi le système pour le suivi des paramètres viscoélastiques lors d'une polymérisation de protéines.

Echantillon	Modules visqueux (en kPa)	
	Série 1	Série 2
Référence	92,18	93,79
Protéine 30 μM	99,10	101,79
Protéine 480 μM	235,99	237,98

Tableau 4, Modules visqueux (en kPa) en fonction des concentrations en protéines et de la série de mesure.

III.5 Conclusion

Les résultats expérimentaux présentés dans ce chapitre ont permis de démontrer la faisabilité du suivi des réactions de polymérisation des protéines *tau* et *Aβ*. Les premières manipulations ont consisté à déposer successivement sur le capteur des solutions de monomères et de polymères. A 22°C, elles ont permis de suivre le module élastique de différentes solutions de protéines *tau* représentatives d'une polymérisation. Les résultats obtenus et leur comparaison aux études réalisées par les biologistes de l'IGDR ont permis de valider le système. En ce qui concerne le module visqueux, plus la concentration en protéines est élevée, plus le module visqueux va augmenter jusqu'à atteindre un palier, correspondant à l'atteinte de l'équilibre du système biologique et de l'arrêt de sa polymérisation. Ces résultats s'expliquent par le changement de conformation de la solution d'étude : aux faibles concentrations, le système présente une structure proche du tampon de polymérisation, du fait de l'unique présence de peptides libres en solution. Aux plus fortes concentrations, le module visqueux est plus important du fait de la polymérisation des peptides en oligomères puis fibres matures. Le suivi du module visqueux valide également la pertinence du système pour le suivi de la polymérisation de la protéine *tau*. L'outil validé, la cinétique de polymérisation de la protéine *tau* à 37°C, non publiée jusqu'alors, a pu être établie et comparée à celle obtenue à 22°C : la température modifie les paramètres viscoélastiques mais ne modifie pas la cinétique globale de la polymérisation de la protéine *tau*. La maladie d'Alzheimer est étroitement liée à la détection et à la compréhension des phénomènes de polymérisation de deux protéines : la protéine *tau* et le peptide *Aβ*. La détection du peptide *Aβ* a donc également été réalisée. Les résultats obtenus confirment qu'il est possible de discerner différentes concentrations de peptides représentatives d'une polymérisation et ce pour le module élastique et pour le module visqueux.

La détection *in fine* devant être réalisée en milieu complexe, une première étude a été faite dans des sérums humain et bovin. Des expériences avec des dépôts de sérums pour des concentrations entre 10 % et 100 % en sérum ont été réalisées montrant une sensibilité suffisante du capteur pour discriminer les deux milieux et une similitude entre les deux sérums : les modules élastiques et les modules visqueux augmentent linéairement avec la concentration. Ces résultats sont en accord avec les modèles biologiques car, à des concentrations élevées, le sérum est plus riche en protéines et éléments biologiques.

La finalité du capteur conçu dans cette étude est la détection simultanée des différentes espèces à l'origine de la maladie d'Alzheimer. Afin de quantifier les biomarqueurs de la maladie pour fournir une information quant à l'avancement de la pathologie chez les patients, le développement d'un système de détections multiples est nécessaire. Après avoir démontré dans le chapitre 2 le caractère répétable et reproductible des mesures grâce au capteur multiélectrodes développé des tests de détection des protéines d'études ont été menés. Les essais de détection réalisés avec le capteur à 3 électrodes pour des solutions protéiques d'études démontrent la capacité du capteur à différencier différentes conformations 3D des protéines.

III.6 Références bibliographiques

- [34] H. Mori *et al.*, "Tau in cerebrospinal fluids: establishment of the sandwich ELISA with antibody specific to the repeat sequence in tau," *Neurosci. Lett.*, vol. 186, no. 2–3, pp. 181–183, Feb. 1995.
- [87] M. Perez *et al.*, "The role of the VQIVYK peptide in tau protein phosphorylation," *J. Neurochem.*, vol. 103, no. 4, pp. 1447–1460, 2007.
- [88] M. von Bergen, P. Friedhoff, J. Biernat, J. Heberle, E. M. Mandelkow, and E. Mandelkow, "Assembly of tau protein into Alzheimer paired helical filaments depends on a local sequence motif ((306)VQIVYK(311)) forming beta structure," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 97, no. 10, pp. 5129–5134, 2000.
- [89] C. Schirmer, "Chaperons moléculaires et tauopathies : effet de Hsp90 sur la fibrillation in vitro du peptide VQIVYK issu de la protéine tau," Université de Rennes 1, 2014.
- [90] S. Koga *et al.*, "Influence of temperature on the composition and polymerization of gluten proteins during grain filling in spring wheat (*Triticum aestivum* L.)," *J. Cereal Sci.*, vol. 65, pp. 1–8, 2015.
- [91] T. L. G., "Studies on microtubules in Heliozoa. IV. The effect of colchicine on the formation and maintenance of the axopodia and the redevelopment of pattern in *Actinosphaerium nucleofilum* (Barrett).," *J. Cell Biol.*, vol. 3, pp. 549–562, 1968.
- [92] X. Mo, X. S. Sun, and Y. Wang, "Effects of molding temperature and pressure on properties of soy protein polymers," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 73, no. 13, pp. 2595–2602, 1999.
- [93] F. J. Monahan, J. B. German, and J. E. Kinsellat, "Effect of pH and Temperature on Protein Unfolding and Thiol / Disulfide Interchange Reactions during Heat-Induced Gelation of Whey Proteins," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 43, pp. 46–52, 1995.
- [94] P. Didier *et al.*, "Rheological monitoring of tau protein polymerisation with acoustic waves sensor," *Electron. Lett.*, vol. 53, no. 5, pp. 298–300, Mar. 2017.
- [95] G. G. Glenner and C. W. Wong, "Alzheimer's disease: Initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein," *Biochem. Biophys.*

- Res. Commun.*, vol. 120, no. 3, pp. 885–890, 1984.
- [96] D. J. Selkoe, “Cell Biology of the Amyloid beta-Protein Precursor and the Mechanism of Alzheimer’s Disease,” *Annu. Rev. Cell Biol.*, vol. 10, no. 1, pp. 373–403, Nov. 1994.
 - [97] D. J. Selkoe, “Alzheimer ’ s Disease : Genes , Proteins , and Therapy,” *Perspective*, vol. 81, no. 2, pp. 741–767, 2001.
 - [98] M. P. Mattson, “Pathways towards and away from Alzheimer’s disease,” *Nature*, vol. 430, no. 7000, pp. 631–639, 2004.
 - [99] M. Citron, D. B. Teplow, and D. J. Selkoe, “Generation of amyloid β protein from its precursor is sequence specific,” *Neuron*, vol. 14, no. 3, pp. 661–670, 1995.
 - [100] C. Haass, A. Y. Hung, M. G. Schlossmacher, D. B. Teplow, and D. J. Selkoe, “ β -Amyloid peptide and a 3-kDa fragment are derived by distinct cellular mechanisms,” *J. Biol. Chem.*, vol. 268, no. 5, pp. 3021–3024, 1993.
 - [101] F. Chiti and C. M. Dobson, “Protein Misfolding, Functional Amyloid, and Human Disease,” *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 75, no. 1, pp. 333–366, 2006.
 - [102] S. W. Pimplikar, “Reassessing the amyloid cascade hypothesis of Alzheimer’s disease,” *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 41, no. 6, pp. 1261–1268, Jun. 2009.
 - [103] C. Rosén, O. Hansson, K. Blennow, and H. Zetterberg, “Fluid biomarkers in Alzheimer’s disease – current concepts,” *Mol. Neurodegener.*, vol. 8, no. 1, p. 20, 2013.
 - [104] H. Hampel *et al.*, “Discriminant power of combined cerebrospinal fluid τ protein and of the soluble interleukin-6 receptor complex in the diagnosis of Alzheimer’s disease,” *Brain Res.*, vol. 823, pp. 104–112, 1999.
 - [105] M. Vestergaard, K. Kerman, D. K. Kim, H. M. Hiep, and E. Tamiya, “Detection of Alzheimer’s tau protein using localised surface plasmon resonance-based immunohip,” *Talanta*, vol. 74, pp. 1038–1042, 2008.
 - [106] K. Blennow and H. Hampel, “CSF markers for incipient Alzheimer’s disease,” *Lancet Neurol.*, vol. 2, no. 10, pp. 605–613, 2003.
 - [107] B. Malpoux and C. Legros, “Rôle du liquide céphalo-rachidien dans le transport de la mélatonine pinéaliennne vers ses cibles centrales,” *Bull. Acad. Vet. Fr.*, vol. 161, no. 5, pp. 455–460, 2008.
 - [108] C. Nilsson, M. Lindvall Axelsson, and C. Owman, “Neuroendocrine regulatory mechanisms in the choroid plexus- cerebrospinal fluid system,” *Brain Res Brain Res Rev*, vol. 17, pp. 109–138, 1992.
 - [109] B. L. C. Wright, J. T. F. Lai, and A. J. Sinclair, “Cerebrospinal fluid and lumbar puncture: A practical review,” *J. Neurol.*, vol. 259, no. 8, pp. 1530–1545, 2012.

Conclusion générale

Les travaux réalisés au cours de cette thèse s'inscrivent dans un projet plus vaste visant à la mise au point d'une thérapie des maladies du type conformationnelle dans lesquelles figure la maladie d'Alzheimer. L'objectif de cette thèse était de démontrer la faisabilité d'un suivi de polymérisation de protéines et le développement d'un système multi-électrodes permettant la détection simultanée de plusieurs protéines, biomarqueurs d'une pathologie à des fins diagnostiques.

Si une multitude de techniques expérimentales permettent la détection d'éléments biologiques, seuls les résonateurs de type TSM sont capables de déterminer les paramètres viscoélastiques de solutions biologiques en cours de polymérisation.

En adaptant les techniques de microfabrication et en veillant à la qualité des matériaux et des différentes étapes de fabrication, l'obtention d'un capteur à ondes acoustiques de volume présentant des caractéristiques et propriétés de sensibilité plus élevée par rapport aux capteurs commerciaux est rendu possible. Le premier capteur fabriqué a été un capteur mono-électrode, dont le design de l'électrode a été optimisé, afin d'en tirer les meilleures performances. La caractérisation électromécanique du capteur fabriqué a permis de valider les procédés de fabrication, et une corrélation, entre la propagation théorique et expérimentale a pu être établie. Les campagnes de calibration et de validation démontrent les bonnes propriétés du système développé.

Si la faisabilité de la détection et le suivi des propriétés des protéines ont pu être établies avec des capteurs mono-électrode, il est nécessaire de montrer la capacité d'obtenir un système multi-électrodes, permettant la détection, in fine, des différents analytes propre à la maladie d'Alzheimer. Afin de répondre à cette problématique, un résonateur TSM composé de trois électrodes distinctes a été conçu en adaptant les procédés expérimentaux jusqu'alors employés dans cette étude. En effet, ce concept de système repose sur la fabrication de trois électrodes à épaisseurs variable sur le substrat de quartz. La caractérisation des capteurs conçus est passée par l'étude du comportement mécanique du capteur suivant différentes conditions expérimentales et également par la détection de solutions tests dont leurs propriétés sont connues dans la littérature. Il a été confirmé que la réponse des capteurs présentait des valeurs conformes aux valeurs attendues. Une optimisation des épaisseurs des différentes électrodes a été menée afin de déterminer les configurations optimales pour parvenir à la meilleure qualité des capteurs.

Après la validation du fonctionnement des différents capteurs conçus, des essais expérimentaux sur les protéines tau et le peptide A β ont permis de démontrer la capacité des

systèmes développés à discriminer les différents états conformationnels des protéines. En effet, dans le cas de la protéine tau, les propriétés viscoélastiques de solutions, à différentes concentrations, ont été extraites. Chacune des solutions étant représentatives d'un état conformation de la polymérisation, allant du noyau à la fibre protéique mature, il apparaît clairement qu'il est possible de les différencier.

Cette étude ouvre la voie du développement de résonateur TSM pour des applications de détection et de diagnostic de maladies conformationnelles, puisque la polymérisation de protéines est un phénomène intervenant dans bon nombre de mécanismes du corps humain. En ce qui concerne les maladies conformationnelles, cette étude apparaît comme le point de départ du développement d'outils de diagnostic précoce, de thérapie et de prédiction, permettant la détection de la pathologie chez le patient et également déterminer l'état d'avancement de la maladie si elle devait être déclarée, et ce en quasi temps réel.

Cependant des améliorations doivent être apportées aux systèmes multi-électrodes développés en vue de leurs utilisations finales. En effet, malgré l'optimisation des épaisseurs des électrodes du capteur, des perturbations des signaux durant les essais sont observés, la continuité de l'optimisation topologique, en axant les recherches sur le design ainsi que la disposition des électrodes à la surface du capteur peut mener à l'amélioration des propriétés du système. La finalisation des travaux de modélisation des capteurs mono-électrode et également des capteurs multi-électrodes permettrait la parfaite connaissance des comportements électromécaniques des capteurs à ondes acoustiques développés afin d'en tirer les meilleures performances.

De plus, les tests présentés dans ces travaux de recherche ont été réalisés en milieu « simple » composé uniquement des protéines d'études, cependant, in vivo, ces protéines évoluent dans le sang ou le liquide céphalo-rachidien qui sont deux milieux complexes. Il devient donc nécessaire de rendre sélectif la détection du capteur aux biomarqueurs de la maladie d'Alzheimer. L'apport d'un traitement de fonctionnalisation de surface au capteur est donc nécessaire. Si l'amélioration de la surface de mouillage a été effectuée par le biais de traitement physique par plasma, la sélectivité de la détection peut être mise en place par le greffage de structure PEG-thiol à la surface d'or du capteur. Les premières campagnes d'essais montrent la possibilité du traitement de surface mis en place à permettre l'accroche préférentielle des protéines en condition in vitro. En poursuivant cette étude, la détection des protéines dans des milieux complexes, type sérum, et à terme, dans des échantillons issus de patients, sera possible. Des campagnes sont actuellement en cours pour mener à bien cette

voie d'amélioration.

Annexe A

A.1 Diagnostic actuel de la pathologie

Si la maladie d'Alzheimer s'apparente principalement par des troubles de la mémoire, d'autres troubles apparaissent au cours de l'évolution de la pathologie, comme par exemple les troubles désorientations spatio-temporelles (trouble d'orientation du sujet dans le temps et dans l'espace), l'anomie (trouble du langage symbolisé par la difficulté du patient à trouver les mots qu'il recherche), l'apraxie gestuelle (incapacité du patient à effectuer un mouvement) ou encore la prosopagnosie (trouble de la reconnaissance et de la différenciation des visages familiers). Dans certains cas cependant des cas d'apathie (absence d'émotions et de désirs), d'agressivité ou encore de délire peuvent apparaître. Tous ces symptômes auront pour incidence de nuire à l'autonomie du patient.

L'association des troubles cognitifs présentés ci-dessus ainsi que les dégénérescences neurofibrillaires et les plaques amyloïdes est la piste principale pour l'établissement du diagnostic clinique de la maladie d'Alzheimer. Cependant la présence des analytes biologiques spécifiques à la pathologie n'est pas un automatisme. Ainsi pour le diagnostic de la pathologie, la recherche s'articule en deux étapes : la recherche de la présence d'une démence chez le patient, puis le recentrage des recherches des troubles apparentés à la maladie d'Alzheimer afin de mettre en évidence le développement de la pathologie cible. Cependant, aucun outil précis ne permet le diagnostic précoce de la maladie d'Alzheimer de façon certaine, et de ce fait l'évaluation reste encore probabiliste. En effet, à l'heure actuelle, seules les coupes histologiques *post-mortem* permettent, avec certitude, de mettre en avant la présence des dégénérescences neurofibrillaires et des plaques amyloïdes.

Différents critères ont été développés pour établir l'état démentiel du patient et identifier l'origine de cet état dû à la maladie d'Alzheimer. On trouve ainsi le *DSM IV-TR* (**D**iagnostic and **S**tatistical Manual of **M**ental Disorders Revision 4) qui décrit et classe les troubles mentaux, et les critères *NINCDS-ADRDA* (**N**ational **I**nstitute of **N**eurological and **C**ommunication **D**isorders and **S**troke – **A**lzheimer's **D**isease and **R**elated **D**isorders Association).

A.1.1 Critères *DSM-IV-TR*

Les critères *DSM-IV-TR* ont été mis en place afin de diagnostiquer le caractère démentiel du patient. Six points seront observés pour diagnostiquer au moins la présence d'une démence. Le premier point (*critère A*) s'intéresse aux déficits cognitifs, avec l'apparition de ces troubles qui peuvent se traduire par une altération de la mémoire ou l'aphasie, apraxie, agnosie. Le deuxième point d'observation (*critère B*) met en évidence l'altération du fonctionnement social et professionnel du patient. Dans un troisième temps, le *critère C* va permettre d'évaluer le caractère progressif et continu du déclin cognitif. Le *critère D* est mis en place pour montrer que les déficits cognitifs ne sont pas dus à d'autres pathologies affectant le système nerveux central et qui entraînent des troubles cognitifs progressifs, à des affections générales pouvant générer une démence ou à la prise de substances. De même, le *critère E* permettra de faire la différence entre la maladie d'Alzheimer et les troubles cognitifs dus à un délirium, qui est une conséquence neurologique sévère liée à un syndrome de sevrage à l'alcool. Enfin, le *critère F* permettra d'exclure les troubles de type dépressif ou schizophrène comme étant à l'origine de la démence.

■ Critères diagnostiques de F00.xx [294.1x] la Démence de type Alzheimer

A. Apparition de déficits cognitifs multiples, comme en témoignent à la fois :

- (1) une altération de la mémoire (altération de la capacité à apprendre des informations nouvelles ou à se rappeler les informations apprises antérieurement) ;
- (2) une (ou plusieurs) des perturbations cognitives suivantes :
 - (a) aphasie (perturbation du langage)
 - (b) apraxie (altération de la capacité à réaliser une activité motrice malgré des fonctions motrices intactes)
 - (c) agnosie (impossibilité de reconnaître ou d'identifier des objets malgré des fonctions sensorielles intactes)
 - (d) perturbation des fonctions exécutives (faire des projets, organiser, ordonner dans le temps, avoir une pensée abstraite)

B. Les déficits cognitifs des critères A1 et A2 sont tous les deux à l'origine d'une altération significative du fonctionnement social ou professionnel et représentent un déclin significatif par rapport au niveau de fonctionnement antérieur.

C. L'évolution est caractérisée par un début progressif et un déclin cognitif continu.

D. Les déficits cognitifs des critères A1 et A2 ne sont pas dus :

- (1) à d'autres affections du système nerveux central qui peuvent entraîner des déficits progressifs de la mémoire et du fonctionnement cognitif (p. ex., maladie cérébro-vasculaire, maladie de Parkinson, maladie de Huntington, hématome sous-dural, hydrocéphalie à pression normale, tumeur cérébrale)
- (2) à des affections générales pouvant entraîner une démence (p. ex., hypothyroïdie, carence en vitamine B12 ou en folates, pellagre, hypercalcémie, neurosyphilis, infection par le VIH)
- (3) à des affections induites par une substance

E. Les déficits ne surviennent pas de façon exclusive au cours de l'évolution d'un delirium.

F. La perturbation n'est pas mieux expliquée par un trouble de l'Axe I (p. ex., Trouble dépressif majeur, Schizophrénie).

Codification fondée sur la présence ou l'absence d'une perturbation cliniquement significative du comportement :

F00.x [294.10] Sans perturbation du comportement : si les troubles cognitifs ne s'accompagnent d'aucune perturbation cliniquement significative du comportement.

F00.xx [294.11] Avec perturbation du comportement : si les troubles cognitifs s'accompagnent d'une perturbation cliniquement significative (p. ex., errance, agitation) du comportement.

Préciser le sous-type :

À début précoce : si le début se situe à 65 ans ou avant

À début tardif : si le début se situe après 65 ans

Figure A-1, Critères DSM-IV-TR pour la détermination de l'état démentiel du patient.

A.1.2 Critères NINCDS-ADRDA

Les critères *NINCDS-ADRDA* permettent d'affiner le diagnostic en ciblant la recherche des origines des troubles cognitifs sur la maladie d'Alzheimer [110], [111]. À l'issue de ce test, une classification va pouvoir être effectuée en jugeant impossible, peu probable, probable ou fortement probable la maladie d'Alzheimer comme étant la cause de la démence chez le patient.

CRITERES DIAGNOSTIQUES NINCDS-ADRDA DE LA MALADIE D'ALZHEIMER

(Mc Khann et al., 1984)

I. Critères de diagnostic clinique de MA probable

- démence établie à l'examen clinique
- déficit dans au moins 2 domaines des fonctions cognitives
- aggravation progressive de la mémoire et d'autres fonctions cognitives
- pas d'altération de la conscience
- début entre 40 et 90 ans, le plus souvent après 65 ans
- absence de cause systémique ou d'autres affections cérébrales pouvant être rendues responsables des troubles

II. Elements en faveur du diagnostic de MA probable

- détérioration progressive des fonctions spécifiques : langage (aphasie), habiletés motrices (apraxie), perception (agnosie)
- perturbation des activités quotidiennes et du comportement
- notion familiale de troubles similaires
- normalité des examens paracliniques : LCR normal, EEG normal ou non spécifique, atrophie cérébrale au CT scan

III. Autres aspects cliniques compatibles avec le diagnostic de MA probable

- plateaux dans la progression de la maladie
- association de symptômes de dépression, insomnie, incontinence, hallucinations, accès d'agitation verbale ou comportementale, troubles sexuels, perte de poids
- autres symptômes neurologiques chez certains patients, en particulier en phase évoluée de la maladie (hypertonie, myoclonies, troubles de la marche)
- crises comitiales tardives
- CT scan normal

IV. Aspects rendant improbable le diagnostic de MA

- début soudain
- signes neurologiques focaux tels que : hémiplégie, déficit sensitif, altération du champ visuel, incoordination, survenant en début d'évolution
- crises comitiales et troubles de la marche survenant très tôt dans l'évolution de la maladie

V. Diagnostic clinique de MA possible

- sur la base d'un syndrome démentiel et en l'absence d'autres troubles neurologiques, psychiatriques ou systémiques suffisants pour causer la démence, lorsque le mode de début, la présentation et l'aspect évolutif sont atypiques
- en présence d'une autre affection systémique ou neurologique suffisante pour causer la démence, mais considérée comme n'étant pas la cause de la démence
- lorsqu'un déficit cognitif isolé et sévère s'aggrave progressivement en l'absence d'autre cause identifiable

VI. Critères diagnostiques de MA certaine

- les critères de MA probable et
- la preuve histopathologique obtenue par biopsie ou autopsie

Figure A-2, Critères NINCDS-ADRDA.

A.2 Evaluation de la maladie :

A.2.1 Evaluation clinique de la maladie d'Alzheimer

Dans un premier temps, une évaluation clinique est à réaliser auprès d'un médecin généraliste. Le patient, accompagné par un membre de sa famille, ou un proche, afin de vérifier la véracité des réponses du patient, devra répondre au mieux aux questions du médecin concernant ses antécédents médicaux avec les traitements éventuels liés, son niveau d'éducation et son activité professionnelle. Un historique des symptômes rappelant des troubles cognitifs ainsi que les changements de comportement sur le plan socio-professionnel est établi.

Une fois l'entretien avec le généraliste, une série de test aidant au diagnostic de la

pathologie est effectuée par ce dernier en suivant les normes de critères *DSM-IV-TR* et *NINCDS-ADRDA* :

Le *MMSE* (**M**ini **M**ental **S**tate **E**valuation), ou test de Folstein [112], est le test le plus répandu pour diagnostiquer la maladie d'Alzheimer. Il a pour rôle d'évaluer les capacités d'orientation, d'apprentissage des informations, la capacité de langage, la praxie, la capacité d'attention ou encore la capacité mnésique du patient. Le *MMSE* consiste en une succession de 30 questions à réaliser dans un temps imparti, généralement une quinzaine de minutes. Suivant les réponses du patient aux questions, un score final, noté sur 30, est obtenu et c'est à partir de ce score qu'un jugement de l'état de conscience du patient peut être effectué.

Ainsi avec un score inférieur à 24 sur 30, une démence est suspectée chez le patient. Si le score final obtenu est supérieur à 28 alors le cas du patient est jugé normal.

Cependant, afin de ne pas fausser le résultat, les origines socio-culturelles, le niveau d'étude ainsi que l'ancienne activité professionnelle du patient sont à prendre en compte.

- Le test de l'horloge [113][114], qui est une épreuve visuo-graphique dans laquelle le patient devra dessiner au mieux une horloge et également indiquer une heure précise donnée par l'examineur. Différents items seront jugés à la fin de ce test, comme par exemple l'exactitude du placement des chiffres dans l'horloge (liste complète et dans l'ordre), le placement des aiguilles par rapport à l'heure demandé et la structure des aiguilles (tailles différentes des aiguilles, bon placement des aiguilles indiquant l'heure et les minutes).
- Le test des 5 mots de Dubois [115], qui consiste au jugement de la capacité du patient à rappeler des mots préalablement acquis. L'avantage de ce test est sa facilité et sa rapidité à être mis en place. Il consiste en l'apprentissage par le patient d'une liste de 5 mots aléatoire. Pour cela, la liste de mots lui est présentée. On lui demandera ensuite de redonner les mots après la lecture des catégories sémantiques des mots présentés précédemment. Une fois la liste de mots jugée acquise, elle est retournée puis un rappel immédiat est effectué en demandant au patient de répéter les mots qu'il vient de lire. Une épreuve attentionnelle intercurrente est effectuée pour détourner l'attention du patient, on lui demandera donc de réaliser un calcul mental, une organisation sérielle de chiffre ou encore un test de l'horloge. Cette étape prendra entre 3 et 5 minutes. Enfin, dès l'épreuve attentionnelle intercurrente terminée, il est demandé au patient de redonner la

liste des mots acquis, et si cela lui est impossible, les catégories sémantiques des mots peuvent lui être redonnées. Le résultat de ce test est la notation sur dix du test, qui résulte de la somme du score du premier rappel immédiat (sur cinq) et du score du rappel différé avec l'épreuve attentionnelle intercurrente (sur cinq).

- Le test de fluence verbale, ou *Set-Test d'Isaacs* [116], où le patient devra donner une succession de dix mots de quatre catégories différentes (Couleurs, Animaux, Fruits et Villes) dans un temps imparti réduit (de l'ordre de quinze secondes par catégorie). Le score final est le nombre total de mots qu'il aura pu fournir à l'issue du test. En fonction du score final, l'état du patient peut être déterminé, ainsi, avec un score supérieur ou égal à 37, l'état est jugé normal, entre 34 et 37, la surveillance du patient est mise en place, entre 30 et 34, un bilan complémentaire est programmé, et en dessous de 30 le score est pathologique.

A.2.2 Evaluation paraclinique de la maladie

Quand le diagnostic clinique est posé par le praticien, une évaluation paraclinique est effectuée. Elle prend en compte un examen par *IRM*, où une atrophie corticale et une atrophie des hippocampes peuvent être mises en avant. Des examens de tomographie à émission monophotonique (*TEMP*) et par émission de positons (*TEP*) permettront de mettre en avant, respectivement, une diminution de l'apport sanguin dans les zones temporales bilatérales et un sous-fonctionnement de ces régions cérébrales.

Une ponction lombaire est également effectuée dans le cadre d'un diagnostic paraclinique. Elle aura pour objectif de doser les marqueurs biologiques spécifiques de la maladie d'Alzheimer dans le liquide céphalo-rachidien (qui est le fluide qui entoure le cerveau et la moelle épinière).

Enfin des examens biologiques complémentaires sont recommandés. Un dosage de la thyroïdostimuline hypophysaire (*TSH*), un hémogramme, une calcémie, une glycémie sont ainsi réalisés.

A.3 Références bibliographiques

[110] G. McKhann, D. Drachman, M. Folstein, R. Katzman, D. Price, and E. M. Stadlan,

- “Clinical diagnosis of Alzheimer’s disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer’s Disease,” *Neurology*, vol. 34, no. 7, pp. 939–944, 1984.
- [111] G. Waldemar *et al.*, “Recommendations for the diagnosis and management of Alzheimer’s disease and other disorders associated with dementia: EFNS guideline,” *Eur. J. Neurol.*, vol. 14, no. 1, pp. 1–26, 2007.
- [112] M. F. Folstein, S. E. Folstein, and P. R. McHugh, “‘Mini-mental state’. A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician,” *J. Psychiatr. Res.*, vol. 12, no. 3, pp. 189–198, 1975.
- [113] B. Agrell and O. Dehlin, “The clock-drawing test,” *Age Ageing*, vol. 27, pp. 399–403, 1998.
- [114] P. J. Manos and R. Wu, “The ten point clock test: a quick screen and grading method for cognitive impairment in medical and surgical patients,” *Int. J. Psychiatry Med.*, vol. 24, no. 3, pp. 229–44, 1994.
- [115] B. Dubois, J. Touchon, F. Portet, P.-J. Ousset, B. Vellas, and B. Michel, “‘Les 5 mots’, épreuve simple et sensible pour le diagnostic de la maladie d’Alzheimer,” *Press. Medicale*, vol. 31, pp. 1696–9, 2002.
- [116] B. Isaacs and A. J. Akhtar, “The set test: A rapid test of mental function in old people,” *Age Ageing*, vol. 1, no. 4, pp. 222–226, 1972.

Annexe B

B.1 Micro-rhéologie

B.1.1 Modélisation des fluides viscoélastiques, lien entre contrainte et déformation

A partir de la contrainte σ , de la déformation γ , la description du caractère visqueux et élastique d'un matériau est possible et ce à travers des lois de la mécanique des fluides et de la mécanique des solides.

Il est possible d'exprimer la conservation de la quantité de mouvement d'un fluide à partir d'une des équations fondamentales de la dynamique communes aux solides et aux fluides. Cependant les matériaux complexes étudiés dans cette étude présentent des structures hétérogènes. Il est donc plus convenable d'isoler un élément de volume infinitésimal pour en exprimer ses déplacements et ses vitesses en fonction des contraintes associées. La résolution de l'équation différentielle établie va permettre de positionner dans le temps et l'espace chaque particule élémentaire du fluide complexe. Cela ne sera possible que si les contraintes soumises au milieu sont parfaitement connues. La finalité de cette résolution, dans le cadre d'une perturbation faible du milieu, sera l'établissement de l'équation de propagation de l'onde de pression.

Du point de vue instrumental, l'accès aux valeurs des contraintes dans le milieu semble difficile, seules les contraintes soumises aux frontières du fluide pourront être mesurées et quantifiées. Pour remédier à ce problème, l'hypothèse de l'homogénéité et de l'isotropie du fluide est mise en place. Les caractéristiques rhéologiques telles que la viscosité et l'élasticité se déduisent alors des résultats connus de la théorie des fluides et des solides.

- Pour un fluide visqueux, le taux de déformation (ou vitesse de déformation) sera proportionnel à la contrainte (loi de Newton) ;
- Et dans le cas d'un solide élastique, la déformation s'exprimera en fonction de la contrainte (loi de Hooke).

La détermination de leurs comportements est une combinaison des deux approches.

De nombreux outils existent dans la littérature pour caractériser et modéliser le

comportement des matériaux viscoélastiques en régime transitoire. Pour réaliser cela, des modèles, se basant sur la modélisation au travers de ressorts et d'amortisseurs, sont établis. Ils auront pour rôle d'établir un lien temporel entre la contrainte et la déformation du matériau. Pour ne citer qu'eux, le modèle de Kelvin-Voigt va permettre de modéliser le comportement des matériaux viscoélastiques solides et le modèle de Maxwell est utilisé pour la modélisation des liquides viscoélastiques.

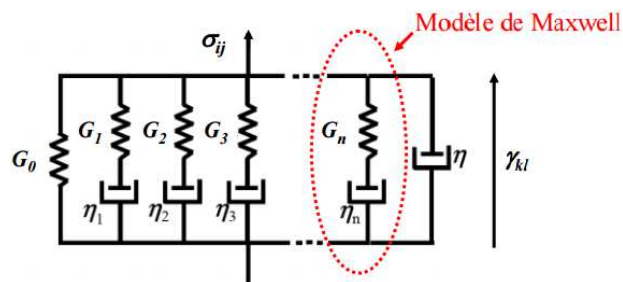


Figure B-3, Modèle mécanique de Maxwell d'un matériau viscoélastique isotrope, constitué de n branches de Maxwell en parallèle.

Les matériaux étudiés dans cette étude passent par différents états structuraux. En effet, ils passent d'une phase liquide (noyaux) à une phase de formation des fibres. Malgré le fait que l'on trouve ces matériaux dans un fluide complexe (sang ou liquide céphalo-rachidien), ils présentent des structures flexibles.

En phase liquide, le matériau peut être considéré comme un fluide homogène du point de vue comportemental, ce qui implique donc la caractérisation de la capacité de ce fluide à s'écouler. Tant que les particules constituant la phase sol restent petites, le fluide est considéré comme newtonien, et sa contrainte sera donc proportionnelle au taux de cisaillement. Dans le cadre d'un régime dynamique linéaire, l'inertie du fluide est le lien entre la contrainte et la déformation.

Lors de la polymérisation, et donc de la transformation structurale du matériau, la rigidité du matériau va augmenter. Cela va se décrire par le fait que la viscosité dynamique η ne sera plus constante en fonction du taux de cisaillement. Les forces entropiques, qui sont perpendiculaires au cisaillement, vont tendre à restaurer la forme initiale de la structure du matériau. Dans le cas des matériaux viscoélastiques, où la déformation continue d'évoluer alors que la contrainte n'est plus appliquée.

Dans le cas des petites déformations et des petites contraintes, les effets liés à la rigidité G et à la viscosité se superposent. Le lien entre la contrainte et la déformation dans ce type de matériaux viscoélastiques isotropes peut être décrit par l'équation différentielle (7)

$$\sigma_{ij} + \sum_m A_m \frac{\partial^m \sigma_{ij}}{\partial t^m} = G_0 \gamma_{kl} + \sum_n B_n \frac{\partial^n \gamma_{kl}}{\partial t^n} \quad (7)$$

Où A_m et B_n sont des coefficients constants correspondant respectivement à l'ordre m et n , qui n'ont pas de signification physique évidente, mais qui permettent d'expliquer les différents temps caractéristiques représentatifs des interactions multiples dans le matériau. G_0 est la rigidité statique, t le temps et σ_{ij} et γ_{kl} qui sont les tenseurs de contraintes et de déformations du second ordre.

Suivant les travaux de P. Rouse pour les matériaux polymères, le nombre de temps caractéristiques significatifs est proche de l'infini car il dépend de l'échelle d'observation considérée. Ainsi, pour caractériser le fluide d'étude, il devient plus convenable de considérer une distribution continue des temps de relaxation. Un module continu de relaxation des contraintes de cisaillement $g(t)$ peut être alors défini par l'équation (8)

$$g(t) = \int_0^{\infty} G(\tau) e^{-\frac{t}{\tau}} d\tau \quad (8)$$

Où $G(\tau)d\tau = \frac{\eta}{\tau} d\tau$ et représente les contributions à la viscosité totale η de tous les éléments de Maxwell, dont les temps de relaxation sont compris entre τ et $\tau + d\tau$.

Un lien temporel entre la contrainte et la déformation s'exprime donc sous la forme du produit de convolution suivant l'équation (9)

$$\sigma(t) = \int_{-\infty}^t g(t-t') \frac{\partial \gamma(t')}{\partial t'} dt' \quad (9)$$

La Figure B-4 suivant représente le matériau dans le domaine temporel, et dans lequel $g(t)$ est le module de relaxation.

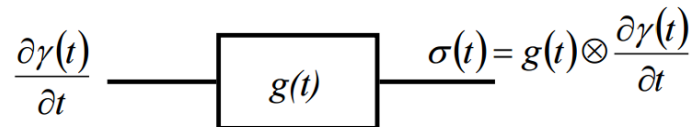


Figure B-4, Représentation schématique du matériau dans le domaine temporel.

Du fait du caractère causal de cette fonction (le module de relaxation n'étant généré qu'une fois qu'une déformation est appliquée au fluide), l'étude du matériau en régime harmonique semble plus adéquate.

B.1.2 Module complexe de cisaillement

Lorsque le matériau est soumis à une déformation sinusoïdale de pulsation ω et d'amplitude connues, il est possible de réécrire le produit de convolution tel que le montre l'équation (10).

$$\tilde{\sigma}(t, \omega) = j\omega \tilde{\gamma}(t, \omega) \left(\int_0^{\infty} g(u) e^{-(j\omega u)} du \right) \quad (10)$$

Grâce aux lois de Hooke, le module complexe de cisaillement $G^*(\omega)$ peut être introduit par l'équation (11).

$$G^*(\omega) = G'(\omega) + jG''(\omega) = j\omega \int_0^{\infty} g(t) e^{-(j\omega t)} dt \quad (11)$$

Le module de conservation $G'(\omega)$, en phase avec la déformation, est associé à la réponse élastique du matériau, c'est le **module élastique**. Le module de perte $G''(\omega)$, étant en quadrature avec la déformation, est associé quant à lui au taux de déformation, c'est le **module visqueux**.

La représentation schématique par une fonction de transfert reliant la contrainte et la déformation d'un matériau viscoélastique est rendue possible, et est illustrée à la Figure B-5. Cela va donc permettre de modéliser le matériau dans le domaine spectral.

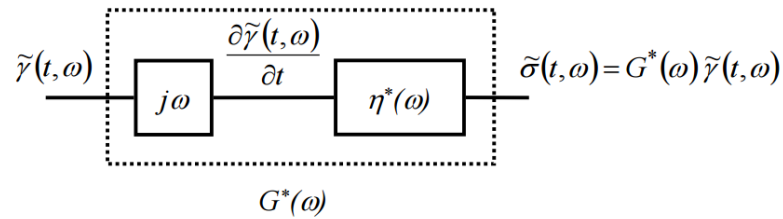


Figure B-5, Représentation schématique du matériau viscoélastique à caractériser dans le domaine spectral en fonction du module complexe de cisaillement.

Dans la modélisation des matériaux viscoélastiques dans le domaine fréquentiel, la contrainte et la déformation sont liées par le module complexe de cisaillement $G^*(\omega)$.

B.2 Principe de mesure du microrhéomètre

B.2.1 Instrumentation

Le capteur est constitué d'un substrat de quartz de coupe AT (coupe orientée à $35,25^\circ$ par rapport à l'axe optique du cristal) et la technique de mesure du capteur se base sur celle des résonateurs à quartz de coupe AT. Le transducteur piézoélectrique, en contact avec le milieu à caractériser, permet de générer des ondes de cisaillement qui sont mesurées en réflexion à l'aide d'une instrumentation développée au laboratoire.

Le dépôt du fluide à la surface du capteur va modifier ses propriétés mécaniques et électriques. De par les propriétés piézoélectriques du capteur, les variations des paramètres du capteur sont disponibles par la mesure en ligne de son impédance complexe au voisinage de sa fréquence de résonance. Du fait des forts coefficients de qualité de ce genre de capteur, il est préférable de mesurer et suivre l'admittance Y_e du capteur lors des essais de mesure des paramètres rhéologiques. Cela s'explique par le fait des grandes valeurs de coefficient de qualité de ce genre de capteur qui engendre des faibles valeurs d'impédance autour de la fréquence de résonance et qui seront dans l'ordre de grandeur du bruit électronique.

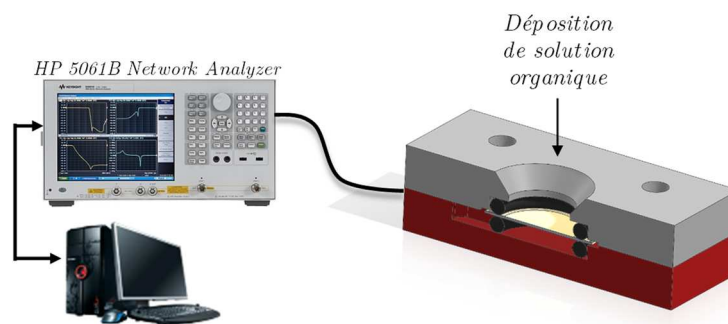


Figure B-6, Chaîne d'instrumentation du microrhéomètre.

Le capteur est inséré dans une cellule de mesure et relié à un analyseur de réseau HP 5061B. Afin de s'affranchir des éventuels effets de température, l'ensemble est inséré dans une enceinte thermostatée. Une temporisation est possible entre chaque mesure d'admittance ce qui permettra un suivi de ce paramètre en fonction des changements structuraux de la solution à caractériser.

La Figure B-7 ci-dessous illustre des mesures d'admittance lors de la formation d'un gel obtenu à partir d'un yaourt. Chaque arc de cercle représente la mesure de l'admittance du capteur au voisinage de la fréquence de résonance (de l'ordre de 6 MHz) à des temps définis.

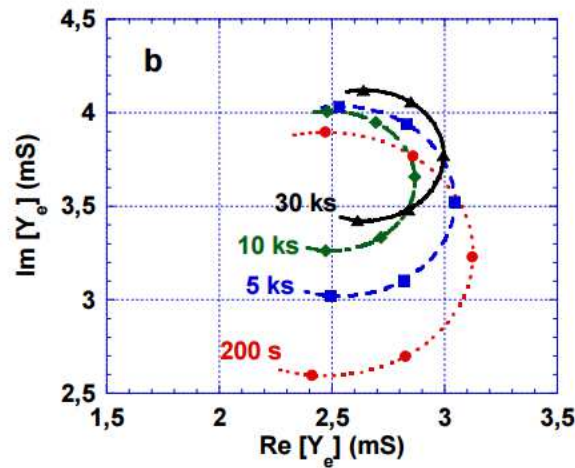


Figure B-7, Mesure de l'admittance Y_e du capteur lors de la formation d'un yaourt à partir de lait acidifié.

Il est possible d'observer une atténuation de la courbe finale (à $t = 30$ ks) par rapport à la courbe initiale (à $t = 200$ s). Cette atténuation est la réponse de la formation du yaourt (ou gel) à partir de l'état initial sous forme de lait acidifié.

L'impédance mécanique équivalente à la surface du quartz dépend principalement des interactions mécaniques entre le capteur et le matériau.

B.2.2 Modélisation des interactions entre le capteur et le matériau

La modélisation du quartz chargé par le matériau est largement développée dans la littérature. Il est possible ainsi de représenter le transducteur autour de sa fréquence de résonance comme étant une ligne de transmission mécanique ou par un circuit électrique équivalent. Cependant la nature des matériaux à tester définit la validité des équivalences des modèles. La détection des protéines à l'origine de la maladie d'Alzheimer est possible, cependant il faut faire face à deux problématiques :

- L'effet d'inertie qui dépend de l'état surfacique des électrodes du quartz et des propriétés viscoélastiques de la solution à caractériser.
- Les propriétés électriques du matériau au cours de leur formation sont susceptibles d'évoluer et de modifier les conditions de propagation de l'onde mécanique dans le capteur, affectant de manière significative sa sensibilité.

Le modèle utilisé dans cette étude tient compte de ces effets afin d'extraire le plus précisément possible l'évolution des propriétés viscoélastiques du matériau en contact.

B.2.2.1 Modélisation du quartz

Afin d'avoir accès aux paramètres viscoélastiques de la solution à tester, il est nécessaire

de modéliser le quartz par un circuit électrique où le quartz, les électrodes, ainsi que la solution test (ou charge) sont représentés. Le modèle du quartz ainsi obtenu est présenté à la Figure B-8. Il est défini par une branche statique décrivant le comportement purement électrique du quartz, et une branche dynamique décrivant le comportement électromécanique du quartz.

La branche statique peut être représentée par une impédance Z_0 . Cette impédance regroupe deux effets. L'effet capacitif, C_0 , lié aux courants de déplacement effectifs dans le substrat, et l'effet de pertes diélectriques, R_0 , correspondant aux courants de conduction fictifs dans le substrat.

La branche dynamique, quant à elle, est définie par l'impédance Z_{meff} . L'effet de la charge sur le quartz rajoute une impédance en série dans la branche dynamique Z_{charge} . C'est à partir de cette impédance que seront extraits les paramètres viscoélastiques de la solution à tester.

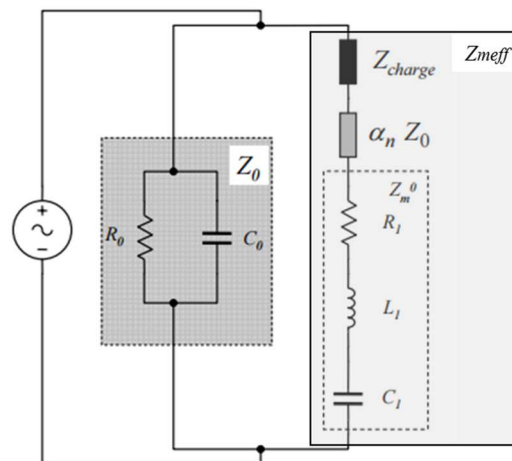


Figure B-8, Modélisation électrique du résonateur TSM utilisé dans l'étude.

B.2.2.2 Effet d'inertie

L'effet d'inertie peut s'expliquer à partir de la démonstration de Sauerbrey sur les microbalances à cristal de quartz chargées par un film mince rigide. Dans ces conditions, on peut considérer que le mouvement de la couche mince va rester synchrone avec le mouvement du transducteur et avec la même amplitude. Ainsi l'impédance mécanique du quartz, aussi appelée effet de masse par analogie aux microbalances à quartz, ne dépendra que de la masse volumique du film ρ_{film} et de l'épaisseur h_{film} de celui-ci et pourra donc s'exprimer par l'équation (12)

$$Z_{masse} = j\omega\rho_{film}h_{film} \quad (12)$$

Ces effets inertiels sont également observés dans le cas des fluides. Cependant il existe deux zones différentes du liquide pour lesquelles la réponse à une sollicitation sinusoïdale due à la propagation de l'onde est différente. La première zone aura un comportement similaire à celui d'un film rigide d'épaisseur h_{eff} , où le fluide est piégé dans les aspérités de la surface de l'électrode. Ici, le fluide se déplacera ainsi de manière synchrone et avec la même amplitude par rapport à l'électrode. La seconde zone répond aux lois de propagation des ondes dans les fluides.

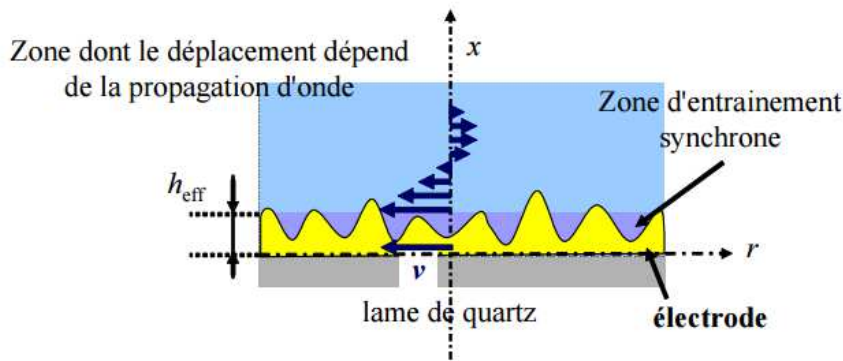


Figure B-9, Effet d'inertie liée aux aspérités dans le cas des fluides.

La différenciation, entre ces deux zones, n'est cependant pas évidente à établir, et il est plus convenable d'estimer l'épaisseur de délimitation comme étant h_{eff} . A l'échelle macroscopique, cette épaisseur est liée au rapport entre le volume total du fluide piégé dans le relief de l'électrode et de l'aire de l'électrode immergée. A l'échelle de la particule, l'épaisseur effective va dépendre des liaisons entre les particules du fluide qui impliquent un déplacement homogène identique à celui de l'électrode.

B.2.2.3 Effets des propriétés viscoélastiques du fluide sur l'impédance du quartz

Lors du dépôt d'un fluide viscoélastique à la surface de l'électrode du transducteur, le cisaillement du capteur va imposer une onde ultrasonore au fluide. Dans le cas où seuls les effets liés à la propagation de l'onde ultrasonore sont considérés, l'impédance électrique est définie comme étant l'impédance caractéristique du matériau, telle que le montre l'équation (13)

$$Z_s = \sqrt{\rho_{mat}G^*(\omega)} \quad (13)$$

Où ρ_{mat} est la masse volumique du matériau déposé sur le transducteur. Si on introduit les modules visqueux et élastique, l'équation devient donc :

$$Z_s = \sqrt{\frac{\rho_{mat}(|G^*(\omega)| + G'(\omega))}{2}} + j \sqrt{\frac{\rho_{mat}(|G^*(\omega)| - G'(\omega))}{2}} \quad (14)$$

Si l'on considère un fluide purement newtonien, $G'(\omega)$ est nul et $G''(\omega)$ ne dépend que de la viscosité dynamique η et de la fréquence d'excitation. Les parties réelle et imaginaire de l'impédance électrique seront égales. Si le liquide à caractériser est faiblement visqueux, les faibles variations de la fréquence (inférieures à 1% autour de la fréquence de résonance), impliquent que l'impédance mécanique dépend essentiellement de $\sqrt{\rho_{mat}\eta}$ conformément aux résultats observés dans la littérature. Ainsi, l'impédance de charge totale Z_{load} pourra s'exprimer par l'équation (15) :

$$Z_{load} = \sqrt{\frac{\rho_{mat}(|G^*(\omega)| + G'(\omega))}{2}} + j \left(\sqrt{\frac{\rho_{mat}(|G^*(\omega)| - G'(\omega))}{2}} + \omega \rho_{mat} h_{eff} \right) \quad (15)$$

B.2.3 De la mesure de l'impédance du quartz aux paramètres viscoélastiques

A partir de la mesure de l'impédance complexe du capteur à vide et chargé par une solution newtonienne, il est possible d'identifier les éléments constitutifs du modèle électrique exposé précédemment et de déterminer l'impédance complexe Z_{load} qui permettra d'extraire les paramètres viscoélastiques du matériau à tester.

Le dépôt d'un liquide purement newtonien, avant toute mesure, permettra de calibrer le système à chaque expérimentation, de vérifier le fonctionnement correct du capteur, tout en extrayant les effets inertiels. Ainsi le suivi des propriétés viscoélastiques du matériau à caractériser est rendu possible avec le contrôle des parties réelles R_{load} et parties imaginaires X_{load} , qui composent les valeurs d'impédance électrique liées strictement aux effets viscoélastiques.

Dans l'exemple montré ci-dessous, le lait acidifié en début de manipulation peut être considéré comme un liquide newtonien. Le suivi des paramètres R_{load} et X_{load} va permettre de suivre l'évolution de la structure du lait au cours de sa transformation en yaourt.

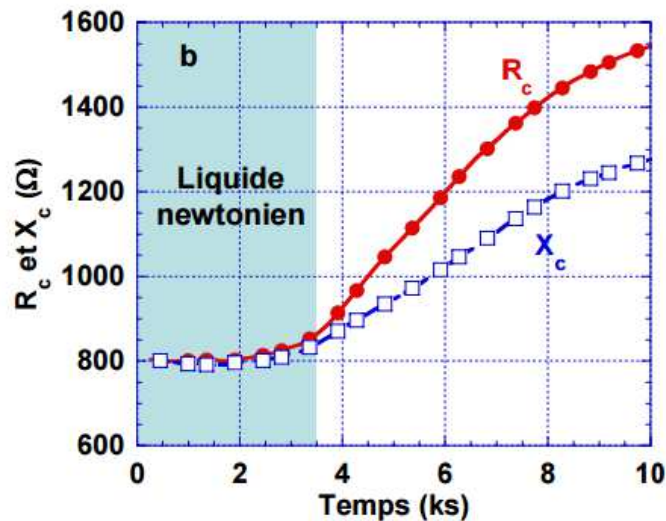


Figure B-10, Suivi des paramètres R_{load} et X_{load} à 6MHz pour un lait lors de la formation de yaourt à $[GDL] = 26g.L^{-1}$, avec $[GDL]$ la concentration molaire en glucono- δ -lactone.

Il est nécessaire de noter la superposition des paramètres complexes jusqu'à $t = 3$ ks, qui est le temps caractéristique de gélification. Après $t = 3$ ks, le lait va commencer à changer de structure conformationnelle, visualisée par la séparation des signaux R et X.

Le suivi des paramètres élastique G' et visqueux G'' va être possible à partir de la variation des paramètres R_{load} et X_{load} déterminés plus haut. Ainsi les courbes ci-dessous illustrent cette extraction et la visualisation de la variation des modules élastiques et visqueux du matériau à caractériser.

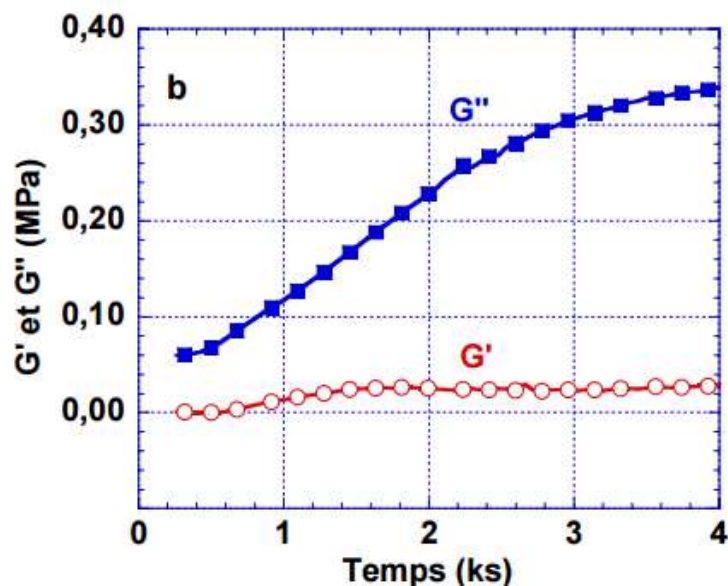


Figure B-11, Suivi des paramètres viscoélastiques G' (module élastique) et G'' (module visqueux) lors de la formation d'un yaourt à partir d'un lait acidifié à 6MHz.

Annexe C

C.1 Origine des dégénérescences neurofibrillaires

La protéine *tau* et plus particulièrement la présence de dégénérescences neurofibrillaires, qui sont issus de la dégradation de la protéine *tau*, sont le deuxième type de lésion caractéristique. Cependant, l'association de la protéine *tau* en tissus insoluble n'est pas caractéristique uniquement de la maladie d'Alzheimer, mais d'un ensemble de pathologie regroupé sous le nom de tauopathie. C'est l'association entre des tissus amyloïde et une dégénérescence neurofibrillaire qui est spécifique et est synonyme de maladie d'Alzheimer.

C.1.1 Structure de la protéine *tau*

La protéine *tau* appartient à la famille des MAP, pour *Microtubule-Associated Proteins*. La protéine *tau* joue un rôle important dans le bon fonctionnement des neurones, en effet, elle assure la rigidité des axones à travers les microtubules qui sont des structures longilignes. Les microtubules sont des filaments servant au transport des matériaux construits à l'intérieur du neurone vers les terminaisons nerveuses, ainsi qu'au transport de l'information [117]. Elles ont également pour rôle d'organiser l'espace neuronal. Les travaux de Cleveland, ont permis en 1977, de montrer que la présence de la protéine *tau* favorisait la polymérisation des microtubules et que c'est un des facteurs stabilisant. On retrouve deux types de protéines *tau* dans l'organisme, les 3R et 4R, qui sont caractérisées par le nombre de point d'ancrage entre la protéine et les microtubules.

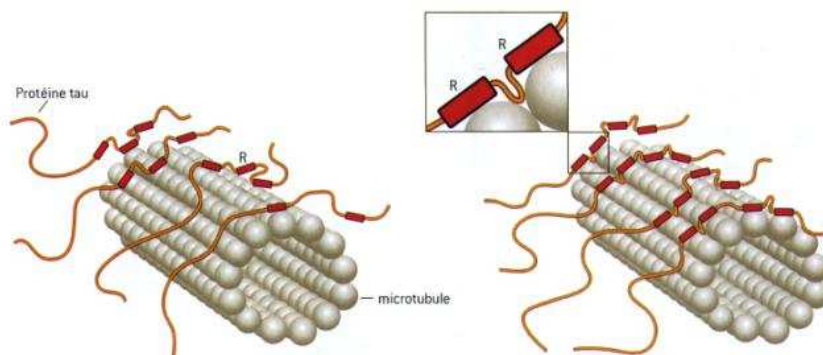


Figure C-12. Représentation des microtubules fixés par les protéines tau 3R (à gauche) et 4R (à droite).

Si le détachement régulier de la protéine *tau* des microtubules, ainsi que leur dégradation dans l'organisme n'est pas pathogène, l'accumulation dans le corps neuronal des résidus

provoque les dégénérescences neurofibrillaires. Il en résulte la mort du neurone.

C.1.2 Agrégation de la protéine *tau*

C.1.2.1 Formation des fibres

L'agrégation de la protéine *tau* est associée à de nombreux troubles neurologiques, cependant elle n'est pas uniquement synonyme de la maladie d'Alzheimer, en effet, une trentaine de pathologie sont le résultat de la dégénérescence de la protéine *tau*. Ces pathologies sont regroupées sous le terme de « tauopathies ».

	Pattern of dementia	Movement disorder	L-dopa response	3R : 4R	Associated genes
Predominantly tau pathology					
PSP					
Richardson's syndrome	Frontal dysexecutive	Axial rigidity, postural instability, bradykinesia, ophthalmoplegia	-/+	1:2-4	MAPT H1
PSP-P	Late frontal dysexecutive	Asymmetric onset, axial rigidity, tremor, late falls	++	1:1-2	MAPT H1
Argyrophilic grain disease	Limbic dementia	No	—	1:2	MAPT H1
Corticobasal degeneration	Parietal, frontal dysexecutive	Asymmetric parkinsonism, alien limb	—	1:2	MAPT H1
Pick's disease	Frontal dysexecutive, PNFA, SD	Rare	—	3:1	None
FTDP-17	Frontal behavioural	Symmetric rigidity and bradykinesia, ophthalmoplegia	-/+	1:2 1:1 2:1	Multiple mutations/deletions of MAPT
PEP	Rare	Symmetric rigidity and bradykinesia, ophthalmoplegia	++	1:1	None
PDC Guam	Frontal dysexecutive, cortical	Symmetric rigidity and bradykinesia, ophthalmoplegia	—	1:1	None
Guadeloupean parkinsonism	Frontal dysexecutive	Symmetric rigidity and bradykinesia, ophthalmoplegia	-/+	1:2	None
Associated with amyloid deposition					
Alzheimer's disease	Amnesic, cortical	Rare	—	1:1	APP, PS1, PS2
Down's syndrome	Amnesic, cortical	No	—	1:1	Trisomy 21
Dementia pugilistica	Amnesic, cortical	Parkinsonism	—	1:1	ApoE4 risk factor
Familial British dementia and Familial Danish dementia	Amnesic, cortical	No	—	—	BRI2
In association with other pathology					
Myotonic dystrophy	Frontal behavioural	No	—	2:1	DMPK
Hallewörden-Spatz disease	Mental retardation	Gait disturbance, extrapyramidal syndrome	—		PANK2
NPC	Mental retardation, psychosis	Dystonia, ataxia, ophthalmoplegia	—		NPC1, NPC2

Apo E4, Apolipoprotein E ε4; APP, amyloid precursor protein; DMPK, dystonia myotonica protein kinase; FTDP-17, frontotemporal dementia with parkinsonism associated with chromosome 17; MAPT, microtubule-associated protein tau; NPC, Niemann Pick type C; PANK, pantothenate kinase; PEP, post-encephalitic parkinsonism; PNFA, progressive non-fluent aphasia; PS, presenilin; PSP-P, progressive supranuclear palsy-parkinsonism; SD semantic dementia; —, negative response.

Figure C-13, Listes des principales tauopathies.[118]

Certains facteurs ont pour conséquences de désolidariser la protéine *tau* des microtubules et de modifier la structure des protéines. L'incidence direct de cette séparation est la présence de fragment protéique qui s'agrègeront entre eux sous forme de tissus insolubles neurofibrillaires, également appelés *NFT* pour « *NeuroFibrillary Tangles* ».

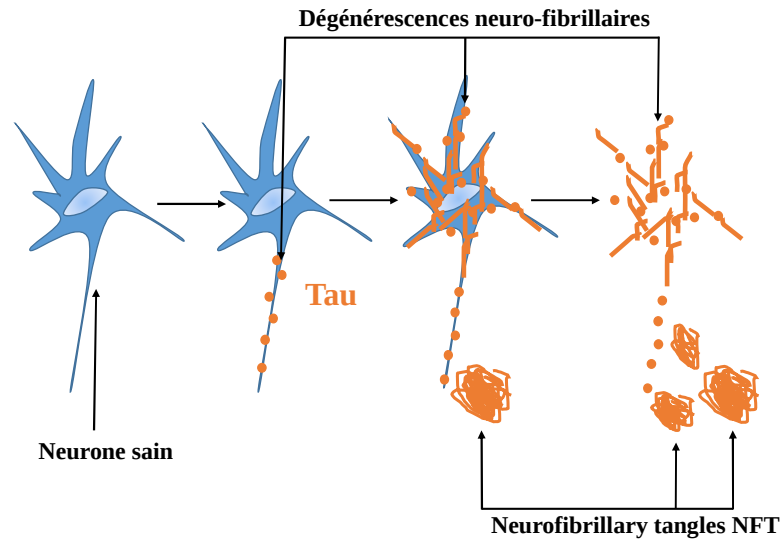


Figure C-14, Génération des dégénérescences neuro-fibrillaires avec la dégradation des protéines tau.

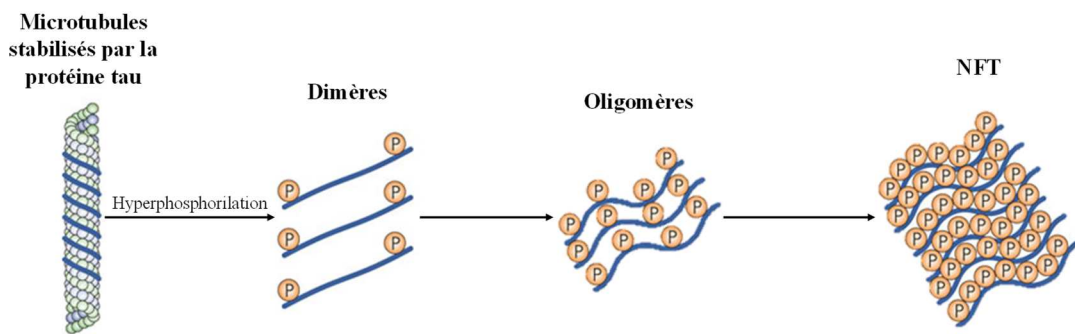


Figure C-15, Production des NFT à partir des fragments de protéines tau hyperphosphorylés.

Les protéines libres formeront des paires de filaments en hélice (ou *Paired Helical Filaments*, *PHF*) qui sont composées de 2 filaments protéiques de longueur variable, avec un pas de 80 nm et un diamètre variant entre 8 et 20 nm. Cette structure se retrouve dans les *NFT*.

C.1.2.2 Facteurs d'agrégation

Différents facteurs sont amenés à modifier la protéine *tau* comme l'hyperphosphorylation de la protéine *tau* ou l'action de kinases spécifiques lors de la polymérisation de la protéine.

La phosphorylation est la principale modification post-traductionnelle de la protéine *tau*. Actuellement, il est reconnu que de nombreux sites dans la séquence protéique de la protéine *tau* peuvent être phosphorylés, et que cette opération aura pour rôle de stabiliser les microtubules. Cependant une phosphorylation anormale ou une hyperphosphorylation peuvent avoir de toutes autres conséquences. En effet, cela peut remettre en cause l'affinité

entre les protéines *tau* et les microtubules, et donc permettre le relargage de protéine dans le milieu complexe et ce en grande quantité. La finalité de ce relargage sera l'augmentation de la probabilité d'agrégation de ses fragments libres pour la formation de tissus insolubles. La distinction entre la phosphorylation anormale et l'hyperphosphorylation réside dans l'origine du site de phosphorylation dans la protéine. Dans le cadre d'une phosphorylation anormale, des sites, normalement non phosphorylants, le seront, alors que dans le cadre d'une hyperphosphorylation, le pourcentage de phosphorylation sera anormalement élevé par rapport à un cerveau humain normal.

Les kinases et les phosphatases, qui sont deux enzymes jouent un rôle dans la phosphorylation de la protéine *tau*. Les kinases vont phosphoryler la protéine, avec que les phosphatases auront pour rôle de déphosphoryler la protéine *tau*. Les principales kinases dans la régulation de la phosphorylation de la protéine *tau* sont la *protéine kinase de Tau 1* (TPK1) et la *Tau protéine kinase 2*.

C.2 Références bibliographiques

- [117] M. D. Weingarten, A. H. Lockwood, S. Y. Hwo, and M. W. Kirschner, "A protein factor essential for microtubule assembly.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 72, no. 5, pp. 1858–62, 1975.
- [118] D. R. Williams, "Tauopathies: Classification and clinical update on neurodegenerative diseases associated with microtubule-associated protein tau," *Intern. Med. J.*, vol. 36, no. 10, pp. 652–660, 2006.

Annexe D

D.1 Procédé de fabrication

Pour la fabrication des TSM, les techniques usuelles de microfabrication en salle blanche ont été utilisées. Ainsi dans cette première partie, il sera détaillé l'environnement de travail ainsi que les techniques de fabrication utilisée pour la réalisation des capteurs servant à l'optimisation.

D.1.1 Environnement de travail

Afin de fabriquer des capteurs possédant les meilleures caractéristiques, tant au niveau structure qu'au niveau de leurs réponses électriques, ils ont été fabriqués dans une salle blanche de classe 1000, qui est un environnement sain et propre de toute impuretés. La classe de la salle blanche assure un nombre maximum de particules volatiles en fonction de leur diamètre. La Figure D-16 détaille la classification des salles blanches suivant leur niveau de concentration particulaire.

Numéro de classification ISO	Concentrations maximales admissibles (particules/m ³ d'air) en particules de taille égale ou supérieure à celles données ci-dessous					
	0,1 µm	0,2 µm	0,3 µm	0,5 µm	1 µm	5 µm
Classe ISO 1	10	2				
Classe ISO 2	100	24	10	4		
Classe ISO 3	1 000	237	10	35	8	
Classe ISO 4	10 000	2 370	1 020	352	83	
Classe ISO 5	100 000	23 700	10 200	3 520	832	29
Classe ISO 6	1 000 000	237 000	102 000	35 200	8 320	293
Classe ISO 7				352 000	83 200	2 930
Classe ISO 8				3 520 000	832 000	29 300
Classe ISO 9				35 200 000	8 320 000	293 000
NOTE : à cause des incertitudes dues au mesurage, les concentrations sont données avec au plus trois chiffres significatifs						

Figure D-16, classification particulaire de l'air en salle blanche suivant la norme ISO 14644-1.

D.1.2 Fabrication

D.1.2.1 Nettoyage des substrats

La première étape de la fabrication des capteurs est le nettoyage des substrats de quartz. Il se compose de trois étapes :

-Nettoyage par ultrasons

-Nettoyage par solvants

-Nettoyage par plasma

Au cours de cette première étape, les quartz sont disposés dans un support, et immergés dans une solution d'Hellmanex diluée à 2 % dans de l'eau. Cet ensemble est ensuite passé aux ultrasons pendant 1 h à 60°C. L'Hellmanex étant un composé alcalin, il sera activé après mélange à l'eau, et d'autant plus sous l'action des ultrasons.

La deuxième étape sert à éliminer tous les résidus gras et organiques aux surfaces du quartz. Pour cela, différents bains sont successivement effectués. Dans un premier temps, les quartz sont immergés dans un bain de méthanol, puis dans un bain d'éthanol et enfin dans un bain d'isopropanol. Une fois le dernier rinçage effectué, un séchage à l'aide d'un gaz neutre est réalisé pour éviter la formation de traces en surface.

La dernière étape du nettoyage est la réalisation d'un plasma oxygène sur la surface des quartz pour modifier l'énergie d'activation du substrat avant l'étape de dépôt.

D.1.2.2 Métallisation des plaques

Les électrodes constituant le capteur sont composées d'une bicouche métallique avec une couche de titane et une couche d'or. Elles sont d'une épaisseur respective de 30 et 200 nm. L'or n'adhère pas au verre, une pré-couche de titane est déposée sur le quartz. Lors de cette étape, des dépôts successifs de métaux à la surface des plaques nettoyées vont être réalisés en vue de la création des électrodes. Différentes techniques ont été abordées au cours de cette phase, avec l'évaporation par effet Joule, et la pulvérisation cathodique :

L'évaporation par effet Joule, consiste à faire évaporer un lingot de métal préalablement disposé dans une nacelle en tungstène par le passage d'un courant de forte intensité. Pour rendre possible l'évaporation, le système est placé dans une étuve sous vide. La mise sous vide de l'étuve aura pour rôle d'augmenter le libre parcours moyen des atomes de métal. Ainsi, la pression doit être assez basse pour que ce libre parcours moyen soit égal à la distance séparant la nacelle et le porte substrat.



Figure D-17, A gauche, bâti d'évaporation par effet Joule, à droite, vue intérieur du bâti d'évaporation.

L'épaisseur de métal déposé est contrôlée par une microbalance à quartz en mesurant la déviation de la fréquence de résonance de l'oscillateur à quartz. L'épaisseur consigne est saisie dans le boîtier de contrôle du bâti d'évaporation, et une fois cette valeur atteinte, la source de courant est arrêtée, coupant ainsi le dépôt de métal sur le substrat. Etant donné le niveau de vide dans l'étuve, une contamination de cette dernière est limitée. Cependant des contaminations dans le dépôt peuvent apparaître à partir de la nacelle. De plus l'impossibilité d'évaporer des métaux à hautes températures de fusion, l'impossibilité de déposer des alliages, et la limitation dans l'épaisseur finale de la couche déposée constituent les inconvénients majeurs de cette technique.

Le principe de fonctionnement de la pulvérisation cathodique repose sur la création d'un plasma d'argon entre une cible du matériau à déposer et le porte échantillon. Les ions du plasma viennent bombarder la cible de matière négativement polarisée, ce qui aura pour incidence d'arracher des atomes de cette dernière. Les atomes, ainsi arrachés, seront déposés sur le porte échantillon où la matière sera condensée, rendant le dépôt définitif.



Figure D-18, à gauche, vue d'ensemble du bâti de pulvérisation cathodique, à droite, dépôt de métal à partir du bombardement d'une cible métallique par plasma.

Cette technique de dépôt comporte plusieurs avantages comme la possibilité de pulvériser des matériaux à hautes températures de fusion, des alliages ou encore des

matériaux isolants. Il est possible de déposer de plus grandes épaisseurs de couche. Malgré tout, le contrôle de la croissance des couches est rendu difficile et des dégradations de substrats peuvent apparaître. Ainsi pour le contrôle de l'épaisseur, des abaques sont établis, et permettent d'estimer en fonction du temps de dépôt, l'épaisseur de ce dernier.

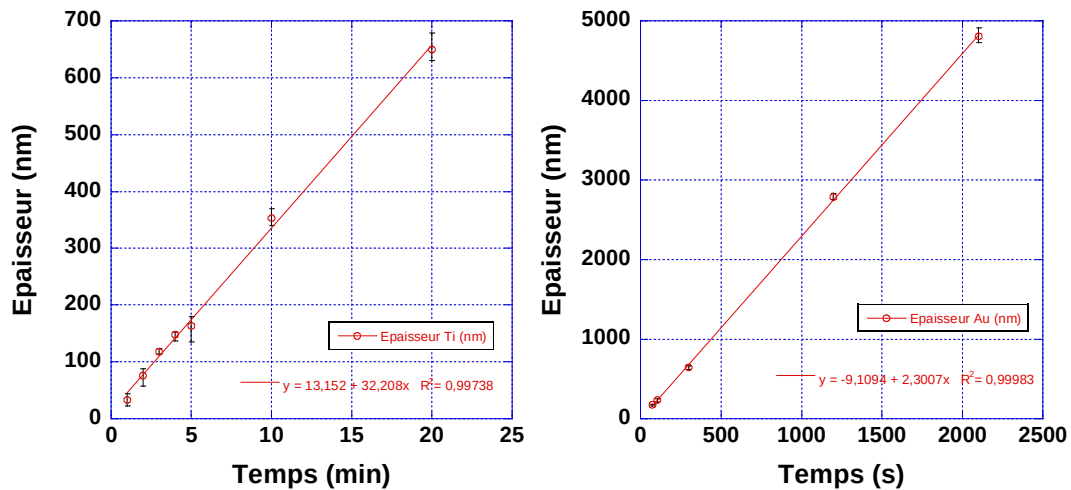


Figure D-19, Abaques donnant l'épaisseur de titane et d'or déposé en fonction du temps de dépôt.

La solution de métallisation choisie dans cette étude est la pulvérisation cathodique.

Ainsi un premier dépôt de 30 nm de titane a été réalisé sur la surface du quartz, puis la couche de 200 nm d'or est déposée sur le titane. Entre les deux dépôts de métaux, le vide est maintenu dans l'enceinte, ceci pour éviter l'oxydation de la couche de titane, qui causerait une mauvaise cohésion entre les couches métalliques.

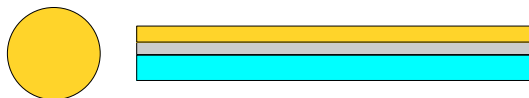


Figure D-20, Substrat de quartz (en bleu) métallisé d'une couche de Ti de 30 nm d'épaisseur (en gris), et d'une couche d'or de 200 nm d'épaisseur (en jaune).

D.1.2.3 Photolithographie

La phase de photolithographie a pour objectif de créer, sur une couche de résine photosensible, préalablement déposée sur le wafer métallisé, un motif défini. Pour se faire, la résine est insolée à travers un masque puis subi un bain chimique afin de révéler le motif désiré sur le wafer. Il existe deux familles de résines photosensibles, les résines négatives, et les résines positives. La différence entre ces deux résines réside dans le comportement qu'elles auront lors de l'insolation et du développement. Ainsi, pour une résine positive, la partie insolée va disparaître lors du développement, inversement, la résine de type négatif insolée va rester à la surface du substrat.

La première étape du procédé de photolithographie est la création d'une couche homogène de résine photosensible à la surface du quartz. Pour créer cette couche, la technique

du spin coating est utilisée. Elle consiste au dépôt de résine au centre du wafer et à la mise en rotation de ce dernier, sous l'effet de cette rotation, la résine va enduire de façon homogène la surface du quartz. L'épaisseur du film de résine dépend de la nature de la résine (et plus particulièrement de sa viscosité), mais également de la vitesse de rotation. Afin de créer la couche de résine de $2\text{ }\mu\text{m}$ d'épaisseur, le système sera mis en rotation à 4000 tr.min^{-1} , pendant 30 s. Une fois la résine déposée sur le substrat, il est placé pendant 1 min sur une plaque chauffante à 110°C pour réaliser une étape de cuisson.

Le substrat est ensuite placé dans une bâti d'insolation, en vue de structurer et de déporter le motif de l'électrode sur la résine. Cette étape est réalisée par photolithographie UV. Cette technique consiste à insoler la résine à travers un masque par un rayonnement UV. La durée du procédé d'insolation dépend de l'épaisseur. Pour une épaisseur de résine de $2\text{ }\mu\text{m}$, l'insolation dure 7.5 s.

Une fois la résine insolée, elle est révélée grâce à un développeur qui va permettre d'enlever la partie insolée dans le cas de la résine positive et la partie non insolée dans le cas de la résine négative. La différence fondamentale entre ces deux types de résines, est la réaction qu'elles auront lors de l'insolation. Dans le cas de la résine positive, l'insolation aura pour incidence de solubiliser la résine, quant à la résine négative, l'insolation va induire la polymérisation de la résine. La nature du développeur utilisé pour révéler le motif insolé va également dépendre de la résine utilisée lors du processus.

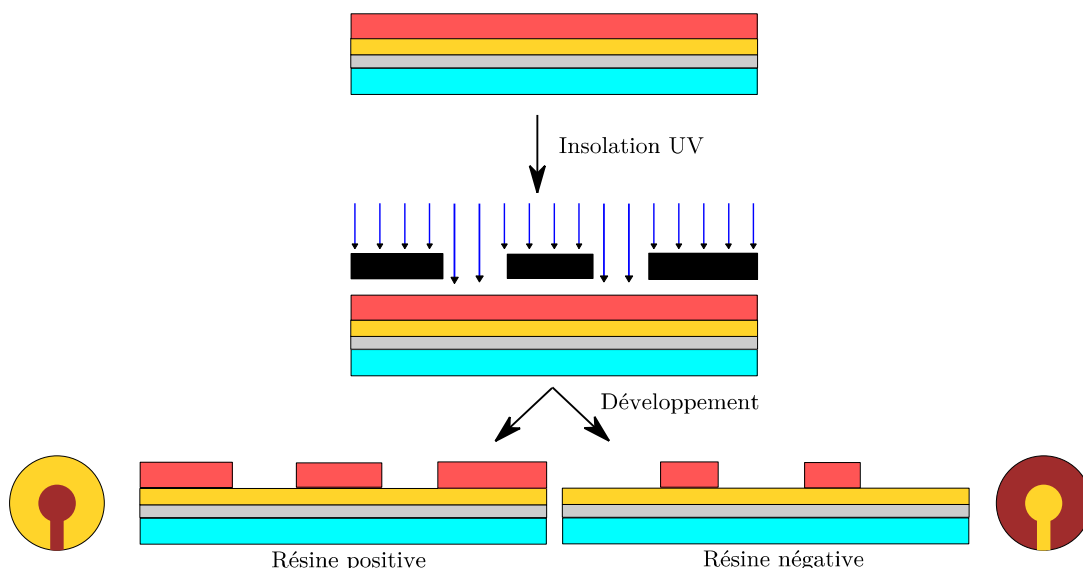


Figure D-21, Principe de la photolithographie.

D.1.2.4 Gravure des couches métalliques

La gravure des couches métalliques permet de supprimer les zones métalliques qui ne sont plus protégées par la résine. Deux grandes classes de gravure peuvent être employées

pour la réalisation de cette gravure : la gravure chimique et la gravure physique.

Les gravures humides consistent à l'immersion des substrats métallisés dans des bains chimiques qui attaqueront spécifiquement les métaux non protégés. La gravure humide peut être isotrope, avec la gravure uniforme dans toutes les directions, mais peut être également anisotrope où la gravure humide va se faire dans une direction définie.

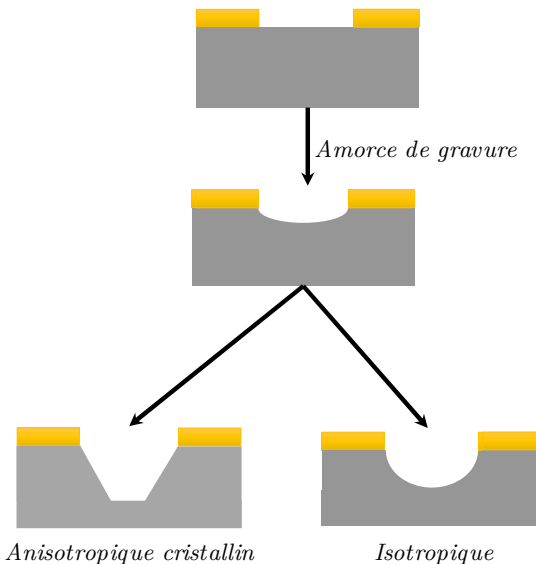


Figure D-22, Effet de la gravure humide.

Les gravures sèches sont la résultante de phénomènes physico-chimique dus à l'exposition de plasma sur la surface des substrats. En effet, ces gravures peuvent être de l'ordre physique avec l'arrachement d'atomes suite au bombardement de la surface d'un substrat par un plasma, ou de l'ordre chimique où les ions à l'origine du plasma vont réagir avec la surface. Les gravures sèches sont réalisées dans des bâti de RIE (pour Reactive Ion Etching, ou Gravure à Ions Réactifs), où un plasma est généré sous l'effet de radiofréquence. Comme pour la gravure humide, la gravure sèche peut être anisotropique ou isotropique.

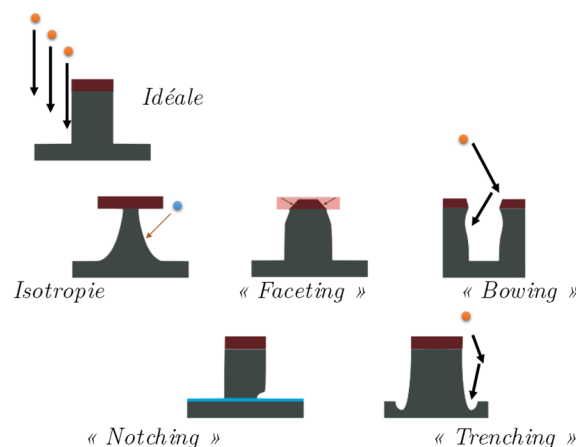


Figure D-23, Effets de la gravure sèche.

Afin de graver la couche d'or et la couche de titane, l'utilisation de bain chimique a été

préconisé. Ainsi, l'or a été gravé par un bain de KI/I₂ et le titane par une solution de TFT HF.

Une fois les gravures effectuées, un bain dans un solvant spécifique est effectué pour supprimer la couche de résine restée sur la surface du substrat. Un rinçage final, couplé d'un séchage à l'azote finalisera la fabrication de l'électrode.

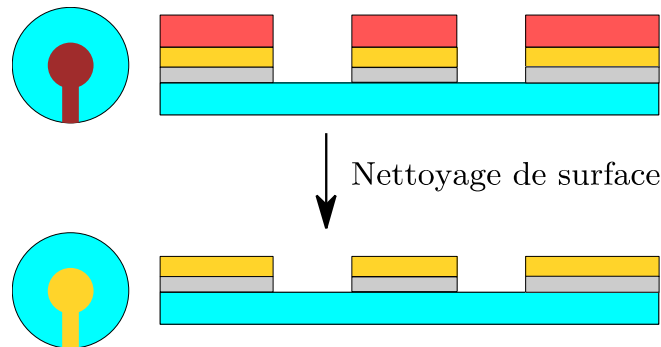


Figure D-24, Gravure des couches métalliques et nettoyage de surface.

D.1.2.5 Création de la face antérieure

Une fois la première face réalisée, le travail de fabrication consiste à la réalisation de la seconde face, qui comprend l'électrode située sur l'autre face du substrat ainsi que le retour de piste sur la tranche du substrat. Cependant, une étape intermédiaire d'enduction est nécessaire pour la protection de la première face réalisée. L'objectif de cette enduction est d'éviter l'altération de l'électrode fabriquée précédemment lors des phases de fabrication de la seconde électrode. Pour cela, une couche de 2 μm de résine est déposée par spin coating, qui est ensuite cuite pendant 1min à 110°C. A l'issue de cette étape, la présence de résidus de résine sur la face arrière et sur la tranche du substrat peut être observée. Un nettoyage au solvant est donc nécessaire et est effectué en veillant à la conservation de l'intégrité de la couche de résine déposée. Le substrat est ensuite métallisé par pulvérisation cathodique, avec la création d'une couche de titane de 30nm d'épaisseur, et une couche de 200 nm d'or. Une mise en rotation du porte échantillon est effectuée afin de métalliser la tranche du substrat. A terme, la métallisation de la tranche du substrat permettra la création du retour de piste entre les deux faces du substrat, et autorisera la prise de contact sur la même face.

Le substrat est ensuite enduit de résine photosensible et cuit sur une plaque chauffante, puis est exposé à un rayonnement UV afin d'insoler la résine en fonction du design de l'électrode. La résine insolée est ensuite développée, afin de révéler le motif, permettant ainsi la gravure des couches d'or et de titane. Une fois le processus de gravure terminé, la surface est nettoyée par un solvant. La Figure D-25 illustre le protocole expérimental pour la fabrication de la seconde électrode.

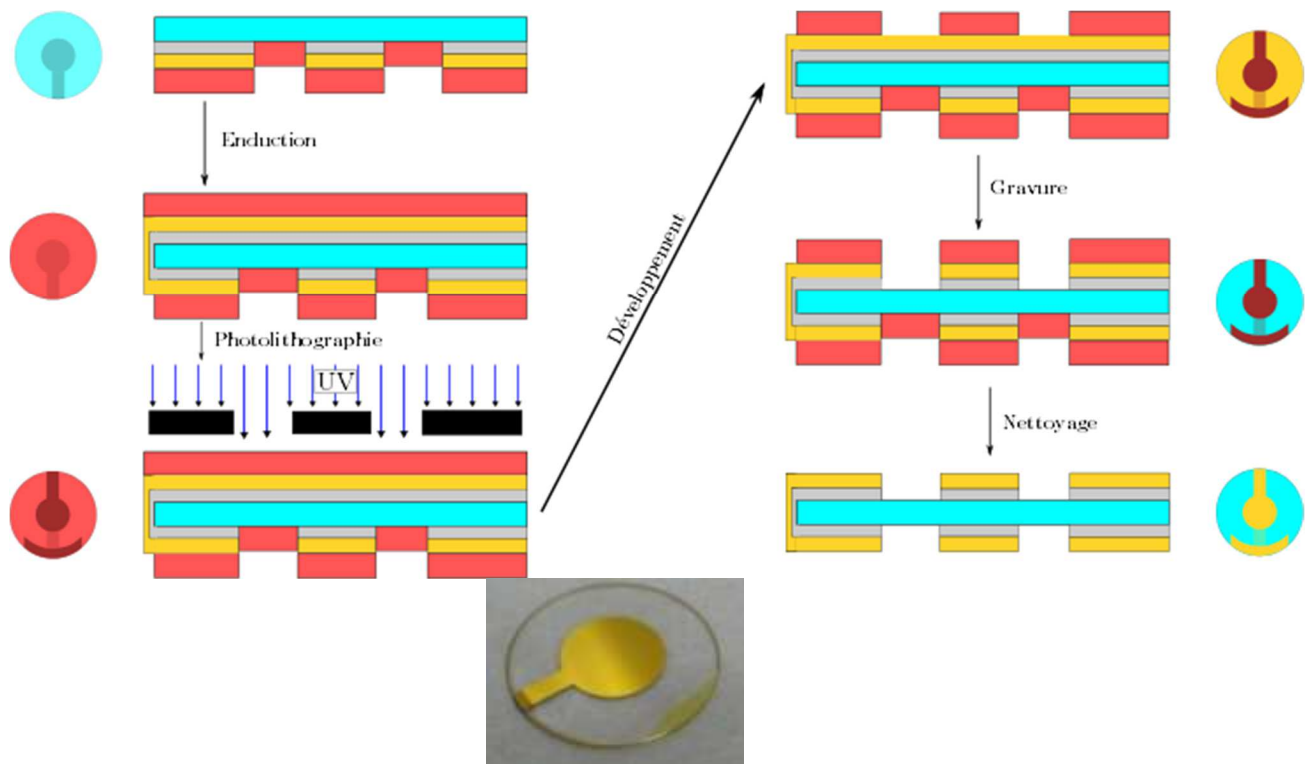


Figure D-25, En haut, protocole de fabrication de l'électrode antérieure, et du retour de piste. En bas, capteur final obtenu.

Publications scientifiques

- 1) P. Didier *et al.*, “Improvement of the electromechanical properties of a thickness shear mode resonator by shape optimization”, in review in *Electronics Letters*.
- 2) A. Dalla Monta, P. Didier, *et al.*, “Validation of a compact and low-cost network analyzer as a read-out instrument for Quartz Crystal Microbalance applications”, in review in *Electronics Letters*.
- 3) I. Mazérie, P. Didier, *et al.*, “Sampled-Current Voltammetry on Electrode Array: a General and Facile Method to Minimize Electrode Fouling”, in review in *Analytical Chemistry*.
- 4) P. Didier *et al.*, "Rheological monitoring of tau protein polymerisation with acoustic waves sensor," in *Electronics Letters*, vol. 53, no. 5, pp. 298-300, 3 2 2017. doi: 10.1049/el.2016.3400.
- 5) T. Rey, J.-B. Le Cam, G. Chagnon, D. Favier, M. Rebouah, F. Razan, E. Robin, P. Didier, L. Heller, S. Faure, K. Janouchova, “An original architected NiTi silicone rubber structure for biomedical applications”, *Materials Science and Engineering: C*, Volume 45, 1 December 2014, Pages 184-190, ISSN 0928-4931, <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2014.08.062>.
- 6) Faure SP, Mercier L, Didier P, *et al.*, “Laser Sintering Process Analysis: Application to Chromium-Cobalt Alloys for Dental Prosthesis Production”. *ASME*. ():9-15. doi:10.1115/ESDA2012-82108.

Conférences avec actes

- 2016 - Conférence internationale "26th Anniversary World Congress on Biosensors", Göteborg.
 - 7^{ème} Colloque Interdisciplinaire en Instrumentation, Saint-Nazaire.
- 2015 - Journées d'Acoustique Physique Sous-Marine et Ultra Sonore, Blois.
 - Journées Nationales du Réseau Doctoral en Micro-nanoélectronique, Bordeaux.
- 2013 - 17^{èmes} Journées d'Etude sur l'Adhésion, Aussois.

Colloques et séminaires

- 2017 - Journée d'interactions de l'Institut D'Alembert, Cachan.
- 2016 - Séminaire du laboratoire SATIE, Chatillon sur Cluses.
- 2015 - Journée des doctorants du laboratoire SATIE, ENS Rennes.
 - Séminaire du laboratoire SATIE, Chatillon sur Cluses
 - Séminaire mécatronique ENS Rennes, Rennes.
- 2014 - Journée des doctorants du laboratoire SATIE, Université Cergy Pontoise.

Contributions et faits marquants

- Optimisation du procédé de microfabrication.
- Développement d'un capteur à ondes acoustiques multiélectrodes.
- Mise en route du banc de pulvérisation cathodique de l'ENS Rennes.
- Mise en place d'un banc expérimental de mesure des angles de contact et des tensions de surface.
- Prise en main et maintenance des machines usuelles à l'environnement de salle blanche.

Titre : Développement d'un capteur à ondes acoustiques pour le suivi rhéologique de la polymérisation de protéines. Application à la maladie d'Alzheimer.

Mots clés : Microcapteurs, Paramètres viscoélastiques, Ondes acoustiques, Polymérisation de protéines, Quartz, TSM.

Résumé : La mise au point de nouveaux systèmes biocompatibles de suivi des phénomènes de polymérisation de protéines est un enjeu majeur pour la compréhension des mécanismes moléculaires en vue d'une détection et d'un traitement précoce des pathologies dites conformationnelles telles que la maladie d'Alzheimer ou les maladies à prions. Dans ces pathologies, des protéines ou des fragments de celles-ci perdent leur structure, puis s'assemblent en fibres ordonnées au sein d'agrégats. Les mécanismes moléculaires du changement de conformation d'une protéine et sa polymérisation en fibres amyloïdes sont encore largement inconnus. La compréhension de ces mécanismes et le diagnostic sont étroitement liés à la disponibilité d'un concept analytique performant pour le suivi *ex vivo* de ces phénomènes.

Pour répondre à cette problématique, un microsystème a été mis au point pour la détection et le suivi de polymérisation de la protéine tau et du peptide A β , principaux biomarqueurs de la maladie d'Alzheimer.

Le microcapteur est basé sur la propagation d'ondes acoustiques hautes fréquences qui permettent d'extraire les propriétés rhéologiques du milieu cible.

En mesurant l'impédance complexe du biocapteur, un traitement du signal dédié permet l'extraction des paramètres viscoélastiques (module élastique et module visqueux).

L'étude et le développement de ce microsystème impliquent un savoir-faire pluridisciplinaire en instrumentation : élaboration et conception et modélisation de biocapteurs, conditionnement des signaux et résolution des problèmes inverses associés.

Tout d'abord, le capteur a été optimisé pour améliorer sa sensibilité et permettre le suivi de polymérisation. Un travail sur la faisabilité du système a montré la possibilité de discriminer des solutions de protéines de différentes concentrations. La finalité du système de détection étant la détection simultanée des différents biomarqueurs à l'origine de la maladie d'Alzheimer, un capteur multi-électrodes permettant la détection de ces différents analytes a été développé.

Title : Development of an acoustic waves sensor for rheological monitoring of proteins polymerization. Application to Alzheimer's disease.

Keywords : Microsensors, Viscoelastic parameters, Acoustics waves, Proteins polymerization, Quartz, TSM.

Abstract : The development of new biocompatible systems for monitoring protein polymerization processes is a key issue for understanding the molecular mechanisms of detection and for early treatment of so-called conformational diseases such as Alzheimer's disease or prion diseases. In these pathologies, proteins or fragments lose their structure and then assemble themselves into ordered fibers within aggregates. The molecular mechanisms of the conformational changes of a protein and its polymerization into amyloid fibers are still largely unknown. Understanding these mechanisms and diagnosis are closely related to the availability of an efficient analytical concept for the *ex vivo* monitoring of these phenomena.

To address this problem, a microsystem has been developed for the detection and monitoring of polymerization of tau and A β peptide, the main biomarkers of Alzheimer's disease. The microsensor is based on the propagation of acoustic high frequency waves that extract the rheological properties of the target environment.

By measuring complex impedance of the biosensor, a dedicated signal processing allows the extraction of viscoelastic parameters (viscosity and elasticity). The study and development of this microsystem involve multidisciplinary expertise in instrumentation: development and design and modeling of biosensors, signal conditioning and solving associated inverse problems.

First, the sensor has been optimized to improve its sensitivity and allow tracking of polymerization. Work on the feasibility of the system showed the ability to discriminate protein solutions of different concentrations. Since the purpose of the detection system is the simultaneous detection of different biomarkers responsible for Alzheimer's disease, a multi-electrode sensor for the detection of these different analytes has been developed. The optimization of the sensor, the microfabrication processes and chemical surface treatments are also developed in this work.