



HAL
open science

Nouvelles technologies intégrées d'adressage et de détection des interactions moléculaires pour application de biopuces en diagnostic moléculaire in vitro

Julie Foncy

► **To cite this version:**

Julie Foncy. Nouvelles technologies intégrées d'adressage et de détection des interactions moléculaires pour application de biopuces en diagnostic moléculaire in vitro. Biotechnologies. INSA de Toulouse, 2013. Français. NNT : 2013ISAT0043 . tel-02003471

HAL Id: tel-02003471

<https://theses.hal.science/tel-02003471>

Submitted on 1 Feb 2019

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

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



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse (INSA de Toulouse)

Présentée et soutenue par :

Julie Foncy

Le Jeudi 12 Décembre 2013

Titre :

Nouvelles technologies intégrées d'adressage et de détection pour la conception de biopuces dédiées au diagnostic moléculaire *in vitro*

Ecole doctorale et discipline ou spécialité :

ED SEVAB : Ingénieries microbienne et enzymatique

Unités de recherche :

Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés (LISBP)
UMR 5504 & UMR 792 CNRS-INRA et Institut des technologies avancées en sciences du vivant (ITAV) USR3505 CNRS

Directeur (s) de Thèse :

M. Jean Marie François (Directeur de thèse)

M. Michel Corbarieu (Co-directeur de thèse)

Rapporteurs :

Mme. Eliane Souteyrand

M. Yves Lemoine

Autre (s) membre (s) du jury :

M. Christophe Vieu (Président)

M. Jean-Christophe Cau (Examinateur)

M. Guy Voirin (Examinateur)

Mme Marjorie Séverac-Tailhades (Invitée)

Mme Emmanuelle Trévisiol (Invitée)

M. Childéric Séverac (Invité)

« Cela semble toujours impossible, jusqu'à ce qu'on le fasse »

Nelson Mandela (1918-2013)

A mes proches,

Remerciements

Je souhaiterais remercier en tout premier lieu mon directeur de thèse, le professeur Jean Marie François, pour m'avoir permis de vivre cette très belle aventure scientifique et humaine. Je le remercie pour son encadrement et la confiance qu'il m'a témoignée tout au long de l'avancement de mes travaux. Il m'a fait découvrir la force de l'interdisciplinarité et le grand intérêt des collaborations industrielles dans le monde de la recherche sans occulter les problèmes qui peuvent y être associés. Je lui en serai toujours reconnaissante.

J'aimerais maintenant remercier la société Dendris et plus particulièrement son Président, M. Corbarieu ainsi que les membres du COS sans qui cette thèse Cifre n'aurait pu avoir lieu. Avoir pu évoluer en immersion totale dans la jeune société a été très formateur. Merci également à Marjorie Séverac-Tailhades de m'avoir fait découvrir la vie d'une société et donner l'opportunité d'y participer activement.

Je tiens tout particulièrement à remercier Emmanuelle Trévisiol et Childérick Séverac qui ont participé à mon encadrement (et bien plus...). Ils ont toujours été présents pour m'encourager, me soutenir et m'épauler tout en cherchant à me rendre meilleure. Je suis très heureuse que nos chemins se soient croisés. Merci pour vos conseils avisés, votre bienveillance et votre sincérité. Bien plus que des encadrants vous êtes devenus de vrais amis. Je vous souhaite le meilleur pour la suite.

Les cinq personnes que je viens de remercier précédemment peuvent être fières du travail interdisciplinaire que nous avons accompli ensemble. Je me suis découverte, j'ai beaucoup appris et grandi. J'en garderai un souvenir impérissable et je vous en suis très reconnaissante.

Je remercie Véronique Anton Leberre et Bernard Ducommun respectivement directrice de la Plateforme Biopuce du LISBP et directeur de l'Institut des Technologies Avancées en sciences du Vivant pour leur accueil et pour les très bonnes conditions de travail qu'ils m'ont offertes.

Un grand merci à mes proches collaborateurs qui ont chacun avec leurs compétences contribué à l'aboutissement de ce projet de thèse.

Amandine E, le duo gagnant *dixit* JMF, une belle rencontre professionnelle mais aussi et surtout personnelle. Depuis mon stage de fin d'étude jusqu'à la soutenance de ma thèse tu as toujours été présente pour me soutenir. C'est toi qui m'as transmis le sujet ainsi que ton expérience de la thèse! Je n'oublierai jamais nos grandes discussions philosophiques (ou pas) sur les sciences, la vie, les relations humaines... Merci pour tout. Je te souhaite le meilleur.

Julie Fre, Freu Freu pour les intimes! On se connaît depuis les bancs de la Fac et la salle G0... Merci pour ton aide et ton soutien pendant la thèse, ce fut un plaisir de travailler en étroite collaboration avec toi. On restera à jamais les Julies de Chilou !

Merci à Alice S, et Anne Laure B mes voisines de bureau qui m'ont soutenues, aidé et supporté au quotidien pendant ces 3 années.

Lidwine T, merci Lili pour ton soutien et ta franchise depuis mon premier jour à la plateforme. Ce fut un plaisir de bosser avec toi ! Les afterworks n'étaient pas mal non plus, le Hoeg s'en souvient encore !

Sophie L, tu m'as fait découvrir la « puissance » des statistiques. Je te remercie pour ton aide en toutes circonstances ! Vive les boîtes à moustache !

Jean Christophe C, merci pour notre collaboration très enrichissante et nos discussions très constructives au cours desquelles j'ai beaucoup appris.

Merci également à Carlos B, Juliette F, Marie Ange T, Jacques R, Jean Luc P, Etienne D, Marie Laure B pour leur aide et leurs contributions.

Merci à Nathalie M, Delphine L, Adeline J, Carine V, Vincent P, Laurène A, Christel C, Camille L, Morgane F. Valérie R et tous les autres pour les bons moments passés au boulot et en dehors.

J'aimerais maintenant remercier mes amis, Périgourdins et Toulousains qui m'ont toujours soutenue. Je commencerai par ceux qui m'ont vue grandir, mes amis de toujours Aurel, Dédé et Olive. Merci pour vos conseils avisés, vos encouragements et votre bienveillance depuis toutes ces années. Merci à mes amis du basket d'Eyzerac et d'ailleurs pour tous les bons moments passés ensemble Stef, Sandrine, Fat et David, Mymy, Kobi et Lulu, Manu, Caro, Aurore, Vivi, Galou et Kevin, Jo, Julie L, Valé, Rara, Luis, Amandine L, Yo, Remy (GM), Matthieu et tous ceux que j'aurais pu oublier...

Je voudrais ensuite remercier du fond du cœur Samuel pour son soutien et son amour au quotidien. Un GRAND MERCI pour ton aide et tes encouragements en toutes circonstances.

Enfin pour clôturer ces remerciements, je souhaiterais remercier du plus profond de mon cœur toute ma famille et en particulier mes parents et mon frère qui ont toujours été là pour m'aider, me soutenir et me pousser à devenir meilleure. Merci de m'avoir transmis vos valeurs sur le travail, la persévérance et l'abnégation qui m'ont été très utiles durant ces trois années de thèse.

Sommaire

INTRODUCTION	1
---------------------------	----------

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	3
---	----------

A. De la structure de l'ADN aux biopuces	5
B. Les étapes indispensables de la fabrication d'une biopuce à ADN.....	7
B.1. Sélection des oligonucléotides sondes.....	8
B.1.a. Spécificité de la séquence	9
B.1.b. Température de fusion.....	9
B.1.c. La composition en bases de la séquence.....	11
B.1.d. Les structures secondaires	11
B.2. Choix du support	11
B.2.a. Les supports à deux dimensions.....	12
B.2.b. Les supports à trois dimensions	13
B.3. Adressage et immobilisation des molécules sondes.....	14
B.3.a. Synthèse in situ d'oligonucléotides	14
B.3.b. Adressage et immobilisation d'oligonucléotides sondes	17
B.4. Hybridation des acides nucléiques cibles.....	33
B.4.a. Conditions d'hybridation.....	34
B.4.b. Lavage de la biopuce après hybridation	36
B.5. Méthode de lecture	36
B.5.a. Les méthodes de détection avec marquage.....	37
B.5.b. Les méthodes de détection sans marquage	39
C. Les principales applications des biopuces à ADN	48
C.1. Etudes du transcriptome.....	48
C.2. L'étude des réarrangements génomiques : CGH-array	48
C.3. La détection des SNP	49
C.4. La méthode du « ChIP-on-Chip ».....	49
D. Comment rendre la technologie des biopuces à ADN accessible au diagnostic <i>in vitro</i> ?.....	49
D.1. Etat de l'art sur le diagnostic in vitro	49
D.2. Les contraintes et attentes du marché du DIV	51
D.3. Les biopuces commercialisées par domaines	52
D.4. Verrous technologiques de la technologie biopuce à ADN pour le diagnostic in vitro	54
E. Positionnement des travaux de thèse	57
E.1. La chimie des dendrimères pour la conception de biopuces à ADN	57
E.2. La technologie du microcontact printing pour l'adressage des biomolécules sondes.....	59
E.3. Intégration du procédé d'adressage des molécules sondes pour la détection par diffraction.....	62

CHAPITRE 1 : NOUVEAUX PROCEDES DE LITHOGRAPHIE DOUCE POUR LA STRUCTURATION DE SURFACE	67
--	-----------

A. Nouvelle technique de structuration de surface par des dendrimères pour l'augmentation des signaux de fluorescence	69
A.1. Le procédé de structuration de surface par « confinement ».....	69
A.1.a. Description du procédé	69
A.1.b. Exemple de motifs micrométriques de dendrimères obtenus par confinement	72

A.1.c.	Quels sont les principes mis en jeu dans le procédé de « confinement » ?	73
A.2.	Un procédé de fonctionnalisation de surface pour l'augmentation des signaux de l'hybridation	81
B.	Le « tout en un » pour la simplification du procédé de fonctionnalisation et l'augmentation des signaux de fluorescence	83
B.1.	Description du procédé du « tout en un »	84
B.2.	Un procédé compatible avec la production de biopuces à ADN	87
C.	Conclusion	89

CHAPITRE 2 : DEVELOPPEMENT D'UN AUTOMATE DE MICROCONTACT PRINTING POUR LA CONCEPTION DE BIOPUCES A ADN 91

A.	Adressage de biomolécules par μ CP avec l'Innostamp 40	93
A.1.	Différences entre le μ CP manuel et le μ CP avec l'Innostamp 40	93
A.2.	Analyse des conditions d'encrage et de dépôt d'oligonucléotides sondes sur dendrilames	95
A.2.a.	Quelle est la force de contact optimale entre le macrotimbre et la lame ?	95
A.2.b.	Etude de la contamination croisée	98
A.2.c.	Lavage du macrotimbre	99
A.2.d.	Durée de vie du macrotimbre	102
A.2.e.	Reproductibilité du dépôt pour un même macrotimbre	103
A.2.f.	Reproductibilité entre les macrotimbres	105
A.2.g.	Bilan des conditions idéales pour le dépôt d'oligonucléotides	105
A.3.	Améliorations du procédé de dépôt par macrotimbre	106
A.3.a.	L'encrage dynamique du PDMS	106
A.3.b.	La maîtrise du contact: un point clé!	110
B.	Comparaison de l'Innostamp 40 au robot à aiguilles pour la production de biopuces à ADN	112
C.	Conclusion	116

CHAPITRE 3 : NANOSTRUCTURATION DE RESEAUX MOLECULAIRES DIFFRACTANTS EN VUE D'UNE BIODETECTION SANS MARQUAGE 119

A.	Réalisation de moules nanostructurés de réseaux diffractants	121
A.1.	Enduction du silicium, lithographie et développement	122
A.2.	Gravure et délaquage	123
A.3.	Traitement anti-adhésif	123
A.4.	Duplication de moules nanostructurés	124
A.4.a.	Comparaison des moules répliqués avec le moule mère en silicium :	125
B.	Nanostructuration par microcontact printing	130
B.1.	Lecture au scanner de diffraction des réseaux moléculaires	134
B.2.	Robustesse des réseaux moléculaires aux étapes de l'hybridation	136
C.	Nanostructuration de réseaux diffractants de dendrimères	137
C.1.	Fabrication des réseaux de lignes de dendrimères par microtransfert molding	137
C.2.	Fabrication des réseaux de lignes de dendrimères par le procédé de « confinement »	139
C.3.	Adressage des oligonucléotides sondes sur les lignes des réseaux de dendrimères	143
D.	Le procédé « tout en un » pour la fabrication de réseaux diffractants de lignes fonctionnalisées avec des oligonucléotides	146
E.	Fabrication multiplexée des réseaux de lignes de dendrimères fonctionnalisées	149
F.	Conclusion	152

CHAPITRE 4 : INTEGRATION DES TECHNIQUES D'ADRESSAGE ET DE STRUCTURATION DE SURFACE POUR LA BIODETECTION SANS MARQUAGE.....155

A.	Principe de la biodétection sans marquage basé sur la diffraction optique de réseaux moléculaires.	158
A.1.	Résultats des simulations théoriques de l'impact d'une hybridation sur le signal de diffraction d'un réseau.....	159
B.	Simulation de réponse d'une hybridation se rapprochant de la réalité expérimentale et stratégie de validation de la détection.....	163
C.	Validation expérimentale des techniques de nanostructuration de surface pour la détection par diffrapuce.....	169
C.1.	Validation de la preuve de conception de biodétection par diffrapuce :	170
C.2.	Caractéristiques des réseaux après l'hybridation	177
C.3.	Effet de la concentration en sondes sur le gain en diffraction après hybridation	178
C.4.	Points clés pour la biodétection optique par diffrapuce.....	180
D.	Intégration des techniques de structuration de surface pour la biodétection d'une bactérie environnementale.....	183
D.1.	Le modèle de détection de bactéries environnementales: DendrisChipLégio © :	183
D.2.	Transposition du modèle de biopuce à fluorescence en diffrapuce	184
D.3.	Adaptation du protocole expérimental à la détection par diffrapuce de Legionella pneumophila	190
E.	Conclusion.....	193

CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES197

MATERIEL ET METHODES.....201

A.	Le matériel	203
A.1.	Produits et Solvants :.....	203
A.2.	Supports	203
A.3.	Matériel biologique.....	204
B.	Méthodes de fonctionnalisation de surface	204
B.1.	Fabrication d'un timbre en PDMS	204
B.2.	Fonctionnalisation de lames de verre par des amines en utilisant un aminosilane (APTES 5%)	205
B.3.	Fonctionnalisation de lames de verre par des dendrimères par « confinement »	205
B.4.	Méthodes de co-fonctionnalisation de surface (le « tout en un »).....	205
B.5.	Dépôt par microcontact printing manuel.....	206
B.6.	Dépôt par microcontact printing avec le robot GeSiM μ -CP 3.0.....	206
B.7.	Dépôt par microcontact printing avec le robot Innostamp 40.....	208
B.7.a.	Lavage du macrotimbre	209
B.8.	Encrage dynamique d'un timbre en PDMS	209
B.9.	Dépôt d'oligonucléotides par le robot à aiguilles.....	210
B.10.	Réduction des fonctions imines après le dépôt d'oligonucléotides.....	210
C.	Méthodes de biologie moléculaire et hybridation des biopuces	211
C.1.	Réaction en chaîne par polymérase (PCR) des fragments de gène mip et rpoB sur Legionella Pneumophila.....	211
C.2.	Protocoles d'hybridation des biopuces	211
C.2.a.	Protocoles d'hybridation des sondes et cibles synthétiques issues du gène HSP12.....	211
C.2.b.	Protocoles d'hybridation des sondes et cibles de Legionella pneumophila.....	211
D.	Méthode d'observation.....	211
D.1.	Scanner de fluorescence : Innoscan 700 ou 900 (Innosys)	211

D.2.	Scanner de diffraction : Diffrascan (Innopsys)	212
D.3.	Microscope en champ sombre.....	213
D.4.	Microscope à fluorescence	213
D.5.	Microscope à force atomique	213
D.6.	Microscope électronique à balayage	213
E.	Méthodes de traitement et représentation graphique des données.....	214
E.1.	Représentation graphique des données	214
E.2.	Tests statistiques	214
ANNEXE 1 : LA DIFFRACTION DE LA LUMIERE.....		217
A.	Diffraction de la lumière par 1 fente	217
B.	Diffraction de la lumière par N fentes	218
ANNEXE 2 : LE DIFFRASCAN		221
A.	L'outil de lecture de la diffraction : Le diffraScan	221
A.1.	Description générale du scanner.....	221
A.2.	Les caractéristiques et spécifications du scanner	223
ANNEXE 3 : DEPLACEMENT DES AIMANTS DE L'INNOSTAMP 40		225
RESUME.....		227

Liste des abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADNc : Acide DésoxyriboNucléique complémentaire

AFM : Microscopie à force atomique (Atomic Force Microscopy)

ARN : Acide RiboNucléique

DIV : Diagnostic *in vitro*

LAAS : Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes

LIFT : « Laser Induced Forward Transfer »

MEB : Microscope Electronique à Balayage

NIL: Nano Imprint Lithography

OTS : OctadécylTrichloroSilane

PCR: Polymerase Chain Reaction

PDMS: Polydiméthylsiloxane

RIE : Gravure par faisceau d'ions (Reactive Ion Etching)

SDS : Sodium Dodécyl Sulfate

SNP : Polymorphisme d'un seul nucléotide (Single Nucleotide Polymorphism)

SPM : « Scanning Probe Microscopy »

SPR : Résonance plasmonique de surface (Surface Plasmon Resonance)

SPRi : Imagerie par SPR

SSC : Saline Sodium Citrate

THF : TétraHydroFurane

T_m : Température de fusion

UV : Rayonnement ultraviolet

μCP: Microcontact Printing

Introduction

Le diagnostic médical est défini selon Emile Littré comme « l'art de reconnaître les maladies par leurs symptômes et de les distinguer les unes des autres ». Il est fondamentalement élaboré par un médecin selon au moins deux phases. D'une part à partir de l'amnèse (ou histoire de la maladie) qui, permet de connaître les antécédents du patient, les symptômes ressentis, l'ancienneté de la maladie et son évolution, d'autre part, le médecin pratique l'examen physique qui sert quant à lui à rechercher des signes physiques liés à la maladie et ainsi apporter des preuves pour confirmer un diagnostic. Néanmoins, le diagnostic seul du médecin n'est pas toujours suffisant, il peut être complété par des examens complémentaires. Deux types de diagnostic peuvent ainsi être distingués, à savoir le diagnostic *in vivo*, réalisé sur le patient directement comme l'imagerie médicale et le diagnostic *in vitro* (DIV), réalisé à partir d'un échantillon de fluide corporel (sang, urine, salive...) ou tissus. L'avènement du diagnostic *in vitro* et plus particulièrement de la biochimie et biologie moléculaire a modifié progressivement mais radicalement la conception du diagnostic en médecine. Aujourd'hui, 60 à 70 % des décisions médicales font intervenir le résultat d'un test de diagnostic *in vitro*¹.

Dans l'exemple du diagnostic dédié à l'identification d'agents pathogènes, les méthodes de détection sont très variées et différentes selon la nature de la « biomolécule » à identifier. La microbiologie permet un diagnostic « phénotypique » de microorganismes cultivables. Cette technique est la plus utilisée aujourd'hui par sa facilité d'utilisation et son faible coût de revient. Néanmoins, elle ne permet pas d'identifier les organismes non cultivables et le délai d'obtention du diagnostic est long (compris en 24 h et 72 h). D'autres méthodes de diagnostic sont basées sur les interactions entre un anticorps et une protéine comme la méthode ELISA ainsi que l'ensemble des tests de sérologie. Les délais d'obtention des résultats sont là aussi en général de 24 heures à 48 heures. Depuis l'avènement de la biologie moléculaire et tout particulièrement de la PCR (« Polymerase Chain Reaction ») en 1985, le diagnostic « génotypique » est en plein essor. En effet, les tests PCR permettent une détection en un peu plus de 24 h après une phase d'enrichissement. Malgré l'avantage réel en termes de rapidité, cette technique est encore trop peu utilisée en routine car elle nécessite un aménagement minimum des locaux et son coût reste élevé. De plus, elle ne cible qu'un seul pathogène à la fois. Ces limites poussent à la multiplication des analyses par échantillons conduisant à l'augmentation des coûts et du temps pour l'obtention d'un diagnostic.

La technologie des biopuces à ADN permettant d'identifier un ensemble de pathogènes simultanément et en une seule analyse dispose d'un atout considérable. En effet, cet outil permet l'analyse simultanée de plusieurs dizaines voire centaines de séquences nucléiques conduisant ainsi à l'identification d'autant d'organismes en une seule analyse. Elle permet de donner une réponse globale de la multiplicité des espèces présentes dans l'échantillon sans avoir besoin de réaliser obligatoirement une étape de culture. Initialement

¹ Source : Le syndicat de l'industrie du diagnostic *in vitro*, www.sidiv.fr

développée pour des travaux académiques, cette technologie n'est qu'au début de son avènement dans le domaine du diagnostic *in vitro*. Pour répondre aux critères socio-économiques du marché du DIV, elle doit devenir accessible aux laboratoires d'analyses médicales en étant simplifiée, robuste, rapide et peu onéreuse. Il est donc nécessaire de développer des méthodes alternatives de production. Pour cela, nous avons choisi de traiter deux points clés de la fabrication des biopuces à ADN :

1. La fonctionnalisation de surface et l'adressage d'oligonucléotides ;
2. La méthode de détection de l'hybridation.

L'objectif de cette thèse Cifre réalisée avec la société DENDRIS est, dans un premier temps, de mettre au point un prototype nouveau de dépôt de biomolécules basé sur la lithographie douce afin de déposer les oligonucléotides sondes de façon multiplexée et selon des motifs micrométriques. Cette nouvelle technologie sera évaluée par rapport aux technologies de référence de fabrication des biopuces. La seconde partie de la thèse consiste à coupler cette nouvelle technologie pour la détection des événements d'hybridation sans marquage en utilisant la diffraction de la lumière. La principale différence avec la méthode de détection par fluorescence repose sur l'adressage des sondes. En effet, le dépôt doit être réalisé sous forme de réseaux de lignes nanométriques de façon à ce que ces motifs formés de molécules sondes diffractent un faisceau de lumière incident.

Ainsi, nous présenterons, dans une première partie, la technologie des biopuces à ADN ainsi que les méthodes de conception et de détection existantes. Puis, nous décrirons le contexte dans lequel s'inscrit ce travail de thèse avant de présenter les résultats au travers de quatre chapitres.

Cette thèse a été le fruit d'une collaboration interdisciplinaire avec des spécialistes de domaines aussi variés que la biologie moléculaire, la chimie, la physique, la microfabrication, la bioinformatique et les statistiques. Ces travaux impliquent, d'une part, les partenaires académiques du LAAS-CNRS pour la partie physique (équipe NBS du professeur C. Vieu), du LISBP-UMR CNRS (équipe GeT-biopuce de Véronique Le Berre) et de l'ITAV-USR CNRS (équipe Innodiag du Professeur JM François) pour les aspects biologiques et de bioingénierie et d'autre part des industriels, la société Dendris (jeune start-up fondée en juin 2009) et la société Innopsys.

Introduction bibliographique



A. De la structure de l'ADN aux biopuces

L'acide désoxyribonucléique (ADN) est une molécule formée par la répétition de sous unités appelées nucléotides assemblés entre eux par des liaisons phosphodiesters. Chaque nucléotide est composé d'un groupement phosphate, d'un sucre, le désoxyribose, et de l'une des quatre bases azotées : Adénine (A), Guanine (G), Thymine (T) et Cytosine (C) (Figure 1a). Les deux brins de la double hélice sont antiparallèles et complémentaires par leur base azotée, la Guanine avec la Cytosine par 3 liaisons hydrogènes (Figure 1b) et l'Adénine se liant à la Thymine par 2 liaisons hydrogènes (Figure 1c). Sur ce principe et dans certaines conditions (température, concentration en sels...) deux oligonucléotides simple brin en solution dont les séquences sont complémentaires s'apparient entre eux pour reformer un double brin d'ADN. Ce phénomène appelé l'hybridation est le principe sur lequel repose les biopuces à ADN.

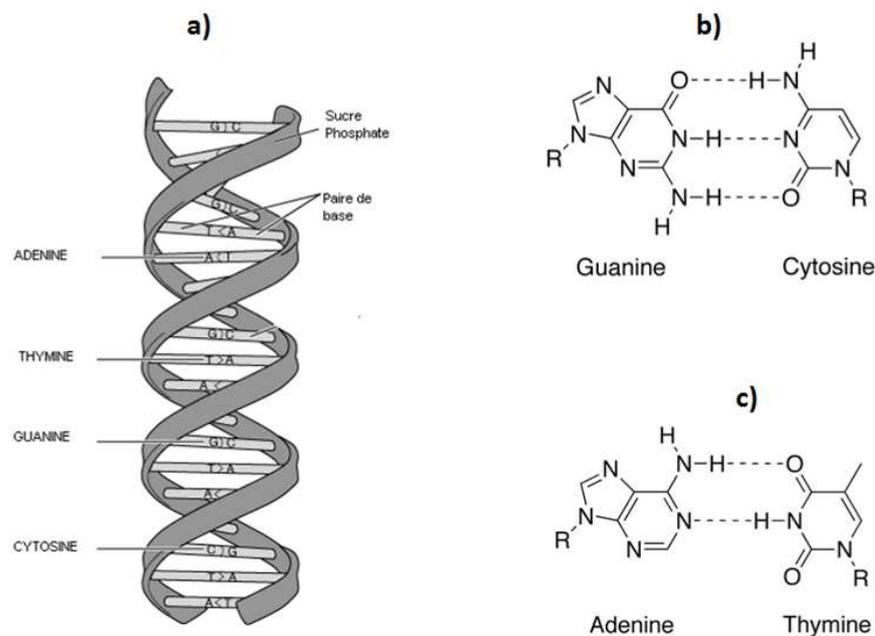


Figure 1 : Schéma représentant a) la structure de l'ADN en double hélice, b) l'interaction par trois liaisons hydrogènes de la guanine avec la cytosine, c) l'interaction par deux liaisons hydrogènes de l'adénine avec la thymine.

La biopuce à ADN est constituée d'un support solide, généralement une lame de verre fonctionnalisée avec des molécules qui serviront d'accroche. Sur cette lame, sont déposés plusieurs centaines voire milliers de « spots » d'oligonucléotides simple brin. Chaque « spot » est constitué d'un ensemble d'oligonucléotides dont la séquence est connue. Ces oligonucléotides appelés « sondes » sont choisis pour leur capacité à s'hybrider avec les séquences d'acides nucléiques à détecter dans un échantillon appelées « cibles ». L'utilisation de la biopuce à ADN consiste à incuber sur la matrice de spots d'oligonucléotides sondes, les acides nucléiques extraits de l'échantillon à analyser préalablement amplifiés et marqués (généralement avec une molécule fluorescente). Pendant cette étape, si les séquences cibles d'intérêt sont présentes dans l'échantillon, elles vont s'hybrider sur les séquences sondes

immobilisées sur la biopuce. La détection de l'hybridation est ensuite réalisée grâce à la lecture de la fluorescence émise par chacun des spots (Figure 2).

La présence de fluorescence sur un spot valide l'hybridation et donc l'identification des séquences cibles d'intérêts. Cet outil a pour avantage de détecter de multiples ADN cibles d'un échantillon en parallèle et en une seule analyse.

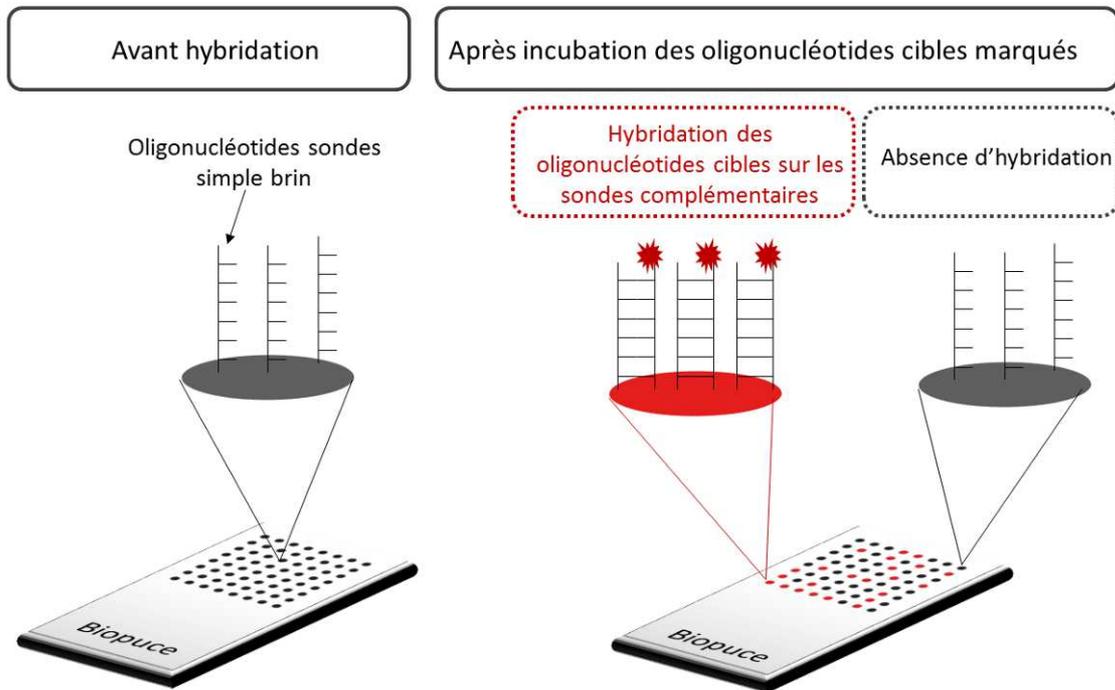


Figure 2 : Principe d'hybridation sur une biopuce à ADN.

Les premiers travaux de détection par hybridation ont été réalisés par Southern² avec ces travaux sur la détection spécifique de séquences oligonucléotides séparées par gel électrophorèse. Puis les biopuces à ADN appelées « cDNA microarray », ont été réalisés au début des années 1990 par Patrick Brown³ dans un laboratoire de Stanford. Cette biopuce a été réalisée par dépôt d'ADN complémentaires (ADNc) clonés sur une lame de microscope avec un robot. La lame a ensuite été incubée avec des ARNs marqués en fluorescence. L'étude de la fluorescence a permis de valider l'hybridation spécifique entre les ADNc déposés sur la lame et les ARN marqués de l'échantillon. Ces résultats ont mis en évidence le niveau d'expression des gènes correspondant à chaque ADNc. Le développement et la conception des biopuces à ADN ont été réalisés par la société Affymetrix. Leurs travaux ont permis de synthétiser à haute densité (plusieurs milliers) des oligonucléotides sondes sur une lame de verre.⁴ Ces travaux ont ensuite été validés par Lockhart *et al.*,⁵ pour mesurer l'expression de gènes à haute densité. Depuis cette période, l'activité scientifique sur le sujet a

² E.M. Southern, *Journal of Molecular Biology*, 1975, 98, 3, 503–508.

³ M. Schena, D. Shalon, R.W. Davis et P.O. Brown, *Science*, 1995, 270, 5235, 467-470.

⁴ A C Pease, D Solas, E J Sullivan, M T Cronin, C P Holmes, et S P Fodor, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994, 91(11): 5022–5026.

⁵ D.J. Lockhart, H. Dong, M.C. Byrne, M.T. Follettie, M.V. Gallo, M.S. Chee, M. Mittmann, C. Wang, M. Kobayashi, H. Norton et E. L. Brown, *Nature Biotechnology*, 1996, 14, 1675-1680.

augmenté de façon spectaculaire : à titre indicatif, la Figure 3 décrit l'évolution du nombre de publications référencées sur le site «PubMed » avec le mot-clé « microarray » entre 1995 et 2012. Depuis ces 6 dernières années, le référencement est stabilisé autour de 6 000 publications annuelles.

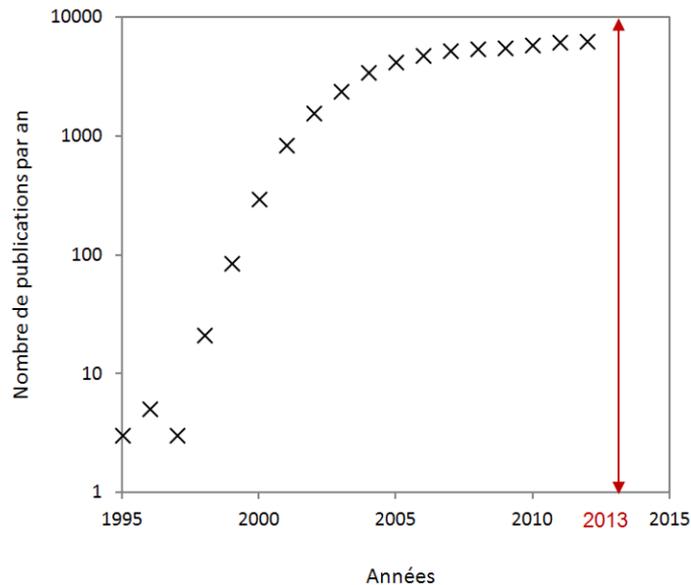


Figure 3 : Evolution du nombre de publications scientifiques référencées dans « PubMed » avec le mot clé « microarray » entre 1995 et 2012.

B. Les étapes indispensables de la fabrication d'une biopuce à ADN

La fabrication des biopuces à ADN est un travail multidisciplinaire.⁶ On distingue la conception sur le plan de la biologie moléculaire (sélection des sondes, préparation de l'échantillon...). Cette partie désigne l'application ciblée et la conception matérielle de l'outil. Cette dernière implique le choix du support, de la chimie de surface, ainsi que la méthode de production et l'adressage des oligonucléotides sondes et un système de détection de l'hybridation. L'ensemble de ces étapes décrites dans la Figure 4 permet de fabriquer l'outil qui sera utilisé par les biologistes.

⁶ J.-P. Cloarec, Y. Chevotot, E. Laurenceau, M. Phaner-Goutorbe, E. Souteyrand, IRBM, 2008, 29, 2-3, 105-127.

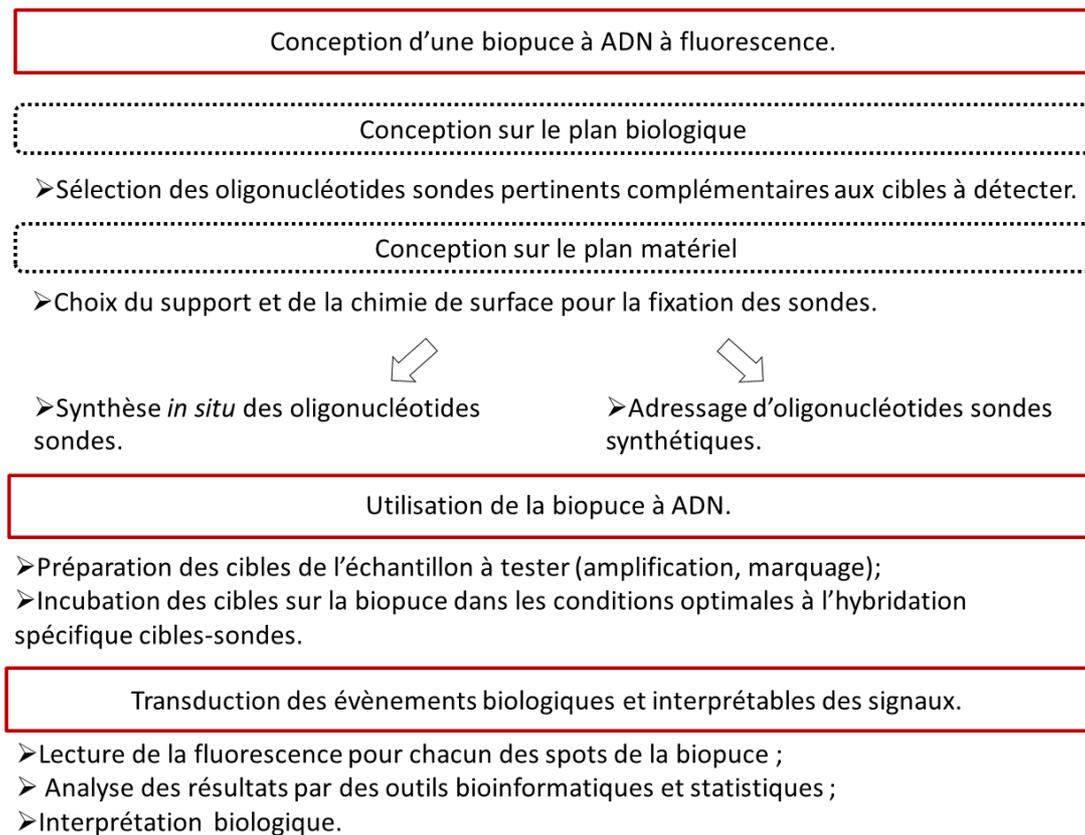


Figure 4 : Grandes étapes de conception d'une biopuce à ADN.

L'ensemble de ces points sera abordé dans cette introduction bibliographique.

B.1. Sélection des oligonucléotides sondes

La sélection des oligonucléotides sondes constitue le cœur de la biopuce. Cette étape cruciale a pour but de sélectionner les sondes reconnaissant spécifiquement les entités biologiques à identifier et dépend du type d'application souhaité. Les sondes peuvent être choisies pour reconnaître un gène, un transcrit ou une portion d'un transcrit d'un organisme. Ces séquences nucléiques sondes sont des oligonucléotides courts (quelques dizaines de nucléotides) simple brin, synthétisés chimiquement et dont la séquence est choisie précisément pour être complémentaire à une partie du gène ciblé. Il est nécessaire de connaître les séquences cibles pour déterminer les séquences des sondes.

La pertinence dans le choix des oligonucléotides sondes est un point décisif dans la conception d'une biopuce à ADN. Les principaux critères que doit satisfaire l'oligonucléotide sonde sont :

- La spécificité de la séquence ;
- La température de fusion ;
- La composition en bases de la séquence ;
- Les structures secondaires ;

- La position de l'appariement de l'oligonucléotide sonde dans la séquence cible. (préférentiellement dans la partie 5' de la cible).

B.1.a. Spécificité de la séquence

La spécificité de la séquence représente la complémentarité de la séquence de la sonde envers la séquence ciblée (Adénine complémentaire de Thymines et Cytosine complémentaire de Guanine). Cette complémentarité permet à la sonde de s'hybrider avec sa cible complémentaire dans un échantillon donné sans s'hybrider avec les autres séquences cibles contenues dans l'échantillon. S'il y a hybridation avec des cibles non complémentaires, on parle de « cross hybridation ».

En 2000 Kane et *al.*,⁷ ont défini deux conditions pour qu'une sonde soit spécifique. Les résultats sont issus d'une étude sur la spécificité d'oligonucléotides de 50 bases :

1. La séquence de l'oligonucléotide sonde ne doit pas présenter plus de 75% de similarités avec une séquence non ciblée présente dans le mélange de l'hybridation.
2. La séquence de l'oligonucléotide ne doit pas contenir une sous-séquence de plus de 15 bases consécutives strictement identiques à une séquence non ciblée présente dans le mélange de l'hybridation.

B.1.b. Température de fusion

Les liaisons hydrogènes entre les deux brins de la double hélice de l'ADN sont sensibles à la température. La température de fusion (Melting Temperature ou T_m en anglais) représente la température pour laquelle la moitié des oligonucléotides est sous forme simple brin et l'autre moitié sous forme double brin. Ce passage d'une forme à l'autre peut être visualisé en mesurant l'absorbance d'une solution d'ADN (absorbance, DO) à 260 nm en fonction de la température car l'absorbance à 260 nm augmente au cours du désappariement (Figure 5).

⁷ M.D. Kane, T.A. Jatkoe, C.R. Stumpf, J. Lu, J.D. Thomas et S.J. Madore, *Nucleic Acids Res.*, 2000, 28, 4552-4557.

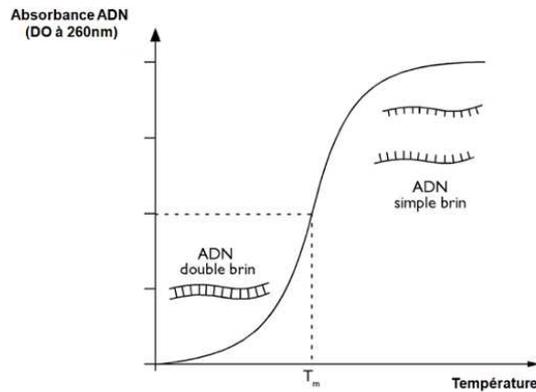


Figure 5 : Mise en évidence de la température de fusion T_m par l'étude de l'absorbance de l'ADN à 260nm en fonction de la température.

La température de fusion dépend de plusieurs facteurs :

- Longueur du fragment ;
- Composition en Cytosines et Guanines ;
- Concentration en ion Na^+ du milieu.

La formule la plus employée pour le calcul des T_m entre les sondes et leurs cibles est la suivante^{8,9} :

$$T_m = \frac{\Delta H}{\Delta S + R \ln(C_T / 4)} + F([Na^+]) - 273.15$$

Où :

ΔH : Enthalpie de formation de l'hélice d'ADN ;

ΔS : Entropie de formation de l'hélice d'ADN ;

R : Constante des gaz parfaits ;

C_T : Concentration de l'oligonucléotide ;

F : Terme de correction en fonction de la concentration en sels.

Dans le cas des biopuces à ADN, l'ensemble des réactions d'hybridation entre la multitude de sondes constituant la biopuce et leurs cibles complémentaires, se déroule en même temps et dans le même milieu réactionnel (même température, même concentration en Na^+). C'est pourquoi, tous les couples sondes-cibles doivent avoir une température de fusion proche pour s'assurer que toutes les réactions d'hybridation puissent avoir lieu de façon optimale dans les conditions fixes de l'hybridation. Parfois, tous les couples sondes-cibles ne

⁸ J.Jr. SantaLucia, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, 95, 1460-1465.

⁹ J.M. Rouillard, M. Zuker, et E. Gulari, Nucleic Acids Res., 2003, 31, 3057-3062.

peuvent pas avoir un T_m identique dans ces conditions, il est possible d'ajouter du formamide ou du dithiothreitol pour que l'hybridation ait lieu.¹⁰

B.1.c. La composition en bases de la séquence

Pour rappel, l'appariement Guanine-Cytosine (G-C) implique 3 liaisons hydrogènes contre 2 pour l'appariement Adénine-Thymine (A-T). La paire G-C possède donc une énergie de dissociation plus grande : 5.5 kcal/paire contre 3.5 kcal/paire pour l'appariement A-T. C'est pourquoi plus le pourcentage de paires G-C est élevé entre les sondes et leurs cibles, plus il faudra fournir d'énergie pour dissocier les deux brins. Il est recommandé de limiter les séquences dites de faible complexité comme les répétitions de motifs simples (TTTT..., AAA..., ...).¹¹ Ces régions auront une plus faible spécificité et plus de chances de favoriser les « cross hybridation ».

B.1.d. Les structures secondaires

Un fragment d'ADN (ou d'ARN) simple brin peut se replier sur lui-même et s'hybrider avec ses propres bases en fonction de sa séquence. On parle de structure secondaire d'une séquence nucléique.¹² Dans le cas des biopuces à ADN, il est préférable de limiter les sondes qui posséderaient une structure secondaire stable dans la condition d'hybridation de la biopuce. Dans le cas contraire, la sonde repliée perdrait la capacité de s'hybrider avec sa cible complémentaire.

En conclusion, la sélection des sondes répond à un ensemble de critères thermodynamiques précis. La spécificité des sondes est un point essentiel dans la conception d'une biopuce à ADN. L'identification spécifique des séquences cibles d'un échantillon sera liée en grande partie à leur spécificité. Il existe de nombreux outils informatiques disponibles sur internet comme ArrayOligoSelector¹³ ou ProbeSelect¹⁴ pour la sélection des sondes. Néanmoins, les outils bioinformatiques ne sont que prédictifs. Les sondes choisies doivent impérativement être confrontées à la réalité biologique de l'hybridation pour démontrer leur pertinence et spécificité.

B.2. Choix du support

Les biopuces à ADN sont constituées d'un support solide sur lequel sont immobilisées les sondes oligonucléotidiques. Le choix du support dépend principalement du mode de détection et de l'application visée. Pour des capteurs optiques, le verre et le silicium sont des substrats de choix largement utilisés. Dans le cas d'une détection par voie électrochimique ou bien par résonance plasmonique de surface, on préférera des surfaces recouvertes d'or. D'une

¹⁰ S. Russell, L. A. Meadows, R.R. Russell, *Microarray technology in Practice*, 2009, livre édité par Elsevier.

¹¹ J.M. Hancock, *Genetica*, 2002, 112, 93-103.

¹² M. Zucker, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2000,10, 303-310.

¹³ Z. Bozdech, J. Zhu, M.PJoachimiak, F.E. Cohen, B. Pulliam, J.L. DeRisi, *Genomz Biol*, 2003, 4, R9.

¹⁴ F. Li, G.D. Stormo, *Bioinformatics*, 2001, 17, 1067-1076.

manière générale, les critères pris en compte seront l'homogénéité chimique, la stabilité du support, les propriétés de surface (polarité, mouillabilité...), mais aussi l'étendue des chimies de surface connues, leur facilité de mise en œuvre et leur reproductibilité.

B.2.a. Les supports à deux dimensions

✓ Le verre

Le verre est une surface de référence pour l'immobilisation de biomolécules, en particulier les séquences d'ADN. Les avantages du verre sont nombreux. Ce matériau est inerte, peu onéreux, non polaire et mécaniquement stable. Il peut supporter de hautes températures et ses propriétés de surface restent stables en milieu aqueux.¹⁵ Sa transparence et sa faible fluorescence intrinsèque le rendent particulièrement attrayant pour le développement de capteurs optiques. De plus, un large panel de fonctionnalisation de surface est connu et maîtrisé pour ce matériau (cf partie B.3). Dans la littérature, le verre est aussi bien utilisé pour des synthèses *in situ* d'oligonucléotides sondes que pour des fixations d'oligonucléotides pré-synthétisés.

✓ Le silicium

Le silicium est très utilisé dans l'industrie des semi-conducteurs pour ses propriétés électriques mais aussi pour son excellente résistance aux solvants et sa bonne stabilité mécanique. Sa faible fluorescence intrinsèque est également un atout pour la fabrication de biopuces à détection optique.¹⁶ Les différentes voies d'activation du silicium comme le plasma oxygène permettent de créer des fonctions Si-OH ouvrant la voie aux fonctionnalisations décrites pour le verre.

✓ Les polymères

Le développement de la microfluidique et des systèmes miniaturisés a généré un engouement pour de nouveaux matériaux comme les supports plastiques et les polymères. Par exemple dans le domaine biomédical,¹⁷ les polymères et notamment les matériaux thermoplastiques sont très utilisés pour la fabrication de microsystèmes. Simple d'utilisation, ils sont adaptés à la production à bas coût. Les techniques issues de l'industrie des polymères (moulage par injection) ou bien de l'industrie des semi-conducteurs (lithographie, gravure) ont ainsi été adaptées aux systèmes miniaturisés.¹⁸ Les polymères les plus utilisés sont les plastiques (polymères avec additifs) à base de poly-(méthyl méthacrylate) (PMMA)¹⁹ et

¹⁵ C. Situma, M. Hashimoto et S.A. Soper, *Biomolecular Engineering*, 2006, 23, 5, 213-231.

¹⁶ M. Bras, V. Dugas, F. Bessueille, J.P. Cloarec, J.R. Martin, M. Cabrera, J.P. Chauvet, E. Souteyrand et M. Garrigues, *Biosensors and Bioelectronics*, 2004, 20, 797-806.

¹⁷ C. Rivet, H. Leea, A. Hirscha, S. Hamiltona et H. Lua, *Chemical Engineering Science*, 2011, 66, 7, 1490-1507.

¹⁸ H. Becker et C. Gärtner, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2007, 390, 1, 89-111.

¹⁹ K. Tsougeni, A. Tserepi, V. Constantoudis, E. Gogolides, P. S. Petrou et S. E. Kakabakos, *Langmuir*, 2010, 26, 17, 13883-13891.

polycarbonate (PC).²⁰ Cependant, ils ont une mauvaise résistance aux solvants.²¹ Les polymères et copolymères d'oléfines cycliques (COP et COC)²² présentent quant à eux, une bonne résistance au solvant.^{23,24} Enfin, les supports de polystyrène (PS), largement employés pour l'immobilisation de biomolécules pour les tests ELISA, très résistants aux solvants, ont également été utilisés comme supports de dépôt de protéines ou d'oligonucléotides.^{25,26}

B.2.b. Les supports à trois dimensions

✓ Les membranes poreuses à base de polymères organiques

Utilisées à l'origine comme support d'immobilisation de biomolécules pour le « Western blot », les membranes poreuses à base de polymères organiques, telles que la nitrocellulose, ont depuis été adaptées à l'immobilisation de matrices de biomolécules.²⁷ Par exemple, les lames « FAST slides » commercialisées par la société Whatman sont des lames de verre recouvertes de nitrocellulose. Néanmoins, l'absorption non spécifique ainsi que l'auto fluorescence dans le vert souvent élevées sont les inconvénients majeurs de ces supports.

✓ Les supports poreux inorganiques

Les supports poreux inorganiques ont été utilisés pour l'immobilisation de biomolécules. Par exemple, l'alumine poreuse nanostructurée²⁸ permet d'obtenir une surface spécifique pour l'accroche des biomolécules en modulant la taille des pores. Grasso *et al.*,²⁹ ont montré l'immobilisation de molécules d'ADN sur une matrice d'alumine poreuse nanostructurée par une méthode de photolithographie.

✓ Les hydrogels

Un hydrogel est un réseau polymérique à trois dimensions ayant une forte affinité pour l'eau. La polymérisation, qui peut être photo- ou thermo- induite, entraîne la réticulation des chaînes hydrophiles et crée un réseau insoluble dans lequel l'eau peut pénétrer, provoquant le gonflement du gel. On parle d'hydrogel quand le gel est chargé d'eau et de xérogel quand la structure est sèche. Hydrophiles, ils sont plus appropriés pour les applications biologiques que les supports poreux traditionnels, généralement hydrophobes. Par exemple, les

²⁰ M.J. Bañuls, F. García-Piñón, R. Puchades et Á. Maquieira, *Bioconjugate Chemistry*, 2008, 19, 3, 665-672.

²¹ H. Becker et L.E. Locascio, *Polymer microfluidic devices*. *Talanta*, 2002, 56, 2, 267-287.

²² (Pu et al. 2007)

²³ C. Rivet, H. Leea, A. Hirscha, S. Hamiltona et H. Lua, *Chemical Engineering Science*, 2011, 66, 7, 1490-1507.

²⁴ C. Rivet, H. Leea, A. Hirscha, S. Hamiltona et H. Lua, *Chemical Engineering Science*, 2011, 66, 7, 1490-1507.

²⁵ P. Nahar, N.M. Wali et R.P. Gandhi, *Analytical Biochemistry*, 2001, 294, 2, 148-153.

²⁶ A. Perrin, *Analytical Biochemistry*, 2003, 322 (2), p.148-155

²⁷ R. Huang R, *Journal of Immunological Methods*, 2001, 255 1-2, 1-13.

²⁸ A. Campo et I.J. Bruce, *Substrate Patterning and Activation Strategies for DNA Chip Fabrication*. Dans le livre *Immobilisation of DNA on Chips I Topics in Current Chemistry* édité par Springer-Verlag, 2005, 77-111.

²⁹ V Grasso, V. Lambertini, P. Ghisellini, F. Valerio, E. Stura, P. Perlo et C. Nicolini, *Nanotechnology*, 2006, 17, 795.

hydrogels comme l'agarose et le polyacrylamide sont décrits pour la conception de biopuces à ADN.³⁰

B.3. Adressage et immobilisation des molécules sondes

Il existe deux stratégies pour la conception de biopuces à ADN, soit les oligonucléotides sondes sont synthétisés directement sur la puce, on parle de conception par synthèse *in situ*, soit ils sont synthétisés au préalable puis adressés sur la puce.

B.3.a. *Synthèse in situ d'oligonucléotides*

Dans cette partie, sont traités les grands principes de production de biopuces à ADN par synthèse *in situ*. Ce type de biopuces offrant une très haute densité de sondes d'oligonucléotides, représente une grande partie de la production de puces commercialisées par de grands groupes comme Affymetrix ou Agilent. Les 3 technologies les plus représentatives du marché des biopuces à ADN par synthèse *in situ* sont présentées ci-dessous.

✓ La technologie Affymetrix

La technologie Affymetrix repose sur le principe de la photolithographie où un masque portant des motifs en chrome est utilisé pour activer sélectivement des zones sur une résine. Cette technique a été adaptée au début des années 1990 pour la synthèse *in situ* d'ADN et de peptides.³¹ La méthode de synthèse consiste à utiliser des phosphoramidites protégés par un groupement photolabile. La synthèse de l'ensemble des sondes de la puce est réalisée en même temps par un jeu de masques (un pour chaque base A, T, G, C). Les masques vont permettre de déprotéger sélectivement les oligonucléotides en cours de synthèse (Figure 6b). Le procédé est répété pour chaque type de nucléotide (A, T, G, ou C) puis pour chaque « couche de synthèse » des oligonucléotides sondes (Figure 6a).

³⁰ M.J. Heller, Annu. Rev. Biomed. Eng., 2002, 4,129-153.

³¹ S.P.A. Fodor, J.L. Read, M.C. Pirrung, L. Stryer, A.T. Lu, et D. Solas, Science, 1991, 251 (4995), 767-773

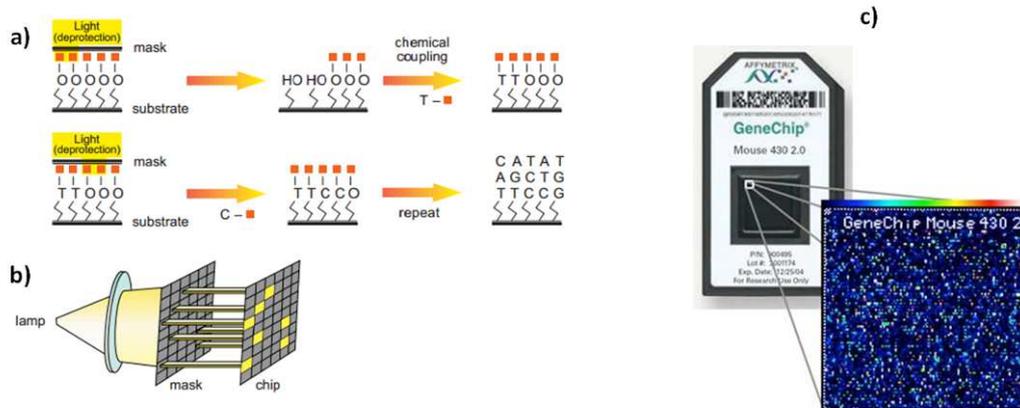


Figure 6: Schéma représentant a) la synthèse *in situ* d'oligonucléotides sondes par photolithographie ; b) la lampe, le masque et la puce pendant la synthèse *in situ* (Images issues des travaux de Lipshutz *et al.*, 1998) ; c) photo représentant un exemple de biopuce à ADN commercialisée par la société Affymetrix (Images adaptées du site internet : <http://m.utoledo.edu>).

Caviani Pease *et al.*,³² valident le principe de la photolithographie pour la fabrication de biopuces à ADN. Puis en 1996, Lockhart *et al.*,³³ de la société Affymetrix conçoivent la première biopuce à ADN portant des séquences représentatives de l'ensemble du génome humain. Cette technologie, commercialisée par la société Affymetrix, offre l'avantage d'une puce de très haute densité de sondes oligonucléotidiques (jusqu'à 2,5 millions sur 1,28 cm²).³⁴ La Figure 6c) illustre un exemple de biopuce à ADN commercialisée par la société Affymetrix.

✓ La technologie NimbleGen

La technique développée par NimbleGen permet de synthétiser *in situ* les oligonucléotides sans utilisation d'un masque. La déprotection sélective des zones d'intérêt pour la synthèse est obtenue grâce à des micro-miroirs orientables. Ces derniers, dirigent spécifiquement les faisceaux lumineux vers les oligonucléotides à déprotéger pour permettre l'addition du nucléotide suivant (Figure 7a). La synthèse est ainsi obtenue par des cycles consécutifs de déprotection et d'addition des nucléotides comme pour la technologie Affymetrix. La Figure 7 b) illustre les micro-miroirs orientables utilisés pour diriger spécifiquement les faisceaux lumineux vers les oligonucléotides à déprotéger. Cette technologie permet de synthétiser entre 385 000 et 2,1 millions de sondes sur la puce à ADN.^{35,36} En 2007, Roche a racheté NimbleGen et cette technologie n'est actuellement plus disponible.

³² A. Caviani Peaset, D. Solast, E.J. Sullivant, M.T. Cronin, C.P. Holmest, et S.P.A. Fodort, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994, 91, 5022-5026.

³³ D.J. Lockhart, H. Dong, M.C. Byrne, M.T. Follettie, M.V. Gallo, M.S. Chee, M. Mittmann, C. Wang, M. Kobayashi, H. Norton et E.L. Brown, Nature Biotechnology, 1996, 14, 1675-1680.

³⁴ R.J. Lipshutz, S.P.A. Fodor, T.R. Gingeras et D.J. Lockhart, Nature Genetics, 1999, 21, 20-24.

³⁵ S. Singh-Gasson, R.D. Green, Y. Yue, C. Nelson, F. Blattner, M.R. Sussman et F. Cerrina, Nat Biotechnol 1999, 17, 974-978.

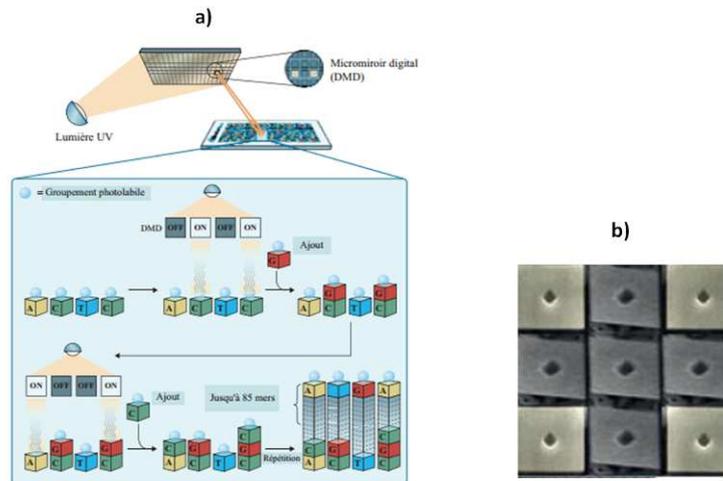


Figure 7 : a) Schéma représentant la synthèse *in situ* par photolithographie sans masque et à l'aide de micro-miroirs. b) Photographie de 9 micro-miroirs orientables utilisés pour diriger spécifiquement les faisceaux lumineux vers les oligonucléotides à déprotéger.

✓ La technologie Agilent

La technologie de synthèse *in situ* Flexjet, développée par la société Agilent, repose sur un système d'impression par jet d'encre.³⁷ Elle permet de synthétiser directement les sondes nucléiques sur la surface de la puce sans faire appel à un système de masque. Les quatre types de nucléotides sont contenus dans des « cartouches » individualisées comme celles utilisées pour les imprimantes laser couleur (Figure 8a). Le dépôt est réalisé sous l'effet d'un courant électrique. Les Figure 8 b) et c) schématisent l'empilement des nucléotides déposés par jet d'encre sous forme de spot.

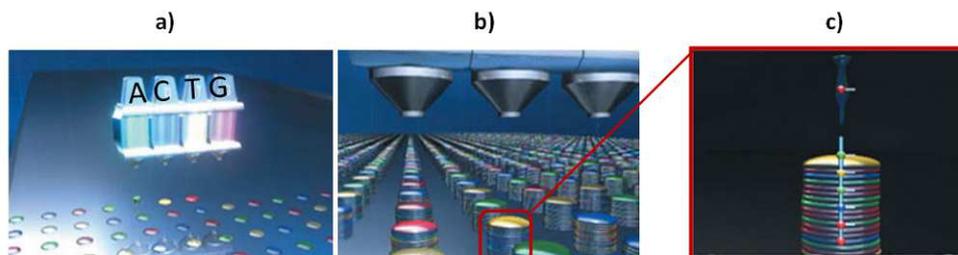


Figure 8 : Schéma du principe de synthèse *in situ* par jet d'encre ; a) schéma du premier dépôt de nucléotides A, C, T, G constituant le premier niveau de bases des oligonucléotides ; b) schéma représentant l'empilement des différentes bases constituant l'oligonucléotide sonde ; c) zoom sur un spot. (Images adaptées du site internet : <http://www.genomics.agilent.com>).

³⁶ T.J. Albert, J. Norton, M. Ott, T. Richmond, K. Nuwaysir, E.F. Nuwaysir, K-P. Stengele and R.D. Green, *Nucleic Acids Res*, 2003, 31, 7, e35.

³⁷ T.R. Hughes, M. Mao, A.R. Jones, J. Burchard, M.J. Marton, K.W. Shannon, S.M. Lefkowitz, M. Ziman, J.M. Schelter, M.R. Meyer, S. Kobayashi, C. Davis, H. Dai, Y.D. He, S.B. Stephanians, G. Cavet, W.L. Walker, A. West, E. Coffey, D.D. Shoemaker, R. Stoughton, A.P. Blanchard, S.H. Friend et P.S. Linsley, *Nature Publishing Group*, 2001, 19, 342-347.

B.3.b. Adressage et immobilisation d'oligonucléotides sondes

Avant l'adressage des oligonucléotides sondes synthétiques sur la biopuce, il convient de choisir une chimie de surface pour l'immobilisation des biomolécules. Elle permet de fixer les sondes et de les maintenir fonctionnelles et accessibles pour l'hybridation avec les séquences cibles. L'immobilisation et l'adressage des sondes sur la puce sont indissociables et doivent être efficaces, reproductibles, garantir une bonne homogénéité des dépôts, présenter une densité de sondes élevée, un accrochage stable dans les conditions d'hybridation et une bonne accessibilité pour l'hybridation. Dans le cas des biopuces à ADN à fluorescence, la chimie de surface peut contribuer à limiter l'adsorption non spécifique. Il existe différents types de chimie de surface pour l'immobilisation d'oligonucléotides, les principales sont décrites ci-dessous.

✓ Immobilisation par interactions faibles

L'immobilisation par interactions faibles désigne les interactions de type liaisons hydrogènes, interactions électrostatiques, interactions hydrophobes et interactions de Van der Waals. Ces types d'interactions ont été décrits initialement pour l'immobilisation de protéines ou d'acides nucléiques sur des membranes poreuses (Western blot) et validés depuis comme support de conception des biopuces.³⁸ Par exemple, les oligonucléotides sondes portant une charge négative (groupement phosphate), peuvent se lier par interaction électrostatique à une surface chargée positivement. Schena *et al.*,³⁹ ont ainsi immobilisé une matrice d'ADN sur une lame de verre recouverte d'une couche de poly-L-lysine chargée positivement. Néanmoins, cette chimie de surface a pour inconvénient de présenter un fort bruit de fond, résultant notamment d'interactions non spécifiques des cibles directement sur le support.

✓ Immobilisation par piégeage physique

L'immobilisation des biomolécules par piégeage physique concerne principalement les supports de type membrane poreuse ou hydrogel. Le piégeage des biomolécules dans la matrice a pour avantage de limiter leur dénaturation en les maintenant dans un environnement aqueux et tamponné. C'est le cas des biopuces réalisées sur gel d'agarose,^{40,41} ou gel de polyacrylamide.^{42,43} Néanmoins, il est difficile de contrôler le relargage des molécules cibles non liées spécifiquement lors des étapes de lavage après l'hybridation. En 1999, Vasiliskov *et al.*,⁴⁴ ont mis au point un procédé pour fixer de façon covalente les oligonucléotides aux mailles du polymère d'acrylamide par copolymérisation avec des oligonucléotides modifiés.

³⁸ R. Huang, *Journal of Immunological Methods*, 2001, 255, 1-2, 1-13.

³⁹ M. Schena, D. Shalon, R.W. Davis, P.O. Brown, *Science*, 1995, 270, 5235, 467-470.

⁴⁰ W. Hong, L. Jiong, L. Heping, L. Quanjun, M. Qian, W. Yihin, Z. Jijun, H. Nongyue, L. Zuhong, *Nucleic Acids Research*, 2002, 30, 12, 1228-1229.

⁴¹ V. Afanassiev, V. Hanemann et S. Wöfl, *Nucleic Acids Research*, 2000, 28 (12), e66.

⁴² K.R. Khrapko, Y.P. Lysov, A.A. Khorlin, I.B. Ivanov, G.M. Yershov, S.K. Vasilenko, V.L. Florentiev, A.D. Mirzabekov, *DNA Sequencing*, 1991, 1, 375-388.

⁴³ G. Yershov, V. Barsky, A. Belgovskiy, E. Kirillov, E. Kreindlin, I. Ivanov, S. Pannov, D. Guschin, A. Drobishev, S. Dubiley, et A. Mirzabekov, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93, 4913-4918.

⁴⁴ A.V. Vasiliskov, E.N. Timofeev, S.A. Surzhikov, A.L. Drobyshev, V.V. Shick et A.D. Mirzabekov, *BioTechniques*, 1999, 27, 592-606.

Le dextran est également un polymère décrit comme couche d'accroche.⁴⁵ Il permet un piégeage physique et une immobilisation des biomolécules simultanément *via* les amines, les thiols, les aldéhydes ou la biotine.⁴⁶ Ce polymère a d'ailleurs initialement été adopté pour les analyses par SPR⁴⁷ par l'ancienne société Biacore rachetée en 2006 par GE Healthcare.

Le piégeage physique est également mise en jeu dans le cas des biopuces à ADN sur membranes de nitrocellulose ou de vinyle PVDF (PolyVinylidene DiFluoride).⁴⁸ Les travaux menés par Kukar *et al*,⁴⁹ ont montré que la quantité de biomolécules piégées dans les pores des membranes était bien plus importante que celle déposée sur une lame de verre, ce qui peut être un avantage dans le cas de tests à haute sensibilité.

✓ Immobilisation par liaison covalente

L'immobilisation covalente est caractérisée par une liaison forte entre les oligonucléotides sondes sur le support de la biopuce, nous verrons dans cette partie quelques exemples de liaisons covalentes utilisés pour la conception de biopuces à ADN. Dans la majorité des cas, l'immobilisation covalente implique une fonctionnalisation chimique de la surface (généralement lame de verre) et l'utilisation d'oligonucléotides sondes modifiés par incorporation d'une fonction chimique à leur extrémité lors de leur synthèse (chimique ou biologique). L'essentiel des fonctionnalisations de surface repose sur la chimie des groupements amine, acide carboxylique et thiol. Les liaisons réalisées sont majoritairement des amides, imines, thioéthers, ponts disulfures, hydrazides et isocyanates.

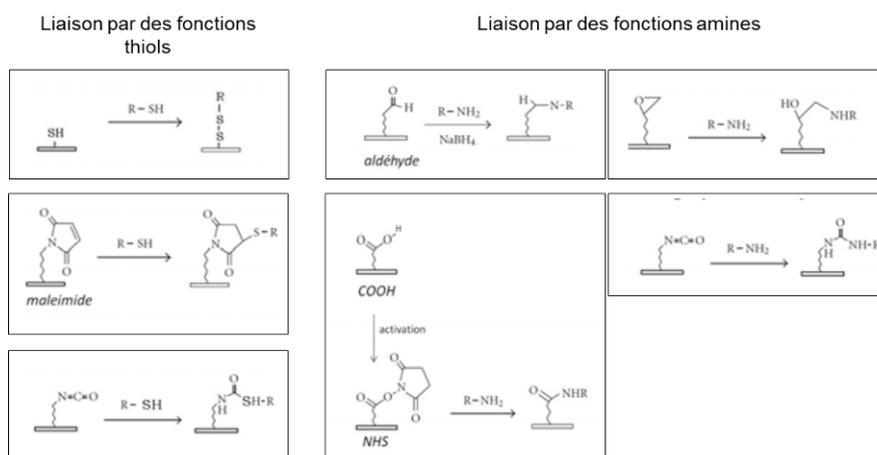


Figure 9 : Principales méthodes d'immobilisation de biomolécules par liaison covalente⁵⁰

⁴⁵ B. Johnsson, S. Löfas et G. Lindquist, *Analytical Biochemistry*, 1991, 198, 2, 268-277.

⁴⁶ B. Johnsson, S. Löfas, G. Lindquist, A. Edström, R.M. Müller Hillgren, A. Hansson, *J. Mol. Recognit*, 1995, 8 1-2, 125-131.

⁴⁷ D.G. Myszka, *Analytical Biochemistry*, 2004, 329,2, 316-323.

⁴⁸ B.A Stillman, J.L. Tonkinson, *Biotechniques*, 2000, 29, 3, 630-635.

⁴⁹ T. Kukar, S. Eckenrode, Y. Gu, W. Lian, M. Megginson, J.X. She et D. Wu, *Analytical, Biochemistry*, 2002, 306,50-54.

⁵⁰ Thèse N. Berthet-Duroure, INSA, Toulouse, 2009.

✓ Les espaceurs

En 1999, Southern *et al.*⁵¹ montrent que lorsque les sondes sont déposées directement sur la surface, les bases proches de la surface sont moins accessibles pour l'hybridation. Les auteurs ont montré que l'ajout d'un espaceur entre la surface et la biomolécule réduit cet effet. Par exemple, pour les biopuces à ADN, il est fréquent d'ajouter une séquence de polythymine en position 5' de la sonde pour jouer le rôle d'espaceur.

Certains espaceurs peuvent constituer la partie intégrante de la chimie de surface. Des macromolécules arborescentes, comme les dendrimères, permettent également d'augmenter la densité de fonctions réactives sur la surface.^{52,53} A ce titre, des travaux ont été menés pour la production de biopuces à ADN utilisant comme chimie de surface des dendrimères aldéhydes phosphorés.⁵⁴ Les résultats ont montré que ce type de chimie de surface permettait de concevoir des biopuces à ADN 10 fois plus sensibles que celles sur lames commerciales (amines, aldéhydes ou époxydes).⁵⁵ Ce type de chimie de surface permet à la fois de créer un espaceur de plusieurs nanomètres entre la surface et la sonde mais également d'offrir une immobilisation orientée et spécifique (Figure 10).

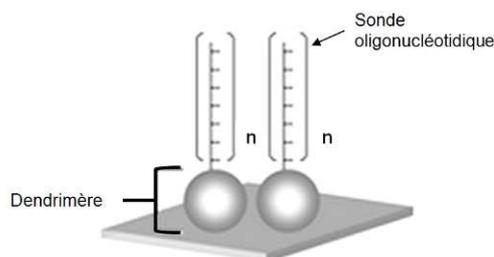


Figure 10 : Schéma représentant les dendrimères comme espaceur et de chimie d'accroche des sondes oligonucléotidiques.

✓ Couplage électrochimique

Dans le cas du couplage électrochimique, les biomolécules sont couplées à une fonction électro-active. L'application d'une différence de potentiel dans la solution contenant les oligonucléotides activés initie une réaction électrochimique qui permet leur fixation à la surface. Parmi les méthodes de greffage électrochimique de biomolécules, on peut citer en

⁵¹ E. Southern, K. Mir et M. Shchepinov, *Nat. Genet.*, 1999, 21 (1 Suppl), 5-9.

⁵² M. Beier et J.D. Hoheisel, *Nucleic Acids Research*, 1999, 27, 9, 1970-1977.

⁵³ R. Benters, C.M. Niemeyer, et D. Wöhrle, *Chem. Biochem.*, 2001, 2, 686-694.

⁵⁴ E. Trévisiol, V. Le Berre-Anton, J. Leclaire, G. Pratviel, A-M. Caminade, J-P. Majoral, J.M. François et B. Meunier, *New J. Chem.*, 2003,27, 1713-1719.

⁵⁵ V. Le Berre, E. Trévisiol, A. Dagkessamanskaia, S. Sokol1, A-M. Caminade, J-P. Majoral, B. Meunier et J-M. François, *Nucleic Acids Res.* 2003, 31, 16, e88.

particulier l' « électrogreffage » par oxydation du pyrrole⁵⁶ et la réduction électrochimique de sels de diazonium.^{57,58}

En conclusion, le choix de la chimie de surface dépend du matériau support et détermine l'accrochage des oligonucléotides sondes sur la puce. Il est préférable de choisir une chimie de surface permettant une fixation covalente et orientée des sondes. De plus, l'accrochage des sondes doit être compatible avec l'hybridation cibles-sondes tout en limitant les interactions non spécifiques cibles-surface.

L'adressage des molécules sondes se définit par le dépôt des oligonucléotides sondes sur le support de la puce de façon précise et contrôlée, sous forme de motifs prédéfinis. Il s'agit de réaliser une matrice ordonnée de spots ronds ou carrés sur des surfaces planes fonctionnalisées. Ci-dessous sont décrits les principales techniques d'adressage d'oligonucléotides sur des surfaces planes (conventionnelles ou non) déjà utilisées pour la réalisation de biopuces à ADN. L'adressage sur d'autres supports comme des billes ne sera pas développé.

✓ Adressage par contact

Dépôt par aiguilles

Le dépôt par aiguilles est une technique qui a été largement utilisée dans les débuts de la conception des biopuces. Les robots utilisant les aiguilles permettent de déposer les oligonucléotides sous forme de spots ronds de 50 à 500 µm. L'uniformité des spots est principalement déterminée par les critères suivants :

- la viscosité de l'échantillon déposé ;
- le diamètre de la fente de l'aiguille ;
- les propriétés de surface de l'aiguille ;
- les propriétés de surface du support (biopuce) ;
- la planéité du support ;
- le contrôle en humidité et température de l'environnement de dépôt.

⁵⁶ T. Livache, A. Roget, E. Dejean, C. Barthet, G. Bidan et R. Teoule, *Nucleic Acids Research*, 1994, 22, 15, 2915-2921.

⁵⁷ M. Delamar, R. Hitmi, J. Pinson, J.-M. Savéant, *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, 114, 5883-5884.

⁵⁸ J.C. Harper, R. Polsky, D. R. Wheeler, S.M. Dirk, et S.M. Brozik, *Langmuir*, 2007, 23, 16, 8285-8287.

La Figure 11 illustre à titre d'exemple un schéma de robot de dépôt pour la fabrication de biopuces à ADN. Les aiguilles sont maintenues à la verticale par un porte-aiguille dirigé par un bras robotisé. Le robot permet de déplacer les aiguilles de la microplaque (zone de chargement des aiguilles) vers le support pour le dépôt. D'après les travaux publiés par D. Rose,⁵⁹ les porte-aiguilles peuvent contenir 16, 48, 64 ou 96 aiguilles et l'espacement entre les aiguilles est compris entre 4.5 mm et 9 mm. Il est adapté aux microplaques commerciales de 96 ou 384 puits. La densité de spots par puce est comprise entre 400 et 10000 spots/cm² pour des diamètres de spots de 75 à 360 µm. Dans ces travaux, D. Rose rapporte qu'il faut 30 minutes au robot Arrayit ChipMaker™ 2 (TeleChem International, Inc., Sunnyvale, CA) pour déposer les échantillons d'une microplaque de 384 puits avec 32 aiguilles et 6h30 avec une seule aiguille (temps comprenant le chargement, le dépôt et le lavage des aiguilles).

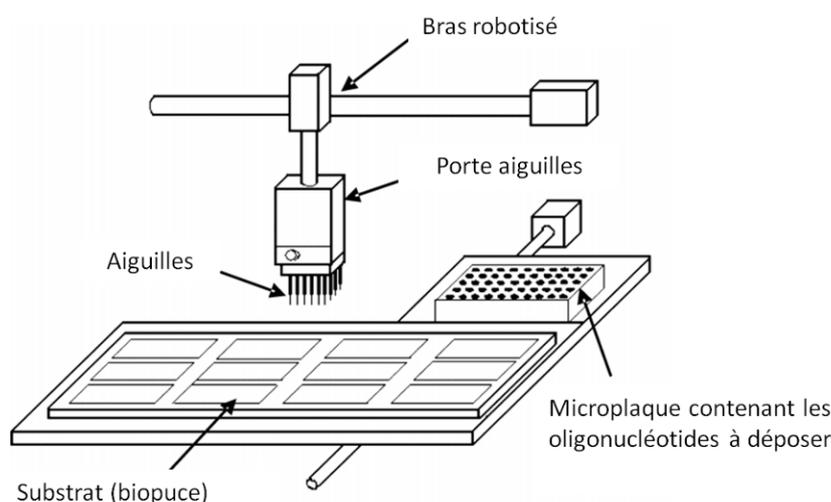


Figure 11 : Schéma représentant un exemple de robot de dépôt à aiguilles pour la fabrication de biopuces à ADN par contact. (Image adaptée de Ito *et al.*, 2004⁶⁰)

Il existe différents types d'aiguilles généralement fabriqués à partir de métaux, tels que l'acier inoxydable, le tungstène et le titane. Les plus simples sont les aiguilles dites « plates » (Figure 12 a) avec un diamètre variant de 50 à 500 µm.⁶¹ Montée sur une tête mobile pilotée par un robot, l'aiguille est trempée dans le liquide à déposer puis mise en contact avec la surface sur laquelle une goutte est alors déposée (Figure 12 b) et c)). En fonction des robots, il est possible d'utiliser une ou plusieurs aiguilles en parallèle dans le but de multiplexer le dépôt des sondes. Les oligonucléotides-sondes à déposer sont généralement disposés dans une microplaque à puits où chaque puits contient une solution différente de sondes. Ces aiguilles ne comportant pas de réservoir, il est nécessaire de recharger la ou les aiguilles entre chaque dépôt. Néanmoins, ce système possède l'avantage de pouvoir déposer des solutions

⁵⁹ Rose, D. 2000. Microfluidic technologies and instrumentation for printing DNA microarrays. In: *Microarray Biochip Technology*. pp. 19-38. Schena, M., Ed., Eaton Publishing, Natick, MA.

⁶⁰ Ito, S. and Tachibana, M. 2004. Spotting Pin. U. S. Patent 6,835-352 B2.

⁶¹ Jr. Mace, M.L. Montagu, J. Rose, S. D. et McGuinness, G. M. 2000. Novel microarray printing and detection technologies. In: *Microarray Biochip Technology*. pp. 39-64. Schena, M., Ed., Eaton Publishing, Natick, MA

visqueuses.⁶² De plus, le design des aiguilles plates a pour avantage de les rendre plus robustes et plus simples à nettoyer en comparaison avec les aiguilles creuses.

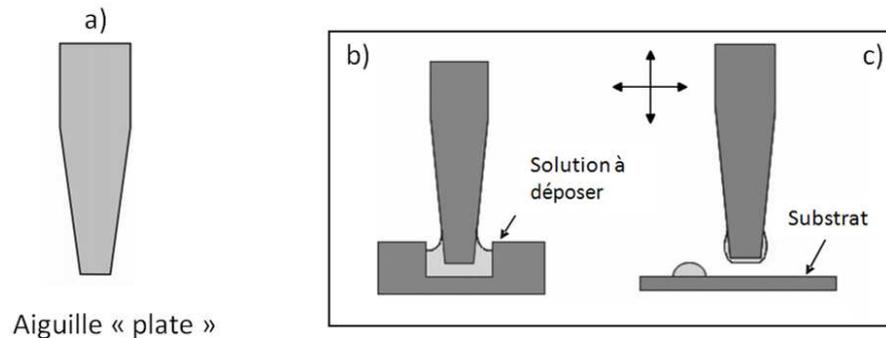


Figure 12 : a) Schéma représentant une aiguille dite « plate », b) et c) schéma représentant le procédé de prélèvement de la solution à déposer dans un puits et le dépôt par contact sur un support (Images adaptées de Barbulovic-Nad *et al.*, 2006⁶³).

Les aiguilles dites « creuses » sont les plus fréquemment utilisées pour la conception de biopuces à ADN. Elles sont formées d'un canal avec ou sans réservoir et sont basées sur le modèle du stylo à encre (Figure 13 a). L'avantage majeur par rapport aux aiguilles « plates » est qu'il n'est pas nécessaire de recharger la ou les aiguilles entre chaque dépôt.

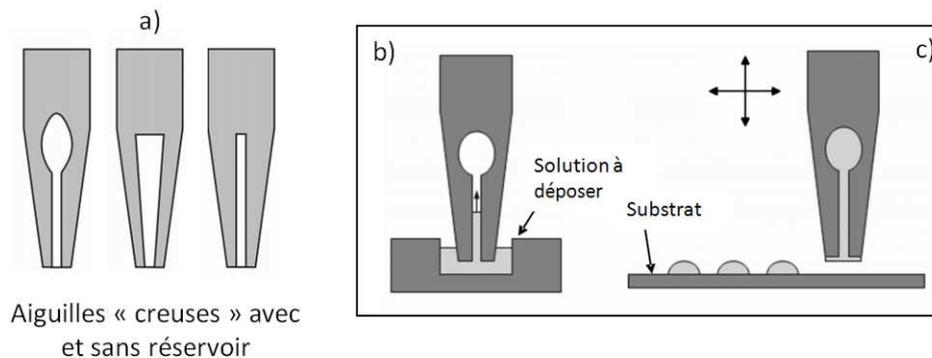


Figure 13 : a) Schéma représentant trois aiguilles dites « creuses », b) et c) schéma représentant le procédé de prélèvement de la solution à déposer dans un puits et le dépôt par contact sur un support. (Images adaptées de Barbulovic-Nad *et al.*, 2006⁶⁰).

Les Figure 13 b) et c) décrivent le principe de chargement de l'aiguille avec la solution à déposer et le dépôt par contact. Tout d'abord, l'aiguille est immergée dans la solution à déposer contenue par la microplaque (Figure 13b). Pendant cette étape, l'échantillon remplit par capillarité le canal des aiguilles (de 10 à 100 μm de diamètre). Comme les forces de tension de surface dominent les forces d'inertie à l'échelle microscopique, l'effet de la gravité est négligeable.⁷⁷ Lorsque l'aiguille touche la surface du support, de petits volumes de l'ordre du pico ou du nanolitre sont transférés sur la surface. La taille des spots dépend de la mouillabilité du substrat, du diamètre des aiguilles et du temps de contact. Il a été démontré

⁶² C. Weibel, Journal of the Association for Laboratory Automation 2002, 7, 3, 91-96.

⁶³ I. Barbulovic-Nad, M.Lucente, Y.S. Mingjun Zhang, A.R. Wheeler et M. Bussmann, Critical Reviews in Biotechnology, 2006, 26, 4, 237-259.

que lorsque la surface du substrat est très hydrophile, la taille du spot peut augmenter de près de 50%.⁶⁴

En 2002, Tsais *et al.*,⁶⁵ ont développé des aiguilles en silicium pour la conception de biopuces à ADN. Le silicium présente plusieurs avantages par rapport aux métaux, il est possible de fabriquer des aiguilles plus petites avec des diamètres inférieurs à 50 μm . De plus, la production en parallèle est beaucoup plus reproductible.

Dépôt à l'aide de microleviers : le robot Bioplume

Le principe du robot Bioplume repose sur le dépôt par contact à l'aide de microleviers à canal, montés sur un système de contrôle des déplacements.⁶⁶ Les microleviers, appelés « plumes » ou « bioplumes », sont formés d'un canal et d'un réservoir (Figure 14 a). Le principe est le même que pour les aiguilles creuses : les plumes sont trempées dans la solution d'oligonucléotides à déposer pour un chargement des plumes par capillarité, puis ces dernières sont mises en contact avec la surface du support pour le dépôt d'une goutte (Figure 14b). Ce système de bioplumes a pour avantage de pouvoir effectuer 10000 spots (50 μm de diamètre) consécutifs sans avoir à recharger les microleviers.⁶⁷ Des capteurs piézorésistifs sont situés au niveau des quatre leviers positionnés aux extrémités de chaque barrette de 12 leviers. Ces capteurs permettent de contrôler à la fois le parallélisme des plumes par rapport à la surface, la force d'appui et le temps de contact.⁶⁸

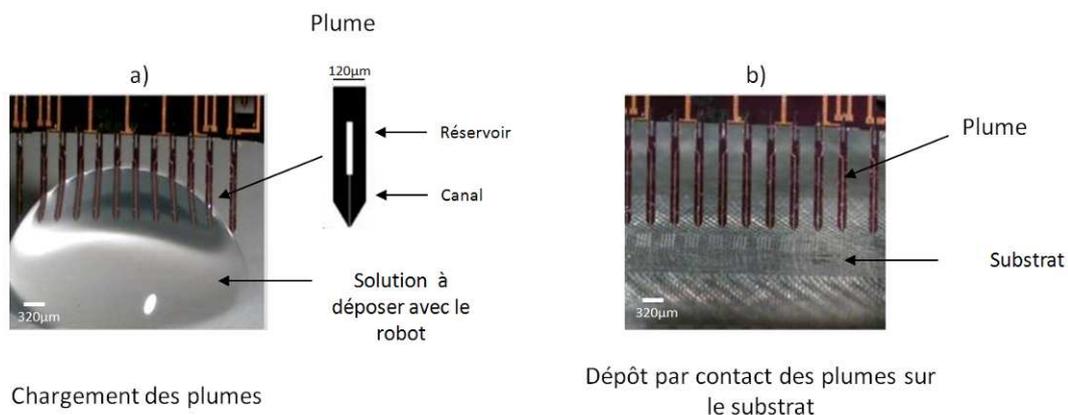


Figure 14 : Robot de dépôt par contact Bioplume à l'aide de microleviers a) chargement des plumes dans une goutte de solution à déposer b) dépôt par contact des plumes sur le support (lame de verre). (Images adaptées de N. Berthet-Durore *et al.*, 2008)

⁶⁴ Martinsky, T., et Haje, P. 2000. Microarray Tools, Kits, Reagents, and Services. In: Microarray Biochip Technology. pp. 201–220. Schena, M., Ed., Eaton Publishing, Natick, MA.

⁶⁵ J. Tsai et C.J. Kim, 2002, Engineering in Medicine and Biology, 24th Annual Conference and the Annual Fall Meeting of the Biomedical Engineering Society EMBS/BMES Conference, 2, 1632-1633.

⁶⁶ P. Belaubre, M. Guirardel, V. Leberre, J.-B. Pourciel, C. Bergaud, Sens. and Act. A, 2004, 110, 130-135

⁶⁷ N. Berthet-Durore, T. Leïchlé, J.-B. Pourciel, C. Martin, J. Bausells, E. Lora-Tamayo, F. Perez-Murano, J.-M. François, E. Trévisiol, L. Nicu, Biomedical Microdevices, 2008, 10 (4), 479-87.

⁶⁸ T. Leïchlé, D. Saya, J.-B. Pourciel, F. Mathieu, C. Bergaud, et L. Nicu, IEEE NTC Review on Advances in Nano/Micro Engineered and Molecular Systems, 2006, 1, 337.

Ce robot permet également de réaliser de l'électromouillage et de l'électrochimie grâce à une électrode en or incorporée à l'intérieur du canal des plumes.⁶⁹

En 2007, sur ce principe, Daisuké Saya *et al.*,⁷⁰ ont décrit une miniaturisation de la méthode en fabriquant des plumes plus petites par gravure anisotrope selon les plans cristallins inclinés du silicium. Ce système appelé Nanobioplume permet d'obtenir des gouttes de diamètre inférieur à 5 μm .

Dépôt à l'aide de la pointe d'un AFM

Le microscope à force atomique (AFM) est un outil d'imagerie à haute résolution (30Å en résolution latérale et 1Å en résolution verticale). Le principe de l'AFM est basé sur l'interaction entre la surface de l'échantillon à analyser et une pointe nanométrique, fixée sous un micro-levier. La pointe balaye la surface et suit la topographie de l'échantillon, donnant une image tridimensionnelle de la surface analysée. Toute variation de l'état de surface se traduit par une déformation du microlevier qui est enregistrée à l'aide d'un laser pointé sur la face supérieure et dirigé sur une photodiode à quatre quadrants (Figure 15).

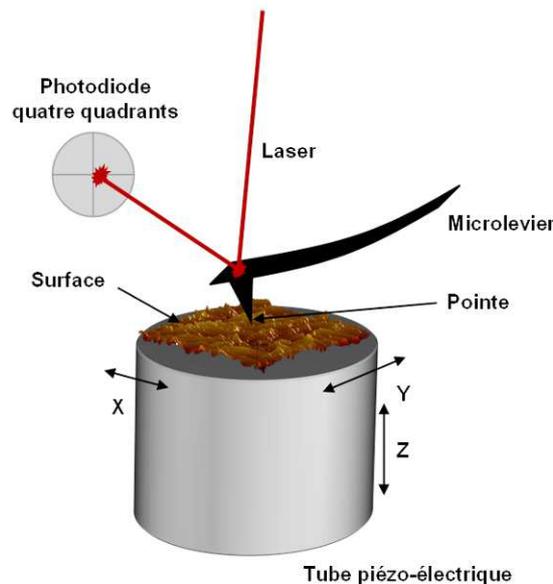


Figure 15 : Principe du Microscope à Force Atomique.⁷¹

L'utilisation de l'AFM pour le dépôt de biomolécules, nommée « Dip-pen Nanolithography », est née au milieu des années 1990 sous l'influence de Jaschke et Butt.^{72,73,74,75} Tout d'abord la pointe de l'AFM est immergée dans la goutte de solution à déposer.

⁶⁹ L. Tanguy, T. Leïchlé, et L. Nicu, Journal of Applied Physics, 2007, 101, 044907.

⁷⁰ D Saya, T Leïchlé, J.-B. Pourciel, C. Bergaud et L. Nicu, Journal of Micromechanics and Microengineering, 2007, 17, 1-5

⁷¹ <http://www.biophyresearch.com/>

⁷² M. Jaschke, and J. Butt, Langmuir, 1995, 11, 1061

⁷³ R.D. Piner, J. Zhu, F. Xu, S. Hong, C.A. Mirkin, Science, 1999, 283, 661-663.

Les molécules sont instantanément séchées sur la pointe par évaporation du tampon. Puis la pointe est mise en contact avec la surface de dépôt sous atmosphère contrôlée en humidité. Cette dernière va permettre la formation d'un ménisque entre la pointe et la surface lors de leur contact pour le dépôt des molécules présentes sur la pointe selon des motifs de quelques dizaines de nanomètres (Figure 16).

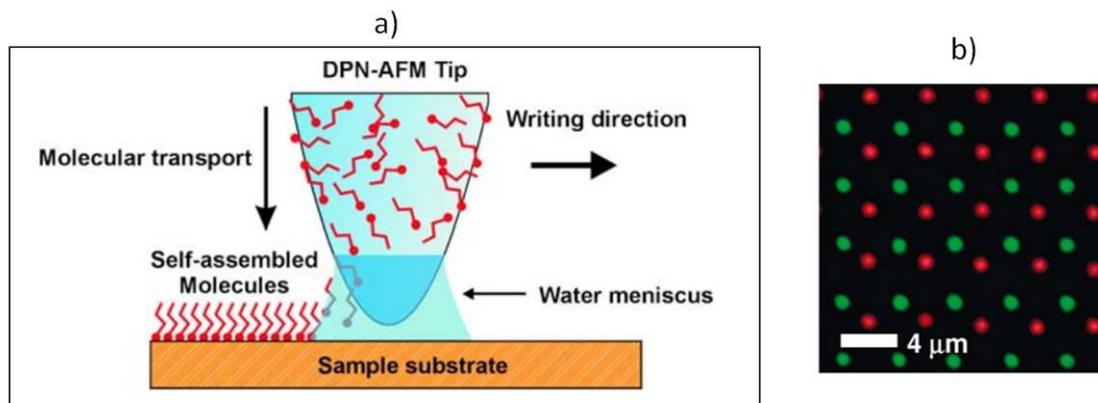


Figure 16 : a) Schéma représentant le principe du « Dip-pen Nanolithography » b) Image en fluorescence du dépôt d'oligonucléotides marqués en rouge et en vert (Oregon Green 488-X and Texas Red-X) par DPN. (Images adaptées de Ginger *et al.*, 2004)⁷⁶

Dépôt par microcontact printing

Le dépôt par microcontact printing (μ CP) s'inspire du principe de l'imprimerie de Gutenberg. Le tampon encreur est un timbre en élastomère (le polydiméthylsiloxane (PDMS)) que l'on encre avec les molécules d'intérêt à déposer. Le timbre est ensuite mis en contact avec le support pour un transfert des molécules depuis la surface du timbre vers la surface du support. Les motifs de dépôt sont déterminés par le timbre qui peut être structuré de différents types de motifs nano ou micrométriques. Ce procédé d'adressage de biomolécules sur une surface plane a été introduit par G.M. Whitesides au début des années 90.⁷⁷

Le PDMS, (Sylgard® 184) est un mélange d'une base contenant l'oligomère PDMS et un agent de réticulation formé de deux composés : un catalyseur au platine et un oligomère hydrogéné (Figure 17a). Lorsque les deux composés sont en contact, les groupes hydrosilane (Si-H) du polymère contenus dans l'agent de réticulation et les chaînes carbonées non saturées vont se lier de façon covalente grâce à la présence du catalyseur au platine. Ce phénomène est appelé hydrosilylation (Figure 17b). Cette réaction conduit à la formation d'un réseau réticulé de chaînes polysilanes qui donne au PDMS ses propriétés élastomériques. Avec un faible module de Young (2.5 MPa), cet élastomère oblige à respecter certaines proportions dans la

⁷⁴ D.S. Ginger, H. Zhang et C.A. Mirkin, *Angewandte Chemie International Edition*, 2004, 43, 30

⁷⁵ K. Salaita, Y. Wang, et C.A. Mirkin, *Nature Nanotechnology*, 2007, 2, 145-155

⁷⁶ D.S. Ginger, H. Zhang, et C.A. Mirkin, *Nanolithography*, 2004, 43, 1, 30-45.

⁷⁷ A. Kumar; G. M. Whitesides, *Appl. Phys. Lett.* 1993, 63, 2002-2005.

taille des motifs pour éviter leur effondrement pendant le procédé de microcontact printing. Celles-ci sont très largement décrites dans la littérature.^{78,79,80}

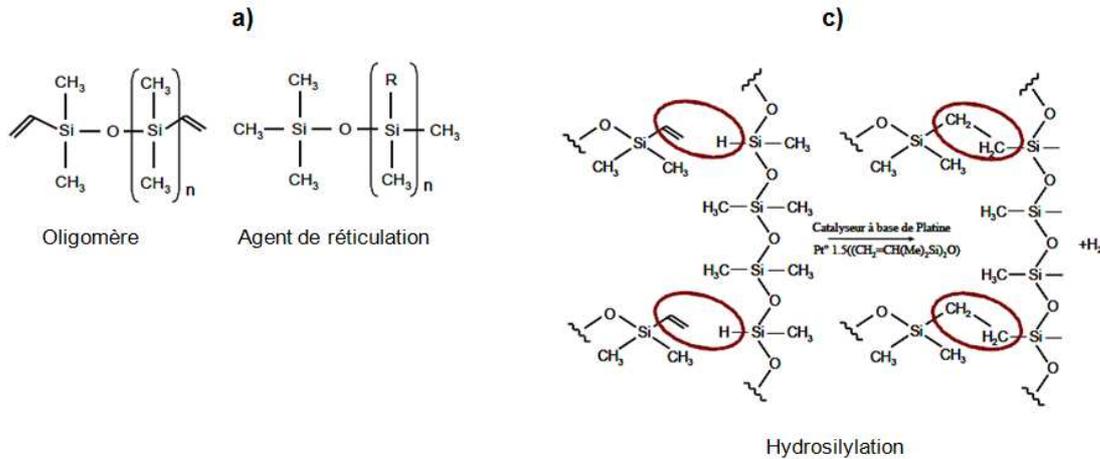


Figure 17 : a) Représentation de l'oligomère et de l'agent de réticulation nécessaire à la fabrication du PDMS ; b) Représentation de la réaction hydrosilylation pendant la réticulation du PDMS.

Le timbre en PDMS est fabriqué par moulage sur une pièce de silicium qui est structuré topographiquement de motifs. Les moules sont fabriqués et structurés par des techniques de photolithographie et gravure issues de la microélectronique. Lorsque le PDMS est réticulé, le timbre est démoulé et peut être utilisé.

Le procédé du μ CP se décline en trois étapes. Tout d'abord, le timbre en PDMS structuré topographiquement est encre par dépôt d'une goutte de la solution contenant des molécules d'intérêt (Figure 18a). Pendant cette étape, les molécules vont s'accrocher sur de petits fragments de PDMS non réticulés constituant le timbre.⁸¹ La goutte est ensuite retirée et le timbre est séché sous un flux d'azote (Figure 18b). Enfin, il est déposé au contact du substrat à fonctionnaliser (Figure 18c). Lors de cette étape, les molécules sont transférées du timbre vers la surface du support selon les motifs du timbre.

⁷⁸ A. Bietsch, B. Michel, J. of Appl. Phys., 200, 88. 7, 4310-4318.

⁷⁹ K.G. Sharp, G.S. Blackman, N.J. Glassmaker, A. Jagota, and C.Y. Hui, , Langmuir, 2004, 20, 6430-6438.

⁸⁰ J.A. Rogers, K.E. Paul, and G.M. Whitesides, 1998, J. Vac. Sci. Technol., 16, 1, 88-97.

⁸¹ C. Thibault, C. Severac, A-F Mingotaud, C. Vieu, et M. Mauzac, Langmuir 2007, 23, 10706-10714.

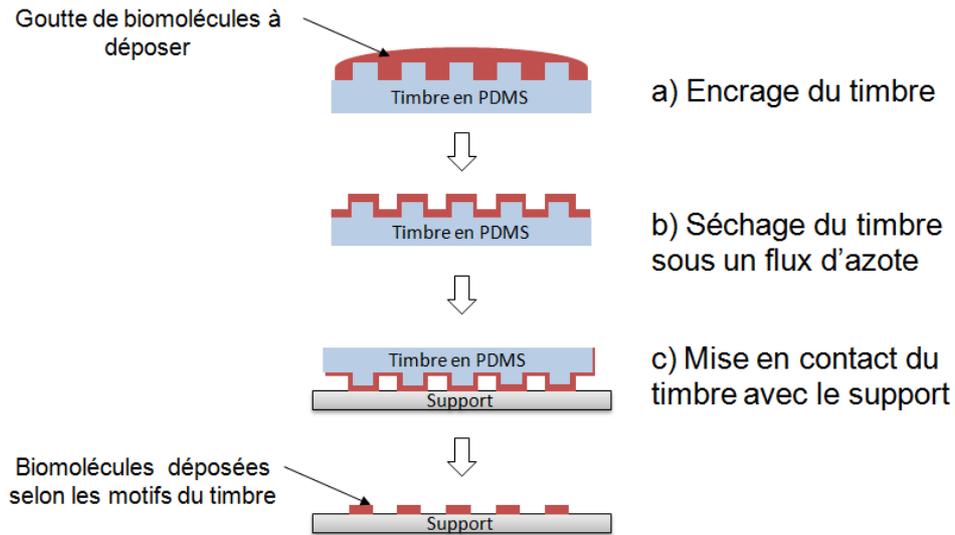


Figure 18 : Principe du microcontact printing.

Des travaux de 2004 et 2005 ont validé le dépôt d'oligonucléotides pour la conception de biopuces à ADN par μ CP.^{82,83}

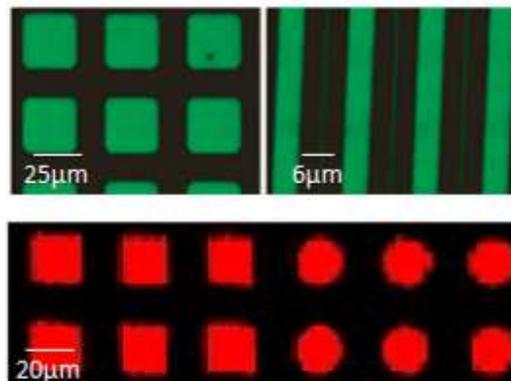


Figure 19 : Images de fluorescence après hybridation de biopuces à ADN réalisées par μ CP. (Images adaptées des travaux de Lange *et al.*, 2004 et Thibault *et al.*, 2005).

Le μ CP est une méthode simple et rapide à mettre en œuvre. Le large choix en matière de molécules à déposer et de motifs de dépôt la rend accessible à de nombreuses applications comme la fabrication de biocapteurs, selon des motifs micro ou nanométriques.^{84,85,86,87,88}

⁸² S. Lange, V. Benes, D. Kern, H. Hörber, A. Bernard, *Anal Chem*, 2004, 76, 1641-1647.

⁸³ C. Thibault, V. Le Berre, S. Casimirius, E. Trévisiol, J François et C Vieu, *Journal of Nanobiotechnology*, 2005, 1-12.

⁸⁴ B. Michel, A. Bernard, A. Bietsch, E. Delamarche, M. Geissler, D. Juncker, H. Kind, J.-P. Renault, H. Rothuizen, H. Schmid, P. Schmidt-Winkel, R. Stutz, H. Wolf, *IBM Journal of R&D* 2001, 45, 697-719.

⁸⁵ A. Bernard, E. Delamarche, H. Schmid, B. Michel, H. R. Bosshard, H. Biebuyck, *Langmuir* 1998, 14, 2225-2229.

De nombreux travaux basés sur ce principe ont été menés pour le multiplexage de la technique, c'est-à-dire le dépôt de plusieurs molécules différentes en une seule étape. Trois sont décrits ci-dessous.

L'encreage d'un timbre en PDMS sans motif par « Dip-Pen Nanolithography »^{89,90}

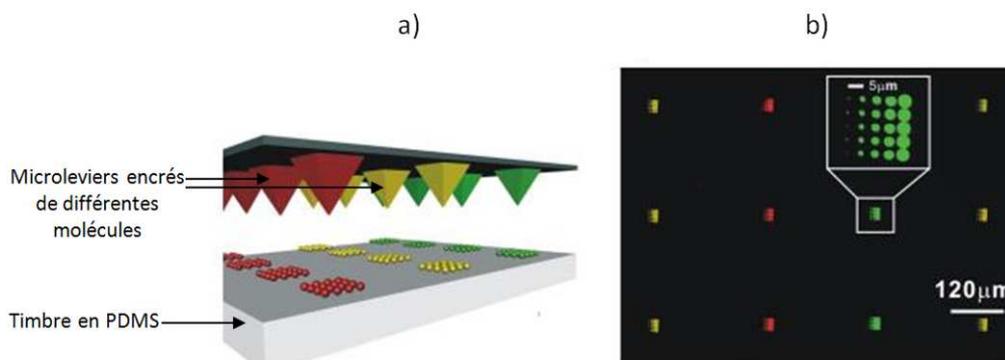


Figure 20 : a) Schéma représentant l'encreage multiplexé d'un timbre en PDMS par contact avec un ensemble de microleviers du « Dip-Pen » encre des différentes molécules (en rouge, jaune et vert) ; b) image en fluorescence d'une biopuce multiplexée de différentes molécules à déposer par un timbre en PDMS encre par « Dip-Pen. (Images adaptées de Z. Zheng *et al.*,¹⁰⁶)

Les microleviers sont encreés avec différentes biomolécules (un type par levier) puis par contact, ces microleviers vont venir déposer les biomolécules sur le timbre en PDMS pour l'encre (Figure 20a). Ce timbre est ensuite utilisé, comme pour le microcontact printing décrit précédemment, pour déposer les molécules sur un substrat. La Figure 20b) illustre le résultat du dépôt par microcontact avec un timbre encre par Dip-Pen Nanolithography.

Pointes AFM en élastomère (« Scanning Probe Contact Printing »)^{91, 92}

Le dépôt par « Scanning Probe Contact Printing » utilise un microlevier possédant une pointe en élastomère (PDMS). Cette pointe est encre des molécules à déposer puis par contact avec la surface, les molécules sont déposées sur le support à l'aide d'un microscope à force atomique (Figure 21b). Ce procédé permet d'obtenir des dépôts de la taille de la pointe AFM (< 1µm). Comme pour le « Dip-Pen » il est possible d'utiliser plusieurs leviers en parallèle pour multiplexer le dépôt. La Figure 21b) illustre le dépôt par « Scanning Probe Contact Printing » d'acide 16- mercapto-hexadécanoïque selon des spots et des lignes sub-micrométriques.

⁸⁶ A. Bernard, J. P. Renault, B. Michel, H. R. Bosshard et E. Delamarche, *Adv. Mater.* 2000, 12, 1067-1070.

⁸⁷ E. Delamarche, A. Bernard, H. Schmid, B. Michel et H. Biebuyck, *Science* 1997, 276, 779-781.

⁸⁸ E. Delamarche, A. Bernard, H. Schmid, A. Bietsch, B. Michel et Hans Biebuyck, *J. Am. Chem. Soc.* 1998, 120, 500-508.

⁸⁹ Z. Zheng, J. W. Jang, G. Zheng et C. A. Mirkin, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2008, 120, 51, 10099-10102.

⁹⁰ Z. Zheng, W. L. Daniel, L. R. Giam, F. Huo, A.J. Senesi, G. Zheng et C. A. Mirkin, 2009, 48, 41, 7626-7629.

⁹¹ H. Zhang, R. Elghanian, N.A. Amro, S. Disawal, et R. Eby, 2004, *Nano Letters*, 4, 9, 1649-1655.

⁹² X. Wang, K.S. Ryu, D.A. Bullen, J. Zou, H. Zhang, C.A. Mirkin et Chang Liu, *Langmuir*, 2003, 19, 8951-8955.

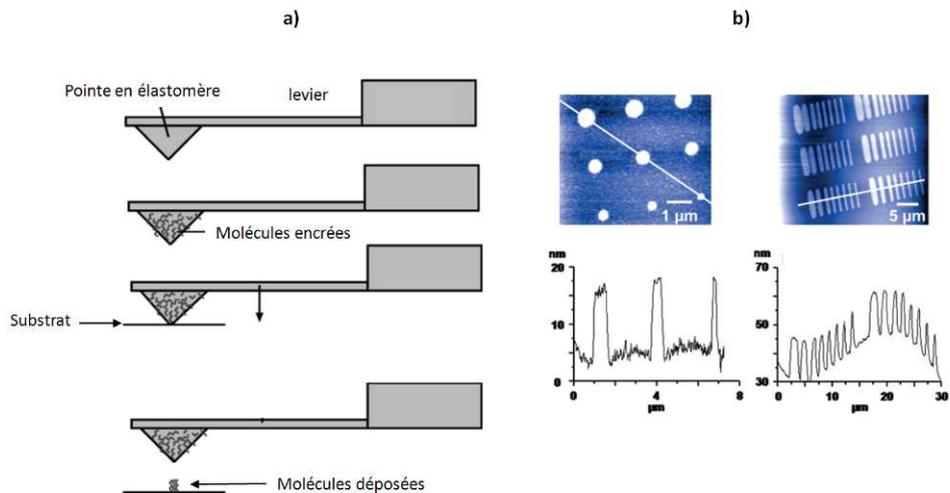


Figure 21 : a) Schéma représentant le dépôt de molécules par AFM avec une pointe en élastomère (PDMS) (Image adaptée de X. Wang *et al.*,¹⁰⁸) ; b) images topographiques de dépôts par Scanning Probe Contact Printing d'acide 16-mercapto-hexadécanoïque (Images adaptées de H. Zhang *et al.*,¹⁰⁷).

Le « Microstamp system »⁹³

Le microstamp permet de déposer 25 échantillons en parallèle et en même temps. Fabriqué en PDMS, le système comporte des réservoirs ainsi que des microcanaux (Figure 22b). Lorsque ces microcanaux sont en contact avec le support, une goutte de molécules est rapidement transférée sur la surface (moins de 1 min) (Figure 22a). Le procédé de dépôt relève de la microfluidique et des principes régissant la mécanique des fluides.⁹⁴

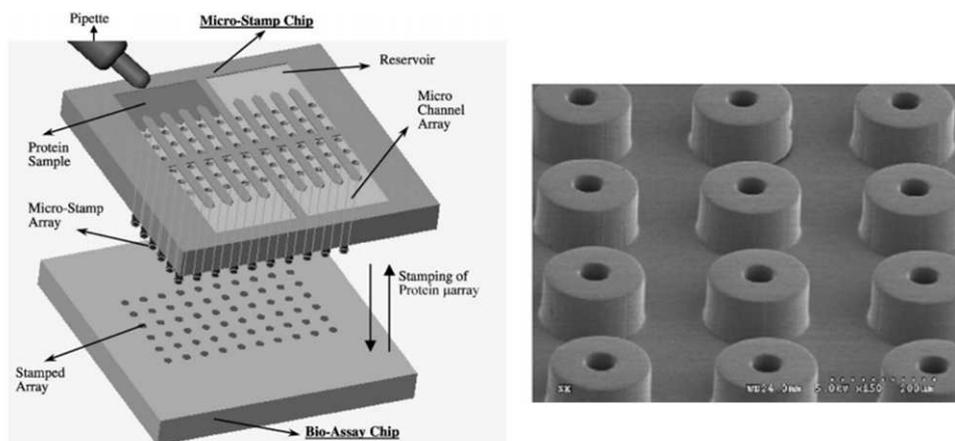


Figure 22 : a) Schéma représentant le « système microstamp » ; b) image issue du microscope électronique à balayage des microcanaux. (Images adaptées de Lin *et al.*,¹⁰⁹)

⁹³ S.C. Lin, F.G. Tseng, H.M. Huang, Yu-Feng Chen, Y.C. Tsai, C.E. Ho et C.C. Chieng, Sensors and Actuators B 99,2004, 99, 1, 174-185.

⁹⁴ S.C. Lin, F.G. Tseng, H.M. Huang, C.Y. Huang, et C.C. Chieng, Journal of Analytical Chemistry, 2001, 371, 2, 202-208.

✓ Adressage sans contactDépôt par jet d'encre

Cette technique de dépôt est inspirée de celle de l'imprimante à jet d'encre.^{95,96} Chaque buse est chargée avec l'échantillon à déposer par aspiration dans une plaque de titration. L'aiguille est ensuite positionnée au-dessus du support et va libérer par actionnement une très faible quantité de solution (de l'ordre du pico et nanolitre) pour former un spot sur la surface (Figure 23). L'éjection de la solution à déposer au travers des très fines buses ou de canaux est réalisée soit par élévation de la température, soit par un actionnement piézoélectrique.⁹⁷ L'élévation thermique a pour inconvénient d'augmenter l'évaporation des échantillons de petit volume et de dénaturer certains échantillons. Ce type de robot permet de déposer une grande densité de spots dans des temps relativement courts. Par exemple le robot Nano PlotterTM, commercialisé par la société Gesim⁹⁸ permet de déposer plus de 2500 spots par cm² en utilisant 1 à 16 buses en parallèle. Chaque aiguille peut réaliser plusieurs centaines de spots sans être rechargée.

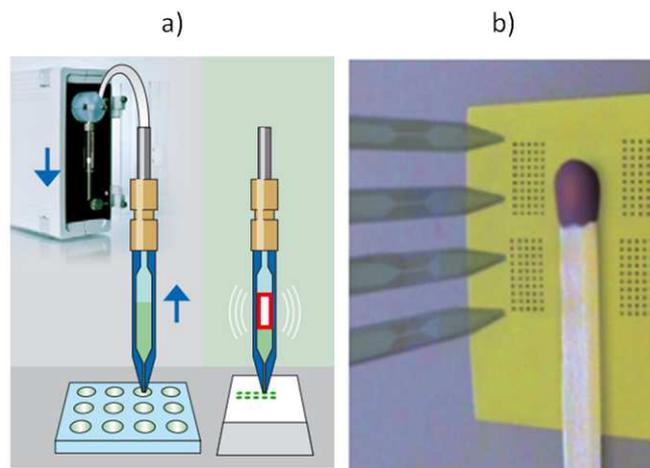


Figure 23 : a) Schéma représentant le chargement des échantillons à déposer par les aiguilles (à gauche) et du dépôt par actionnement piézoélectrique de la buse; b) photo de 4 aiguilles utilisées par le Nano PlotterTM (Images adaptées du site internet <http://www.gesim.de>).

De nombreux travaux ont été réalisés avec cette technologie pour le dépôt de matériel biologique comme l'ADN,⁹⁹ les protéines^{100,101,102} ou même les cellules.^{103,104}

⁹⁵ T. Goldmann, J.S. Gonzalez et J. Biochem. Biophys. Methods, 2000, 42, 105-110.

⁹⁶ J. Xu, M. Lynch, J.L. Huff, C. Mosher, S. Vengasandra et G. Ding, Biomed. Microdevices, 2004, 6, 2, 117-123.

⁹⁷ L.R. Allain, M. Askari, D.L. Stokes, et T. Vo-Dinh, Journal of Analytical Chemistry, 2001, 371, 2, 146-150.

⁹⁸ <http://www.gesim.de>

⁹⁹ T. Goldmann et J.S. Gonzalez, J. Biochem. Biophys. Methods, 2000, 42, 105-110.

¹⁰⁰ F. Turcu, K. Tratsk-Nitz, S. Thanos, W. Schuhmanna, P. Heiduschka et T. Bolan, Biotechnol. Bioeng., 2004, 85, 1, 29-33.

¹⁰¹ A. Roda, M. Guardigli, C. Russo, P. Pasini et M. Baraldini, BioTechniques, 2000, 28, 492-486.

¹⁰² L. Pardo, W.C. Wilson, et T. Boland, Langmuir, 2003, 19, 1462-1466.

¹⁰³ J. Merrin, S. Leibler, et J.S. Chuang, PLoS ONE, 2, 7, e663.

¹⁰⁴ T. Xu, J. Jin, C. Gregory, J.J. Hickman et T. Boland, Biomaterials, 2005, 26, 93-99.

Dépôt par « electro spray »

Le dépôt par « electro spray » initialement développé par Zeleny *et al*¹⁰⁵ consiste à éjecter la solution à déposer depuis une aiguille vers le support en appliquant une différence de potentiel entre la solution et la surface de dépôt. Le liquide nébulisé se dépose sous forme de fines gouttelettes. Morozov *et al*¹⁰⁶ ont démontré qu'il était possible de structurer le dépôt par « electro spray » au travers d'un masque pour déposer les molécules selon des motifs précis (Figure 24).

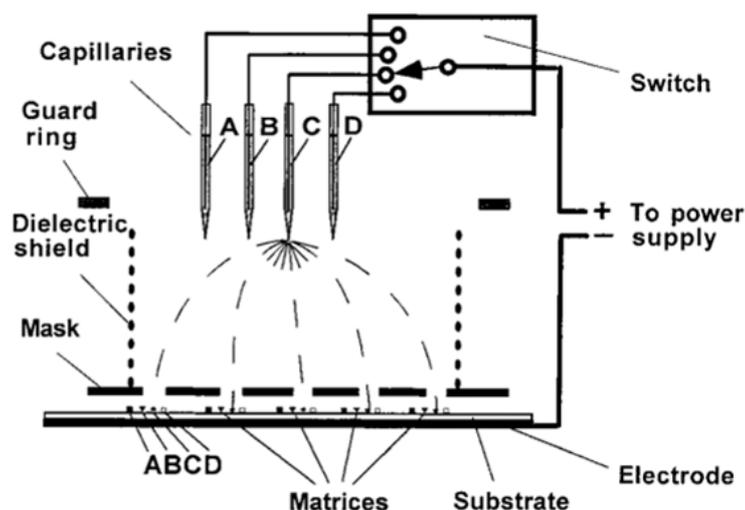


Figure 24 : Schéma représentant le principe de l'électrospray de solution au travers d'un masque par application d'une différence de potentiel entre la solution et la surface de dépôt.¹²⁵

En 2001, Moerman *et al.*,¹⁰⁷ ont développé une technique plus simple et sans masque de dépôt par « electro spray » appelé « Scanning Probe Microscopy » (SPM). Cette technique utilise une nano-pipette, qui, au lieu de libérer la solution en spray, la libère par goutte individuelle (Figure 25a). Le dépôt de la goutte est contrôlé par le champ électrique et par la distance entre la pipette et la surface (Figure 25b). La Figure 25 illustre un exemple de dépôt de lactate déshydrogénase par SPM.

¹⁰⁵ J. Zeleny, The Physical Review, 1914, 3 (2), 69

¹⁰⁶ V.N. Morozov et T.Y. Morozova, Anal. Chem. 1999, 71, 3110-3117.

¹⁰⁷ R. Moerman, J. Frank, J.C.M. Marijnissen, T.G.M Schalkhammer, et G.W.K. van Dedem, Analytical Chemistry, 2001, 73, 10, 2183-2189.

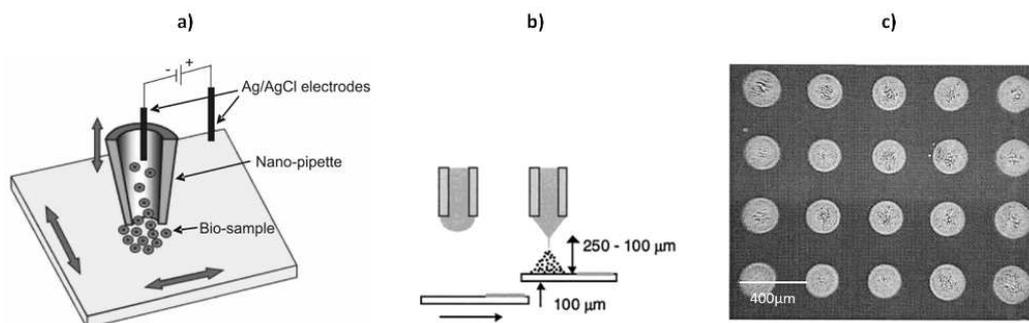


Figure 25 : Schéma représentant a) le principe de dépôt par « Scanning Probe Microscopy »¹⁰⁸, b) le contrôle de libération des gouttes en fonction de la distance entre la nano-pipette et la surface ; c) exemple de dépôt de lactate déshydrogénase par SPM^{106, 107}.

Dépôt par activation laser (LIFT)

Pour le dépôt par activation laser (en anglais « Laser Induced Forward Transfer ») (LIFT), un film mince déposé sur un support activable est excité par un laser. Au point d'impact du laser sur le support, une goutte de solution est éjectée du film mince pour être déposée sur la surface placée en dessous du film (Figure 26 a). Le volume de la goutte ainsi déposé, est lié directement à l'énergie libérée par le laser (Figure 26b). Ainsi la taille des spots peut varier de quelques dizaines de nanomètres à plusieurs centaines de micromètres. Cette technique permet le dépôt d'une très grande variété de matériaux liquides et même solides sans les dénaturer : protéines¹⁰⁹, ADN¹¹⁰, cellules souches embryonnaires,¹¹¹ polystyrène.¹¹² En 2005, Colina *et al.*,¹¹³ ont prouvé l'efficacité de cette technique pour la conception de biopuces à ADN. La qualité des résultats obtenus après hybridation sont équivalents à ceux résultant d'un dépôt par robot à aiguilles (Figure 26 c) et d)).

¹⁰⁸ A. Bruckbauer, L.M. Ying, A.M. Rothery, D.J. Zhou, A.I. Shevchuk, C. Abell, Y.E. Korchev, et D. Klenerman, *Journal of the American Chemical Society*, 2002, 124, 30, 8810-8811.

¹⁰⁹ J.A. Barron, H.D. Young, D.D. Dlott, M.M. Darfler, D.B. Krizan, et B.R. Ringe, *Proteomics*, 2005, 5, 4138-4144.

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

¹¹¹ N.T. Kattamis, P.E. Purnick, R. Weiss, C.B. Arnolda, *Applied Physics Letters*, 2007, 91, 171120

¹¹² A. Palla-Papavlu, V. Dinca, I. Paraico, A. Moldovan, J. Shaw-Stewart, C.W. Schneider, E. Kovacs, T. Lippert et M. Dinescu, *Journal of Applied Physics*, 2010, 108, 033111-1;033111-6.

¹¹³ M. Colina, P. Serra, J.M. Fernandez-Pradas, L. Sevilla et J.L. Morenza, *Biosensors and Bioelectronics*, 2005, 20, 8, 1638-1642.

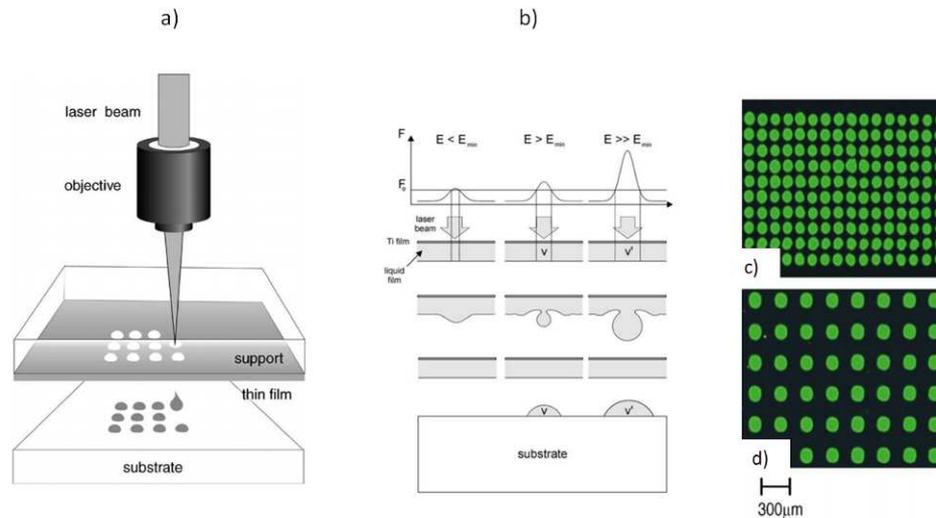


Figure 26 : Schéma représentant a) le principe du dépôt par activation laser, b) la taille des spots déposés en fonction de l'énergie libérée par le laser ; image en fluorescence c) après hybridation d'une biopuce à ADN fabriquée par dépôt par activation laser, d) après hybridation d'une biopuce à ADN fabriquée par robot à aiguilles. (Images adaptées des travaux de Colina *et al.*, 2005).

En conclusion, les techniques d'adressage de biomolécules sur des surfaces planes sont nombreuses et variées. On distingue deux grandes catégories de techniques adaptées à la production de biopuces à ADN. D'une part, celles permettant le dépôt d'oligonucléotides synthétiques et celles permettant la synthèse des oligonucléotides directement sur le support. Les critères indispensables à la production de biopuces à ADN sont : la robustesse de la technique, la reproductibilité et le multiplexage des dépôts. Actuellement les méthodes qui répondent au mieux sont les méthodes de synthèse *in situ*. Néanmoins, elles ont pour inconvénient d'être relativement complexes à mettre en œuvre et sont onéreuses. Les méthodes de dépôt d'oligonucléotides synthétiques par un robot à aiguilles ou jet d'encre sont celles utilisées le plus souvent.

B.4. Hybridation des acides nucléiques cibles

L'étape d'hybridation correspond à l'étape où les acides nucléiques cibles issus de l'échantillon à tester, marqués généralement en fluorescence, sont incubés sur les oligonucléotides sondes de la biopuce. L'hybridation entre les cibles et sondes complémentaires est fondée sur les propriétés de complémentarité des bases azotées des nucléotides. Si deux séquences oligonucléotidiques sont complémentaires et antiparallèles elles vont s'hybrider de manière spécifique par des liaisons de faible énergie (liaison hydrogène) s'établissant entre leurs bases azotées. La complémentarité des séquences n'est pas suffisante pour que l'hybridation ait lieu. Les propriétés intrinsèques du milieu réactionnel

(température, pH, concentration en cation monovalent constituant le tampon d'hybridation) sont primordiales pour que l'hybridation ait lieu.^{114,115}

Dans cette partie, nous verrons les points-clés indispensables à l'hybridation ainsi que l'utilité de l'étape de lavage de la puce après l'hybridation.

B.4.a. Conditions d'hybridation

✓ Température d'hybridation

Comme évoqué dans la partie B.1.b, la température de fusion (T_m) est un paramètre clé pour l'hybridation. Dans le cas des biopuces à ADN, les couples sondes-cibles choisis doivent avoir une température de fusion proche pour s'assurer que toutes les réactions d'hybridation puissent avoir lieu dans les conditions fixes de l'hybridation. D'un point de vue expérimental :

- Si la température du milieu réactionnel est supérieure au T_m , les oligonucléotides cibles et les sondes complémentaires ne s'hybrideront pas.
- Si la température du milieu réactionnel est égale ou légèrement inférieure au T_m , il y aura hybridation spécifique, entre oligonucléotides cibles et les sondes complémentaires.
- Si la température est très inférieure au T_m , il y aura hybridation des cibles et sondes complémentaires mais aussi des hybridations non spécifiques (cibles et sondes non complémentaires).

La température de fusion dépend de la longueur du fragment, de la composition en Cytosine et Guanine et de la concentration en ions Na^+ :

- La température de fusion diminue quand la force ionique du milieu diminue (concentration en cations). En effet, en neutralisant une partie des charges négatives des groupements phosphates portés par les acides nucléiques, les cations s'opposent aux forces de répulsion qui existent entre les deux brins. Les cations stabilisent la double hélice entre deux brins complémentaires.
- La température de fusion diminue quand le pH augmente. En effet, à pH alcalin, tous les groupements phosphates exposent une charge négative ainsi les forces électrostatiques de répulsions augmentent. La structure double brin est moins stable.
- La température de fusion diminue en présence d'agents dénaturants (formamide, urée). Ces derniers agissent comme des inhibiteurs compétitifs des interactions hydrogènes qui s'établissent entre les paires de bases

¹¹⁴ S. Russell, L. A. Meadows, R.R. Russell, *Microarray technology in Practice*, 2009, livre édité par Elsevier.

¹¹⁵ A. Relógio, C. Schwagerl, A. Richterl, W. Ansorge1 et J.Valcárcel, *Nucl. Acids Res.*, 2002, 30, 11, e51

complémentaires. Ces composants peuvent servir à diminuer les hybridations non spécifiques ou à « uniformiser » les T_m de séquences très différentes.

✓ Stringence du milieu

La stringence du milieu réactionnel (tampon d'hybridation) désigne les conditions expérimentales de température, de pH et de force ionique permettant l'hybridation entre les oligonucléotides monobrin. La stringence est liée à la température et à la concentration en cations monovalents (Na^+ par exemple). Les conditions sont très stringentes quand la température est élevée, la concentration en Na^+ est faible, tandis qu'elles sont peu stringentes lorsque la température est faible et la concentration en Na^+ est élevée. D'un point de vue expérimental, les conditions très stringentes rendent l'hybridation moléculaire plus difficile et favorisent l'hybridation spécifique alors que les conditions peu stringentes favorisent les hybridations non spécifiques. Les conditions idéales sont un compromis entre les deux.

✓ Le temps d'hybridation

Le temps d'hybridation est également un paramètre très important pour l'hybridation des acides nucléiques cibles sur leurs sondes complémentaires.¹¹⁶ Le temps d'hybridation dépend principalement des concentrations en molécules sondes et cibles et plus particulièrement du ratio entre les deux concentrations. Il est fortement recommandé que les oligonucléotides sondes soient en fort excès par rapport à la concentration en acides nucléiques cibles au risque que l'encombrement stérique empêche l'hybridation spécifique. Le temps doit être suffisamment long afin que les acides nucléiques cibles rencontrent leurs sondes complémentaires. En revanche, des temps d'hybridation trop longs favoriseront les hybridations non spécifiques.

✓ La composition du tampon d'hybridation

Lors de l'hybridation des acides nucléiques cibles sur la biopuce, ces derniers sont contenus dans un tampon permettant de réunir les conditions expérimentales favorisant l'hybridation spécifique tout en limitant l'hybridation non spécifique. C'est pourquoi généralement, les tampons d'hybridation contiennent une forte concentration en sel, détergent... Les plus communs sont décrits ci-dessous¹¹⁷ :

- Le chlorure et citrate de sodium (SSC) est une source de cations monovalents qui interagissent principalement avec les phosphates des acides nucléiques pour diminuer les interactions électrostatiques entre les deux brins oligonucléotidiques et ainsi augmenter la stabilité des doubles brins.
- Le formamide et le dithiothreitol (DTT) sont des composés organiques qui réduisent la stabilité thermique des liaisons hydrogènes entre cibles et sondes.

¹¹⁶ D.R. Dorris, A. Nguyen, L. Gieser, R. Lockner, A. Lublinsky, M. Patterson, E. Touma, T.J. Sendera, R. Elghanian et A. Mazumder, BMC Biotechnology, 2003, 3, 1-6.

¹¹⁷ . Russell, L. A. Meadows, R.R. Russell, Microarray technology in Practice, 2009, livre édité par Elsevier.

Ils permettent de favoriser les hybridations spécifiques en abaissant la température.

- L'EDTA est un cation divalent chélateur de calcium Ca^{2+} et magnésium Mg^{2+} . L'effet de ce cation permet de favoriser l'hybridation spécifique.
- ADN de sperme de saumon, polyA, Denhardt's sont des agents dits « saturants » qui permettent de limiter les hybridations non spécifiques et les interactions non spécifiques avec la surface.

B.4.b. Lavage de la biopuce après hybridation

Après l'étape d'hybridation, la biopuce à ADN est lavée. Cette étape indispensable permet d'éliminer tous les acides nucléiques non hybridés ou hybridés non spécifiquement. Elle contribue également à réduire le bruit de fond de la puce, c'est-à-dire les interactions possibles entre les cibles marquées et la surface de la puce. Ceci provoque une augmentation du bruit de fond qui serait préjudiciable pour l'analyse des signaux. Généralement, cette étape est constituée de plusieurs immersions de la puce dans des tampons de lavage avec ou sans agitation. Le premier bain est réalisé dans un tampon dont la stringence est équivalente à celle du tampon utilisé pendant l'hybridation. Puis la stringence des bains suivants augmente progressivement. Après cette étape de lavage, la biopuce peut être lue.

En conclusion, nous avons vu que l'hybridation entre deux acides nucléiques sondes et cibles ne relève pas uniquement de la complémentarité de leurs séquences. La température, le temps d'hybridation, ainsi que les éléments constituant le tampon d'hybridation sont des paramètres thermodynamiques et cinétiques indispensables à l'hybridation. D'un point de vue expérimental, si les conditions d'hybridation ne sont pas optimales, certaines entités biologiques présentes dans l'échantillon et à identifier ne le seront pas. C'est ce que l'on appelle des résultats « faux négatifs ». De plus, les conditions de lavage de la biopuce après l'étape d'hybridation sont également primordiales pour ne pas fausser l'interprétation des résultats. Elles ont notamment pour but d'éviter les résultats dits « faux positifs » liés à la présence d'hybridations non spécifiques et de limiter le bruit de fond de la puce.

B.5. Méthode de lecture

La « lecture de la biopuce » vise à identifier les cibles hybridées sur la biopuce pour interpréter le résultat de l'analyse. Pour cela, l'hybridation doit être identifiée et transformée en un signal analysable par un « transducteur ». A ce jour la méthode de détection de référence pour les biopuces à ADN est la fluorescence, lue par un scanner de fluorescence. Néanmoins, cette méthode de biodétection n'est pas la seule. En effet, il existe d'autres méthodes de détection avec et sans marquage de l'hybridation qui seront décrites dans cette partie.

B.5.a. Les méthodes de détection avec marquage

✓ La fluorescence

La fluorescence est la méthode de détection la plus utilisée pour les biopuces à ADN. C'est une méthode très sensible et non destructive. Chaque oligonucléotide cible incubé sur la puce a préalablement été marqué par un ou plusieurs fluorophores. Les deux fluorophores les plus employés sont principalement la Cyanine 3 (Cy3) et la Cyanine 5 (Cy5), car ils possèdent des rapports quantiques élevés et peuvent être incorporés aux biomolécules cibles, par couplage chimique ou bien pendant une amplification par PCR en utilisant des amorces marquées.¹¹⁸ Comme ils possèdent des spectres d'absorption et d'émission distincts, ces deux fluorophores peuvent être utilisés simultanément pour un double marquage, particulièrement intéressant pour les tests multiparamétriques.

Lorsqu'un fluorophore est excité par une source lumineuse d'une longueur d'onde identique à celle de sa longueur d'onde d'excitation, il se retrouve dans un état électroniquement excité. Son retour à l'état fondamental se traduit alors par une émission de fluorescence selon le diagramme de Jablonski (Figure 27a).

La Figure 27b) illustre un exemple de lecteur de fluorescence commercialisé par la société Innopsys pour la lecture de biopuces à fluorescence au format d'une lame de verre.

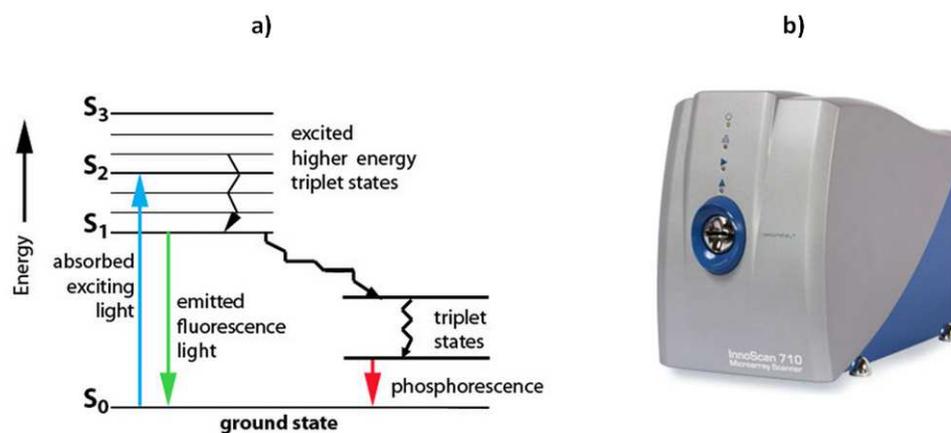


Figure 27 : a) Diagramme de Jablonski décrivant les différents processus de désexcitation possibles suite à l'excitation d'un composé par absorption d'un photon. Les processus non-radiatifs sont représentés par des flèches ondulées, les processus radiatifs par des flèches droites.¹¹⁹ b) Photographie d'un scanner de fluorescence commercialisé par la société Innopsys.¹²⁰

Toutefois, même si cette méthode de détection est actuellement très largement utilisée, elle nécessite un appareillage complexe et coûteux pour l'excitation et la détection du signal

¹¹⁸ M. Bally, M. Halter, J.Vörös, H. M. Grandin, Surface and Interface Analysis, 2006, 38, 11,1442-1458.

¹¹⁹ site internet <http://web.uvic.ca>.

¹²⁰ site internet <http://www.innopsys.com/>

émis. De plus, les phénomènes de photo-blanchiment, « quenching » ainsi que la fluorescence intrinsèque du support peuvent poser problème pour la détection de l'événement de l'hybridation.

✓ La chimiluminescence

Cette méthode de détection repose sur une réaction chimique ayant pour conséquence la production de lumière. La molécule produite par la réaction se trouve dans un état excité et lors de son retour à l'état fondamental elle émet une onde électromagnétique. La réaction la plus connue est l'oxydation du luminol (5-amino-2,3-dihydrophthalazine-1,4-dione) en présence de peroxyde (Figure 28).^{121,122}

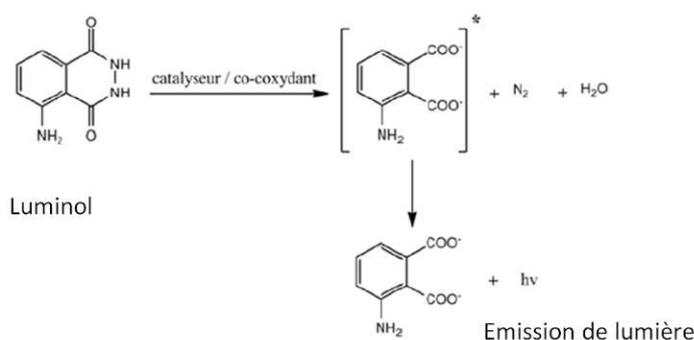


Figure 28 : Mécanisme d'oxydation du luminol en solution aqueuse.

Cette méthode de détection a largement été décrite dans la littérature pour la détection d'une hybridation entre deux oligonucléotides.^{123, 124, 125, 126.}

✓ La colorimétrie

La détection par colorimétrie est très utilisée pour les tests dit « Point of Care » (POC). Simple d'utilisation et peu coûteuse, elle permet de donner un premier résultat en quelques minutes. De nombreux « immuno-tests » sont colorimétriques comme par exemple le test de grossesse ou encore certains tests de détection virale et bactérienne (VIKIA® Rota-Adeno, HIV-1/2).¹²⁷

Il existe deux approches pour la détection par colorimétrie : soit le marquage est réalisé par une particule colorée soit par une enzyme catalysant la production d'un produit

¹²¹ H.O.Albrecht H.O., *Chemie- international journal of research in physical chemistry & chemicalphysics*, 1928, 136, 321-330

¹²² Blum L.J., *Bio- and chemi-luminescent sensors*, Livre édité par World Scientific en 1997

¹²³ M.S. Urdea, B.D. Warner, J.A. Running, M. Stempien, J. Clyne et T. Horn, *Nucl. Acids Res.*, 1988, 16, 11, 4937-4956.

¹²⁴ A. Jayne, A. Batki, C. Hynd et , L.J. Krick, *Analytical Biochemistry*, 1985, 151,1 205-209.

¹²⁵ B.J. Cheek, A.B. Steel, M.P. Torres, Y-Y. Yu, et H. Yang, *Anal. Chem.*, 2001, 73, 24, 5777-5783.

¹²⁶ W. Fang, M. Chao, Z. Xin, L. Chuanyan, D. Yan et H. Nongyue, *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 2012, 8, 5, 786-790.

¹²⁷ bioMérieux, www.biomerieux.fr

coloré. La plupart de ces tests POC colorimétriques reposent sur un marquage par des nanoparticules d'or.^{128,129,130} Concernant les détections par une enzyme catalysant la production d'un produit coloré, Petersen et *al.*, en 2007¹³¹ puis Cretich et *al.* en 2010¹³² ont respectivement utilisé des marqueurs enzymatiques pour la détection d'hybridations oligonucléotidiques sur gel d'agarose et sur nitrocellulose. Ce type de supports poreux est particulièrement adapté à la détection par colorimétrie car ils permettent de retenir le précipité coloré formé sur le support. Néanmoins, ces techniques de marquage sont fréquemment associées à des problèmes de bruit de fond et à un manque de sensibilité, ce qui peut s'avérer particulièrement problématique pour la conception de biopuces à ADN.

✓ Les méthodes magnétiques

La détection par méthodes magnétiques implique que chaque oligonucléotide cible incubé sur la puce soit marqué par une particule magnétique généralement nanométrique. L'identification de l'hybridation est faite par la détection du champ magnétique généré par cette particule. La lecture s'effectue à l'aide d'un capteur de champ magnétique suffisamment sensible pour mesurer le champ créé.¹³³ Cette technique de détection a déjà été décrite pour la détection de l'hybridation.^{134,135,136}

B.5.b. Les méthodes de détection sans marquage

Certaines méthodes de détection dites sans marquage permettent de s'affranchir du marquage des cibles pour l'identification de l'hybridation. Dans cette partie seront décrites les méthodes de détection sans marquage de l'hybridation basées sur des principes mécaniques et optiques.

✓ Les méthodes mécaniques

Deux méthodes de détection mécanique sans marquage sont développées : la microbalance à quartz et les micro-poutres.

• *Détection par microbalance à quartz*

Le principe de détection par la microbalance à quartz (QCM) est basé sur le phénomène de résonance mécanique. Un cristal de quartz (matériau piézoélectrique) est placé en résonance mécanique par application d'une tension alternative grâce à deux électrodes de

¹²⁸ X. Mao, Y. Ma, A. Zhang, L. Zhang, L. Zeng et G. Liu, *Analytical Chemistry*, 2009, 81, 4, 1660-1668

¹²⁹ J. Aveyard, M. Mehrabi, A. Cossins, H. Braven et R. Wilson, *Chemical Communications*, 2007, 41, 4251-4253

¹³⁰ R. Aveyard, B.P. Binks et J.H. Clint, *Analytical Chemistry*, 2003, 75, 16, 4155-4160

¹³¹ Petersen J. et al., *Analytical Biochemistry*, 2007, 360, 1, 169-171.

¹³² M. Cretich, V. Sedin, F. Damin, M. Pelliccia, L. Sola et M. Chiari, *Analytical Biochemistry*, 2010, 397, 1, 84-88.

¹³³ C.R. Tamanaha*, S.P. Mulvaney, J.C. Rife, L.J. Whitman, *Biosensors and Bioelectronics*, 2008, 24, 1-13.

¹³⁴ S. Katsura, T. Yasuda, K. Hirano, A. Mizuno et S. Tanaka, *Supercond. Sci. Tech.*, 2001, 14, 1131-1134.

¹³⁵ J.C. Rifea, M.M. Millera, P.E. Sheehana, C.R. Tamanahaa, M. Tondrab et L.J. Whitman, *Sensors and Actuators A: Physical* 2003, 107, 3, 1, 209-218.

¹³⁶ M.M. Miller, P.E. Sheehan, R.L. Edelstein, C.R. Tamanaha, L. Zhong, S. Bounnak, L.J. Whitman et R.J. Colton, *J. Magn. Magn. Mater.* 2001, 225, 138-144.

contact. Ce quartz est utilisé comme support de l'interaction biologique et sa fréquence de résonance dépend de sa masse totale. Lorsqu'il entre en résonance, l'adsorption de biomolécules à sa surface va entraîner un changement de la masse totale du quartz et la fréquence de résonance va diminuer. Lorsque le quartz est fonctionnalisé avec des molécules sondes, cette technique de détection sans marquage permet de détecter une interaction ou une hybridation cibles-sondes. Cette technique a largement été décrite pour la détection de l'hybridation entre oligonucléotides sondes et cibles et la conception de biocapteurs.^{137,138,139,140,141,142,143} Cependant le multiplexage de l'analyse est réduit au nombre de chambres microfluidiques (4 ou 6).

La Figure 29 a) représente un exemple d'une microbalance à quartz à 4 cellules fluidiques qui peuvent être utilisées en série ou en parallèle et la Figure 29 b) est un schéma représentant un quartz vu de dessus et de dessous.

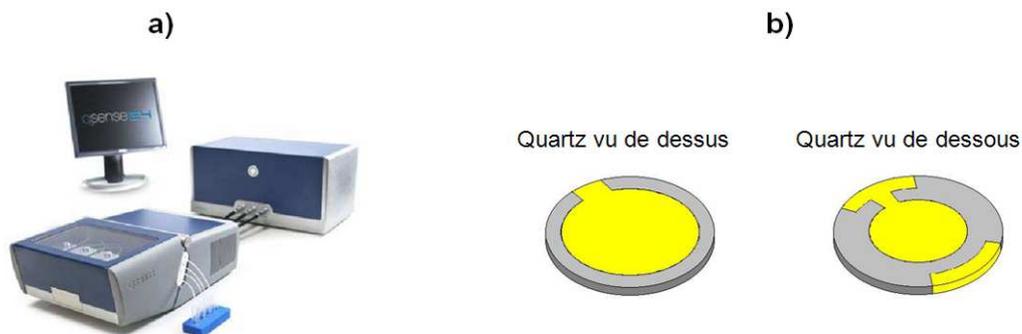


Figure 29 : a) Photographie d'une microbalance à quartz (Q-SENSE E4) ; b) schéma représentant un quartz vu de dessus et de dessous, les électrodes sont représentées en jaune et le quartz en gris. (Images adaptées du site internet <http://www.q-sense.com>).

- *Détection par micro-poutre*

Le principe de détection par micro-poutres¹⁴⁴ repose sur la mesure de la déflexion d'une poutre lors de l'accrochage des molécules à sa surface. Dans le cas où les biomolécules sondes sont immobilisées à la surface des poutres, l'interaction cible-sonde entraîne un ajout de masse sur la poutre qui modifie sa fréquence de résonance (Figure 30a). La déflexion de la poutre peut être mesurée soit par un élément piézorésistif¹⁴⁵ (Figure 30b) qui délivre une

¹³⁷ Y. Okahata, Y. Matsunobu, K. Ijio, M. Mukae, A. Murakami et K. Makino, J. Am. Chem. Soc., 1992, 114, 21, 8299-8300.

¹³⁸ F. Caruso, E. Rodda, D.N. Furlong, K. Niikura et Y. Okahata, Anal. Chem., 1997, 69, 11, 2043-2049.

¹³⁹ Y. Okahata, M. Kawase, K. Niikura, F. Ohtake, H. Furusawa et Y. Ebara, Anal. Chem., 1998, 70, 7, 1288-1296.

¹⁴⁰ F. Höök, A. Ray, B. Nordén et B. Kasemo, Langmuir, 2001, 17, 26, 8305-8312.

¹⁴¹ H. Tai Hwan, K. Sunhee, L. Geunbae et K. Kwan, Biosensors and Bioelectronics, 2004, 20, 2, 15, 378-389.

¹⁴² C.Yaoa, T. Zhub, J. Tang, R.Wu, Q. Chen, M. Chen, B. Zhang, J. Huang et W. Fu, Biosensors and Bioelectronics, 2008, 23, 6, 879-885.

¹⁴³ T.J. Zwang, K. Singh, M.S. Johal, et C.R. Selassie, J. Med. Chem., 2013, 56, 4, 1491-1498.

¹⁴⁴ SK Vashist - J. of Nanotechnology, 2007 - azonano.com

¹⁴⁵ G.Y. Kanga, G.Y. Han, J.Y. Kang et I-H. Cho, H-H. Park, S-H. Paek et T.S. Kim, Sensors and Actuators B: Chemical, 2006, 117, 2, 332-338.

tension proportionnelle à la déformation soit par un faisceau laser pointé sur la poutre et à un photodétecteur¹⁴⁶ (Figure 30c).

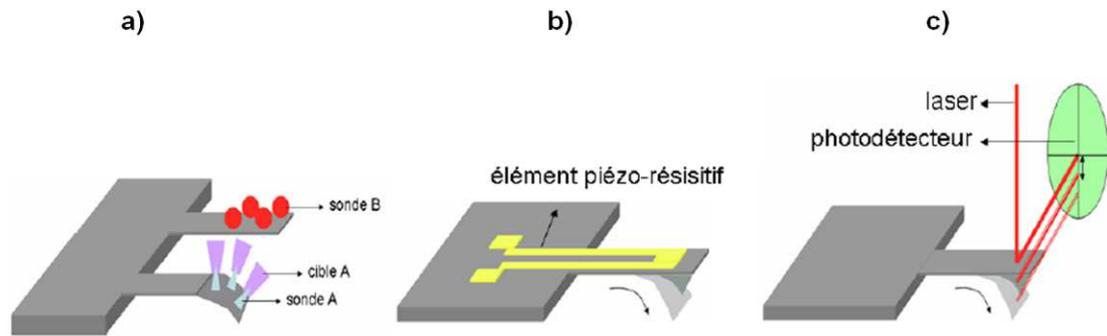


Figure 30 : a) schéma représentant la déflexion de la micropoutre lors de la fixation ciblesA-sondesA ; schéma d'une poutre dont la déflexion est mesurée b) par un élément piézo-résistif ; c) par un photodétecteur.¹⁴⁷

Cette méthode de biodétection est décrite dans la littérature notamment pour la détection de l'hybridation entre oligonucléotides.^{148,149,150,151}

✓ Les méthodes optiques

Les méthodes de détection optique sans marquage des cibles sont très nombreuses. Dans cette partie seront présentées : le système de résonance plasmonique de surface, l'ellipsométrie, la réflectométrie, l'interférométrie et la diffraction.

- *La détection par résonance plasmonique de surface*

La résonance plasmonique de surface (SPR) est une technique optique permettant la détection en temps réel et sans marquage des interactions biomoléculaires. Le support sur lequel sont immobilisées les molécules sondes est une surface recouverte d'une fine couche métallique généralement de l'or ou de l'argent. La surface en argent est très rare à cause de son oxydation. à cause de son oxydation. Lorsqu'une lumière monochromatique incidente est réfléchi sur la face arrière de la couche métallique à l'angle de réflexion total, une partie de l'énergie de cette onde est transmise à travers la couche métallique sous forme d'onde évanescente dans le milieu diélectrique généralement formé par le milieu et les sondes biologiques (Figure 31). L'interaction cible-sonde provoque une modification de l'indice optique du diélectrique et modifie ainsi les conditions de réflexion totale.

¹⁴⁶ K.Y. Gfeller, N. Nugaeva et M. Hegner, *Biosensors and Bioelectronics*, 2005, 21, 3, 528-533.

¹⁴⁷ J.C. Cau, Thèse INSA, Toulouse, 2009

¹⁴⁸ R. Mukhopadhyay, M. Lorentzen, J. Kjems et F. Besenbacher, *Langmuir*, 2005, 21, 18, 8400-8408.

¹⁴⁹ R. Raiteri, M. Grattarola, H-J Butt et P. Skládal, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2001, 79, 2-3, 115-126.

¹⁵⁰ S.M. Yang, C. Chang, T.I. Yin et P.L. Kuo, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2008, 130, 2, 674-681.

¹⁵¹ C-W Huang, H-T Hsueh, Y-J Huang, H-H Liao, H-H Tsai, Y-Z Juang, T-H Lin, S-S Lu, C-T Lin, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2013, 181, 867-873.

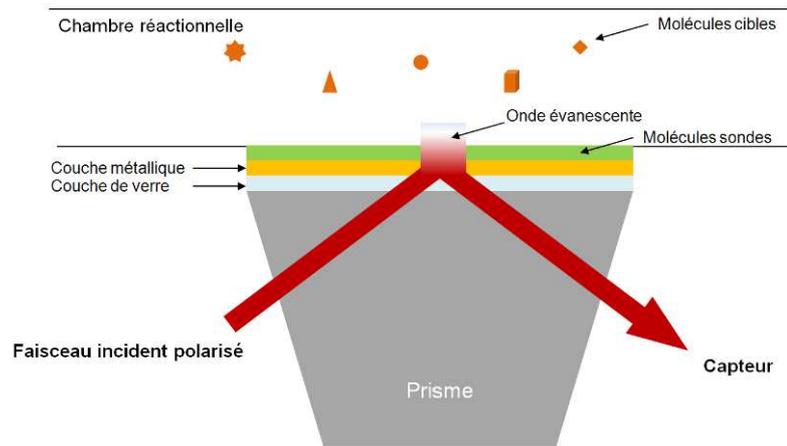


Figure 31 : Représentation schématique d'un dispositif SPR (Genoptics).

La détection est mesurée soit par l'étude de variations de l'angle de résonance au cours du temps, (Résonance Plasmonique de Surface (SPR) dite «classique»), soit par l'étude des variations de réflectivité induites par la variation d'angle au cours du temps (Résonance Plasmonique de Surface par imagerie (SPRi)). Cette technique de biodétection largement décrite pour la détection de l'hybridation oligonucléotidique^{152,153,154} peut être multiplexée¹⁵⁵, à basse et moyenne densité. Le multiplexage de la détection sur un seul prisme est réalisé soit par l'utilisation de canaux fluidiques sur le prisme (Figure 32a), soit en déposant les sondes sous forme de spots directement à la surface du prisme (Figure 32b). De plus, cette technique permet de déterminer les constantes d'affinité entre les molécules.

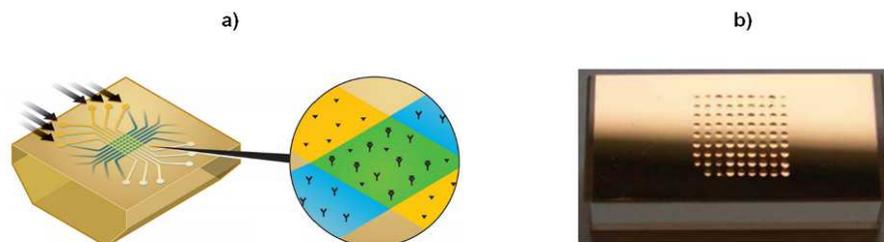


Figure 32 : a) Représentation schématique de la cellule fluidique du ProteOn XPR36¹⁵⁶ ; b) Photographie représentant un prisme recouvert de spots de différentes sondes¹⁵⁷.

¹⁵² K.A. Peterlinz R.M. Georgiadis, T.M. Herne et M.J. Tarlov, J. Am. Chem. Soc., 1997, 119,14, 3401-3402.

¹⁵³ A.J. Thiel, A.G. Frutos, C.E. Jordan, R.M. Corn et L.M. Smith, Anal. Chem., 1997, 69, 24, 4948-4956.

¹⁵⁴ B. P. Nelson, T.E. Grimsrud, M.R. Liles, R.M. Goodman, et R.M. Corn, Anal. Chem., 2001, 73, 1, 1-7.

¹⁵⁵ C. Corne, J-B Fiche, D. Gasparutto, V. Cunin, E. Suraniti, A. Buhot, J. Fuchs, R. Calemczuk, T. Livache et A. Favier, Analyst, 2008,133, 1036-1045.

¹⁵⁶ www.bio-rad.com

¹⁵⁷ Thèse Flavien Pillet, thèse INSA, Toulouse, 2010.

- *La détection par ellipsométrie*

Le principe de l'ellipsométrie consiste à éclairer la surface de l'échantillon par une onde monochromatique polarisée et de détecter les modifications de la polarisation de l'onde réfléchie (Figure 33). Des modèles sur les interactions onde-matière permettent de déduire les indices et les épaisseurs des couches constituant le substrat.

Différents travaux sont décrits dans la littérature sur la détection de l'hybridation entre oligonucléotides sondes et cibles par ellipsométrie.^{158,159,160}

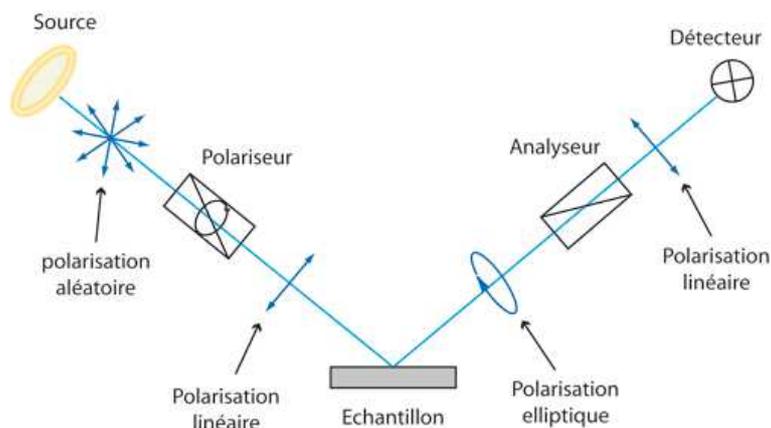


Figure 33 : Schéma représentant le principe de l'ellipsométrie.

- *La détection par réflectométrie*

Le principe de la réflectométrie est basé sur les réflexions multiples de la lumière d'un substrat composé de multicouches. Lorsque le substrat composé d'une superposition de couches d'indices optiques et d'épaisseurs différents est éclairé avec une lumière blanche, cette dernière est partiellement réfléchiée par chaque couche. L'onde réfléchiée par le système multicouches correspond à l'interférence d'ondes déphasées les unes par rapport aux autres. Son amplitude dépend de la longueur d'onde utilisée. Sur ce principe, il est possible de détecter une hybridation entre deux oligonucléotides.^{161,162,163} En effet, lorsque le support est fonctionnalisé avec des oligonucléotides sondes, l'hybridation des cibles sur ces sondes va entraîner l'ajout d'une couche modifiant ainsi le spectre de réflexion (Figure 34).

¹⁵⁸ G. Demirel, M.O. Çağlayan, B. Garipcan et E. Pişkin, Surface Science, 2008, 602, 4, 952-959.

¹⁵⁹ N. C. Hoai Le, V. Gubala, R.P. Gandhiraman, C. Coyle, S. Daniels et D.E. Williams, Anal Bioanal Chem, 2010, 398, 1927-1936.

¹⁶⁰ V. V. Vlasov, A. N. Sinyakov, D. V. Pyshnyi, S. V. Ryhlitskii, V. N. Kruchinin, E. V. Spesivtsev, I. A. Pyshnaya, E. V. Kostina, E. D. Dmitrienko et V. P. Bessmel'tsev, Optoelectronics, Instrumentation and Data Processing, 2011, 47, 5, 472-481.

¹⁶¹ M. Sauer, A. Brecht, K. Charissé, M. Maier, M. Gerster, I. Stemmler, G. Gauglitz et Ernst Bayer, Anal. Chem., 1999, 71, 14, 2850-2857.

¹⁶² G. Proll, L. Steinle, F. Proll, M. Kumpf, B. Moehrle, M. Mehlmann et G. Gauglitz, Journal of Chromatography A, 2007, 1161 2-8.

¹⁶³ T. Gao, J. Lu et L.J. Rothberg, Anal. Chem. 2006, 78, 6622-6627

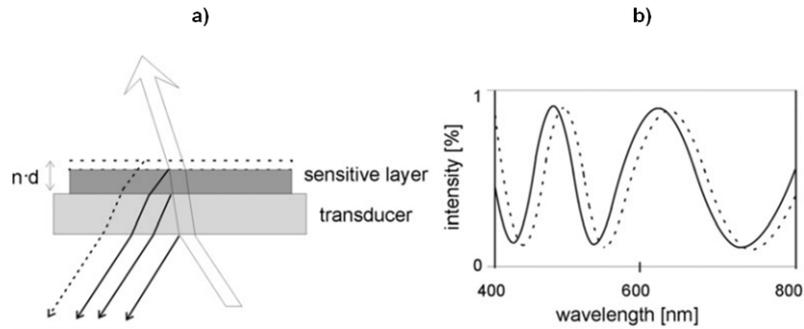


Figure 34 : a) Schéma représentant le principe d'un phénomène de réflectométrie ; b) spectre obtenu avant (en trait plein) et après hybridation (en trait discontinu). (Images adaptées des travaux de G. Proll *et al.*, 2007)

- *La détection par interférométrie*

Ce principe de détection est basé sur l'interférence entre différentes ondes lumineuses. Si l'on s'intéresse à l'exemple de l'interféromètre de Young,¹⁶⁴ chaque guide d'onde (canaux) fonctionnalisé avec des biomolécules sondes se comporte en sortie comme deux sources lumineuses qui émettent dans l'espace libre et qui interfèrent entre elles sur un écran. Dans le cas où il y a interaction de molécules cibles sur les guides d'ondes fonctionnalisés avec des biomolécules sondes, la figure d'interférences sera modifiée (Figure 35).

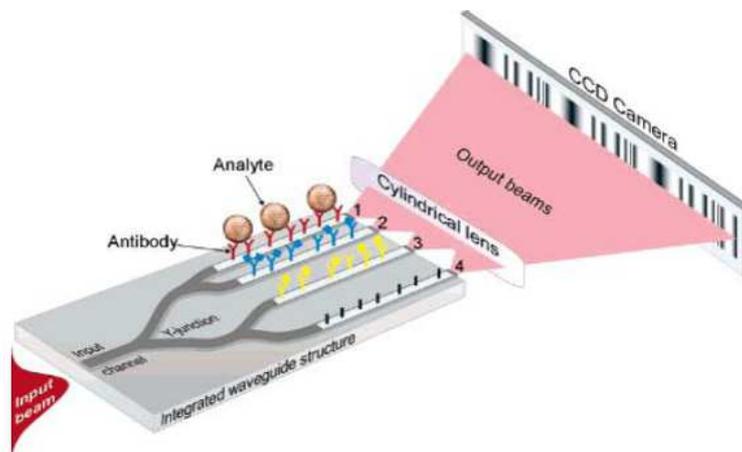


Figure 35 : Principe de détection représentant un capteur basé sur l'interféromètre de Young composé de plusieurs branches et donc mesurant plusieurs interactions. (Images adaptées de A. Ymeti *et al.*, 2007).

- *La détection par diffraction*

Une structure périodique (comme un réseau de lignes) éclairée par une onde plane monochromatique transforme cette onde en un faisceau réfléchi et en des faisceaux diffractés suivant des ordres caractérisés par des angles d'émergences différents appelés figures de diffraction (Figure 36). L'amplitude de ces ordres étant dépendante de l'arrangement

¹⁶⁴ A. Ymeti, J. Greve, P.V. Lambeck, T. Wink, W.F. Stefan, A.M. Tom, R.R. Wijn, R.G. Heideman, V. Subramaniam et J.S. Kanger, *Nano Lett.*, 2007, 7, 394-397.

périodique du réseau (période p , largeur l et hauteur h des lignes), toute variation de structure modifiera la figure de diffraction. Sur ce principe, l'hybridation d'acides nucléiques cibles sur un réseau de sondes modifiant l'arrangement périodique de ce réseau changera la figure de diffraction.

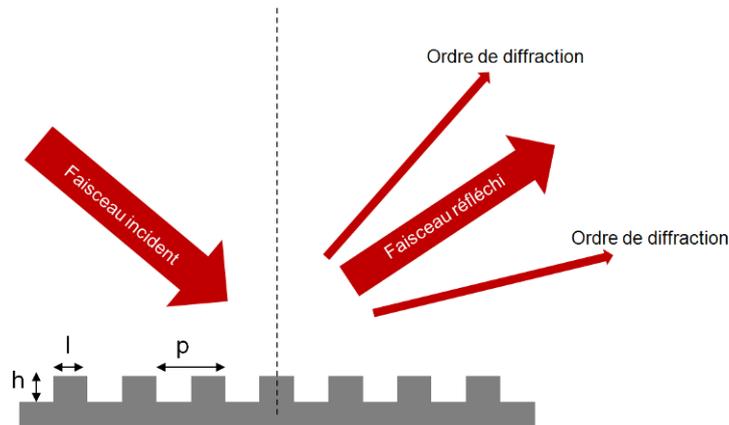


Figure 36 : Schéma représentant le principe de diffraction d'une source lumineuse par un réseau de lignes périodiques.

Les premiers travaux sont décrits par Tsay *et al.*,¹⁶⁵ en 1991. Ils réalisent un réseau de lignes micrométriques d'anticorps « actifs » à partir d'une couche homogène d'anticorps. Pour cela, les auteurs inactivent des lignes d'anticorps par illumination avec un rayonnement ultraviolet à travers un masque, ce dernier possédant un enchaînement périodique de lignes opaques et transparentes. Puis le réseau est incubé avec l'antigène spécifique de l'anticorps. En mesurant l'intensité diffractée à l'ordre 1 avant puis après l'interaction, un signal de diffraction initialement absent apparaît après l'incubation (Figure 36). L'empilement des molécules cibles sur les lignes d'anticorps actifs a créé un réseau de lignes diffractant la lumière. Ces travaux valident ce principe de détection de l'interaction sans marquage.

¹⁶⁵ Y. G. Tsay, C. I. Lin, J. Lee, E. K. Gustafson, R. Appelqvist, P. Maggini, R. Norton, N. Teng, et D. Chariton, CLIN.CHEM., 1991, 37, 9, 1502-1505.

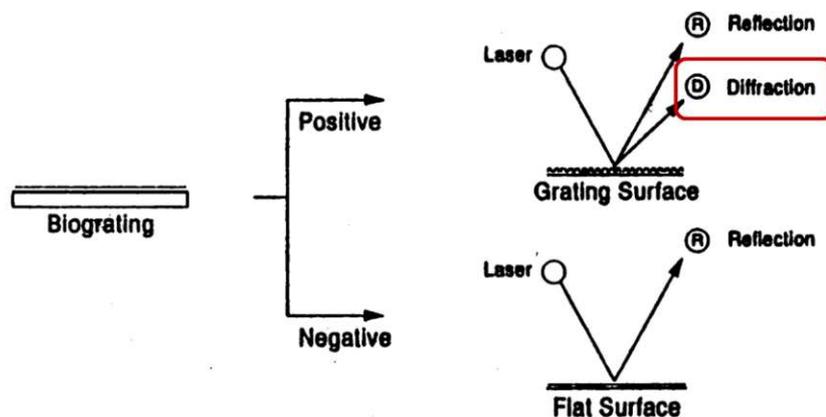


Figure 37 : Principe de biodétection sans marquage par diffraction optique développée par Tsay et al. 1991.

Ce principe de détection fut également adapté à la détection de bactéries *Escherichia coli* et *Renibacterium Salmoninarum* à partir de motifs périodiques d'anticorps.^{166,167}

Par ailleurs, à partir des années 2000, J.B. Goh, R.W. Loo, P.L. Tam et M.C. Goh ont largement contribué au développement de ce principe de détection pour l'identification d'interactions protéiques. Dans un premier temps, les auteurs ont montré que la détection par diffraction de plusieurs analytes simultanément était possible.¹⁶⁸ Pour cela, deux réseaux de lignes (micrométriques) de molécules sondes différentes ont été fabriqués par microcontact printing sur lames de verre. Ces réseaux sont superposés avec une rotation de 90° l'un par rapport à l'autre (Figure 38a). Cet angle permet de dissocier les deux figures de diffraction émises par les réseaux et ainsi de quantifier l'intensité de diffraction de chaque réseau (Figure 38b). La comparaison des intensités de diffraction avant et après interaction a permis de détecter une interaction protéique.

En 2001, les avancées technologiques ont conduit à la création de la société Axela, qui a commercialisé un système dédié à la détection des interactions protéiques en temps réel par diffraction optique.

¹⁶⁶ F Morhard, J Pipper, R Dahint et M Grunze, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2000, 70, 1-3, 232-242.

¹⁶⁷ S.W. Howell, H.D. Inerowicz, F.E. Regnier, et R. Reifenberger, *Langmuir*, 2003, 19, 2, 436-439.

¹⁶⁸ J.B. Goh, R.W. Loo, R.A. McAloney et M.C. Goh, *Anal Bioanal Chem*, 2002, 374, 54-56.

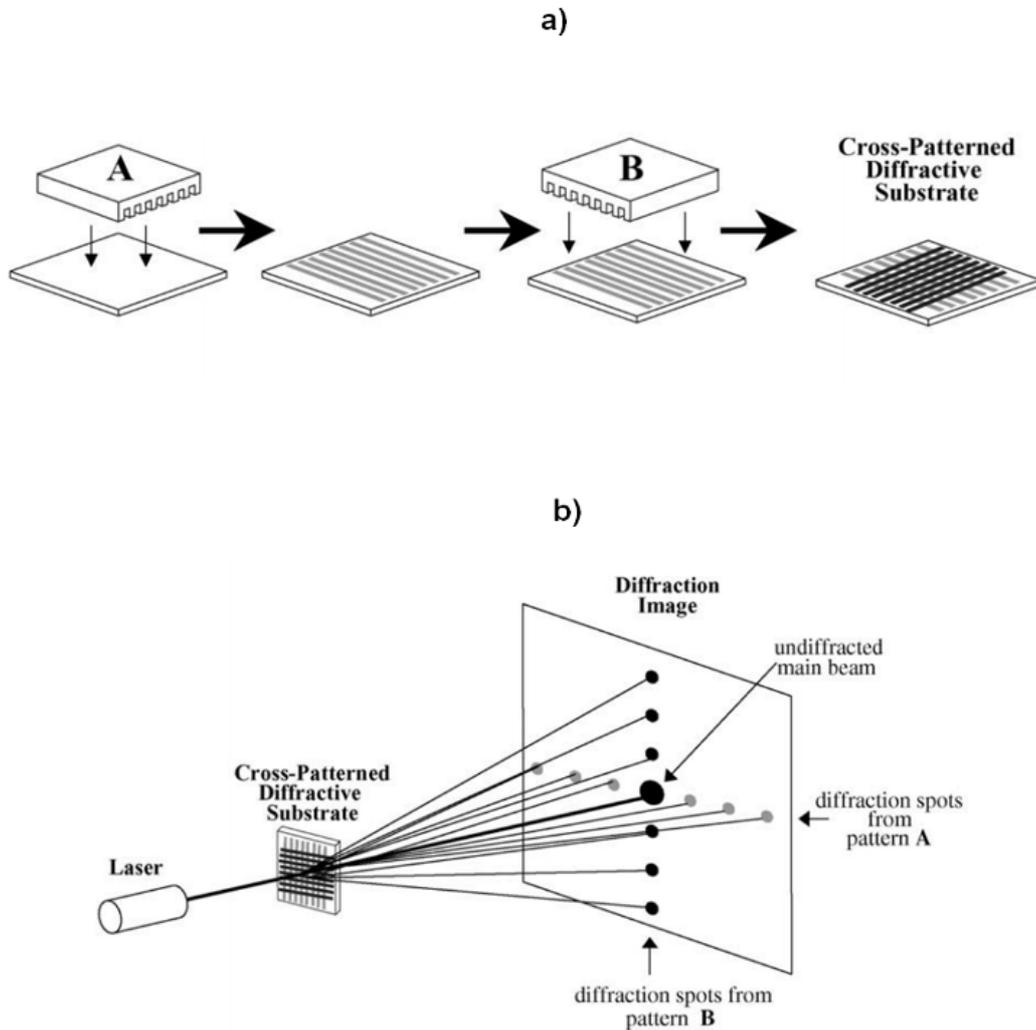


Figure 38 : a) Schéma représentant la réalisation de deux réseaux de molécules sondes superposés avec une rotation de 90° l'un par rapport à l'autre par microcontact printing ; b) schéma représentant le principe de détection des figures de diffraction des deux réseaux. (Images adaptées des travaux de J.B. Goh *et al.* 2002).

A partir de 2003, les auteurs ont ajouté un prisme et une cellule fluïdique au système de détection (Figure 39a). Le prisme est positionné sur la face arrière de la lame qui comporte le réseau et permet de se placer dans une configuration de réflexion totale interne (TIR, total internal relection) pour collecter plus de 95% de l'intensité du laser (Figure 39b). Ce système permet d'augmenter la sensibilité de la détection.^{169,170}

¹⁶⁹ J.B. Goh, P.L. Tam, R.W. Loo, M.C. Goh, *Analytical Biochemistry*, 2003, 313, 2, 262-266.

¹⁷⁰ J.B. Goh, R.W. Loo, M.C. Goh, *Sensors and Actuators B*, 2005, 106, 243-248.

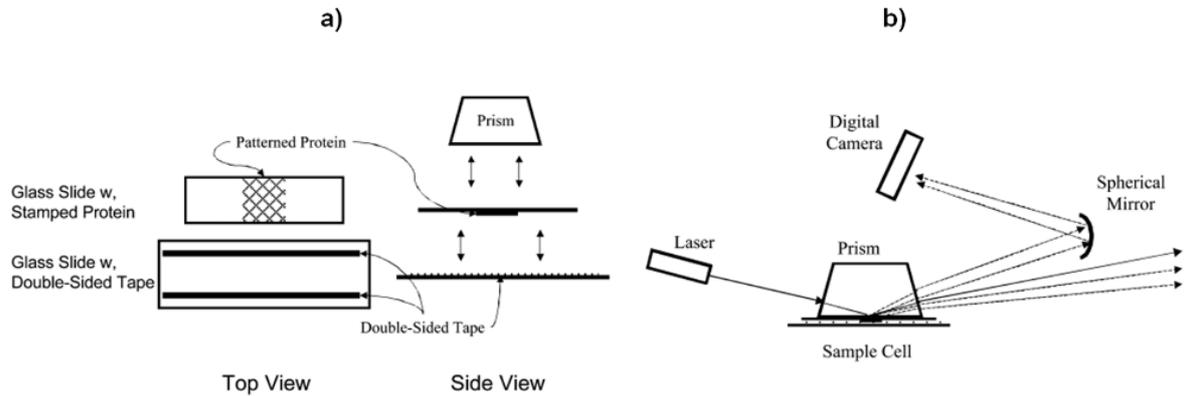


Figure 39 : a) Schéma représentant le système composé du prisme positionné sur la face arrière de la lame comportant les réseaux de molécules sondes et la cellule microfluidique ; b) Schéma représentant le système complet de biodétection. (Images adaptées des travaux de J.B. Goh *et al.* 2005).

A ce jour et à notre connaissance, aucun travaux concernant la détection d'une hybridation entre deux oligonucléotides par diffraction n'a été recensé dans la littérature sans avoir ajouté un marquage aux acides nucléiques cibles, comme dans les travaux de Bailey *et al.*¹⁷¹ où les auteurs détectent une hybridation ADN-ADN par diffraction grâce au marquage des cibles avec une nanoparticule d'or.

C. Les principales applications des biopuces à ADN

Les biopuces à ADN ont été développées initialement pour des applications de recherche académique.

C.1. Etudes du transcriptome

L'étude du transcriptome permet d'obtenir le profil d'expression des gènes étudiés c'est-à-dire la variation de leur niveau d'expression en fonction de différents paramètres. De très nombreuses études ont été réalisées sur différents organismes pour identifier les gènes co-régulés dans certaines conditions expérimentales. Par exemple, les travaux de K.S. Kim *et al.*,¹⁷² ont permis de réaliser une étude globale du transcriptome d'*Escherichia coli* 0157 en réponse à un antibiotique issu de la plante *Houttuynia Cordata*. Cette technologie trouve également de nombreuses applications dans le domaine du diagnostic médical. Elle permet notamment d'obtenir un profil d'expression de l'ensemble des gènes de cellules cancéreuses à un instant donné et de le comparer à celui de cellules saines.¹⁷³

C.2. L'étude des réarrangements génomiques : CGH-array

Le « Comparative Genomic Hybridization-array » (CGH-array), permet de comparer deux échantillons et de détecter les variations du nombre de copies de certaines régions de

¹⁷¹ R.C. Bailey, J-M Nam, C.A. Mirkin et J.T. Hupp, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, 125, 44, 13541-13547.

¹⁷² K.S. Kim, Y.J. Park, H-J Jung, K.S. Ahn, S-G Lee, S-H Kim, S-K Jung et H-J Jang, *BioChip J.*, 2010, 4, 3, 237-246.

¹⁷³ E. Segal, N. Friedman, N. Kaminski, A. Regev et D. Koller, *Nat. Genet.*, 2005, 37, 38-45

l'ADN génomique entre les deux échantillons. Par exemple dans le cas d'un cancer, il est fréquent d'observer des aberrations chromosomiques comme une augmentation du nombre de copies des oncogènes et une diminution du nombre de gènes suppresseurs de tumeurs.¹⁷⁴ Cette méthode est utilisée pour comparer deux génomes d'organismes proches afin d'identifier leurs différences. Par exemple, la comparaison des gènes d'une souche microbienne pathogène avec ceux d'une souche non pathogène permet d'identifier les gènes de virulence. C'est comme cela qu'en 1999, Behr *et al.*,¹⁷⁵ ont identifié l'agent responsable de la tuberculose, la bactérie *Mycobacterium tuberculosis*.

C.3. La détection des SNP

Les SNP (Single Nucleotide Polymorphism) représentent la forme la plus abondante de variations génétiques dans le génome humain. Il s'agit de mutations ponctuelles (variations d'une seule base) tout au long de l'ADN du génome. Ces variations sont associées à la diversité des individus de la population mais également à la différence de sensibilité à certaines maladies ou à la réponse aux médicaments.¹⁷⁶

C.4. La méthode du « ChIP-on-Chip »

Au sein des cellules, il existe de nombreuses interactions entre l'ADN et des protéines comme par exemple entre l'ADN et l'ADN polymérase lors de la réplication de l'ADN. La méthode du « ChIP-on-chip » (ChromatinImmunoPrecipitation on chip) permet d'identifier les sites de fixation de protéines d'intérêt sur l'ADN génomique.^{177, 178, 179}

D. Comment rendre la technologie des biopuces à ADN accessible au diagnostic *in vitro*?

D.1. Etat de l'art sur le diagnostic *in vitro*

L'industrie du diagnostic *in vitro* (DIV) fait partie des industries de santé ; elle est constituée par l'ensemble des sociétés qui conçoivent, développent, fabriquent et commercialisent les réactifs, matériaux et instruments permettant la réalisation d'analyses de biologie médicale à partir d'échantillons variés (sang, urine, peau, cellules, eau...). Il est estimé que 60 à 70% des décisions médicales font intervenir le résultat d'un test de diagnostic *in vitro*.¹⁸⁰ L'ensemble des tests réalisés pour la grande majorité au sein des laboratoires d'analyses médicales privés et hospitaliers permet :

¹⁷⁴ D.G. Albertson, C.Collins, F. McCormick et J.W. Gray, Nat. Genet., 2003, 34, 369-376

¹⁷⁵ M.A. Behr, M.A. Wilson, W. P. Gill, H. Salamon, G.K. Rane et P.M Small, Science, 1999, 248, 1520-1523.

¹⁷⁶ J.N. Hirschhorn, P. Sklar, K. Lindblad-Toh, Y.M. Lim, M. Ruiz-Gutierrez, S. Bolk, B. Langhorst, S. Schaffner, E. Winchaster et E.S. Lander, Proc.Natl Acad. Sci, USA, 2000, 97, 12164-12169.

¹⁷⁷ B. Ren, F. Robert, J.J. Wyrick, O. Aparicio, E.G. Jennings, I. Simon, J. Zeitlinger, J. Schreiber, N. Hannett, E. Kanin, T.L. Volkert, C.J. Wilson, S.P. Bell et R.A. Young, Science, 2000, 290, 2306-309.

¹⁷⁸ J.D. Lieb, X. Liu, D. Botstein et P.O. Brown, Nat. Genet. 2001, 28, 327-334.

¹⁷⁹ M.J. Buck, et J.D. Jieb, Genomics, 2004, 83, 349-360.

¹⁸⁰ Source : Le syndicat de l'industrie du diagnostic *in vitro*, www.sidiv.fr

- L'identification de pathogènes : maladies infectieuses, agroalimentaires, contrôles sanitaires ;
- L'identification des pathologies non infectieuses : dosage et identification de biomarqueurs ;
- La prise en charge et le suivi thérapeutique du patient : mesure des paramètres biologiques individuels ou le monitoring ;
- La prévention des maladies : dépistage dans les populations à risques ;
- La prédiction : analyse des facteurs prédictifs de pathologies (biomarqueurs, anticorps).

Dans l'ensemble de cette thèse, nous nous focaliserons sur le domaine du DIV dédié à l'identification de pathogènes. Nous verrons quels avantages peuvent apporter les biopuces à ADN au diagnostic *in vitro*. Les méthodes de détection de ces agents pathogènes sont très variées et différentes selon la nature de la « biomolécule » à identifier. Par exemple, la microbiologie permet un diagnostic « phénotypique » de microorganismes cultivables. Il existe aussi des méthodes de diagnostic basées sur les interactions entre un anticorps et une protéine comme la méthode ELISA ainsi que l'ensemble des tests de sérologie. Depuis l'avènement de la biologie moléculaire et tout particulièrement de la PCR (Polymerase Chain Reaction) en 1985 le diagnostic « génotypique » est en plein essor. Les méthodes de diagnostic actuelles les plus employées pour l'identification de pathogènes sont :

- La culture dans des milieux chromogènes permettant la mise en évidence directe de certaines propriétés des micro-organismes recherchés (activité enzymatique caractéristique, propriétés biochimiques). Grâce à ces milieux de culture, les résultats sont obtenus entre 24 et 72 heures. Cette technique reste la plus utilisée aujourd'hui car elle est facile d'utilisation et d'un coût de revient faible, mais présente l'inconvénient majeur de n'identifier que les espèces « cultivables ».
- Les tests immuno-enzymatiques (ELISA ou EFLA après la phase d'enrichissement). Les délais de réponse sont en général de 24 à 48 heures. Cette technique est moins utilisée en routine car elle nécessite l'utilisation d'un automate pour traiter des volumes importants, ce qui induit un investissement initial puis des obligations d'entretien et de métrologie qui ne sont pas toujours compatibles avec les budgets des laboratoires d'analyses.
- Les tests PCR (Polymerase Chain reaction), permettent une détection en quelques heures après la phase d'enrichissement. Les résultats sont obtenus dans un délai de 6 à 24 heures, car il est parfois nécessaire d'effectuer une culture au préalable. La PCR a pour avantage d'être plus rapide que les autres technologies et de pouvoir détecter des espèces non cultivables. Néanmoins, elle est encore très peu utilisée en routine car elle nécessite un aménagement minimum des locaux et surtout elle reste encore chère.

D.2. Les contraintes et attentes du marché du DIV

L'ensemble des tests dédiés au marché du DIV répond à des contraintes socio-économiques très précises. Ces contraintes listées ci-dessous régulent l'essor de nouvelles technologies :

- La fiabilité du résultat ;
- Le délai d'attente du résultat ;
- Faible coût d'utilisation ;
- Leur facilité à mettre en œuvre.

Sur le plan technologique, la biologie moléculaire et le développement de la PCR et qPCR améliorent sensiblement les méthodes de diagnostic. Par exemple, dans le cas du diagnostic des infections bactériennes initialement identifiées par culture sur des milieux chromogènes, l'identification par PCR permet de donner un diagnostic plus rapide et spécifique. De plus cette technique a pour avantage de pouvoir également identifier les bactéries non cultivables. Néanmoins, les limitations principales des méthodes de détection restent le délai d'obtention des résultats mais également le fait qu'elles ne ciblent qu'un seul pathogène à la fois. Ces contraintes poussent à la multiplication des analyses par échantillons et donc à l'augmentation des coûts et du temps pour délivrer un diagnostic. C'est pourquoi le développement d'outils permettant d'identifier un ensemble de pathogènes en même temps et en une seule analyse devient un atout considérable. La technologie des biopuces à ADN (décrite dans la partie A) répond sur le principe à cette attente. Cet outil permet l'analyse simultanée de plusieurs dizaines voire centaines de séquences nucléiques et donc l'identification d'autant d'organismes en une seule analyse. Cette technologie s'inscrit en complément de la PCR en apportant l'avantage de l'analyse multiplexée. De plus, elle permet de donner une réponse globale de la multiplicité des espèces présentes dans un échantillon sans avoir besoin nécessairement de passer par une étape de culture. Le tableau ci-après compare les différentes méthodes de diagnostic actuelles selon les paramètres de spécificité, la sensibilité, le multiplexage de l'analyse, le délai d'obtention du résultat, la détection d'espèces non cultivables et le coût.

Tableau 1 : Comparaison qualitative des méthodes de détection des microorganismes : culture cellulaire, PCR et biopuces à ADN. *Néanmoins le coût de la détection par espèce identifiée est très inférieur à celui obtenu par PCR.

	Méthodes de détection		
	<u>Culture</u>	<u>PCR</u>	<u>PCR+ biopuce à ADN</u>
Spécificité	Bonne	Elevée	Elevée
Sensibilité	Bonne	Elevée	Elevée
Multiplexage (nombre mesures par échantillon)	1	Très faible (de 1-4)	Elevé (de 1 à plusieurs centaines)
Délai	24h à 48h	< 24h	< 24h
Espèces non cultivables	Non	Oui	Oui
Coût	Faible	Moyen	Elevé*

D.3. Les biopuces commercialisées par domaines

Actuellement peu de biopuces à ADN sont dédiées au marché du diagnostic *in vitro*. Le

Tableau 2 répertorie quelques applications dans le domaine médical et agroalimentaire.

Tableau 2 : Exemples de biopuces à ADN commercialisées dans le domaine du diagnostic *in vitro*.

Nom de la biopuce	Domaine d'application	Entités détectées	Société
PapilloCheck®	Médical	24 pathogènes du Papilloma virus	Greiner bio-one
CytoInspect™	Médical	Mycoplasma	Greiner bio-one
ParoCheck®	Médical	Agents pathogènes associés à la parodontite	Greiner bio-one
LPLchip	Médical	Mutation du gène de la lipoprotéine lipase	Progenika
LIPOnchip	Médical	250 mutations du LDLR, apoB et PCSK9 (Hypercholestérolémie familiale)	Progenika
Bloodchip®	Médical	variantes alléliques des groupes sanguins et 12 antigènes plaquettaires	Progenika
CarnoCheck®	Agroalimentaire	Huit espèces animales: cheval, bœuf, porc, âne, dinde, poulet, mouton et chèvre.	Greiner bio-one

D.4. Verrous technologiques de la technologie biopuce à ADN pour le diagnostic *in vitro*

Les biopuces à ADN ne sont qu'au début de leur avènement dans le domaine du diagnostic *in vitro*. Afin de répondre aux critères socio-économiques du marché du DIV, la technologie doit être fiable, robuste, rapide et peu onéreuse pour devenir accessible aux laboratoires d'analyses médicales.

Tout d'abord, simplifier la technologie des biopuces à ADN passe par la réduction de la densité de sondes oligonucléotides. En effet, il n'est pas nécessaire de produire des biopuces de haute densité (> à 1000 analyses en parallèle) comme c'est le cas pour les biopuces dédiées à la « recherche ». Prenons l'exemple d'une puce dédiée à la détection de bactéries pathogènes responsables de maladies respiratoires. Dans ce cas le nombre de bactéries à identifier serait inférieur à 100. Une biopuce de basse ou moyenne densité serait suffisante. Simplifier la technologie implique également la simplification de son utilisation et de sa conception pour en réduire le coût. L'adressage des molécules sondes et la détection des signaux de l'hybridation sondes-cibles sont deux verrous technologiques qui doivent être levés pour rendre la technologie plus « attractive » et moins coûteuse dans le DIV.

1. L'adressage des biomolécules sondes :

L'adressage est une étape clé et incontournable dans la conception d'une biopuce à ADN. Comme décrit dans la Partie B, les procédés d'adressage des oligonucléotides sondes sont complexes et coûteux. En effet que ce soit le dépôt d'oligonucléotides sondes synthétiques ou la synthèse *in situ*, le coût des outils de fabrication augmente celui de la puce en elle-même. Le Tableau 3 compare les procédés d'adressage d'oligonucléotides-sondes présentés dans la partie B et donne une estimation quantitative de leur coût. Ces derniers sont comparés selon trois critères :

- Le multiplexage du dépôt c'est-à-dire le dépôt de plusieurs sondes en parallèle ;
- La densité des biopuces produites, c'est-à-dire le nombre de spots d'oligonucléotides sondes réalisé par biopuce ;
- Le coût de l'appareillage.

Tableau 3 : Récapitulatif et comparaison des procédés d'adressage d'oligonucléotides sondes. *
Source : Frédéric Bonté LVMH Recherche (Puces à ADN)

Procédés d'adressage	Multiplexage par puce*	Densité des biopuces produites	Coût
Robot à aiguilles	Moyenne densité (< 3000 sondes par cm ²)	Basse et moyenne densité	+++
Robot Bioplume	Peu applicable	Basse et moyenne densité	+++

Pointe AFM	Peu applicable	Basse densité	+++++
Dépôt par microcontact printing	Oui mais faible	Basse densité	+
Robot Jet d'encre	Moyenne densité (< 10 000 sondes par cm ²)	Haute densité	++++
Electrospray	Moyenne densité (< 10 000 sondes par cm ²)	Basse densité	++++
Dépôt par activation laser	Peu applicable	Basse densité	++++
Synthèse in-situ des sondes	Haute densité (>300 000 sondes par cm ²)	Haute densité	+++++

La technologie d'adressage des sondes choisie doit permettre un dépôt multiplexé des oligonucléotides de manière reproductible à moindre coût. Parmi les technologies présentées dans la partie B.3.b, le microcontact printing est un bon candidat. Néanmoins, il est nécessaire de développer le multiplexage du dépôt et de le valider pour la conception d'une biopuce à ADN.

2. La lecture et transduction de l'information biologique :

La « lecture de la biopuce » permet de traduire l'événement biologique en un signal physique mesurable et interprétable. D'un point de vue technique le but est d'identifier les spots d'oligonucléotides sondes hybridés avec des cibles complémentaires. Pour la majorité des biopuces à ADN, cet événement est détecté par fluorescence. Néanmoins, ce mode de lecture implique l'obligation de marquer les oligonucléotides cibles, ajoutant une étape expérimentale dans l'utilisation de la biopuce. Les procédés de marquage des acides nucléiques supposent l'utilisation de réactions biochimiques onéreuses. De plus, le coût de l'appareil de lecture de la fluorescence augmente intrinsèquement celui de l'utilisation de la biopuce. En effet, le lecteur nécessite un dispositif optique complexe et onéreux (lasers, photodiodes, photomultiplicateurs, filtres...). S'affranchir du marquage des cibles pour la détection est une voie de développement qui pourrait permettre à la fois de simplifier la technologie mais également de réduire son coût.

Dans le Tableau 4, les méthodes de détection décrites dans la partie B.5 sont comparées à la détection par fluorescence d'un point de vue qualitatif.

La sensibilité est évaluée par la limite de détection comme :

- très sensible: <nM ;
- sensible: nM ;
- moyennement sensible : μ M.

La densité des analyses est évaluée comme :

- faible < à 10 analyses en parallèle ;
- moyenne < à 100 analyses en parallèle ;
- très élevée > à 10 000 analyses en parallèle.

Tableau 4 : Comparaison qualitative des différentes méthodes de biodétection optique.

Méthode de détection	Marquage	Sensibilité	Nombre d'analyse en parallèles	Coût de la détection
Fluorescence	Oui	Très sensible	Très élevé	Moyen
Photochimie	Oui	Très sensible	Faible	Moyen
Colorimétrie	Oui	Moyenne	Faible	Faible
Billes magnétiques	Oui	Très sensible	Faible	Moyen
Microbalance à quartz	Non	Sensible	Faible	Elevé
Micro poutre	Non	Très sensible	Moyenne	Moyen
Résonance plasmonique de surface	Non	Moyennement sensible	Moyenne	Elevé
Ellipsométrie	Non	Moyennement sensible	Faible	Elevé
Réfectométrie	Non	Très sensible	Faible	Elevé
Interférométrie	Non	Sensible	Moyenne	Elevé
Diffraction	Non	Sensible	Moyenne	Faible

La technologie choisie doit être sensible, préférentiellement sans marquage, peu onéreuse et permettant une détection multiplexée des événements de l'hybridation. La méthode de détection sans marquage par diffraction présente les critères recherchés pour la détection d'une hybridation sans marquage.

Les travaux présentés ici ont été réalisés dans le cadre d'une thèse CIFRE avec la société Dendris,¹⁸¹ une jeune start up Toulousaine spécialisée dans le diagnostic par la technologie des biopuces à ADN en partenariat avec le LISBP et l'ITAV. Ils visent à démontrer l'intérêt de la technologie du microcontact printing et de la diffraction optique pour la conception de biopuces à ADN. Outre le fonctionnement de ces technologies que je viens de décrire, les connaissances établis à ce jour par des travaux antérieurs réalisés au sein des équipes NBS du LAAS-CNRS et du LISBP de l'INSA sont rapportées ci-après. Ceci me permettra de clarifier les objectifs de la présente thèse.

E. Positionnement des travaux de thèse

Dans ces travaux de thèse, trois aspects pour la conception de biopuce à ADN sur support fonctionnalisé par des dendrimères seront traités :

- 1) La fonctionnalisation de surface avec des dendrimères aldéhydes phosphoré G4 ;
- 2) L'automatisation de l'adressage des oligonucléotides sondes par microcontact printing ;
- 3) La détection d'une hybridation sans marquage basée sur la diffraction optique de la lumière.

E.1. La chimie des dendrimères pour la conception de biopuces à ADN

Les premiers travaux sur l'utilisation des dendrimères aldéhydes phosphorés G4 pour la conception de biopuces à ADN ont été menés en 2003.¹⁸² Les résultats ont montré que les lames de verre fonctionnalisées avec ces dendrimères appelées dendrilames, permettaient de créer des biopuces à ADN 10 fois plus sensibles que sur des lames commerciales (amines, aldéhydes ou époxydes).¹⁸³ Les dendrimères d'environ 7 nm de diamètre jouent un rôle de lien et d'espaceur entre la surface de la lame de verre et les oligonucléotides sondes. Ils permettent ainsi d'offrir une immobilisation covalente, orientée et spécifique comme décrit dans la Figure 40.

¹⁸¹ www.dendris.fr

¹⁸² E. Trévisiol, V. Le Berre-Anton, J. Leclaire, G. Pratviel, A-M. Caminade, J-P. Majoral, J.M. François et B. Meunier, *New J. Chem.*, 2003, 27, 1713-1719.

¹⁸³ V. Le Berre, E. Trévisiol, A. Dagkessamanskaia, S. Sokol, A-M. Caminade, J-P. Majoral, B. Meunier et J-M. François, *Nucleic Acids Res.* 2003, 31, 16, e88.

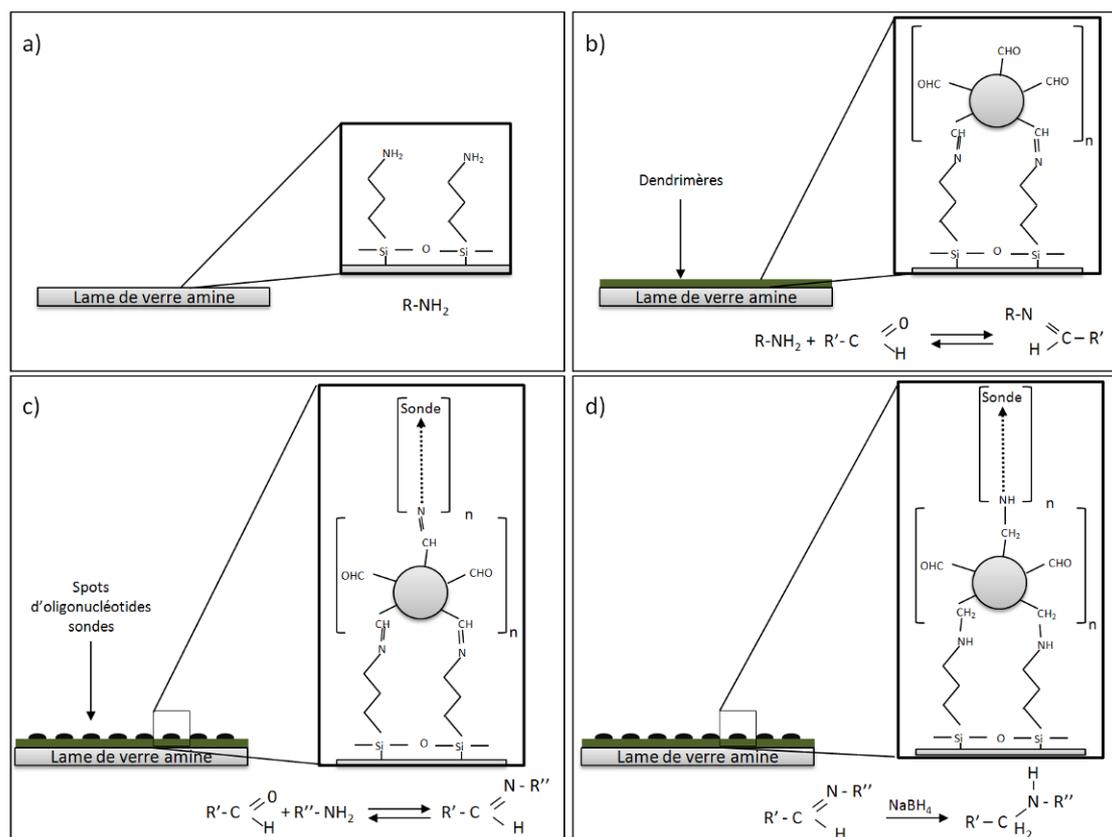


Figure 40 Schéma représentant la chimie des dendrimères phosphorés aldéhydes G4 pour l'immobilisation des oligonucléotides sondes sur une lame de verre. a) Silanisation de la lame de verre (APTES), b) fonctionnalisation de la lame amine avec les dendrimères aldéhydes phosphorés G4, c) adressage des oligonucléotides sondes modifiés par une fonction amine à l'extrémité 5' (liaison covalente mais sensible à l'hydrolyse entre les sondes et les dendrimères), d) réduction de la lame avec du borohydrure de sodium (NaBH_4) (liaison covalente entre les sondes et les dendrimères).

La Figure 40 décrit comment les sondes sont immobilisées sur la puce par liaison covalente avec les dendrimères phosphorés aldéhydes G4. Dans un premier temps, la lame de verre est fonctionnalisée avec des fonctions amines par utilisation d'un aminosilane (3-aminopropyl triéthoxysilane, (AminoPropylTriEtoxySilane-APTES) (Figure 40a). Ces fonctions amines permettent l'immobilisation des dendrimères sur la surface par leurs fonctions aldéhydes (Figure 40b). Les oligonucléotides sondes modifiés à leur extrémité 5' par une fonction amine sont adressés sur la dendrilame où ils vont se fixer aux fonctions aldéhydes des dendrimères par une liaison imine covalente mais sensible à l'hydrolyse. De ce fait, les liaisons imines sont stabilisées par réduction en liaisons amines en utilisant le borohydrure de sodium (NaBH_4). Après cette étape, la puce est prête à être utilisée. Actuellement, la société Dendris détient une licence exclusive du brevet d'invention sur ce principe de fabrication¹⁸⁴. Elles sont fabriquées par « trempage » c'est-à-dire par incubation des lames dans des bains successifs et l'adressage des oligonucléotides sondes est réalisé par un robot de dépôt à aiguilles.

¹⁸⁴ Supports solides fonctionnalisés par des dendrimères phosphorés, leur procédé de préparation et applications – WO 03091304, du 6 novembre 2003.

Le chapitre 1 des résultats de cette thèse est consacré à l'amélioration du procédé de fonctionnalisation des lames avec les dendrimères. Je présenterai notamment un nouveau procédé de fonctionnalisation de surface applicable à la conception de biopuces à ADN avec la chimie des dendrimères.

E.2. La technologie du microcontact printing pour l'adressage des biomolécules sondes

En 2004, Lange *et al.*,¹⁸⁵ décrivent la fabrication d'une biopuce à ADN par microcontact printing avec un timbre en PDMS chimiquement modifié (traitement au plasma oxygène) sur des lames silanisées. Puis en 2005, C. Thibault *et al.*,¹⁸⁶ démontrent qu'il est possible de concevoir des biopuces à ADN sur des lames fonctionnalisées avec des dendrimères aldéhydes phosphorés par microcontact printing et sans modification chimique du timbre. La Figure 41 issue de ces travaux illustre l'adressage de sondes oligonucléotidiques pour la production de biopuces à ADN par microcontact printing. En plus de fournir un large choix de motifs, les résultats de l'hybridation prouvent que les sondes déposées sont accessibles pour l'hybridation avec les cibles complémentaires.

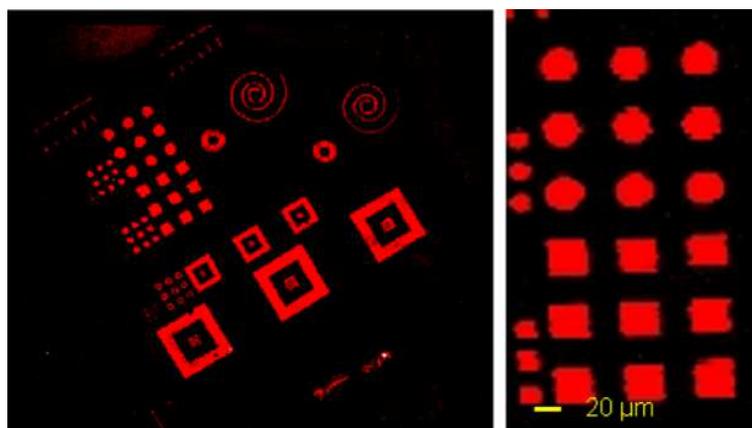


Figure 41 : Images de fluorescence obtenues après hybridation d'une biopuce à ADN à fluorescence réalisée par microcontact printing (Images adaptées des travaux de Thibault *et al.* 2005)

La Figure 42 également issue des travaux de Thibault *et al.*, présente une comparaison des signaux de l'hybridation pour une biopuce fabriquée par microcontact printing ou par la méthode du robot à aiguilles. Elle représente les intensités de fluorescence mesurées après hybridation de cibles fluorescentes sur différentes concentrations en sondes en fonction de la technologie d'adressage des sondes (μ CP ou robot à aiguilles). Les résultats montrent que pour de faibles concentrations en oligonucléotides sondes ($< 10 \mu\text{M}$) déposés sur la puce, la

¹⁸⁵ S.A. Lange, V. Benes, D.P. Kern, J. K. Heinrich Horber, et A. Bernard, *Anal. Chem.*, 2004, 76, 1641-1647.

¹⁸⁶ C. Thibault, V. Le Berre, S. Casimirius, E. Trévisiol, J François et C Vieu, *Journal of Nanobiotechnology*, 2005, 1-12.

conception par microcontact printing permet d'obtenir des signaux de fluorescence plus importants après l'hybridation que lors de la conception par robot à aiguilles. Ce résultat signifie que le procédé de microcontact printing nécessite des concentrations en sondes plus faibles pour une réponse après hybridation équivalente. Ce résultat est très important car il permettrait d'augmenter la sensibilité de la biopuce et ainsi réduire son coût de fabrication.

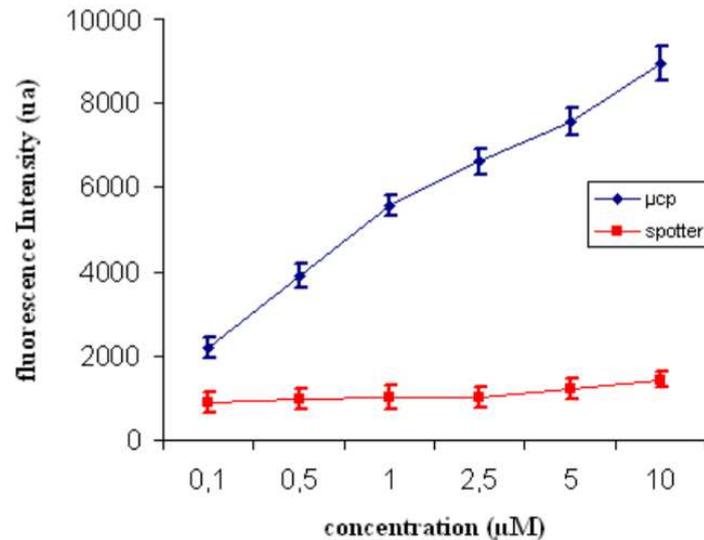


Figure 42 : Comparaison des signaux de l'hybridation pour une biopuce fabriquée par microcontact printing ou par la méthode conventionnelle du robot à aiguilles. (Image adaptée des travaux de Thibault *et al.*)

Ces résultats très encourageants laissent à penser que le microcontact printing est une technologie qui pourrait répondre à notre problématique d'adressage pour la fabrication de biopuces à ADN à moindre coût. Cependant, ces travaux réalisés de façon purement manuelle demandent à être développés pour l'adressage multiplexé des sondes sur la biopuce.

Les premiers travaux sur le multiplexage du microcontact printing ont été menés par une équipe du LAAS-CNRS en 2009.¹⁸⁷ Ils ont permis de développer le dépôt multiplexé de molécules par microcontact printing *via* un timbre en PDMS particulier appelé le macrotimbre ou macrostamp. Ce timbre est formé d'un ensemble de 64 plots aux dimensions d'une microplaque de 384 puits (Figure 43b). L'encre des 64 plots du timbre se fait par immersion des plots dans les puits de la microplaque contenant les échantillons à déposer. Puis, le macrotimbre est mis en contact avec le support pour déposer 64 molécules différentes en une seule étape. L'extrémité de chacun des plots peut être micro ou nanostructuré de motifs en fonction de l'application souhaitée. Cette technologie est brevetée par la Société Innopsys et le CNRS.¹⁸⁸

Au cours de cette thèse, et au sein du projet ANR Innodiag, Cau et al,¹¹¹ ont développé un robot, l'Innostamp 40 (Figure 43 a) utilisant un macrotimbre magnétique. Le robot utilise

¹⁸⁷ H. Lalo, J.C. Cau, , C. Thibault, N. Marsaud, C. Severac et C. Vieu, *Microelectronic Engineering*, 2009, 86,1428-1430.

¹⁸⁸ Brevet : fr 2921 002-A1-2007

un champ magnétique pour mettre en contact le timbre et le support avec une pression d'appui homogène et contrôlée. Pour cela le timbre en PDMS possède une semelle constituée de PDMS et de poudre de fer et des aimants sont positionnés sous le support pendant l'étape de dépôt. Un exemple de dépôt de molécules fluorescentes est montré dans la Figure 43 c.

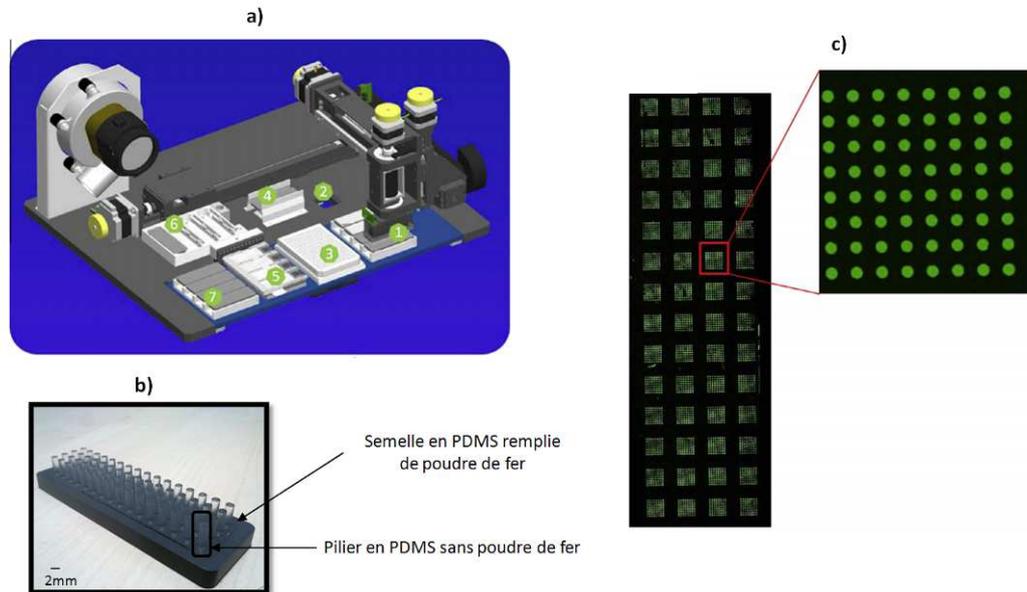


Figure 43 : a) Schéma représentant l'Innostamp 40 avec 1) Zone de préhension du timbre, 2) Plaque de titration pour l'encrage, 3) Zone de séchage, 4) Zone de dépôt sur les lames, 5) Zone de relargage du timbre, 6) Zone de lavage, 7) Zone de déchargement du timbre ; b) Photo d'un macrotimbre avec une semelle constituée de PDMS et de poudre de fer et de 64 piliers ; Image en fluorescence de dépôt de molécules fluorescentes sur lame de verre avec l'Innostamp 40. (Images a) et b) adaptées des travaux de Cau *et al*,¹¹¹)

Le chapitre 2 est consacré à la validation de cet automate de dépôt par microcontact printing pour la production de biopuces à ADN à basses et moyennes densités. Dans ces travaux nous chercherons à répondre aux questions suivantes :

- Cet automate de dépôt est-il adapté au dépôt d'oligonucléotides sondes ?
- Le dépôt permet-il une bonne fixation des sondes sur la surface de la biopuce ?
- Les sondes sont-elles accessibles pour l'hybridation ?
- Quelle est la reproductibilité des dépôts en comparaison avec une autre technologie de dépôt (robot à aiguilles) validée pour la production de biopuces à ADN ?

E.3. Intégration du procédé d'adressage des molécules sondes pour la détection par diffraction

La biodétection par diffraction est basée sur la capacité d'un réseau de lignes constituées de biomolécules sondes à diffracter un faisceau incident de lumière. Un réseau de diffraction est un dispositif optique composé d'une série de fentes parallèles périodiques. L'espacement régulier entre les structures lignes ou fentes est appelé le pas. La diffraction d'une source lumineuse sur un réseau périodique de lignes s'apparente à la diffraction de la lumière au travers de N fentes (décrites dans l'annexe 1). Lorsqu'un faisceau lumineux éclaire à incidence normale le réseau périodique sur un support transparent, le faisceau lumineux est diffracté par le réseau dans différentes directions caractérisées par des angles discrets. Cette dispersion du spectre lumineux selon différents ordres définit une figure de diffraction qui peut être collectée soit en réflexion, soit en transmission. Si le support n'est pas transparent, le signal est exclusivement collecté en réflexion. (Figure 44)

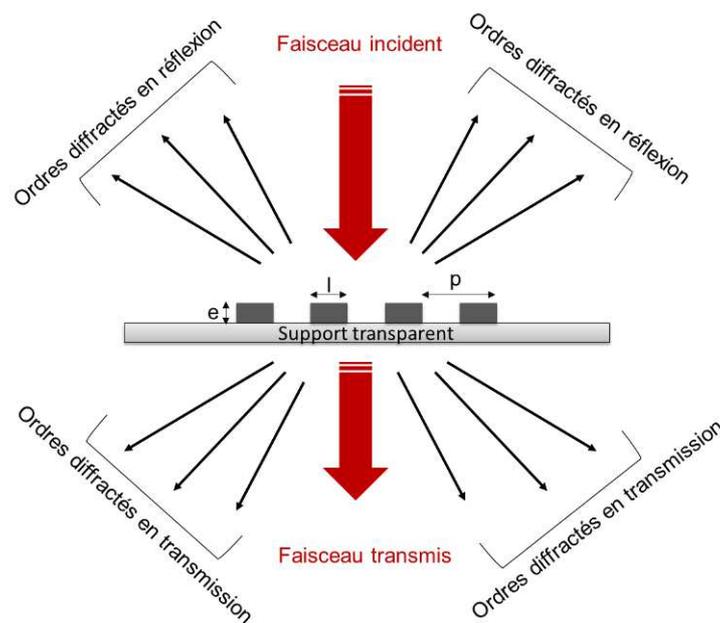


Figure 44 : Schéma représentant la diffraction d'un faisceau incident par un réseau de lignes périodiques sur un support transparent. La figure de diffraction est définie par l'indice de réfraction de la matière qui compose le réseau, l'épaisseur des lignes e , la largeur des lignes l et la périodicité du réseau p .

La période entre les lignes du réseau et la longueur d'onde (fixe) du laser incident vont déterminer selon quels angles précis les différents ordres seront diffractés et donc déterminer le positionnement précis du capteur afin de récolter l'ordre de diffraction souhaité. Dans le cas de la diffraction en réflexion, l'équation suivante régit ce principe :

$$p \cdot [(\sin(\theta_i) + \sin(\theta_{\max}))] = n \cdot \lambda$$

Avec p : la périodicité du réseau, θ_i : l'angle d'incidence du faisceau, θ_{\max} : l'angle de diffraction du faisceau, n : l'ordre de diffraction et λ : la longueur d'onde du faisceau incident

L'intensité de diffraction dépend d'un ensemble de paramètres liés non seulement à la source lumineuse mais également aux caractéristiques du réseau de diffraction. Les principaux sont listés ci-dessous :

- La longueur d'onde incidente de la source;
- L'angle d'incidence;
- L'arrangement périodique du réseau (périodicité, épaisseur, et la largeur des lignes);
- L'indice de réfraction des composants constituant les lignes du réseau.

En conclusion, pour une longueur d'onde incidente du laser et l'angle d'incidence fixe, toute modification de périodicité du réseau (périodicité entre les lignes, épaisseur, largeur et hauteur des lignes) se traduira par la modification du spectre de diffraction.

La diffraction d'un réseau de N fentes mène à deux phénomènes superposés : l'interférence des ondes provenant d'une même fente, appelée diffraction et l'interférence des ondes émises par les diverses fentes considérée comme des sources ponctuelles, appelée interférence. L'intensité de diffraction collectée à l'ordre 1 varie si l'épaisseur des lignes du réseau varie (variations du terme de l'interférence) et si la largeur des lignes varie (variations du terme de la diffraction). Pour être plus précis, l'augmentation de la hauteur des lignes d'un réseau de molécules sondes, lié aux interactions sondes-cibles entraîne une augmentation de l'intensité diffracté par le réseau. Ainsi, la lecture de la diffrapuce consiste à comparer les intensités de diffraction avant et après l'étape de l'hybridation. La Figure 45 décrit les étapes de conception et d'utilisation de la diffrapuce.

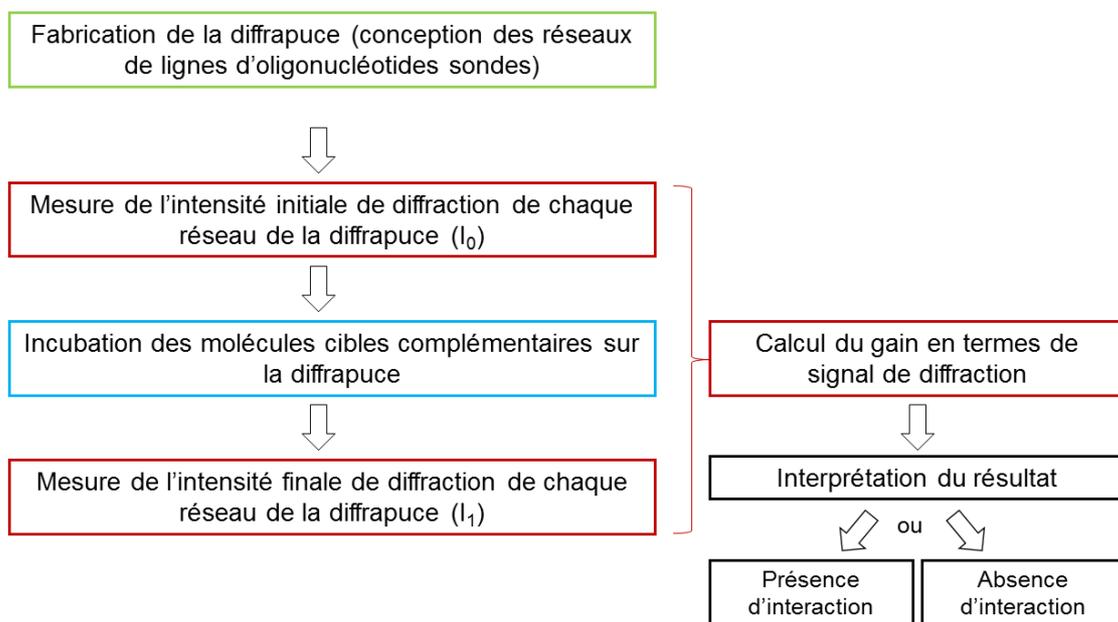


Figure 45 : Les grandes étapes de la conception à l'interprétation du résultat de la diffrapuce.

Les variations d'intensité de diffraction des réseaux sont quantifiées grâce au calcul du gain selon la formule suivante :

$$\text{Gain (en \%)} = \frac{I_1 - I_0}{I_0} \times 100$$

Avec I_1 = l'intensité de diffraction à l'ordre 1 d'un réseau mesurée après interaction avec les molécules cibles moins le bruit de fond autour du réseau et I_0 = l'intensité de diffraction à l'ordre 1 d'un réseau mesurée avant interaction avec les molécules cibles moins le bruit de fond autour du réseau.

Pour l'interprétation des résultats, *in fine*, chacun des réseaux possède un gain de diffraction (%) représentant la variation des signaux de diffraction du réseau avant et après l'étape d'incubation des molécules cibles. Ce gain peut être positif, négatif ou nul en fonction des variations d'intensités des signaux de diffraction. Si l'on considère que l'hybridation résulte de l'accrochage des molécules cibles sur le dessus des lignes de molécules sondes constituant les réseaux de la diffrapuce alors :

- Si hybridation sondes-cibles => Augmentation de la hauteur des lignes du réseau=> Augmentation de l'intensité diffractée par le réseau ($I_1 > I_0$) => le gain est positif
- Si absence d'hybridation sondes-cibles => Absence de variation de la hauteur des lignes du réseau=> Absence de variation de l'intensité diffractée par le réseau ($I_1 = I_0$) => le gain est nul

Trois thèses sur le sujet ont déjà été soutenues : H. Lalo (2009)¹⁸⁹, JC Cau (2009)¹⁹⁰ et A. Egea (2012)¹⁹¹. Jean Christophe Cau a développé pendant ses travaux de thèse le principe d'une biopuce dont la détection est réalisée par diffraction optique. Cette puce sera appelée diffrapuce ou biopuce diffractante. Grâce à des simulations théoriques développées dans le chapitre 4 de sa thèse, il a montré que les interactions de molécules cibles sur un réseau de biomolécules sondes pouvaient augmenter la hauteur des lignes du réseau et ainsi modifier la figure de diffraction résultant du réseau. Une partie importante de ses travaux de thèse a permis de mieux appréhender le design optimal pour la mise au point d'une part du lecteur de diffraction et d'autre part des réseaux moléculaires au travers de simulations.

Je souhaite décrire ici les contraintes technologiques qui ont conduit au design du scanner de diffraction et des réseaux de diffraction que j'ai utilisé pour mes travaux de recherche. Les travaux précédents comme ceux que je développe dans cette thèse ont pour objectif la mise en place d'une technologie peu onéreuse susceptible d'être mise à la disposition de simples laboratoires d'analyse médicale. Le scanner de détection de la diffraction est plus simple et moins onéreux que les scanners de fluorescence. En effet, un laser et une diode balayant la surface de la lame suffisent. De plus, la fabrication des réseaux

¹⁸⁹ H. Lalo, Thèse INSA, Toulouse, 2009.

¹⁹⁰ J.C. Cau, Thèse INSA, Toulouse, 2009.

¹⁹¹ A. Egea, Thèse INSA, Toulouse, 2012.

de biomolécules sondes peut être envisagée par une technique simple et abordable qu'est la lithographie douce.

D'un point de vue du « design » du scanner et des motifs de diffraction, la contrainte est d'avoir un signal de diffraction à incidence normale suffisamment écarté de l'ordre zéro d'une part et présentant un bon rapport signal sur bruit d'autre part. En utilisant une diode laser à bas coût de longueur d'onde 630 nm et des réseaux de lignes de 500 nm au pas de 1 μm , le premier ordre de diffraction fait un angle de 39.4° avec l'ordre zéro à incidence normale. Cette configuration est suffisante pour placer une diode en silicium pour la détection du signal diffracté comme pour les scanners à fluorescence. Par ailleurs, les simulations de JC Cau ont mis en évidence que le signal de diffraction était maximum pour un rapport largeur de ligne sur pas entre les lignes de 50%. La fabrication de lignes de 500 nm au pas de 1 μm sur un moule en silicium reste réalisable par lithographie optique et ne nécessite pas l'utilisation très onéreuse de lithographie électronique. C'est pourquoi le choix a été de réaliser un scanner de diffraction adapté aux signaux émis par des réseaux de lignes de 500 nm au pas de 1 μm . C'est avec cet outil et ce « design » de motifs diffractants que j'ai travaillé durant ma thèse concernant les travaux présentés dans les chapitres 3 et 4.

La thèse de H. Lalo a permis d'améliorer la compréhension et l'utilisation de la technique de lithographie douce adaptée au phénomène de diffraction avec la fabrication de réseaux de polymères à empreintes moléculaires (MIP) utilisant la diffraction comme méthode de transduction de l'interaction entre le MIP et sa cible. Enfin la troisième thèse, celle d'A Egea, a permis de concevoir un prototype de scanner avec la société Innopsys et de l'utiliser sur des biopuces pour la détection d'interactions protéines-protéines. De manière sommaire, le lecteur de diffraction développé permet :

1. d'illuminer des réseaux de lignes de diffraction sur une lame de verre avec une source laser monochromatique;
2. de capter le signal de diffraction de l'ordre 1 en réflexion;
3. de traduire ce signal optique quantifiable sous la forme d'une image TIFF représentant l'intensité de diffraction point par point de chacun des réseaux de l'échantillon.

La Figure 46 illustre le lecteur de diffraction issu de ces travaux ainsi que le type d'image obtenue. Les caractéristiques techniques du scanner sont décrites dans l'annexe 2.

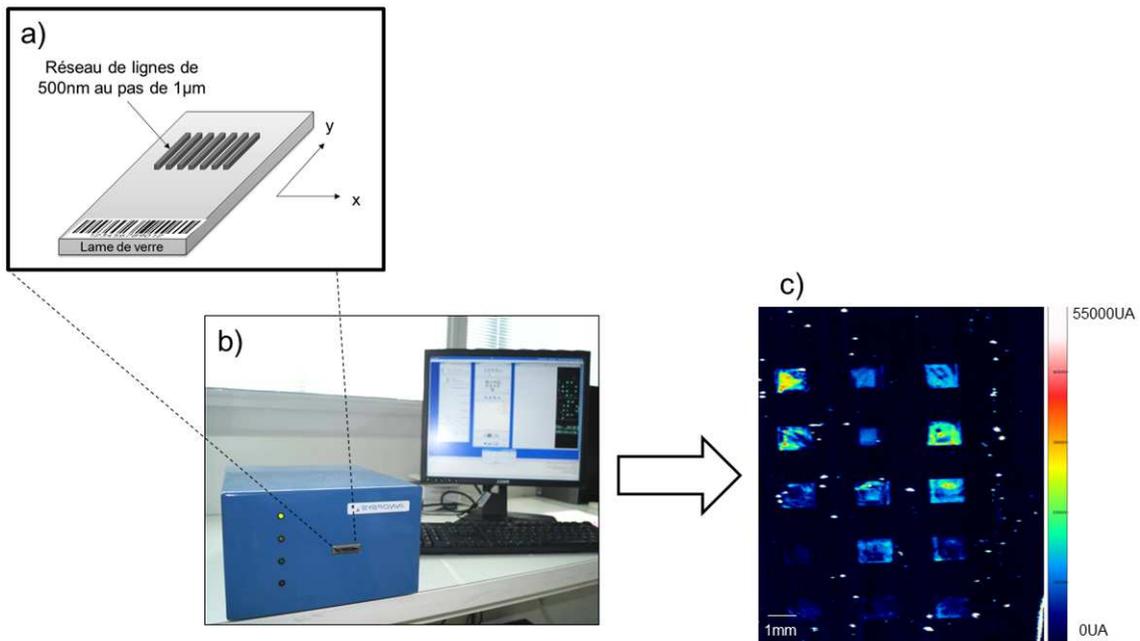


Figure 46 : a) Schéma représentant un réseau de lignes sur une lame de verre, b) photo du scanner de diffraction, c) Image de 15 réseaux de diffraction issue du logiciel Diffraware de traitement du signal de diffraction capté par le scanner. La gamme de couleur symbolise la gamme des intensités de diffraction de l'image. (Réseaux de lignes oligonucléotides sur lame époxyde_Go, P 4mW).

Les chapitres 3 et 4 sont dédiés à la validation de la technique de détection par diffraction pour l'identification d'une hybridation entre deux acides nucléiques. Pour cela, les travaux développés dans le chapitre 3 sont consacrés à la conception de réseaux d'oligonucléotides sondes adaptés à la biodétection par diffraction et le chapitre 4 a pour objectif de valider expérimentalement la détection d'une hybridation par diffraction. Les principales questions abordées pour répondre à cet objectif sont les suivantes :

- Les techniques d'adressage de biomolécules sont-elles adaptées à la production de réseaux de lignes sub-micrométriques ?
- Les motifs sont-ils compatibles avec le procédé de l'hybridation cibles-sondes ?
- L'outil de détection est-il suffisamment sensible pour la détection d'une hybridation entre deux oligonucléotides sondes parfaitement complémentaires ?
- Cette méthode de détection est-elle adaptable aux contraintes de l'hybridation dans des conditions de diagnostic ?

Chapitre 1 : Nouveaux procédés de lithographie douce pour la structuration de surface de surface

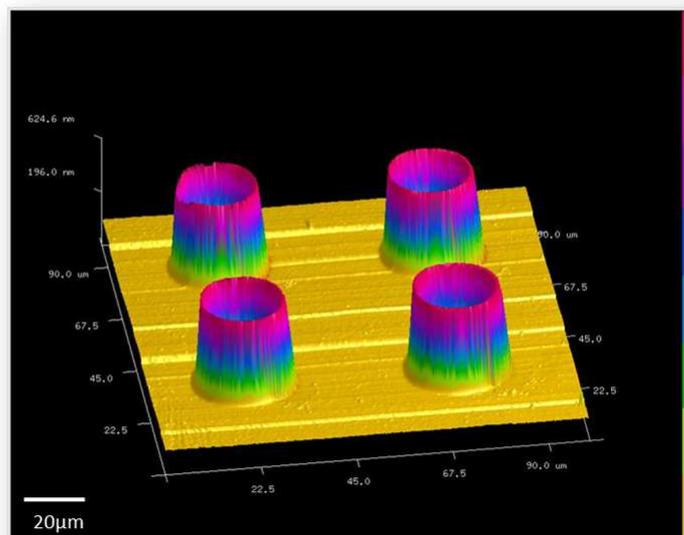


Image AFM de structuration de surface avec des dendrimères réalisée par un nouveau procédé de lithographie douce.

Le procédé de « trempage » actuellement utilisé pour la fonctionnalisation de lames de verre avec des dendrimères est réalisé par incubation des lames dans une solution de dendrimères dans le tétrahydrofurane (THF) pendant plusieurs heures (le protocole est décrit en détails dans la Partie 5). Il a pour principal inconvénient d'être long (5 heures) et coûteux en matière de solvant (500 mL pour 30 lames) et de dendrimères (900 mg dans 500 mL). De plus, il conduit à la fonctionnalisation complète de la lame sur ces deux faces ce qui n'est pas nécessaire pour les applications souhaitées. Pour pallier à cela, le développement d'un procédé plus rapide et flexible permettant de fonctionnaliser uniquement la zone d'intérêt sur la lame, c'est-à-dire la zone utile au dépôt des oligonucléotides sondes, a été mis en place et constitue le principal objectif de ce chapitre.

Dans ce chapitre, le procédé dit de « confinement » ainsi que les principes physiques mis en jeu seront détaillés. Par la suite, les principaux avantages de notre procédé pour la conception de biopuces à ADN et l'augmentation des signaux de l'hybridation seront mis en évidence. Enfin, nous montrerons que ces travaux ont conduit à développer et à mettre au point un procédé innovant de co-fonctionnalisation de surface adapté à la conception de biopuces à ADN.

A. Nouvelle technique de structuration de surface par des dendrimères pour l'augmentation des signaux de fluorescence

Dans cette section, le nouveau procédé de lithographie pour la fonctionnalisation de surface avec des dendrimères est présenté.

A.1. Le procédé de structuration de surface par « confinement »

A.1.a. Description du procédé

Le procédé de « confinement » permet de fonctionnaliser une surface avec des dendrimères avec ou sans motifs topographiques. Pour cela, une solution de dendrimères dans du THF est « confinée » entre une structure en PDMS et une surface amine. Cette structure en PDMS peut être structurée de motifs topographiques ou non. Afin de contrôler les dépôts, le robot semi-automatique de lithographie douce de la société Gésim¹⁹², décrit dans la partie B.6 du Matériel et Méthodes, a été utilisé. Au sein de ce robot, le confinement est assuré par un ensemble formé d'une membrane en PDMS portée par une pièce en plexiglass (Figure 47).

¹⁹² www.gesim.de/en/contact-printers

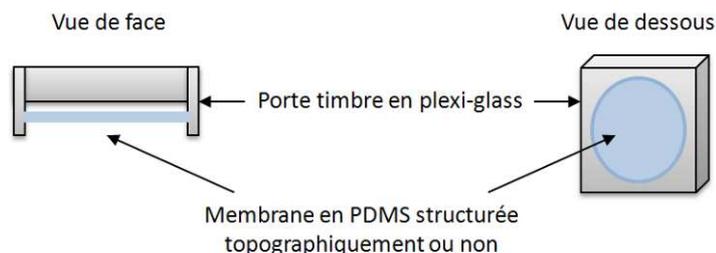
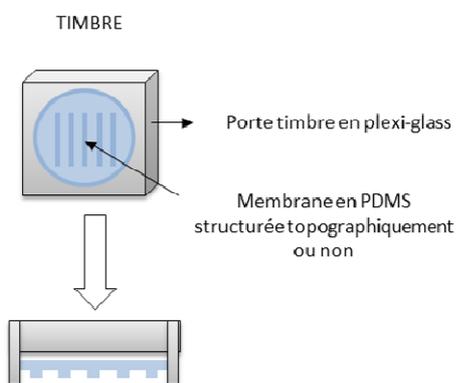


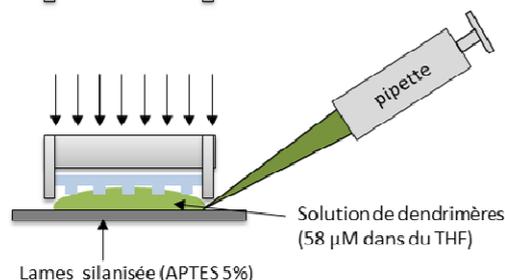
Figure 47 : Schéma représentant les timbres utilisés pour le procédé de structuration de surface par « confinement ». Ces timbres en plexiglass et PDMS sont utilisés avec le robot GeSIM μ -CP 3.0, commercialisé par la société Gésim et dédié à des applications de « soft lithography ».

D'un point de vue expérimental, le procédé se décline en 3 étapes décrites dans la Figure 48. Nous avons choisi de présenter ici le principe avec des motifs de diffraction par soucis de cohérence avec le reste de nos travaux.

Etape 1 : Fabrication du timbre en PDMS structuré topographiquement



Etapes 2 : Piégeage de la goutte de la solution de dendrimères entre le timbre et une lame silanisée



Etapes 3 : Confinement de la solution de dendrimères jusqu'à évaporation du solvant (5 min). Les dendrimères sont contraints de s'assembler sur la lame selon les motifs présents sur le timbre

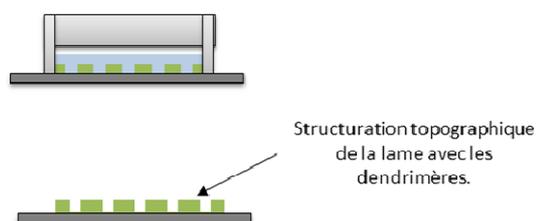


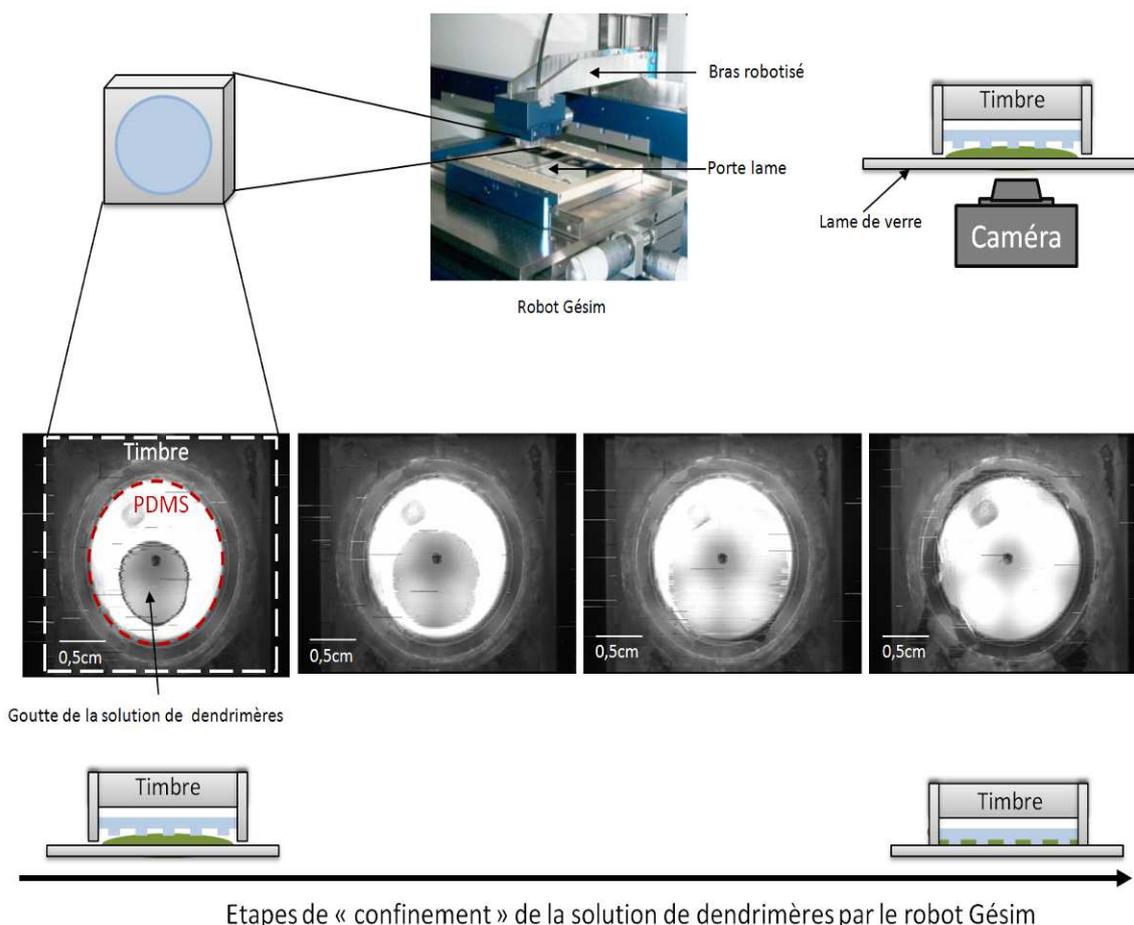
Figure 48 : Schéma représentant le principe de structuration de surface par le procédé de « confinement ». Le protocole précis est décrit dans la partie B.3 du Matériel et Méthodes.

Dans cette figure, nous utilisons un timbre en PDMS adapté au robot de Gesim mais il serait également possible d'envisager une structure entièrement en PDMS. Dans ce dernier cas, le moule en silicium devrait comporter deux niveaux de lithographie : les motifs et tout

autour une structure de confinement plus haute. Ce type de moule à double niveau est déjà décrit dans la littérature.¹⁹³

Lors de l'étape de piégeage de la solution entre le timbre et la surface, la goutte est maintenue grâce au porte timbre en plexiglass. Par la suite, la totalité de la solution est confinée sur la lame de verre aminée lors du rapprochement du timbre avec la surface et ce jusqu'au contact. Le procédé est considéré comme terminé lorsque le solvant est complètement évaporé (5 minutes) à travers le timbre en PDMS perméable au THF mais pas aux dendrimères dont le diamètre est de 7nm. Pendant l'étape de confinement, les dendrimères sont contraints de s'assembler sur la lame selon les motifs présents sur le timbre. Comme dans les travaux publiés par Thibault *et al.*¹⁹⁴, les motifs obtenus correspondent à l'inverse de ceux du timbre. En revanche dans notre cas, le timbre n'est pas encré avec des dendrimères, il sert uniquement à les confiner.

La Figure 49 est constituée de photographies illustrant le procédé de « confinement ». Dans cette figure, le piégeage de la goutte puis le confinement ont été filmés par une caméra située en dessous de la lame de verre aminée. Le procédé a été réalisé par le robot GeSim μ CP-3.0 avec un timbre en PDMS comportant des motifs topographiques submicrométriques.



¹⁹³ J. Chalmeau, C. Thibault, F. Carcenac et C. Vieu, Japanese Journal of Applied Physics, 2008, 47, 6, 5221-5225.

¹⁹⁴ C. Thibault, C. Severac, E. Trévisiol, C. Vieu, Microelectronic Engineering 83(2006), 1513-1516

Figure 49 : Film photographique représentant le procédé de « confinement » avec le robot Gésim.

Dans la première photo, la goutte de solution piégée sous la membrane en PDMS (entourée en rouge) peut être observée. Puis, lorsque le timbre est rapproché de la surface par le bras robotisé, la goutte est « confinée » sur la lame.

A.1.b. Exemple de motifs micrométriques de dendrimères obtenus par confinement

La Figure 50 illustre quelques exemples de motifs formés de dendrimères réalisés par le procédé de « confinement » d'une solution de dendrimères dans du THF sur une lame amine.

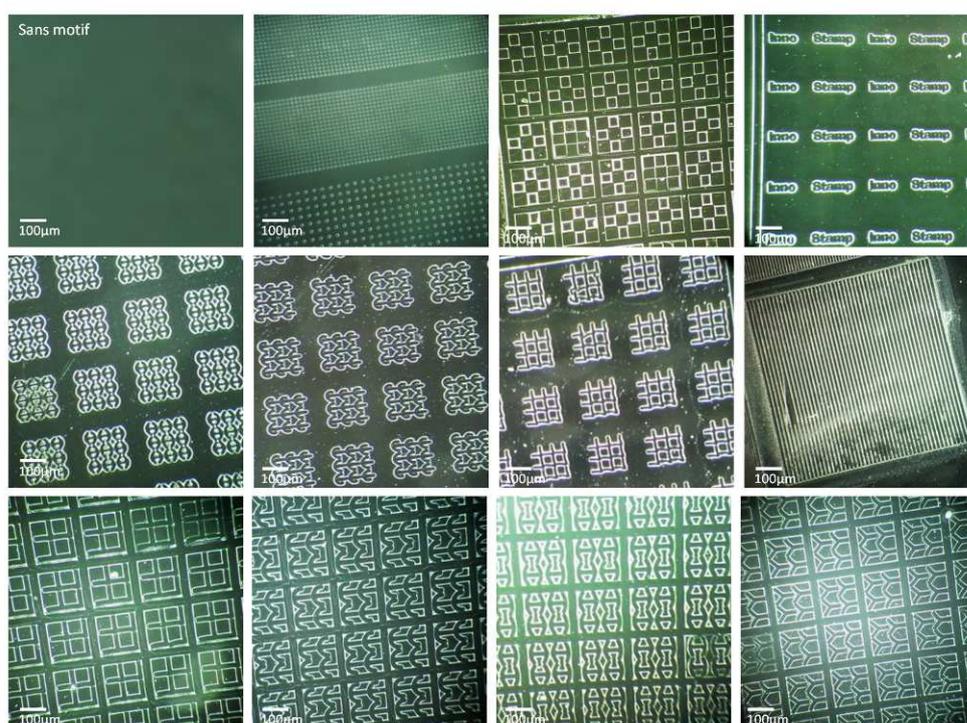


Figure 50 : Exemple de motifs formés de dendrimères réalisés par le procédé de « confinement » d'une solution de dendrimères (58 µM) avec un timbre en PDMS structuré sur lame de verre silanisée (APTES 5%). Images en champ sombre (objectif x10).

Les avantages que procure la méthode de confinement sont résumés dans le Tableau 5 où sont comparés les procédés de fabrication par « trempage » et par « confinement » en termes de durée de fonctionnalisation et de quantité de dendrimères utilisée.

Tableau 5 : Comparaison des procédés de fabrication par « trempage » et par « confinement ».

	Fonctionnalisation par « trempage »	Fonctionnalisation par « confinement »
Temps de fonctionnalisation	Fonctionnalisation de surface avec des dendrimères : 1 jour (possibilité de fonctionnaliser plusieurs lames en parallèle.)	Fonctionnalisation de surface avec des dendrimères : 5 min (fonctionnalisation de plusieurs lames en parallèle non développée)
Quantité de dendrimères utilisée par lame	80 µg/cm² Cependant, la fonctionnalisation par trempage entraîne l'accrochage des dendrimères sur les deux faces de la lame soit 3 mg de dendrimères par lame. ¹⁹⁵	50 µg/cm² La quantité de dendrimères utilisée dépend de la taille de la zone à fonctionnaliser et est directement liée à la taille du timbre utilisé. Cette technique permet de limiter la fonctionnalisation à la zone utile.

Le procédé de fonctionnalisation par « confinement » permet de réduire considérablement le temps de fonctionnalisation ainsi que la quantité de dendrimères utilisée par cm². Le temps de fabrication devient comparable aux temps utilisés pour des techniques de lithographie conventionnelles.

En conclusion, ce procédé de fonctionnalisation a pour avantage de réduire significativement le temps de fonctionnalisation d'une surface par des dendrimères (5 minutes au lieu de plusieurs heures). Il permet aussi de réduire la quantité de dendrimères consommée en fonctionnalisant seulement la zone d'intérêt sur la puce contrairement au procédé de fonctionnalisation par « trempage ». De plus, ce procédé a pour avantage de structurer topographiquement la fonctionnalisation selon un large choix de motifs.

A.1.c. Quels sont les principes mis en jeu dans le procédé de « confinement » ?

Afin de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents au procédé de « confinement », l'influence de la taille des motifs, des molécules confinées et du solvant sont étudiées dans cette section.

1. Variation des motifs du timbre en PDMS :

Dans un premier temps, les résultats du confinement de dendrimères phosphorés dans du THF selon des motifs submicrométriques (lignes de 500 nm de largeur et hauteur au pas de 1 µm) et des motifs micrométriques (lignes de 20µm de largeur et hauteur au pas de 40µm) ont été analysés par AFM.

¹⁹⁵ Source : Société Dendris

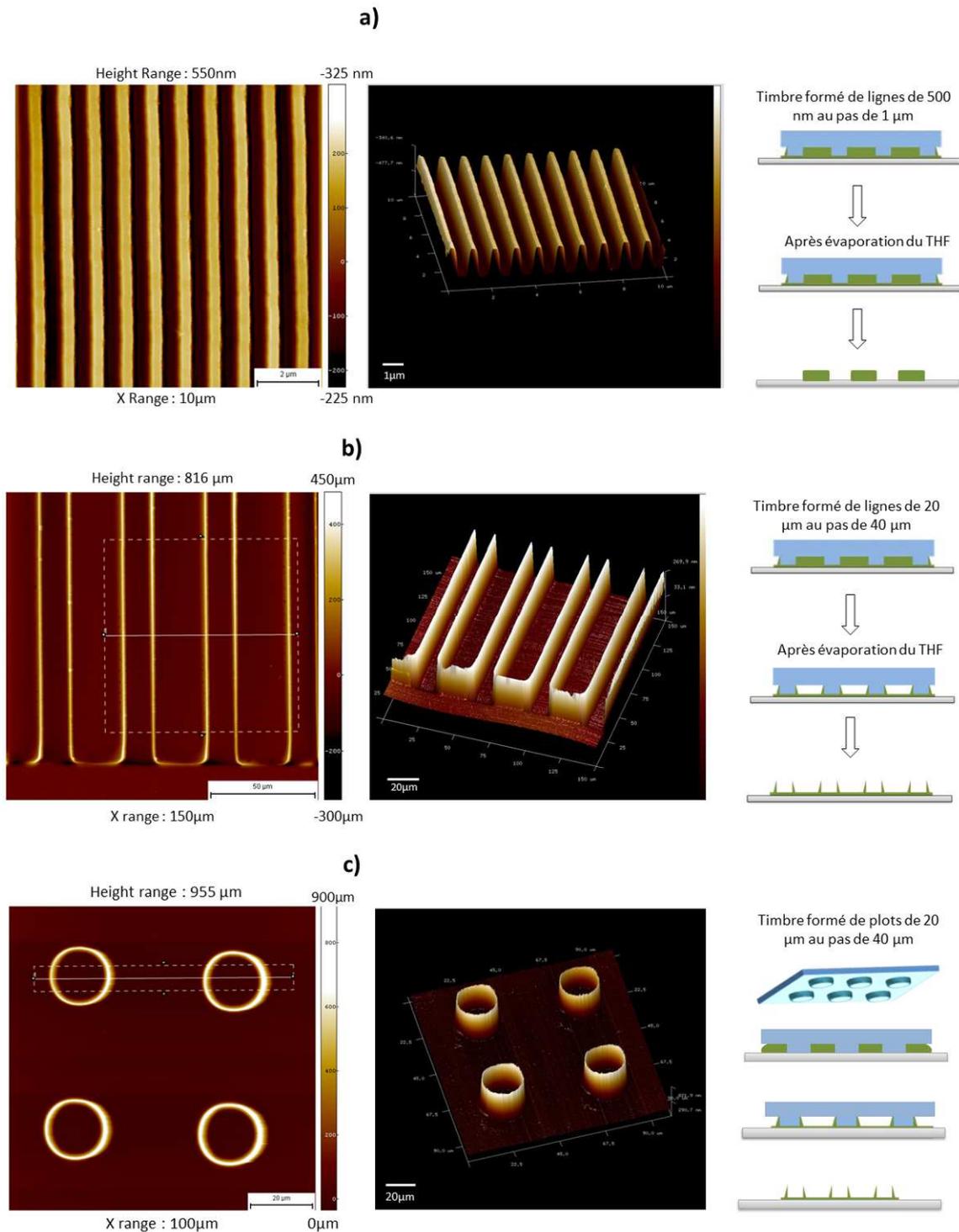


Figure 51 : Images obtenues par microscopie à force atomique des motifs formés de dendrimères (58 μM) réalisés par le procédé de « confinement » (5 minutes), a) pour un timbre formé de lignes de 500 nm au pas de 1 μm, b) pour un timbre formé de lignes de 20 μm de largeur et de hauteur au pas de 40 μm et c) pour un timbre formé de plots de 20 μm de diamètre et de hauteur au pas de 40 μm. Ce procédé a été réalisé avec une solution de dendrimères contenue dans du THF de 60 μL à 58 μM pendant 5 minutes sur une lame silanisée (APTES 5%), AFM_Bruker Catalyst_Mode Scan Asyst_Air_fo : 50-90 kHz k : 0,4N/m.

Pour un timbre formé de lignes de 500 nm au pas de 1 μm , les motifs obtenus sont des lignes de quelque centaines de nanomètres de hauteur et de largeur correspondant à un empilement de dendrimères après évaporation du THF (Figure 51a). *A contrario*, avec un timbre formé de motifs micrométriques (lignes de 20 μm de largeur et hauteur ou plots de 20 μm de diamètre au pas de 40 μm), les dendrimères sont « empilés » le long des parois des motifs du timbre et « dessinent » le contour des motifs en PDMS (Figure 51b et c). Pendant l'étape de confinement, le volume de la solution occupe l'ensemble de l'espace entre les structures topographiques du timbre. Lorsque le solvant est évaporé, les dendrimères « comblent » l'espace entre les lignes du timbre dans le cas d'un timbre formé de motifs submicrométriques. En revanche, ce n'est pas le cas pour les motifs micrométriques car la quantité de dendrimères contenue dans le volume de solution confinée semble insuffisante pour « combler » l'espace entre les motifs.

Le tétrahydrofurane (THF) utilisé comme solvant pour la solution de dendrimères est un solvant organique connu pour pénétrer dans le PDMS et le déformer.¹⁹⁶ La Figure 52 compare la taille des motifs en PDMS avant et après le procédé de « confinement » en utilisant soit une solution de THF contenant des dendrimères soit une solution de THF sans dendrimère. Le timbre en PDMS utilisé est structuré de plots de 20 μm de diamètre au pas de 40 μm .

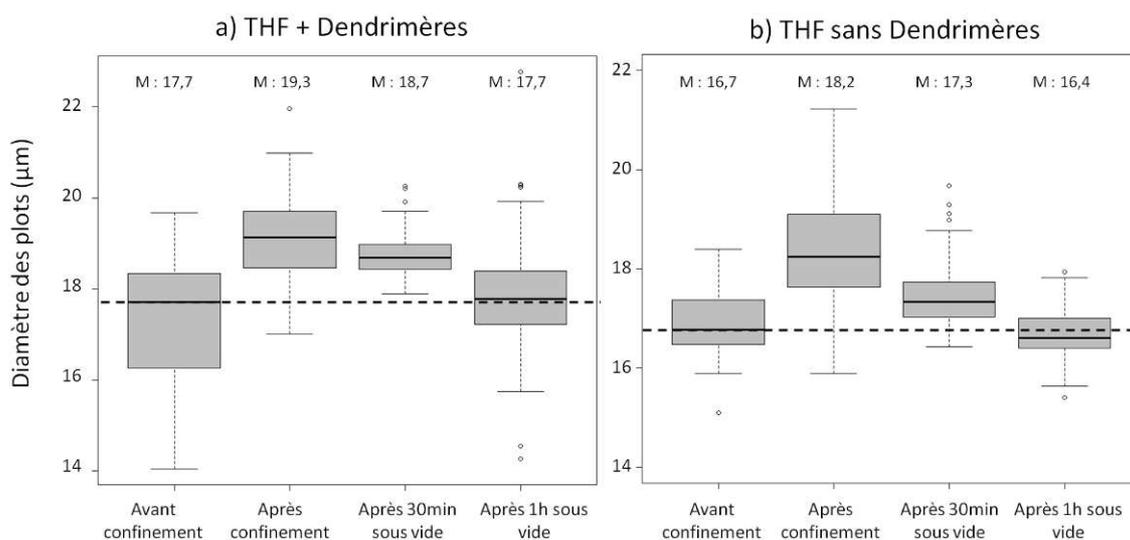


Figure 52 : Variation du diamètre des plots du timbre en PDMS avant et après confinement a) d'une solution de dendrimères dans du THF (58 μM), b) d'une solution de THF sans dendrimères (l'étude a été réalisée à partir de 100 plots en PDMS). M représente la valeur médiane des diamètres des 100 plots par condition.

La comparaison des médianes entre les conditions montre que le diamètre des motifs a augmenté après le procédé de « confinement » d'environ 1,6 μm (soit environ +8 % du diamètre initial). Puis, lorsque le timbre a été placé sous vide pour forcer l'évaporation du THF pendant 30 minutes et 1 heure, la médiane des diamètres mesurés diminue pour atteindre

¹⁹⁶ J.N. Lee, C. Park and G.M. Whitesides, *Anal. Chem.*, 2003, 75, 6544-6554.

sa valeur initiale (3^{ème} et 4^{ème} boxplot). Ces travaux répétés plusieurs fois pour le « confinement » d'une solution de THF sans dendrimère ont permis d'obtenir des résultats similaires (Figure 52b). Ces résultats valident que le THF pénètre dans le timbre en PDMS et le déforme pendant le procédé de « confinement ».

2. Changement des molécules.

Cette section a pour but de comprendre si le procédé de « confinement » est molécule-dépendant. Pour cela, le procédé de « confinement » a été réalisé avec un autre type de molécules, le polybutadiène 1, 2-NH₂, solubilisé dans le THF (Figure 53).

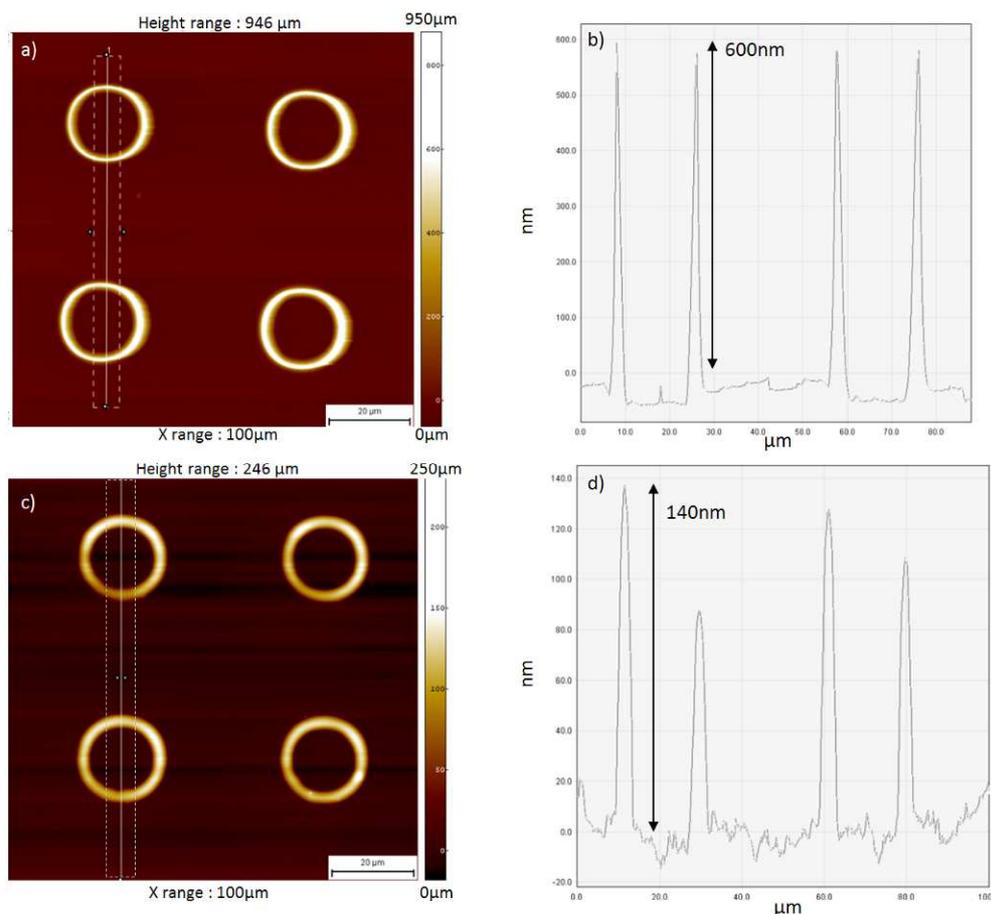


Figure 53 : a) Image AFM de motifs formés de dendrimères réalisés par le procédé de « confinement » (solution de 60 μL à 58 μM) avec un timbre constitué de plots de 20 μm de diamètre et de hauteur sur une lame silanisée (APTES 5%) (5 min), ; b) représentation graphique de la coupe moyenne des hauteurs de la figure a) ; c) Image obtenue par microscopie à force atomique de motifs formés de polybutadiène1, 2-NH₂ (de 60 μL à 1 mg/mL) réalisés par le procédé de « confinement » avec un timbre constitué de plots de 20 μm de diamètre sur une lame époxy silane (5 min), d) représentation graphique de la coupe moyenne des hauteurs de la figure c). AFM_Bruker Catalyst_Mode Scan Asyst_Air_fo : 50-90 kHz k : 0,4N/m. ;

La Figure 53 montre que le procédé de « confinement » est réalisable avec une solution de THF contenant du polybutadiène. Les motifs obtenus (Figure 53c)) sont très similaires à ceux obtenus à partir d'une solution de THF-dendrimères (Figure 53a)). Néanmoins, les représentations graphiques des coupes moyennes des hauteurs des motifs

illustrent une différence de hauteur entre les motifs (600 nm pour les dendrimères et 140 nm par le polybutadiène). La concentration et la taille des molécules étant différentes, ces résultats ne permettent pas d'expliquer les raisons de cette différence. Pour autant, cette expérience montre que le procédé de confinement dans le THF peut être utilisé avec d'autres molécules que les dendrimères pour peu qu'elles soient solubles dans le THF. Il serait intéressant de reproduire cette expérience avec des objets, comme des nanoparticules, dispersées dans le THF.

3. Changement de solvant

Cette section a pour but d'évaluer l'importance des propriétés du solvant utilisé pour pénétrer dans le PDMS. Pour cela, le procédé de « confinement » a été réalisé avec du toluène et de l'éthanol respectivement connus pour pénétrer ou non dans le PDMS. Les travaux ont été réalisés avec un timbre constitué de plots de 20 μm de diamètre dans les deux cas. La Figure 54 compare les motifs obtenus après le procédé de « confinement » pour une solution de polybutadiène contenu dans du toluène et du THF.

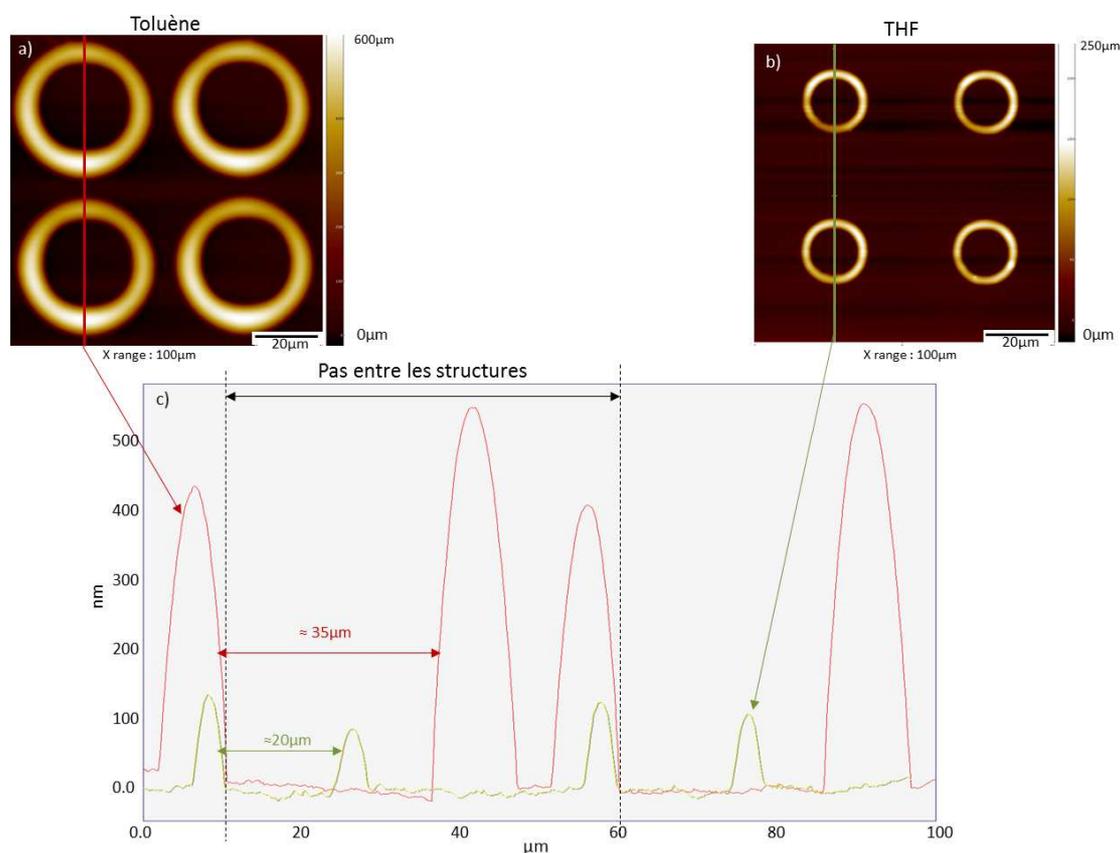


Figure 54 : a) Image AFM de motifs formés de polybutadiène dans du toluène (de 60 μL à 1 mg/mL) réalisés par le procédé de « confinement » avec un timbre constitué de plots de 20 μm de diamètre sur une lame époxysilane (5 min) ; b) Image obtenue à partir du microscope à force atomique de motifs formés de polybutadiène dans du THF (de 60 μL à 1 mg/mL) réalisés par le procédé de « confinement » avec un timbre constitué de plots de 20 μm de diamètre sur une lame époxysilane (5 min) (AFM_Bruker Catalyst_Mode Scan Asyst_Air_fo : 50-90 kHz k : 0,4N/m) ; c) représentation graphique de la coupe moyenne des hauteurs de la figure a) en rouge et b) en vert.

Les Figure 54a) et b) montrent que le « confinement » des molécules a bien eu lieu dans les deux cas selon des motifs de forme « cylindrique creuse » le long des parois du timbre en PDMS. En revanche, le diamètre des structures obtenues est de 35 μm avec le toluène alors qu'il n'est que de 20 μm avec la solution de THF (Figure 54c)). Cette différence de taille de structure semble être liée au solvant car le toluène pénètre et déforme plus le PDMS que le THF.¹⁹⁷ Ainsi, plus le solvant « gonfle » le PDMS, plus les motifs du timbre seront grands par rapport à leur taille initiale. Néanmoins, la Figure 54 montre que le pas entre les motifs reste inchangé entre le procédé de « confinement » avec le THF ou le toluène. Ceci signifie alors que le toluène ne déforme pas la totalité du timbre en PDMS. Il pénètre et déforme préférentiellement les microstructures formant la topographie du timbre. Il est intéressant de noter que dans le cas du toluène qui gonfle le plus les motifs, les molécules accumulées forment des motifs à la fois plus épais et plus hauts qu'avec le THF.

Enfin, la Figure 55 illustre le résultat obtenu par le procédé de « confinement » réalisé avec une solution de dendrimères contenue dans de l'éthanol. Contrairement au THF et au toluène, ce solvant pénètre peu dans le PDMS.

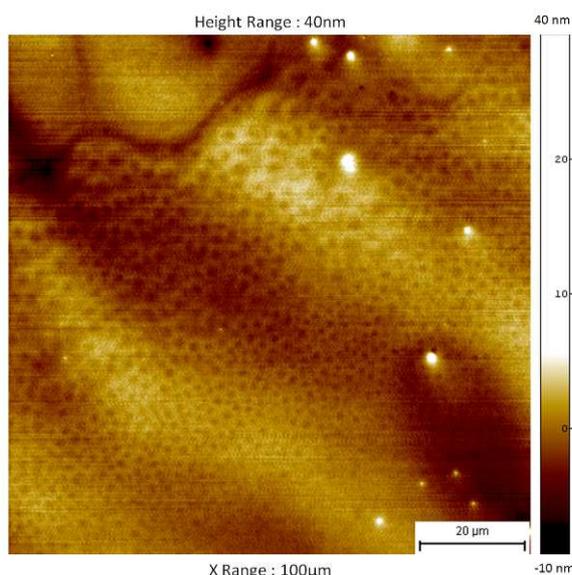


Figure 55 : Image AFM de la fonctionnalisation de surface avec une solution de dendrimères PAMAM (10% dans de l'éthanol) réalisée par le procédé de « confinement » (15 min en chauffant à 80°C). Ce procédé a été réalisé avec un timbre constitué de plots de 20 μm de diamètre sur une lame verre (AFM_Bruker Catalyst_Mode Scan Asyst_Air_fo : 50-90 kHz k : 0,4N/m).

L'image AFM montre que le procédé de confinement n'a pas eu lieu car aucun motif sur la surface fonctionnalisée ne peut être distingué en utilisant de l'éthanol.

L'ensemble de ces travaux montre que le procédé de « confinement » conduit à un assemblage dirigé des « objets » le long des parois des motifs du timbre en PDMS. Nous avons également montré que notre procédé est fortement dépendant de la nature du solvant

¹⁹⁷ J.N. Lee, C. Park and G.M. Whitesides, *Anal. Chem.*, 2003, 75, 6544-6554.

utilisé. Si ce dernier ne pénètre pas dans le PDMS alors le procédé n'est pas réalisable. *A contrario*, il semblerait qu'il ne soit pas dépendant de la nature des molécules car il fonctionne parfaitement avec une solution de dendrimères et de polybutadiène.

Ces travaux laissent à penser que plusieurs phénomènes physiques sont mis en jeu au sein du procédé. Afin de l'expliquer, le mécanisme suivant est proposé:

- 1) La pénétration du solvant dans le PDMS « crée » un volume d'air générant la formation d'une ligne triple (interface air /liquide/ solide). De plus, elle conduit à une surconcentration des « objets » au niveau des parois des motifs en PDMS. Ces derniers sont concentrés au niveau de la ligne triple.
- 2) La géométrie des motifs formés autour des parois en PDMS laisse à penser à un phénomène d'assemblage convectif vertical des « objets » contre le PDMS. Cet assemblage serait réalisé pendant l'évaporation et le déplacement de la ligne triple le long des motifs (Figure 56).

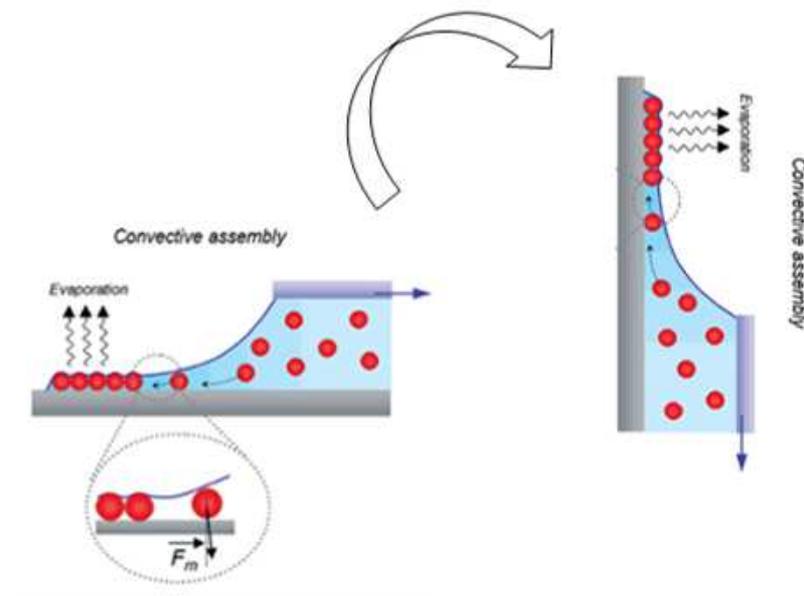


Figure 56 : Schéma représentant l'assemblage capillaire de nano objets. Image adaptée des travaux de Malaquin et al.,¹⁹⁸

¹⁹⁸ L. Malaquin, T. Kraus, H.Schmid, E. Delamarche et H. Wolf, Langmuir, 2007, 23, 11513-11521.

La Figure 57 décrit le mécanisme proposé pour expliquer l'assemblage dirigé des dendrimères pour les motifs micro et nanométriques.

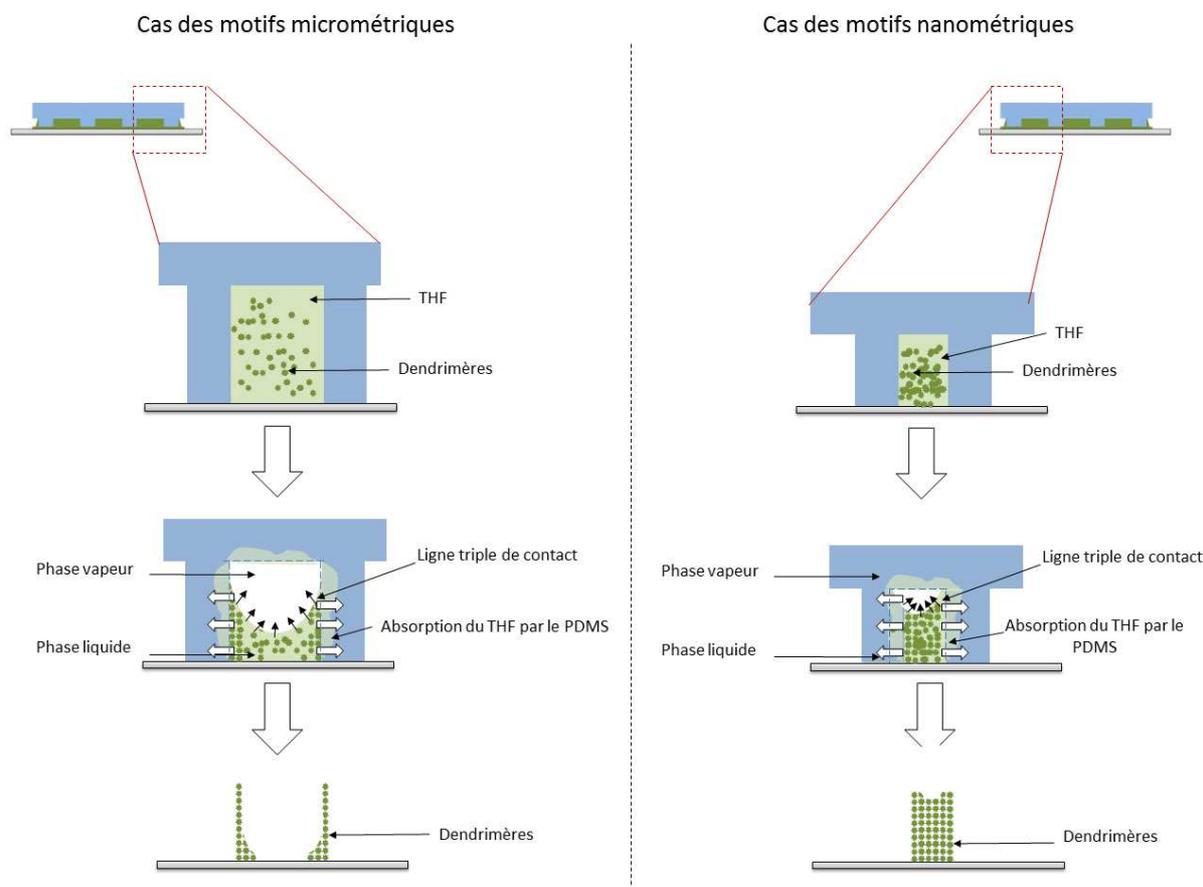


Figure 57 : Schéma représentant l'hypothèse d'assemblage convectif des dendrimères contre les parois des motifs du timbre en PDMS pendant l'évaporation du solvant en fonction de la taille des motifs.

Dans le cas des motifs micrométriques, lorsque la solution de dendrimères est confinée, le THF pénètre dans le PDMS et s'évapore (illustré par les flèches). Les dendrimères sont alors concentrés au niveau de la ligne triple. Le déplacement de cette dernière du haut vers le bas des motifs conduit à l'assemblage convectif des dendrimères contre les parois en PDMS. Lorsque le timbre en PDMS est retiré, les dendrimères restent assemblés entre eux sur la surface. Notons néanmoins que les dendrimères ne sont pas assemblés selon une monocouche car la largeur des motifs en dendrimères obtenue est comprise entre quelques nanomètres pour le sommet des motifs et plusieurs micromètres à leur base (Figure 53).

Pour les motifs nanométriques le principe est le même. Néanmoins, la concentration des dendrimères utilisée ($58 \mu\text{M}$) est suffisamment grande pour que les dendrimères « remplissent » l'ensemble des cavités entre les motifs en PDMS.

La concentration en dendrimères peut moduler les motifs obtenus en fonction de la taille des motifs en PDMS utilisée.

En conclusion, le procédé de fonctionnalisation de surface par « confinement » permet de structurer des motifs nano et micrométriques selon un principe impliquant des phénomènes d'absorption du solvant par les motifs en PDMS et d'assemblage convectif vertical. Les propriétés du solvant sont à la base de ce procédé. Celui-ci doit impérativement pénétrer dans le PDMS pour que le processus ait lieu.

A.2. Un procédé de fonctionnalisation de surface pour l'augmentation des signaux de l'hybridation

Afin de savoir si le procédé de « confinement » pour la fabrication de dendrilames est compatible avec la conception de biopuces à ADN, les lames fabriquées par « confinement » ont été comparées aux dendrilames fabriquées par la méthode de « trempage » déjà décrite dans la littérature.¹⁹⁹ Le procédé de confinement a été réalisé avec une solution de dendrimères en utilisant un timbre en PDMS sans structure (timbre plat) sur des lames « amino-silanisées » (APTES 5%).

La biopuce a été réalisée par dépôt d'oligonucléotides sondes de 20 bases avec un robot à aiguilles.²⁰⁰ Puis après réduction des fonctions imines, les puces ont été hybridées avec les oligonucléotides cibles complémentaires marqués avec un fluorophore.

¹⁹⁹ E. Trévisiol, V. Le Berre-Anton, J. Leclaire, G. Pratviel, A-M. Caminade, J-P. Majoral, J.M. François et B. Meunier, *New J. Chem.*, 2003,27, 1713-1719.

²⁰⁰ <http://biopuce.insa-toulouse.fr/>

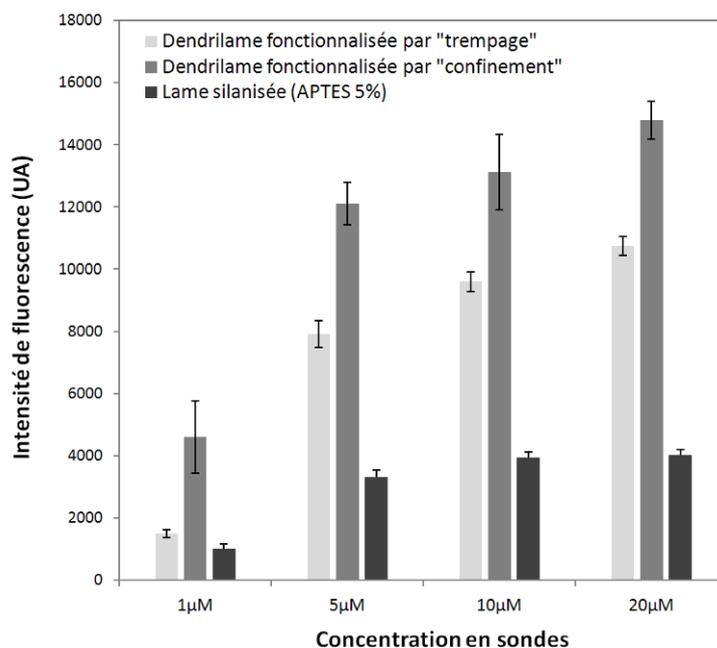


Figure 58 : Intensités de fluorescence médianes après l'hybridation d'oligonucléotides marqués en fluorescence pour différentes concentrations d'oligonucléotide sonde. Les oligonucléotides sondes (5'-[NH₂]-AAT-ATG-TTT-CCG-GTC-GTC-TC-3') utilisés dans un tampon phosphate 0.3M, pH 9) ont été déposés avec un robot à aiguilles sur trois types de supports différents : dendrilame fonctionnalisée par trempage (procédé classique), dendrilame fonctionnalisée par confinement et lame silanisée (APTES 5%) sans dendrimères avec 63 répliqués par lame et par concentration. L'hybridation des puces a été réalisée avec un oligonucléotide cible parfaitement complémentaire (5'-[Cy5]-GAG-ACG-ACC-GGA-AAC-ATA-TT-3') à 100 nM dans un tampon SSC 5X, 0,1% SDS, pendant 30min à 37°C. Paramètres du scanner de fluorescence (Innoscan 700) : PMT λ à 532 nm et PMT λ à 635 nm = 50%.

La Figure 58 montre que les intensités médianes de fluorescence obtenues après hybridation sur une dendrilame fonctionnalisée par « confinement » (en gris foncé) sont 2,5 supérieures aux signaux obtenus sur une dendrilame fonctionnalisée par « trempage » (en gris clair) pour des concentrations faibles en sondes (1µM) et environ 1,3 fois supérieure pour de plus grandes concentrations en sondes (20µM). *A contrario*, les signaux obtenus sur la lame silanisée non fonctionnalisée, servant de témoin négatif (en noir), sont très inférieurs aux intensités obtenues sur dendrilame (procédé classique ou par confinement). Le procédé de « confinement » d'une solution de dendrimères est non seulement compatible avec la conception de biopuces à ADN par robot à aiguilles mais il permet également d'augmenter les signaux de l'hybridation. Ces résultats peuvent être expliqués de la manière suivante :

La densité et/ou l'accessibilité des oligonucléotides sondes fixés sur la surface est/sont supérieure/es dans le cas d'une fonctionnalisation de la lame par le procédé de « confinement ».

La fonctionnalisation par trempage peut être considérée comme une monocouche de dendrimères. En effet, lors de la fonctionnalisation, les fonctions aldéhydes des dendrimères réagissent avec les fonctions amines de la lame silanisée mais ne réagissent pas entre elles. De plus, le lavage des lames après réaction avec les dendrimères permet d'éliminer l'excès de

dendrimères²⁰¹. En opposition, pour le procédé de « confinement », l'ensemble des dendrimères de la solution piégée est confiné sur la lame. Dans ce cas, la fonctionnalisation peut être considérée comme une multitude de couches de dendrimères agrégés. Ces deux considérations laissent à penser que le procédé de « confinement » entraîne une densité de dendrimères plus importante sur la lame augmentant ainsi la quantité d'oligonucléotides sondes fixés et/ou leur accessibilité sur la surface.

Néanmoins, nos résultats ne nous permettent pas de discuter sur la densité de sondes fixées ou encore leur accessibilité. Pour conclure sur cette hypothèse, il est nécessaire d'effectuer une étude de la densité de sondes à partir de sondes radiomarquées.

En conclusion, ce procédé est parfaitement adapté à la production de lames pour la conception de biopuces à ADN. Les lames fonctionnalisées par ce procédé de « confinement » apportent un signal d'hybridation meilleur comparé à celui obtenu avec la méthode traditionnelle de production des dendrilames. Il est donc envisageable d'utiliser préférentiellement à l'avenir ce procédé au détriment du trempage d'autant plus que la quantité de dendrimères nécessaire est réduite de 1.5 fois.

B. Le « tout en un » pour la simplification du procédé de fonctionnalisation et l'augmentation des signaux de fluorescence

Les travaux sur la fonctionnalisation par « confinement » décrits précédemment ont amené à développer et à mettre au point un procédé innovant de co-fonctionnalisation de surface. Ce procédé que nous appellerons le « tout en un » permet de fonctionnaliser un support solide avec des dendrimères par confinement et d'adresser en une seule et même étape des biomolécules (oligonucléotides) Cette technique permet également de structurer la co-fonctionnalisation selon des motifs micro ou nanométriques en quelques minutes.

B.1. Description du procédé du « tout en un »

Le procédé du « tout en un » se compose de trois grandes étapes décrites dans la Figure 59.

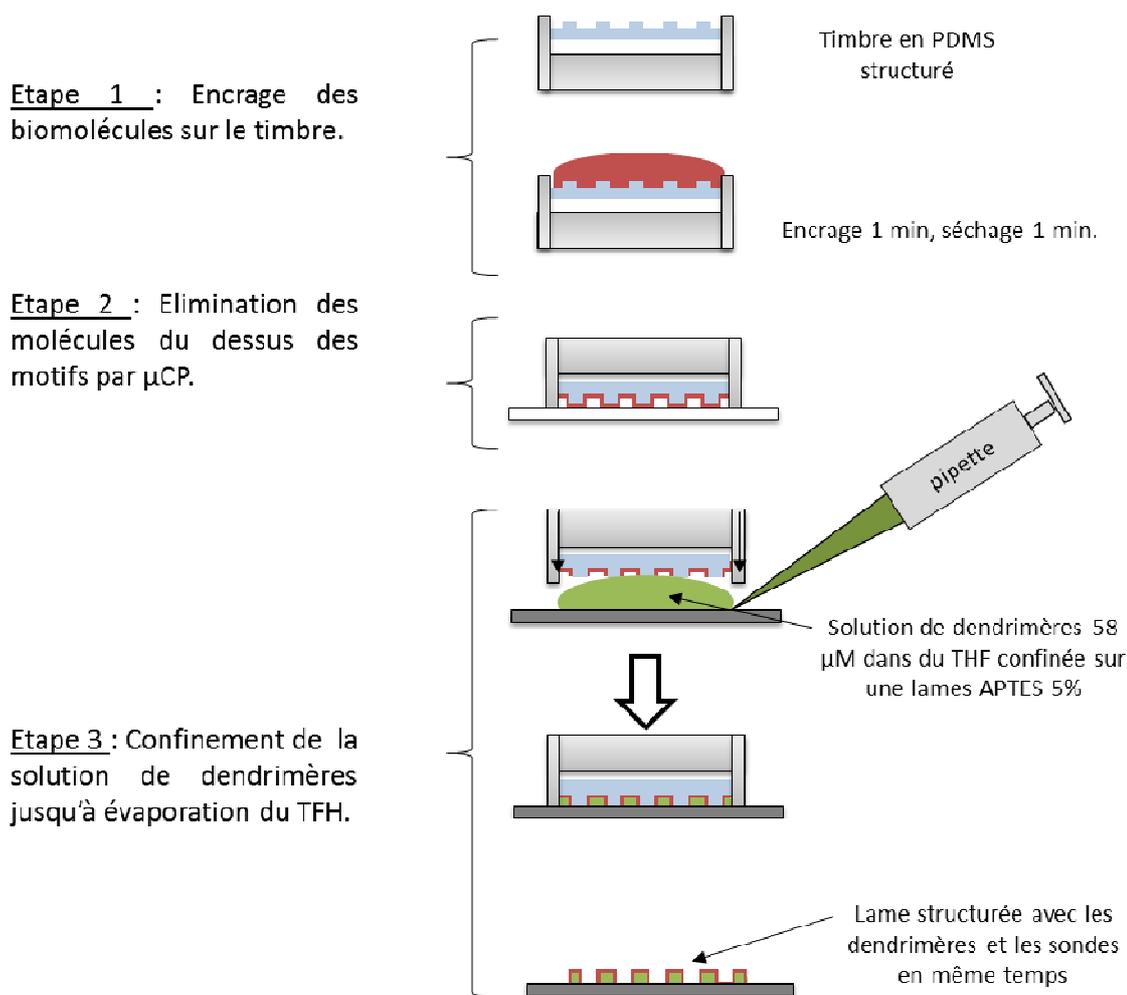


Figure 59 : Schéma représentant le principe de co-fonctionnalisation de surface par le procédé du « tout en un ».

Dans un premier temps, le timbre est encré avec une solution de biomolécules, dans notre cas, d'oligonucléotides sondes modifiés 5'-NH₂. Puis, la couche de biomolécules sur les motifs protubérants du timbre est éliminée afin que ces biomolécules soient uniquement déposées sur les dendrimères lors de l'étape de « confinement » et non sur toute la surface de la lame. Pour cela, le timbre encré est mis en contact avec une lame de verre afin d'éliminer les biomolécules qui seront en contact avec le support et de ne garder que celles présentes dans les creux des motifs (Figure 60). En fonction de l'adressage souhaité, cette étape n'est

pas nécessaire. En effet, si l'on souhaite un adressage sur toute la surface fonctionnalisée par les dendrimères, cette étape n'est pas indispensable.

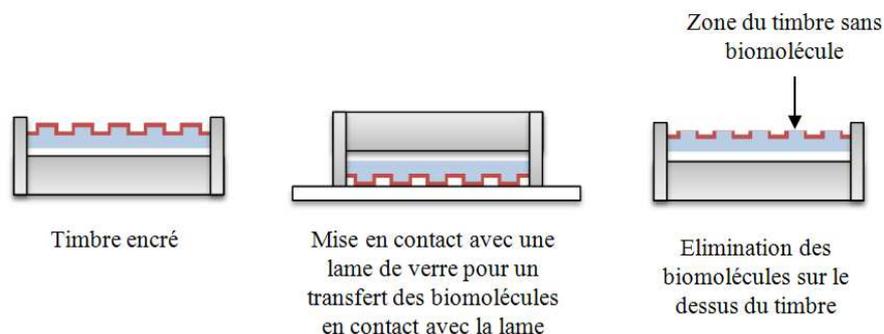


Figure 60 : Schéma représentant l'élimination des molécules du dessus des motifs par microcontact printing.

Enfin, une goutte de solution de dendrimères phosphorés aldéhydes dans du THF est ensuite piégée sous le timbre précédemment encré de biomolécules et la totalité de la solution est confinée sur la lame de verre « amino-silanisée » jusqu'à évaporation du solvant. Pendant l'étape de confinement, les dendrimères sont contraints de s'assembler sur la lame selon les motifs du timbre. Simultanément, les biomolécules encrées sur le timbre sont transférées sur les dendrimères.

Ce procédé permet donc en une seule étape de co-fonctionnaliser avec ou sans motifs un support amine avec des dendrimères tout en adressant des biomolécules sur ces derniers. La Figure 61 illustre quelques exemples de motifs obtenus pour le dépôt de dendrimères et l'adressage d'oligonucléotides marqués en fluorescence par le procédé du « tout en un ».

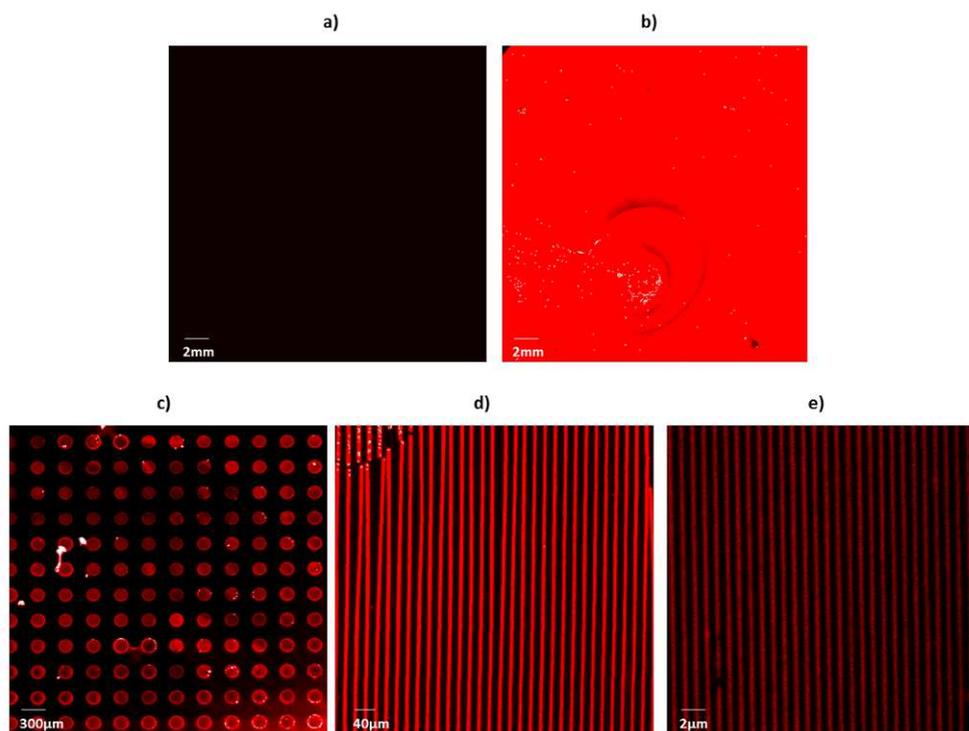


Figure 61 : Image de fluorescence illustrant quelques exemples de motifs obtenus lors du dépôt de dendrimères et l'adressage d'oligonucléotides marqués en fluorescence par le procédé du « tout en un ». Les timbres en PDMS utilisés sont : a) sans motifs et non encrés d'oligonucléotides fluorescents, b) sans motifs avec molécules fluorescentes, c) plots de 160 μm au pas de 300 μm , d) lignes de 20 μm au pas de 40 μm , e) lignes de 500nm au pas de 1 μm . La solution de dendrimères a été utilisée à 58 μM dans du THF et l'oligonucléotide marqué en fluorescence (5'-[NH₂-ATA-CTC-CGG-GAA-ACT-GAC-ATC-TAG-[Cy5]-3') à 5 μM dans du tampon phosphate 0,3 M, pH 9. Les images a), b), c) et d) ont été réalisées avec un scanner de fluorescence (Innoscan 900) : PMT λ à 532 nm et PMT λ à 635 nm = 10% et l'image f) a été réalisée avec un microscope à fluorescence (LSM 510 NLO Zeiss), Laser λ : 633 nm, objectif : x 40 à immersion).

Les images a) et b) illustrent les résultats obtenus avec un timbre en PDMS sans motif et les images c), d) et e), montrent des motifs micrométriques ou submicrométriques.

En conclusion, ce procédé innovant de co-fonctionnalisation de surface, appelé le « tout en un », permet de fonctionnaliser un support solide avec des dendrimères par confinement et d'adresser des biomolécules sur ces derniers en même temps. Cette technique rapide permet en quelques minutes de structurer la double fonctionnalisation selon des motifs micro ou nanométriques.

B.2. Un procédé compatible avec la production de biopuces à ADN

Dans le but de valider la compatibilité de ce procédé pour la production de biopuces à ADN, une comparaison avec le microcontact printing a été réalisée²⁰². Pour cela, les signaux de fluorescence, après hybridation avec les cibles complémentaires marquées, ont été comparés entre les deux méthodes de production.

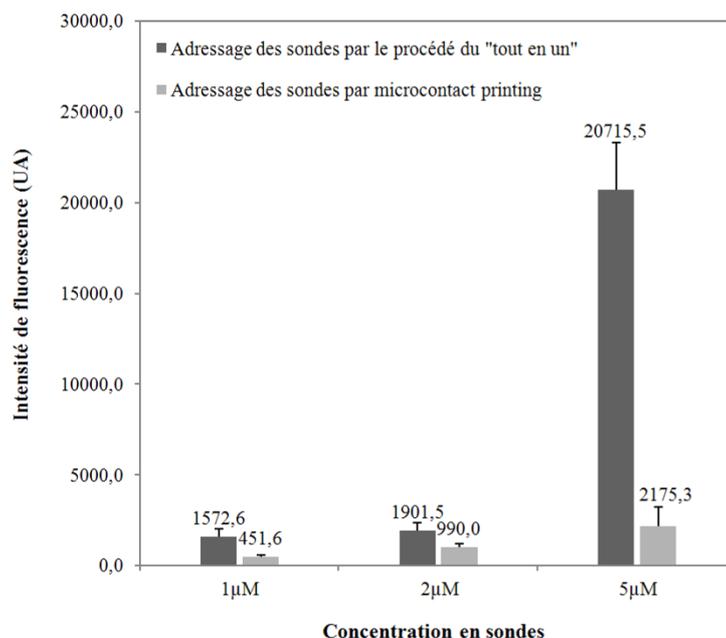


Figure 62 : Intensités de fluorescence médianes après hybridation d'oligonucléotides marqués en fluorescence pour différentes concentrations en oligonucléotides sondes. Les oligonucléotides sondes ont été adressés sur la puce soit par le procédé du « tout en un » (en gris foncé) soit par microcontact printing (gris clair) sur dendrilame. Quel que soit le procédé les dépôts ont été réalisés avec un timbre en PDMS sans motif. L'oligonucléotide sonde (5'-[NH₂-TAA-TAT-GTT-TCC-GGT-CGT-CTC) a été utilisé dans un tampon phosphate 0.3 M pH 9 et les oligonucléotides cibles (5'-[Cy5]GAG-ACG-ACC-GGA-AAC-ATA-TT-3') ont été hybridés à 100 nM dans un tampon SSC 5X, 0,1% SDS, pendant 30min à 37°C. Paramètres du scanner de fluorescence (Innoscan 700) : PMT λ à 532 nm et λ à 635 nm = 50%.

La Figure 62 montre que les biopuces produites par le procédé du « tout en un » (dendrimères + sondes en une étape) permettent une augmentation des signaux de fluorescence après hybridation des cibles complémentaires. En effet, les signaux sont environ 2 fois supérieurs pour de faibles concentrations en sondes (1 et 2 µM) et 10 fois supérieurs pour une plus forte concentration (5µM) dans le cas du procédé de co-fonctionnalisation de surface en comparaison avec le microcontact printing (µCP). Cette différence significative dans le cas du procédé du « tout en un » pourrait s'expliquer par une densité et/ou une accessibilité des sondes adressées et fixées sur la surface supérieure par rapport au procédé de

²⁰² C Thibault, V Le Berre, S Casimirius, E Trévisiol, J François and C Vieu, Journal of Nanobiotechnology, 2005, 3:7 (2005),1-12

microcontact printing. Cette augmentation pourrait également être la conséquence d'un effet optique lié à la couche de dendrimères adressé sur la lame pendant le procédé du « tout en un ».

Pour vérifier cette hypothèse, la quantité de sondes adressées sur la puce a été comparée pour le dépôt d'oligonucléotides sondes marqués en fluorescence pour les deux procédés. L'intensité de fluorescence a été comparée après adressage puis après l'étape de réduction de la puce (avant hybridation) avec une solution aqueuse de borohydrure de sodium (NaBH_4 , 3.5 mg/mL). Ces travaux ont été réalisés à partir de timbres sans motif.

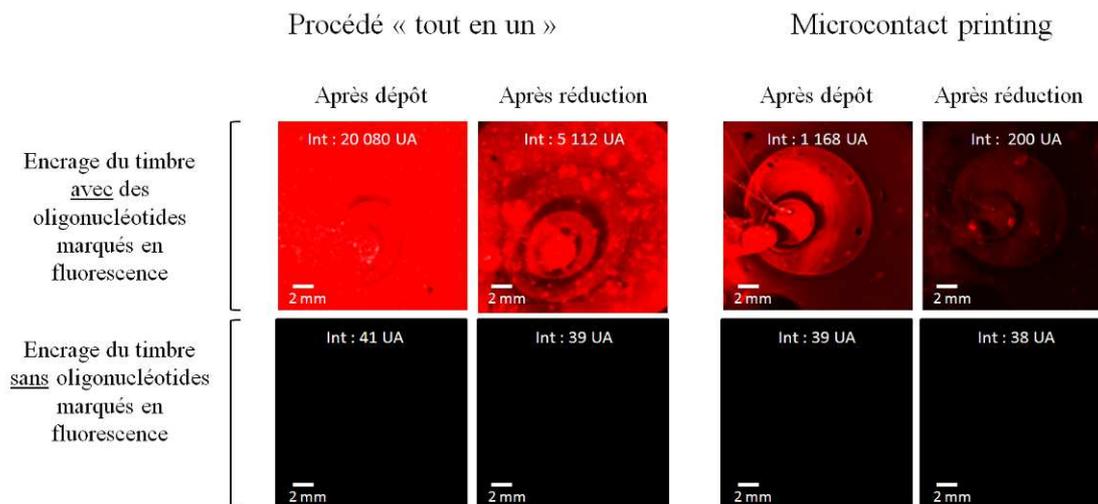


Figure 63 : Images de fluorescence obtenues après l'adressage d'un oligonucléotide marqué en fluorescence soit par le procédé tout en un (à gauche) soit par microcontact printing (à droite). L'intensité de fluorescence médiane de chaque image est inscrite sur l'image en unité arbitraire (UA). L'oligonucléotide (5'-[NH₂-ATA-CTC-CGG-GAA-ACT-GAC-ATC-TAG-[Cy5]-3') a été utilisé à 5 μM dans du tampon phosphate 0,3 M, pH 9. Les images sont issues du scanner de fluorescence (Innoscan 900) : PMT λ à 532nm et PMT λ à 635nm = 60%, lumière : 50, Contraste : 15, Balance: 0.

La Figure 63 montre que l'intensité médiane de fluorescence obtenue par le procédé du « tout en un » est environ 20 fois supérieure à celle obtenue par le procédé μCP. Cette différence est identique après l'étape de réduction de la puce. L'intensité de fluorescence chute après l'étape de réduction car celle-ci permet d'éliminer tous les oligonucléotides non fixés spécifiquement aux dendrimères. De plus, le borohydrure de sodium (NaBH_4) est connu pour altérer le composé fluorescent.²⁰³ Ces résultats montrent que la densité de sondes adressées et fixées sur la surface est supérieure dans le cas du procédé du « tout en un » par rapport à celui de la méthode de microcontact printing. A noter que l'hétérogénéité de la fluorescence après le dépôt des oligonucléotides marqués s'explique par l'encreage hétérogène des molécules sur le timbre discuté dans le chapitre 2.

²⁰³ K. Kundu, S.F. Knight, N.Willett, S.Lee, W. R. Taylor, et N. Murthy, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2009, 48, 299-303.

Cependant, il reste à comprendre pourquoi cette densité de sondes déposées est supérieure dans le cas du procédé du « tout en un ». Pour les deux méthodes de dépôt, le timbre utilisé est encre dans les mêmes conditions avec les oligonucléotides sondes. Si l'on considère qu'initialement la quantité encrée est équivalente dans les deux cas, alors nous pouvons suggérer que dans le procédé du « tout en un » le relargage des biomolécules du timbre vers les dendrimères est amélioré suite à l'effet du solvant qui pénètre dans le PDMS et qui le « gonfle ».

C. Conclusion

Dans la première partie de ce chapitre, j'ai développé le procédé de « confinement » pour la fonctionnalisation de surface. Ce procédé permet de réduire considérablement le temps de fonctionnalisation d'une surface par des dendrimères (5 minutes au lieu de plusieurs heures) ainsi que la quantité de dendrimères consommées en fonctionnalisant seulement la zone d'intérêt sur la puce. Ce procédé présente également pour avantage de structurer topographiquement la fonctionnalisation selon un large choix de motifs. Adapté à la production de lame pour la conception de biopuces à ADN, il permet d'augmenter les signaux de fluorescence après l'hybridation. Il semblerait que le principe repose sur les phénomènes d'absorption du solvant par le PDMS et d'assemblage convectif vertical. Les propriétés du solvant semblent être à la base de ce procédé car celui-ci doit impérativement pénétrer dans le PDMS pour que le processus ait lieu. De plus, ce nouveau procédé a également pour avantage de structurer des motifs non réalisables par d'autres techniques de lithographie douce avec des facteurs de forme incompatibles avec l'élasticité du PDMS²⁰⁴ comme des « cylindres creux » de 20 µm de diamètre, 600 nm de hauteur et de largeur inférieure à 5 µm. De plus, il permet de structurer la fonctionnalisation de surface avec des molécules solubles dans des solvants organiques déformant le PDMS et peu compatibles avec le microcontact printing.

Ces travaux ont également conduit à la mise au point d'un procédé innovant de co-fonctionnalisation de surface, appelé le « tout en un ». Il permet de fonctionnaliser un support solide avec des dendrimères par « confinement » et d'adresser des biomolécules sur ces derniers simultanément. Cette technique rapide et à bas coût permet de structurer la double fonctionnalisation selon des motifs micro ou nanométriques en quelques minutes. De plus, il a pour avantage d'être plus performant que le microcontact printing pour le dépôt d'oligonucléotides sondes. Ainsi, les signaux de l'hybridation en sont augmentés. Ces travaux sont innovants et font l'objet de la rédaction d'un brevet d'invention.

Les techniques de « soft lithography » largement développées par les travaux de Georges Whitesides²⁰⁵ regroupent tous les procédés de structuration de surface à partir de timbre en PDMS comme le microcontact printing, le « microtransfert molding », le « replica molding », le « micromolding in capillaries » ou encore le « solvent assisted micromolding »²⁰⁶. Le procédé du « tout en un » que nous venons de présenter n'a jamais été

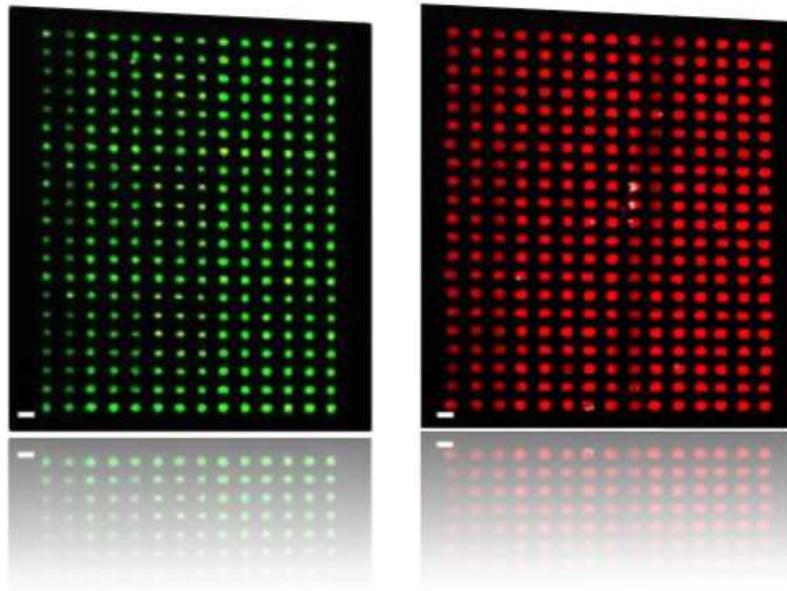
²⁰⁴ A. Bietsch, B. Michel, J. of Appl. Phys., 2000, 88, 7, 4310-4318.

²⁰⁵ D. Qin, Y. Xia et G.M. Whitesides Nature protocols, 2010, 5, 3, 491-VOL.5 NO.3 2010 491-502.

²⁰⁶ Y. Xia et G.M. Whitesides, Angew. Chem. Int. Ed. 1998, 37, 550-575.

décrit dans la littérature. Dédié à la structuration de surface à partir de timbre en PDMS, il peut ainsi être considéré comme un nouveau procédé de lithographie douce.

Chapitre 2 : Développement d'un automate de microcontact printing pour la conception de biopuces à ADN



Images de dépôts d'oligonucléotides fluorescents avec un robot à aiguilles (barre d'échelle : 300 μ m)

Les premiers travaux de conception de biopuces à ADN par μ CP et sur dendrilames ont été menés par Thibault *et al.*²⁰⁷. Il a été montré que pour de faibles concentrations en oligonucléotides sondes ($< 10 \mu\text{M}$) déposés sur la puce, la conception par μ CP permet d'obtenir des signaux de fluorescence plus importants après l'hybridation que ceux obtenus lors de la conception par le robot à aiguilles. Ces résultats très encourageants laissent à penser que le μ CP est une technologie qui pourrait répondre à notre problématique d'adressage pour la fabrication de biopuces à ADN à moindre coût. Cependant, ces travaux, réalisés de façon purement manuelle, demandent à être développés pour l'adressage multiplexé des sondes.

Ce chapitre est consacré à l'évaluation des performances d'un nouveau robot de microcontact printing (μ CP), l'Innostamp 40 pour la conception de biopuces à ADN. L'objectif est de valider les précédents travaux de Thibault *et al.* avec cet automate de μ CP. Ce dernier a été conçu par la société Innopsys dans le cadre du projet ANR Innodiag pour le dépôt multiplexé de biomolécules. Ce robot, décrit dans l'introduction bibliographique, utilise un champ magnétique pour mettre en contact le timbre magnétisé et le support avec une pression d'appui homogène et contrôlée. Les travaux présentés ici ont été réalisés en étroite collaboration avec Julie Fredonnet, ingénieure d'études à l'Institut des Technologies Avancé en science du Vivant (ITAV USR 3505) engagée sur le projet Innodiag.

A. Adressage de biomolécules par μ CP avec l'Innostamp 40

Pour débiter, nous étudierons les conditions optimales de dépôt d'oligonucléotides sondes sur dendrilame. Puis, l'Innostamp dans sa version prototype sera comparé au robot à aiguilles pour la production de biopuces à ADN. En conclusion, nos recommandations en termes de protocole d'utilisation et d'amélioration du prototype seront formulées et résumées.

A.1. Différences entre le μ CP manuel et le μ CP avec l'Innostamp 40

Les caractéristiques techniques de l'outil de μ CP Innostamp 40 sont décrites en détails dans la partie B.7 du Matériel et Méthodes. Le type de macrotimbre sera néanmoins précisé. Puis, nous mettrons en évidence les différences entre le μ CP manuel et le μ CP avec l'Innostamp 40.

Dans le but d'évaluer cet automate pour la production de biopuces à ADN à basse et moyenne densités (< 150 analyses en parallèles), nous avons choisi d'utiliser un macrotimbre constitué de 4 colonnes de 16 piliers en PDMS avec une semelle en PDMS contenant de la poudre de fer (50% en masse) (Figure 64a). Les piliers du macrotimbre sont microstructurés d'une matrice de plots de $160 \mu\text{m}$ de diamètre, $100 \mu\text{m}$ de hauteur au pas de $300 \mu\text{m}$. Ces motifs sont proches de ceux réalisés par la méthode « conventionnelle » du robot à aiguilles. De plus, leur dimension micrométrique est parfaitement adaptée à la résolution du lecteur de fluorescence utilisé (Innoscan 900, Innopsys). Le contact entre le timbre chargé de poudre de fer et la lame de verre à fonctionnaliser est réalisé grâce à l'application d'un champ

²⁰⁷ C. Thibault, V. Le Berre, S. Casimirius, E. Trévisiol, J François et C Vieu, Journal of Nanobiotechnology, 2005, 1-12

magnétique produit par 3 aimants positionnés sous la lame (Figure 64b). La force de contact entre le timbre et la lame est définie non seulement par la quantité de poudre de fer dans la semelle du timbre mais aussi par la position de l'aimant par rapport à la lame. Plus l'aimant est proche de la lame, plus la force de contact est grande.

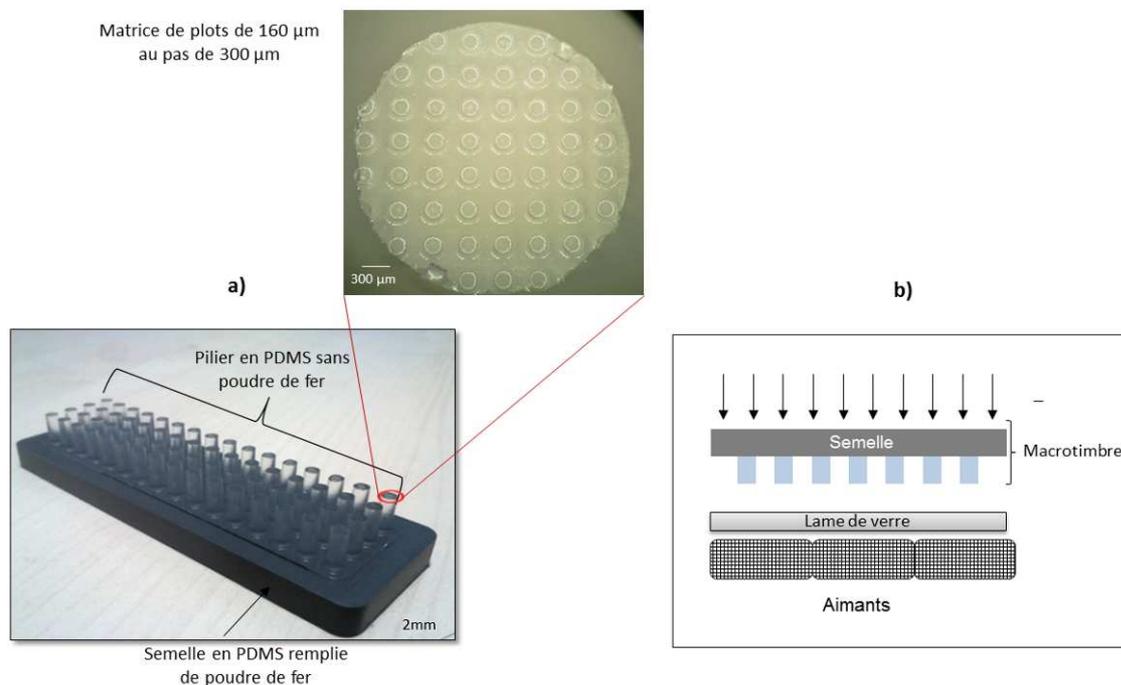


Figure 64 : a) Schéma représentant le principe de contact entre le macrotimbre et la lame par l'application d'un champ magnétique ; b) photo du macrotimbre constitué de 64 piliers microstructurés de plots de 160 µm au pas de 300 µm.

Le Tableau 6 illustre les différentes techniques entre le µCP manuel et le µCP avec l'Innostamp 40. Les étapes d'encrage et de dépôt sont très différentes avec l'Innostamp 40 par rapport au µCP manuel. Les travaux qui vont suivre permettront de vérifier si ces différences ont un impact sur la qualité des dépôts.

Tableau 6 : Comparaison entre le µCP manuel et le µCP avec l'Innostamp 40

	µCP manuel	µCP avec l'Innostamp 40
Timbre	Timbre en PDMS	Macrotimbre en PDMS magnétisé
Encrage	Dépôt d'une goutte de solution sur les motifs du timbre.	Encrage du macrotimbre par immersion dans une microplaque à puits
Séchage	Manuel par un flux d'azote	Automatique par une moto-turbine
Dépôts	Contact avec une pression manuelle sur l'arrière du timbre	Contact <i>via</i> une force magnétique

A.2. Analyse des conditions d'encrage et de dépôt d'oligonucléotides sondes sur dendrilames

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la mise au point des conditions de dépôt pour l'adressage d'oligonucléotides sondes sur dendrilames. Pour cela, nous avons utilisé exclusivement des oligonucléotides sondes de 26 bases modifiés par une fonction amine à l'extrémité 5' et marqués avec un fluorophore à leur extrémité 3' (24 bases [NH₂-5'-TAT-ACT-CCG-GGA-AAC-TGA-CAT-CTA-G-[Cy3 ou Cy5]-3' dilués dans du tampon phosphate 0,3 M, pH 9). L'intensité de fluorescence a été utilisée pour valider la qualité et l'homogénéité des dépôts.

A.2.a. Quelle est la force de contact optimale entre le macrotimbre et la lame ?

Sur l'Innostamp 40, la force de contact entre le macrotimbre et la lame est déterminée par la quantité de poudre de fer dans la semelle du timbre et la distance de l'aimant sous la lame avec la semelle du timbre en contact sur la lame. La distance entre la semelle du macrotimbre et les aimants permet de moduler la force exercée par le champ magnétique sur la semelle du timbre. Plus les aimants sont proches de la lame, plus la force est importante. Le déplacement des aimants sur le robot est matérialisé par des pas-moteurs (allant de 40 PM à 100 PM voir partie B.7 du Matériel et Méthodes). Plus le nombre de pas-moteurs est important, plus les aimants sont proches de la lame et donc plus la force de contact est grande. Dans cette section, nous cherchons à déterminer quelle est la position optimale en pas-moteurs pour que l'ensemble des motifs du macrotimbre soit en contact avec la lame sans être « écrasé ». Cette position doit également permettre un dépôt homogène des oligonucléotides sondes. Pour évaluer cette homogénéité, la dispersion des signaux de fluorescence en fonction de la position en pas-moteurs des aimants a été étudiée.

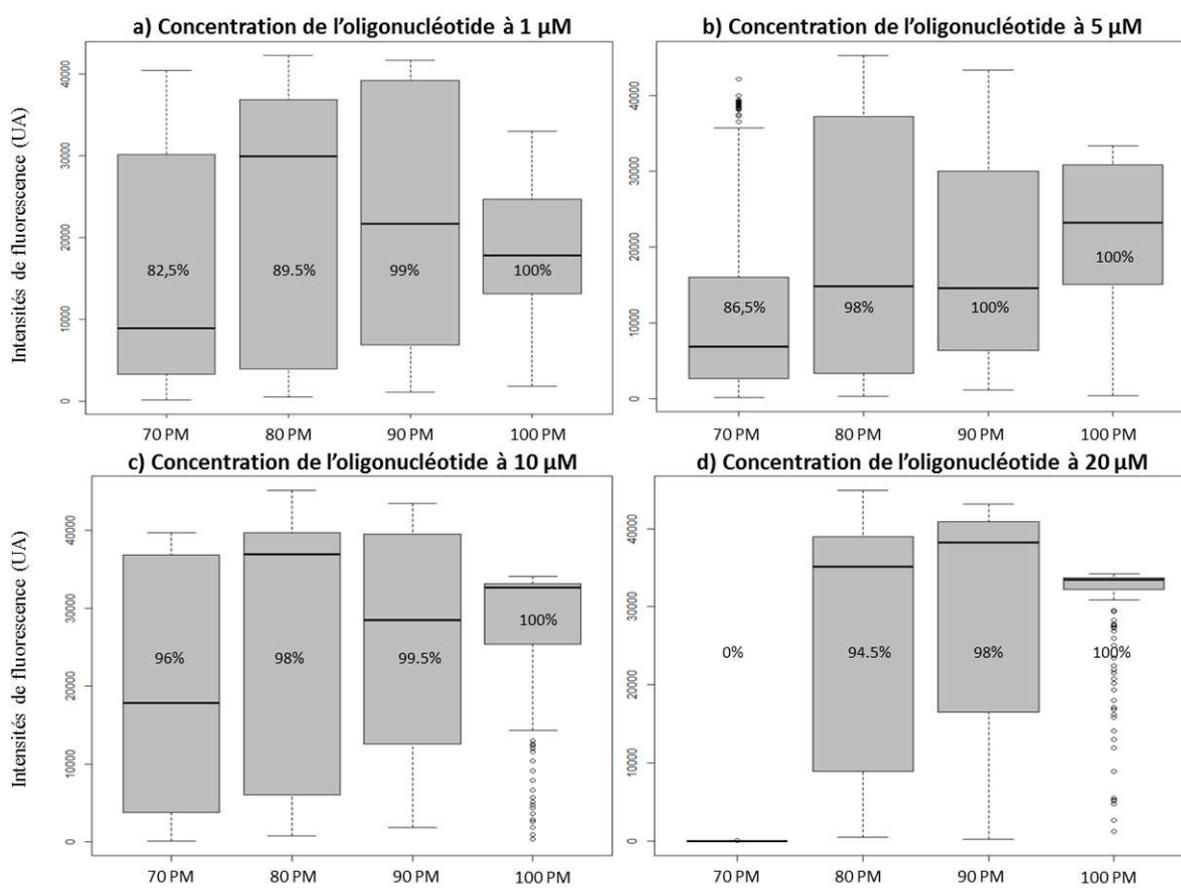


Figure 65 : Intensités médianes de fluorescence en fonction des pas-moteurs (PM) de positionnement de l'aimant sous la lame. Dépôt d'oligonucléotides marqués (5'-[NH₂-ATA-CTC-CGG-GAA-ACT-GAC-ATC-TAG-[Cy5]-3') dilués a) à 1 µM, b) à 5 µM, c) à 10 µM et d) à 20 µM dans du tampon phosphate 0,3 M, pH 9. Conditions de dépôt : encrage 60 s dans une microplaque ; séchage 100 UA pendant 60 s, dépôt 60 s sur dendrilame avec un seul et même macrotimbre. 200 spots par condition. Le chiffre en pourcentage représente les spots détectés en fluorescence. Paramètres du scanner de fluorescence (Innoscan 900) : PMT λ à 532 nm et PMT λ à 635 nm = 100%. (L'interprétation d'un « boxplot » est décrite dans la partie E.1 du Matériel et Méthodes).

La plus faible dispersion des signaux de fluorescence est observée pour une position des aimants de 100 pas-moteurs et ce quel que soit la concentration d'oligonucléotides fluorescents déposés (Figure 65). De plus, à 100 pas-moteurs, 100% de spots sont déposés. Ceci signifie que la totalité des motifs sont en contact avec la lame pendant le dépôt. En plus d'être réduite à 100 pas-moteur, la dispersion des signaux est plus faible pour le dépôt d'oligonucléotides à 20 µM en comparaison avec les dépôts à 1, 5 et 10 µM.

Dans le but d'évaluer la force réelle de contact entre le timbre et la lame, un dynamomètre est utilisé (Figure 66).

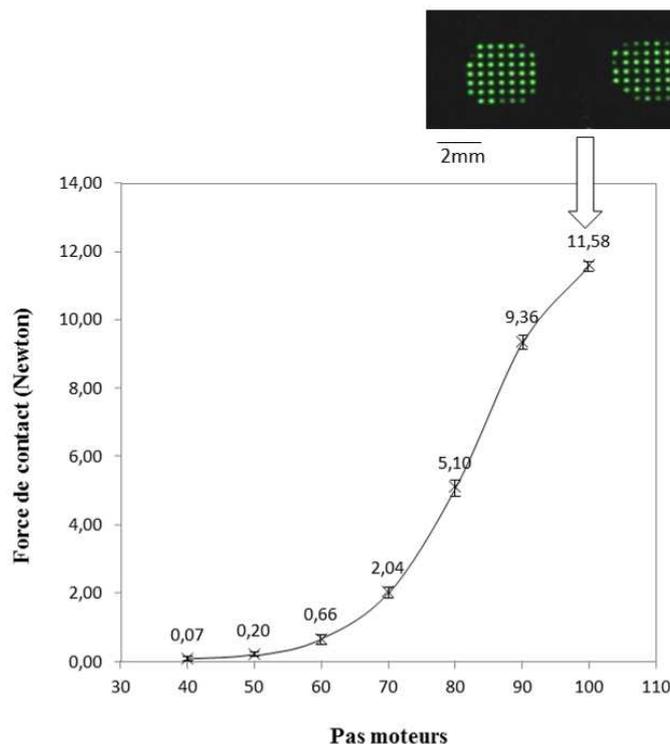


Figure 66 : Force d'aimantation en fonction des pas-moteurs de positionnement de l'aimant. Valeurs mesurées par un dynamomètre pour un macrotimbre constitué de 64 piliers en PDMS et d'une semelle en PDMS et poudre de fer. Dépôt d'oligonucléotides dilués à 20 μM dans du tampon phosphate 0,3 M, pH 9. Les conditions de dépôt sont : encrage 60 s dans une microplaque à puits ; séchage 100 UA pendant 60 s, dépôt 60 s sur dendrilames. Les paramètres du scanner de fluorescence (Innoscan 900) sont : PMT λ à 532 nm et PMT λ à 635 nm = 100%.

La Figure 66 indique que pour 100 PM, la force de contact entre le macrotimbre et la lame est d'environ 11,58 Newtons. L'image obtenue en fluorescence montre que pour cette force de contact aucune zone en dehors des motifs ne présente de fluorescence. Les motifs ne se sont donc pas effondrés pendant le contact.

En conclusion, le dépôt d'oligonucléotides sondes fluorescents avec l'Innostamp 40 est « optimal » pour une force de contact d'environ 11,58 Newtons entre le macrotimbre et la dendrilame. Cette force correspond à un positionnement des aimants de 100 pas-moteurs pour l'utilisation d'un macrotimbre constitué de 64 piliers en PDMS et d'une semelle en PDMS contenant de la poudre de fer. Cette condition permet la meilleure homogénéité de dépôt avec une dispersion des signaux de fluorescence minimale. De plus, la concentration préférentielle en oligonucléotides à utiliser est de 20 μM .

A.2.b. Etude de la contamination croisée

Chacun des piliers du macrotimbre étant encre dans un puits différent, il est nécessaire de vérifier l'absence totale de contamination croisée qui pourrait avoir lieu pendant l'étape de séchage du timbre. Après l'étape d'encre dans les puits de la plaque de titration, une « gouttelette » de solution d'encre reste présente à l'extrémité de chaque pilier en PDMS (Figure 67a). De façon à limiter la contamination croisée, l'Innostamp est équipé d'une grille de séchage (Figure 67b) qui doit permettre d'éliminer les « gouttelettes » résiduelles restantes sur les extrémités des piliers en PDMS.

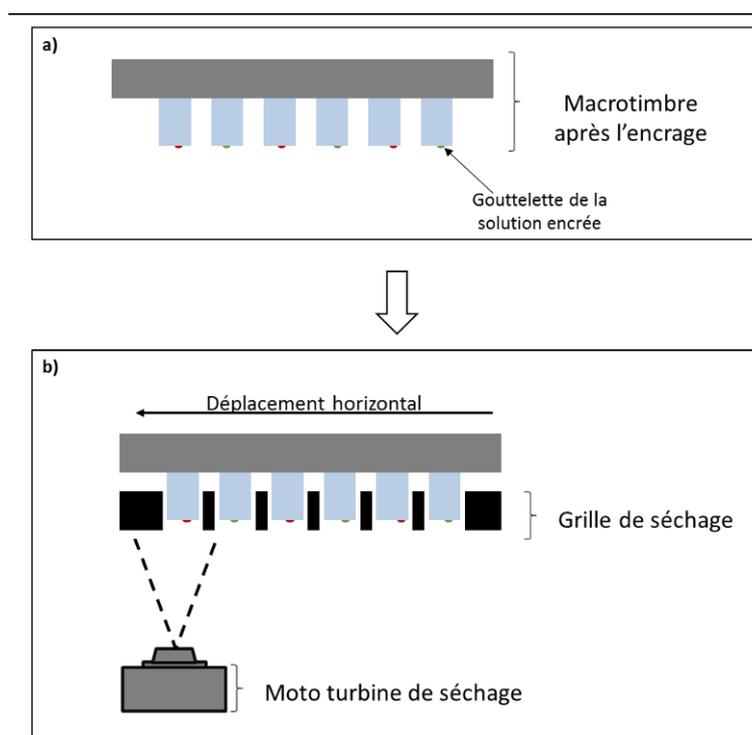


Figure 67 : Schéma représentant a) le macroaimbre après l'étape d'encre avec une gouttelette de la solution encrée à l'extrémité de chaque pilier en PDMS et b) le processus de séchage du macroaimbre avec une moto-turbine au travers d'une grille.

Pour vérifier l'absence de contamination croisée *via* l'utilisation de cette grille de séchage, les piliers du macroaimbre ont été encrés par des oligonucléotides marqués alternativement dans le vert (Cy3) et dans le rouge (Cy5). Puis, après l'étape de séchage au travers de la grille de l'Innostamp 40 dans un cas et sans la grille dans l'autre, les oligonucléotides séchés ont été déposés sur dendrilame (voir conditions dans la Figure 68).

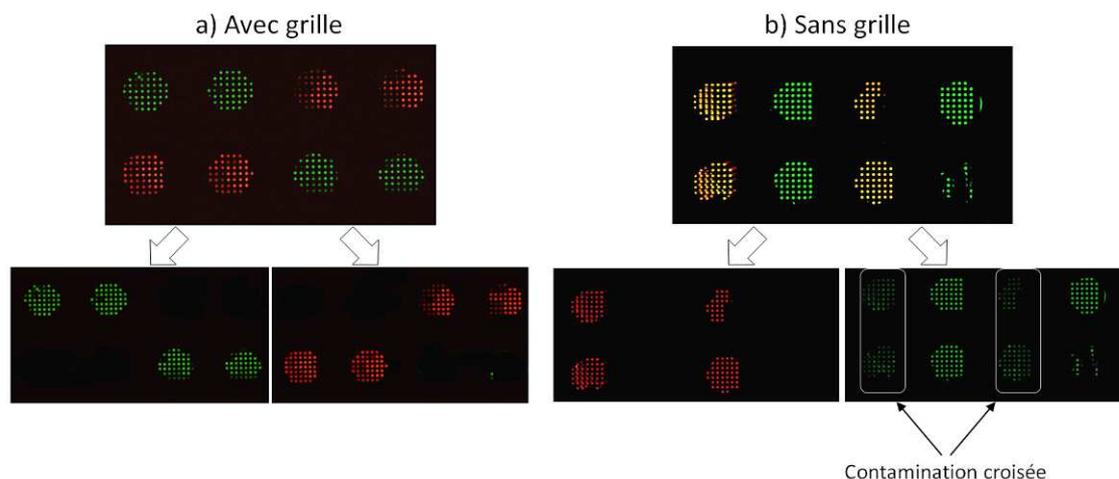


Figure 68 : Images de fluorescence de dépôts d'oligonucléotides marqués en fluorescence Cy3 en vert et Cy5 en rouge : a) images obtenues après dépôt avec un séchage du macrotimbre au travers de la grille, b) images obtenues après dépôt avec un séchage du macrotimbre sans grille. Les oligonucléotides (5'-[NH₂-ATA-CTC-CGG-GAA-ACT-GAC-ATC-TAG-[Cy5]ou[Cy3]-3') ont été utilisés à une concentration de 5 μM dans du tampon phosphate 0,3 M, pH 9. Les conditions de dépôt sont : encrage 60s dans une plaque de titration; séchage à 100 UA pendant 60s, dépôt 60s à 100 pas moteurs sur dendrilame. Les images ont été réalisées avec un scanner de fluorescence (Innoscan 900) selon les conditions suivantes: PMT λ à 532nm = 100% et PMT λ à 635nm = 100%, luminosité : 50, contraste : 10 et balance : 50.

Comme le montre la Figure 68, il n'y a pas de contamination croisée dans le cas de l'utilisation d'une grille de séchage. En revanche, sans la grille une contamination croisée est observée entre les piliers. Cette dernière matérialisée en jaune correspond à la présence de fluorescence verte sur les motifs d'oligonucléotides marqués Cy5 (rouge). La grille de séchage s'avère donc être nécessaire et suffisante pour éviter toute contamination croisée entre les 64 piliers d'un macrotimbre.

A.2.c. Lavage du macrotimbre

Dans un souci de réutilisation des macrotimbres, l'efficacité de différents protocoles de lavages a été testée. Pour cela, la fluorescence des oligonucléotides déposés sur dendrilame a été quantifiée avant et après les protocoles de lavage.

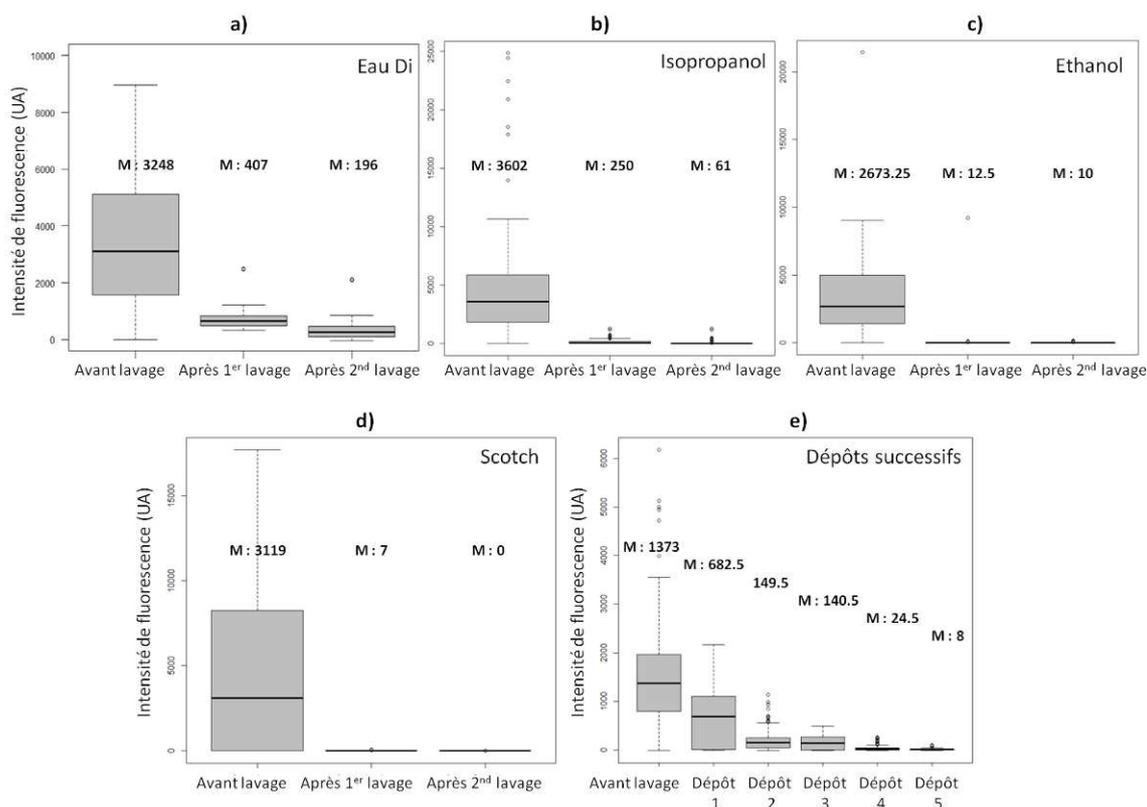


Figure 69 : Résultats obtenus après les différents protocoles de lavage du macrotimbre utilisé pour le dépôt d'oligonucléotides fluorescents (5'-[NH₂-ATA-CTC-CGG-GAA-ACT-GAC-ATC-TAG-[Cy5]-3']), utilisés à 5µM dans du tampon phosphate 0,3 M, pH 9); Lavage avec a) un bain d'eau DI, b) un bain d'isopropanol, c) un bain d'éthanol, d) l'application de Scotch®, e) par dépôts successifs sur une lame. M représente la médiane des valeurs de fluorescence de chaque « boxplot » avec 196 valeurs d'intensités médianes de fluorescence par « boxplot ». Les conditions de dépôt sont : encrage 60s dans une plaque de titration; séchage 100 UA pendant 60s, dépôt 60s à 100 pas moteurs sur dendrilame. Les paramètres du scanner de fluorescence (Innoscan 700) sont : PMT λ à 532nm et PMT λ à 635nm = 100%.

Les graphiques de la Figure 69 illustrent la dispersion des intensités de fluorescence obtenue après le dépôt des oligonucléotides fluorescents avant et après différents lavages du macrotimbre. Quel que soit le protocole de lavage, la médiane des valeurs de fluorescence de chaque « boxplot » indique que l'intensité de fluorescence est fortement diminuée après chaque lavage (proche de zéro). Les deux lavages les plus efficaces sont le nettoyage par application de Scotch® et le lavage par incubation dans un bain d'éthanol (5 minutes) avec une perte de plus de 99,5% de la fluorescence. D'un côté, le Scotch® « arrache » les oligonucléotides accrochés au timbre en PDMS car l'affinité Scotch®-oligonucléotides est plus forte que l'affinité oligonucléotides-PDMS alors que l'éthanol, connu pour précipiter l'ADN, « décroche » les oligonucléotides du PDMS probablement en les précipitant. Le nettoyage par application d'un Scotch® est plus rapide néanmoins, il n'est efficace que pour l'extrémité des motifs (Figure 70). Ce nettoyage peut donc être source de contamination pour les dépôts futurs si les molécules accrochées sur les côtés des motifs se détachent et contaminent la solution d'encrage suivante.

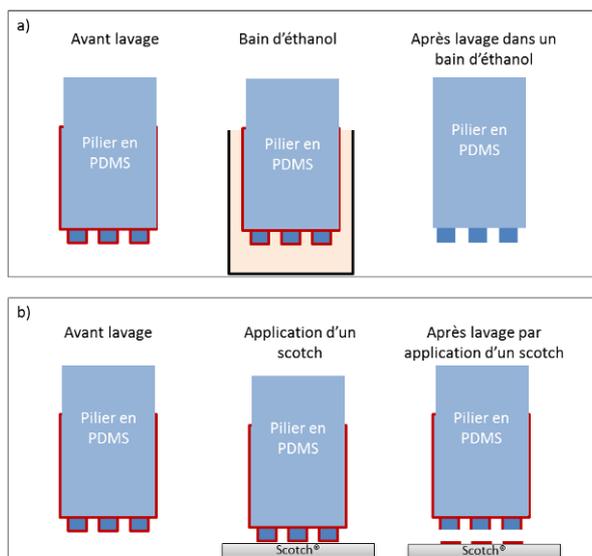


Figure 70 : Schéma illustrant les différences de lavage pour a) un lavage par incubation dans un bain d'éthanol ; b) un lavage par application d'un scotch® sur les motifs en PDMS.

La Figure 71 illustre deux dépôts d'oligonucléotides marqués en fluorescence avec un macrotimbre. Chacun des piliers a d'abord été encré avec les molécules marquées en Cy3 ou en Cy5. Par la suite, l'encre est déposée (dépôt n°1) sur la dendrilame. Après ce dépôt, les piliers sont nettoyés par application d'un Scotch®. Par la suite, les piliers sont de nouveau encrés par un oligonucléotide marqué différemment du précédent.

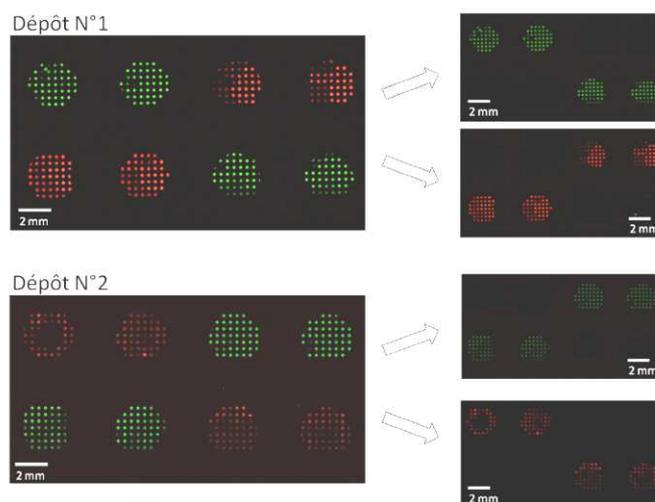


Figure 71 : Images de fluorescence de deux dépôts d'oligonucléotides marqués en fluorescence Cy3 (fluorescence verte) et Cy5 (fluorescence rouge). Les deux dépôts ont été réalisés avec 8 piliers d'un même macrotimbre. Entre ces dépôts, le macrotimbre a été nettoyé par l'application d'un Scotch®. Les oligonucléotides fluorescents (5'-[NH₂-ATA-CTC-CGG-GAA-ACT-GAC-ATC-TAG-[Cy5]ou[Cy3]-3') ont été utilisés à 5µM dans du tampon phosphate 0,3 M, pH 9. Les conditions de dépôt sont : encrage 60s dans une plaque de titration; séchage à 100 UA pendant 60s, dépôt 60s à 100 pas moteurs sur dendrilames. Les images ont été obtenues avec un scanner de fluorescence (Innoscan 900) selon les conditions suivantes: PMT λ à 532nm = 100% et PMT λ à 635nm = 100%, luminosité : 50, contraste : 10 et balance : 50.

La Figure 71 montre qu'il n'y a pas de contamination d'un dépôt à l'autre lorsque le macrotimbre est nettoyé par l'application d'un Scotch®. Nous avons donc utilisé le Scotch® comme méthode de lavage pour la suite des travaux. Ce résultat signifie soit qu'il n'y a pas ou peu d'oligonucléotides encrés sur les parois verticales du pilier et en tout cas en trop faible quantité pour contaminer la solution suivante.

A.2.d. Durée de vie du macrotimbre

Dans cette section, le nombre d'utilisations possibles du macrotimbre a été évalué par le changement d'intensité de fluorescence issu de 20 dépôts successifs d'oligonucléotides marqués. Entre chaque dépôt, le timbre a été nettoyé soit par incubation dans un bain d'éthanol soit par application d'un Scotch® avant d'être de nouveau encré de molécules marquées (Figure 73).

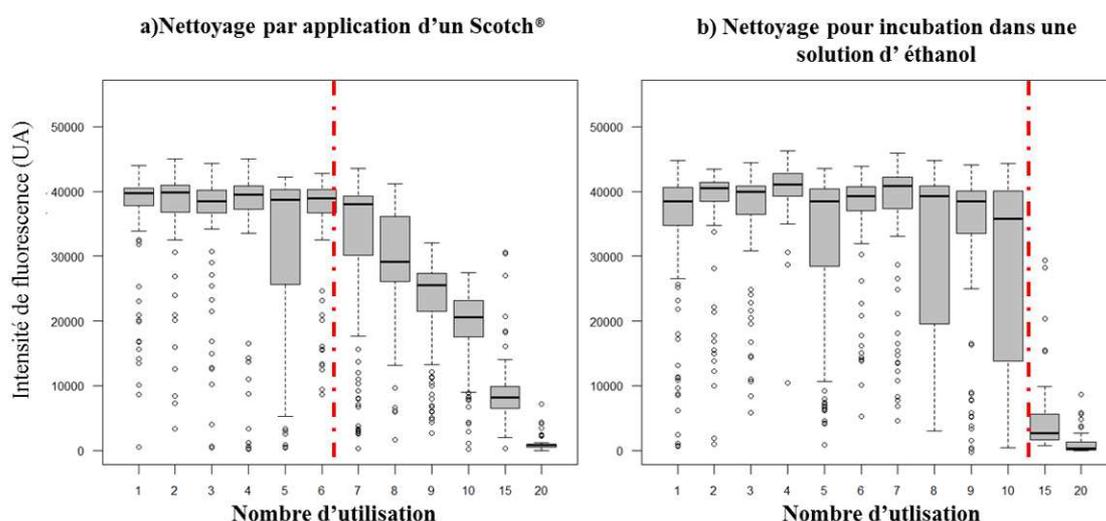


Figure 72 : Nombre d'utilisations possibles du macrotimbre pour le dépôt d'oligonucléotides marqués en fluorescence Cy3 après lavage a) après application d'un Scotch®, b) après incubation dans un bain d'éthanol pour le nettoyer. L'oligonucléotide (5'-[NH₂-ATA-CTC-CGG-GAA-ACT-GAC-ATC-TAG-[Cy3]-3') a été utilisé à 5µM dans du tampon phosphate 0,3 M, pH 9). Les conditions de dépôt sont : encrage 60s dans une plaque de titration; séchage 100 UA pendant 60s, dépôt 60s à 100 pas moteurs sur dendrilames. (200 spots pas dépôt). Les intensités de fluorescence après dépôt ont été mesurées avec un scanner de fluorescence (Innoscan 900) selon les conditions suivantes: PMT λ à 532nm = 100% et PMT λ à 635nm = 100%.

La médiane des intensités de fluorescence (illustrée par un trait noir dans chaque « boxplot ») en fonction du nombre d'utilisations d'un macrotimbre neuf nettoyé entre chaque dépôt chute significativement après le 7^{ème} dépôt lorsque le timbre est nettoyé au moyen d'un Scotch®. En revanche, cette médiane des intensités ne diminue qu'à partir du 15^{ème} dépôt pour le lavage par incubation dans un bain d'éthanol. Cette forte diminution des intensités de fluorescence signifie que le macrotimbre est de moins en moins efficace jusqu'à devenir inefficace pour le dépôt d'oligonucléotides. Les protocoles de lavages semblent donc avoir détérioré la qualité des macrotimbres.

En 2007, Thibault *et al.*²⁰⁸ ont démontré que lorsque le PDMS était nettoyé en utilisant un soxhlet, il perdait ses propriétés d'encrage et de dépôt de molécules nécessaires au μ CP. Ils ont également suggéré que l'adhésion des molécules sur le PDMS était accomplie par de petites chaînes de PDMS non réticulées. Nous pouvons donc interpréter la détérioration des propriétés d'encrage et de dépôt du PDMS après chaque lavage comme provenant de l'élimination à la surface et à proximité de la surface du timbre des petites chaînes de PDMS. Lorsque ces dernières ne sont plus en nombre suffisant alors le timbre perd son efficacité. Selon cette hypothèse, le nettoyage par application d'un Scotch® éliminerait plus rapidement ces petites chaînes de PDMS non réticulées que le protocole de lavage par un bain d'éthanol, réduisant ainsi son nombre d'utilisation.

A.2.e. Reproductibilité du dépôt pour un même macrotimbre

En vue d'un processus de fabrication de puces par automatisation du μ CP, il est important de vérifier que le dépôt des sondes est reproductible et homogène. Pour cela, un macrotimbre a été encré avec une gamme de concentration croissante d'oligonucléotides fluorescents et utilisé 8 fois de suite et nettoyé par application d'un scotch® entre chaque dépôt.

²⁰⁸ C. Thibault , C. Severac, A-F Mingotaud, C.Vieu et M. Mauzac, Langmuir 2007, 23, 10706-10714.

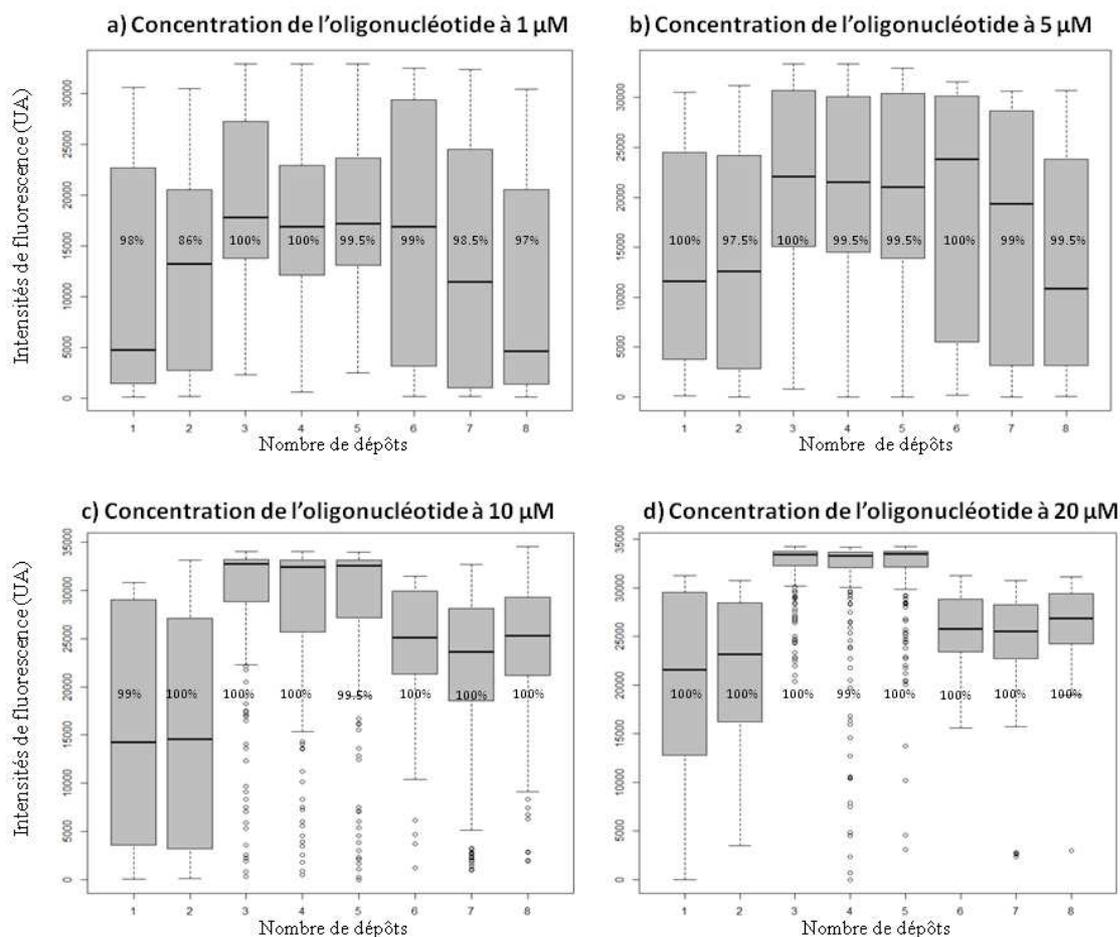


Figure 73 : Intensités médianes de fluorescence pour le dépôt d'oligonucléotides marqués en fluorescence Cy3 en fonction du nombre de dépôts effectués par un seul macrotimbre. L'oligonucléotide fluorescent (5'-[NH₂-ATA-CTC-CGG-GAA-ACT-GAC-ATC-TAG-[Cy3]-3') a été utilisé à 1μM, 5μM, 10μM et 20μM dans du tampon phosphate 0,3 M, pH 9. Les conditions de dépôt sont : encrage 60s dans une microplaque à puits, séchage 100 UA pendant 60s, dépôt 60s à 100 pas moteurs sur dendrilames (50 spots par dépôt). Le chiffre en pourcentage représente les spots détectés en fluorescence. Les paramètres du scanner de fluorescence (Innoscan 900) sont : PMT λ à 532nm = 100% et PMT λ à 635nm = 100%.

Les médianes des intensités de fluorescence collectées (matérialisées par un trait noir au sein de chaque « boxplot ») de chaque dépôt sont très variables entre les dépôts indépendamment de la concentration en oligonucléotides utilisée. Les dépôts d'oligonucléotides sur dendrilames avec un même macrotimbre sont peu répétables. De plus, la taille des « boxplots » met en évidence une très grande dispersion des valeurs de fluorescence au sein d'un seul dépôt. Celle-ci est, de plus, exaltée pour les faibles concentrations (1 et 5 μM). Ces résultats indiquent que la quantité d'oligonucléotides déposés n'est pas homogène entre les spots d'un dépôt.

A.2.f. Reproductibilité entre les macrotimbres

Afin d'étudier la reproductibilité du dépôt entre les timbres, 8 macrotimbres issus de deux lots de production ont été utilisés pour le dépôt d'oligonucléotides marqués en fluorescence sur dendrilames (Figure 74).

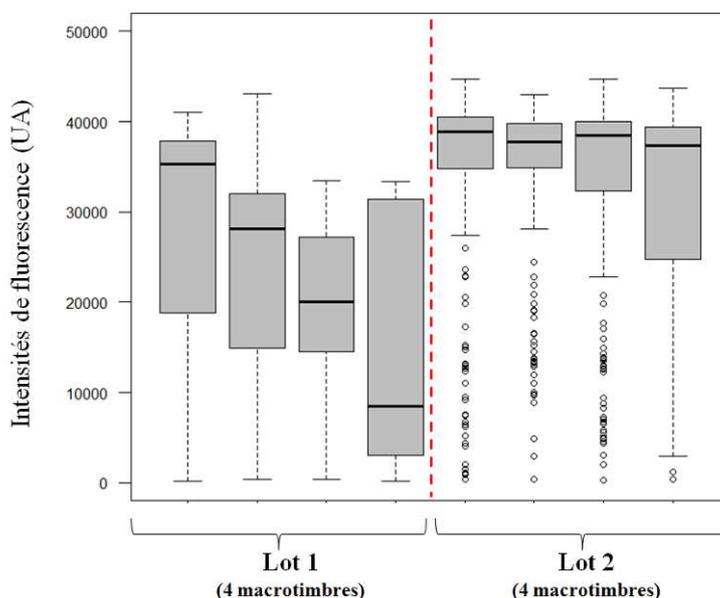


Figure 74 : Intensités médianes de fluorescence pour le dépôt d'oligonucléotides marqués en fluorescence Cy3 avec deux séries de 4 macrotimbres. L'oligonucléotide fluorescent (5'-[NH₂-ATA-CTC-CGG-GAA-ACT-GAC-ATC-TAG-[Cy3]-3') a été utilisé à 5 μM dans du tampon phosphate 0,3 M, pH 9. Les conditions de dépôt sont : encrage 60s dans une microplaque à puits; séchage 100 UA pendant 60s, dépôt 60s à 100 pas moteurs sur dendrilames (50 spots par dépôt). Les paramètres du scanner de fluorescence (Innoscan 900) sont : PMT λ à 532nm = 100% et PMT λ à 635nm = 100%.

Grâce à la représentation en « boxplot » de la dispersion des intensités médianes de fluorescence, nous constatons que les quatre dépôts réalisés indépendamment avec quatre macrotimbres du lot 1 montrent une grande dispersion et donc une faible homogénéité au sein de chaque dépôt. De plus, la médiane des valeurs de fluorescence est très différente d'un dépôt à l'autre, indiquant une faible reproductibilité entre les macrotimbres. En revanche, pour les quatre dépôts réalisés avec quatre macrotimbres du lot 2, la dispersion des intensités est plus faible au sein de chaque dépôt et la médiane entre chacun des dépôts est approximativement équivalente. Ce lot de production semble donc plus homogène et de bonne qualité. En conséquence, nos résultats suggèrent que le procédé actuel de fabrication ne permet pas d'assurer la qualité de production des macrotimbres pour le μCP d'oligonucléotides sur dendrilames.

A.2.g. Bilan des conditions idéales pour le dépôt d'oligonucléotides

Le Tableau 7 liste les paramètres retenus qui permettent d'effectuer des dépôts d'oligonucléotides avec l'Innostamp 40 sur dendrilames conduisant à une dispersion minimale des signaux de fluorescence.

Tableau 7 : Paramètres optimaux de dépôt d'oligonucléotides avec l'Innostamp 40 pour une dispersion minimale des signaux de fluorescence.

	Paramètres retenus
Encrage :	60 s dans une microplaque à puits.
Vitesse de relevage du macrotimbre :	5000 $\mu\text{m/s}$.
Séchage avec moto-turbine :	100 UA pendant 30 s au travers d'une grille.
Lavage des macrotimbres :	Application d'un scotch® ou incubation de 5 min dans un bain d'éthanol.
Position des aimants :	100 pas moteurs soit environ 11,5 Newtons de force entre le timbre et le support.
Concentration en oligonucléotides :	Préférence pour des concentrations en oligonucléotides de 20 μM aux dépens de 1, 5 et 10 μM .

Néanmoins, les résultats obtenus pour les conditions de dépôt sélectionnées ne sont pas satisfaisants. En effet, la dispersion des signaux de fluorescence obtenue au sein des dépôts et entre les dépôts traduit une grande hétérogénéité (> à 30%) dans l'adressage des oligonucléotides sur dendrilames. Cette inhomogénéité paraît en l'état peu compatible avec l'utilisation du macrotimbre pour la fabrication des biopuces. L'analyse des résultats précédents soulève deux questions :

- 1) Le procédé d'encrage du macrotimbre dans une microplaque à puits est-il adapté pour l'obtention d'un encrage homogène des biomolécules sur le timbre ?
- 2) Le contact entre le timbre et la dendrilame sous l'action d'un champ magnétique est-il homogène et suffisant lors de l'étape de dépôt ?

A.3. Améliorations du procédé de dépôt par macrotimbre

A.3.a. *L'encrage dynamique du PDMS*

Le procédé d'encrage du macrotimbre dans une microplaque à puits n'est pas optimal pour l'obtention d'un encrage homogène des piliers du timbre. Lors de l'entrée et de la sortie de chaque pilier du macrotimbre dans chaque puits de la microplaque, la ligne triple de la solution d'encrage va balayer les motifs des piliers en PDMS comme décrit dans la Figure 75. La ligne triple représente l'ensemble des points de contact où se rejoignent les trois phases solide-liquide-gaz c'est-à-dire l'interface entre l'air, le PDMS et la solution d'encrage.

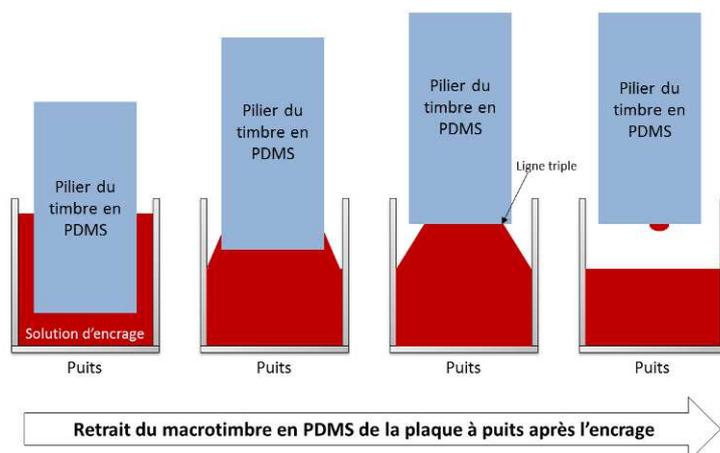


Figure 75 Schéma représentant le déplacement du ménisque lors du retrait du macrotimbre de la microplaque à puits.

Considérons que l'encrage est la cause de l'hétérogénéité des dépôts. Dans ce cas, nous pouvons émettre l'hypothèse suivante :

Le déplacement de la ligne triple lors du retrait du macrotimbre de la plaque à puits est responsable de l'hétérogénéité de l'encrage des biomolécules sur le timbre.

La vitesse de déplacement du ménisque dans le cas de l'Innostamp 40 est liée à la vitesse de retrait du macrotimbre de la microplaque à puits. Afin de vérifier cette hypothèse, comparons la qualité des dépôts d'oligonucléotides en fonction de la vitesse de déplacement du ménisque (Figure 76).

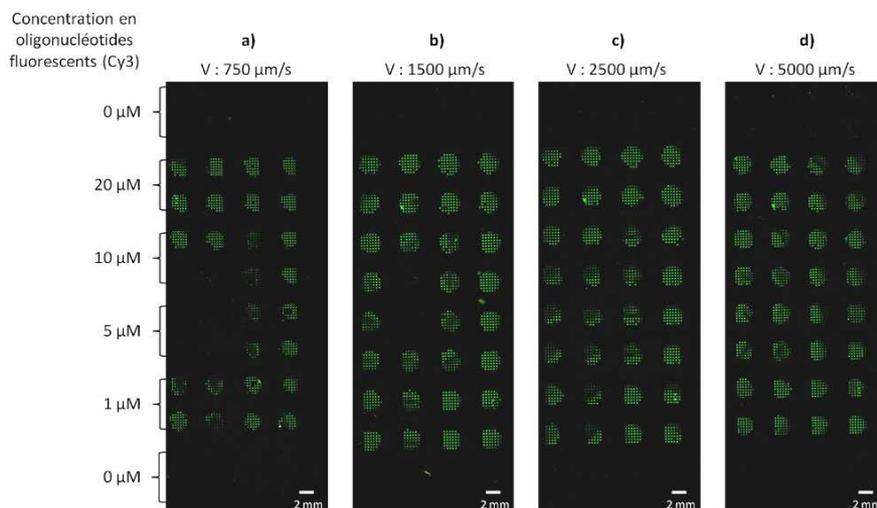


Figure 76 : Images de fluorescence de 4 dépôts d'une gamme d'oligonucléotides marqués en fluorescence en fonction de la vitesse de retrait du macrotimbre de la microplaque à puits. V représente la vitesse en $\mu\text{m/s}$. L'oligonucléotide marqué ($5' \text{-}[\text{NH}_2\text{-ATA-CTC-CGG-GAA-ACT-GAC-ATC-TAG-[Cy3]\text{-}3']$) a été utilisé dans du tampon phosphate 0,3 M, pH 9 à 0, 1, 5, 10 et 20 μM . Les conditions de dépôt sont : encrage 60s; séchage 100 UA pendant 60s, dépôt 60s à 100 pas moteurs sur dendrilame. Les paramètres du scanner de fluorescence (Innoscan 900) sont : PMT λ à 532nm = 50% et PMT λ à 635nm = 100%, luminosité : 50, contraste : 10 et balance : 50.

Les images de fluorescence de 4 dépôts d'oligonucléotides marqués en fluorescence en fonction de la vitesse de retrait du macrotimbre de la microplaque à puits montrent des variations dans la qualité du dépôt (pour les 32 piliers d'un macrotimbre). Lorsque la vitesse de retrait du macrotimbre est la plus faible (750 $\mu\text{m/s}$), certains motifs sont absents en fluorescence. *A contrario*, lorsque la vitesse est au maximum (5000 $\mu\text{m/s}$), les 32 motifs du macrotimbre ont été transférés sur la dendrilame. Ces résultats laissent à penser que la qualité d'encrage du PDMS serait liée à la vitesse de déplacement de la ligne triple.

Dans le but de confirmer ces résultats, nous avons comparé l'homogénéité de dépôts d'oligonucléotides marqués en fluorescence à une concentration de 1 μM dans le cas où l'encrage est réalisé avec ou sans contrôle du déplacement de la ligne triple. Pour cela, un timbre en PDMS structuré de plots de 160 μm de diamètre au pas de 300 μm a été encré soit par dépôt d'une goutte de solution, soit par « balayage » avec contrôle du déplacement de la ligne triple. La goutte est immobilisée sur le timbre entre deux lamelles hydrophobes avec un angle de contact de 49°. Puis, le timbre est déplacé selon un axe horizontal et une vitesse contrôlée (2,5 mm/s). Ceci permet de contrôler le déplacement de la ligne triple de la solution d'encrage sur le timbre. La Figure 77 illustre les deux procédés d'encrage du timbre en PDMS.

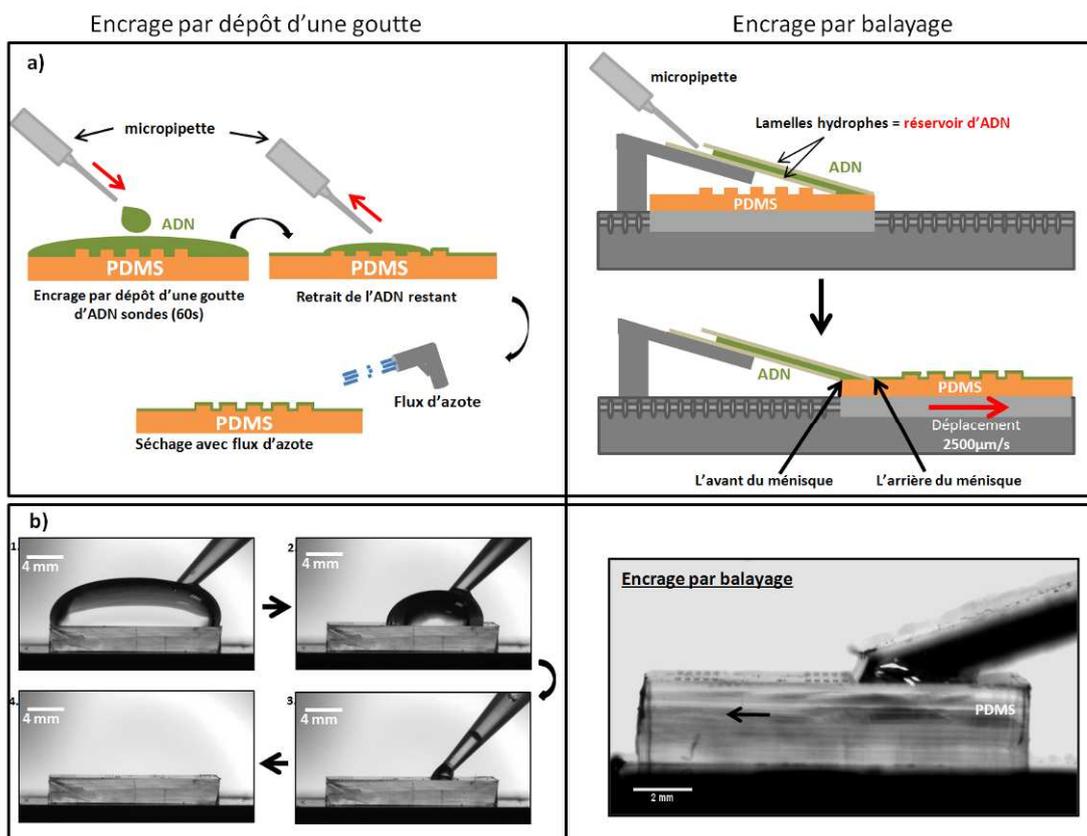


Figure 77 : a) Schéma descriptif de l'encrage par dépôt d'une goutte de solution (à gauche) ou par balayage (à droite) ; b) photographies représentant le retrait de la solution lors de l'encrage par dépôt d'une goutte ou par balayage en contrôlant le déplacement de la ligne triple sur les motifs du timbre en PDMS.

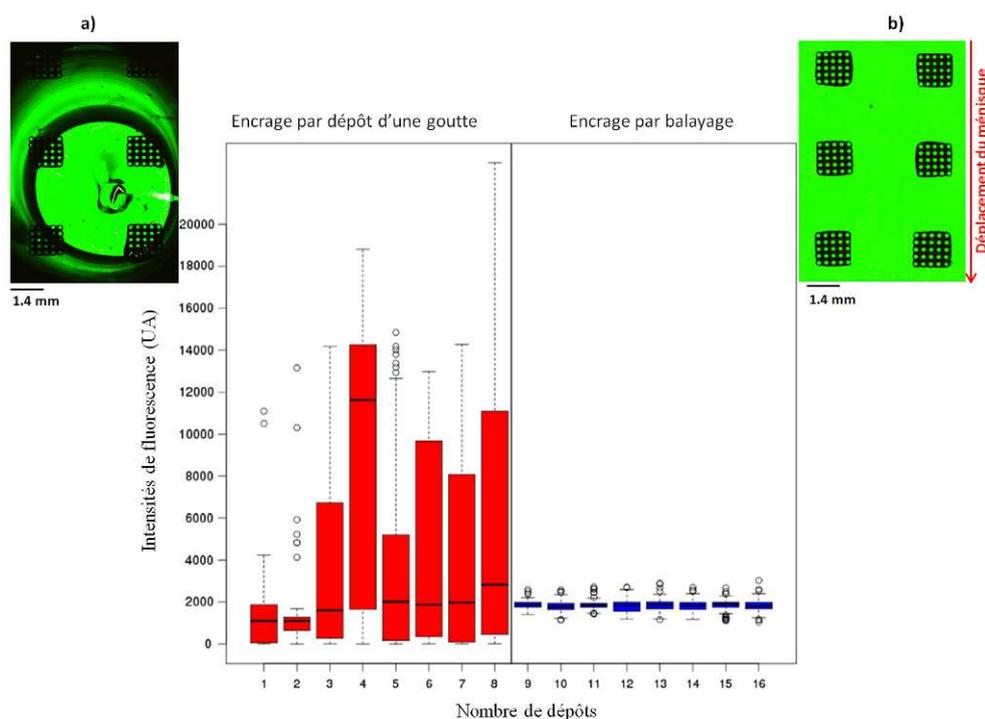


Figure 78 : Intensités médianes de fluorescence obtenues après dépôt d'oligonucléotides fluorescents. Les « boxplots » en rouge représentent les résultats de 8 dépôts dont l'encrage a été réalisé par dépôt d'une goutte de solution sur les motifs du macrotimbre (absence de contrôle dans le déplacement du ménisque). Les « boxplots » en bleu représentent les résultats de 8 dépôts dont l'encrage a été réalisé par balayage d'une goutte de solution entre deux lamelles hydrophobes sur les motifs du macrotimbre (avec contrôle du déplacement du ménisque) ; a) et b) images issues du scanner de fluorescence d'un dépôt d'oligonucléotides sur dendrilames. L'oligonucléotide marqué (5'-[NH₂-ATA-CTC-CGG-GAA-ACT-GAC-ATC-TAG-[Cy3]-3') a été utilisé dans du tampon phosphate 0,3 M, pH 9 à 1μM. Les conditions de dépôt sont : 60s sur dendrilames. Les paramètres du scanner de fluorescence (Innoscan 900) sont : PMT λ à 532nm = 100% et PMT λ à 635nm = 100%, luminosité : 50, contraste : 10 et balance : 50.

La dispersion des intensités de fluorescence est significativement supérieure dans le cas où le déplacement de la ligne triple est effectué par pipetage par comparaison avec l'encrage par balayage. Cette différence d'homogénéité de l'encrage est également illustrée par les images de fluorescence a) et b). Le déplacement de la ligne triple lors de l'étape d'encrage joue donc un rôle sur la qualité de l'encrage des biomolécules. Ces travaux ont donné lieu à une publication scientifique dans le journal *Microelectronic Engineering*.²⁰⁹ L'optimisation de l'encrage des piliers du macrotimbre ouvre la perspective d'une plus grande homogénéité des dépôts de sondes pour la fabrication des biopuces.

²⁰⁹ J. Fredonnet, J. Foncy, S. Lamarre, J-C Cau, E. Trévisiol, J-P Peyrade, J.M. François, C. Séverac, *Microelectronic Engineering*, 2013, 111, 379-383.

A.3.b. La maîtrise du contact: un point clé!

Identifié comme potentiellement responsable de l'hétérogénéité de dépôt d'oligonucléotides sur dendrilames, le contact entre le timbre et la lame de verre sur le robot Innostamp 40 est contrôlé par l'application d'un champ magnétique. Dans ces conditions, le contact entre le macrotimbre et la lame pendant le dépôt est-il homogène ?

Les premiers travaux sur l'Innostamp 40 réalisés par J-C. Cau *et al.*,²¹⁰ ont permis de quantifier la force magnétique exercée pendant le contact en fonction de la distance entre la partie magnétique du timbre et les aimants (Figure 79).

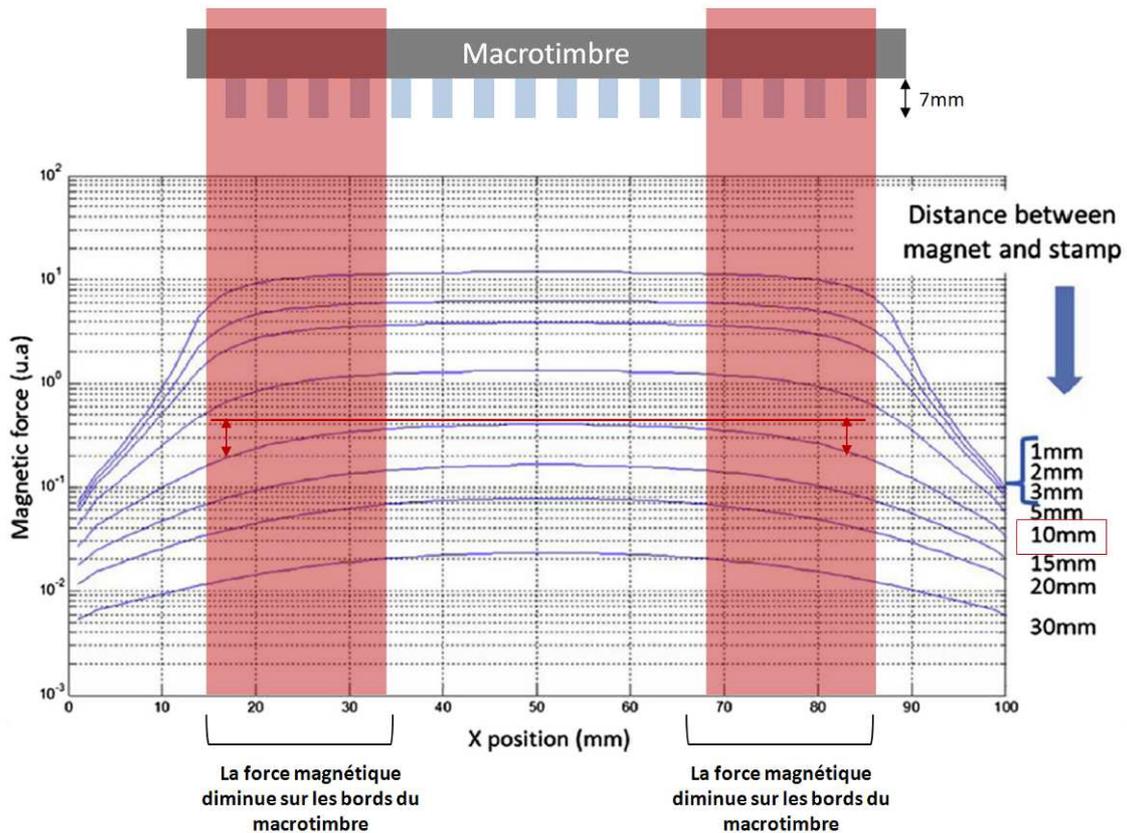


Figure 79 : Mesure de la force magnétique en fonction de la distance entre la partie magnétique du timbre et les aimants. Les zones en rouge représentent les zones où la force de contact est plus faible (Image adaptée des travaux de Cau *et al.*, 2013).

Les macrotimbres utilisés dans nos travaux sont constitués d'une semelle en PDMS remplie de poudre de fer et de 64 piliers en PDMS. La hauteur des piliers est de 7 mm, l'épaisseur d'une lame de verre de 1 mm et le support de lame de 2 mm. Nous considérons que la force magnétique en fonction de la position suit la courbe de réponse pour une distance de 10 mm. Cette courbe montre que la force n'est pas homogène en fonction de la position sur les aimants. Celle-ci diminue jusqu'à un facteur 2 sur les bords des aimants (à gauche et à droite). Dans notre cas, le macrotimbre ayant toujours une position centrale sur les aimants,

²¹⁰ J-C Cau, L. Lafforgue, M. Nogues, A. Lagrault, V. Paveau, *Microelectronic Engineering*, 2013, 110, 207-214.

les extrémités de celui-ci (matérialisées en rouge) subissent une force de contact moins importante que le reste du macrotimbre. Pour réduire cet effet, la Figure 79 nous montre que les conditions de contact les plus homogènes sont atteintes lorsque la distance entre la partie en poudre de fer et les aimants est de 1 à 3 mm. Afin d'améliorer l'homogénéité de la force exercée sur le timbre, plusieurs modifications seraient à envisager :

- 1) Utiliser des aimants plus grands pour que le macrotimbre ne soit pas impacté par l'effet de bords des aimants ;
- 2) Réduire la hauteur des piliers pour diminuer la distance entre la partie magnétique et les aimants et ainsi tendre vers des résultats optimaux illustrés par la courbe N°1 ;
- 3) Ajouter de la poudre de fer dans les piliers pour diminuer la distance entre la semelle magnétique et les aimants. En effet, si la poudre de fer est présente dans tout le macrotimbre sauf à l'extrémité des piliers sur 1 ou 2 mm alors la distance poudre de fer-aimant se rapproche des conditions idéales.

Par précaution, les travaux présentés auparavant ont toujours été réalisés sur les 8 rangées centrales du macrotimbre. Les variations des signaux de fluorescence identifiées dans les résultats antérieurs ne peuvent donc pas être la conséquence d'un mauvais contact entre le macrotimbre et la dendrilame. La Figure 80 est une image issue du scanner de fluorescence d'un dépôt d'oligonucléotides marqués avec les 8 rangées de 4 piliers centraux du macrotimbre par l'Innostamp 40. Chaque pilier permet de déposer une matrice de spots de 160 μ m au pas de 300 μ m. Cette image montre clairement l'hétérogénéité de la fluorescence entre les matrices de spots mais également entre les spots d'une même matrice alors que dans cette zone du macrotimbre la force de contact est homogène.

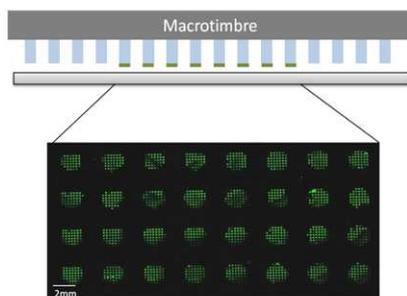


Figure 80 : Image de fluorescence d'un dépôt d'oligonucléotides marqués en fluorescence avec les 8 rangées de 4 piliers centraux du macrotimbre par l'Innostamp 40. L'oligonucléotide marqué (5'-[NH₂-ATA-CTC-CGG-GAA-ACT-GAC-ATC-TAG-[Cy3]-3') a été utilisé à 5 μ M dans du tampon phosphate 0,3 M, pH 9. Les conditions de dépôt sont : encrage 60s; séchage 100 UA pendant 60s, dépôt 60s à 100 pas moteurs sur dendrilames. Les paramètres du scanner de fluorescence (Innoscan 900) sont : PMT λ à 532nm = 50% et PMT λ à 635nm = 100%, luminosité : 50, contraste : 10 et balance : 50.

En conclusion, l'Innostamp 40 permet le dépôt multiplexé d'oligonucléotides par μ CP sur dendrilames. Le principe de dépôt par μ CP sous l'effet d'un champ magnétique est validé. Néanmoins, ces travaux ont mis en évidence des variations dans la répétabilité et la reproductibilité des dépôts. A ce titre, il semblerait que la qualité des macrotimbres et l'efficacité du procédé d'encrage soient les principales causes de ces variations. Le déplacement contrôlé de la ligne triple pendant l'étape d'encrage est la clé d'un dépôt homogène. Ces travaux ont également montré que le macrotimbre peut être nettoyé afin d'être réutilisé. Ce procédé de dépôt par l'Innostamp 40 nécessiterait des optimisations visant notamment à contrôler le déplacement de la ligne triple pendant l'étape d'encrage des macrotimbres.

B. Comparaison de l'Innostamp 40 au robot à aiguilles pour la production de biopuces à ADN

Dans cette partie, l'Innostamp 40 dans sa version prototype a été comparé au robot à aiguilles Qarray (société Genetix) pour la conception de biopuces à ADN. La Figure 81 représente les résultats de l'hybridation pour le dépôt des sondes sur dendrilames avec ces deux robots.

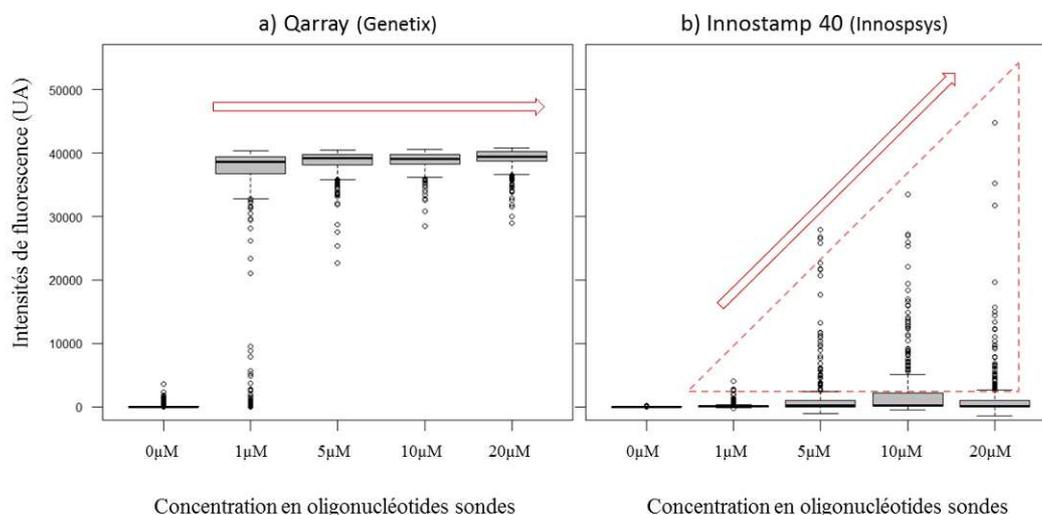


Figure 81 : Dispersion des intensités de fluorescence après hybridation de cibles marquées en fluorescence en fonction de la concentration en sondes déposées. a) dépôt des sondes avec un robot à aiguilles creuses (Qarray_Genetix) sur 7 dendrilames (350 spots par conditions) b) dépôt des sondes par μ CP avec l'Innostamp 40 sur 2 dendrilames (100 spots par conditions). L'oligonucléotide sonde (5'-[NH₂]-AAT-ATG-TTT-CCG-GTC-GTC-TC-3') a été utilisé à 0, 1, 5, 10 et 20 μ M dans du tampon phosphate 0,3 M, pH 9. L'oligonucléotide cible (5'-[Cy5]-GAG-ACG-ACC-GGA-AAC-ATA-TT-3') a été hybridé à 100nM dans un tampon SSC 5X, 0,1% SDS, pendant 30min à 37°C. Les conditions de dépôt des sondes sont : encrage 60s dans une plaque de titration; séchage 100 UA pendant 60s, dépôt 60s à 100 pas moteurs sur dendrilames. Les

paramètres du scanner de fluorescence (Innoscan 900) sont : PMT λ à 532nm = 60% et PMT λ à 635nm = 100%.

Lorsque les sondes sont déposées par le robot à aiguilles, les signaux de fluorescence (autour de 40 000 UA) sont très largement supérieurs au contrôle négatif (0 μ M de sondes) et ce quel que soit la concentration en sondes (Figure 81a). En revanche, lorsque les sondes sont déposées par l'Innostamp 40, la valeur médiane de l'intensité de fluorescence après l'hybridation est très faible et ce quel que soit la concentration. Toutefois, pour les concentrations supérieures à 1 μ M, la présence « d'outliers » (caractérisés par les points en dehors du boxplot) sont représentatifs d'une hybridation. Dans ces conditions, lorsque les sondes sont déposées par μ CP via l'Innostamp 40, l'hybridation n'a pas lieu. Les travaux de la partie A de ce chapitre ont montré que les conditions de dépôt utilisées sont parfaitement adaptées à l'adressage d'oligonucléotides sondes sur dendrilames. Il semblerait que l'hybridation n'ait pas lieu car les sondes ne sont pas en large excès par rapport à la quantité de cibles et/ou les sondes en très faibles quantités. Ainsi la faible quantité de cibles hybridées se traduit par un faible signal de l'hybridation.

L'efficacité de dépôt par l'Innostamp 40 et par le robot à aiguilles ont été comparées en utilisant des oligonucléotides marqués en fluorescence (Figure ci-dessous).

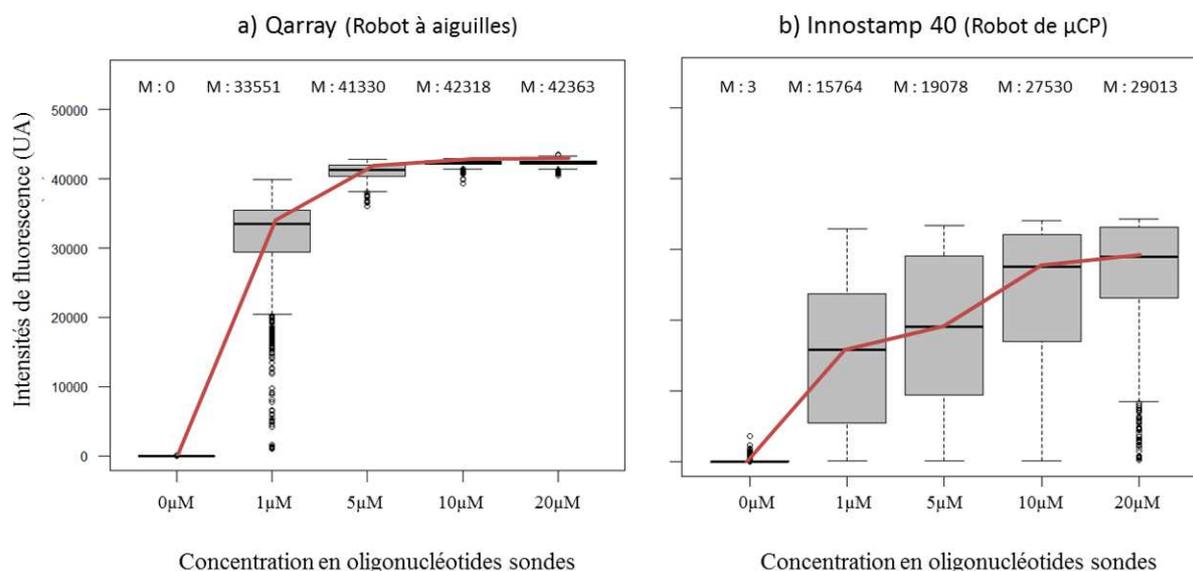


Figure 82 : Intensités de fluorescence après dépôt d'oligonucléotides sondes marqués en fluorescence a) dépôt des sondes avec un robot à aiguilles creuses (Qarray_Genetix) et 8 aiguilles sur 7 dendrilames (1456 spots par conditions), b) dépôt des sondes par μ CP avec l'Innostamp 40 avec 7 macrotimbres sur 7 dendrilames (1400 spots par conditions). M représente la médiane des valeurs de fluorescence pour chaque boxplot. L'oligonucléotide fluorescent (5'-[NH₂-ATA-CTC-CGG-GAA-ACT-GAC-ATC-TAG-[Cy3]-3') a été utilisé à 0, 1, 5, 10 et 20 μ M dans du tampon phosphate 0,3 M, pH 9. Les conditions de dépôt sont : encrage 60s dans une plaque de titration; séchage 100 UA pendant 60s, dépôt 60s à 100 pas moteurs sur dendrilames. Les paramètres du scanner de fluorescence (Innoscan 900) sont : PMT λ à 532nm = 100% et PMT λ à 635nm = 100%.

L'intensité de fluorescence augmente avec la concentration en sondes pour atteindre un palier entre 5 et 10 μM de sondes lorsque les dépôts ont été réalisés avec le robot à aiguilles (Figure 82a). Pour les dépôts avec l'Innostamp 40, l'intensité de fluorescence augmente également avec la concentration en sondes. Néanmoins, elle ne semble pas atteindre de palier pour les concentrations utilisées. De plus, quel que soit la concentration en sondes adressées, l'intensité de fluorescence collectée est plus faible dans le cas où elles sont déposées par l'Innostamp 40. Cette différence d'intensité de fluorescence signifie que la quantité d'oligonucléotides sondes adressées par l'Innostamp 40 est plus faible que celle déposée par le robot à aiguilles. Ce dernier permet de déposer une goutte de solution de quelques picolitres alors que dans le cas du μCP , la quantité de sondes déposées sur la surface est dépendante de l'affinité sondes-PDMS (pendant l'encrage), puis sondes-dendrimères (pendant le dépôt). Dans ces conditions, la quantité de sondes adressées sur la puce peut être inférieure à la concentration de la solution utilisée pour l'encrage du timbre. De plus, l'étape de réduction de la dendrilame (avant l'hybridation) élimine une partie des sondes non fixées de façon spécifique aux dendrimères. Il est probable que l'adressage par μCP (à sec) ne soit pas propice aux liaisons entre la fonction amine de la sonde et les fonctions aldéhydes des dendrimères. Pour confirmer ces résultats, il serait intéressant de comparer la quantité de sondes après l'étape de réduction en fonction de la technique d'adressage (Innostamp *versus* robot à aiguilles). Cette étude pourrait être réalisée en utilisant des oligonucléotides sondes radio-marqués.

Les affinités sondes-PDMS et sondes-dendrimères sont-elles efficaces pour la conception de biopuces à ADN par μCP ? Pour répondre à cette question, l'Innostamp 40 a été utilisé pour la conception de biopuces à ADN sur dendrilames et parallèlement sur une autre chimie de surface à savoir les lames époxy. Les résultats des hybridations obtenues en fonction de la chimie de surface de la biopuce et de l'absence ou non de l'étape de réduction sont présentés Figure 83. Notons que les lames époxy permettent également une fixation orientée des oligonucléotides par leur extrémité.

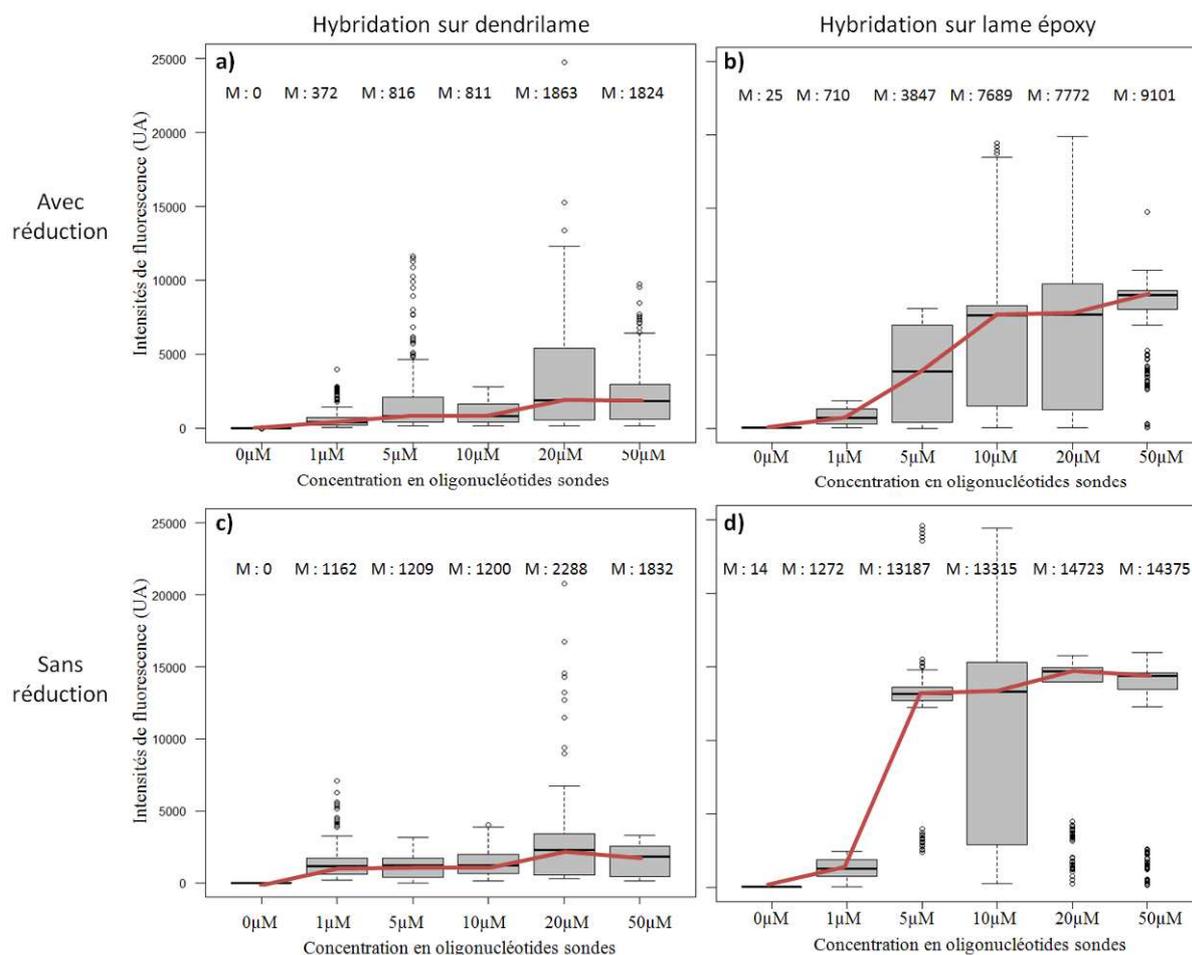


Figure 83 : Dispersion des intensités de fluorescence après hybridation de cibles marquées en fluorescence en fonction de la concentration en sondes déposées. Dépôt des sondes par μCP avec l'Innostamp 40 sur a) et c) dendrilames et sur b) et d) lames époxy (Schott Nexterion). Dans les conditions a) et b), les lames ont été réduites au borohydrure de sodium avant l'hybridation (NaBH_4 3,5mg/mL pendant 3h). M représente la médiane des valeurs de fluorescence pour chaque boxplot. L'oligonucléotide sonde ($5'-[\text{NH}_2]\text{-AAT-ATG-TTT-CCG-GTC-GTC-TC-3}'$) a été utilisé à 0, 1, 5, 10 et 20 μM dans du tampon phosphate 0,3 M, pH 9. L'oligonucléotide cible ($5'-[\text{Cy}5]\text{-GAG-ACG-ACC-GGA-AAC-ATA-TT-3}'$) a été hybridé à 100nM dans un tampon SSC 5X, 0,1% SDS, pendant 30min à 37°C. Les conditions de dépôt sont : encrage 60s dans une plaque de titration; séchage 100 UA pendant 60s, dépôt 60s à 100 pas moteurs. 200 spots par conditions. Les paramètres du scanner de fluorescence (Innoscan 900) sont : PMT λ à 532nm = 60% et PMT λ à 635nm = 100%.

Comme l'indiquent les Figure 83 a) et b), les signaux de l'hybridation sont entre 2 et 10 fois supérieurs sur lames époxy que sur dendrilames. Pour les deux cas, la chimie d'immobilisation des sondes permet une fixation orientée des oligonucléotides par leur extrémité, nous pouvons ainsi considérer que l'accessibilité des sondes n'est pas mise en cause. Par conséquent, ces résultats suggèrent que la quantité de sondes déposées sur lame époxy est supérieure à celles déposées sur dendrilame conduisant à une meilleure hybridation des cibles. Lorsque pour les deux chimies de surface l'étape de réduction est supprimée, les signaux de l'hybridation sont jusqu'à 11 fois supérieurs sur lame époxy que sur dendrilame (Figure 83 c) et d)). Cette différence d'efficacité de l'hybridation peut être expliquée par une meilleure affinité de transfert des sondes du timbre sur la lame époxy que sur la surface

aldéhydes des dendrimères et/ou que la densité des fonctions époxy par cm^2 est supérieure à celle des fonctions aldéhydes sur dendrilame. Cette hypothèse pourrait être vérifiée par le dépôt d'oligonucléotides radiomarqués par l'Innostamp 40 sur ces deux types de chimie de surface.

Enfin, les signaux de l'hybridation sont supérieurs lorsque l'étape de réduction est supprimée et ce quel que soit la chimie de surface utilisée. Ce résultat confirme donc que cette étape élimine une partie des sondes adressées sur la surface. Les résultats de la Figure 83 d) laissent à penser qu'en absence de réduction, les sondes adressées par l'Innostamp 40 sont en excès pour l'hybridation à partir de la concentration $5\mu\text{M}$. En effet, les intensités de fluorescence collectées sont équivalentes et ont atteint un palier pour les concentrations en sondes de 5, 10, 20 et $50\mu\text{M}$.

En conclusion, les conditions de dépôts utilisées par l'Innostamp 40 ne permettent pas la conception de biopuces à ADN sur dendrilames. En effet, il semblerait que l'affinité de transfert des sondes depuis le timbre vers la lame soit meilleure pour des surfaces époxy que pour des surfaces aldéhydes (dendrilames). Ces travaux montrent que le paramètre d'affinité sondes-PDMS *versus* sondes-surfaces doit être pris en considération dans le choix de la chimie de surface pour la conception de biopuces à ADN par μCP . Les résultats de cette section suggèrent donc de changer de chimie de surface pour la fabrication par μCP de biopuces à fluorescence.

C. Conclusion

Les travaux menés sur l'Innostamp 40 ont permis de valider le dépôt multiplexé d'oligonucléotides par cette technologie basée sur le μCP . Les paramètres optimaux de dépôt avec un macrotimbre constitué de 64 piliers en PDMS reposant sur une semelle en PDMS remplie de poudre de fer sont recensés dans le Tableau 8.

Tableau 8 : Paramètres optimaux de dépôt d'oligonucléotides avec l'Innostamp 40 pour une dispersion minimale des signaux de fluorescence.

	Paramètres choisis
Encrage :	60s dans une microplaque à puits.
Vitesse de relevage du macrotimbre :	5000 μ m/s.
Séchage avec moto-turbine :	100 UA pendant 30s au travers d'une grille.
Lavage des macrotimbres :	Application d'un scotch ou incubation de 5min dans un bain d'éthanol.
Nombre d'utilisations possibles ;	7 fois pour le protocole de lavage par application d'un scotch 10 fois pour le protocole de lavage par incubation de 5min dans un bain d'éthanol
Position des aimants :	100 pas moteurs soit environ 11,5 Newtons de force entre le timbre et le support.
Concentration en oligonucléotides :	Préférence pour des concentrations en oligonucléotides de 20 μ M aux dépens de 1; 5 et 10 μ M.

Néanmoins, ces travaux ont mis en évidence de grandes variations dans la répétabilité et la reproductibilité des dépôts par μ CP. A ce titre, il semblerait que la qualité des macrotimbres et l'efficacité du procédé d'encrage soient les principales causes de ces variations. Le déplacement contrôlé de la ligne triple pendant l'étape d'encrage est la clé d'un dépôt homogène. Pour améliorer l'homogénéité des dépôts d'oligonucléotides avec l'Innostamp 40, il semble donc nécessaire de développer un nouveau procédé permettant le contrôle du déplacement de la ligne triple pendant l'étape d'encrage des macrotimbres.

Concernant les résultats de l'hybridation, ils ne sont pas en accord avec ceux publiés par Thibault *et al.*,²¹¹ car lorsque les oligonucléotides sondes sont déposés sur dendrilames par l'Innostamp 40, l'hybridation ne fonctionne pas. Nos travaux ont montré que l'absence d'hybridation n'est pas liée au robot de dépôt mais à l'affinité entre les sondes, le PDMS et la chimie de surface. De plus, il existe des différences liées à la technologie de l'Innostamp 40 par rapport au μ CP manuel (Tableau 9). En effet, les méthodes d'encrage du timbre en PDMS et de contact sont différentes et peuvent contribuer à cette différence de résultat.

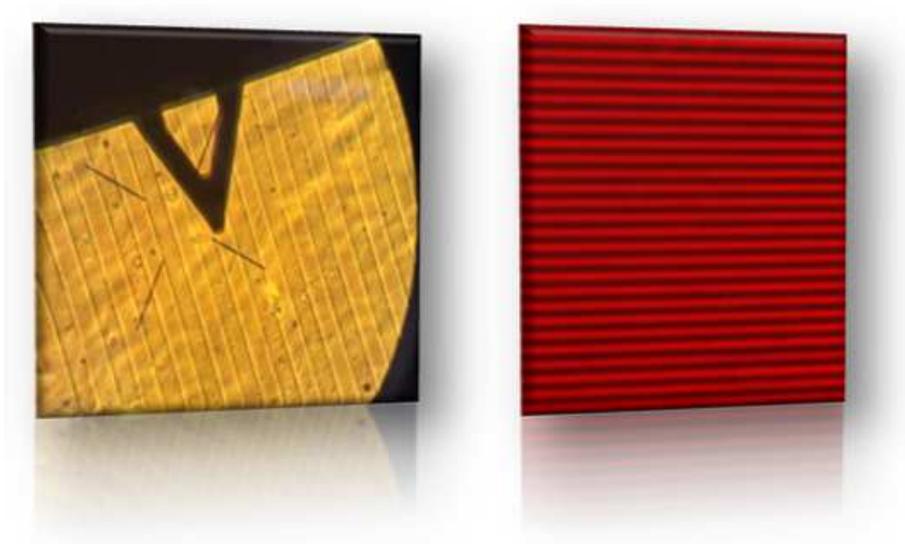
²¹¹ C. Thibault, V. Le Berre, S. Casimirius, E. Trévisiol, J François et C Vieu, Journal of Nanobiotechnology, 2005, 1-12

Tableau 9 : Comparaison entre les μ CP manuel et le μ CP avec l'Innostamp 40

	μ CP manuel	μ CP avec l'Innostamp 40
Timbre	Timbre en PDMS	Macrotimbre en PDMS
Encrage	Dépôt d'une goutte de solution sur les motifs du timbre.	Encrage du macrotimbre par immersion dans une microplaque à puits
Séchage	Manuel par un flux d'azote	Automatique pour une moto-turbine
Dépôts	Contact avec une pression manuelle sur l'arrière du timbre	Contact <i>via</i> un champ magnétique

Ces travaux suggèrent soit de changer de chimie de surface soit de modifier le rapport des concentrations sondes-cibles. Ce rapport peut être modifié en augmentant la concentration en sondes ou en diminuant la concentration en cibles. La concentration minimale en cibles étant contrainte par la limite de détection de la fluorescence par l'outil utilisé.

Chapitre 3 : Nanostructuration de réseaux moléculaires diffractants en vue d'une biodétection sans marquage



Images de lignes de dendrimères (500nm au pas de 1 μ m) fonctionnalisées avec des oligonucléotides fluorescents.

Plusieurs thèses et leurs résultats principaux sur la détection par diffraction ont été présentés dans le chapitre 1 : Introduction Bibliographique. Jean Christophe Cau a développé le principe d'une biopuce dont la détection est réalisée par diffraction optique. Grâce à des simulations théoriques que nous développerons dans le chapitre 4, il a montré que les interactions de molécules cibles sur un réseau de biomolécules sondes pouvaient augmenter la hauteur des lignes du réseau et ainsi modifier la figure de diffraction résultant du réseau. Une partie importante de ses travaux de thèse a permis de mieux appréhender le design optimal pour la mise au point d'une part du lecteur et d'autre part des réseaux moléculaires. La thèse de H. Lalo a elle permis d'améliorer la compréhension et l'utilisation de la technique de lithographie douce adaptée au phénomène de diffraction. Enfin, celle d'A. Egea, a conduit à la conception d'un scanner avec la société Innopsys et à sa validation pour la détection d'interactions protéines-protéines.

L'objectif de ce chapitre est de concevoir des réseaux de lignes sub-micrométriques d'oligonucléotides sondes dans le but d'identifier une hybridation ADN-ADN par diffraction ce qui n'a jamais été fait. Pour cela, nous chercherons à valider les points suivants :

1. Choix de la chimie de surface. Elle doit permettre la fixation des oligonucléotides sondes sous forme de réseaux sur la lame de verre ;
2. Adressage des sondes oligonucléotidiques selon des réseaux de lignes sub-micrométriques diffractants sur lames de verre fonctionnalisées ;
3. Détection des signaux de diffraction par le lecteur Diffрасan d'Innopsys ;
4. Evaluation de l'intégrité des réseaux de lignes après les étapes nécessaires à l'hybridation d'une biopuce (lavage, séchage) dans le but de détecter les signaux après les étapes de l'hybridation.

Les caractéristiques optiques du lecteur de diffraction décrites dans l'introduction bibliographique impliquent la conception de réseaux de lignes d'oligonucléotides sondes de 500 nm au pas de 1 μm . Le microcontact printing flexible en termes de motifs de dépôt et peu onéreux a été choisi pour l'adressage des sondes afin de répondre au mieux à cette contrainte de fabrication. Néanmoins cette technologie est-elle adaptée à la conception de biopuces diffractantes?

Dans un premier temps, nous verrons comment sont réalisés les moules nanostructurés de réseaux de lignes sub-micrométriques pour la production de timbres en PDMS et comment les dupliquer à moindre coût. Puis nous verrons en quoi les réseaux d'oligonucléotides sondes réalisés par microcontact printing ne sont pas adaptés à la détection par diffraction. Enfin nous montrerons que les nouveaux procédés de lithographie douce développés dans le chapitre 1 répondent aux prérequis de la détection par diffraction.

A. Réalisation de moules nanostructurés de réseaux diffractants

L'ensemble des moules utilisés et décrits dans cette thèse a été réalisé par la centrale RTB du LAAS-CNRS. Les moules en silicium nanostructurés constituent la base de la fabrication de timbres en PDMS. Cette partie décrit brièvement les étapes de structuration

topographique d'un substrat de silicium (wafer) pour l'obtention d'un moule fonctionnel (Figure 84).

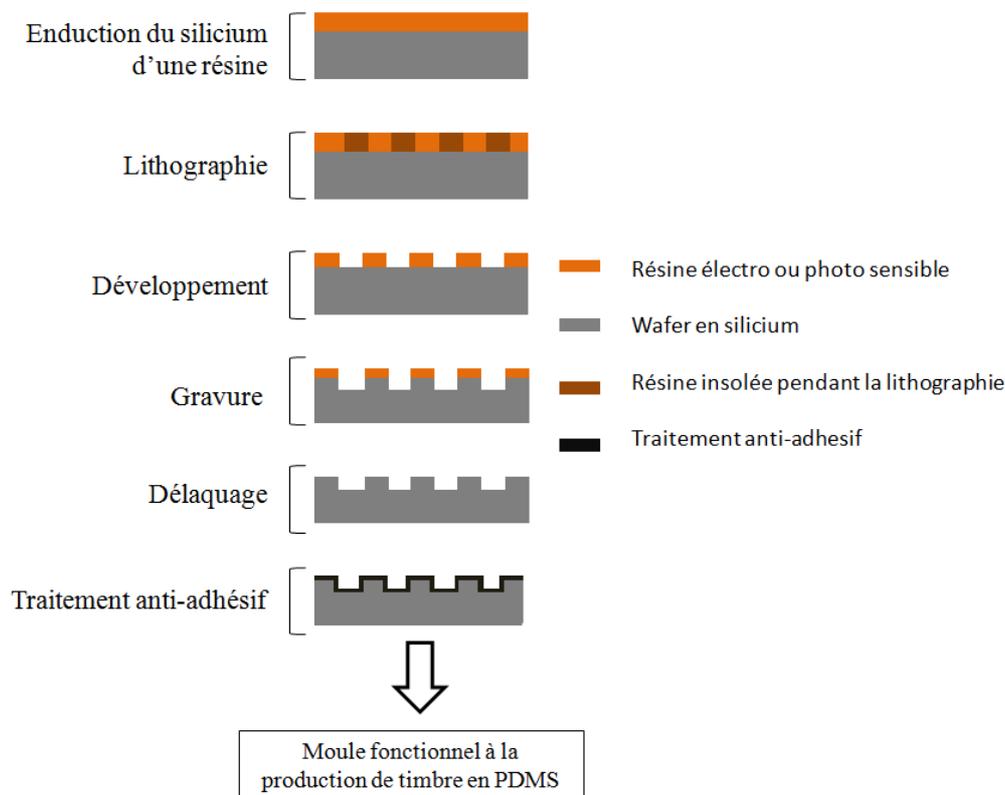


Figure 84 : Schéma représentant les étapes de la structuration topographique d'un substrat de silicium (wafer) pour l'obtention d'un moule utile à la production de timbres en PDMS.

A.1. Enduction du silicium, lithographie et développement

Les étapes d'enduction du silicium, de lithographie et de développement permettent de déterminer les zones à graver sur le wafer en silicium. Dans un premier temps, le wafer est enduit d'une couche de résine photo- ou électro-sensible en fonction du type de lithographie choisie pour obtenir les motifs (Lithographie électronique pour les motifs inférieurs à 400nm ; Lithographie optique par projection ou par contact si supérieur à 400nm). Par la suite, l'insolation dirigée (photolithographie) sur cette résine va modifier la nature chimique de la résine, rendant les zones insolées solubles (résine « positive ») ou insolubles (résine « négative ») dans le développeur. L'étape de développement permet, quant à elle, de dissoudre les régions qui ont été exposées, dans le cas d'une résine positive, ou les régions non-exposées dans le cas d'une résine négative. Ainsi, les zones du wafer sans résine (sans protection) seront sensibles à la gravure alors que les zones encore recouvertes de résine protégeront le silicium de la gravure. Ces motifs en résine sur le wafer permettent une gravure sélective du silicium. Il existe plusieurs types de lithographies avec ou sans masque recensées dans la Figure 85. Dans notre cas, la lithographie par projection a été privilégiée pour sa résolution compatible avec la taille des motifs souhaités. La lithographie électronique est

également adaptée en termes de résolution; néanmoins son coût élevé et le temps d'exécution beaucoup plus long ont été rédhibitoires dans le choix..

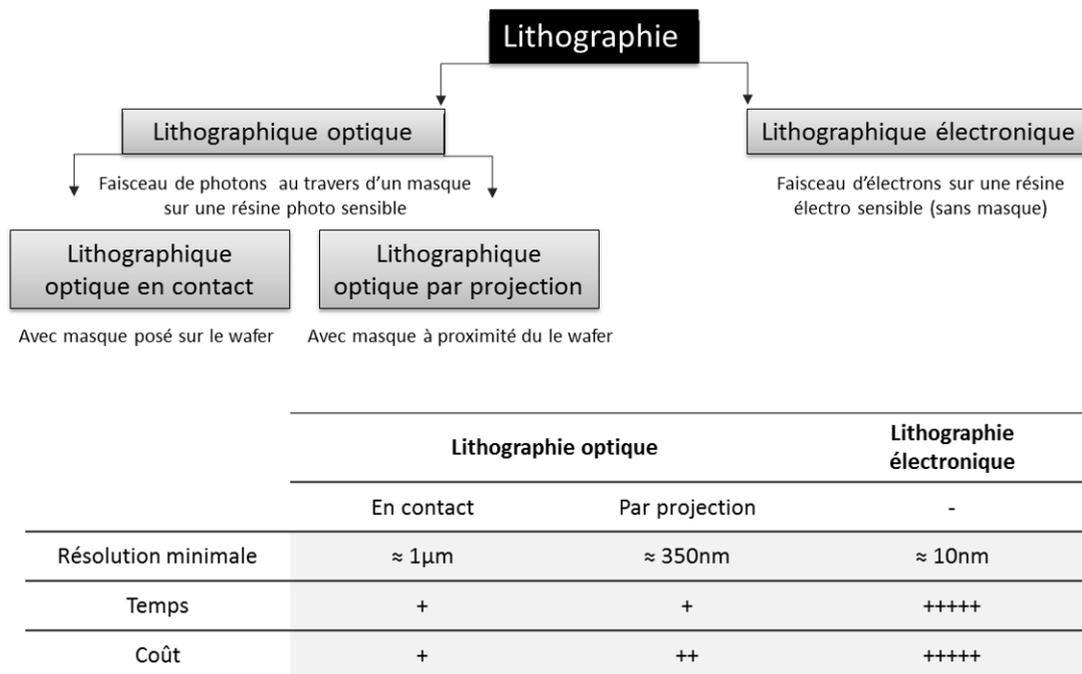


Figure 85 : Schéma représentant les principales techniques de lithographie disponible au LAAS-CNRS avec les principaux critères de choix (résolution, temps et coût)

A.2. Gravure et délaquage

L'étape de gravure consiste à graver physiquement la matière afin d'obtenir des structures topographiques en relief sur le « wafer » en silicium. Il existe deux grandes familles de gravure : les gravures dites « humides » et les gravures dites « sèches ». Dans le cas des gravures dites « humides », la gravure est réalisée par une solution chimique qui va venir attaquer les parties non protégées du « wafer » en silicium. Pour les gravures dites « sèches », le principe repose sur la formation d'un plasma ionique énergétique qui bombarde la surface de l'échantillon. Les vitesses de gravure de la résine et du silicium étant différentes, les motifs en résine vont servir directement de masque de gravure. Pour notre application, la gravure sèche, à savoir la gravure ionique réactive (Reactive Ion Etching_RIE), a été choisie pour son anisotropie. Le plasma qui bombarde la surface entraîne une attaque physico-chimique des matériaux. Après la gravure, l'étape de délaquage réalisée dans un bain de détergents adaptés à la résine permet d'éliminer la résine résiduelle sur le wafer.

A.3. Traitement anti-adhésif

Le traitement anti-adhésif permet de limiter l'adhésion ultérieure du PDMS sur le moule lors de la fabrication du timbre. Cette étape indispensable permet d'assurer le démoulage des motifs du timbre sans « déchirer » le PDMS. Le traitement anti-adhésif le plus

utilisé est réalisé par une silanisation avec de l'OctadécylTrichloroSilane (OTS) en phase liquide.

A.4. Duplication de moules nanostructurés

Bien qu'il soit difficile de s'affranchir totalement des procédés de fabrication robustes et résolus pour la production de moules nanostructurés il est possible de les dupliquer à moindre coût. Afin de minimiser les coûts et simplifier la mise en œuvre, nous avons orienté nos travaux vers la duplication de moules en veillant à respecter les critères suivants :

- Procédés simples et rapides à mettre en œuvre (peu ou pas de matériel spécifique);
- Réplication fidèle des motifs nanométriques;
- Matière première à bas coût.

La restriction de nos critères nous a rapidement orientés vers la duplication de moules par nano-impresion.^{212,213} Cette technique de lithographie douce permet de reproduire à l'identique des motifs micro et nanométriques. Les applications sont nombreuses et dans des domaines très différents.²¹⁴ Dans le domaine du diagnostic par exemple, la nano-impresion est très utilisée pour réduire les coûts de fabrication des systèmes de micro- et nanofluidique. En effet, la plupart des dispositifs fluidiques sont fabriqués à partir de matériaux à base de silicium en utilisant des procédés standards de micro-fabrication (la photolithographie, la lithographie par faisceau d'électrons, la gravure humide ...) mais ces techniques restent coûteuses et difficilement accessibles au plus grand nombre. La nano-impresion a ainsi permis de surmonter ces limites dans le domaine des Lab-on-Chip, notamment pour la fabrication de dispositifs à usage unique et peu coûteux dédiés au diagnostic médical.²¹⁵ Les grandes étapes de la nano-impresion sont décrites dans la Figure 86.

²¹² S.Y. Chou, P. R. Krauss, P. J. Renstrom, *Vacuum Science and Technology*, 1996, 14, 4129-4133.

²¹³ L. Jay Guo, *Adv. Mater.*, 2007, 19, 495-513.

²¹⁴ L. Jay Guo, *J. Phys. D: Appl. Phys.*, 2004, 37, R123-R141.

²¹⁵ J.O. Tegenfeldt, C. Prinz, H.Cao, R. L. Huang, R. H. Austin, S. Y. Chou, E. C. Cox et J. C. Sturm. *Anal Bioanal Chem* 378 (2004) 1678–1692

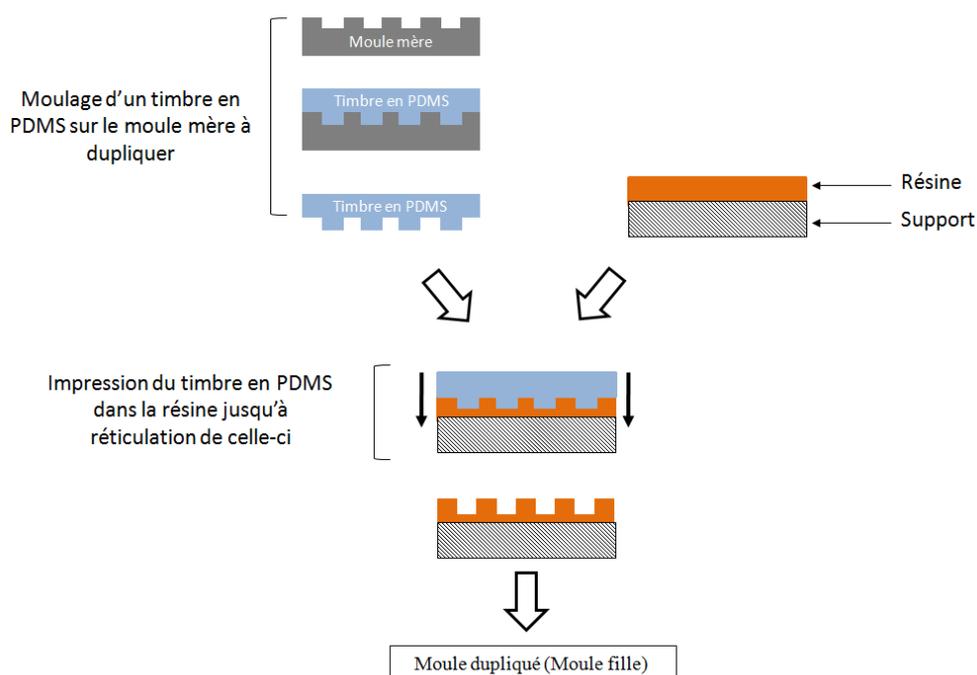


Figure 86 : Schéma représentant les étapes de la duplication d'un moule structuré par nano-impression.

Les travaux de Egea *et al.*,²¹⁶ décrivent la duplication d'un moule nanostructuré avec des motifs similaires aux nôtres par nano-impression thermique assistée par UV (Thermal soft UV NIL). Les étapes pour la duplication sont identiques à celles de la nano-impression décrites dans la Figure 86. Au détail près que la résine utilisée (Su8) réticule sous un rayonnement UV pendant l'étape d'impression du timbre dans la résine. D'autres travaux avec différents types de résine décrivent la duplication de moules micro et nanostructurés par thermal soft UV NIL.²¹⁷ Pour simplifier la mise en œuvre et s'affranchir de l'appareillage UV, nous avons choisi d'utiliser un polymère qui réticule à température ambiante : le polyuréthane. Les travaux de Salil *et al* décrivent ce polymère pour l'impression de motifs micrométriques dédiés à la microfluidique.²¹⁸ En plus de réticuler à température ambiante, le coût de la matière première est de 5 à 10 fois inférieur aux coûts des résines de type époxy utilisées pour la nano-impression.

A.4.a. Comparaison des moules répliqués avec le moule mère en silicium :

La duplication par nano-impression dans du polyuréthane est-elle adaptée aux motifs sub-micrométriques ? La fidélité de réplcation des motifs est-elle équivalente à la duplication déjà décrite par soft UV-NIL ? Dans le but de répondre à ces questions, un moule en silicium structuré de réseaux de lignes de 500 nm au pas de 1 μm et d'une hauteur de 250 nm a été dupliqué par nano-impression dans du polyuréthane et dans une résine époxy par thermal soft

²¹⁶ A. Egea et C. Vieu, *Microelectronic Engineering*, 2011, 88, 1935-1938.

²¹⁷ C.-C Wu, S. Lien-Chung Hsu, Lo et Lin, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2010, 10, 6446-6452.

²¹⁸ Salil P. Desai, Dennis M. Freeman and Joel Voldman *Lab on Chip*, 9 (2009), 1631-1637.

UV NIL puis comparé au moule original. Les résultats décrits dans cette section ont fait l'objet d'une communication (poster) et d'une publication dans le journal *Microelectronic Engineering*.²¹⁹ Ces travaux ont été réalisés en partenariat avec la Société Innopsys et la duplication des moules a été faite par J.C Cau selon les protocoles décrits dans cette publication.

La comparaison des moules répliqués avec le moule mère a été effectuée selon le respect de différents critères listés ci-dessous :

- la fidélité de réplification des motifs sur les moules filles par rapport au moule mère (hauteur, largeur et profondeur des lignes du réseau);
- la capacité des répliqués à permettre la fabrication de timbres en PDMS (appelés timbres filles ou de 2nde génération) avec des dimensions conformes à celles du moule initial;

La Figure 87 compare les dimensions des motifs du moule mère par rapport aux moules filles en termes de largeur, pas et hauteur de lignes.

²¹⁹ Julie Foncy, Jean-Christophe Cau, Carlos Bartual-Murgui, Jean Marie François, Emmanuelle Trévisiol, Childéric Sévérac. *Microelectronic Engineering*, 2013, 110, 183-187

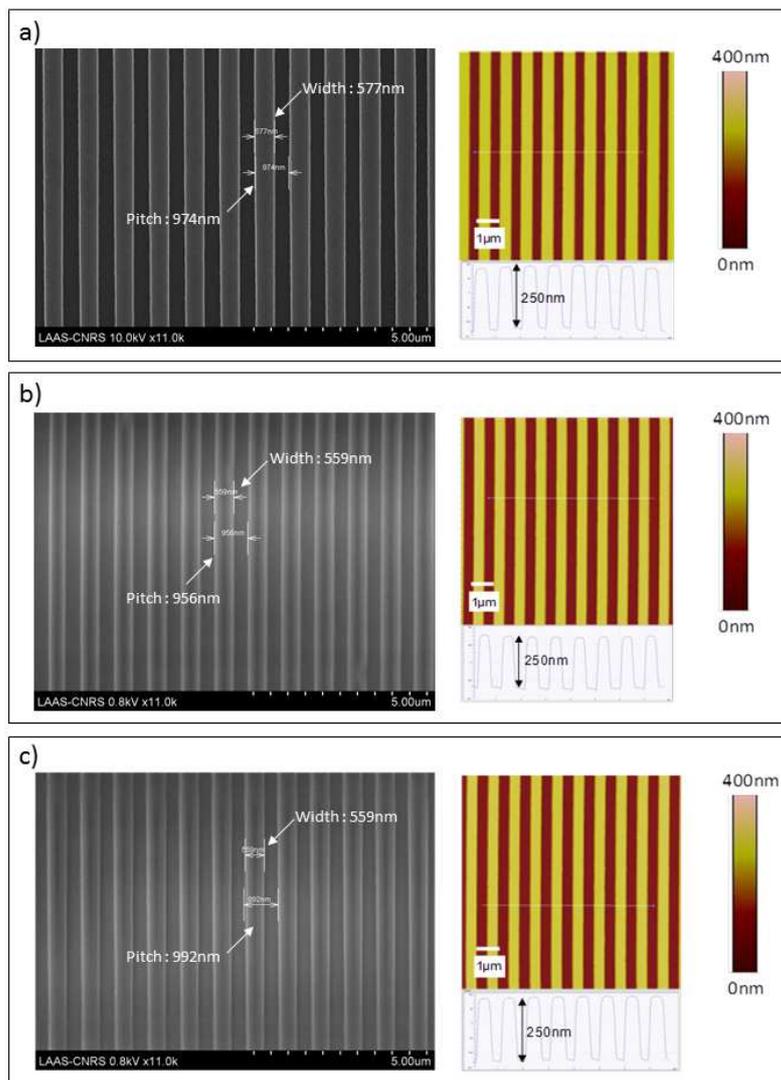


Figure 87 : Images obtenues par microscopie électronique à balayage (MEB_Hitachi S-4800_de 0.8 à 15 keV) et par microscopie à force atomique (AFM_Bruker catalyst_Mode Scan Asyst_Air_fo : 50-90 kHz k : 0,4N/m) du moule mère (a), du moule dupliqué en résine époxy par thermal soft UV NIL (b) et du moule dupliqué en polyuréthane par nano-impession (c).

Les images AFM et MEB issues de la Figure 87 montrent que les dimensions des motifs (la hauteur, la largeur et le pas entre les lignes) sur les répliques sont similaires à celles du moule initial en silicium. Les variations de mesure sur les images au MEB sont liées à l'approximation de l'outil de mesure. On peut donc considérer que ces répliques sont fidèles aux motifs du moule mère. La réplification par nano-impession dans du polyuréthane est donc adaptée à la production de moules nanostructurés. De plus, la simplicité de la technique ainsi que le faible coût de la matière première sont un avantage de taille pour une production à grande échelle (Tableau 10).

Tableau 10 : Tableau récapitulatif des conditions opératoires utilisées pour la réplique du moule mère de 2 cm par 6 cm de côté formé de 20 réseaux de lignes de 1,3 mm de côté. Chaque réseau est formé de lignes de 500 nm au pas de 1 µm.

	Thermal Soft UV NIL avec une résine époxy (Delo-Katiobond 4552)	Nano-impression avec du polyuréthane (Smoth Cast 310)
Matériel nécessaire	Lampe UV	-
Temps de réticulation	5 min sous UV	1h à température ambiante
Coût de la matière première pour 1 réplique	15 euros	1,5 euros

Dans un second temps, la largeur de lignes et le pas de chacune des images AFM ont été mesurés. Les résultats sont répertoriés dans le Tableau 11.

Tableau 11 : Caractéristiques des répliques du moule mère en termes de largeurs des lignes et du pas.

	Moule mère en silicium	Timbre en PDMS issu de moule mère et utilisé pour la nano-impression	Moule fille en résine époxy	Moule fille en polyuréthane
Pas entre les lignes	965 nm	957 nm	955 nm	957 nm
Pourcentage de variation du pas avec le moule mère en silicium.	-	-0.82%	-1%	-0.82%
Largeur moyenne des lignes	580.1 nm (± 7 nm)	565.1 nm (± 5 nm)	563.4 nm (± 5 nm)	564.7 nm (± 5 nm)
Pourcentage de variation de la largeur des lignes avec le moule mère en silicium.	-	- 2.58 %	-2.8 %	-2.6 %

La taille des motifs diminue de 1 à 3% entre les lignes du moule mère et celles des moules filles. D'après les travaux de A.A.Tseng *et al.*,²²⁰ cette variation peut s'expliquer par la rétractation du PDMS pendant la réticulation. La largeur des lignes du timbre en PDMS utilisé pour la nano-impression diminue en moyenne de 2,58 % par rapport au moule mère. Cette variation de quelques pourcents est alors répercutée sur la production des moules en résine époxy et polyuréthane pendant la nano-impression. Pour notre application, ces faibles variations de l'ordre de quelques nanomètres ne sont pas problématiques. Pour s'affranchir de ces variations sur les moules filles, il est simplement nécessaire d'anticiper la rétractation du PDMS, en augmentant de 3% la largeur des lignes du moule mère lors de sa fabrication.

²²⁰ A.A.Tseng, K. Chen, C.D. Chen, K.J. Ma, IEEE Transactions on Electronics Packaging Manufacturing, 26 (2003), 141-149.

Les différents répliques sont-ils adaptés à la production de timbres en PDMS (timbres filles) ? Les motifs en PDMS sont-ils fidèles aux motifs des différents moules ? Dans le but de répondre à ces questions les trois moules ont été utilisés pour la fabrication de timbres en PDMS.

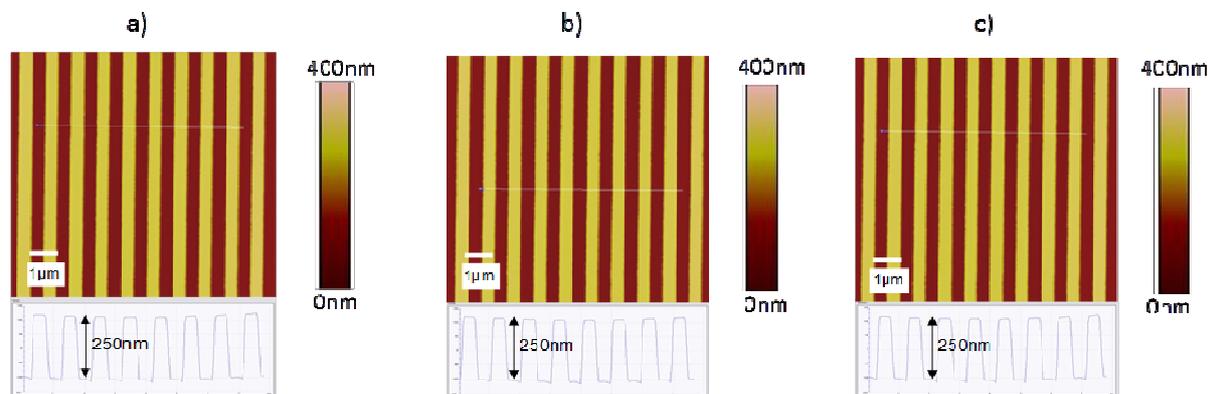


Figure 88 : Images obtenues par microscopie à force atomique (AFM_Bruker catalyst_Mode Scan Asyst_Air_fo : 50-90 kHz k : 0,4N/m) des timbres issus du moule mère (a), du moule dupliqué en résine époxy par thermal soft UV NIL (b) et du moule dupliqué en polyuréthane par nano-impression (c).

Les images AFM de la Figure 88 ainsi que les coupes associées montrent que quel que soit le moule utilisé, les motifs du moule sont correctement réalisés sur le timbre en PDMS car la hauteur et la largeur des lignes sont équivalentes entre les timbres. Les moules répliqués sont donc efficaces pour la production de timbres en PDMS. Nous avons également vérifié l'efficacité des timbres pour le dépôt de biomolécules par microcontact printing. Pour cela, chacun des timbres a été utilisé pour le dépôt d'oligonucléotides marqués en fluorescence.

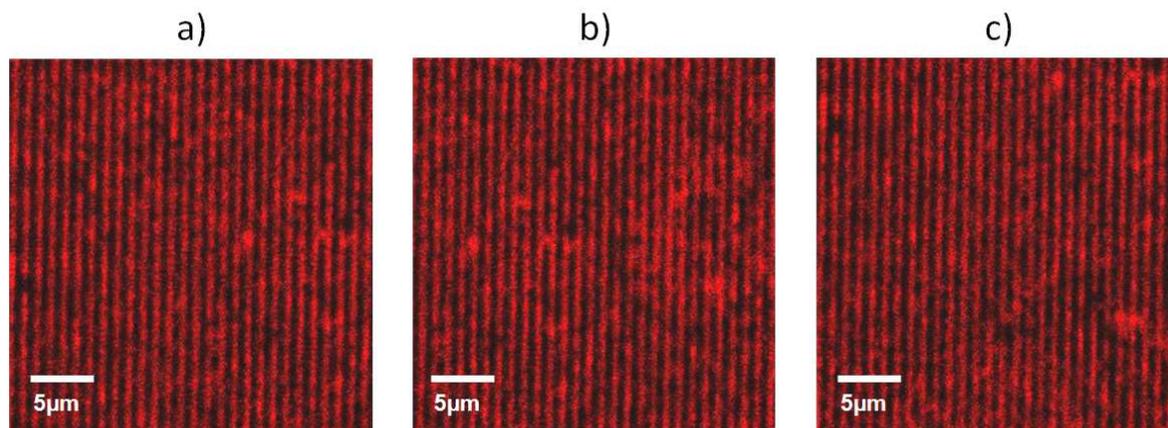


Figure 89 : Images de fluorescence du microcontact printing d'oligonucléotides fluorescents sur lame époxysilane (Schott nexterion) avec les timbre issus (a) du moule mère en silicium, (b) du moule fille en résine époxy et (c) du moule en polyuréthane. L'oligonucléotide fluorescent (5'-[NH₂]-TAT-ACT-CCG-GGA-AAC-TGA-CAT-CTA-G-[Cy5]-3') a été utilisé à 0,5 μM dans du tampon phosphate 0,3 M, pH 9. Les conditions de dépôt sont : encrage 30 s, séchage 30 s, dépôt 30 s. Les images de fluorescence ont été réalisées avec le microscope Zeiss LSM 510 NLO _objectif : X 63 en liquide, laser HeNe: λ = 543 nm.

Les images obtenues par microscopie à fluorescence de la Figure 89 illustrent le dépôt d'oligonucléotides marqués en fluorescence selon des lignes de 500 nm au pas de 1 μm représentées en rouge. Que quel soit la timbre utilisé, l'efficacité des timbres moulés sur les répliques du moule mère n'est pas altérée. Les timbres issus des moules répliqués sont donc efficaces pour le dépôt de biomolécules par microcontact printing. La technique de réplcation de moules nanostructurés de réseaux de lignes (500 nm au pas de 1 μm) dans du polyuréthane est donc aussi efficace que la technique de soft UV NIL déjà décrite dans la littérature.

En conclusion, la nano-impression de motifs dans du polyuréthane est une solution de réplcation de moule parfaitement compatible avec nos motifs sub-micrométriques. Le faible coût de la matière première est très avantageux en comparaison avec les résines utilisées habituellement pour le soft UV-NIL. De plus, sa facilité de mise en œuvre rend ce procédé avantageux et très compétitif. Notons qu'il peut être nécessaire de compenser la rétraction du PDMS pour s'affranchir des variations et ce quel que soit le procédé de nano-impression.

B. Nanostructuration par microcontact printing

Cette section est consacrée à la réalisation de réseaux de lignes de 500 nm au pas de 1 μm d'oligonucléotides marqués en fluorescence par microcontact printing comme illustré dans la Figure 90. Le marquage a pour but d'évaluer la qualité des réseaux de lignes pour la mise au point des conditions optimales de dépôt.

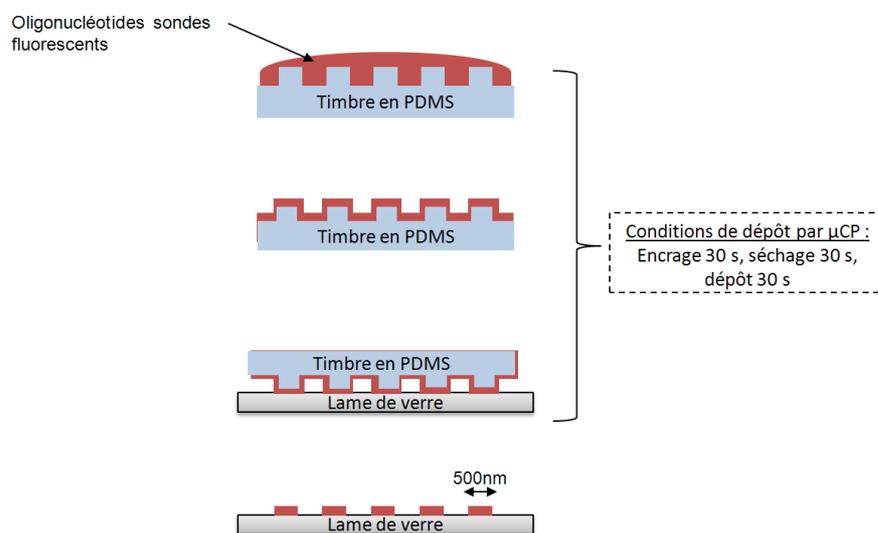


Figure 90 : Schéma représentant la fabrication de réseaux de lignes d'oligonucléotides sondes fluorescentes par microcontact printing.

Dans un premier temps l'objectif a été de déterminer la chimie de surface adaptée à la réalisation de réseaux de lignes d'oligonucléotides sondes détectables au lecteur de diffraction par microcontact printing. Trois types de surfaces ont été testés.

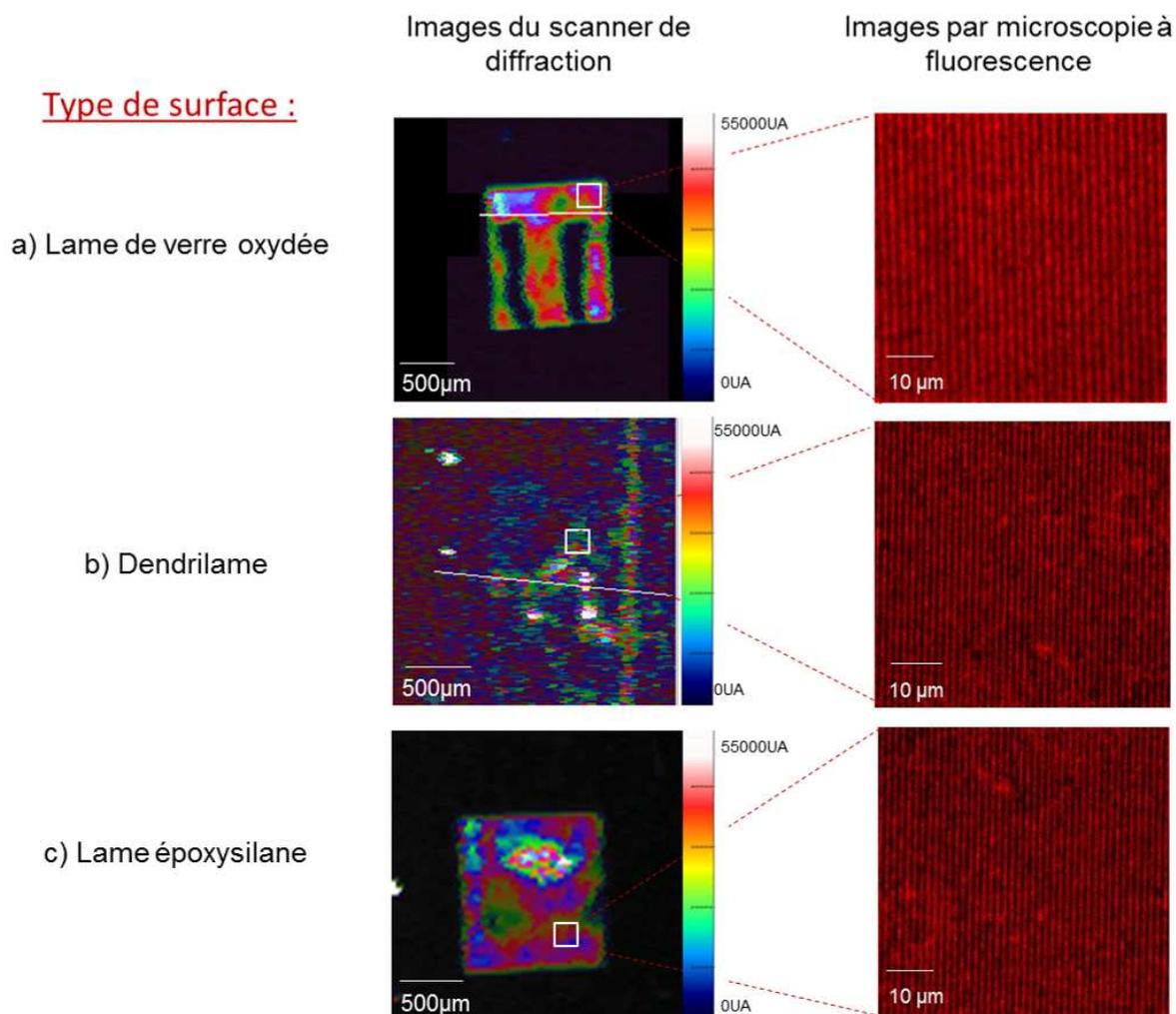


Figure 91 : Images obtenues au scanner de diffraction et au microscope à fluorescence des résultats du microcontact printing d'oligonucléotides fluorescents sous forme de réseaux de lignes de 500 nm par pas de 1 µm. a) Lame de verre oxydée au plasma O₂ (5min à 800W), b) dendrilame, c) lame époxysilane. Conditions de dépôt : encrage 30 s, séchage 30 s et dépôt 30 s. L'oligonucléotide fluorescent (5'-[NH₂]-TAT-ACT-CCG-GGA-AAC-TGA-CAT-CTA-G-[Cy5]-3') a été utilisé à 0,5 µM dans du tampon phosphate 0,3 M, pH 9. Les paramètres des images issues du scanner de diffraction (diffrascan) sont : puissance laser 4 mW et gain 2. Les paramètres des images obtenues au microscope à fluorescence sont : microscope LSM 510 NLO Zeiss, Laser λ : 633 nm, objectif : x 40 à immersion.

Les images obtenues par microscopie à fluorescence de la Figure 91 montrent que quel que soit le type de surface utilisé, les lignes des réseaux d'oligonucléotides fluorescents matérialisées en rouge ont été correctement réalisées par microcontact printing. En revanche, seuls les réseaux réalisés sur lame de verre oxydée et lame époxysilane sont détectables avec le scanner de diffraction (matérialisés par un carré sur les images issues du scanner de diffraction). Sur la dendrilame l'intensité de diffraction émise par les réseaux d'oligonucléotides sondes n'est pas suffisante pour être détectée par l'outil de lecture. Ces résultats laissent à penser que le bruit de fond de la dendrilame est supérieur à celui des deux autres lames empêchant de dissocier l'intensité émise par les réseaux de celle du bruit de fond.

Dans le but de vérifier cette hypothèse, les intensités de diffraction liées uniquement au bruit de fond des différents types de surface ont été mesurées avec le scanner de diffraction et comparées.

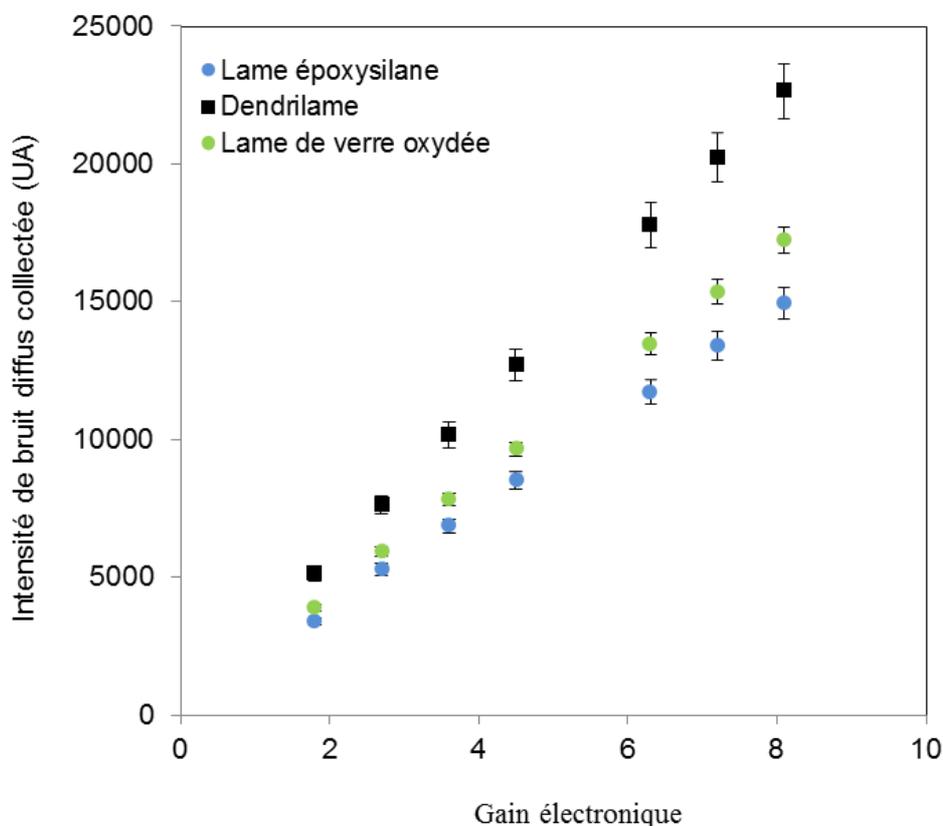


Figure 92 : Intensité collectée du bruit de fond d'une lame époxysilane, d'une dendrilame et d'une lame de verre oxydée pour une puissance laser de 4mW en fonction du gain électronique.

La Figure 92 montre que l'intensité de diffraction liée au bruit de fond de la dendrilame vierge est supérieure à celle collectée sur les autres supports quel que soit le gain de diffraction choisi.

De plus, l'étude de la rugosité des différentes surfaces réalisées à partir d'images AFM montre que pour une image de 1 μm x 1 μm la rugosité de la dendrilame est 3 fois plus importante en comparaison avec la lame époxysilane et la lame de verre oxydée.

Le bruit de fond détecté en diffraction certainement lié à la rugosité de la surface est rédhibitoire pour la dendrilame car il empêche de dissocier les faibles intensités diffractées par les réseaux d'oligonucléotides.

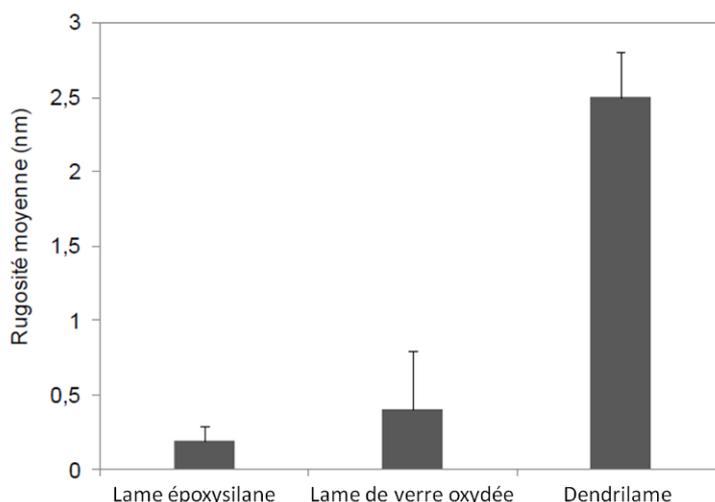


Figure 93 : Moyenne des rugosités de surface (R_q) pour une lame époxysilane, une lame de verre oxydée et une dendrilame. Cette étude a été réalisée à partir d'images AFM de différentes tailles de façon à vérifier la linéarité de la rugosité en fonction de la résolution des images ($1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$, $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$, $20\ \mu\text{m} \times 20\ \mu\text{m}$ et $40\ \mu\text{m} \times 40\ \mu\text{m}$). Seuls les résultats de rugosité des images de $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$ sont présentés dans le but de comparer la rugosité des surfaces à l'échelle du pas et de la largeur des lignes des réseaux. (AFM_Bruker catalyst_Mode Scan Asyst_Air_fo : 50-90 kHz k : 0,4 N/m).

En conclusion, même si l'efficacité de la chimie des dendrimères^{221,222,223} a été démontrée pour la conception de biopuces à ADN à fluorescence, elle ne semble pas adaptée à la conception de biopuces diffractantes par microcontact printing. Le bruit de fond de la lame gêne la lecture des signaux de diffraction de faibles intensités. La lame de verre oxydée, largement utilisée en microcontact printing, est également non compatible avec la conception de biopuces à ADN car les liaisons électrostatiques entre les oligonucléotides sondes et la lame ne permettent pas de maintenir les sondes fixées à la lame lors des étapes de l'hybridation et de lavage. La surface époxysilane quant à elle semble la plus appropriée pour notre application. Ces lames commerciales déjà décrites pour la conception de biopuces à ADN²²⁴ permettent de lier de façon covalente des oligonucléotides sondes fonctionnalisés par une amine ($5'\text{-NH}_2$) aux fonctions époxy de la lame. De plus, le bruit de fond en termes de signaux de diffraction ne semble pas gêner la lecture des signaux.

²²¹E. Trévisiol, V. Le Berre-Anton, J. Leclaire, G. Pratviel, A-M Caminade, J-P Majoral, J. M. François et B. Meunier, *New J. Chem.*, 2003,27, 1713-1719.

²²² V. Le Berre, E. Trévisiol, A. Dagkessamanskaia, S. Sokol, A-M Caminade, J Pierre Majoral, Bernard Meunier³ and Jean François, *Nucleic Acids Res.* 2003, 31(16): e88.

²²³ Supports solides fonctionnalisés par des dendrimères phosphores, leur procédé de préparation et applications – WO 03091304, du 6 novembre 2003.

²²⁴ S.D Conzonea, C.G. Pantano, *Materialstoday*, 2004,7 (3), 20-26.

B.1. Lecture au scanner de diffraction des réseaux moléculaires

Dans le but de mesurer l'impact de la longueur des acides nucléiques sur la diffraction, les signaux de diffraction de réseaux composés d'un acide nucléique « court » de simple brin (26 bases) ou « long » et double brin (319 paires de bases) ont été comparés. La taille de l'oligonucléotide court simple brin étant caractéristique de celle d'un oligonucléotide sonde et celle de l'acide nucléique « long » et double brin d'un fragment PCR pouvant être assimilé aux ADN cibles caractéristiques des biopuces.

Ces travaux ont pour but de vérifier que la sensibilité de l'outil de lecture de la diffraction permet de discriminer ces deux types de réseaux en termes de signaux de diffraction.

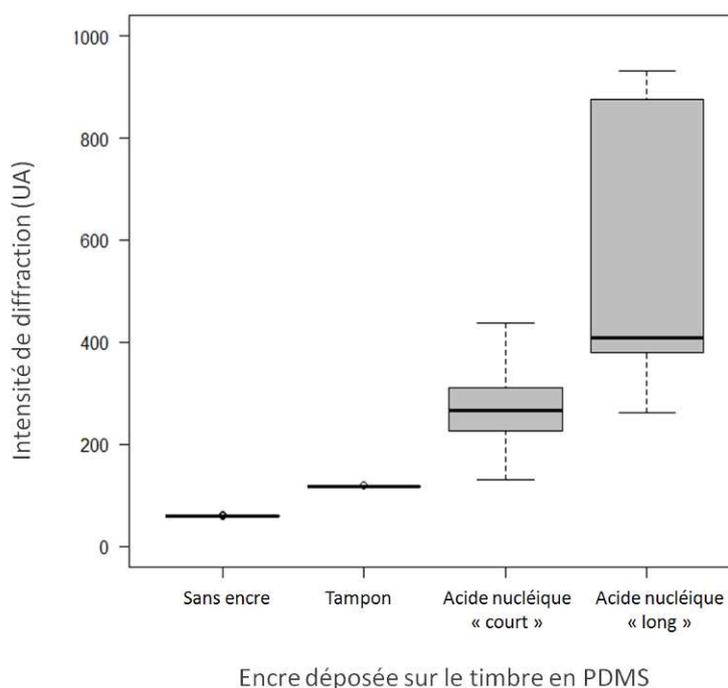


Figure 94 : Intensités moyennes de diffraction de différents réseaux réalisés par microcontact printing. Avec de gauche à droite, 1^{er} «boxplot» timbre non encré, 2nd «boxplot» timbre encré du tampon phosphate 0,3 M, pH 9, 3^{ème} «boxplot» timbre encré de l'oligonucléotide « court » et 4^{ème} «boxplot» timbre encré de l'acide nucléique « long ». Les acides nucléiques ont été utilisés à 0,5µM dans du tampon phosphate 0,3 M, pH 9. 15 réseaux ont été réalisés par condition. Les conditions de dépôt sont : encrage 30 s, séchage 30 s et dépôt 30 s sur lame époxysilane et les paramètres du scanner de diffraction (diffrascan) sont : puissance laser 4 mW et gain 2.

La Figure 94 montre que l'intensité de diffraction mesurée pour les réseaux d'oligonucléotides est significativement supérieure aux deux contrôles négatifs (µCP sans encre et µCP avec du tampon seul). De plus, l'intensité médiane de diffraction des 10 réseaux d'ADN « long » est environ 1,2 fois supérieure à l'intensité médiane de diffraction des 10 réseaux d'oligonucléotides « courts ». La sensibilité du scanner de diffraction est suffisante pour la détection et discrimination de réseaux d'acides nucléiques « courts » et « longs » réalisés par microcontact printing.

L'étude AFM des différents réseaux montre que la hauteur des lignes des réseaux constituées d'acides nucléiques « longs » est environ 2 fois supérieure à celle des réseaux constitués d'acides nucléiques « courts ». Cette différence de hauteur de ligne peut tout à fait expliquer les variations en termes de signaux de diffraction entre les deux types de réseaux.

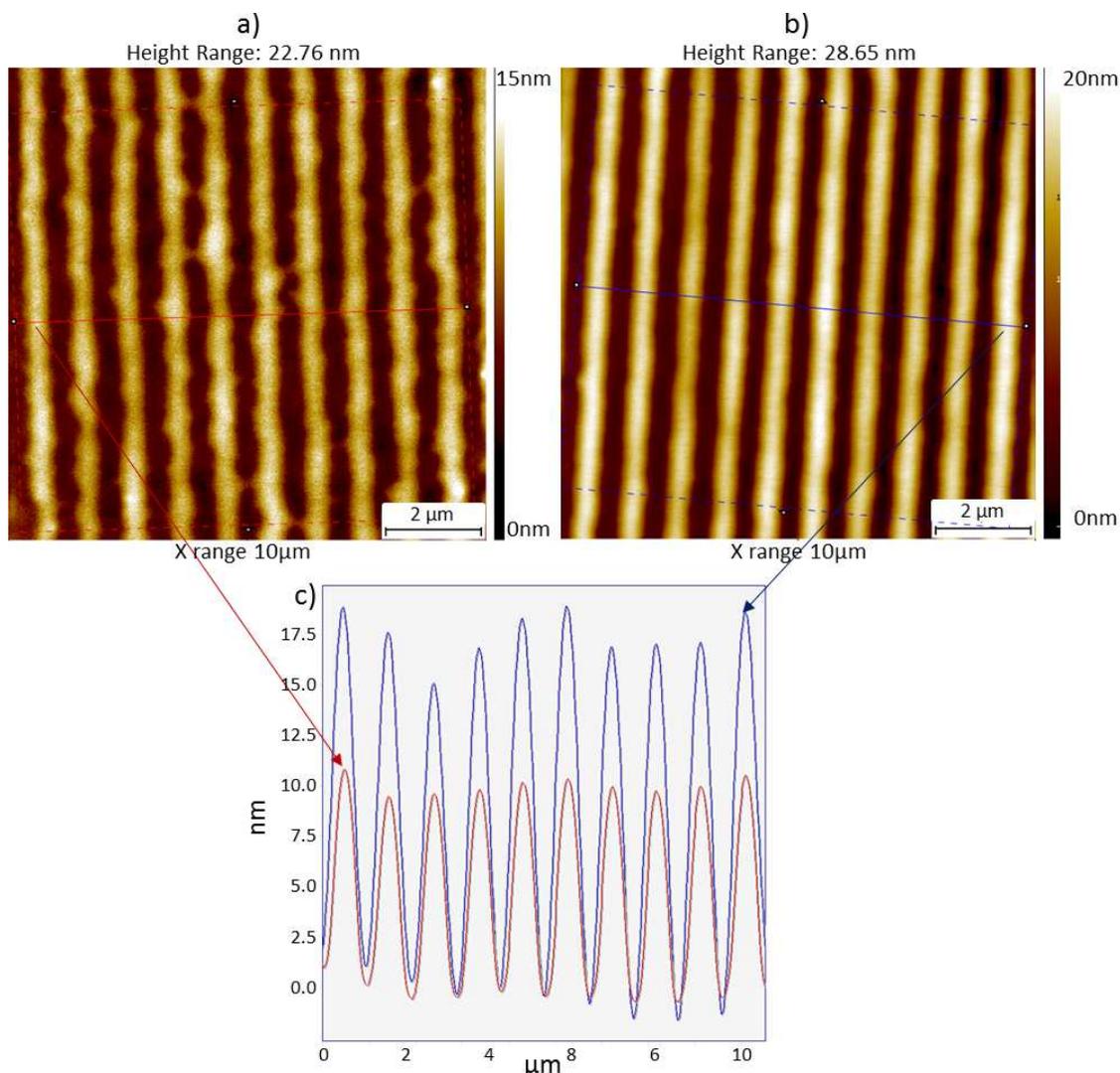


Figure 95 : Images AFM des lignes de deux réseaux d'acides nucléiques de tailles différentes. a) Lignes d'acides nucléiques « courts », b) lignes d'acides nucléiques « longs », c) représentation graphique de la coupe moyenne des hauteurs de 10 lignes (en rouge les lignes d'ADN « courts » et en bleu les lignes d'ADN « longs »). Les conditions de dépôt sont : encrage 30s, séchage 30s et dépôt 30s sur lame époxysilane. (AFM_Bruker catalyst_Mode Scan Asyst_Air_fo : 50-90 kHz k : 0,4N/m).

Chaque ligne du réseau est constituée d'un enchevêtrement d'oligonucléotides, la différence de hauteur de ligne mesurée entre les deux types d'acides nucléiques peut être expliquée par leur différence de taille et/ou une meilleure efficacité du microcontact printing pour des ADN « longs » que pour des ADN « courts ». Néanmoins ces deux hypothèses restent difficiles à vérifier.

En conclusion, l'outil de lecture de la diffraction est suffisamment sensible pour la détection de réseaux de lignes formés d'ADN. La discrimination de réseaux caractéristiques de réseaux d'oligonucléotides sondes et d'acides nucléiques cibles montre que leur taille a un impact sur l'intensité diffractée. Ceci laisse à penser que la détection des événements de l'hybridation en conditions réelles est possible.

B.2. Robustesse des réseaux moléculaires aux étapes de l'hybridation

La fixation des oligonucléotides sondes sur la biopuce est un point essentiel pour que l'hybridation ait lieu. Il l'est d'autant plus dans le cas des biopuces diffractantes dont le principe de lecture est basé sur les caractéristiques topographiques et la périodicité des réseaux d'oligonucléotides sondes. Les réseaux réalisés par microcontact printing sur lame époxysilane sont-ils suffisamment robustes pour ne pas être détruits pendant les étapes de l'hybridation (incubation, lavage, séchage) ?

Pour vérifier cela, les lignes d'un réseau d'oligonucléotides sondes ont été imagées par microscopie à force atomique avant et après les étapes d'une hybridation.

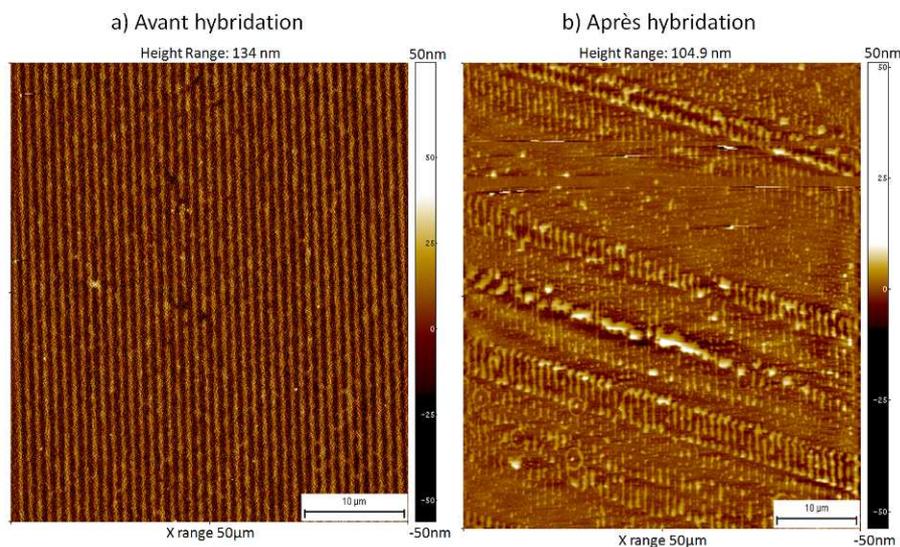


Figure 96 : Images AFM des lignes d'un réseau d'oligonucléotides sondes déposé par μ CP sur lame époxysilane avant (a) et après (b) les étapes d'une hybridation : incubation du tampon d'hybridation constitué de SSC 5X, et SDS 0,1%, deux lavages de 3 min (SSC 2X et SDS 0,2%), un lavage de 3 min (SSC 0,1X) puis séchage de la lame sous un flux d'azote.(AFM_Bruker catalyst_Mode Scan Asyst_Air_fo : 50-90 kHz k : 0,4 N/m).

La Figure 96 montre que les lignes constituées d'oligonucléotides sondes sont en grande partie détruites après les étapes d'incubation et de lavage indispensables à l'hybridation. Il en résulte qu'aucun signal n'a pu être collecté avec le scanner de diffraction.

A l'échelle sub-micrométrique, la fixation des sondes sur la chimie de surface époxysilane ne permet pas de maintenir la structure topographique des réseaux d'oligonucléotides sondes après l'étape d'hybridation. Les lignes des réseaux réalisés par μ CP étant constituées d'un enchevêtrement d'oligonucléotides, il est possible que les sondes n'étant pas en contact avec la surface ne soient pas fixées à la lame et soient éliminées pendant d'hybridation conduisant à la distribution des lignes.

En conclusion, la fabrication des réseaux d'oligonucléotides sondes constitue un verrou pour la biodétection par diffraction. La détection en diffraction d'une hybridation ne peut avoir lieu si les réseaux sont dégradés. La fabrication des réseaux d'oligonucléotides sondes doit être repensée afin qu'ils soient plus robustes et résistent aux étapes indispensables à l'hybridation.

C. Nanostructuration de réseaux diffractants de dendrimères

Pour contourner le verrou technologique mis en évidence dans la section précédente, nous avons choisi de nanostructurer la lame avec la chimie de surface selon des réseaux de lignes puis d'adresser les oligonucléotides sondes sur ces réseaux. Le couple dendrimères phosphorés aldéhydes G4 et oligonucléotides sondes 5'-NH₂ a ainsi été retenu car la fixation des sondes sur les dendrimères est covalente (liaison imine).

C.1. Fabrication des réseaux de lignes de dendrimères par microtransfert molding

La nanostructuration de la lame de réseaux de lignes formées de dendrimères a été réalisée par microtransfert molding. Le dépôt a été fait à partir de timbres constitués de 12 réseaux de 1 mm² composés de lignes de 500 nm de largeur et hauteur au pas de 1 μ m sur des lames silanisées (APTES 5%).

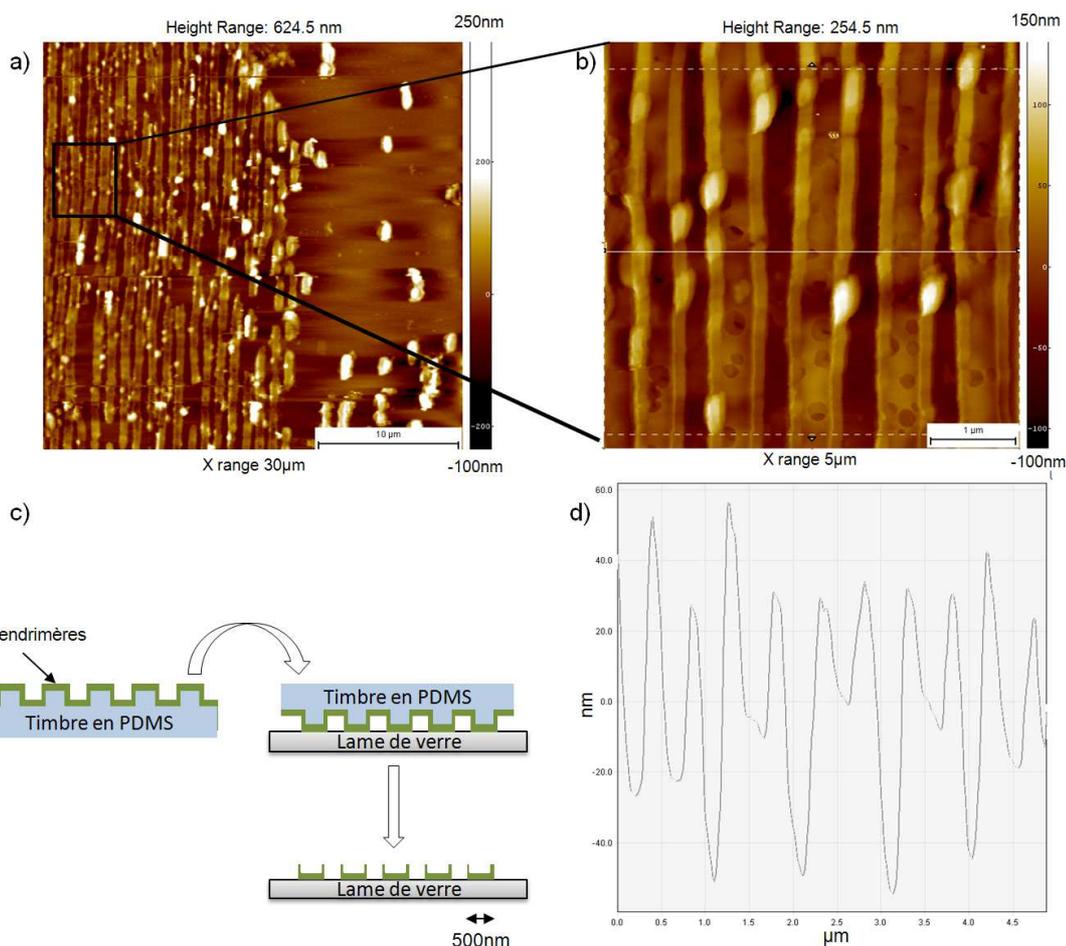


Figure 97 : Images AFM des lignes de dendrimères fabriquées par microtransfert molding sur lame silanisées (APTES 5%). a) Vue d'ensemble des lignes de dendrimères, b) zoom sur 5 lignes de dendrimères c) représentation graphique de la coupe moyenne des hauteurs de 5 lignes. Le dépôt a été réalisé par l'outil GéSim μ CP 3.0 selon les conditions : encrage 1 min d'une solution de dendrimère à 58 μ M contenus dans du THF, séchage 30 s et dépôt 1 min. AFM_Bruker catalyst_Mode Scan Asyst_Air_fo : 50-90 kHz k : 0,4 N/m).

Les Figure 97a) et b) montrent que lors du dépôt de dendrimères par microtransfert molding, les motifs obtenus sur la lame ne correspondent pas rigoureusement aux motifs du timbre. En effet, les « lignes » de dendrimères obtenues n'ont pas les dimensions attendues, soit 500 nm au pas de 1 μ m. Il semble que les dendrimères encrés sur les bords des motifs (à la verticale) soient déposés en même temps que ceux directement en contact avec la lame comme illustré dans la Figure 97c). Ces résultats font référence au "edge printing" de dendrimères déjà décrit par C. Thibault et al.,²²⁵ dans ses travaux sur le microtransfert molding de dendrimères phosphorés aldéhydes G4.

²²⁵ C. Thibault, C. Severac, E. Trévisiol, C. Vieu, *Microelectronic Engineering* 83(2006), 1513-1516

En conclusion, le microcontact printing de dendrimères n'est pas adapté à la production de réseaux de lignes de 500 nm au pas de 1 μm . Les motifs obtenus ne sont pas rigoureusement ceux du timbre utilisé. L'arrangement périodique des réseaux étant à la base du principe de biodétection par diffraction, il est nécessaire d'utiliser un autre procédé de nanostructuration de surface plus efficace pour le dépôt de dendrimères.

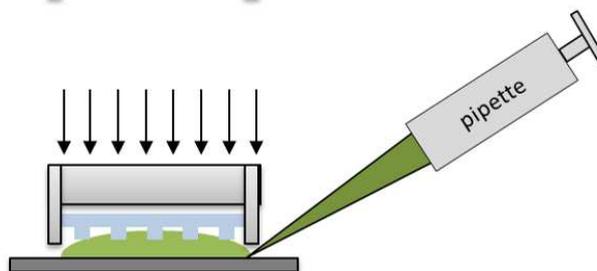
C.2. Fabrication des réseaux de lignes de dendrimères par le procédé de « confinement »

Décrit dans le chapitre 1 comme un procédé innovant de fonctionnalisation de surface, nous avons choisi d'utiliser le procédé de « confinement » d'une solution de dendrimères pour la réalisation de réseaux de lignes. Les travaux ont été réalisés avec l'outil GeSim μCP 3.0 avec des timbres constitués de 12 réseaux de 1 mm^2 composés de lignes de 500 nm de largeur et hauteur au pas de 1 μm et avec une profondeur entre les lignes de 500 nm. Pour rappel, une goutte de solution de dendrimères est piégée entre le timbre nanostructuré et une lame de verre silanisée. Puis la solution est confinée sur la lame jusqu'à évaporation totale du solvant. Pendant l'étape de confinement, les motifs de ce timbre contraignent l'assemblage des dendrimères selon des lignes de 500 nm au pas de 1 μm (Figure 98).

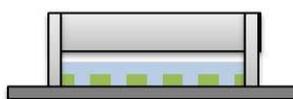
Timbre en PDMS structuré avec des réseaux de lignes de 500 nm au pas de 1 μm



Piégeage de la goutte de la solution de dendrimères (58 μM dans du THF) entre le timbre et la lame silanisée (APTES 5%)



Confinement de la solution de dendrimères jusqu'à évaporation du solvant par le timbre en PDMS



Structuration de la lame avec les dendrimères selon les motifs du timbre



Figure 98 : Schéma représentant le principe du procédé de « confinement » d'une solution de dendrimères avec un timbre en PDMS sur une lame silanisée.

Les motifs obtenus par la nanostructuration de surface de réseaux de lignes de 500 nm au pas de 1 μ m formées de dendrimères par le procédé de « confinement » sont présentés dans la Figure 99

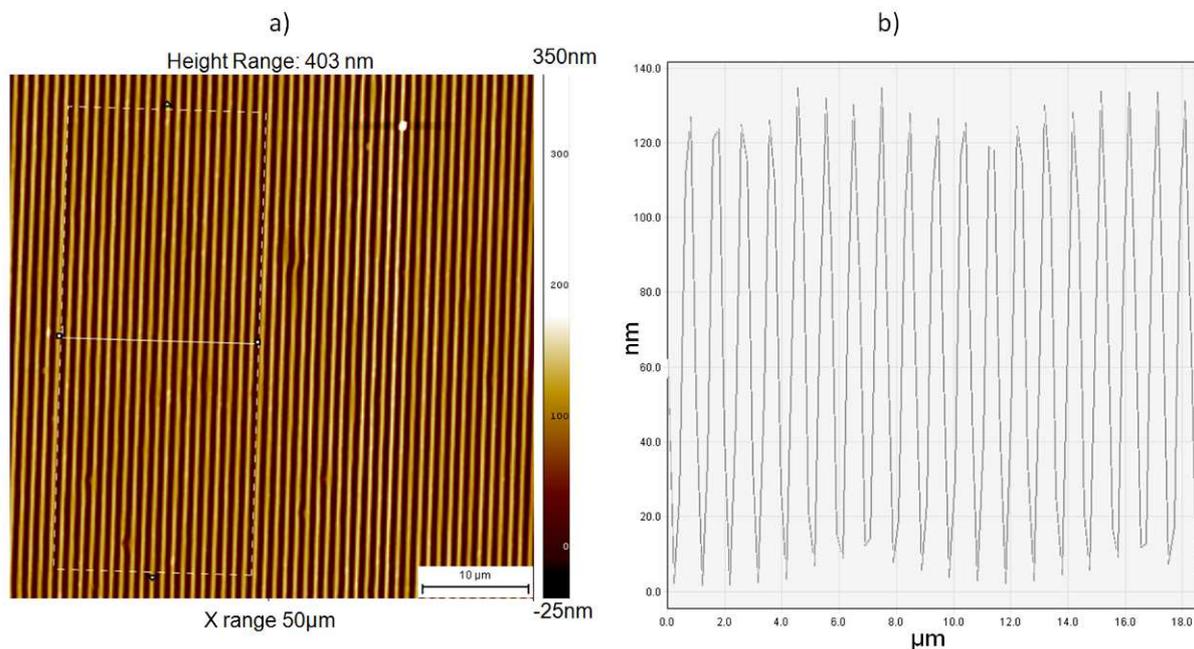


Figure 99 : a) Image obtenue par microscopie à force atomique des lignes de dendrimères fabriquées par confinement des dendrimères sur lame silanisée, b) coupe moyenne des hauteurs de 20 lignes de dendrimères. Le procédé de « confinement » a été réalisé par l'outil GÉSim μ CP 3.0 selon les conditions suivantes : solution de dendrimères à 58 μ M contenus dans du THF, confinement pendant 5 min sur une lame APTES 5%. AFM_Bruker catalyst_Mode Scan Asyst_Air_fo : 50-90 kHz k : 0,4 N/m.

L'image AFM de la Figure 99 montre l'arrangement périodique très régulier des lignes de dendrimères réalisées par le procédé de « confinement ». La hauteur des lignes est d'environ 120 nm. Dans le but de vérifier la résistance des réseaux à l'étape de l'hybridation, ils ont été soumis aux différentes étapes d'incubation et de lavage nécessaires à celle-ci (réduction de la lame, incubation du tampon d'hybridation, lavage et séchage de la lame).

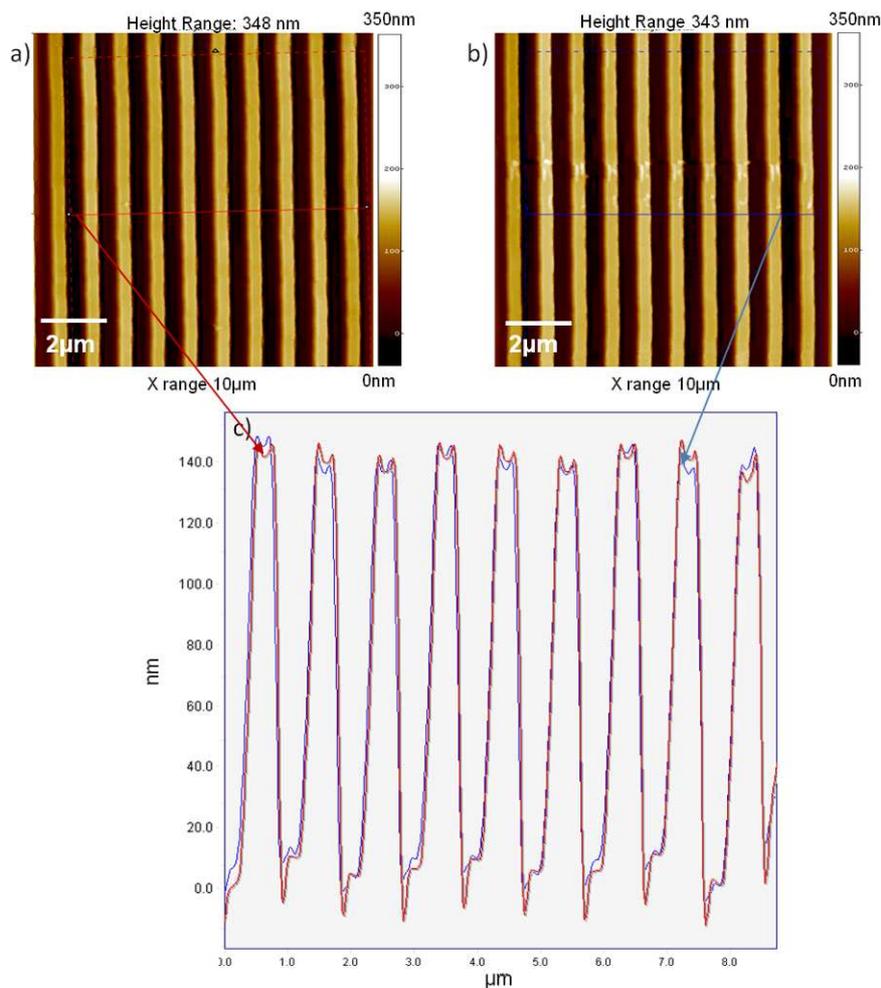


Figure 100 : Images AFM des lignes formées de dendrimères issues d'un réseau réalisé par le procédé de « confinement » (a) avant et (b) après les étapes nécessaires à l'hybridation. c) Représentation graphique de la coupe moyenne de 9 lignes de dendrimères avant (rouge) et après (bleu) incubation du tampon d'hybridation seul. Le procédé de « confinement » a été réalisé par l'outil GéSim μ CP 3.0 selon des conditions suivantes : solution de dendrimères à 58 μ M contenus dans du THF, confinement pendant 5 min sur une lame silanisée (APTES 5%).AFM_Bruker catalyst_Mode Scan Asyst_Air_fo : 50-90 kHz k : 0,4 N/m.

La Figure 100 montre que les lignes d'un réseau avant et après les étapes nécessaires à l'hybridation ne présentent pas de différences significatives au niveau de leur arrangement périodique (hauteur, largeur, épaisseur). Le profil des coupes moyennes des lignes avant (en rouge) et après les étapes nécessaires à l'hybridation (en bleu) est très similaire (Figure 100 c) comme le montre le graphique. Ainsi, ce procédé de structuration de surface permet de fabriquer des réseaux de lignes sub-micrométriques formées d'un empilement de dendrimères robuste.

En conclusion, le procédé innovant de « confinement » est adapté à la production de réseaux de lignes de dendrimères de 500 nm au pas de 1 μm . De plus, le choix de nanostructurer la surface avec la chimie utilisée pour l'accroche des oligonucléotides sondes (dendrimères aldéhydes phosphorés G4) et non plus avec les sondes directement, semble être une solution alternative beaucoup plus robuste.

C.3. Adressage des oligonucléotides sondes sur les lignes des réseaux de dendrimères

Cette section est consacrée à l'adressage des oligonucléotides sondes sur les réseaux de lignes de dendrimères. Ces réseaux étant dédiés à la biodétection il est fortement recommandé de limiter l'adressage des oligonucléotides sondes entre les lignes du réseau. Dans le but d'évaluer l'efficacité de la fonctionnalisation par microscopie à fluorescence, nous avons choisi d'utiliser un oligonucléotide sonde marqué par un fluorophore (3'-Cy5). La Figure 101 résume les deux stratégies utilisées pour l'adressage des molécules sondes qui seront développées.

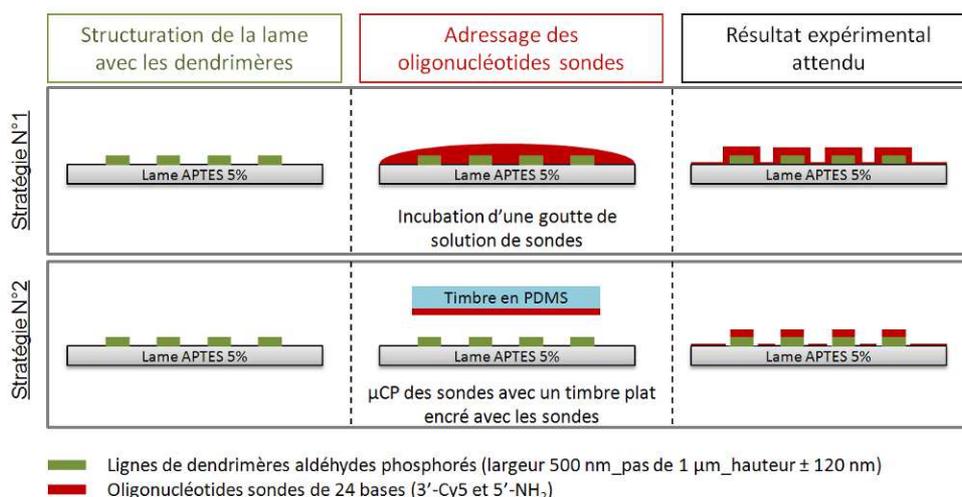


Figure 101 : Schéma récapitulatif des deux stratégies développées pour la fonctionnalisation des réseaux de lignes de dendrimères obtenus par confinement avec des oligonucléotides sondes.

La première stratégie développée a consisté à incuber une goutte de solution d'oligonucléotides sondes directement sur les réseaux de lignes de dendrimères pendant 30 min. Lors de la mise en contact, les oligonucléotides sondes 5'-NH₂ modifiés vont se lier aux fonctions aldéhydes des dendrimères (liaison imine covalente et réversible dans l'eau). Cette fonctionnalisation est adaptée à notre application seulement si la présence de dendrimères entre les lignes des réseaux est limitée. Dans le cas contraire, les sondes seront accrochées dessus, entre et sur les côtés des lignes.

Afin de vérifier au préalable s'il y a des dendrimères déposés entre les lignes des réseaux, la rugosité de surface a été comparée entre la lame silanisée, le dessus des lignes et la zone entre

les lignes de dendrimères. Cette étude a été réalisée à partir d'images AFM de différentes tailles dans le but de vérifier la linéarité de la rugosité en fonction de la taille des images (50 x 50 nm, 100 x 100 nm, 150 x 150 nm et 300 x 300 nm). Seuls les résultats obtenus avec les images de 300 x 300 nm sont présentés ci-dessous.

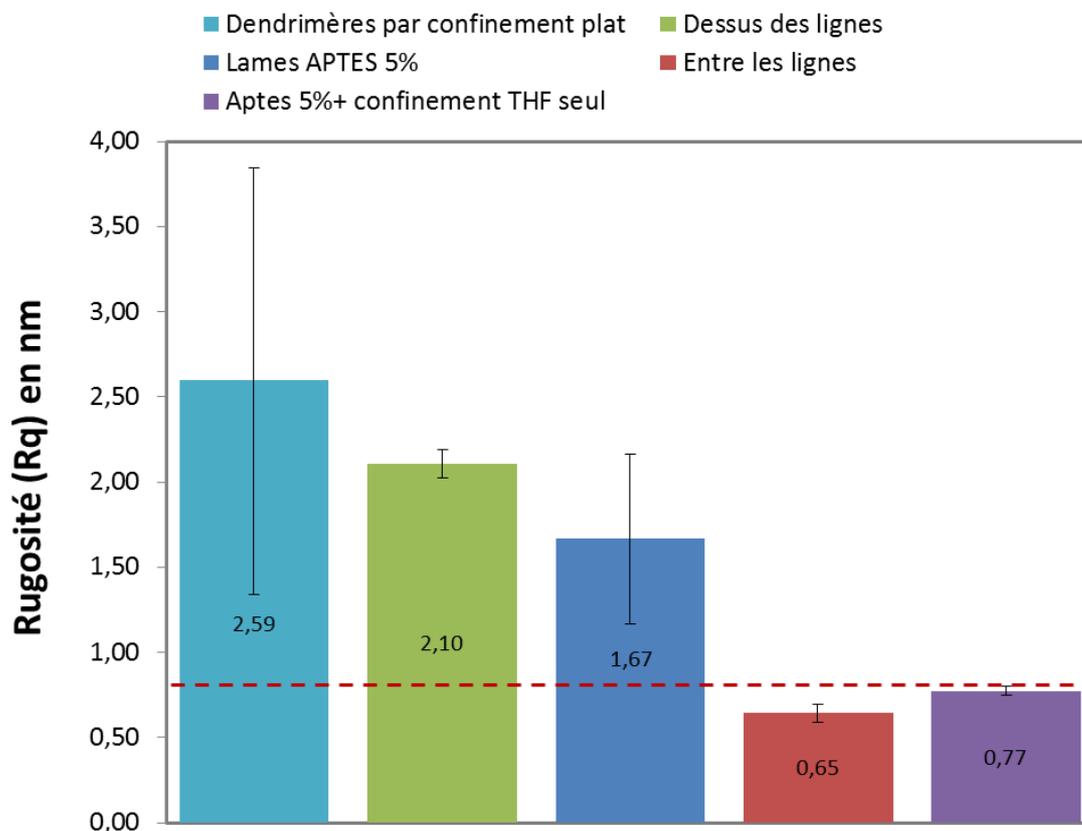


Figure 102 : Moyenne des rugosités (Rq) des différentes surfaces en fonction de la taille des images AFM. L'étude a été réalisée à partir de 3 images AFM de 300 nm x 300 nm pour chacune des surfaces (AFM_Bruker catalyst_Mode Scan Asyst_Air_fo : 50-90 kHz k : 0,4 N/m).

La Figure 102 indique que la rugosité de surface mesurée entre les lignes de dendrimères (en rouge) est équivalente à celle obtenue sur une surface silanisée (APTES 5%) après le procédé de « confinement » d'une solution de THF sans dendrimères (en violet). La rugosité de surface mesurée sur le dessus des lignes de dendrimères (en vert) est comprise entre celle obtenue sur une surface silanisée APTES 5% (en bleu foncé) et celle obtenue sur une surface de dendrimères réalisée par le procédé de « confinement » sans motif (plat) (en bleu clair). Ces résultats montrent que le procédé de « confinement » utilisé pour l'obtention de réseaux de lignes semble limiter le dépôt de dendrimères entre les lignes. Ainsi lors de l'adressage des sondes par incubation, nous pouvons considérer que l'accrochage des sondes entre les lignes de dendrimères est également limité à l'adsorption non spécifique APTES-sondes.

Pour la seconde stratégie, les oligonucléotides sondes sont adressés sur le dessus des lignes de dendrimères par microcontact printing avec un timbre plat (sans motif). Dans ce cas, le dépôt des sondes se fait préférentiellement sur le dessus des lignes. Néanmoins, il est

impossible d'affirmer catégoriquement qu'il n'y a pas d'oligonucléotides sondes entre les lignes. En effet, le facteur de forme des lignes de dendrimères n'est pas en adéquation avec l'élasticité du PDMS (module de Young du PDMS : 2.5 MPa). Le facteur de forme correspond au rapport h/s avec h représentant la hauteur des structures et s la largeur entre les motifs. Ainsi, lorsque $h/s < 0,2$ le timbre en PDMS s'effondre. Ce phénomène lié à l'élasticité du PDMS est nommé « roof collapse ».^{226,227} Dans notre cas, les lignes de dendrimères ont une hauteur toujours ≤ 140 nm, avec une largeur de 500 nm au pas de 1 μm , le facteur de forme est donc de 0.28. Donc le timbre plat en PDMS ne peut pas s'effondrer entre les lignes de dendrimères et ainsi entrainer un dépôt d'oligonucléotides sondes entre les lignes. De plus, la Figure 102 montre que la présence de dendrimères entre les lignes des réseaux est restreinte l'accrochage des sondes entre les lignes est donc limité à l'absorption non spécifique APTES-sondes.

De plus, dans le cas de la chimie des dendrimères après dépôt des oligonucléotides sondes, les lames sont réduites. Cette étape transforme la liaison imine (covalente et réversible dans l'eau) entre les sondes et les dendrimères en liaison amine (covalente et irréversible). Cette étape contribue à éliminer les oligonucléotides non fixés aux dendrimères et à inactiver les sites non occupés sur les dendrimères (fonctions aldéhydes libres transformées en fonctions alcools). Ainsi, l'accrochage des sondes est covalent et cette étape limite l'accrochage non spécifique (APTES-sondes).

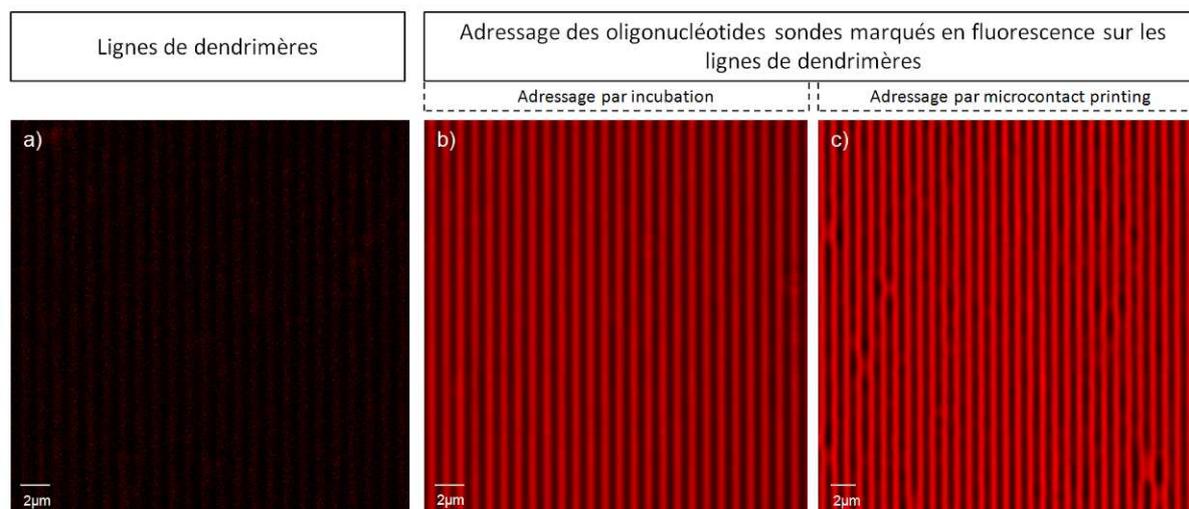


Figure 103 : Images en fluorescence a) des lignes de dendrimères ; de l'adressage des oligonucléotides marqués en fluorescence b) par incubation (30 min) avec une goutte de solution d'oligonucléotides sondes, c) par microcontact printing avec un timbre plat (encrage 1 min, séchage 30 s, dépôt 1 min). L'oligonucléotide fluorescent (5'-[NH₂]-TAT-ACT-CCG-GGA-AAC-TGA-CAT-CTA-G-[Cy5]-3') a été utilisé à 5 μM dans du tampon phosphate 0,3 M, pH 9. Les images ont été obtenues avec le Microscope LSM 510 NLO Zeiss, Laser λ : 633 nm, objectif : x 40 à immersion.

²²⁶ A. Bietsch, B. Michel, Journal of Applied Physics, 2000, 88, 7, 4310 – 4318.

²²⁷ B. Michel, A. Bernard, A. Bietsch, E. Delamarche, M. Geissler, D. Juncker, H. Kind, J.-P. Renault, H. Rothuizen, H. Schmid, P. Schmidt-Winkel, R. Stutz, H. Wolf, IBM J. RES. & DEV, 2001 45, 5.

Les images de la Figure 103 b) et c) montrent des lignes d'oligonucléotides marqués en fluorescence (en rouge) après l'étape d'adressage, celles-ci sont absentes pour le contrôle négatif. Les oligonucléotides sondes marqués en fluorescence ont donc été adressés sur les lignes de dendrimères quel que soit la méthode d'adressage utilisée (incubation ou μ CP). De plus, le fort contraste entre les intensités de fluorescence du dessus des lignes et entre les lignes indique que la présence d'oligonucléotides sondes entre les lignes est limitée.

En conclusion, nous avons montré que le procédé de « confinement » est adapté à la conception de réseaux de lignes sub-micrométriques. De plus, il semble limiter la présence de dendrimères entre les lignes. Ainsi l'adressage des sondes réalisable par incubation d'une goutte ou par microcontact printing avec un timbre sans motif (plat) conduit à l'accrochage préférentiellement des sondes sur les lignes de dendrimères.

D. Le procédé « tout en un » pour la fabrication de réseaux diffractants de lignes fonctionnalisées avec des oligonucléotides

Décrit dans le chapitre 1, le procédé « tout en un » est une approche innovante pour la double fonctionnalisation de surface. Cette technique permet de co-fonctionnaliser une surface avec des dendrimères et des biomolécules en une seule étape. Les temps et les coûts de fonctionnalisation sont fortement réduits. De plus, nous avons montré qu'il y a une augmentation des signaux de l'hybridation. Ce procédé innovant semble en très bonne adéquation avec les objectifs de cette thèse à savoir la production de biopuces à ADN sans marquage à bas coût. Dans cette partie, nous tâcherons de vérifier son adéquation pour la production de réseaux de lignes formées de dendrimères et d'oligonucléotides.

Pour rappel, le principe repose sur l'encreage du timbre en PDMS avec les molécules d'intérêts (ici des oligonucléotides sondes fluorescents) avant de l'utiliser pour confiner la solution de dendrimères. Lors du confinement des dendrimères, les oligonucléotides fixés sur les structures du timbre en PDMS sont transférés sur les dendrimères. Dans le cas de la fabrication de réseaux de lignes de dendrimères fonctionnalisés, il est préférable de limiter la quantité d'oligonucléotides entre les lignes de dendrimères. Pour cela, les biomolécules sur le dessus des motifs doivent être éliminées avant l'utilisation du timbre pour confiner la solution de dendrimères (Figure 104).

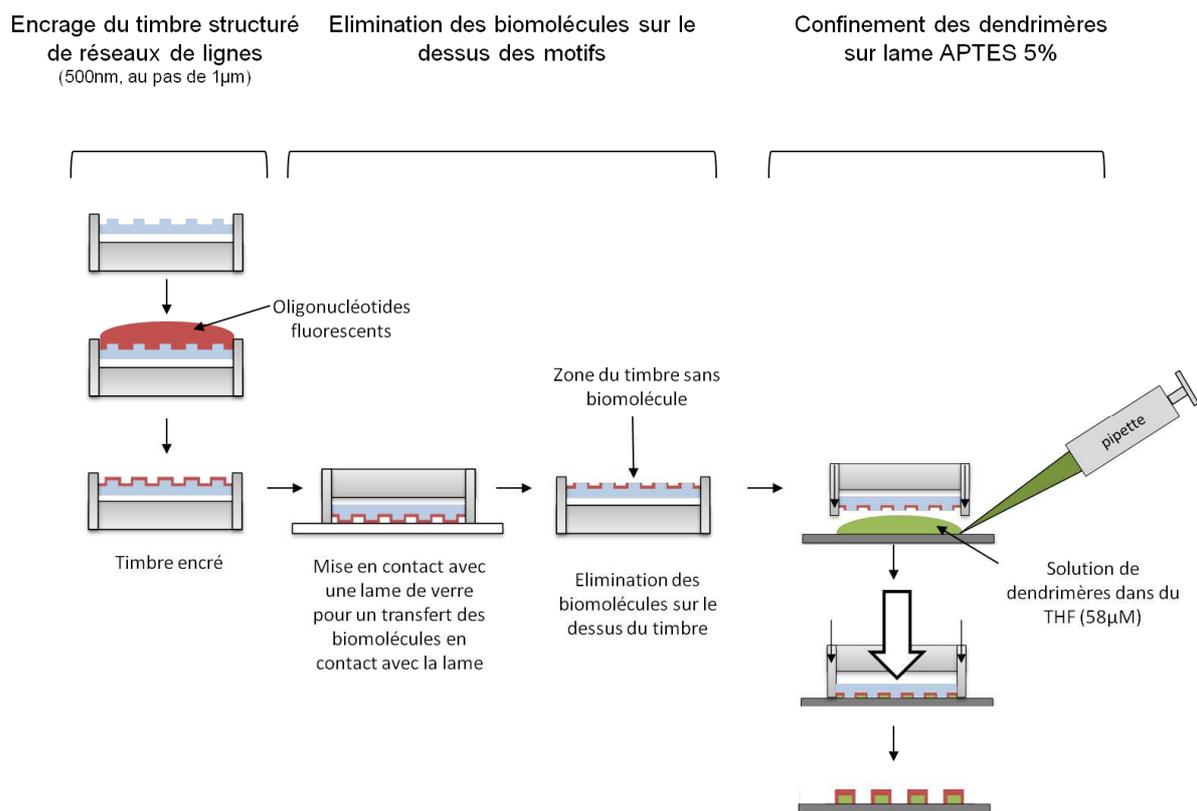


Figure 104 : Schéma représentant le procédé « tout en un » permettant de nanostructurer les dendrimères et d'adresser les oligonucléotides sondes en même temps.

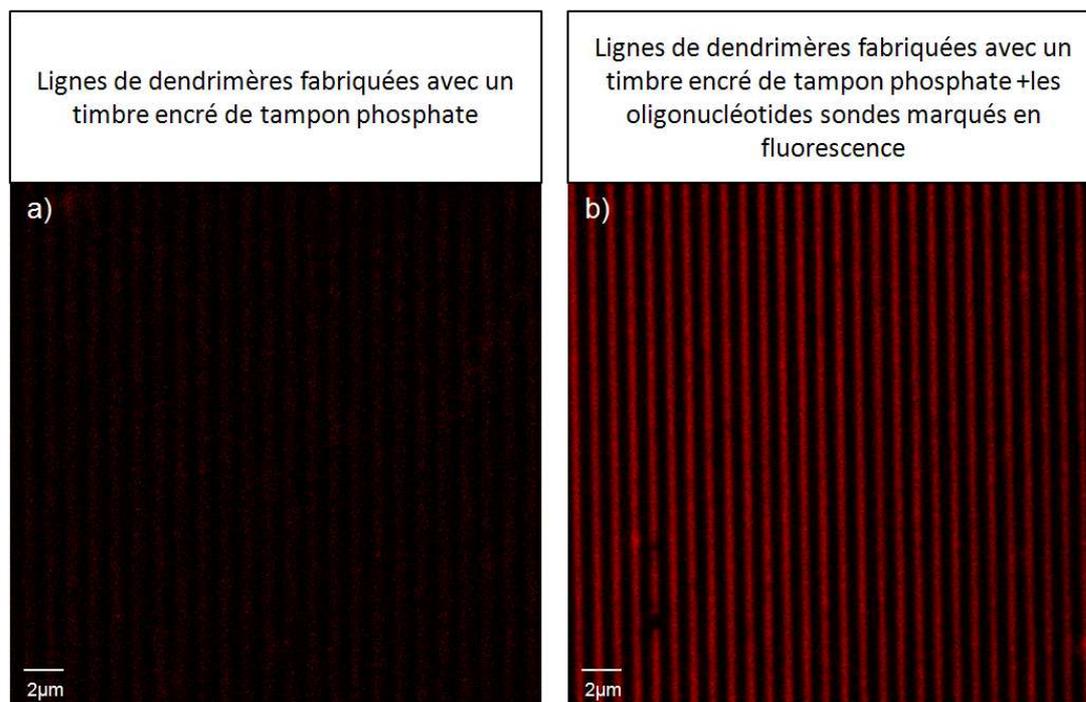


Figure 105 : Images en fluorescence a) des lignes de dendrimères réalisées avec un timbre en PDMS nanostructuré de réseaux de lignes encrés de tampon phosphate (0,3 M, pH 9), b) de lignes d'oligonucléotides fluorescents adressés sur des lignes de dendrimères réalisées avec un timbre en PDMS nanostructuré de réseaux de lignes encrés d'une solution d'oligonucléotides sondes marqués en fluorescence (5'-[NH₂]-TAT-ACT-CCG-GGA-AAC-TGA-CAT-CTA-G-[Cy5]-3') utilisés à 5 μM dans du tampon phosphate 0,3 M, pH 9. Le procédé a été réalisé selon les conditions suivantes : encrage des timbres pendant 1 min, séchage pendant 30 s, confinement d'une solution de dendrimères à 58 μM dans du THF pendant 5 min. Les images ont été réalisées avec un microscope LSM 510 NLO Zeiss, Laser λ : 633 nm, objectif : x 40 à immersion

La Figure 105a) montre l'absence de fluorescence sur les lignes de dendrimères obtenues par le procédé « tout en un » avec un timbre non encré avec l'oligonucléotide marqué. Alors que la Figure 105b) montre que lorsque le timbre est encré de sondes fluorescentes l'adressage de ces dernières s'effectue sur les lignes de dendrimères pendant le procédé « tout en un ». Pendant le procédé « tout en un », les oligonucléotides sont donc transférés du timbre en PDMS vers les dendrimères constituant les lignes du réseau. De surcroît, le fort contraste entre les intensités de fluorescence entre et sur les lignes laisse à penser que la présence d'oligonucléotides entre les lignes de dendrimères est limitée.

En conclusion, le procédé de co-fonctionnalisation de surface « tout en un » permet de réaliser des réseaux de lignes de dendrimères et d'adresser des oligonucléotides sur ces dendrimères en une seule étape. La rapidité de production de ces réseaux est un atout considérable dans la conception de biopuces à ADN sans marquage. Néanmoins, pour envisager la production de biopuces à ADN par ce procédé « tout en un », l'adressage des oligonucléotides doit être multiplexé. Ce point est traité dans la section suivante.

E. Fabrication multiplexée des réseaux de lignes de dendrimères fonctionnalisés

Dans le but de multiplexer le procédé « tout en un » nous avons choisi de combiner les travaux réalisés dans le chapitre 2 sur le dépôt multiplexé d'oligonucléotides avec un macrotimbre et le procédé « tout en un ». Pour cela, nous avons choisi d'utiliser un macrotimbre constitué d'une semelle en PDMS contenant de la poudre de fer (50% en masse) et une série de piliers, chacun des piliers étant nanostructuré d'un réseau de lignes de 500 nm au pas de 1 μm (Figure 106).

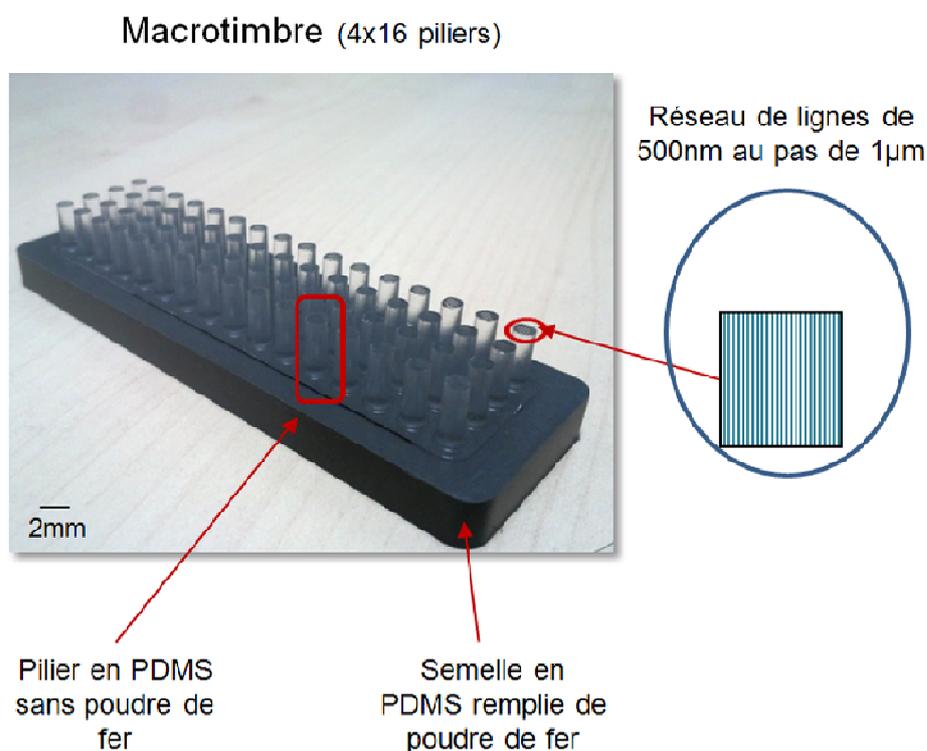


Figure 106 : Photo représentant un macrotimbre dont les piliers sont nanostructurés avec des réseaux de lignes de 500 nm au pas de 1 μm .

Le macrotimbre a été encre dans une plaque à puits (384 puits) avec des oligonucléotides sondes, puis après séchage sous un flux d'azote, il a été utilisé pour la réalisation du procédé « tout en un ». Chaque pilier du macrotimbre permet de réaliser un réseau de lignes de dendrimères « fonctionnalisés » d'oligonucléotides en une seule étape comme décrit dans le schéma de la Figure 107.

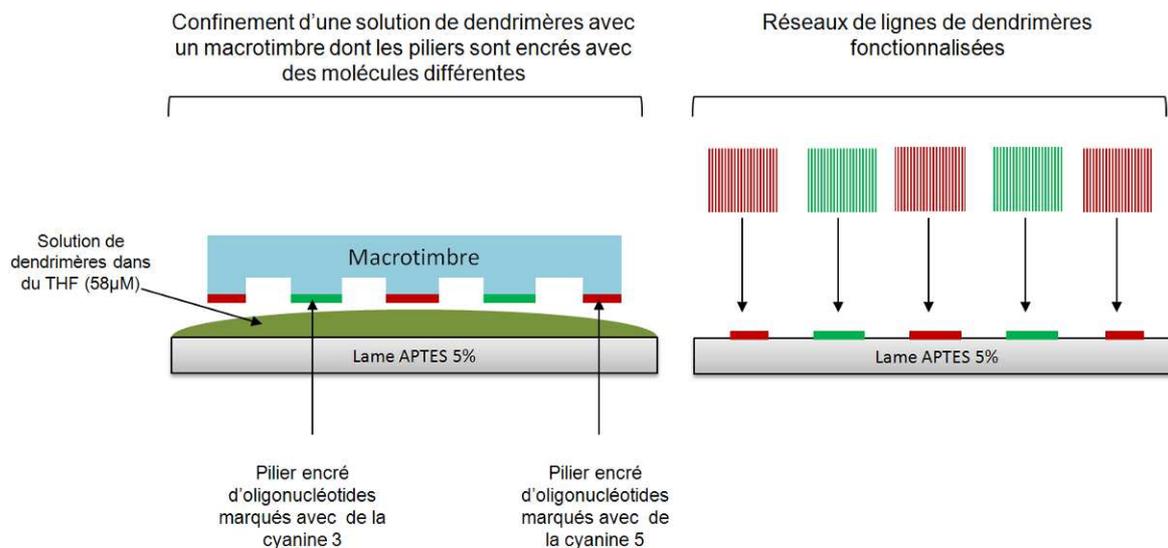


Figure 107 : Schéma représentant le procédé du « tout en un » avec un macrotimbre dont chaque pilier est encre d'une molécule différente dans une plaque à puits.

La Figure 108 présente les résultats de l'adressage des oligonucléotides fluorescents (Cy3 ou Cy5) et l'arrangement périodique des réseaux réalisés avec un macrotimbre par le procédé « tout en un ».

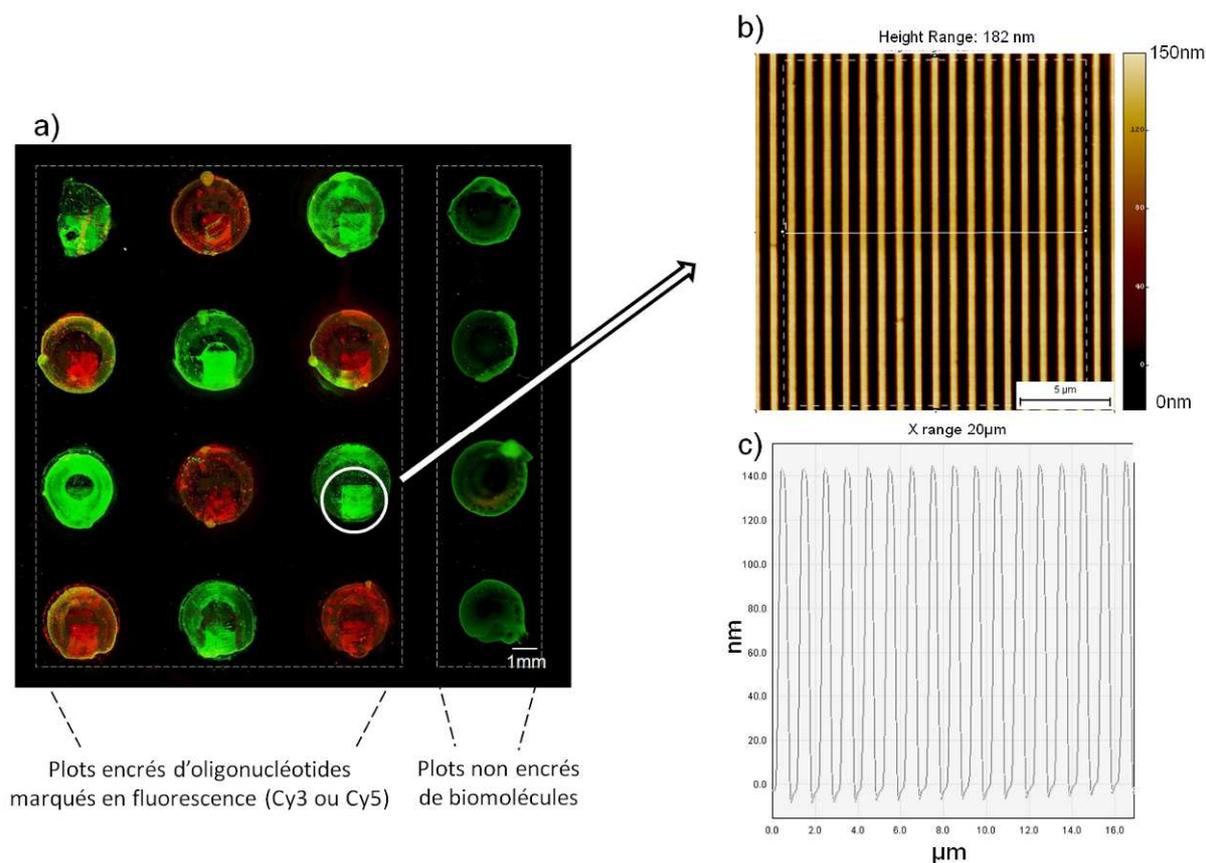


Figure 108 : a) Images en fluorescence du résultat du procédé « tout en un » réalisé avec un macrotimbre dont les piliers ont été encrés ou non avec des oligonucléotides marqués avec de la cyanine 5 ou 3 b) image obtenue par microscopie à force atomique des lignes de dendrimères fabriquées par le procédé « tout en un » avec le macrotimbre, c) coupe moyenne des hauteurs des lignes de dendrimères associée à l'image AFM. Les oligonucléotides marqués (5'-[NH₂]-TAT-ACT-CCG-GGA-AAC-TGA-CAT-CTA-G-[Cy5 ou Cy3]-3') ont été utilisés à 5 μM dans du tampon phosphate 0,3 M, pH 9. Les images AFM ont été obtenues avec un AFM Bruker catalyst (Mode Scan Asyst_Air_fo : 50-90 kHz k : 0,4 N/m). Les images en fluorescence ont été réalisées avec un scanner de fluorescence (Innoscan 900) selon les conditions suivantes : PMT λ : 532 nm et λ : 635 nm : 50%, balance 50, contraste 30, lumière 20.

La Figure 108a) montre une série de dépôts de molécules marquées Cyanine 3 (en vert) et Cyanine 5 (en rouge). Chaque carré fluorescent au sein des dépôts représente un réseau de lignes de dendrimères composées d'oligonucléotides marqués, structuré par un des piliers du macrotimbre. Les Figure 108b) et c) valident la présence de lignes constituant les réseaux formés de dendrimères. Pour les plots non encrés avec des biomolécules, on distingue une « auréole » verte liée à l'auto fluorescence des dendrimères confinés sur le support mais aucun réseau fluorescent n'est présent à l'intérieur. Il est aussi intéressant de noter que la présence de motifs périodique au bout des piliers peut avoir un impact sur l'encrage.

En conclusion, le procédé « tout en un » est multiplexable grâce à l'utilisation d'un macrotimbre. Chaque pilier nanostructuré d'un réseau de lignes et encré d'une biomolécule permet de réaliser des réseaux de lignes de dendrimères et d'adresser les biomolécules sur ces lignes en une seule étape. Ainsi le macrotimbre associé au procédé « tout en un » permet de créer une série de réseaux, chacun fonctionnalisé avec une molécule différente. Ces travaux ouvrent la voie au possible multiplexage de la détection par diffraction.

F. Conclusion

Cette partie a été entièrement consacrée à l'étape de conception de la biopuce diffractante (la diffrapuce) en vue d'une biodétection sans marquage. Les problématiques initiales ainsi que les résultats et interprétations à retenir sont listés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 12 : Objectifs du projet initialement fixés et points clés identifiés

Questions méthodologiques	Résultats et interprétations
Stratégie N°1 : Réalisation des réseaux d'oligonucléotides sondes.	
- Choix de la chimie de surface compatible avec la fabrication de biopuces à ADN.	La chimie de surface peut gêner la lecture des signaux de diffractions de faibles intensités.
- Adressage des sondes oligonucléotidiques selon des réseaux diffractants de lignes sur lame de verre époxy-silane par microcontact printing et validation de la détection par le scanner de diffraction	L'adressage des sondes oligonucléotidiques selon des réseaux diffractants de lignes par microcontact printing est efficace.
- Détection des signaux de diffraction	Le signal de diffraction émis par les réseaux fabriqués par μ CP est détectable avec le scanner de diffraction et la taille des acides nucléiques a un effet sur l'intensité des signaux collectés.
- Vérification de l'intégrité des réseaux de lignes après les étapes nécessaires à l'hybridation d'une biopuce (lavage, séchage) pour la détection du signal final de diffraction	Manque de robustesse des lignes des réseaux d'oligonucléotides pour résister aux étapes de l'hybridation. Impossible de mesurer un signal de diffraction après ces étapes => Verrou technologique dans la fabrication des réseaux
Stratégie N°2 : Réalisation des réseaux d'oligonucléotides sondes par nanostructuration de la surface avec la chimie de surface et adressage des oligonucléotides.	
- Réalisation de réseaux de lignes sub-micrométriques formées de dendrimères	Nous avons développé un procédé innovant appelé « confinement » pour la nanostructuration de surface.
- Adressage des oligonucléotides pour l'obtention	L'adressage des oligonucléotides peut être réalisé

de réseaux de lignes d'oligonucléotides.	par incubation ou par microcontact printing avec un timbre sans motif. Dans les deux cas nous avons montré que la présence d'oligonucléotides était limitée entre les lignes des réseaux.
-Vérification de l'intégrité des réseaux de lignes après les étapes nécessaires à l'hybridation d'une biopuce (lavage, séchage) pour la détection du signal final de diffraction	La nanostructuration de surface avec des dendrimères n'est pas détruite par les étapes nécessaires à l'hybridation. De plus cette chimie de surface permet de lier les oligonucléotides sur les réseaux de lignes de dendrimères par liaison covalente. Ceci permet l'obtention de réseaux d'oligonucléotides robustes.
Stratégie N°3 :	
Réalisation des réseaux d'oligonucléotides sondes par le procédé « tout en un ».	
Réalisation des réseaux d'oligonucléotides sondes	Le procédé « tout en un » permet de réaliser en une seule étape les réseaux de lignes de dendrimères fonctionnalisées avec des oligonucléotides.
Réalisation des réseaux d'oligonucléotides sondes multiplexés	Le macrotimbre initialement dédié au dépôt multiplexé d'oligonucléotides est adapté à la production multiplexée de réseaux de lignes d'oligonucléotides sondes.

L'ensemble de ces travaux a permis de réaliser des réseaux d'oligonucléotides en vue d'une biodétection sans marquage. Le choix de structurer la lame avec la chimie de surface pour y adresser les oligonucléotides s'avère le plus adapté à notre application. Le procédé « tout en un » couplé à l'utilisation du macrotimbre permet d'envisager pour la première fois la production de biopuces à ADN sans marquage, multiplexé et à bas coût. De plus, nos travaux de réplique de moule par nano-impression dans du polyuréthane contribuent à limiter le coût de ce procédé.

Néanmoins, peut-on identifier une hybridation sur ces réseaux d'oligonucléotides par la méthode de détection sans marquage basée sur la diffraction optique de la lumière ? Cette question est abordée dans le chapitre prochain.

Chapitre 4 : Intégration des techniques d'adressage et de structuration de surface pour la biodétection sans marquage



* Culture de *Legionella pneumophila*.

Les biopuces à ADN permettent en une seule analyse et en parallèle la détection de multiples entités biologiques d'un échantillon. La complémentarité entre les chaînes oligonucléotidiques de l'ADN constitue leur principe de base. Les oligonucléotides sondes sont sélectionnés pour leur spécificité et sensibilité aux séquences des acides nucléiques cibles à détecter. Dans le cas de la biopuce diffractante appelée diffrapuce, le principe biologique est le même, seule la détection de l'hybridation est différente. Contrairement aux biopuces à fluorescence, le principe de lecture sans marquage est basé sur la diffraction optique de la lumière.

Cette biopuce à ADN est constituée d'un ensemble de réseaux de lignes d'oligonucléotides sondes capables de diffracter une source lumineuse incidente en fonction de leur arrangement périodique et de l'indice de réfraction des matériaux qui les composent. Les travaux de thèse de Jean Christophe Cau,²²⁸ ont montré que l'interaction entre molécules cibles et molécules sondes constituant les lignes d'un réseau peut modifier l'intensité de lumière diffracté. Ainsi, la détection est réalisée par l'étude des signaux de diffraction des réseaux avant et après interaction. Ce principe de biodétection breveté²²⁹ permet d'identifier sans marquage préalable des cibles dans un échantillon à tester.

La diffraction d'un réseau de N fentes conduit à deux phénomènes superposés : l'interférence des ondes provenant d'une même fente, appelée diffraction et l'interférence des ondes émises par les diverses fentes considérées comme des sources ponctuelles (62 E.3 de l'introduction bibliographique). L'intensité de diffraction collectée à l'ordre 1 varie si l'épaisseur des lignes du réseau varie (variations du terme de l'interférence) et/ ou si la largeur des lignes varie (variations du terme de la diffraction) mais également si l'indice de réfraction des lignes augmente.

Ce chapitre est consacré à l'intégration des procédés d'adressage et la nanostructuration de surface développés dans le chapitre 3 dans le but de valider expérimentalement la détection d'une hybridation ADN-ADN par diffrapuce. Dans un premier temps, seront décrites les principales étapes de la biodétection sans marquage par diffrapuce ainsi que l'impact potentiel de l'hybridation cibles-sondes sur les signaux de diffraction. Dans un second temps, les procédés de nanostructuration de réseaux de lignes d'oligonucléotides sondes seront validés pour la détection d'une hybridation entre deux acides nucléiques de même taille et parfaitement complémentaires. Enfin, ayant validé ce concept sur un cas « d'école » d'hybridation, nous chercherons à transposer les travaux réalisés sur une biopuce à ADN dédiée à la détection de bactéries environnementales par fluorescence, à la détection par diffrapuce.

²²⁸ J.C. Cau, Thèse INSA, Toulouse, 2009

²²⁹ Procédé de recherche d'au moins un analyte dans un milieu susceptible de le contenir
WO 2010029139, du 18 mars 2010

A. Principe de la biodétection sans marquage basé sur la diffraction optique de réseaux moléculaires

Les grandes étapes de conception d'une diffrapuce sont décrites dans la Figure 109.

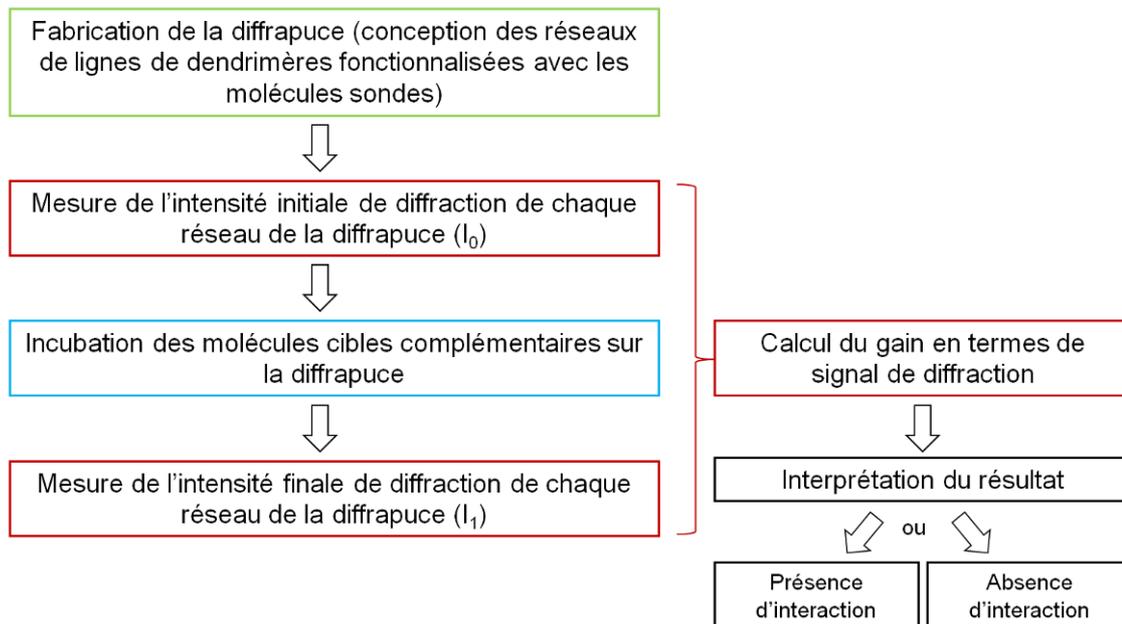


Figure 109 : Récapitulatif des étapes de la conception à l'interprétation du résultat de la diffrapuce.

1. La fabrication de la diffrapuce (vert) : c'est l'ensemble des procédés conduisant à la production des réseaux de molécules sondes ;
2. L'utilisation de la diffrapuce (bleu) : cette partie regroupe l'étape d'incubation des molécules cibles de l'échantillon à tester sur la diffrapuce ainsi que les étapes de lavage nécessaires à l'élimination des molécules n'ayant pas interagi avec les réseaux de molécules sondes sur la biopuce ;
3. Lecture des signaux de diffraction à l'ordre 1 et calcul du gain (rouge) : contrairement aux biopuces à fluorescence où le signal est mesuré après l'hybridation, le signal de diffraction est collecté pour chacun des réseaux, avant et après l'étape d'incubation des molécules cibles à détecter. Toute modification de l'arrangement périodique des réseaux notamment l'augmentation de la hauteur des lignes du réseau liée aux interactions des molécules cibles sur les réseaux de molécules sondes entraîneront des variations dans l'intensité du signal diffracté. Ces variations seront ensuite quantifiées grâce au calcul du gain selon la formule suivante :

$$\text{Gain (en \%)} = \frac{I_1 - I_0}{I_0} \times 100$$

Avec I_1 = l'intensité de diffraction à l'ordre 1 d'un réseau mesurée après interaction avec les molécules cibles moins le bruit de fond autour du réseau et I_0 = l'intensité de diffraction à l'ordre 1 d'un réseau mesurée avant interaction avec les molécules cibles moins le bruit de fond autour du réseau (le calcul des intensités est décrit dans la section D.2 du Matériel et Méthodes).

4. Interprétation des résultats : *In fine*, chacun des réseaux possède un gain de diffraction (%) représentant la variation des signaux de diffraction du réseau avant et après l'étape d'incubation des molécules cibles. Les variations de hauteur, de largeur ou de l'indice de réfraction des lignes vont modifier l'intensité de diffraction émise par réseau ce qui se traduit par un gain positif, négatif ou nul. Les travaux de J.C. Cau²³⁰ ont montré que plus la hauteur de lignes augmente plus le gain est positif. En revanche si l'élargissement des lignes est trop important, le gain peut être diminué (si les creux entre les lignes sont remplis de molécules cibles). Dans le cas d'une hybridation d'oligonucléotides, on peut considérer que l'hybridation des molécules cibles résulte de l'accrochage des molécules cibles sur le dessus des lignes de molécules sondes et qu'elle ne modifie pas significativement la largeur des lignes. Nous reviendrons plus en détails sur ce point dans ce chapitre. D'un point de vue théorique, s'il y a hybridation sondes-cibles alors la hauteur des lignes augmente et donc l'intensité diffractée par le réseau augmente ($I_1 > I_0$). Le gain sera alors positif. Dans le cas où il n'y a pas d'hybridation il n'y aura pas de variation de la hauteur des lignes du réseau et les intensités diffractées par le réseau avant et après hybridation seront équivalentes. Le gain sera alors nul.

A.1. Résultats des simulations théoriques de l'impact d'une hybridation sur le signal de diffraction d'un réseau

L'hybridation ne peut pas être considérée uniquement par la présence ou absence de cibles sans tenir compte des hybridations non spécifiques. Pour cela, la Figure 110 illustre différents cas possibles d'hybridation ainsi que leur impact sur les signaux de diffraction lorsque les oligonucléotides sondes sont adressés uniquement sur le dessus des lignes du réseau. L'impact des hybridations sur les signaux de diffraction est adapté des travaux de simulations de J.C. Cau.²³¹

²³⁰ J.C. Cau, Thèse INSA, Toulouse, 2009

²³¹ J.C. Cau, Thèse INSA, Toulouse, 2009

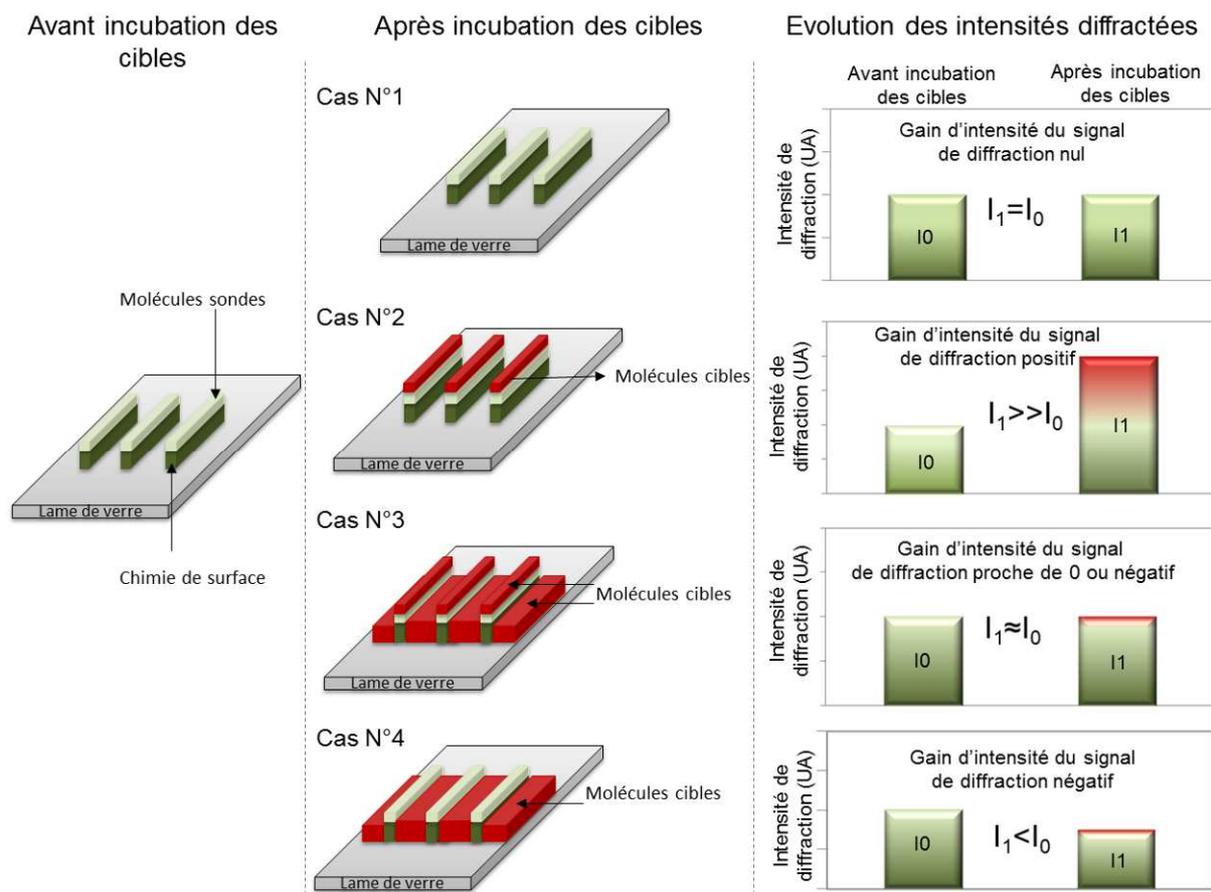


Figure 110 : Schéma représentant 4 cas possibles d'hybridation de cibles sur un réseau de lignes formées de chimie de surface et de molécules sondes adressées sur le dessus des lignes. Avant incubation des cibles, les lignes du réseau diffractant sont composées de la chimie de surface (vert foncé) et des molécules sondes (vert clair). Après incubation des cibles, ces dernières sont matérialisées en rouge.

Le cas N°1 représente l'absence d'hybridation après incubation des molécules cibles. La hauteur et la largeur des lignes du réseau ne sont pas modifiées, conduisant à aucune modification de la « géométrie » du réseau. Les intensités de diffraction finales (I_1) et initiales (I_0) du réseau sont équivalentes. Le gain de diffraction obtenu est nul.

Le cas N°2 illustre l'hybridation spécifique de cibles sur le dessus des lignes constituées de molécules sondes conduisant à l'ajout d'une « couche ». Cet événement peut se produire si les molécules sondes sont adressées sur le dessus des lignes et en absence d'interaction non spécifique entre les lignes. Cette configuration représente l'hybridation entre des acides nucléiques cibles d'une taille supérieure à celle des sondes (c'est-à-dire une séquence d'oligonucléotides plus grande). Dans ce cas, la hauteur des lignes du réseau est augmentée conduisant à une intensité de diffraction finale (I_1) supérieure à l'intensité initiale (I_0). Le gain obtenu est alors positif.

Le cas N°3 représente l'hybridation spécifique des molécules cibles sur des lignes constituées de molécules sondes et la présence d'interactions non spécifiques entre les lignes du réseau. L'intensité de diffraction du réseau collectée avant hybridation (I_0) est équivalente à celle collectée après hybridation (I_1) car la profondeur des motifs (hauteur effective des

lignes) reste inchangée. Le gain en intensité du signal de diffraction résultant est proche de 0. Notons que, si l'interaction non spécifique entre les lignes du réseau est supérieure en termes de hauteur à l'hybridation spécifique sur les lignes alors le gain sera négatif. Cette configuration ne permet pas de détecter une hybridation par l'étude des signaux de diffraction avant et après incubation des acides nucléiques cibles.

D'un point de vue expérimental, deux conditions peuvent aboutir à ce type d'interaction entre les lignes du réseau :

1. La présence de molécules sondes entre les lignes du réseau conduisant à une hybridation spécifique sondes-cibles entre les lignes;
2. L'adsorption non spécifique des cibles entre les lignes directement sur le support (interaction non spécifique cible-support). L'efficacité des lavages de la diffrapuce après hybridation sera primordiale pour éliminer au maximum cet événement d'adsorption non spécifique.

Enfin, le cas N°4 illustre la présence d'interaction non spécifique uniquement entre les lignes du réseau. L'intensité de diffraction du réseau collectée après hybridation (I_1) est inférieure à celle collectée avant hybridation (I_0) car la hauteur des lignes est diminuée. Le gain obtenu est négatif. Cette configuration peut être assimilée à l'incubation de cibles non spécifiques aux sondes constituant le réseau et interagissant entre les lignes directement avec la surface.

Les procédés de conception des réseaux d'oligonucléotides sondes mis au point dans le chapitre 2 conduisent dans certains cas à l'adressage d'oligonucléotides sondes sur le dessus et les côtés des lignes. Dans ce cas il est nécessaire de prendre en compte la hauteur mais également la largeur des lignes du réseau après l'incubation des ADN cibles comme décrit dans la Figure 111.

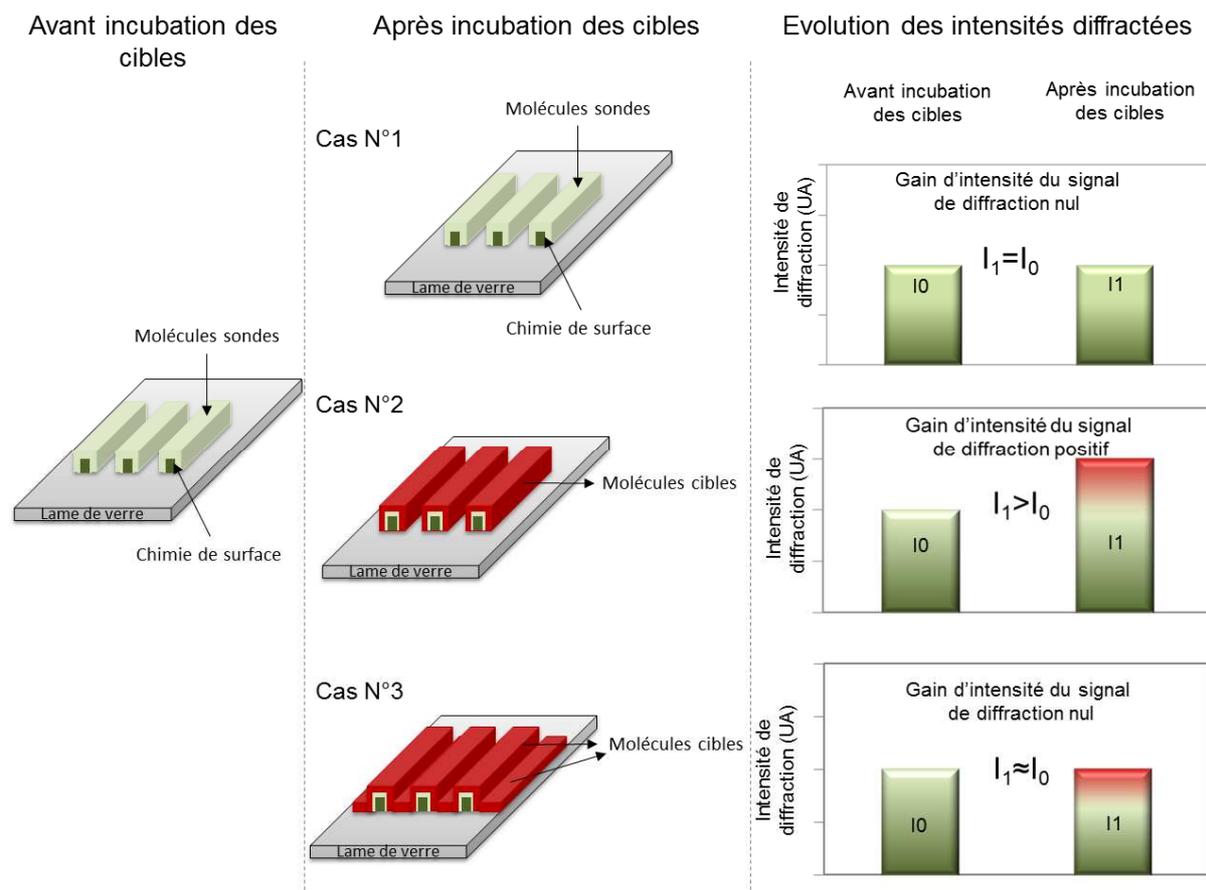


Figure 111 : Schéma représentant 3 cas possibles d'hybridation de cibles sur un réseau de lignes formées de chimie de surface et de molécules sondes adressées sur le dessus et les côtés des lignes. Avant incubation des cibles, les lignes du réseau diffractant sont composées de la chimie de surface (vert foncé) et des molécules sondes (vert clair). Après incubation des cibles, ces dernières sont matérialisées en rouge.

Dans le cas de l'absence d'hybridation (cas N°1), après incubation des cibles l'arrangement périodique du réseau est inchangé. Les intensités de diffraction avant et après l'incubation sont équivalentes, ce qui conduit à l'obtention d'un gain nul. Le cas N°2 représente l'hybridation spécifique des acides nucléiques cibles sur les côtés et le dessus des lignes constituées d'oligonucléotides sondes sans interaction non spécifique entre les lignes du réseau. L'hybridation entraîne une augmentation de la hauteur des lignes mais également leur élargissement. Les travaux de JC Cau²³² ont montré que, lorsque le rapport entre la largeur de la ligne et le pas est proche de 0.5, l'élargissement des lignes n'a pas d'impact sur le gain. Il sera donc positif. Si au contraire ce rapport augmente fortement, le gain chute et peut devenir négatif car l'élargissement des lignes change le pas entre les lignes et modifie fortement l'angle avec lequel la lumière est diffractée. Dans le cadre de la détection d'une hybridation ADN-ADN on peut considérer que la taille des sondes et des cibles (de plusieurs dizaines de bases à quelques centaines) ne modifiera pas significativement le pas entre les lignes initialement de 1µm. Le rapport entre la largeur de la ligne et le pas restera proche de 0.5.

²³² J.C. Cau, Thèse INSA, Toulouse, 2009

Enfin, le dernier cas N°3 représente l'hybridation spécifique des ADN cibles sur les côtés et dessus des lignes ainsi que la présence d'interactions non spécifiques entre les lignes. Les résultats de diffraction sont équivalents à ceux obtenus pour le cas N°3 de la Figure 110. Les intensités de diffraction du réseau collectées avant hybridation (I_0) et après hybridation (I_1) sont similaires car la profondeur des motifs (hauteur effective des lignes) reste inchangée. Le gain en intensité du signal de diffraction en résultant est proche de 0. Cette configuration ne permet pas la détection d'une hybridation par l'étude des signaux de diffraction avant et après incubation des acides nucléiques cibles.

En conclusion, il est essentiel que l'hybridation des molécules cibles soit réalisée préférentiellement sur le dessus et les côtés des lignes du réseau. L'intensité diffractée d'un réseau étant sensible aux variations de hauteur des lignes qui le composent, toute absorption non spécifique modifiant cette hauteur change l'intensité diffractée. Ainsi, quel que soit l'arrangement des molécules sondes sur les lignes du réseau de la diffrapuce (sur les côtés et ou le dessus des lignes), il est important de limiter les interactions non spécifiques des acides nucléiques cibles entre les lignes du réseau. Pour cela, il est nécessaire de contrôler au mieux l'adressage des molécules sondes sur les lignes de dendrimères ainsi que l'efficacité des lavages de la puce après hybridation afin d'éliminer la majorité des interactions non spécifiques entre les lignes du réseau (cibles-surfaces). Dans le cas contraire, la détection d'une hybridation spécifique sondes-cibles par diffrapuce est impossible.

B. Simulation de réponse d'une hybridation se rapprochant de la réalité expérimentale et stratégie de validation de la détection

Dans le cas de la détection d'une hybridation ADN-ADN, l'acide nucléique cible peut avoir une taille (en termes de nombre de bases) soit équivalente à celle de la sonde soit supérieure (Figure 112). En fonction de cette configuration, les résultats attendus en diffraction seront différents.

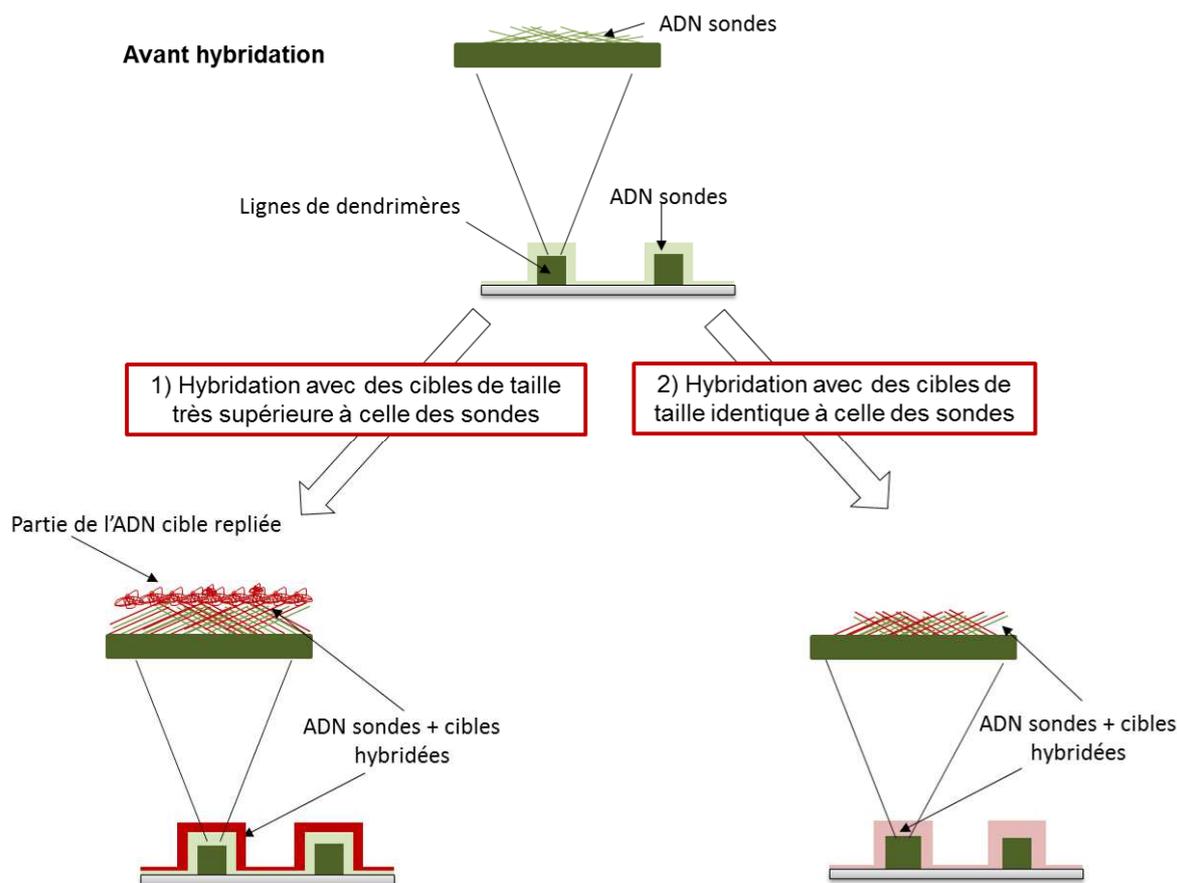


Figure 112 : Représentation schématique de l'hybridation ADN-ADN se rapprochant de la réalité expérimentale. 1) Hybridation avec des cibles de taille très supérieure à celle des sondes, 2) Hybridation avec des cibles de taille identique à celle des sondes.

- 1) Dans le cas de l'hybridation entre un oligonucléotide sonde de quelques dizaines de bases et un acide nucléique de type PCR de plusieurs centaines de bases, nous considérons que l'hybridation des cibles peut être assimilée à « l'ajout d'une couche » de molécules (Figure 112.1). Nous partons du postulat que la partie de la séquence oligonucléotidique de la cible qui n'est pas complémentaire à la sonde se replie et conduit à une augmentation de la hauteur des lignes après hybridation. Ce type d'hybridation se rapproche d'un cas réel de biodétection par biopuce à ADN et il peut être assimilé aux résultats de simulation de la partie A.1 de ce chapitre (Figure 110 et Figure 111).
- 2) L'hybridation entre deux oligonucléotides sondes et cibles de même taille et parfaitement complémentaires (même nombre de bases) ne peut pas être considérée comme « l'ajout d'une couche » de molécules comme schématisé dans la Figure 112.2). En revanche, l'hybridation densifie la couche d'acides nucléiques sondes à la surface des lignes entraînant potentiellement de faibles variations de hauteur des lignes. Mais, cette densification contribue à augmenter l'indice optique effectif de la couche supérieure des lignes après hybridation. Ce cas n'est pas décrit dans les

résultats des travaux de simulation présentés dans la partie A.1 de ce chapitre néanmoins, J.C. Cau²³³ a décrit dans ces travaux de thèse l'impact de l'augmentation de l'indice de réfraction des lignes sur le gain en fonction de l'épaisseur de chimie de surface.

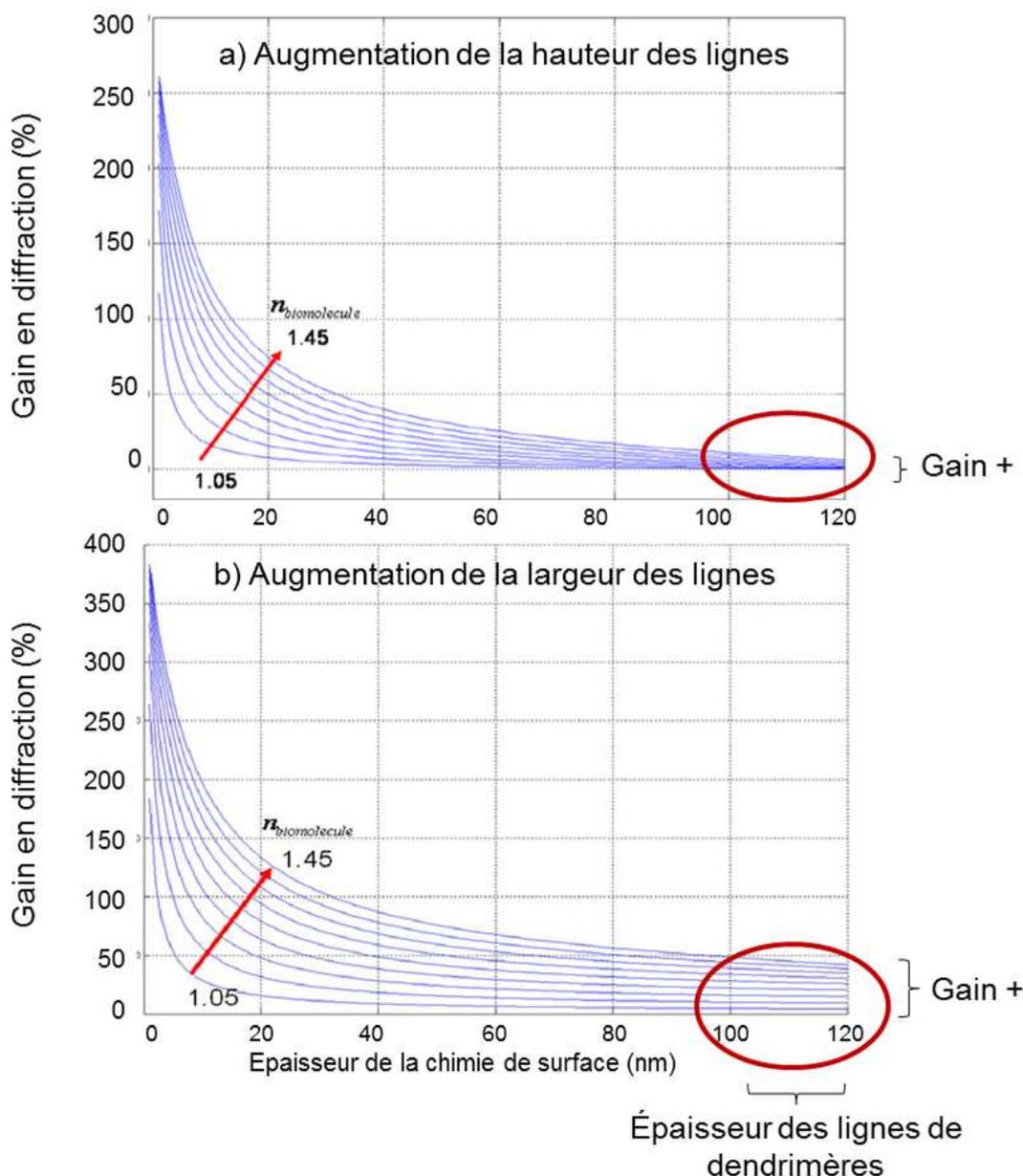


Figure 113 : Variations du gain de diffraction en fonction de l'épaisseur de dendrimères et de l'indices de réfraction des molécules impliquées dans l'interaction biologique a) dans le cadre d'une augmentation de la hauteur des lignes et b) dans le cadre d'un élargissement des lignes (Figures adaptées des travaux de J.C. Cau, 2009).

La Figure 113a montre que pour des lignes de chimie de surface (dendrimères dans notre cas) comprises entre 100 et 120nm, si l'indice de réfraction (η) de la couche d'oligonucléotides augmente après l'hybridation alors le gain en diffraction sera positif. Ce

²³³ J.C. Cau, Thèse INSA, Toulouse, 2009

gain augmente d'autant plus dans le cas où l'augmentation de l'indice de réfraction est associée à un élargissement des lignes (Figure 113b).

En conclusion, l'indice optique des lignes augmenté par l'hybridation des cibles conduira à l'obtention d'un gain positif en diffraction. De plus, le gain sera plus grand pour une hybridation sur le dessus et les côtés des lignes que pour une hybridation uniquement sur le dessus des lignes. Ces résultats de simulation prévoient que la détection par diffraction d'une hybridation entre deux oligonucléotides de même taille est possible.

Les procédés de structuration de surface et d'adressage des oligonucléotides décrits dans le chapitre 3 ont permis la fabrication de réseaux de lignes constituées de sondes pour la détection par diffrapuce. En fonction de la technique d'adressage utilisée, les molécules sondes sont adressées préférentiellement sur le dessus des lignes ou sur le dessus et côtés des lignes (Figure 114).

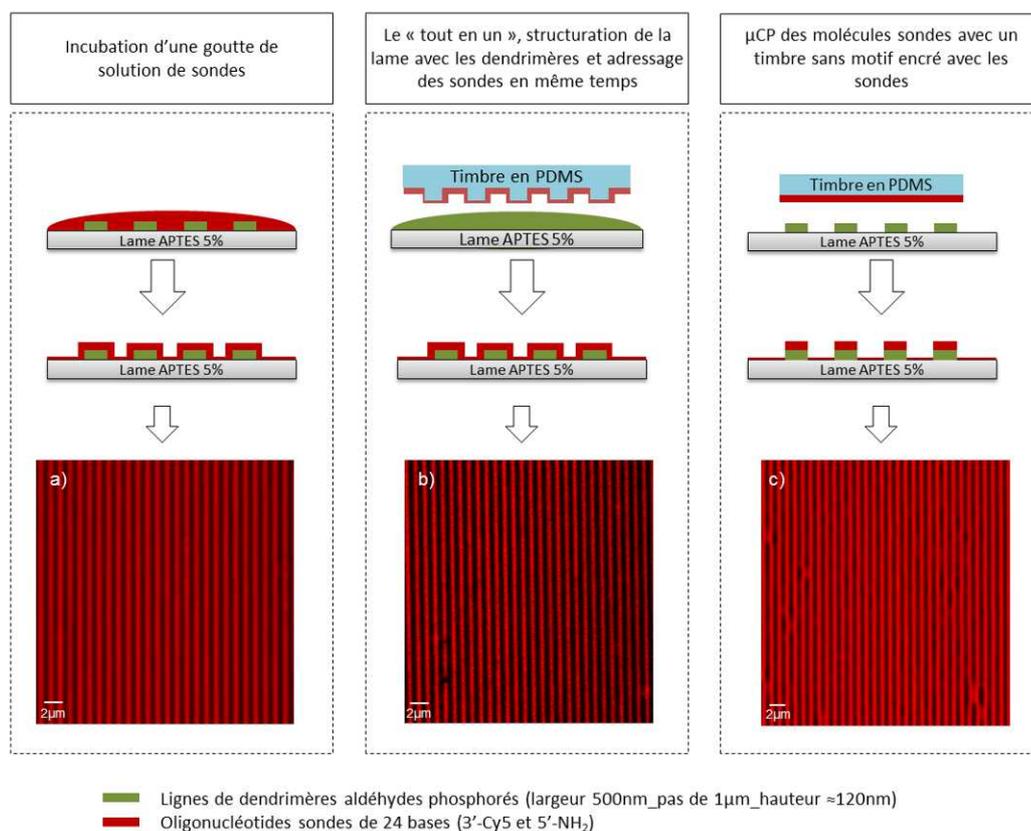


Figure 114 : Récapitulatif des techniques d'adressage des oligonucléotides sondes sur les réseaux de lignes de dendrimères ; a), b) et c) images obtenues par microscopie à fluorescence des lignes d'oligonucléotides sondes marqués en fluorescence. L'oligonucléotide (5'-[NH₂]-TAT-ACT-CCG-GGA-AAC-TGA-CAT-CTA-G-[Cy5]-3') a été utilisé à 5 µM dans du tampon phosphate 0,3M, pH 9. Les images ont été obtenues au microscope LSM 510 NLO Zeiss, Laser λ : 633 nm, objectif : x 40 à immersion.

Dans le chapitre précédent, nous avons montré que la présence des oligonucléotides sondes était limitée entre les lignes des réseaux. Néanmoins, il est réducteur de conclure sur une absence totale de sondes entre les lignes. Ainsi, nous considérerons la présence d'une fine

couche d'oligonucléotides sondes entre les lignes. La Figure 115 décrit l'impact de cette couche sur les signaux de diffraction après l'hybridation.

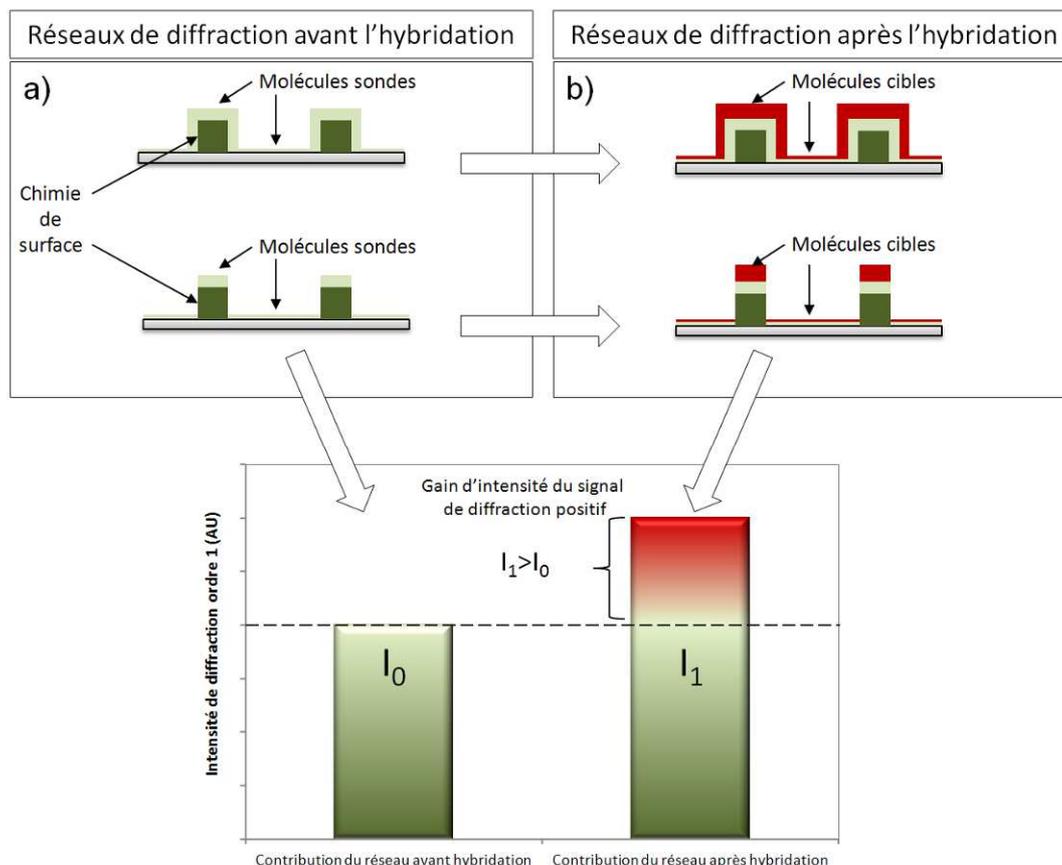


Figure 115 : Schéma représentant une hybridation spécifique proche de la réalité expérimentale : a) avant hybridation, les lignes du réseau diffractant sont composées de la chimie de surface (vert foncé) et des oligonucléotides sondes (vert clair), b) après hybridation, l'accrochage des oligonucléotides cibles (rouge) se fait spécifiquement sur les lignes de sondes. Notons également un faible accrochage des cibles entre les lignes, difficile à éliminer totalement.

Après l'hybridation, les oligonucléotides cibles sont fixés préférentiellement sur le dessus et les côtés des lignes en fonction de la technique d'adressage des sondes. Nous considérons que la quantité de cibles fixées sur les lignes est très supérieure à celle fixée entre les lignes. Ainsi la hauteur des lignes du réseau et leur indice de réfraction sont augmentés. L'intensité de diffraction finale I_1 est alors supérieure à l'intensité initiale I_0 conduisant à l'obtention d'un gain positif en diffraction. Notons que plus l'accrochage des molécules cibles entre les lignes du réseau est faible, plus la hauteur sera augmentée et plus le gain sera grand.

La suite de ce chapitre se focalise sur la validation expérimentale de la détection d'une hybridation ADN-ADN par diffrapuce. Les conditions expérimentales testées ainsi que les résultats attendus sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 13 : Résultats attendus en termes de fluorescence et diffraction pour valider la détection par diffrapuce.

	Événements biologiques testés	Résultats en fluorescence	Différence entre I_0 et I_1	Gains du signal de diffraction
Contrôle positif	<u>Hybridation spécifique</u> (incubation du tampon d'hybridation avec la cible complémentaire sur les réseaux composés d'oligonucléotides sondes)	Présence de fluorescence	$I_0 < I_1$	Gain positif
Contrôle négatif	<u>Absence d'hybridation</u> (incubation du tampon d'hybridation seul)	Absence de fluorescence	$I_0 \approx I_1$ ou $I_0 > I_1$	Gain proche de zéro ou négatif
Contrôle négatif	<u>Interaction non complémentaire</u> (incubation du tampon d'hybridation avec une cible non complémentaire)	Absence de fluorescence	$I_0 > I_1$	Gain négatif
Contrôle négatif	<u>Interactions non spécifiques cibles-dendrimères.</u> (incubation du tampon d'hybridation avec la cible complémentaire sur les réseaux de lignes de dendrimères sans les oligonucléotides sondes)	Absence de fluorescence	$I_0 \approx I_1$ ou $I_0 > I_1$	Gain proche de zéro ou négatif

Pour valider ces conditions expérimentales, nous avons choisi de travailler avec deux oligonucléotides sondes et cibles synthétiques de 26 bases parfaitement complémentaires qui sont issus d'un fragment du gène HSP12 de la levure. L'oligonucléotide sonde possède une fonction amine à l'extrémité 5' de la séquence afin de pouvoir se fixer de façon covalente sur les aldéhydes des dendrimères (5'-[AmC6T]-AAT-ATG-TTT-CCG-GTC-GTC-TC-3'). L'oligonucléotide cible est marqué avec un fluorophore (Cy5) à l'extrémité 5' de sa séquence (5'-[Cy5]-GAG-ACG-ACC-GGA-AAC-ATA-TT-3'). La fluorescence de l'ADN cible sera utilisée pour valider l'hybridation avant d'interpréter les résultats issus des signaux de diffraction. Ces conditions expérimentales ont été testées pour les trois procédés de fabrication de réseaux diffractants d'oligonucléotides sondes (décrits dans la Figure 114).

Nous partons du postulat que l'hybridation des cibles sur les oligonucléotides sondes (malgré une taille identique par leur nombre de bases) densifie la couche d'acides nucléiques à la surface de lignes entraînant potentiellement de faibles variations de hauteur des lignes et qu'elle conduit à l'augmentation de l'indice optique de la couche d'acides nucléiques.

Dans un souci de compréhension, l'ensemble des schémas illustrant l'hybridation entre les deux oligonucléotides de même taille est représenté par une couche de cibles superposée à une couche de sondes. Néanmoins cette représentation doit être considérée comme une densification de la couche d'acides nucléiques sondes après hybridation des cibles à la surface de lignes du réseau contribuant à augmenter l'indice optique effectif de la ligne (Figure 116).

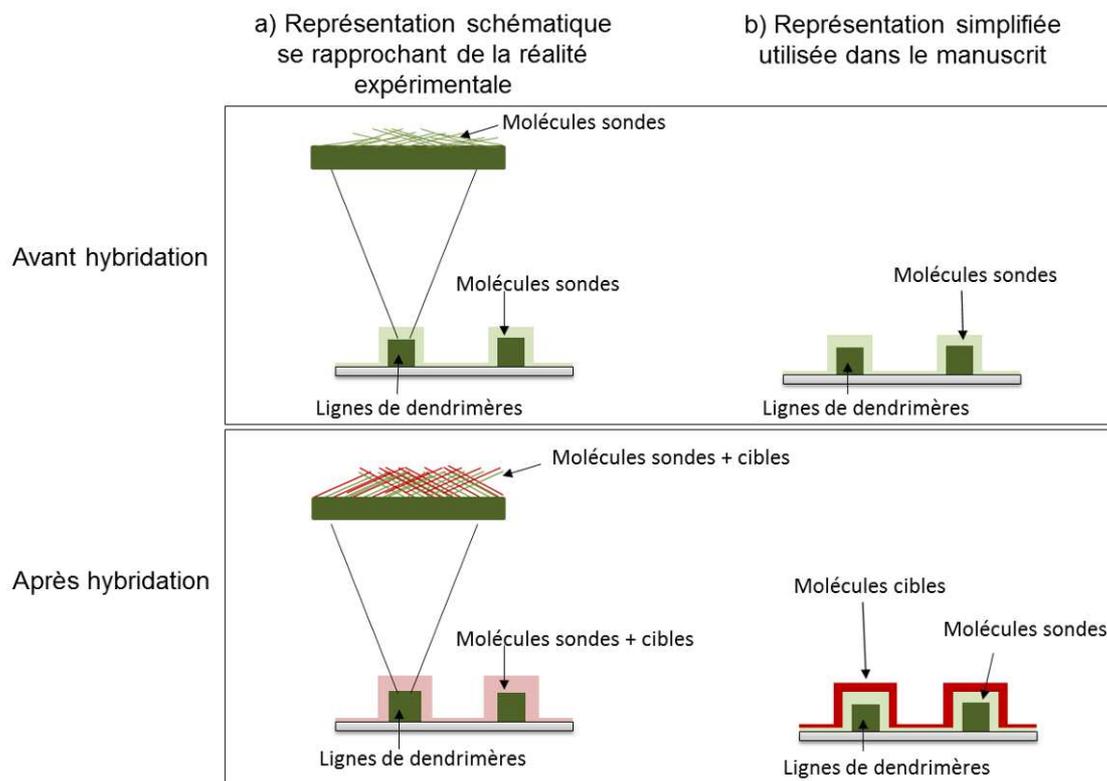


Figure 116 : a) Représentation de l'hybridation entre deux oligonucléotides de même taille et parfaitement complémentaires se rapprochant de la réalité expérimentale ; b) représentation simplifiée utilisée dans le manuscrit.

C. Validation expérimentale des techniques de nanostructuration de surface pour la détection par diffrapuce

Cette partie est entièrement consacrée à la validation expérimentale de la détection d'une hybridation ADN-ADN par diffrapuce. Pour cela nous étudierons :

1. Les résultats en fluorescence et en diffraction des différentes conditions expérimentales à valider et ce pour chacune des techniques de nanostructuration ;
2. L'impact de l'hybridation des oligonucléotides cibles sur la « géométrie » des réseaux ;
3. L'effet de la concentration en sondes sur le gain en diffraction après hybridation.

C.1. Validation de la preuve de conception de biodétection par diffrapuce :

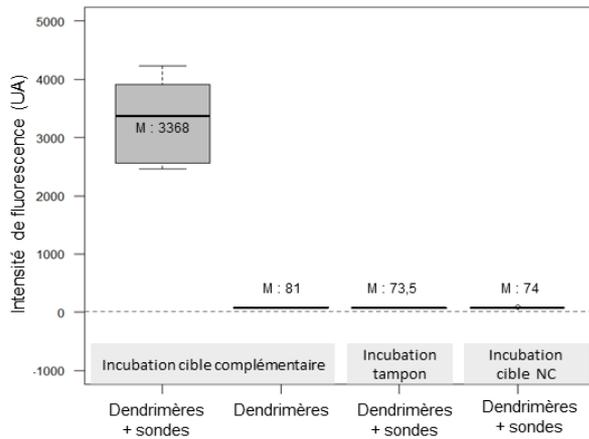
La Figure 117 représente les résultats en fluorescence (a) et en diffraction (b) issus de la validation expérimentale de la détection par diffrapuce d'une hybridation ADN-ADN. Les trois procédés d'adressage des oligonucléotides sondes ont été testés dans les mêmes conditions expérimentales sur 12 réseaux indépendants par condition. Les protocoles de conception des réseaux et de l'hybridation de la diffrapuce sont détaillés dans les parties B et C.2 du Matériel et Méthodes.

Figure 117 : Mesure a) des intensités moyennes de fluorescence b) des gains des signaux de diffraction après hybridation en fonction du procédé d'adressage des oligonucléotides sondes. De gauche à droite : 1^{er} « boxplot », incubation des molécules cibles complémentaires sur les réseaux de lignes constituées d'oligonucléotides sondes ; 2^{ème} « boxplot », incubation des molécules cibles complémentaires sur les réseaux de lignes de dendrimères sans sondes ; 3^{ème} « boxplot », incubation du tampon d'hybridation sans les molécules cibles sur les réseaux de lignes constituées d'oligonucléotides sondes; 4^{ème} « boxplot », incubation des molécules cibles non complémentaires sur les réseaux de lignes constituées d'oligonucléotides sondes. M représente la médiane des valeurs pour chaque « boxplot ». P représente les «p-values» en pourcentage du test de comparaison de moyenne entre l'hybridation spécifique et les contrôles négatifs. Les oligonucléotides sondes et cibles ont été utilisés respectivement à 5 μ M et 100 nM. Les paramètres du scanner de fluorescence (Innoscan 900) sont : PMT $\lambda = 532$ nm et PMT $\lambda = 635$ nm : 100%. Les paramètres du lecteur de diffraction sont : puissance (p): 1 mW et gain (g): 0.

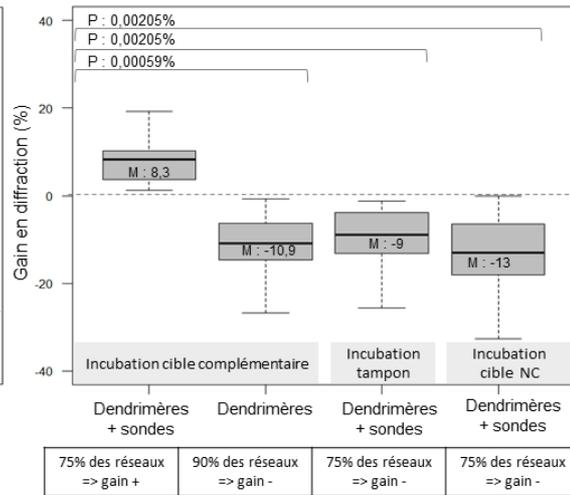


Adressage des sondes par incubation d'une goutte

1a) Résultats en fluorescence

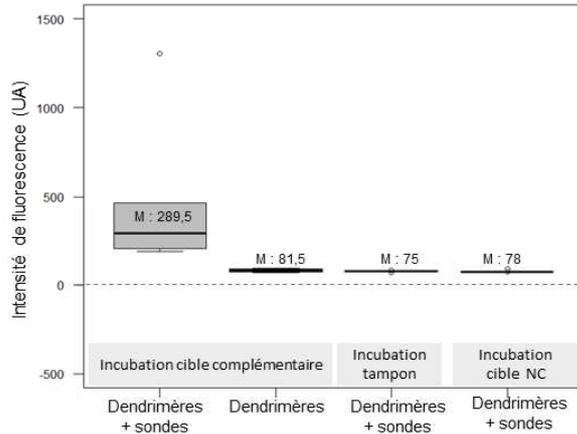


1b) Résultats en diffraction

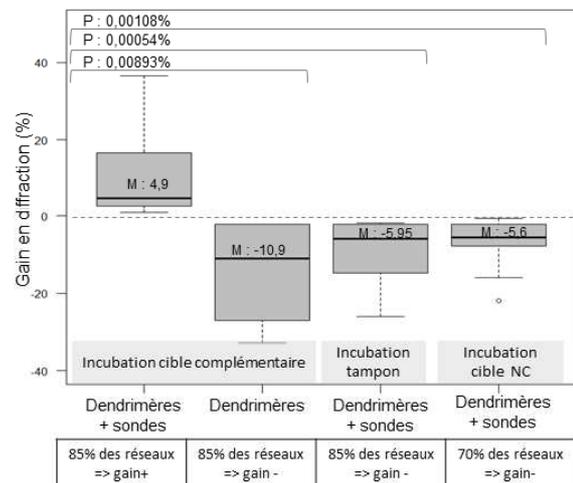


Adressage des sondes par microcontact printing

2a) Résultats en fluorescence

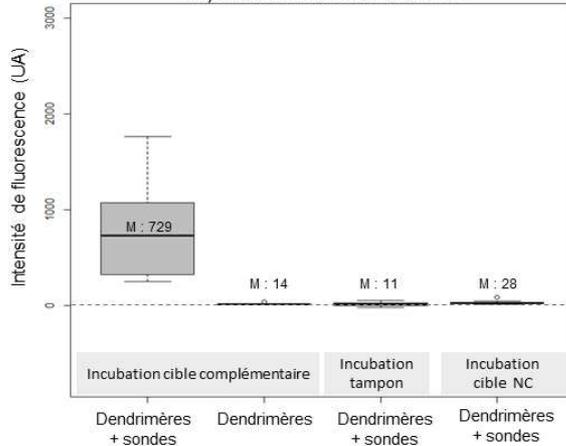


2b) Résultats en diffraction

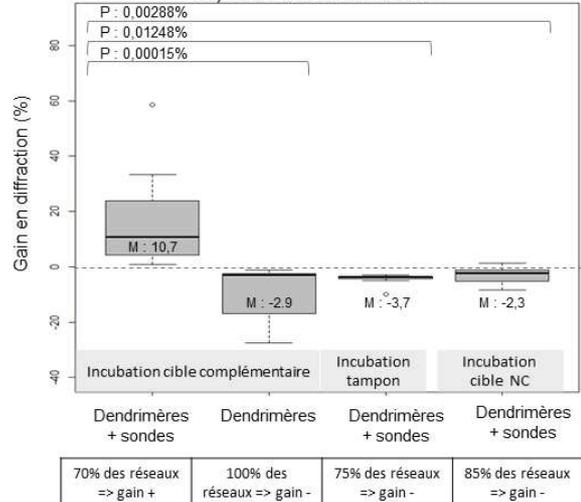


Adressage des sondes par le procédé « tout en un »

3a) Résultats en fluorescence



3b) Résultats en diffraction



Dans la Figure 117, quel que soit le procédé de fabrication des réseaux de lignes d'oligonucléotides sondes, les résultats en fluorescence présentent une intensité médiane de fluorescence significativement plus élevée pour l'hybridation spécifique (1^{er} boxplot) que pour les trois contrôles négatifs. Ceci valide l'hybridation spécifique des oligonucléotides cibles sur la diffrapuce. Concernant les résultats issus des signaux de diffraction, quel que soit le procédé de fabrication, la médiane des gains en diffraction est positive (comprise entre +4,9 et +10,7%) pour l'hybridation spécifique et négative pour les contrôles négatifs. Ce résultat signifie que l'hybridation spécifique des cibles conduit à l'augmentation de l'intensité de lumière diffractée alors que les conditions contrôles contribuent à la diminuer. De manière hypothétique, les résultats des 3 contrôles négatifs laissent à penser que certains éléments présents dans le tampon d'hybridation et non éliminés pendant l'étape de lavage (sels et oligonucléotides non complémentaires...) se fixent entre les lignes des réseaux réduisant ainsi leur hauteur après hybridation.

Les différences entre les gains de diffraction obtenus pour l'hybridation spécifique et les contrôles négatifs ont été appuyées par un test statistique de comparaison de moyennes (Mann-Whitney-Wilcoxon corrigé par la méthode de Bonferroni). Ce test permet de confirmer grâce au calcul d'une « p-value » une différence significative entre les résultats obtenus pour l'hybridation spécifique et les trois contrôles négatifs. Dans notre cas, si les « p-values » sont inférieures à 0,03333%, alors elles sont considérées comme significatives avec une erreur alpha de 0,1%. L'ensemble des « p-values » est $< 0,03333\%$ les différences entre les contrôles positifs et les contrôles négatifs sont donc significatives. Le choix des tests statistiques et leur description sont détaillés dans la section E.2 du Matériel et Méthodes.

Ces résultats sont en accord avec les simulations de réponse rapportées dans la section A.1 de ce chapitre. La comparaison des signaux de diffraction avant et après hybridation permet de discriminer, des contrôles négatifs, l'hybridation spécifique entre 2 oligonucléotides. Les oligonucléotides sondes constituant les réseaux sont donc correctement fixés sur les lignes de dendrimères et accessibles pour leur hybridation avec les oligonucléotides cibles.

Les tableaux sous les graphiques illustrant les résultats en diffraction de la Figure 117 représentent le pourcentage de réseaux en accord avec les simulations de réponse attendues. Notons que certains réseaux ont une réponse « inverse » à celle attendue ou ne sont pas exploitables (\leq à 30% des réseaux). Cette minorité de réseaux n'est pas prise en compte dans la représentation graphique de la Figure 117b. Ce problème est principalement lié à la reproductibilité des procédés de nanostructuration. Nous reviendrons en détails sur l'explication de ce résultat dans la section C.4 .

Pour discuter des différences de résultats entre les différents procédés de fabrication, le Tableau 14 rassemble les valeurs de fluorescence et de diffraction obtenus pour l'hybridation spécifique.

Tableau 14 : Récapitulatif des médianes des intensités de fluorescence et des médianes des gains en diffraction obtenues pour l'hybridation spécifique en fonction des procédés d'adressage des biomolécules sondes.

Procédés d'adressage des biomolécules sondes.	Configuration de l'adressage des sondes	Médianes des intensités de fluorescence.	Médianes des gains en diffraction.
N°1 : Incubation d'une goutte	Sur le dessus et les côtés des lignes. 	3 368 UA	8,3 %
N°2 : Microcontact printing	Sur le dessus des lignes. 	289,5 UA	4,9%
N°3 : Procédé du « tout en un »	Sur le dessus et les côtés des lignes. 	729 UA	10,7%

1) Discussion des résultats en fonction du type d'**adressage des sondes**.

Les gains de diffraction obtenus après hybridation sont plus grands lorsque les sondes sont adressées sur le dessus et les côtés des lignes que lorsqu'elles sont adressées uniquement sur le dessus des lignes pour des conditions d'hybridation identiques (Tableau 14). Ces résultats sont en accord avec les résultats des simulations présentés dans la Figure 113, soit que l'augmentation de l'indice de réfraction de la couche d'oligonucléotides après hybridation permet d'obtenir un gain positif plus grand lorsque l'hybridation a lieu sur le dessus et les côtés des lignes.

2) Discussion des résultats lorsque que l'adressage des sondes est réalisé sur **le dessus et les côtés des lignes** (procédé N°1 et N°3).

La médiane des intensités de fluorescence mesurées après hybridation pour le procédé N°1 (adressage par incubation d'une goutte) est 4,5 fois plus grande que celle obtenue lorsque les sondes sont adressées par le procédé N°3 (procédé « tout en un »). Ce résultat peut être interprété comme une meilleure accessibilité et /ou une plus grande densité des sondes dans le procédé N°1 que dans le procédé N°3, alors que la concentration de la solution d'oligonucléotides utilisée et les conditions d'hybridation sont identiques pour les 2 procédés. Les deux procédés de fonctionnalisation sont très différents, dans le procédé N°1, les

molécules sondes sont adressées sur la surface dans un milieu liquide (incubation d'une goutte) alors que dans le procédé N°3, les molécules sont encrées et séchées sur le timbre en PDMS pour être déposées pendant le confinement de la solution de dendrimères (Figure 118). Cette différence lors de l'adressage des sondes pourrait expliquer ces résultats. De plus, la densité de sondes adressées sur les réseaux en fonction des procédés pourrait être vérifiée en utilisant des sondes radio marquées.

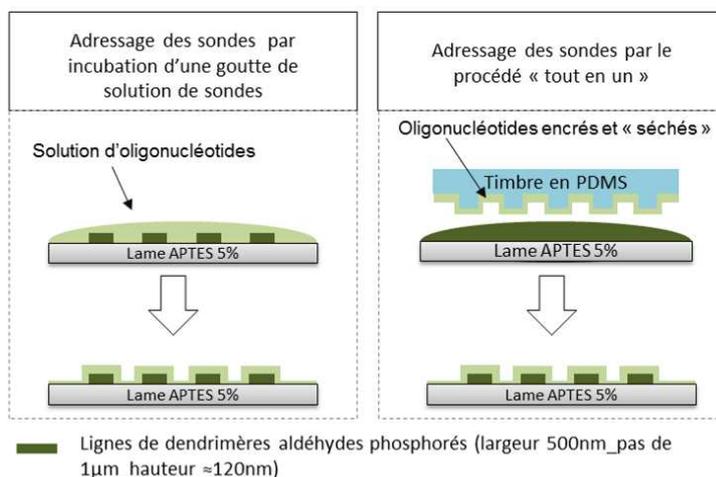


Figure 118 : Schéma représentant les différences entre l'adressage de oligonucléotides sondes par incubation d'une goutte ou par le procédé « tout en un ».

Concernant les signaux de diffraction, la médiane des gains obtenue pour le procédé N°1 (8,3%) est inférieure à celle obtenue pour le procédé du « tout en un » (10,7 %). Dans les deux cas, les sondes sont adressées sur le dessus et les côtés des lignes. Notons que le signal de fluorescence mesuré par réseau représente l'intensité totale du réseau c'est-à-dire l'intensité mesurée sur les lignes mais également entre. Ainsi il est possible que l'intensité de fluorescence 4,5 fois plus grande pour le procédé N°1 que pour le procédé N°3 traduise une quantité de cibles entre les lignes plus importante pour le procédé N°1. Ainsi l'augmentation de la hauteur des lignes après l'étape d'hybridation serait plus faible pour le procédé N°1 dû à la présence de ces cibles entre les lignes que pour le procédé N°3. Le gain serait alors réduit (Figure 119).

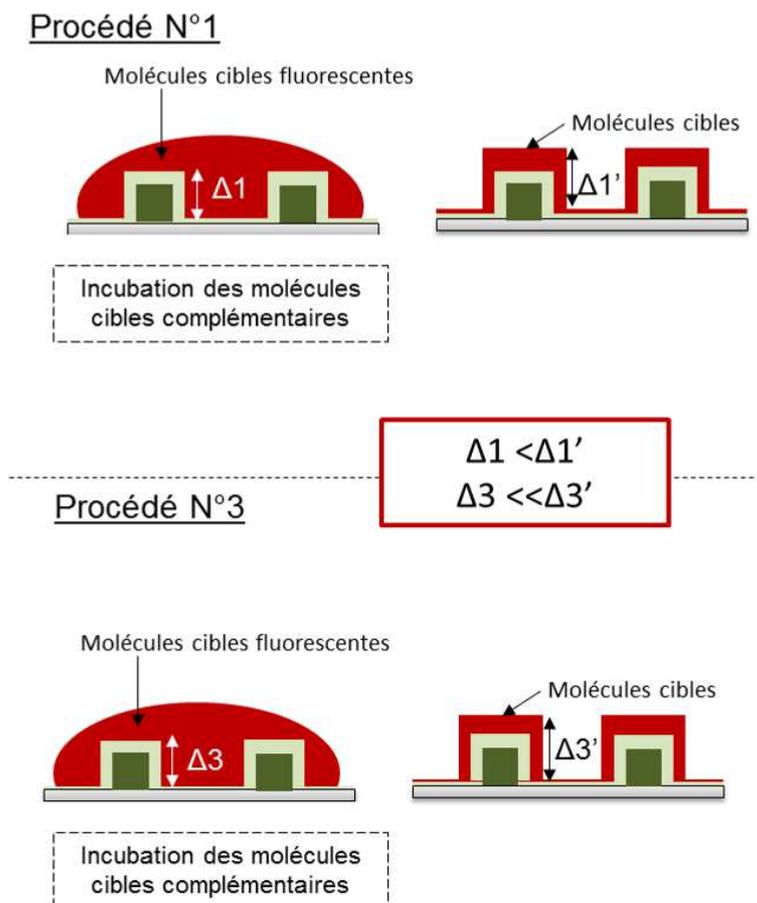


Figure 119 : Schéma représentant l'hypothèse d'une hybridation entre les lignes limitée mais plus importante pour le procédé N°1 que pour le procédé N°3.

La présence de cibles entre les lignes peut s'expliquer de deux manières :

- 1) Interactions non spécifiques cible-surface.
- 2) Présence d'oligonucléotides sondes entre les lignes.

Cette hypothèse peut être confortée par le fait que le procédé N°1 peut favoriser la présence de molécules sondes entre les lignes du réseau. En effet, pendant l'adressage des sondes par incubation d'une goutte (procédé N°1) les molécules sondes sont en contact avec toute la surface du réseau (dessus, sur les côtés et entre les lignes) alors que pour le procédé « tout en un », les molécules encrées sur les lignes du timbre en PDMS qui mouleront les parties entre les lignes du réseau sont éliminées avant d'utiliser le timbre pour le confinement de la solution de dendrimères (Figure 120). Il est donc possible que la quantité, bien que limitée des sondes entre les lignes des réseaux, contribue à augmenter la fixation de cibles entre les lignes conduisant à la réduction du gain en diffraction.

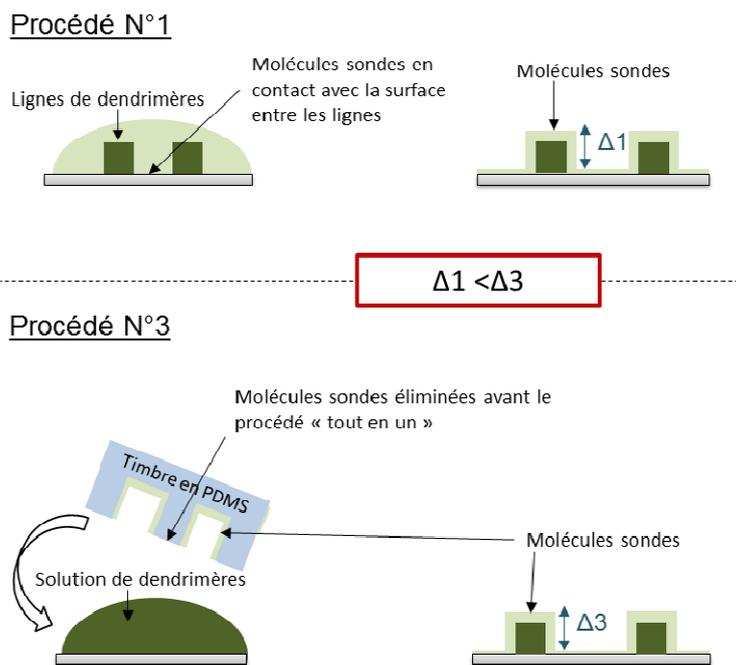


Figure 120 : Schéma illustrant l'hypothèse selon laquelle pendant le procédé N°1, une quantité limitée de sondes se fixe entre les lignes conduisant à une augmentation de la hauteur des lignes plus faible après l'hybridation.

Pour conclure sur ces hypothèses, il faut dissocier l'intensité de fluorescence des lignes de l'intensité globale du réseau après hybridation pour chacun des procédés.

3) Discussion des résultats lorsque l'adressage des sondes est réalisé sur le dessus des lignes par microcontact printing

Lorsque les sondes sont adressées par microcontact printing avec un timbre sans motif, les signaux de fluorescence obtenus après hybridation sont 2.5 fois plus faibles que pour le procédé « tout en un » et plus de 11 fois plus faibles dans le cas du procédé d'incubation d'une goutte. Ces résultats sont en accord avec ceux du chapitre 1 montrant que l'adressage par le procédé « tout en un » conduisait à une augmentation des signaux de fluorescence après hybridation de sondes en comparaison avec le microcontact printing. La quantité de sondes adressées et fixées sur les réseaux de lignes de dendrimères et/ou leur accessibilité semble être plus faible par microcontact printing que par les procédés N°1 et N°3. Notons que quel que soit le procédé d'adressage des sondes, ces dernières sont « fixées » de manière covalente et orientée aux lignes de dendrimères par leur extrémité 5'-NH₂. Leur accessibilité peut donc être considérée comme équivalente. Pour conclure sur la densité des sondes adressées sur la surface en fonction du procédé, il serait nécessaire d'utiliser d'acides nucléiques radio marqués.

En conclusion, les procédés de nanostructuration de surface développés dans le chapitre 3 pour la conception de réseaux d'oligonucléotides sondes sont adaptés à l'hybridation. Les oligonucléotides sondes constituant ces réseaux sont correctement fixés aux lignes de dendrimères et accessibles pour l'hybridation avec les oligonucléotides cibles. Ces résultats valident expérimentalement la détection d'une hybridation ADN-ADN par diffrapuce. Les différences significatives entre les gains obtenus à partir des signaux de diffraction permettent de discriminer l'hybridation spécifique entre deux oligonucléotides de même taille (20 bases) et parfaitement complémentaires des contrôles négatifs. Néanmoins, les résultats sont différents en fonction du procédé d'adressage des oligonucléotides. Les signaux de fluorescence représentent l'intensité globale des cibles marquées et hybridées sur le réseau et ne sont pas dépendantes de la « géométrie » du réseau. Alors que les signaux de diffraction sont eux totalement dépendants de la « géométrie » des réseaux et de l'indice de réfraction des composants constituant les lignes des réseaux.

C.2. Caractéristiques des réseaux après l'hybridation

L'intensité de lumière diffractée par un réseau peut varier en fonction de l'arrangement périodique de celui-ci et de l'indice de réfraction de ces composants. Nous sommes partis du postulat que l'hybridation des cibles sur les oligonucléotides sondes de même taille densifie la couche d'acides nucléiques à la surface de lignes, entraînant potentiellement de faibles variations de hauteur des lignes et une augmentation de l'indice optique effectif de la couche formée après hybridation. L'étude des variations de hauteur et de largeur des lignes par microscopie à force atomique n'a pas permis de montrer de variations significatives. En revanche, dans ces travaux de thèse A. EGEA²³⁴ a montré que l'adressage de molécules de streptavidine sur les réseaux de lignes de résine SU-8 était caractérisé par l'augmentation de la rugosité du dessus des lignes. C'est pourquoi, nous avons choisi de caractériser la rugosité des lignes des réseaux après les étapes de nanostructuration des lignes, d'immobilisation des oligonucléotides sondes et d'hybridation. Cette étude a été réalisée par microscopie à force atomique sur 3 réseaux différents à partir d'images de 50 nm x 50 nm, 100 nm x 100 nm, 150 nm x 150 nm et 300 nm x 300 nm de façon à vérifier la linéarité de la rugosité en fonction de la taille des images. Seules les valeurs moyennes de rugosité mesurées pour les images de 300 nm x 300 nm sont présentées sur la Figure 121 car elles représentent la rugosité globale de la largeur de la ligne.

²³⁴ A. Egea, Thèse INSA, Toulouse, 2012

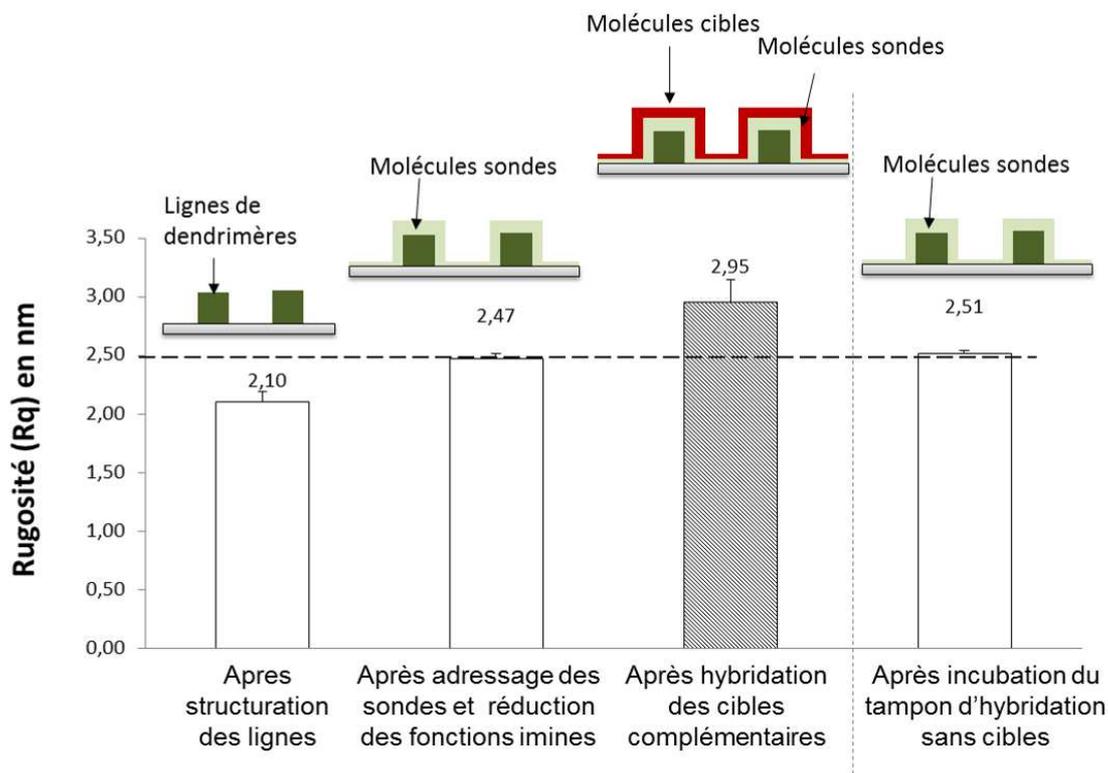


Figure 121 : Etude de la rugosité moyenne (Rq), obtenue à partir d'images AFM de 300 nm x 300 nm, du dessus des lignes de 3 réseaux dans 4 conditions expérimentales. Les biopuces diffractantes ont été analysées après nanostructuration des lignes de dendrimères, adressage des oligonucléotides sondes par incubation d'une goutte de solution d'oligonucléotides, et hybridation avec les molécules cibles complémentaires ou après incubation du tampon d'hybridation sans les molécules cibles sur 3 réseaux de lignes formées d'oligonucléotides sondes. Les conditions expérimentales sont décrites dans la partie B et C.2.a du Matériel et Méthodes. (AFM_Bruker catalyst_Mode Scan Asyst_Air_fo : 50-90 kHz k : 0,4N/m)

L'adressage des oligonucléotides sondes et l'hybridation des oligonucléotides cibles sur les réseaux entraîne respectivement une augmentation de 17,5% et 20% de la rugosité moyenne de surface (Figure 121). *A contrario*, sans l'hybridation des cibles complémentaires, la rugosité de surface n'est pas modifiée de façon significative.

En conclusion, l'hybridation des ADN cibles sur les réseaux d'ADN sondes entraîne de très faibles variations de rugosité détectées en diffraction. Ces résultats indiquent que cette méthode de détection est très sensible. Toutefois, tout changement de la rugosité créée par des modifications physiques ou biologiques va perturber la mesure des signaux de diffraction.

C.3. Effet de la concentration en sondes sur le gain en diffraction après hybridation

Dans cette section, nous nous sommes intéressés à étudier l'effet de la concentration en sondes sur les valeurs de gains obtenues après hybridation. Le but a été d'identifier si les sondes étaient en excès par rapport à la quantité de cibles hybridées et quel était leur impact

sur les signaux de diffraction. Pour cela, différentes diffrapuces ont été réalisées avec une gamme de concentration en sondes (0, 1, 2, et 5 μM), puis chacune d'entre elles a été hybridée dans les mêmes conditions opératoires avec 100 nM de molécules cibles complémentaires. Les protocoles sont détaillés dans la partie B et C.2.a du Matériel et Méthodes.

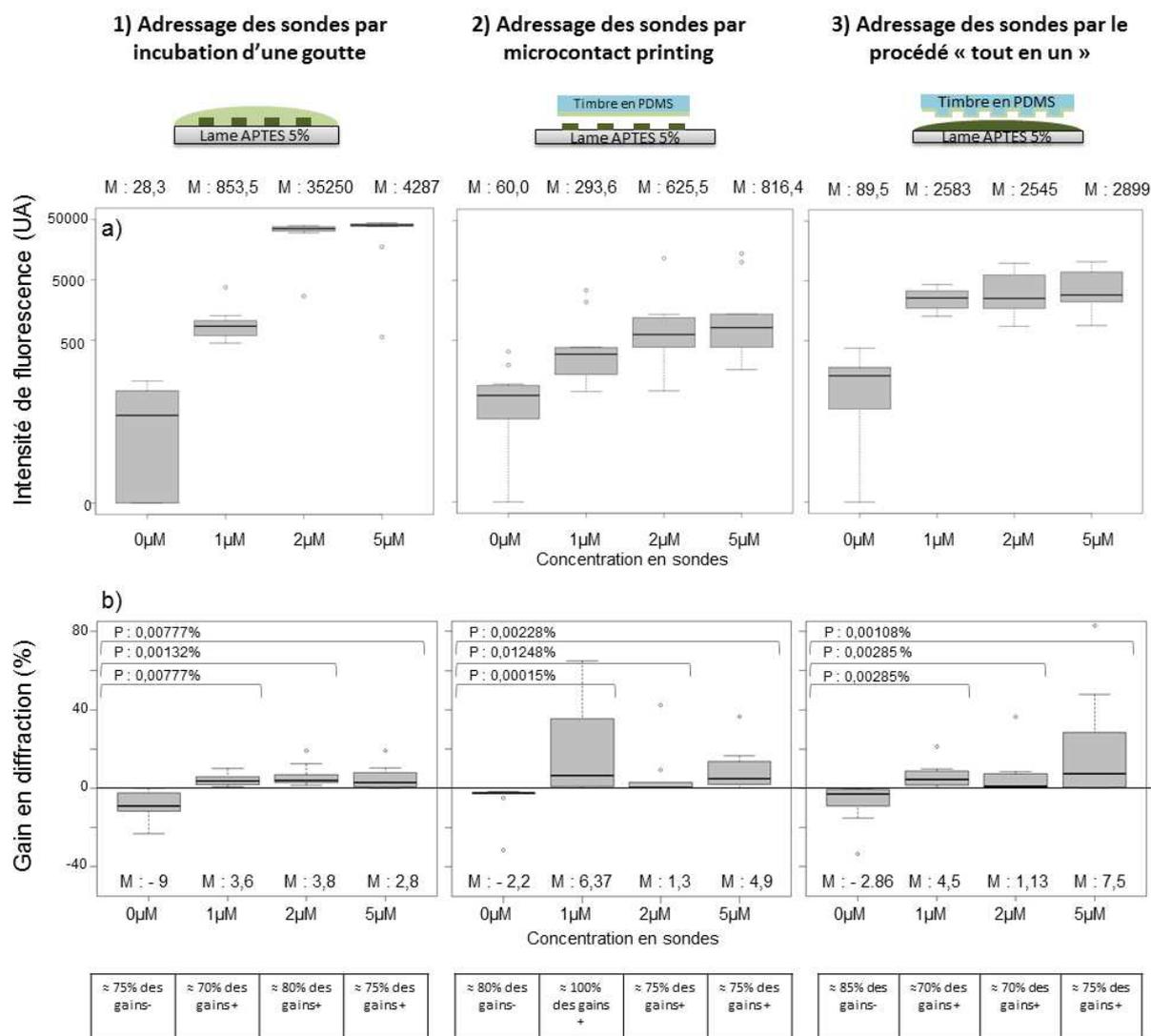


Figure 122 : Mesures a) des intensités moyennes de fluorescence b) des gains obtenus par diffraction après hybridation pour les trois procédés de fabrication de la diffrapuce. 1) Adressage des oligonucléotides sondes par incubation d'une goutte, 2) adressage des oligonucléotides sondes par μCP avec un timbre en PDMS sans motif et 3) adressage des oligonucléotides sondes par le procédé « tout en un ». Hybridation avec les oligonucléotides cibles parfaitement complémentaires marquées en fluorescence (100 nM). M représente la médiane des valeurs pour chaque « boxplot ». P représente les « p-values » en pourcentage du test de comparaison de moyenne entre l'hybridation spécifique et les contrôles négatifs. Les paramètres du scanner de fluorescence (Innoscan 900) sont : PMT $\lambda=532\text{nm}$ et PMT $\lambda = 635\text{nm}$: 100% et les paramètres du lecteur de diffraction sont : puissance (p): 1mW et gain (g): 0.

Les intensités de fluorescence mesurées dans le cas l'hybridation des cibles complémentaires sont significativement plus importantes que dans le cas du contrôle négatif (Figure 122 a). Ce résultat obtenu quel que soit le procédé de fabrication des réseaux valide l'hybridation des cibles pour chacune des concentrations en sondes. Notons que plus la concentration en sondes est grande plus les intensités de fluorescences mesurées après hybridation sont élevées jusqu'à atteindre un palier entre 2 et 5 μM . Pour l'ensemble des trois procédés, la concentration en molécules sondes a donc un effet sur les signaux de fluorescence mesurés après hybridation. Il semble donc que les sondes ne sont pas en large excès sur la puce pour des concentrations inférieures à 5 μM .

Quel que soit le procédé de fabrication des réseaux, les gains obtenus en diffraction sont positifs pour les hybridations spécifiques et négatifs dans la condition contrôle (Figure 122 b)). Ces résultats sont appuyés par les tests statistiques de comparaison de moyenne entre les résultats issus des hybridations spécifiques et les résultats du contrôle négatif (« p-value » < à 0,03333% avec une erreur alpha de 0,1%). Contrairement aux résultats en fluorescence, l'augmentation de concentration en sondes n'a pas d'effet sur le gain en diffraction. Ces résultats indiquent que le gain ne semble pas directement corrélé à la concentration en sondes. L'hybridation est détectée aussi bien pour 1 μM que pour 5 μM de sondes. Contrairement aux signaux de fluorescence, les signaux de diffraction sont dépendants de la « géométrie » des réseaux et de l'indice de réfraction des composants constituant les lignes des réseaux. Ainsi les oligonucléotides cibles hybridées sur les réseaux de sondes peuvent modifier similairement la « géométrie » des réseaux et/ou l'indice de réflexion les lignes des réseaux que ce soit avec 1 ou 5 μM de sondes.

Les tableaux sous les graphiques illustrant les résultats en diffraction (Figure 122b) représentent le pourcentage de réseaux en accord avec les simulations de réponse attendues. Notons que certains réseaux ont une réponse « inverse » à celle attendue ou ne sont pas exploitables (\leq à 30% des réseaux). Ce problème est principalement lié à la reproductibilité des procédés de nanostructuration. Nous reviendrons en détails sur l'explication de ce résultat dans la section C.4 .

En conclusion, quelle que soit la quantité de sondes utilisées pour la conception des réseaux (1, 2 ou 5 μM) et le procédé de fabrication de la diffrapuce, l'hybridation spécifique est détectable par un gain en diffraction positif. La valeur du gain en diffraction semble ne pas être directement corrélée à la quantité de sondes adressées sur la puce (à condition que l'hybridation ait lieu). Pour valider cette hypothèse il serait intéressant d'évaluer l'effet de la concentration en cibles hybridées sur la puce ainsi que l'effet de leur taille.

C.4. Points clés pour la biodétection optique par diffrapuce

Dans cette partie, nous traiterons les raisons pour lesquelles certains réseaux ont une réponse « inverse » aux résultats attendus et d'autres présentent des signaux inexploitables.

1) La structuration de surface.

Lorsque les réseaux de lignes formés de dendrimères et d'oligonucléotides sondes ne sont pas correctement structurés, l'hybridation des cibles marquées est détectable en fluorescence (signal très supérieur au bruit de fond) mais ne l'est pas en diffraction (gain négatif) (Figure 123). L'absence de périodicité entre les lignes ne permet pas l'obtention d'un gain de diffraction positif après l'hybridation car l'hybridation a lieu sur tout le « réseau » et non pas préférentiellement sur le dessus des lignes. Certains réseaux seront alors interprétés comme des faux négatifs. Ce résultat, confirmé sur plusieurs réseaux, indique que l'arrangement périodique du réseau est indispensable pour la détection par diffrapuce d'une hybridation entre deux oligonucléotides.

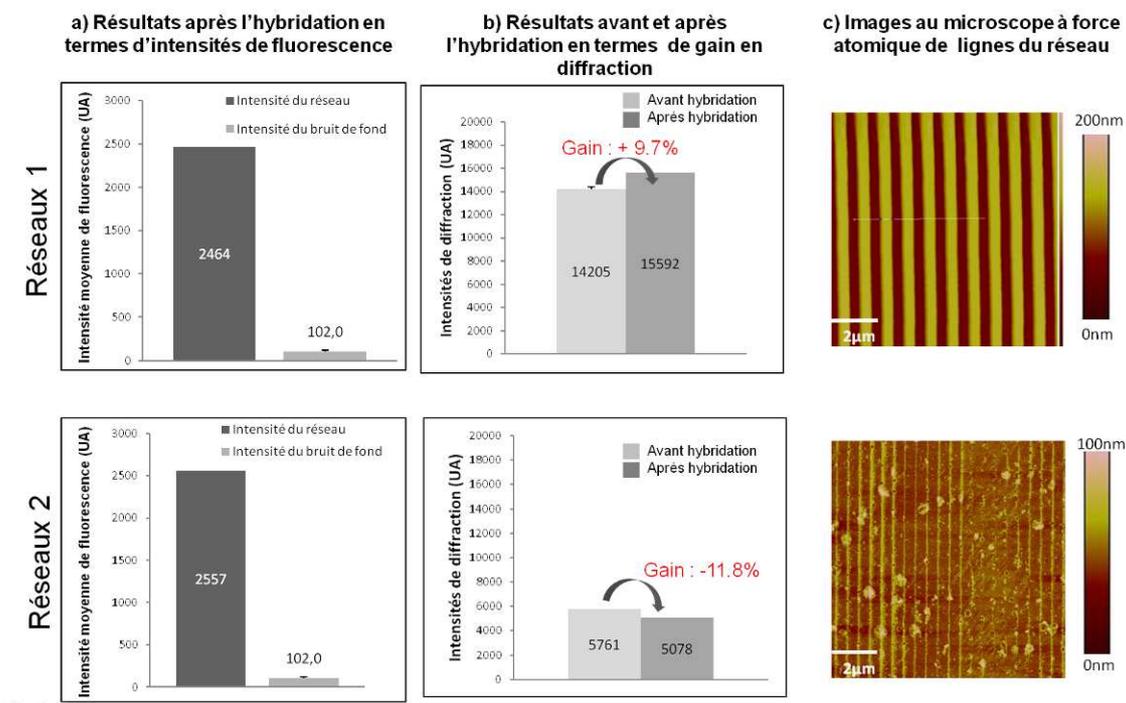


Figure 123 : Résultats d'une hybridation spécifique de deux réseaux (1 et 2) formés d'oligonucléotides sondes et leurs cibles parfaitement complémentaires : a) résultats en fluorescence, b) résultats en diffraction. c) Images obtenues au microscope à force atomique de la structure des lignes des réseaux 1 et 2 avant l'hybridation (AFM_Bruker catalyst_Mode Scan Asyst_Air_fo : 50-90 kHz k : 0,4N/m).

2) Les interactions non spécifiques

Lorsque les oligonucléotides cibles sont incubés sur des réseaux de lignes de dendrimères sans y avoir adressé les oligonucléotides sondes au préalable (contrôle négatif), certains réseaux ont un gain positif. La Figure 124 montre que 80% des réseaux issus du contrôle négatif ont un gain négatif en diffraction mais une intensité de fluorescence proche du bruit de fond. Ces résultats sont en accord avec ceux attendus d'un contrôle négatif. Néanmoins parmi les 12 réseaux de la puce, 2 ont un gain positif corrélé à une intensité de fluorescence 2 et 3 fois supérieure à celle des autres réseaux. (réseaux N°2 et N°6). Ce résultat peut être interprété comme l'adsorption non spécifique des oligonucléotides cibles marquées

sur les lignes formées de dendrimères des réseaux 2 et 6, entraînant la détection d'un signal de fluorescence et l'obtention d'un gain positif en diffraction.

Avant l'incubation des oligonucléotides cibles sur la puce, les fonctions aldéhydes des dendrimères ont été réduites en fonctions alcools par une solution de borohydrure de sodium (3.5 mg/mL) pendant 15 minutes. Pour rappel, cette étape permet de limiter l'adsorption non spécifique des cibles sur les dendrimères²³⁵. Néanmoins ces résultats semblent indiquer que le temps de réaction n'est certainement pas toujours suffisant pour limiter l'ensemble des interactions non spécifiques cibles-dendrimères pendant l'étape d'hybridation. L'absorption non spécifique bien que minoritaire est problématique car elle conduit à la détection de faux positifs.

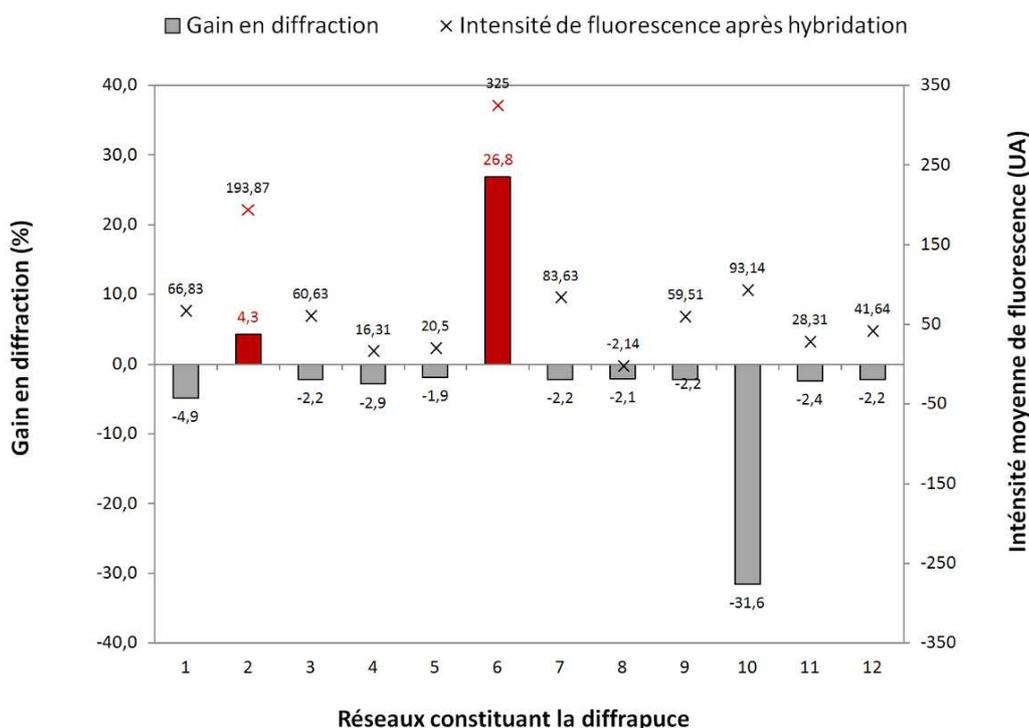


Figure 124 : Gains en diffraction et intensité de fluorescence de 12 réseaux sans adressage des oligonucléotides sondes après incubation avec des oligonucléotides cibles marqués en fluorescence (100nM). L'axe des abscisses représente les 12 réseaux de la puce. L'axe des ordonnées situé à gauche ainsi que les histogrammes représentent le gain en diffraction (%) de chaque réseau alors que l'axe des ordonnées situé à droite et les points matérialisés par les croix représentent l'intensité moyenne de fluorescence (UA). Les paramètres du scanner de fluorescence (Innoscan 900) sont : PMT λ à 532 nm et PMT λ à 635 nm = 100% et les paramètres du lecteur de diffraction : puissance (p) : 1 mW et gain (g) : 0.

²³⁵ N. Raghavachari, Y.P. Bao, G. Li, X. Xie et U.R. Muller, *Analytical Biochemistry*, 2003, 312, 101–105.

En conclusion, la nanostructuration des réseaux de lignes de dendrimères est un point-clé dans la conception de la diffrapuce. Si le procédé de confinement des dendrimères n'est pas parfaitement contrôlé, l'hybridation ne pourra pas être détectée par comparaison des signaux de diffraction. Certains résultats seront alors interprétés comme des faux négatifs. De plus, ces travaux nous montrent que toute absorption non spécifique de molécules sur les lignes de dendrimères va perturber la mesure des signaux de diffraction. Les protocoles de l'hybridation doivent être parfaitement contrôlés dans le but de limiter les interactions non spécifiques au risque d'interpréter des résultats comme faux positifs.

D. Intégration des techniques de structuration de surface pour la biodétection d'une bactérie environnementale

Les validations expérimentales réalisées pour la détection d'une hybridation entre 2 oligonucléotides de même taille et parfaitement complémentaires sont-elles compatibles avec un test de diagnostic ? Pour vérifier si les protocoles expérimentaux utilisés pour la détection par biopuce à fluorescence sont transposables à la détection par diffrapuce, nous avons choisi de tester la biopuce à ADN DendrisChipLégio[©], développée par la société Dendris²³⁶, pour la détection d'espèces de Légionelles par diffrapuce. En plus d'être dans des conditions d'hybridation plus complexes, la taille des acides nucléiques cibles est plus grande que la taille des oligonucléotides sondes.

D.1. Le modèle de détection de bactéries environnementales: *DendrisChipLégio*[©]:

La DendrisChipLégio[©] permet la détection de 21 espèces de *Legionella* pathogènes pour l'homme. Les échantillons testés sont très variés : eaux de tours aéro-réfrigérantes, eaux chaudes sanitaires (hôtels, hôpitaux...), boues mais également des échantillons de prélèvements humains de types LBA (Lavage Brocho-Alvéolaire).²³⁷ Cette puce est constituée de 47 sondes « designées » au sein des parties variables de l'ADN génomique des différentes espèces de Légionelle à identifier. L'ensemble des sondes permet de les discriminer les unes des autres. Dans un premier temps, l'ADN génomique des bactéries de l'échantillon est extrait puis un fragment des gènes *mip* et *rpoB est* amplifié et marqué par une « Polymerase Chain Reaction » (PCR). Après purification du produit PCR, ce dernier est ensuite incubé sur la puce dans un tampon d'hybridation. Ce tampon d'hybridation permet de réunir les conditions de stringence (sels, détergents...) idéales à l'hybridation de chaque cible sur leurs sondes complémentaires. Après l'étape d'hybridation, la puce est lavée dans différents tampons permettant l'élimination des hybridations aspécifiques puis la fluorescence est collectée grâce à un scanner de fluorescence pour chacune des 47 sondes. Le résultat est un « profil d'hybridation » de l'échantillon. Il permet d'identifier les espèces présentes et les espèces absentes dans l'échantillon testé. L'interprétation des valeurs de fluorescence de chaque sonde

²³⁶ www.dendris.fr

est automatisée par un « plug-in » associé au logiciel du lecteur de fluorescence. Notons que le nombre de sondes est plus grand que le nombre d'espèces car c'est l'ensemble des valeurs de fluorescence des sondes qui permet d'identifier les espèces présentes et absentes et non pas une sonde unique. Le protocole est décrit dans la partie C.2.b du Matériel et Méthodes. Néanmoins, pour des raisons de confidentialité, certaines caractéristiques comme des séquences oligonucléotidiques (cibles, sondes et amorces PCR) ne seront pas détaillées.

D.2. Transposition du modèle de biopuce à fluorescence en diffrapuce

Dans ce cas réel de biodétection, les paramètres d'hybridation sont différents de ceux utilisés précédemment pour la validation expérimentale de la détection par diffrapuce (Partie C). D'une part la taille des acides nucléiques cibles est plus importante que la taille des oligonucléotides sondes et d'autre part les conditions d'hybridation (composition du tampon et température d'hybridation) sont différentes (Tableau 15).

Tableau 15 : Récapitulatif des conditions d'hybridation utilisées pour l'hybridation entre deux oligonucléotides de même taille et parfaitement complémentaires et pour l'hybridation de la DendriChipLégio®.

	Conditions utilisées pour l'hybridation entre deux oligonucléotides de même taille et parfaitement complémentaires	Conditions utilisées pour l'hybridation de la DendriChipLégio®
Taille des oligonucléotides sondes	- Sonde HSP12 : 26 bases	- Sonde rpoB : 25 bases
Tailles des acides nucléiques cibles	- Cible HSP12 26 bases	-360 bases pour le fragment du gène <i>rpoB</i> -600 bases pour le fragment du gène <i>mip</i>
Tampon d'hybridation	- Tampon de citrate de sodium (SSC_5X) - Tampon de sodium dodecyl sulfate (SDS_0,1%)	- Solution de Dendhardt's (5X) - Tampon de citrate de sodium SSC (5X) - ADN de sperme de saumon (100µg/ml)
Température d'hybridation	37°C	60°C
Temps d'hybridation	30 min	30 min
Lavages	- 2 fois 3 minutes dans un bain de tampon de lavage => 2X SSC, 0.2% SDS. Puis 1 fois 3 minutes dans un bain de tampon de lavage => 0.2X SSC.	- 2 fois 3 minutes dans un bain de tampon de lavage => SSC (2X) et SDS (0.2%). Puis 1 fois 3 minutes dans un bain de tampon de lavage => SSC (0.2X).

D'après les résultats de travaux de simulation présentés dans la partie A.1 de ce chapitre, la taille des cibles (fragment PCR) très supérieure à la taille des sondes doit être favorable à la détection par diffrapuce. Néanmoins ceci est à vérifier expérimentalement.

Dans le but de simplifier le processus de détection pour l'appliquer à la diffrapuce, nous avons choisi de ne pas multiplexer la détection. Seule la présence de *Legionella pneumophila* sera identifiée. Les gènes *rpoB* et *mip* ont été amplifiés à partir de l'ADN génomique de la souche *Legionella pneumophila* puis hybridés après purification sur la diffrapuce. Les réseaux de lignes des diffrapuces utilisés pour ces travaux étaient constitués de sondes *rpoB* et les acides nucléiques issus de la PCR du gène *rpoB* et *mip* ont respectivement été utilisés comme cibles complémentaires et non complémentaires. Les conditions expérimentales pour valider la détection de *Legionella pneumophila* par diffrapuce ainsi que les résultats attendus sont regroupées dans le Tableau 16.

Tableau 16 : Résultats attendus en termes de fluorescence et diffraction pour valider la détection par diffrapuce.

	Événements biologiques testés	Résultats en fluorescence	Différence entre I_0 et I_1	Gain du signal de diffraction
Contrôle positif	<u>Hybridation spécifique</u> (incubation du tampon d'hybridation avec la cible complémentaire (produit PCR <i>rpoB</i>) sur les réseaux constitués d'oligonucléotides sondes (<i>rpoB</i>))	Présence de fluorescence	$I_0 < I_1$	Gain positif
Contrôle négatif	<u>Absence d'hybridation</u> (incubation du tampon d'hybridation seul sur les réseaux constitués d'oligonucléotides sondes (<i>rpoB</i>))	Absence de fluorescence	$I_0 \approx I_1$ ou $I_0 > I_1$	Gain proche de zéro ou négatif
Contrôle négatif	<u>Absence d'hybridation en présence du blanc PCR</u> (incubation du tampon d'hybridation avec un produit PCR obtenu sans ADN génomique de <i>Legionella pneumophila</i> (blanc PCR) sur les réseaux constitués d'oligonucléotides sondes (<i>rpoB</i>))	Absence de fluorescence	$I_0 \approx I_1$ ou $I_0 > I_1$	Gain proche de zéro ou négatif
Contrôle négatif	<u>Interaction non complémentaire</u> (incubation du tampon d'hybridation avec la cible non complémentaire (produit PCR <i>mip</i>) sur les réseaux constitués d'oligonucléotides sondes (<i>rpoB</i>))	Absence de fluorescence	$I_0 > I_1$	Gain négatif
Contrôle positif	<u>Hybridation spécifique en présence de cibles complémentaires et non complémentaires</u> (incubation du tampon d'hybridation les produit PCR <i>rpoB</i> et <i>mip</i> sur les réseaux constitués d'oligonucléotides sondes (<i>rpoB</i>))	Présence de fluorescence	$I_0 < I_1$	Gain positif

Pour l'ensemble de ces travaux, les oligonucléotides sondes *rpoB* ont été adressés sur les réseaux de lignes de dendrimères par incubation d'une goutte de solution. Puis les fonctions imines entre les sondes et les dendrimères ont été réduites dans une solution de borohydrure de sodium (3.5 mg/mL pendant 15 min) avant l'hybridation.

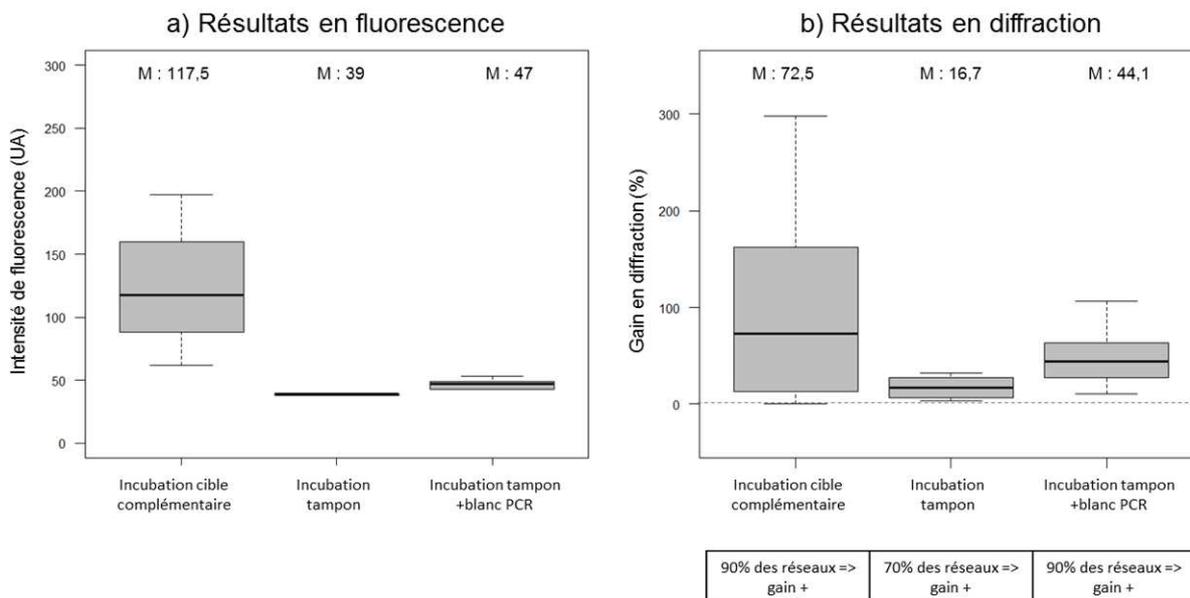


Figure 125 : Mesure a) des signaux de fluorescence et b) des gains de diffraction obtenus pour les 3 conditions expérimentales. De gauche à droite : 1^{er} « boxplot », incubation du produit PCR cible (*rpoB*) (750ng) sur des réseaux d'oligonucléotides sondes *rpoB* (5 μ M) ; 2^{ème} « boxplot », incubation du tampon utilisé pour l'hybridation sans les cibles sur les réseaux d'oligonucléotides sondes *rpoB* ; 3^{ème} « boxplot », incubation du tampon d'hybridation avec le blanc de la PCR sur des réseaux d'oligonucléotides sondes *rpoB* (5 μ M). M représente la médiane des valeurs de chaque boxplot. Les paramètres du scanner de fluorescence (Innoscan 900) sont : PMT λ à 532 nm et PMT λ à 635 nm = 100%. Les paramètres du lecteur de diffraction sont : puissance (p) : 1 mW et gain (g) : 0.

L'intensité de fluorescence collectée pour les réseaux après incubation des acides nucléiques cibles complémentaires (produit PCR *rpoB*) est significativement supérieure à celle collectée pour les deux contrôles négatifs (Figure 125a). Ce résultat valide l'hybridation spécifique des cibles sur la puce. En revanche, (Figure 125 b)) les gains en diffraction obtenus sont positifs que ce soit pour l'hybridation spécifique ou les contrôles négatifs alors qu'il est attendu un gain négatif pour les conditions contrôles.

L'étude au microscope à force atomique des lignes d'un de ces réseaux après incubation uniquement du tampon d'hybridation sans cibles montre des « patches » (en jaune) répartis sur les lignes de façon hétérogène (Figure 126b). La coupe des hauteurs sur ces « patches » indique une augmentation de la hauteur des lignes d'environ 50 nm en comparaison avec la hauteur des lignes avant incubation du tampon d'hybridation sans cibles sur des zones sans « patch » (Figure 126 c). Sur le graphique, le haut des lignes du patch est supérieur de 50 nm mais il semblerait que la hauteur entre le haut de la ligne et le creux ne soit pas augmentée (\approx 150 nm). L'observation n'est pas un artéfact de l'image car une seconde image d'un

« patch » de $10\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$ a été faite (Figure 126 d et e) validant l'augmentation uniquement de la hauteur des lignes d'environ 50nm.

D'un point de vue plus fondamental, la détection par la technique de diffraction de ces patches dont la superficie représente moins d'un tiers de la surface des lignes et la hauteur additive que 50nm, souligne la sensibilité de cette technique de détection et confirme les simulations effectuées pour des interactions sur le haut de ligne uniquement. Il serait intéressant de savoir si le signal de diffraction augmente avec la densité de patches.

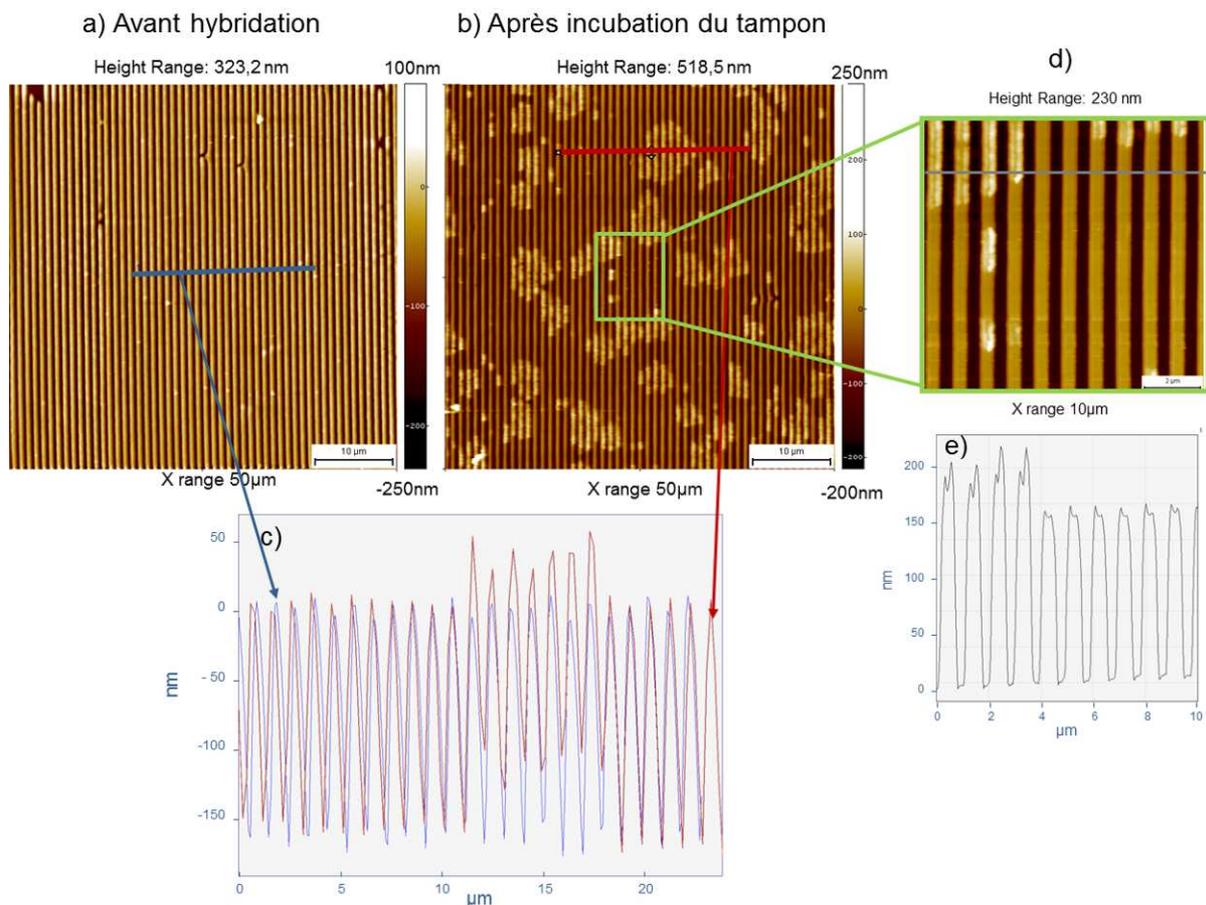
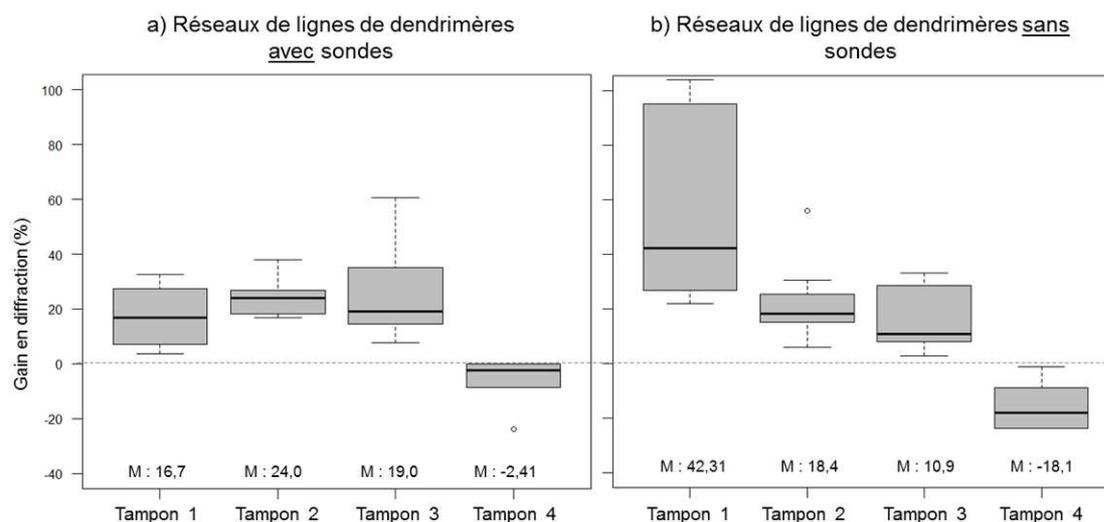


Figure 126 : a) Image AFM de 50 lignes d'un réseau de la diffrapuce avant hybridation ; b) Image obtenue par microscopie à force atomique de 50 lignes d'un réseau de la diffrapuce après incubation du tampon d'hybridation sans oligonucléotides cibles (Denhardt's (5X), SSC (5X), ADN de sperme de saumon $100\mu\text{g/ml}$) ; c) graphique représentant une coupe des hauteurs des lignes du réseau : avant hybridation (en rouge) et après incubation du tampon d'hybridation (en bleu) ; d) Image obtenue par microscopie à force atomique de 10 lignes du réseau de la zone encadrée en vert sur la figure b) ; e) graphique représentant une coupe des hauteurs des lignes de la figure d). (AFM_Bruker catalyst_Mode Scan Asyst_Air_fo : 50-90 kHz k : 0,4N/m).

En conclusion, dans ces conditions expérimentales d'hybridation, même si le gain en diffraction est plus grand dans le cas de l'hybridation spécifique que pour les contrôles négatifs, la grande dispersion des gains ne permet pas de discriminer l'hybridation spécifique des contrôles négatifs. Certains éléments du tampon d'hybridation restent fixés sur les réseaux de lignes de dendrimères entraînant des variations de hauteur responsables des gains positifs obtenus en diffraction. Ces résultats indiquent que les conditions d'hybridation utilisées pour la détection par biopuce à fluorescence ne sont pas adéquates pour la détection par diffrapuce.

La composition du tampon d'hybridation décrite dans le Tableau 15 utilisé pour la DendrisChipLégio© est différente de celle utilisée pour les validations expérimentales précédentes. Le Denhardt's et l'ADN de sperme de saumon sont les deux composants ajoutés au tampon d'hybridation. Ces derniers ont un rôle très précis dans l'hybridation. La solution de Denhardt's, composée de 1% de Ficoll (type 400), 1% polyvinylpyrrolidone, 1% bovine serum albumin et l'ADN de sperme de saumon, est typiquement utilisée comme agent de « saturation » dans le but de réduire l'accrochage non spécifique des molécules cibles pendant l'étape de l'hybridation²³⁸. Dans le cas de la DendrisChipLégio©, ils permettent de limiter l'accrochage non spécifique des molécules cibles sur la dendrilame (support de la biopuce).

Dans le but de comprendre quels éléments du tampon d'hybridation sont responsables de l'obtention d'un gain positif dans les conditions contrôles, l'effet du Denhardt et de l'ADN de sperme de saumon sur les signaux de diffraction a été évalué. Quatre tampons d'hybridation avec ou sans ces deux éléments ont été incubés sur les réseaux constitués de lignes de dendrimères avec ou sans oligonucléotides sondes. L'incubation des tampons et le lavage des réseaux ont été réalisés selon les mêmes conditions opératoires que pour la DendrisChipLégio©.



²³⁸ S. Russell, L. A. Meadows, R.R. Russell, Microarray technology in Practice, 2009, livre édité par Elsevier

Figure 127 : Mesure des gains de diffraction obtenus : a) après incubation des tampons 1, 2, 3 et 4 sur des réseaux de lignes de dendrimères avec les oligonucléotides sondes et réduits, b) après incubation des tampons 1, 2, 3 et 4 sur des réseaux de lignes de dendrimères sans oligonucléotides sondes et réduits. Tampon 1 : Tampon d'hybridation utilisé dans le cadre de l'hybridation de la DendriChipLégio :5X_Denhardt's, 5X_SSC, ADN de sperme de saumon_100µg/ml ; Tampon 2 (sans l'ADN de sperme de saumon) : 5X_Denhardt's, 5X_SSC ; Tampon 3 (sans le Denhardt's): 5X_SSC, ADN de sperme de saumon_100µg/ml ; Tampon 4 : Tampon d'hybridation utilisé dans le cadre de l'hybridation entre deux oligonucléotides de même taille et parfaitement complémentaires : 5X_SSC, 0,1%_SDS. M représente la valeur médiane des gains de chaque boxplot. Les paramètres du lecteur de diffraction sont : puissance (p) : 1mW et gain (g) : 0.

La présence de Denhardt's et/ou d'ADN de sperme de saumon dans le tampon d'hybridation, entraîne une augmentation de l'intensité diffractée par les réseaux traduite par l'obtention d'un gain positif (Figure 127a) et b)). Alors que l'absence de ces deux agents de saturation (tampon 4), conduit à un gain négatif en diffraction. Cet effet est observé sur des réseaux de lignes de dendrimères avec ou sans oligonucléotides sondes.

De plus, si l'on compare les valeurs de gains obtenues après incubation du Tampon 1 sur les réseaux de dendrimères composés d'oligonucléotides sondes avec ceux sans oligonucléotides, les médianes des gains sont supérieures pour les réseaux de lignes constitués uniquement de dendrimères (25%). Une possible interprétation de ces résultats serait que :

Les dendrimères sont plus disponibles pour l'absorption non spécifique du Denhardt's et l'ADN de sperme de saumon que, dans le cas des lignes constituées de dendrimères « recouverts » d'oligonucléotides sondes. »

En conclusion, la solution de Denhardt's ainsi que l'ADN de sperme de saumon modifient les propriétés des réseaux conduisant à l'obtention d'un gain positif en diffraction. Les résultats obtenus à partir de réseaux de lignes composées uniquement de dendrimères montrent que ces éléments peuvent se fixer directement sur les dendrimères dont les fonctions aldéhydes ont été au préalable réduites en fonctions alcools. Le choix des éléments du tampon d'hybridation est donc primordial. C'est l'ensemble des conditions d'hybridation qui doivent être repensées pour la détection par diffraction afin d'éviter l'obtention de résultats faux positifs.

D.3. Adaptation du protocole expérimental à la détection par diffrapuce de *Legionella pneumophila*

Cette section est consacrée à la détection de l'hybridation entre la sondes *rpoB* et le fragment PCR qui lui est complémentaire en utilisant un tampon sans agent « saturant ».

Les cinq conditions expérimentales listées dans le Tableau 16 ont été testées avec 12 réseaux différents afin de valider la détection de l'hybridation pour l'identification de *Legionella pneumophila* par diffrapuce. L'adressage d'oligonucléotides sondes sur les réseaux de lignes a été réalisée par incubation d'une goutte de solution de sondes. Hormis le changement du tampon d'hybridation, les conditions d'hybridation sont inchangées (température, temps d'incubation, lavages...).

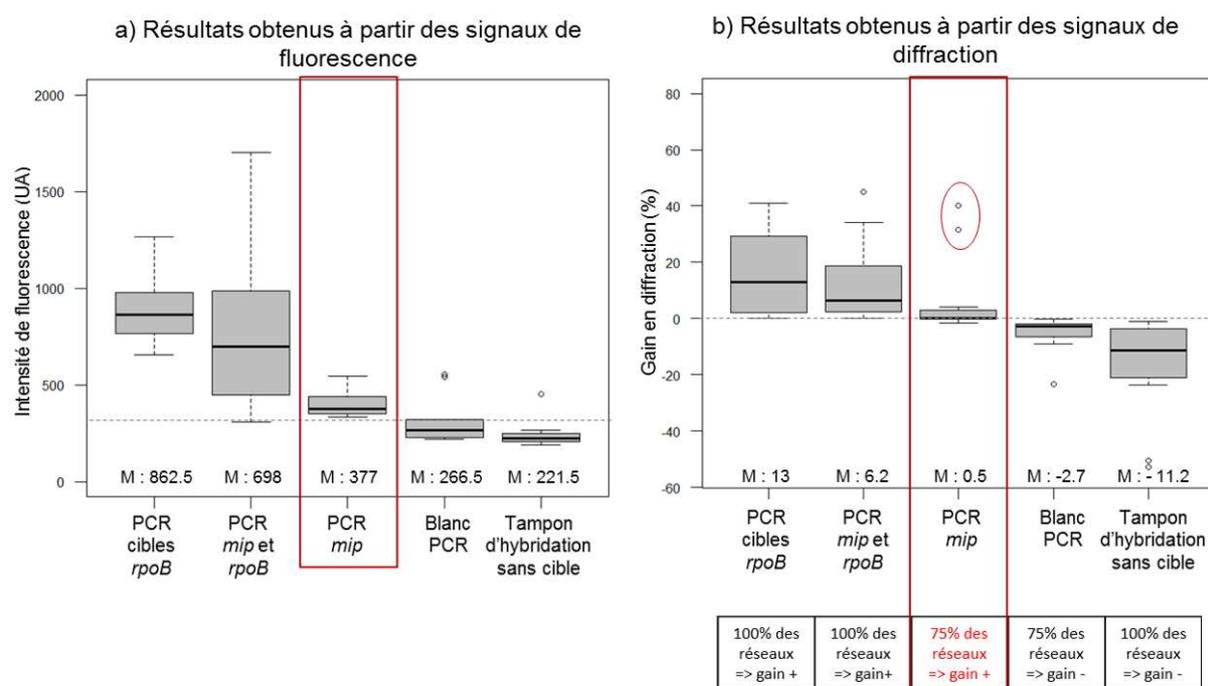


Figure 128 : Mesure a) des signaux de fluorescence et b) des gains de diffraction pour la détection de *Legionella pneumophila* à partir du gène *rpoB* par diffrapuce (sondes *rpoB* utilisée à 5 μ M). De gauche à droite : 1^{er} « boxplot » incubation du produit PCR cible (*rpoB*) (750ng), 2nd « boxplot » incubation du produit PCR *rpoB* et *mip* (750ng), 3^{ème} « boxplot » incubation du produit PCR non complémentaire *mip* (750ng), 4^{ème} « boxplot » incubation du tampon d'hybridation avec le blanc de la PCR, 5^{ème} « boxplot » incubation du tampon utilisé pour l'hybridation sans les cibles. M représente la médiane des valeurs de chaque boxplot. Les paramètres du scanner de fluorescence (Innoscan 900) sont : PMT $\lambda=532$ nm et PMT $\lambda = 635$ nm : 100%. Les paramètres du lecteur de diffraction sont : puissance (p) : 1mW et gain (g) : 0.

Les signaux de fluorescence sont significativement supérieurs après hybridation des acides nucléiques complémentaires sur la sonde *rpoB* en comparaison avec les trois contrôles négatifs. Ces résultats valident l'hybridation spécifique des cibles sur les réseaux de la diffrapuce (Figure 128a)). Néanmoins, notons que dans le cas de l'incubation du produit PCR non complémentaire *mip* (3^{ème} boxplot) la médiane des intensités de fluorescence est inférieure à celles obtenues dans le cas des hybridations spécifiques mais supérieures aux médianes des deux autres contrôles négatifs. Cela signifie qu'une faible quantité de produit PCR *mip* est accrochée de façon non spécifique sur la diffrapuce. Ce résultat peut être la conséquence de l'absence des agents « saturants » dans le tampon d'hybridation.

Les résultats de diffraction montrent que 100% des réseaux ont un gain positif après l'hybridation spécifique (+13% et +6,2%) (Figure 128b). Les gains obtenus après l'incubation des cibles complémentaires uniquement sont supérieurs à ceux obtenus après l'incubation d'un mélange de cibles complémentaires et non complémentaires. Néanmoins ces résultats ne permettent pas de discriminer l'hybridation spécifique des acides nucléiques issus de la PCR du gène *RpoB* de *Legionella pneumophila* car seulement 2 des 3 contrôles négatifs montrent un gain en diffraction négatif. Lorsque les acides nucléiques non complémentaires (produit PCR *mip*) à la sonde *rpoB* sont incubés sur la puce, 75% des réseaux donnent un gain positif. Il semblerait que la faible quantité de produits PCR *mip* ayant interagi de façon non spécifique sur la diffrapuce détectée très faiblement en fluorescence soit la cause de l'obtention de gains positifs.

Lorsque les acides nucléiques non complémentaires (produit PCR *mip*) sont incubés sur des réseaux de lignes avec ou sans sondes les valeurs médianes des gains sont positives (+0.2% et +0.4%) et proches de zéro (Figure 129). Néanmoins, même si elles sont proches de zéro, la dispersion des données des gains de diffraction est comprise entre 0 et +15%. Ces résultats signifient que les oligonucléotides cibles se fixent directement sur les dendrimères conduisant à la modification de la « géométrie » des réseaux (hauteur et/ou largeur des lignes) et/ou à l'augmentation de l'indice optique des lignes se traduisant par un gain positif en diffraction.

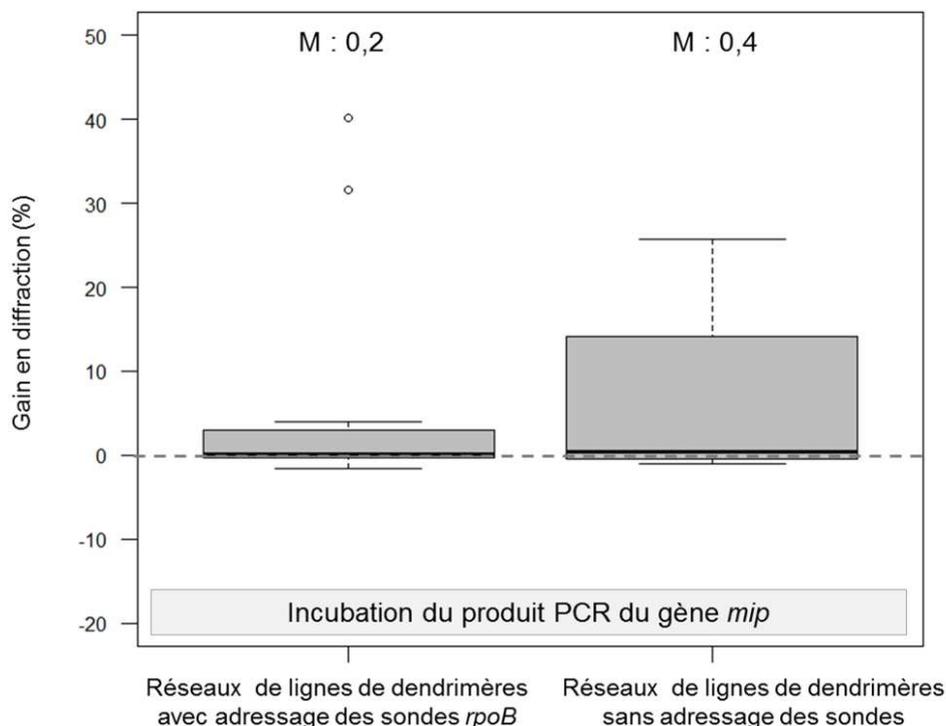


Figure 129 : Mesure des gains obtenus à partir des intensités de diffraction pour 2 conditions expérimentales : de gauche à droite : 1^{er} « boxplot » incubation du tampon contenant les produits PCR du gène *mip* de *Legionella pneumophila* (750ng) sur les réseaux avec les sondes *rpoB* (5 μ M), 2nd « boxplot » incubation du tampon contenant les produits PCR du gène *mip* de *Legionella pneumophila* (750ng) sur les réseaux sans adressage des sondes. Dans les deux cas, les

12 réseaux étudiés ont été réduits dans une solution de borohydrure de sodium avant l'incubation du tampon contenant les produits PCR. M représente la médiane des gains de diffraction pour chaque boxplot. Les paramètres du lecteur de diffraction sont : puissance (p) : 1mW et gain (g) : 0.

En conclusion, les conditions d'hybridation ne permettent pas de détecter la présence ou non de *Legionella pneumophila* par diffrapuce. Sans les agents « saturants » du tampon d'hybridation, les interactions non spécifiques cibles-dendrimères modifient l'intensité de lumière diffractée par le réseau et sont détectées au même titre que les interactions spécifiques cibles-sondes. Ces résultats conduisent à la détection de faux positifs.

E. Conclusion

En conclusion, les travaux de structuration de surface développés dans le chapitre 3 pour la conception de réseaux d'oligonucléotides sondes sont parfaitement adaptés à l'hybridation de cibles complémentaires. Nous avons montré que, l'hybridation entre deux oligonucléotides parfaitement complémentaires pour un cas « d'école » est détectable en diffraction. Les résultats obtenus sont en accord avec les travaux de simulation présentés au début de ce chapitre.

Les travaux menés sur la transposition d'un modèle de biopuce à fluorescence pour la détection par diffrapuce (détection d'une bactérie environnementale) ont montré que les conditions d'hybridation mises au point pour la détection par fluorescence ne le sont pas pour la détection par diffrapuce. Dans le cas des biopuces à fluorescence le tampon d'hybridation contient des agents dits « saturants » ou « passivants » pour limiter les interactions non spécifiques des molécules cibles avec le support communément appelé le « bruit de fond ». Ce type de molécules tel que le Denhardt's, l'ADN de sperme de saumon ou l'albumine de sérum bovin (BSA) interagissent avec la surface et bloquent ainsi tout accrochage non spécifique des cibles directement sur le support. Dans le cas de la diffrapuce et comme pour les biopuces à fluorescence, il est indispensable de limiter l'accrochage non spécifique des molécules cibles sur les réseaux de lignes au risque de détecter de faux positifs. Cependant, l'approche utilisée par les biopuces à fluorescence n'est pas applicable pour la détection par diffrapuce. En effet, les agents dits « passivants » interagissent directement avec les dendrimères composant les lignes des réseaux. La technique de détection est sensible aux variations de la hauteur des lignes des réseaux, ce qui conduit à l'obtention d'un gain en diffraction positif même en absence d'hybridation spécifique.

L'ensemble de ces travaux a permis de mettre en évidence plusieurs points:

1. La nanostructuration et l'adressage des molécules sondes sont déterminants pour la biodétection par diffraction. Si la périodicité des réseaux n'est pas respectée pendant la

nanostructuration alors les résultats peuvent être faussés par l'apparition de faux négatifs. Dans ce cas, l'hybridation a bien eu lieu mais n'est pas identifiable par l'étude des signaux de diffraction.

2. Dans certains cas, les intensités des faisceaux diffractés par les réseaux sont supérieures au maximum des intensités détectables par le lecteur de diffraction (Figure 130). Ces signaux dits « saturants » sont inexploitable, pour la détection d'une hybridation car il est impossible de comparer la valeur réelle de diffraction avant et après l'étape d'hybridation. Ces signaux de diffraction en dehors de la gamme de lecture du scanner de diffraction sont la conséquence de la hauteur des lignes supérieure à la moyenne de certains réseaux. Cette limitation est due à l'utilisation d'un capteur ayant une gamme de lecture trop petite. La société Innopsys a prévu de faire évoluer le scanner de diffraction en ajoutant un deuxième capteur avec une plus grande dynamique de lecture.

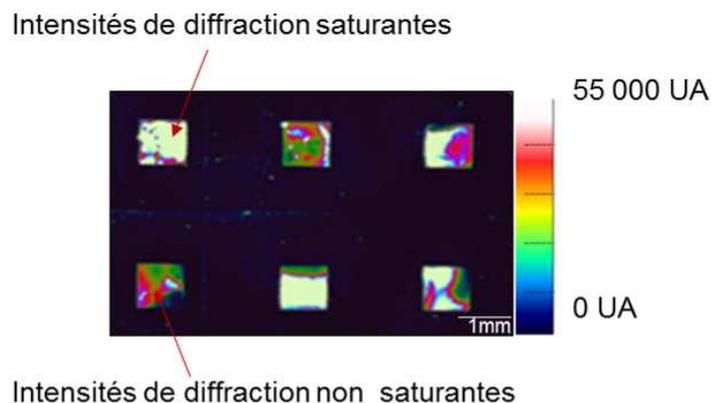


Figure 130 : Image issue du scanner de diffraction (diffrascan) de la représentation des intensités de diffraction de 6 réseaux. L'échelle de couleur stipule que les pixels blancs représentent des intensités de diffraction supérieures à 55 000 UA dites « saturantes ». Paramètres du lecteur de diffraction : puissance (p) : 1 mW et gain (g) : 0.

3. Ces travaux ont mis en évidence la sensibilité de la technique qui permet de détecter de très faibles quantités de molécules hybridées sur les réseaux d'oligonucléotides sondes (faible intensité de fluorescence des réseaux très proche du « bruit de fond » de la puce après hybridation). Néanmoins, toute modification de la « géométrie des réseaux et/ou de l'indice de réfraction des lignes par quel que biais que ce soit (comme les interactions non spécifiques avec les lignes du réseau), sera aussi détecté par diffraction.
4. Il semblerait que contrairement à la détection par fluorescence, la détection par diffraction ne soit pas directement corrélée à la concentration en sondes. En effet, nous avons vu que les signaux de fluorescence après hybridation augmentaient avec la concentration en sondes jusqu'à atteindre un palier alors que le gain en diffraction ne change pas avec l'augmentation de la concentration des sondes déposées.

5. La taille des ADN cibles semble avoir un impact sur la variation quantitative des signaux de diffraction. En effet, les interactions non spécifiques cibles-dendrimères non détectés en diffraction pour le « cas d'école » avec de cibles de 26 bases le sont pour des cibles de 600 bases dans le cas de la détection de *Legionella pneumophila*.

En perspective, le tableau ci-dessous répertorie les apports issus de ces travaux ainsi que de futurs travaux à envisager:

Tableau 17 : Synthèse et perspectives de travaux pour l'amélioration de la détection par diffrapuce.

	Apports issus de ces travaux	Perspectives de travaux
<u>Fabrication de l'outil et « design » des couples sondes-cibles.</u>		
Nanostructuration de surface.	Le contrôle de la nanostructuration de surface (arrangement périodique des réseaux).	Amélioration du procédé et contrôle de la qualité de fabrication.
Adressage des molécules sondes.	Les procédés de fonctionnalisation couplés aux procédés de nanostructuration de surface avec des dendrimères répondent parfaitement aux attentes de l'adressage des molécules sondes préférentiellement sur les lignes des réseaux. Le procédé « tout en un » est le plus rapide à mettre en place.	Etude de la taille des sondes couplée aux procédés de fonctionnalisation sur l'efficacité de l'hybridation.
« Design » des couples sondes-cibles.	Dans un premier temps le « design » doit respecter le principe des biopuces à ADN. Les sondes et les cibles doivent avoir une bonne spécificité et sensibilité pour discriminer au mieux les différentes entités biologiques à identifier.	Etude de la taille des molécules cibles sur les signaux de l'hybridation en termes de gain en diffraction. Etude de l'effet du positionnement de la sonde sur les cibles (extrémité 5', 3' ou positionné au milieu) sur le gain en diffraction.
<u>Conditions d'hybridation.</u>		
Conditions d'hybridation.	De même que pour la puce à fluorescence il est indispensable de mettre au point les conditions de température de l'hybridation et de stringence du tampon d'hybridation pour favoriser les hybridations spécifiques cibles-sondes complémentaires et hybridations	

	cibles-sondes non complémentaires.	
<p>Limiter l'hybridation non spécifique.</p>	<p>Comme pour les biopuces à fluorescence il est nécessaire de limiter les interactions non spécifiques cibles-dendrimères. Cependant, la « saturation » de surface doit être découplée de l'hybridation au risque d'une fausse interprétation des résultats.</p>	<p>Augmentation du temps de réduction de la diffrapuce avant hybridation permet-elle de limiter les interactions non spécifiques cibles-dendrimères</p> <p>Ajouter une étape de « saturation » de surface avant l'hybridation en incubant au préalable des agents « saturants » pour limiter les interactions non spécifiques cibles-dendrimères.</p>
<p>Protocoles de lavage.</p>	<p>Les protocoles de lavages permettent principalement de limiter les interactions sondes-cibles non spécifiques. Ils peuvent contribuer à éliminer une partie des interactions non spécifique cibles-dendrimères mais ne sont pas suffisants.</p>	
<u>Systeme de détection.</u>		
<p>Scanner de diffraction.</p>	<p>Le capteur du lecteur a une gamme de lecture trop petite pour certain réseau.</p>	<p>Ajout d'un deuxième capteur avec une plus grande dynamique de lecture.</p>

Ces travaux posent les bases d'une nouvelle approche de la détection sans marquage. Nous pouvons considérer que les procédés de nanostructuration sont validés car ils permettent la fabrication des réseaux de lignes d'oligonucléotides sondes robustes et accessibles à l'hybridation avec leurs cibles complémentaires. En changeant le système de détection, c'est toute la conception de la puce et les protocoles d'hybridation qui s'avèrent modifiés. Les conditions de l'hybridation depuis le choix de la taille des sondes et des cibles qui interagissent jusqu'aux conditions d'hybridation et de lavage de la puce doivent être repensés. Il faudra résoudre la question des interactions non spécifiques et s'assurer que les valeurs de diffraction collectées sont dépendantes de la réponse biologique attendue et non pas d'artéfact présents dans le système biologique.

Conclusions générales et perspectives

Ces travaux de thèse sont inscrits dans un contexte très interdisciplinaire. Trois aspects de la conception de biopuces à ADN ont été traités dans un même but : rendre la technologie des biopuces à ADN accessible au marché du diagnostic *in vitro*. Pour que la technologie soit simplifiée tout en étant fiable, robuste, rapide et peu onéreuse, nous avons identifié l'adressage des molécules sondes et la détection des signaux de l'hybridation comme deux verrous technologiques limitant le développement de cette technologie.

Dans le chapitre 1, j'ai développé le procédé de « confinement » pour la fonctionnalisation de surface. Ce procédé permet de réduire considérablement le temps de fonctionnalisation d'une surface par des dendrimères ainsi que la quantité de dendrimères consommée en fonctionnalisant seulement la zone d'intérêt sur la puce. Ce procédé présente également comme avantage de structurer topographiquement la fonctionnalisation selon un large choix de motifs. Adapté à la production de lames pour la conception de biopuces à ADN, il permet d'augmenter les signaux de fluorescence après l'hybridation. De plus, ce nouveau procédé permet de structurer des motifs non réalisables par d'autres techniques de lithographie douce avec des facteurs de forme incompatibles avec l'élasticité du PDMS.²³⁹

Ces travaux ont également conduit à la mise au point d'un procédé innovant de co-fonctionnalisation de surface, nommé « tout en un ». Il permet de fonctionnaliser un support solide avec des dendrimères par « confinement » et d'adresser des biomolécules sur ces derniers simultanément. Cette technique rapide et à bas coût permet de structurer la double fonctionnalisation selon des motifs micro ou nanométriques en quelques minutes. De plus, il a pour avantage d'être plus performant que le microcontact printing pour le dépôt d'oligonucléotides sondes. Ainsi, les signaux de l'hybridation sont augmentés. Ces travaux sont innovants et font l'objet de la rédaction d'un brevet d'invention.

Dans le chapitre 2, les travaux menés sur l'Innostamp 40 ont permis de valider le dépôt multiplexé d'oligonucléotides par cette technologie basée sur le μ CP. Néanmoins, ces travaux ont mis en évidence de grandes variations dans la répétabilité et la reproductibilité des dépôts par μ CP. A ce titre, il semblerait que la qualité des macrotimbres et l'efficacité du procédé d'encrage soient les principales causes de ces variations. Le déplacement contrôlé de la ligne triple pendant l'étape d'encrage est la clé d'un dépôt homogène. Pour améliorer l'homogénéité des dépôts d'oligonucléotides avec l'Innostamp 40, il semble donc nécessaire de développer un nouveau procédé permettant le contrôle du déplacement de la ligne triple pendant l'étape d'encrage des macrotimbres.

²³⁹ A. Bietsch, B. Michel, J. of Appl. Phys., 2000, 88, 7, 4310-4318.

Les chapitres 3 et 4 ont été consacrés à la mise au point et à la validation de la détection sans marquage d'une hybridation ADN-ADN. Les travaux ont montré que, les procédés de nanostructuration de surface développés pour la conception de réseaux d'oligonucléotides sondes étaient parfaitement adaptés à l'hybridation de cibles complémentaires. Ils ont ainsi permis de valider expérimentalement et pour la première fois la détection d'une hybridation par diffrapuce sur un cas « d'école ». Néanmoins, la transposition d'un modèle de biopuce à fluorescence pour la détection par diffrapuce (détection d'une bactérie environnementale) a montré que les conditions d'hybridation mises au point pour la détection par fluorescence ne le sont pas pour la détection par diffrapuce. L'ensemble de ces travaux a permis de mettre en évidence plusieurs points :

La nanostructuration et l'adressage des molécules sondes sont déterminants pour la biodétection par diffraction.

1. Toute modification de la « géométrie » des réseaux et / ou de l'indice de réfraction des lignes par quelque biais que ce soit comme les interactions non spécifiques avec les lignes du réseau sera détectée par l'étude des signaux de diffraction.
2. Il semblerait que contrairement à la détection par fluorescence, la détection par diffraction ne soit pas directement corrélée à la concentration en sondes.
3. La taille des ADN cibles semble avoir un impact sur la variation quantitative des signaux de diffraction.

En perspective, ces travaux posent les bases d'une nouvelle approche de la détection sans marquage. Nous pouvons considérer que les procédés de nanostructuration sont validés car ils permettent la fabrication des réseaux de lignes d'oligonucléotides sondes robustes et accessibles à l'hybridation avec leurs cibles complémentaires. En changeant le système de détection, c'est toute la conception de la puce et les protocoles d'hybridation qui s'avèrent modifiés. Les conditions de l'hybridation depuis le choix de la taille des sondes et des cibles qui interagissent jusqu'aux conditions d'hybridation et de lavage de la puce doivent être repensées. Il faudra résoudre la question des interactions non spécifiques et s'assurer que les valeurs de diffraction collectées sont dépendantes de la réponse biologique attendue et non pas d'artéfacts présents dans le système biologique. Pour cela, nous proposons de :

1) Repenser les protocoles de l'hybridation en découplant l'étape de passivation des réseaux de sondes et celle de l'hybridation.

2) Coupler l'hybridation à un système de microfluidique pour que l'hybridation ne soit pas réalisée en statique. Le but est que l'hybridation soit réalisée au travers d'un flux de solution dans le sens des lignes pour limiter les absorptions non spécifiques.

D'un point de vue de la conception de la puce, le multiplexage et l'automatisation de la fabrication pourrait être envisagé avec l'Innostamp 40. L'ajout d'un système de pipetage pour l'étape de confinement est déjà en pourparlers avec la société Innopsys.

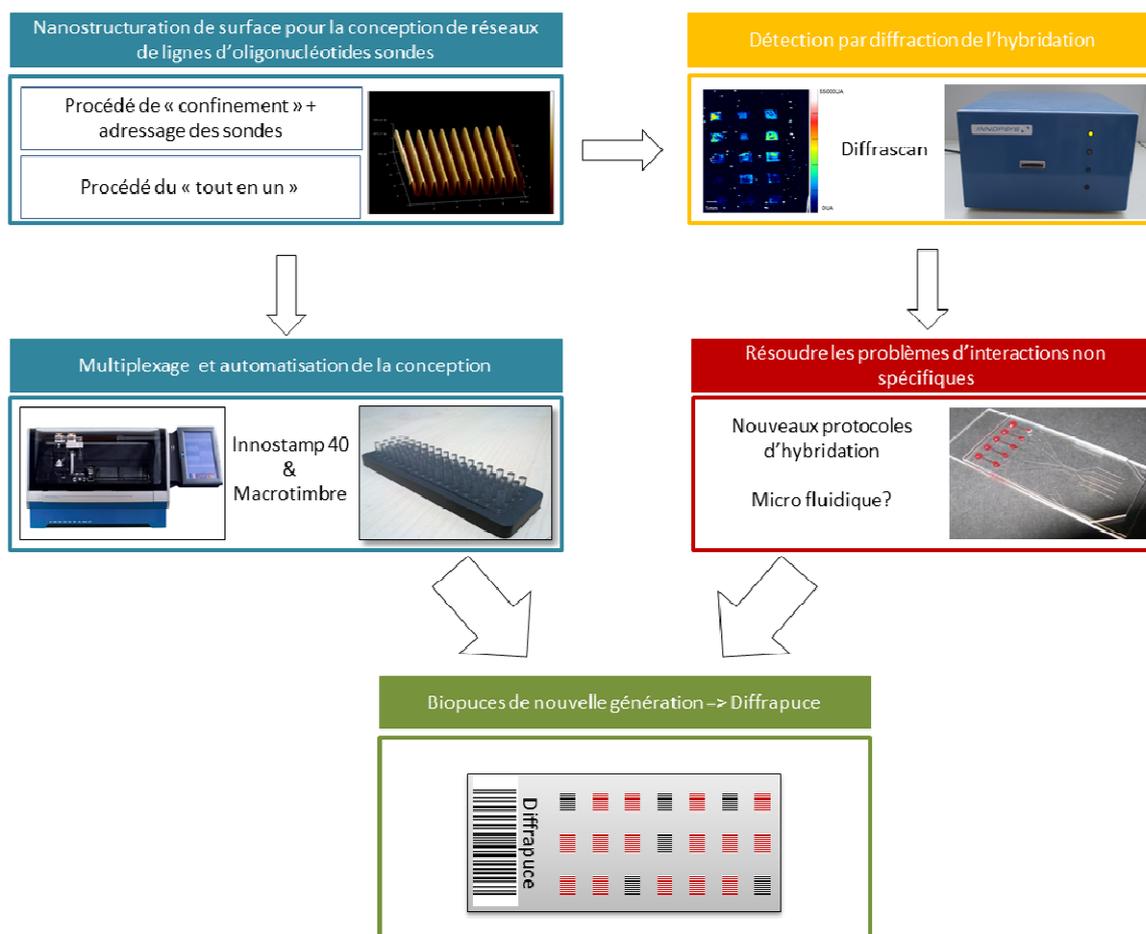


Figure 131 : Diagramme représentant la conception d'une biopuce de nouvelle génération : la Diffrapuce

La Figure 131 illustre la conception d'une puce de nouvelle génération (la diffrapuce) dont le principe de détection sans marquage d'une hybridation est basé sur la diffraction de la lumière.

Ces travaux combinés aux thèses soutenues précédemment (C. Thibault (2007)²⁴⁰, H. Lalo (2009)²⁴¹, JC Cau (2009)²⁴² et A. Egea (2012)²⁴³) démontrent tout le potentiel de la lithographie douce et de la biodétection sans marquage pour simplifier la conception technique des biopuces. De plus, ces travaux suggèrent des améliorations des outils de dépôts (Innostamp 40) et de lecture (diffrascan) pour un développement pré industriel.

²⁴⁰ C. Thibault, Thèse INSA, Toulouse, 2007.

²⁴¹ H. Lalo, Thèse INSA, Toulouse, 2009.

²⁴² J.C. Cau, Thèse INSA, Toulouse, 2009.

²⁴³ A. Egea, Thèse INSA, Toulouse, 2012.

Matériel et Méthodes

M

&

W

Dans cette partie est décrit l'ensemble du matériel et des méthodes utilisé dans ces travaux de thèse.

A. Le matériel

A.1. Produits et Solvants :

Produits ou solvants		Fournisseur
NaH ₂ PO ₄ :	Phosphate de sodium.	<i>Sigma-Aldrich.</i>
NaBH ₄ :	Borohydrure de sodium.	<i>Sigma-Aldrich.</i>
SSC :	Saline Sodium Citrate. 0,3M citrate de sodium, 3M NaCl.	<i>Corning.</i>
SDS	Sodium Dodécyl Sulfate (CH(C ₃ H ₂) ₁₁ OSO ₃ Na).	<i>Corning.</i>
APTES	3-Aminopropyltriéthoxysilane	<i>Sigma-Aldrich</i>
Dendrimères	Aldéhydes phosphoré G4	Synthétisés par Marjorie Séverac (<i>Société Dendris</i>)
Dendrimères PAMAM	G4	<i>Sigma-Aldrich</i>
Polybutadiène 1,2-NH ₂ : masse molaire moyenne 15000 g/mol	-	Solutions contenues dans du THF ou Toluène fournies par Juliette Fitremann (<i>IMRCP, CNRS UMR 5623</i>).
Tétrahydrofurane (THF)		<i>Sigma-Aldrich.</i>
EtOH	Ethanol absolu et technique	<i>Sigma-Aldrich.</i>
Isopropanol		<i>Sigma-Aldrich.</i>
PDMS :	Sylgard 184	<i>Corning</i>
Polyuréthane	Smoth cast 310	Fourni par la société <i>Innopsys</i>
Résine époxy	Delo-Katio-bond 4552	Fournie par la société <i>Innopsys</i>

A.2. Supports

Lame époxysilane : Nexterion Slide E, *Schott*.

Dendrilames : Lames préparées par Marjorie Séverac (*Société Dendris*).

Lame de verre. *Delta microscopie*.

Lames de verre activées : Plasma O₂ pendant 5 min, à 800 W, *Electronic diener*.

A.3. Matériel biologique

L'ensemble des oligonucléotides utilisés (*Sigma-Aldrich*) dans ces travaux de thèse sont utilisés dans du tampon phosphate (Na_2HPO_4) à 0.3M, pH 9.

Oligonucléotides marqués par un fluorophore :

5'-[NH₂]-TAT-ACT-CCG-GGA-AAC-TGA-CAT-CTA-G-[Cy5]-3'

5'-[NH₂]-TAT-ACT-CCG-GGA-AAC-TGA-CAT-CTA-G-[Cy3]-3'

Oligonucléotides sondes (fragment du gène HSP12) :

5'-[NH₂]-AAT-ATG-TTT-CCG-GTC-GTC-TC-3'

Oligonucléotides cibles complémentaires marqués (fragment du gène HSP12) :

5'-[Cy5]-GAG-ACG-ACC-GGA-AAC-ATA-TT-3'

Oligonucléotides cibles non complémentaires marqués :

5'-[Cy5]-TTT-AGC-TTT-TGC-TGG-CAT-ATT-TGG-GCG-GAC-A-3'

Amorces PCR pour l'amplification d'un fragment du gène *mip* de *Légionella Pneumophila* :
(NC_ confidentielles)

Amorces PCR pour l'amplification d'un fragment du gène *rpoB* de *Légionella Pneumophila*
(NC_ confidentielles).

Oligonucléotide sondes l'hybridation d'un fragment du gène *rpoB* de *Légionella Pneumophila*
(NC_ confidentielles).

ADN génomique de *Légionella Pneumophila*, souche ATCC 33152. *LGC Promochem*.

B. Méthodes de fonctionnalisation de surface

B.1. Fabrication d'un timbre en PDMS

Les timbres sont fabriqués en polydiméthylsiloxane (PDMS, Sylgard 184). Le PDMS est un mélange de deux composants : un oligomère (silicone) et un agent réticulant. Ces derniers sont mélangés selon les proportions suivantes 10/1 en masse (comme indiqué par le fournisseur). Ce mélange est dégazé puis injecté sur le moule en silicium dans le support de fabrication de timbre adapté à cet outil. Après 6 h de réticulation à 80°C, le timbre est prêt à être utilisé. Le timbre utilisé avec le robot Gésim, est formé d'une pièce en plexiglass et d'une membrane circulaire en PDMS de 1.5 cm de diamètre la méthode de fabrication est identique. Les moules micro et nanostructurés utilisés ont été réalisés par Amandine Egea ou Carlos Bartual dans la centrale RTB du LAAS-CNRS dans la cadre du projet ANR Innodiag.

B.2. Fonctionnalisation de lames de verre par des amines en utilisant un aminosilane (APTES 5%)

Les lames de verre sont activées dans un bain de soude (50 g de NaOH dans 200mL d'eau ultrapure et 300mL d'EtOH à 96% soit une solution de soude à 2.5 M) pendant 30 min à température ambiante et sous agitation (agitateur tridimensionnel 23 tr/min). Les lames sont ensuite rincées jusqu'à retour à la neutralité (3 bains de 5 min dans de l'eau ultrapure sous agitation_23tr/min) et transférées dans un bain d'éthanol 96% (5min) avant l'étape de silanisation. Puis elles sont trempées dans une solution d'APTES à 5% (25 mL d'APTES dans 475 mL d'EtOH 96%) pendant 30 min sous agitation (agitateur tridimensionnel 23tr/min). Elles sont ensuite rincées dans un bain d'EtOH 96% sous agitation (agitateur tridimensionnel 23tr/min) pendant 5 min et dans un bain d'EtOH absolu sous agitation (agitateur tridimensionnel 23tr/min) pendant 5 min. Pour terminer, les lames sont séchées par centrifugation (8 min à 500 rpm) et placées à l'étuve pendant 1 h à 120°C.

B.3. Fonctionnalisation de lames de verre par des dendrimères par « confinement »

Dans ces travaux de thèse, toutes les fonctionnalisations réalisées par confinement ont été réalisées avec le robot de microcontact printing GeSiM μ -CP 3.0. Le procédé de fonctionnalisation par des dendrimères est réalisé sur lames de verre fonctionnalisées par des fonctions amines (protocole décrit dans la partie B.2). Une goutte de 60 μ L de solution de dendrimères à une concentration de 58 μ M dans le THF est piégée entre la structure du timbre en PDMS et la lame de verre fonctionnalisée par des fonctions amines. La totalité de la solution est ensuite confinée sur la lame de verre « amine » jusqu'à évaporation du solvant (5 min). Pendant l'étape de confinement, les dendrimères sont contraints de s'assembler sur la lame selon les motifs présents sur le timbre.

B.4. Méthodes de co-fonctionnalisation de surface (le « tout en un »)

Le procédé du « tout en un », l'encrage du timbre est réalisé par dépôt d'une goutte de solution de biomolécules sur le timbre pendant 1 min. La goutte est ensuite retirée par aspiration à l'aide d'une pipette et le timbre séché sous un flux d'azote. Pour éliminer les oligonucléotides seulement sur le dessus des motifs, le timbre encré est mis en contact avec une lame de verre pendant 1 min pour un transfert des oligonucléotides du timbre vers la lame (Figure 132).

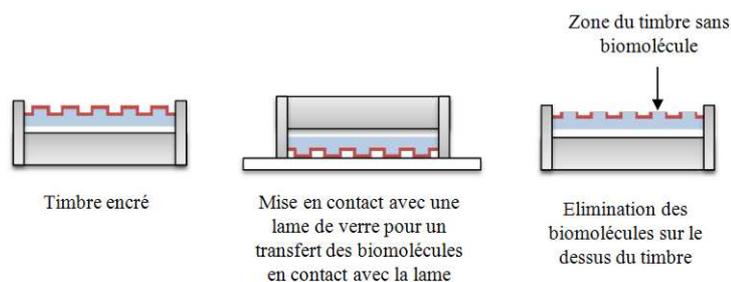


Figure 132 : Schéma représentant l'étape permettant d'éliminer les oligonucléotides seulement sur le dessus des motifs.

Une goutte de 60 μL de solution de dendrimères à une concentration de 58 μM dans le THF est piégée entre la structure du timbre en PDMS et la lame de verre fonctionnalisée par des fonctions amines. La totalité de la solution est ensuite confinée sur la lame de verre « amine » jusqu'à évaporation du solvant (5 min). Pendant l'étape de confinement, les dendrimères sont contraints de s'assembler sur la lame selon les motifs présents sur le timbre en PDMS. Simultanément, les molécules encrées sur le timbre sont transférées sur les dendrimères.

B.5. Dépôt par microcontact printing manuel

L'encrage du timbre se fait par dépôt d'une goutte de solution de biomolécules sur le timbre pendant 1 min. La goutte est ensuite retirée par aspiration à l'aide d'une pipette et le timbre est séché sous un flux d'azote. Puis, le timbre est mis en contact avec le support pendant 1 min pour un transfert des oligonucléotides selon les motifs du timbre.

B.6. Dépôt par microcontact printing avec le robot GeSiM $\mu\text{-CP}$ 3.0.

L'outil GeSiM $\mu\text{-CP}$ 3.0 (*Gesim*) est un robot de microcontact printing semi-automatisé et non multiplexé (Figure 133).

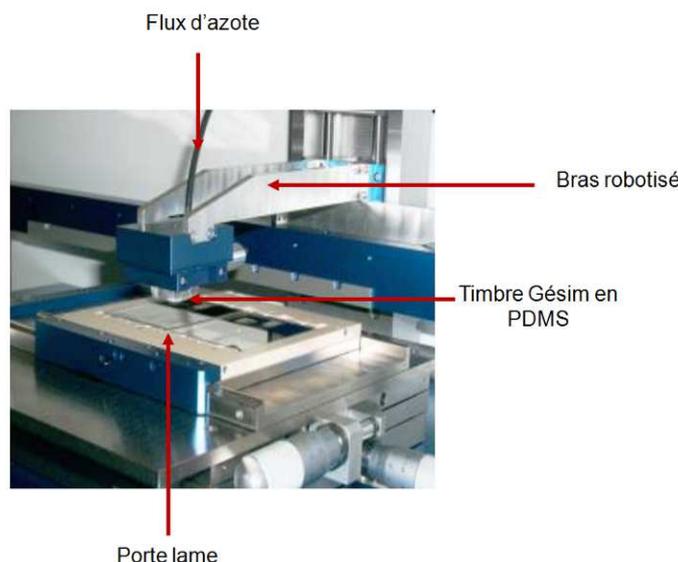


Figure 133 : Outil semi-automatique de microcontact printing Gésim (Semi microcontact printing system 3.0).

Dans le cas de notre application, l'encrage du timbre se fait par dépôt d'une goutte de solution de biomolécules sur le timbre pendant 1 min. La goutte est ensuite retirée par aspiration à l'aide d'une pipette et le timbre est séché sous un flux d'azote. Le timbre est ensuite placé sur le bras motorisé de l'appareil qui va l'amener en contact avec la lame située dessous (Figure 133). Lors du dépôt, la membrane de PDMS est légèrement déformée par un flux d'azote injecté par le dessus du timbre. Ainsi les molécules encrées sur le timbre vont être transférées selon les motifs par un contact doux sur la surface de la lame de verre (Figure 134).

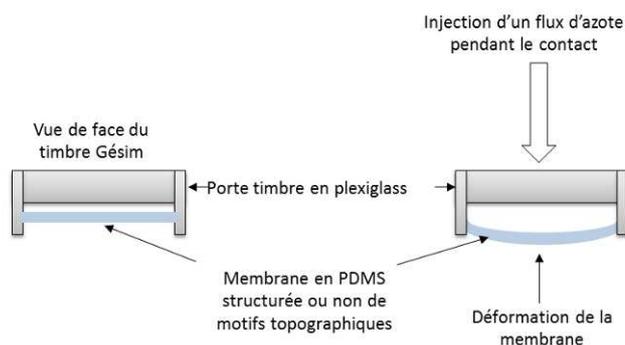


Figure 134 : Timbre de PDMS utilisé par l'outil de dépôt Gésim composé d'un porte timbre en plexi-glass et d'une membrane en PDMS.

Après le dépôt, la membrane en PDMS revient à son état initial puis le timbre est retiré. Cet outil permet de réaliser 3 dépôts par lame. Chaque lame fonctionnalisée avec des oligonucléotides sondes est structurée d'un ensemble de réseaux de lignes avec la même biomolécule, le multiplexage n'étant pas possible avec cet outil.

B.7. Dépôt par microcontact printing avec le robot Innostamp 40

L’Innostamp 40 (Figure 135a) permet à la fois d’automatiser le microcontact printing et de le multiplexer *via* l’utilisation d’un macrotimbre. Le robot est constitué de sept modules permettant de réaliser l’ensemble des étapes du microcontact printing (Figure 135b) :

- 1) Zone de préhension du timbre ;
- 2) Microplaquette à puits pour l’encrage ;
- 3) Zone de séchage ;
- 4) Zone de dépôt sur les lames ;
- 5) Zone de relargage du timbre ;
- 6) Zone de lavage du timbre ;
- 7) Zone de déchargement du timbre.

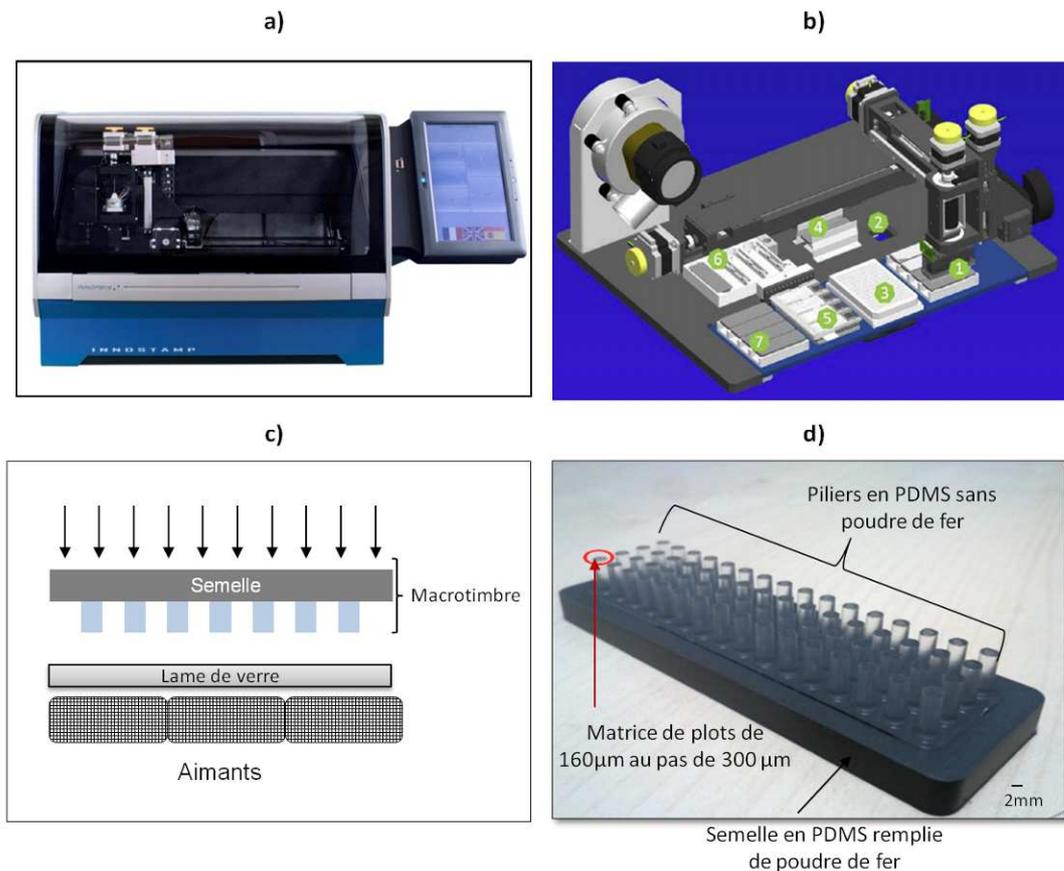


Figure 135 : a) Photographie représentant l’Innostamp 40 ; b) schéma représentant les modules de l’Innostamp 40 avec 1) zone de préhension du timbre, 2) microplaquette à puits pour l’encrage, 3) zone de séchage, 4) zone de dépôt sur les lames, 5) zone de relargage du timbre, 6) zone de lavage, 7) zone de déchargement du timbre ; c) schéma représentant le principe de contact entre le macrotimbre et la lame par l’application d’un champ magnétique; d) photo du macrotimbre constitué de 64 piliers et d’une semelle remplie de poudre de fer.

Les macrotimbres (Figure 135d) utilisés sont formés de 64 piliers en PDMS microstructurés à leur extrémité par matrice de plots de 160 µm de diamètre au pas de 300 µm. La semelle du macrotimbre en PDMS est remplie de poudre de fer (50% en masse).

L'ensemble de ces macrotimbres a été fabriqué par la société Innopsys propriétaire du robot de dépôt. L'encrage est réalisé dans une plaque de titration par l'Innostamp 40. Chaque pilier du macrotimbre est immergé dans un puits de la plaque pendant 1 min. Le timbre est ensuite séché au travers d'une grille par une moto-turbine (puissance et temps de séchage réglable). Puis il est mis en contact avec une lame de verre, le contact entre cette dernière et le timbre est réalisé imposé par un champ magnétique agissant sur la poudre de fer dans la semelle du macrotimbre (Figure 135c). Pour cela, 3 aimants sont positionnés sous la lame (le système de déplacement des aimants est décrit dans l'annexe 3). La force de contact entre le timbre et la lame est définie par la quantité de poudre de fer dans la semelle du timbre et la position de l'aimant par rapport à la lame. Plus l'aimant est proche de la lame, plus la force est grande. Le contact est maintenu pendant 1 min pour un transfert des oligonucléotides selon les motifs du timbre.

B.7.a. Lavage du macrotimbre

Pour le protocole par application d'un Scotch®, les piliers du macrotimbre sont mis en contact avec un morceau de scotch pendant 10 s puis, le scotch est retiré. Dans le cas du protocole de lavage par des bains d'eau ultrapure, d'éthanol et d'isopropanol, les piliers du macrotimbre sont immergés dans la solution de lavage pendant 5 min puis séché sous un flux d'azote.

B.8. Encrage dynamique d'un timbre en PDMS

Le timbre en PDMS est placé sur la plateforme motorisée de l'outil d'encrage dynamique avec les motifs du timbre sur le dessus. La solution d'encrage contenant les oligonucléotides (20 μ L) est maintenue dans un réservoir formé de deux lames en plastique hydrophobe (Deckgläser, Knit- tel-Glass, 24 mm \times 32 mm) espacées de 1 mm. Ce réservoir est mis en contact avec le timbre en PDMS selon un angle de 15°. Le timbre en PDMS déposé sur une plateforme motorisée (NewPortMFA-CC) et contrôlée par ordinateur est ensuite déplacé horizontalement avec une vitesse de 1 μ m/s. Le déplacement du ménisque est visualisé par la caméra d'un Digidrop (GBX).

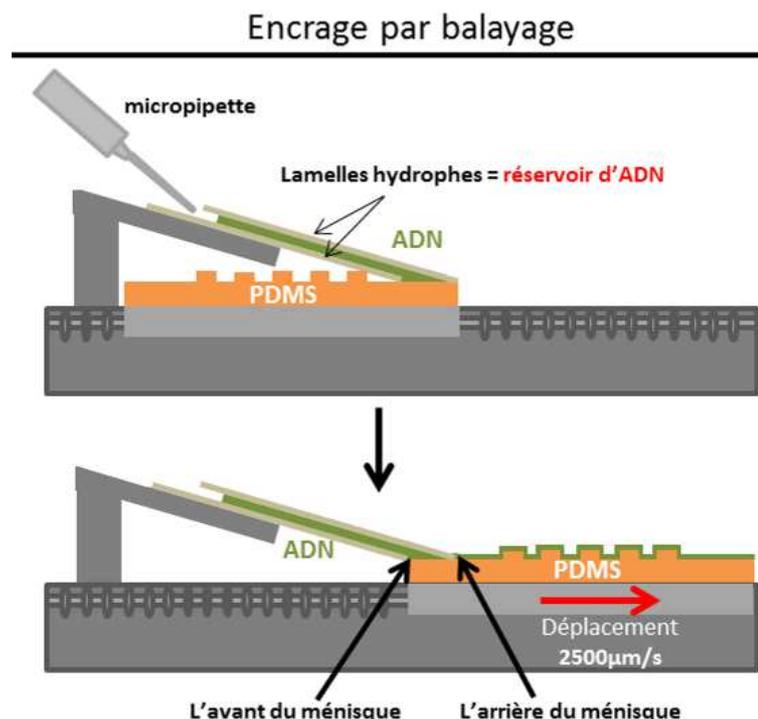


Figure 136 : Schéma représentant l'encrage dynamique par balayage.

B.9. Dépôt d'oligonucléotides par le robot à aiguilles

Les oligonucléotides à déposer sont disposés dans une plaque de titration. Le robot « spotteur » utilisant des aiguilles creuses (Q-Array mini, *Genetix*) prélève la solution à déposer dans les puits de la plaque pour déposer une goutte de quelques picolitres sur la lame par contact. Chaque spot mesure environ 150 µm de diamètre. Le spotting est réalisé à une humidité relative de 50% et une température de 22°C.

B.10. Réduction des fonctions imines après le dépôt d'oligonucléotides

Après 1 nuit de séchage sous atmosphère humide, les fonctions imines présentes entre les dendrimères et les oligonucléotides et entre la surface et les dendrimères sont réduites pendant 15 min ou 3 h (en fonction des protocoles) en utilisant une solution aqueuse de borohydrure de sodium (NaBH_4 , 3.5mg/mL). Elles sont ensuite rincées 3 fois dans un bain d'eau déionisée pendant 5 min et enfin séchées sous un flux d'azote. Cette étape permet de transformer des liaisons imines en liaisons amines. L'étape de réduction permet aussi de transformer les fonctions aldéhydes des dendrimères en fonction alcool, participant ainsi à la réduction du bruit de fond.²⁴⁴

²⁴⁴ N. Raghavachari, Y.P. Bao, G. Li, X. Xie et U.R. Muller, *Analytical Biochemistry*, 2003, 312, 101–105.

C. Méthodes de biologie moléculaire et hybridation des biopuces

C.1. Réaction en chaîne par polymérase (PCR) des fragments de gène *mip* et *rpoB* sur *Légionella Pneumohila*

Les PCR des fragments de gène *mip* et *rpoB* ont été réalisées à partir du génome complet de *Légionella Pneumohila* (souche ATCC 33152). Les séquences des amorces PCR et les conditions PCR ne sont pas communiquées pour cause de confidentialité. Les PCR ont ensuite été purifiées avec le kit MinElute® (*Qiagen*), dosées au Nanodrop 2000 (*Thermo Scientific*) et analysées par un gel électrophorèse (2%) avec comme intercalant le SYBER Safe® (*Invitrogen*). Le « blanc PCR » correspond à une PCR sans ajout de l'ADN génomique.

C.2. Protocoles d'hybridation des biopuces

C.2.a. Protocoles d'hybridation des sondes et cibles synthétiques issues du gène HSP12

Après réduction, les sondes sont mises en contact avec l'oligonucléotide complémentaire ou non complémentaire marqué en fluorescence à une concentration de 100 nM dans le tampon SSC 5X, 0,1% SDS, pendant 30 min à 37°C. Après l'étape d'hybridation les lames sont lavées (2x3min) dans un bain de 2X SSC, 0,2% SDS puis 1 fois (3min) dans un bain de 0,1X SSC sous agitation (1200 rpm). Enfin les lames sont séchées sous un flux d'azote.

*C.2.b. Protocoles d'hybridation des sondes et cibles de *Légionella pneumophila**

Après réduction, les sondes sont mises en contact avec les produits PCR complémentaires ou non complémentaires marqués en fluorescence (750 ng) dans le tampon constitué de solution de Dendhardt's (5X), tampon de citrate de sodium SSC (5X) et ADN de sperme de saumon (100µg/ml), pendant 30 min à 60°C. Après l'étape d'hybridation les lames sont lavées deux fois (3 min) dans un bain de 2X SSC, 0,2% SDS puis 1 fois (3 min) dans un bain de 0,1X SSC sous agitation (1200 rpm). Les lames sont enfin séchées sous un flux d'azote.

D. Méthode d'observation.

D.1. Scanner de fluorescence : Innoscan 700 ou 900 (*Innopsys*)

Chaque lame est analysée à l'aide d'un scanner de fluorescence en utilisant deux longueurs d'onde d'excitation (532 nm et 635 nm) adaptées aux marquages Cy3 et Cy5 respectivement. Les photomultiplicateurs (PMTs) de chaque longueur d'onde sont réglés en fonction des intensités de fluorescence de l'échantillon pour qu'il n'y ait pas de saturation du signal de fluorescence.

L'ensemble des images issues des scanners de fluorescence a été analysé avec le logiciel Mapix (*Innopsys*). Ce logiciel de traitement d'image permet de quantifier l'intensité moyenne ou médiane de fluorescence de chacun des spots après le positionnement d'une grille. Les intensités de fluorescences présentées dans ces travaux de thèse ont été obtenus à partir des intensités moyennes de fluorescence auxquelles a été soustrait le bruit de fond. L'intensité de chaque spot est calculée comme la moyenne des intensités de chaque pixel moins le bruit de fond autour du spot.

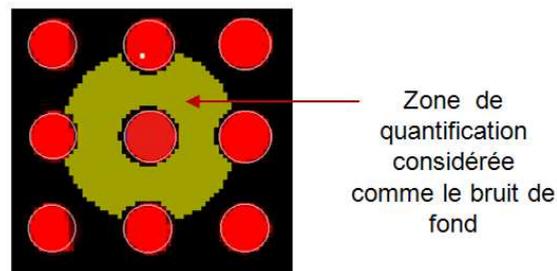


Figure 137 : Images issues du logiciel Mapix montrant la zone autour du spot considérée pour le calcul du bruit de fond.

D.2. Scanner de diffraction : Diffrascan (*Innopsys*)

Le scanner de diffraction est un prototype développé par la société Innopsys (l'ensemble de ces caractéristiques techniques est développé en annexe). Il permet de collecter l'intensité de diffraction de l'ordre 1 de réseaux de lignes 500 nm au pas de 1 μm . Le gain et la puissance du laser sont réglés pour limiter au maximum la saturation du signal de diffraction collecté.

Les images TIFF issues du scanner de diffraction ont été réalisées avec le logiciel Mapix (*Innopsys*). Ce logiciel de traitement d'image permet de déterminer l'intensité moyenne ou médiane d'une zone précise sur l'image. Cette zone d'analyse est définie par une fenêtre de lecture que l'on positionne sur l'image. Ainsi il est possible de quantifier l'intensité moyenne de diffraction d'un réseau représentant l'intensité moyenne de tous les pixels constituant le réseau. L'intensité moyenne de diffraction de chaque réseau d'une image est obtenue en soustrayant l'intensité moyenne du bruit de fond à l'intensité moyenne des pixels de chacun des réseaux. (Figure 138)

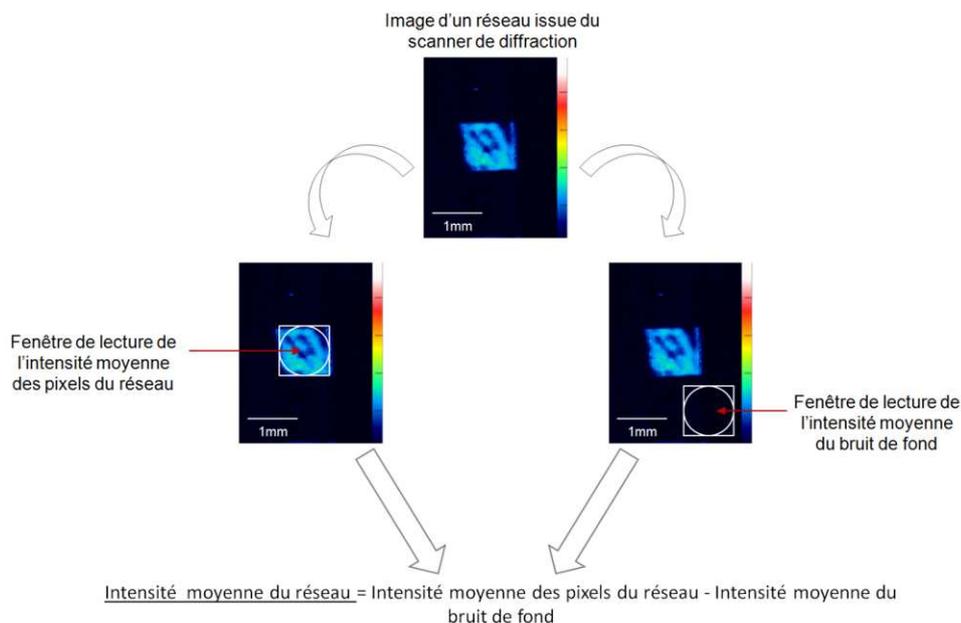


Figure 138 : Schéma représentant la définition des zones d’analyses et de traitement du signal de diffraction pour l’obtention de l’intensité moyenne d’un réseau.

Dans le but d’atténuer les fluctuations de lecture causées par les variations intrinsèques du scanner de diffraction, chaque réseau est imagé 3 fois. La valeur finale de chaque réseau exploité correspond à la moyenne des intensités de diffraction collectées des trois images.

D.3. Microscope en champ sombre

Le microscope utilisé pour les images en champ sombre est un microscope Nikon Eclipse LV 100 (objectif x10).

D.4. Microscope à fluorescence

Les images issues du microscope de fluorescence ont été obtenues avec le Microscope LSM 510 NLO Zeiss. Longueur d’onde du laser λ : 633 nm. Objectif x 40 à immersion. Les images ont été analysées par le logiciel Zen 2009 Light Edition.

D.5. Microscope à force atomique

La totalité des images issues du microscope à force atomique (AFM) ont été réalisées avec AFM_Bruker catalyst en mode Scan Asyst Air avec des levier Bruker du même nom (f_0 : 50-90 kHz k : 0,4N/m). Les images AFM ont été analysées avec le logiciel Spip 6.0.9 ou Nanoscope Analysis de Bruker.

D.6. Microscope électronique à balayage

Les images issues du microscope électronique à balayage (MEB) ont été réalisées par Carlos Bartual au LAAS-CNRS sur un MEB Hitachi S-4800.

E. Méthodes de traitement et représentation graphique des données

E.1. Représentation graphique des données

L'ensemble des données issues des signaux de fluorescence et de diffraction est représenté par des boxplots. Cette représentation graphique permet d'identifier la distribution des données (médiane, 1^{er} quartile, 3^{ème} quartile, valeurs extrêmes) et permet de comparer plusieurs distributions entre elles. L'ensemble des graphiques a été réalisé avec le logiciel R grâce à un script développé par Sophie Lamarre (Biostatisticienne, plateforme GeT-Biopuces).

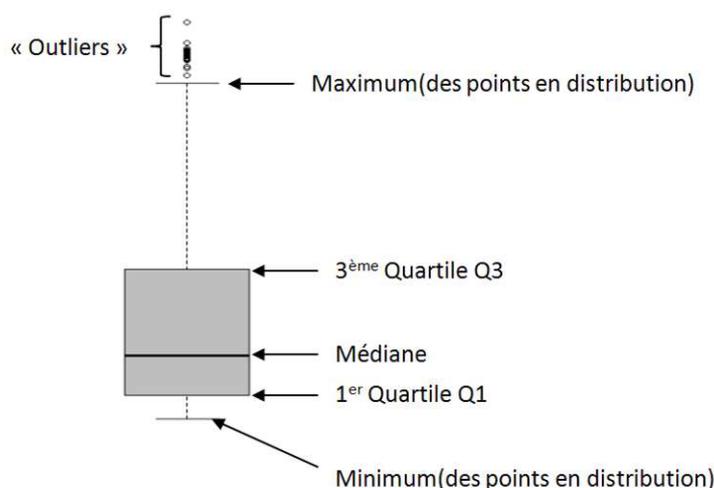


Figure 139 : Exemple de la représentation sous forme de boxplot.

Dans la figure ci-dessus, Q3 signifie que 75% des données ont une valeur inférieure à la valeur de Q3, Q1 signifie que 25% des données ont une valeur inférieure à la valeur de Q1. Le rectangle représente l'écart interquartile : $Q3 - Q1$ et contient 50% des valeurs. Le trait au milieu du rectangle représente la médiane (Q2) qui signifie que 50% des valeurs ont une valeur inférieure à la valeur de Q2 et que 50% des valeurs ont une valeur supérieure à la valeur de Q2. Le trait à l'extrémité de la « moustache » inférieure (minimum des points en distribution) représente les valeurs adjacentes inférieures au premier quartile et supérieures à $(Q1 - 1,5 \times (Q3 - Q1))$. Le trait à l'extrémité de la « moustache » supérieure (maximum des points en distribution) représente les valeurs adjacentes supérieures au 3^{ème} quartile et inférieures à $(Q3 + 1,5 \times (Q3 - Q1))$. Enfin les points aux extrémités appelés « outliers » représentent les valeurs atypiques (ou extrêmes).

E.2. Tests statistiques

Dans ce manuscrit, les tests statistiques ont été utilisés pour valider les différences de signaux de diffraction entre les conditions de l'hybridation et les conditions contrôles. Pour cela, nous avons utilisé un test non paramétrique adapté aux jeux de données comportant peu

d'individus (<30), qui ne suppose pas de faire des hypothèses sur la distribution des données. Le test utilisé est le Test de Mann Whitney Wilcoxon qui est un test statistique non paramétrique de comparaison de moyennes, utilisé lorsque les échantillons ont peu d'individus (moins de 30) et que les données sont indépendantes. L'issue du test accepte l'une ou l'autre des deux hypothèses ci-dessous selon la valeur de leur probabilité (« p value »):

H0 : « la moyenne de la condition A et la moyenne de la condition B sont égales » : « p value » > seuil fixé.

H1 : « p value » < seuil fixé (le seuil fixé est en général 1% ou 5%).

Dans le cas d'un test bilatéral : « la moyenne de la condition A et la moyenne de la condition B sont différentes »

Dans le cas d'un test unilatéral gauche : « la moyenne de la condition A est supérieure à la moyenne de la condition B »

Dans le cas d'un test unilatéral droit : « la moyenne de la condition A est inférieure à la moyenne de la condition B »

La « p value » représente le seuil permettant d'accepter ou de rejeter l'hypothèse H0. Elle est également appelée probabilité critique ou niveau de signification observé. Plus la valeur de la « p value » est petite et plus le test est strict.

Dans notre cas, nous sommes face à des tests de comparaisons multiples car les résultats issus de la condition de l'hybridation sont comparés à plusieurs contrôles négatifs. On appelle tests multiples des tests d'hypothèses permettant de rejeter ou d'accepter H0 selon la « p value » fixée, où les mêmes conditions sont réutilisées plusieurs fois (exemple : A vs B, A vs C, A vs D ...), où le but est de répondre à l'hypothèse « la condition A est différente (/ supérieure / inférieure) des (/ aux) autres conditions ». Le problème des tests multiples est que l'erreur de première espèce augmente avec le nombre de tests (si on fait 3 comparaisons avec une « p value » de 5%, on a $5\% \times 3 = 15\%$ de chances de se tromper en rejetant H0). Différentes méthodes existent pour corriger les « p values » : la méthode de Bonferroni est la plus usitée et celle utilisée dans ces travaux. Cette méthode divise le seuil de la « p value » fixée pour chacun des tests par le nombre total de tests effectués (exemple : si on fait 3 comparaisons avec une « p value » de 5%, la p value corrigée sera de $5\%/3 = 1,67\%$, il faudra que toutes les « p values » obtenues dans chacune des 3 comparaisons soient inférieures à 1,67% pour rejeter H0).

Annexe 1 : La diffraction de la lumière

Le principe de la diffraction de la lumière fut mis en évidence au 17^{ème} siècle par Francesco Maria Grimaldi. D'un point de vue historique, il fût le premier à en faire une observation et description détaillée dans son traité sur la lumière : *Physico-mathesis de lumine, coloribus et iride* que l'on peut traduire par Connaissances physiques sur la lumière, les couleurs et l'arc-en-ciel publié en 1665. La diffraction fut ensuite étudiée et interprétée au cours notamment du 18^{ème} et 19^{ème} siècle entre autre par Huygens, Fresnel, Fraunhofer et Young qui mirent en évidence la nature ondulatoire de la lumière.

A. Diffraction de la lumière par 1 fente

La diffraction de la lumière par une fente est le modèle théorique le plus simple pour modéliser les phénomènes de diffraction en optique. Lorsqu'un rayonnement lumineux de longueur d'onde λ passe au travers d'une fente de largeur a et de longueur l , placée à une distance D d'un écran, la lumière sera diffractée si les paramètres suivants sont respectés :

- 1) Le rayonnement lumineux de longueur d'onde λ doit être du même ordre de grandeur que la largeur de la fente a ;
- 2) La longueur l de la fente doit être très supérieure à sa largeur ($l \gg a$);
- 3) L'écran doit être placé à une distance D suffisamment grande pour être considéré comme situé à l'infini.

Dans ce cas, les conditions de diffraction sont dites de Fraunhofer, c'est-à-dire que les rayons qui arrivent sur l'écran sont considérés comme parallèles. La figure de diffraction qui apparaît sur l'écran est alors constituée de l'ensemble des intensités lumineuses, provenant des divers points de la fente comme représenté dans la Figure 140. Le graphique de cette figure représente la dispersion de la lumière selon l'axe x défini perpendiculairement à la grande dimension de la fente. L'intensité de chaque point est tracée en fonction de sa position sur l'axe. Le graphique montre un pic central d'ordre 0 de diffraction entouré de pics d'intensités moindres (ordres 1 et 2).

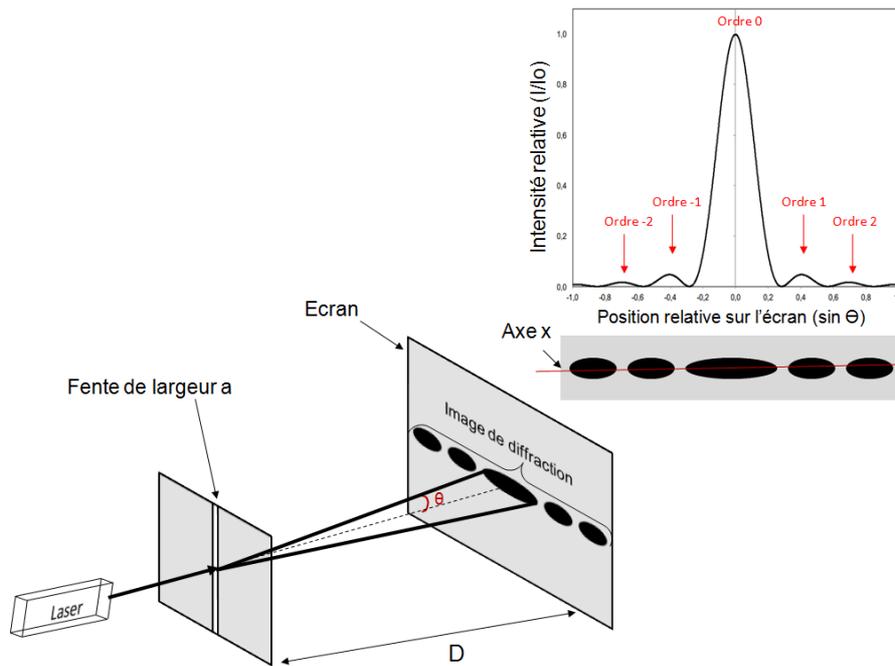


Figure 140 : Schéma de diffraction au travers d’une fente dont la figure de diffraction est observée sur un écran placé à l’infini ($D=3\text{m}$, $a=60\text{ nm}$, $\lambda = 10\text{ nm}$).

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

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

B. Diffraction de la lumière par N fentes

La diffraction au travers de N fentes est plus complexe que la diffraction au travers d’une fente. En effet, si l’on considère un ensemble de N fentes de largeur a, disposées selon une périodicité p et un rayonnement lumineux de longueur d’onde λ qui éclaire en transmission cette structure, chaque fente va se comporter individuellement comme la diffraction au travers d’une fente. Cependant, comme il y a un ensemble de fentes juxtaposées, les ondes diffractées vont interférer entre elles (principe de Huygens-Fresnel). Chaque point du front d’onde va alors se comporter comme une source secondaire et l’onde finale sera le résultat des interférences entre ces sources ponctuelles et cohérentes. Comme les ondes émises par chaque fente parcourent une distance différente jusqu’à l’écran, elles sont déphasées et interfèrent entre elles (Figure 141).

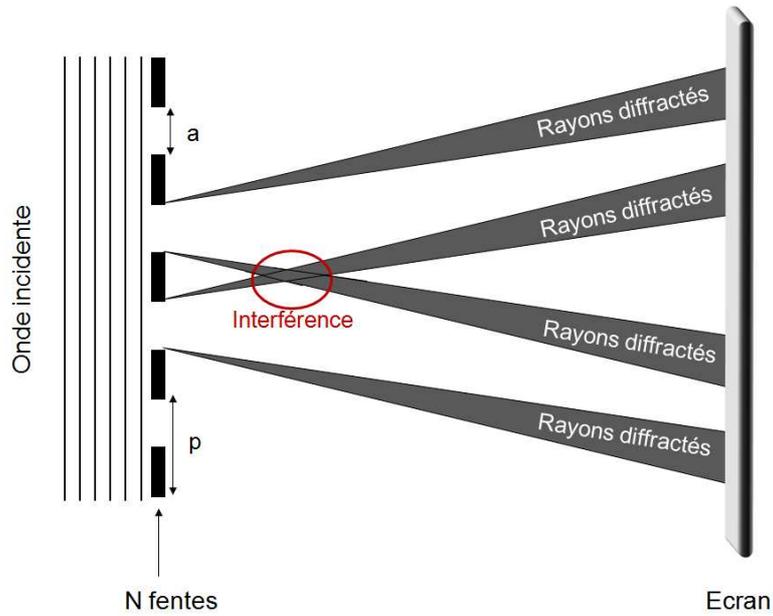


Figure 141 : Schéma de diffraction au travers de N fentes dont la figure de diffraction est observée sur un écran placé à l'infini

Sur l'écran placé à l'infini, la figure de diffraction observée est la combinaison des phénomènes de diffraction et d'interférence (Figure 142).

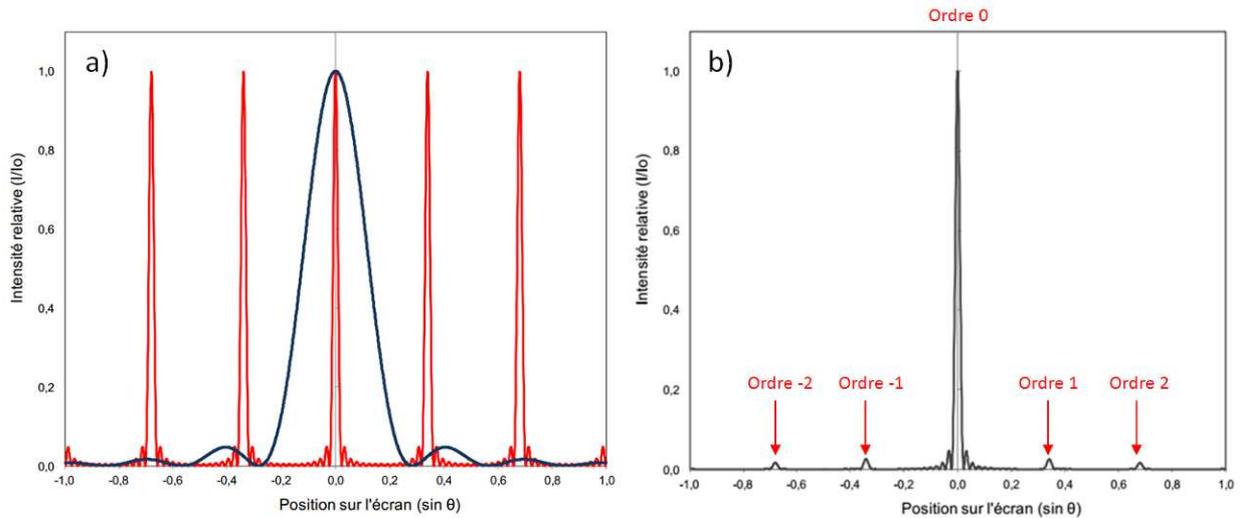


Figure 142 : Intensité lumineuse collectée sur un écran placé à l'infini après qu'un rayon lumineux soit diffracté par N fentes : (a) contribution des termes de diffraction en bleu et d'interférences en rouge, (b) image de diffraction résultante (l'ordre 0 correspond au faisceau non dévié).

L'intensité lumineuse reçue par l'écran dans la direction θ est donc la combinaison entre la diffraction et les interférences selon la formule suivante:

$$\begin{array}{c}
 \text{Terme représentant la} \\
 \text{contribution de la diffraction} \\
 \Downarrow \\
 \boxed{\frac{\sin^2\left(\frac{\pi \cdot a \cdot \sin\theta}{\lambda}\right)}{\left(\frac{\pi \cdot a \cdot \sin\theta}{\lambda}\right)^2}}
 \end{array}
 \cdot
 \begin{array}{c}
 \text{Terme représentant} \\
 \text{la contribution des} \\
 \text{interférences} \\
 \Downarrow \\
 \boxed{\frac{\sin^2\left(\frac{N \cdot \Phi}{2}\right)}{\sin^2\left(\frac{\Phi}{2}\right)}}
 \end{array}$$

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

En conclusion, la diffraction optique de la lumière est différente que l'on ait une ou N fentes. Dans les deux cas, il est possible de mesurer l'intensité de diffraction des différents ordres diffractés.

Annexe 2 : Le diffracScan

A. L'outil de lecture de la diffraction : Le diffracScan

Pour démarrer ce projet, nous avons à notre disposition un élément essentiel : un prototype de scanner de diffraction développé par Innopsys lors de son doctorat en partenariat entre le LAAS-CNRS et la société Innopsys. Ce scanner de diffraction permet de collecter l'intensité de diffraction de réseaux de lignes de 500 nm au pas de 1 μm . Il constituera donc l'outil de lecture de diffraction pour la suite des travaux.

A.1. Description générale du scanner

Dans ce paragraphe, sera décrit le scanner de diffraction de façon générale afin de comprendre son fonctionnement et les informations/données qu'il peut délivrer.

De manière sommaire, le scanner de diffraction permet :

4. D'illuminer des réseaux de lignes de diffraction sur une lame de verre avec une source laser monochromatique;
5. de capter le signal de diffraction de l'ordre 1 en réflexion;
6. de traduire ce signal optique quantifiable sous la forme d'une image TIFF représentant l'intensité de diffraction point par point de chacun des réseaux de l'échantillon.

Les paramètres de mesure, d'affichage et d'analyse de l'image sont gérés par une interface graphique développée par la société Innopsys (Diffracware). Dans la Figure 46, le schéma a) représente une lame de verre avec un réseau de lignes à sa surface. La lame de verre est positionnée dans la fente sur la face avant du scanner de façon à être scannée avec le réseau sur la face supérieure. Après le scan, l'image issue du logiciel du scanner de diffraction (c) représente les intensités de diffraction de 15 réseaux. La gamme de couleur symbolise la gamme des intensités de diffraction de l'image.

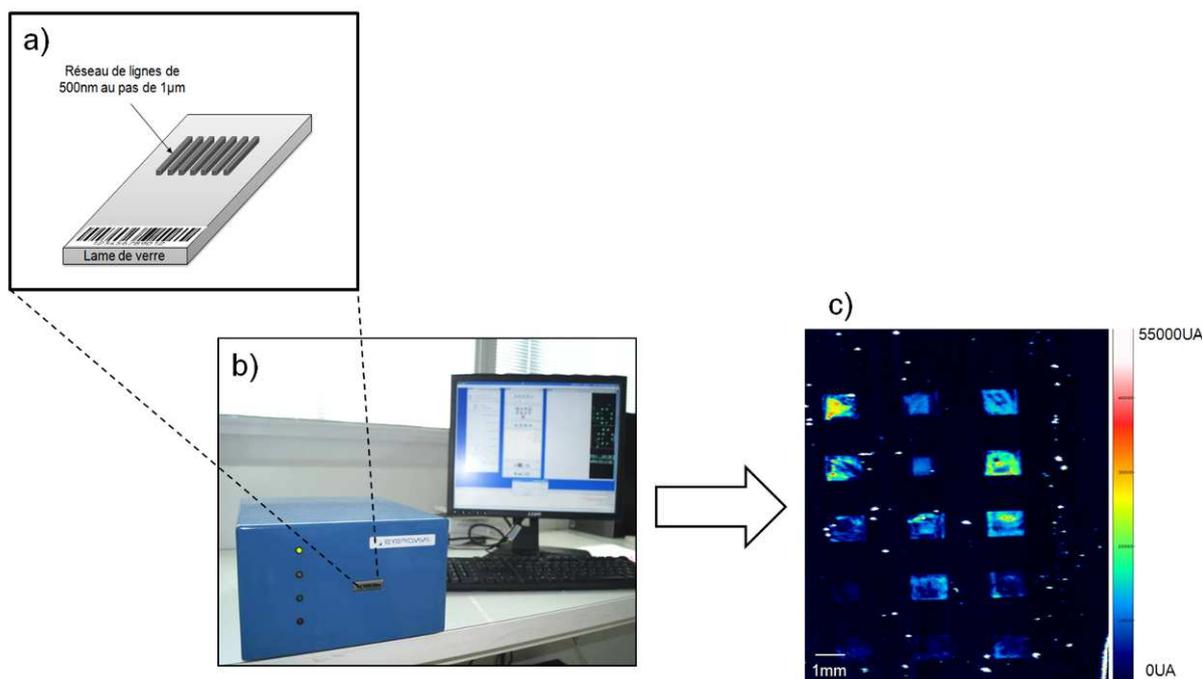


Figure 143 : a) Schéma représentant un réseau de lignes sur une lame de verre, b) photo du scanner de diffraction, c) Image de 15 réseaux de diffraction issue du logiciel Diffraware de traitement du signal de diffraction capté par le scanner (réseaux de lignes oligonucléotides sur lame epoxyde_Go, P 4mW)

Le prototype est composé de plusieurs parties détaillées dans la Figure 144 :

- Le bloc optique permettant d'illuminer les réseaux de diffraction sur la lame par un faisceau laser (635 nm) et de collecter le signal de diffraction *via* un photodétecteur. L'agencement très précis des composants du système optique (diode laser, lentilles prismes, miroirs et photodétecteur) permet de collecter le maximum du signal de diffraction de l'ordre 1 tout en évitant de capter la lumière diffuse;
- Le bloc électronique permettant de gérer le fonctionnement du scanner;
- Un porte-échantillon permettant de maintenir la lame pendant le « scan »;
- Deux axes de déplacement : le premier axe qualifié de « rapide » porte un des miroirs qui réfléchit le laser sur la surface de l'échantillon. Cet axe garantit un balayage de la lame par le laser dans le sens transversal de la lame. Le second axe permet, quant à lui un déplacement « lent » de la lame dans le sens longitudinal. Le déplacement simultané de la lame selon ces deux axes, permet au laser de balayer l'ensemble de la lame pendant le scan.

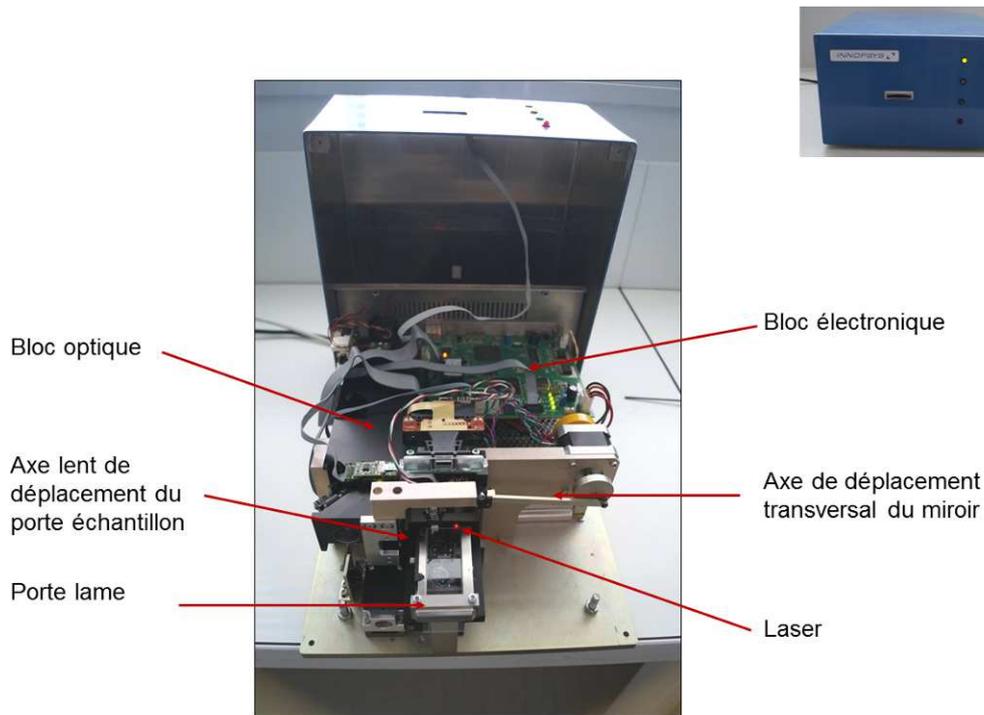


Figure 144 : Photo du scanner de diffraction sans le capot.

A.2. Les caractéristiques et spécifications du scanner

Dans ce paragraphe, seront décrites les caractéristiques techniques de lecture du scanner de diffraction. Ces dernières constituent le cahier des charges pour la conception de la biopuce diffractante. L'ensemble des caractéristiques est issu des travaux d'une thèse précédente²⁴⁵:

- Les caractéristiques techniques de lecture de la diffraction par le scanner décrivent une large gamme dynamique de lecture (P : de 0 à 4mW et G de 0 à 15) choisie par l'utilisateur avant le scan. Dans le but d'exploiter au mieux les images qui en résultent, la puissance du laser et le gain doivent être réglés afin de limiter les zones d'intensité saturante tout en collectant un maximum d'intensité lumineuse;
- La dimension des pixels, quant à elle, est directement liée à la résolution de l'image. Il est donc recommandé de travailler avec des pixels de $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$ pour que l'intensité globale du réseau soit constituée de l'intensité d'un maximum de pixel;
- Enfin, notons que le scanner est sujet à une dérive thermique et spatiale au cours de son utilisation représentant 2% à 4% du signal. Il faudra donc le prendre en compte.

²⁴⁵ A. Egea, Thèse INSA, Toulouse, 2012

Caractéristiques techniques de lecture avec le scanner de diffraction	
Sources laser	Rayonnement monochromatique $\lambda = 635 \text{ nm}$
Diamètre du laser sur l'échantillon	70 μm
Collecte de l'ordre 1 de diffraction en réflexion à l'aide d'un miroir et un photodétecteur silicium	Le miroir placé de manière fixe à un angle de $\theta_{\text{max}} = 39.4^\circ$
Puissance du faisceau incident (P)	De 0 à 4 mW
Gain électronique (G)	De 0 à 15
Taille des pixels	De 10 à 800 μm .
Variations de la dérive thermique ($T^\circ : <25^\circ\text{C}$) et spatiale	2% à 4% du signal collecté

Tableau 18 : Récapitulatif des caractéristiques techniques de lecture avec le scanner de diffraction.

Les caractéristiques de l'échantillon décrites dans le Tableau 19 : Récapitulatif des caractéristiques de l'échantillon pour une lecture avec le scanner de diffraction. Tableau 19 sont indispensables pour que le signal de diffraction soit correctement collecté par le photodétecteur du scanner.

Tout d'abord, l'arrangement périodique du réseau ainsi que l'orientation du sens des lignes dans le réseau sont primordiaux. Le degré de liberté d'alignement correspond à la tolérance d'alignement du réseau périodique avec le bord de la lame pour que l'intensité lumineuse soit collectée par la photodiode. La tolérance d'alignement est faible (3°), il est donc préconisé de fabriquer le réseau avec un outil permettant de contrôler l'alignement. Pour terminer, la tolérance de variation de la périodicité du réseau correspond à la variation du pas entre les lignes tolérée par le système optique sans que le faisceau lumineux diffracté ne sorte de la photodiode.

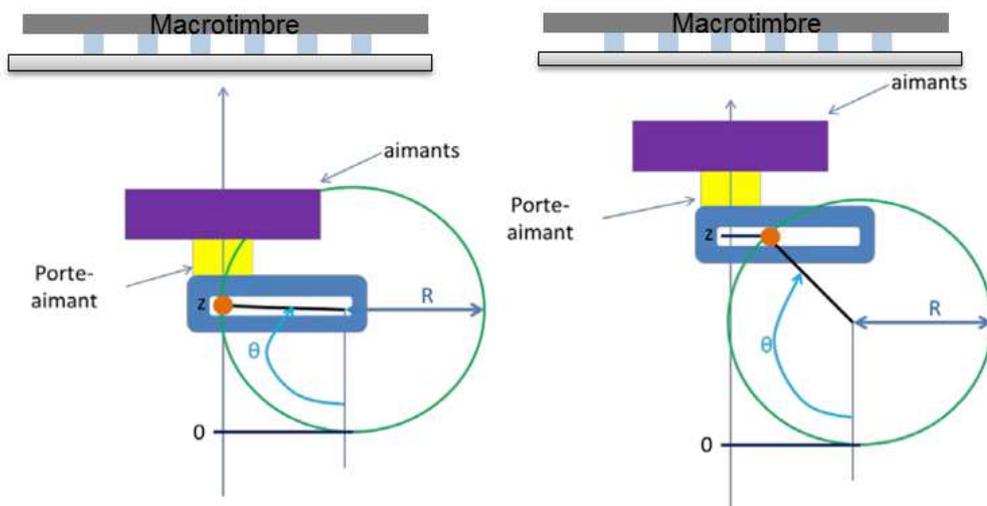
Tableau 19 : Récapitulatif des caractéristiques de l'échantillon pour une lecture avec le scanner de diffraction.

Caractéristiques de l'échantillon pour une lecture en diffraction	
Arrangement périodique du réseau	Réseau de lignes de 500 nm au pas de 1 μm Lignes parallèles au bord longitudinal de la lame
Degré de liberté d'alignement du réseau sur le bord de la lame	3°
Tolérance de la variation de périodicité entre les lignes du réseau	$\Delta p = 60 \text{ nm}$

En conclusion, ces contraintes techniques imposent une fabrication de réseaux contrôlée par des outils automatisés ou semi-automatisés.

Annexe 3 : Déplacement des aimants de l’Innostamp 40

Le schéma ci-dessous représente le système de déplacement des aimants de l’Innostamp 40. Sur le robot, ce dernier est matérialisé par des pas-moteurs (PM) qui varient de 40 à 100 PM. Lorsque l’aimant est positionné à 40 PM, il est éloigné (au maximum) du macrotimbre mis en contact avec la surface de dépôt ($Z = 0$ sur le schéma). Dans ce cas, le champ magnétique exercé est petit. *A contrario*, lorsque l’aimant est positionné à 100 PM, il est proche du macrotimbre. Le champ magnétique exercé est grand. Plus le champ magnétique est grand, plus la force de contact entre le macrotimbre et la surface de dépôt est grande.



passage de position angulaire en position verticale selon le modèle suivant :

$$Z = R \times \left(1 - \sin\left(\frac{3\pi}{2} - \theta\right)\right)$$

où,

R : le rayon de déplacement (15mm)

θ : l'angle : 1 pas moteur = $1,8^\circ$



Comparison of polyurethane and epoxy resist master mold for nanoscale soft lithography

Julie Foncy^{a,b,c,d}, Jean-Christophe Cau^f, Carlos Bartual-Murgui^{a,e}, Jean Marie François^{a,b,c,d},
Emmanuelle Trévisiol^{a,b,c,e}, Childéric Sévérac^{a,c,*}

^a Université de Toulouse, UPS, INSA, INP, ISAE, Toulouse F-31077, France

^b CNRS, UMR-5504 Ingénierie des Systèmes Biologiques et Procédés, Toulouse F-31077, France

^c ITAV-USR3505, 1 place Pierre Potier, Toulouse F-31106, France

^d Dendris SAS, Route d'Espagne, Oncopôle entrée B, Toulouse F-31106, France

^e CNRS, UPR-8001 LAAS, 7 avenue du colonel Roche, Toulouse F-31077, France

^f Innopsys SA, Parc Activestre, Carbone F-31390, France

ARTICLE INFO

Article history:

Available online 29 March 2013

Keywords:

Nanostructured silicon master mold
Polyurethane
Epoxy resist
Nanoimprint
Soft lithography
Duplication

ABSTRACT

Soft lithography at the nanoscale requires a nanostructured silicon master mold generated by ebeam lithography and reactive ion etching. Such a fabrication is both expensive and time consuming for an expected industrial use of polydimethylsiloxane (PDMS) stamps in soft lithography. Our work focuses on a easy – low cost – technology to duplicate silicon master molds with nanoscale structures. Hence, master silicon molds patterned with nanometer scale lines have been replicated into epoxy resist and polyurethane by a process that implicated the following steps. First, the PDMS stamp made from a silicon master mold was used as template to copy this original mold into epoxy resist or polyurethane layer by nanoimprint. After characterization by Atomic Force Microscopy (AFM), these replicated molds were used to generate a second generation of PDMS stamps, which were ultimately employed to transfer labeled DNA probes on epoxysilane slides by soft lithography. Fluorescent microscopy reveals that molecular nanoscale patterns produced by these second generation PDMS stamps were exquisitely identical to those from the original PDMS stamp. As a conclusion, the epoxy resist or polyurethane are very attractive and cost-effective substrate to reproduce at large scale PDMS stamps initially made on a nanostructured silicon master mold.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Soft lithography [1–3] or microcontact printing (μ CP) has emerged as the dominant technique for rapid and precise biopatterning of surfaces at the nanoscale. It allows immobilizing biomolecules without damaging them on a surface by printing using elastomeric stamps with patterns of interest. For example, Lange *et al.* showed for the first time in 2004 that DNA can be printed with high resolution in sub micrometer to fabricate DNA arrays using elastomeric stamps made with polydimethylsiloxane (PDMS) chemically modified prior use [4]. A year later, Thibault *et al.* demonstrated that the DNA chips could be fabricated using such elastomeric stamps without any surface modification [5]. This very simple method needs silicon master mold to mold stamps patterned with micro or nanostructures. However the fabrication of a nanostructured silicon master mold by ebeam lithography and

reactive ion etching (RIE) to generate the stamps is an expensive step that may preclude industrial development. To reduce the cost of mold production, several methods of nanoimprint have been developed to replicate master mold with nano and microstructures. For example, Su-8 epoxy is a resist known to be used to replicate silicon master mold from polydimethylsiloxane (PDMS) stamps by thermal soft UV NIL [6–8]. An alternative technique that does not require solvent and etching process was shown to replicate a 200 nm pitch grating mold bearing sub-50 nm features over wafer scale areas [9]. A ultraviolet curable mold that enables to fabricate densely spaced sub-100 nm nanostructures in a short time have been develop in 2004 by Choi *et al.* [10]. This UV-curable mold consists of a functionalized prepolymer with acrylate group, a photo initiator, and a radiation-curable releasing agent for the surface activity. An alternative solution was presented by Desai *et al.* [11] to duplicate the microstructures from a master mold via a PDMS stamp. Our work focuses on easy and low cost materials able to replicate by nanoimprint silicon master molds bearing nanoscale structures. In the present work, epoxy resist and polyurethane materials have been compared.

* Corresponding author at: ITAV-USR3505, 1 place Pierre Potier, Toulouse, F-31106, France. Tel.: +33 582991016.

E-mail address: childerick.severac@itav-recherche.fr (C. Sévérac).

2. Fabrication and replication of silicon master mold

2.1. Silicon master mold fabrication

Silicon master molds with nanostructures were fabricated by ebeam lithography and reactive ion etching [12,13]. The generated structures were gratings of 500 nm wide lines at a 1 μm pitch with a nominal etching depth of 250 nm. Before the PDMS stamp molding, an anti-adhesive treatment was carried out by a process using OTS (octadecyltrichlorosilane) in liquid phase. Polydimethylsiloxane (PDMS, Sylgard 184) polymer, which is a mixture of PDMS oligomers and the curing agent (10–1 mass ratio according to data sheet, 80 °C, during 4 h) were molded on the silicon master mold (Fig. 1). When the crosslinking was completed, the PDMS stamp was characterized by Atomic Force Microscopy (AFM) and used as a negative template to replicate the silicon master mold by nanoimprint.

2.2. Replication of silicon master mold in epoxy resist

Silicon master mold was replicated to epoxy resist (Delo-Katio-bond 4552) by soft UV nanoimprint lithography (Fig. 1). The resist was spin coated on SiO_2 substrate (5000 rpm for 60 s) from a uniform layer. Then the PDMS template generated from the silicon master mold was imprinted in this resist during 5 min under UV light (Emission spectrum: 350–405 nm, Intensity: 750 mW/cm²) to cross-link the nanostructured resist layer and generate a replicated mold.

2.3. Replication of silicon master mold in polyurethane

Silicon master mold was replicated in polyurethane using a commercially available two-part polyurethane plastic (Smooth cast

310, 1:1 volume, according to data sheet) by nanoimprint lithography (Fig. 1). This polymer was deposited on SiO_2 substrate (30 g). Then the PDMS template generated from the silicon master mold was imprinted in the polyurethane layer for 1 h at room temperature and under a pressure of 3.5 bars until cross linking of the nanostructured polyurethane layer formed the replicated mold.

3. Characterization and comparison of silicon master mold and replicated molds

Nanometer line gratings of each mold were characterized and compared by AFM in Scan Asyst mode (Bruker catalyst, silicon tip on nitride lever, model: ScanAsyst_Air, K: 0.4 N/m, f_0 : 50–90Khz) and by Scanning Electron Microscopy (SEM). SEM images were recorded with a Hitachi S-4800 microscope operating from 0.8 to 15 keV depending on the nature of the sample. As reported in Fig. 2, the depth of grooves, the width and the pitch of the grating (500 nm/1 μm) from the replicated molds have similar dimensions as the original master mold. This result suggested that the replicated molds are technically identical to the initial silicon master mold bearing nanostructures.

3.1. Deformation between original and replicated molds

To further verify this technical identity, the average width of the grating lines and the pitch size of each mold were precisely determined from AFM images using the NanoScope analysis software. As can be seen in Table 1, the average width of the lines and the pitch size from replicated molds were lower than those from the original silicon master mold, in agreement with a previous report [14]. These authors already showed that there was a 1–3% decrement in the periodicity of the PDMS grating due to thermal contraction of the PDMS, which depends on the curing temperature.

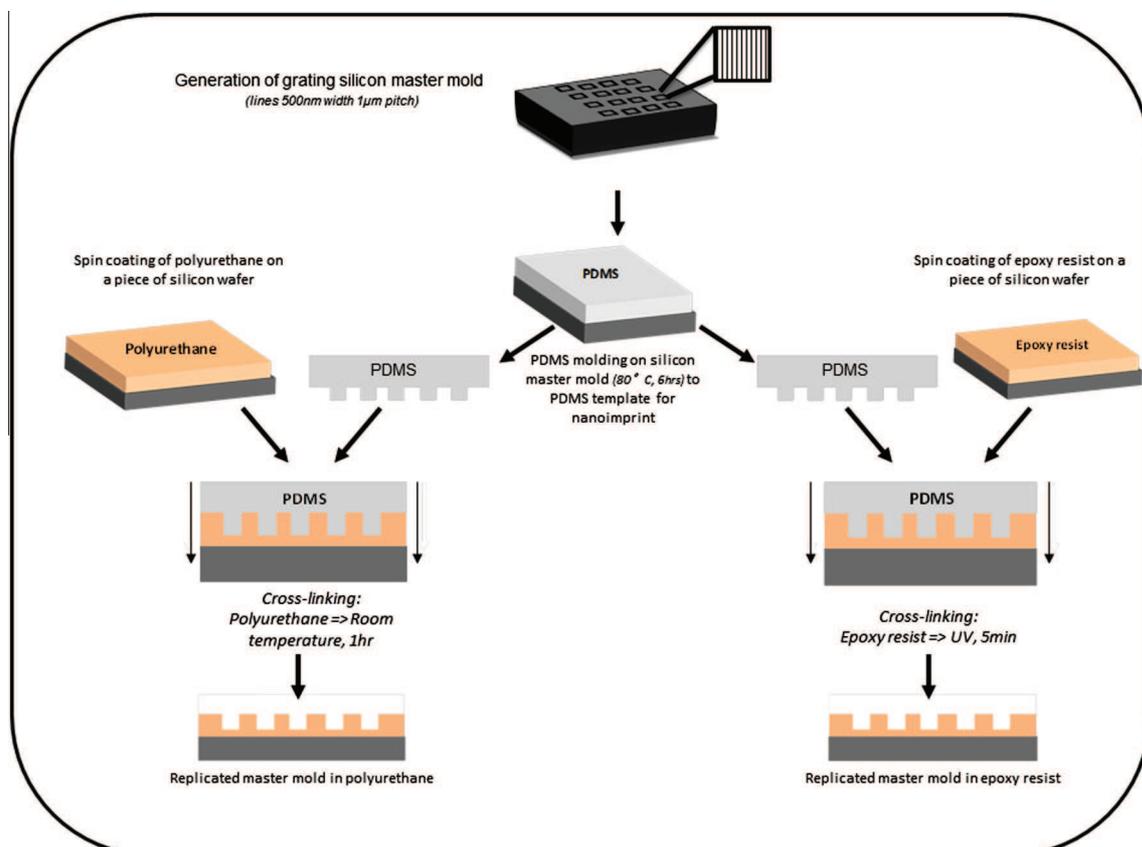


Fig. 1. Scheme of the nanoimprint technology to duplicate silicon master mold to polyurethane or epoxy resist.

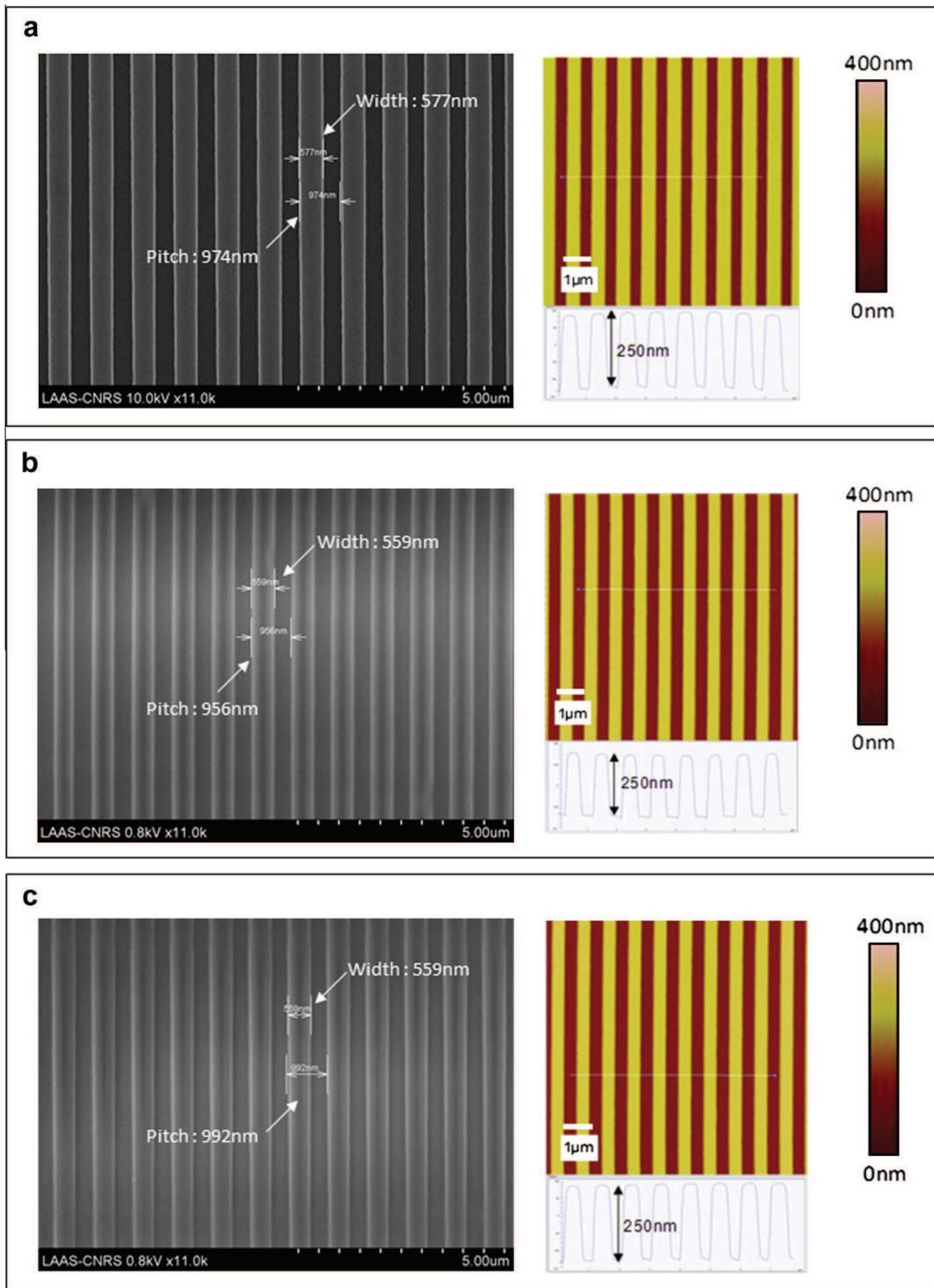


Fig. 2. SEM images and AFM images with cross sections of (a) the original silicon and replicated master mold in (b) epoxy resist and (c) in polyurethane.

For an industrial process, this contraction due to curing condition could be easily corrected in order to precisely reproduce replicated molds to the original silicon master mold.

4. Validation of PDMS stamp generated by replicated master mold for soft lithography

To further validate this replication process, we made a second generation of PDMS stamps on each of these replicated molds,

quantified their dimension, their deformation and compared their transfer quality by nanoscale soft lithography.

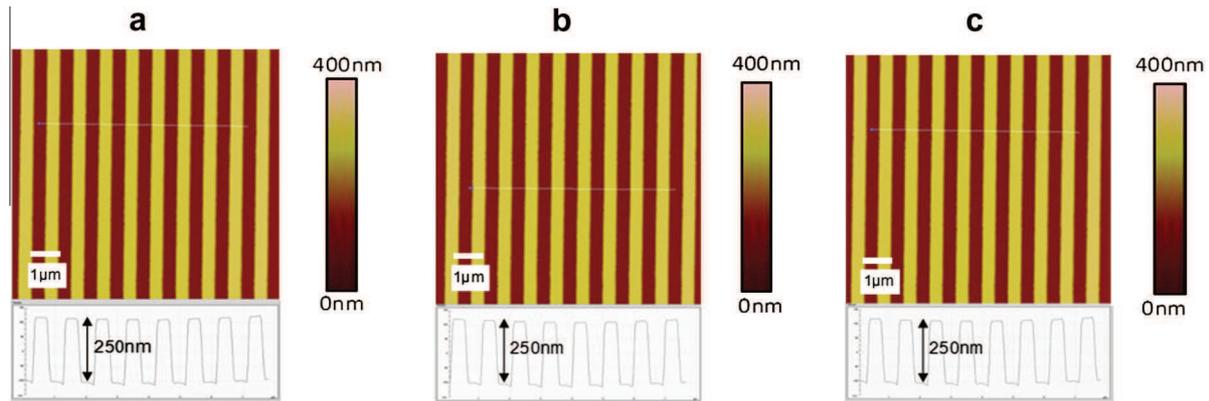
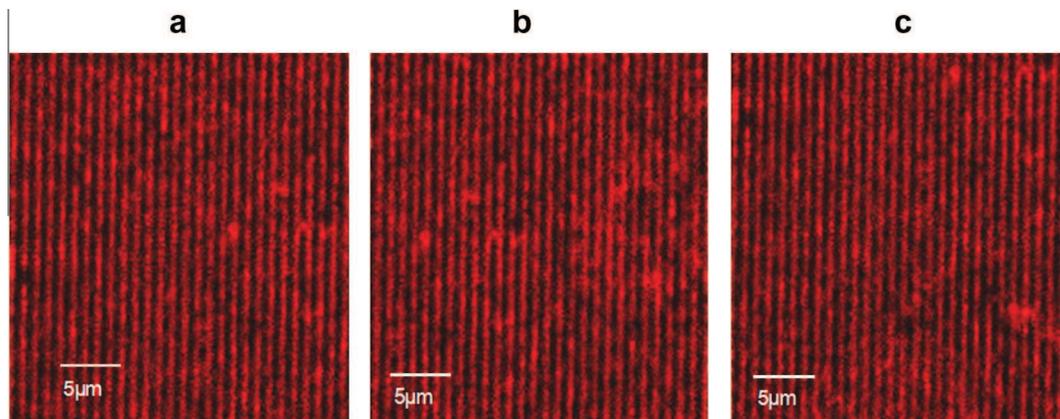
4.1. Second generation PDMS stamps molding on replicated master molds

The replicated molds in epoxy resist and polyurethane were used to produce the second generation of PDMS stamps, which were performed by crosslinking at 60 °C, for 8hrs. These second

Table 1

The pitch size and the average width of grating lines of PDMS template and of each mold, respectively.

	Original silicon master mold	PDMS template molded on silicon master mold	Epoxy resist mold	Polyurethane mold
Pitch	965 nm	957 nm	955 nm	957 nm
Percentages of pitch variation with original silicon master mold	–	–0.82%	–1%	–0.82%
Average width of line	580.1 nm (± 7 nm)	565.1 nm (± 5 nm)	563.4 nm (± 5 nm)	564.7 nm (± 7 nm)
Percentages of average width of line variation with original silicon master mold	–	–2.58%	–2.8%	–2.6%

**Fig. 3.** AFM images and cross sections of PDMS stamp molded on (a) the original silicon master mold, (b) the replicated master mold in epoxy resist and (c) in polyurethane.**Fig. 4.** Fluorescence images of DNA gratings obtained by soft lithography using PDMS stamp molded on (a) silicon, (b) epoxy and (c) polyurethane master mold.

generation PDMS stamps were characterized and compared using AFM in Scan Asyst mode (as described above) (Fig. 3).

This comparison revealed a comparable transfer of the patterns between the replicated and the original master molds. Nanostructures were correctly reproduced with the second generation PDMS stamps with the advantage that this process does not require anti-adhesive treatment on epoxy resist and polyurethane molds.

4.2. Soft lithography of fluorescent DNA probes using second generation stamps

These second generation PDMS stamps were evaluated for their imprinting capability on epoxysilane slides (Schott nexterion) and compared to that of PDMS stamps made with the original silicon master mold. As described in previous work [5], we directly inked the PDMS stamp with the DNA solution. More specifically, amino-modified-fluorescent DNA probes ([AmC₆T]-ATACTCCGGAAACT

GACATCTAG-Cy₅) (0.5 μM in phosphate buffer 0.3 M, pH7) was deposited by droplet onto each PDMS stamp (during 30 s). After this short time of inking, the stamps were dried under nitrogen flow (during 30 s) and brought into contact during 30 s with epoxysilane slides. The resulting fluorescent patterns of DNA molecules imprinted on these slides were visualized using LSM 510 NLO Zeiss microscope (objective: X 63 in liquid, laser HeNe: $\lambda = 543$ nm). As illustrated in Fig. 4, the patterns of DNA gratings obtained with the PDMS stamps molded on epoxy resist or polyurethane replicated master mold were identical to those obtained with the original silicon master mold.

5. Conclusion

We report in this work that the epoxy resist and polyurethane are suitable materials to replicate silicon master molds bearing

nanostructures for soft lithography. The patterns obtained by nanoimprint using these two materials have been characterized by AFM. The depth of grooves, the width and pitch of the grating (250 nm/500 nm/1 μ m) faithfully reproduce the pattern dimensions of the initial silicon master mold. These materials do not require an anti-adhesive treatment for PDMS stamp demolding. Moreover, fluorescent images of DNA line gratings obtained by soft lithography with each PDMS stamp confirmed the good transfer of molecules on epoxysilane slides at the nanoscale. As polyurethane is 10 times cheaper than epoxy resist, this former material is very attractive from an industrial point of view to be used as a replicate master mold for nanoscale soft lithography.

Acknowledgement

This work was funded by the Research Agency National (ANR) under the convention number ANR 2010 BIOT 004 01 to J.M.F.

References

- [1] D. Qin, Y. Xia, G.M. Whitesides, *Nature Protocols* 5 (2010) 491–502.
- [2] Y. Xia, G.M. Whitesides, *Annual Review of Materials Science* 28 (1998) 153–184.
- [3] G.M. Whitesides, E. Ostuni, S. Takayama, X. Jiang, D.E. Ingber, *Annual Review of Biomedicine Engineering* 3 (2001) 335–373.
- [4] S.A. Lange, V. Benes, D.P. Kern, J.K.H. Horber, A. Bernard, *Analytical Chemistry* 76 (2004) 1641–1647.
- [5] C. Thibault, V. Le Berre, S. Casimirius, E. Trévisiol, J.M. François, C. Vieu, *Journal of Nanobiotechnology* 3 (7) (2005) 1–12.
- [6] Stephen Y. Chou, Peter R. Krauss, Preston J. Renstrom, *Vacuum Science and Technology* 14 (1996) 4129–4133.
- [7] Chun-Chang Wu, Steve Lien-Chung Hsu, Lo Lin, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 10 (2010) 6446–6452.
- [8] A. Egea, C. Vieu, *Microelectronic Engineering* 88 (2011) 1935–1938.
- [9] P.F. Murphy, K.J. Morton, Z. Fu, S.Y. Chou, *Applied Physics Letters* 90 (2007). 206115_1–206115_3.
- [10] S.J. Choi, P.J. Yoo, S.J. Baek, T.W. Kim, H.H. Lee, *Society* 126 (2004) 7744–7745.
- [11] Salil P. Desai, Dennis M. Freeman, Joel Voldman, *Lab on Chip* 9 (2009) 1631–1637.
- [12] A.A. Tseng, K. Chen, C.D. Chen, K.J. Ma, *IEEE Transactions on Electronics Packaging Manufacturing* 26 (2003) 141–149.
- [13] C. Vieu, F. Carcenac, A. Pepin, Y. Chen, M. Mejias, A. Lebib, L. Manin-Ferlazzo, L. Couraud, H. Launois, *Applied Surface Science* 164 (2000) 111–117.
- [14] A. Kocabas, A. Aydinli, *Optical Society of America* 14 (2006) 10228–10232.



Dynamic PDMS inking for DNA patterning by soft lithography

Julie Fredonnet^a, Julie Foncy^{a,b,c,e,f}, Sophie Lamarre^{b,e,f}, Jean-Christophe Cau^d, Emmanuelle Trévisiol^{a,b,e,f,g}, Jean-Pierre Peyrade^{a,b,g}, Jean Marie François^{a,b,c,e,f}, Childéric Séverac^{a,*}

^a CNRS, USR-3505 ITAV, 1 place Pierre Potier, Toulouse F-31106, France

^b Université de Toulouse, UPS, INSA, INP, ISAE, Toulouse F-31077, France

^c Dendris, Route d'Espagne, Oncopôle entrée B, Toulouse F-31106, France

^d Innopsys, Parc Archivestre, Carbone F-31390, France

^e CNRS, UMR-5504 Ingénierie des Systèmes Biologiques et Procédés, Toulouse F-31077, France

^f INRA, UMR-792 Laboratoire Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, Toulouse F-31077, France

^g CNRS, UPR-8001 Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes, 7 avenue du colonel Roche, Toulouse F-31077, France

ARTICLE INFO

Article history:

Available online 29 March 2013

Keywords:

DNA microarrays
Soft lithography
Microcontact printing
DNA patterning
Dynamic inking

ABSTRACT

Microcontact printing (μ CP) is used as a patterning technique to produce simple, rapid and cost-effective DNA microarrays. The accuracy of the final transferred pattern drastically depends on the inking step. The usual way to ink a PDMS stamp by droplet deposition of labeled biomolecules using a pipette, results in irregular transfer of the biomolecules on the chip surface and leads to poor and irreproducible fluorescent signals. These drawbacks are likely due to irregular 'coating' of the biomolecules on the PDMS stamp. In this work, a novel approach for inking PDMS with DNA molecules is presented. It is based on the continuous displacement of the meniscus formed by the inking solution over the surface of the stamp. When compared with the conventional technique, this dynamic PDMS inking method proved to be very reproducible for producing regular prints/spots on a functionalized glass slide, and this method could be easily extrapolated at an industrial scale.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Conventional techniques of DNA microarrays fabrication such as spotting needles [1], ink jet nozzles [2,3] or direct *in situ* synthesis of oligonucleotides on glass slides [4] require sophisticated equipment, are time consuming and relatively expensive. Microcontact printing (μ CP) technique using an elastomeric stamp, made preferentially in PolyDiMethylSiloxane (PDMS, Sylgard 184) has been proposed as an alternative and cost-effective procedure of fabrication, easy to implement and potentially transposable at an industrial scale [5,6]. In addition, the μ CP technique was found to be useful for patterning of any kind of biomolecules including proteins, bilipidic membranes or even single cells onto functionalized surfaces [7–9]. However, a major critical step for successful application of this technique for biochips fabrication at industrial scale is the inking of PDMS stamp with DNA molecules allowing a perfect, regular and reproducible transfer of the biomolecules on the surface for optimal hybridization and henceforth for reproducible and robust biochips. The usual way for inking PDMS stamps is based on the deposition of a drop containing the DNA molecules over the patterned surface of the stamp using a micropipette. This inking system leads to irregular 'coating' of the stamp

likely due to several reasons, among which, the opposite chemical nature of PDMS which is hydrophobic while DNA is mostly hydrophilic and the uncontrolled drying of the deposited drop. This lack of regularity in the PDMS 'coating' with DNA molecules leads to poor hybridization signal and constitutes a real drawback for a robust and reproducible biochip fabrication, preventing its industrial development.

To overcome this problem, we present in this paper a new approach for inking PDMS stamp that is based on a continuous displacement of the biomolecules solution meniscus over the surface of the stamp. This automated inking system allows tight control over the displacement of the front and the rear menisci at a defined speed and meniscus angle. This novel inking technique was compared with the classical mode of inking using fluorescent DNA probes. Optical microscopy revealed a remarkable reproducibility and regularity of the micrometric spots made with our novel PDMS inking technique, as characterized by a weak variation in the fluorescence intensity (CVs) between the spots.

2. Material and methods

2.1. Materials

DNA probes were 24-mer oligonucleotides modified with a 5'-amino C₆ linker for covalent linkage to the dendrslide [10]

* Corresponding author.

E-mail address: childerick.severac@itav-recherche.fr (C. Séverac).

and labeled with a 3'-Cy3: (5'[AmC₆T]-ATACTCCGGGAAACTGACATCTAG-[Cy3] 3') (Sigma–Aldrich) to allow detection using a fluorescence reading scanner (InnoScan[®] 710, Innopsys). The DNA probes were HPLC purified (Sigma–Aldrich) and diluted at final concentration of 1 μ M in a sodium phosphate buffer (PBS) at pH 9.

2.2. Fabrication of master mold and stamps

The fabrication of a PDMS stamp requires the generation of a silicon master mold (Fig. 1). The micrometer-patterned master mold was achieved by UV photolithography and the pattern transfer by reactive ion etching (RIE) where the targeted etch depth was fixed to 160 μ m. An anti-adhesive treatment is carried out using silanisation in liquid phase with OTS (OctadecylTrichloroSilane) to facilitate the master demolding. The PDMS prepolymer solution composed of a mixture of PDMS oligomers and a reticular agent from Sylgard 184 Kit (Dow Corning) (at mass ratio 10:1) was poured on the silicon master and cured at 80 °C for 6 h. The micrometric patterns used are blocks of 25 pillars (5 \times 5, 160 μ m diameter with a pitch of 300 μ m) [6].

2.3. Inking step

2.3.1. By droplet deposition

DNA probes solution (200 μ l at 1 μ M in sodium phosphate buffer) was deposited on the surface of the microstructured PDMS stamp during 1 min using a micropipette, followed by removal of the excess of DNA solution with the micropipette. Then, the stamp was blown dry under a stream of nitrogen.

2.3.2. By dynamic PDMS inking

The microstructured PDMS stamp was placed on a motorized translation stage. A DNA reservoir for the inking solution was formed by two hydrophobic plastic cover slips (Deckgläser, Knittel-Glass, 24 mm \times 32 mm) separated by 1 mm plastic wedges that were glued together (using Super glue 3 Loctite) onto the cover slips. A 20 μ l DNA solution at 1 μ M was injected between the two hydrophobic plastic cover slips using a micropipette. The DNA reservoir was positioned in contact with the surface of the PDMS stamp at a defined angle of 15°, while the stamp was placed

on a computer control motorized platform (NewPort MFA-CC). This system allowed mechanical displacement at a given constant velocity ranging from 0 to 2.5 mm/s by step of 1 μ m/s. The maximum displacement range was 25 mm. Dynamic PDMS inking was performed throughout the entire surface of the PDMS stamp (8 mm \times 14 mm). The experiment was conducted at room temperature. The meniscus contact angles during dynamic inking were measured using Digidrop from GBX. All experiments were performed at ambient temperature (22 °C) and at 52 \pm 2% of humidity.

2.4. Transfer of DNA molecules on biochips

The stamp was brought into contact with the dendrimer-coated glass slides (dendrslides) [10] for 1 min without external pressure and then peeled away. The microstructured PDMS stamp leads to a pattern of DNA molecules composed of 6 blocks of 25 spots. The spots were 160 μ m diameter and formed a 300 μ m pitch grating of 25 \times 25 spots.

2.5. Optical microscopy

Bright-field images were acquired with a Nikon eclipse LV 100 microscope, equipped with long-distances bright-field lenses and coupled with an Andor Luca EMCCD camera (Andor™ Technology); and images were captured using Andor Solis acquisition software.

2.6. Fluorescence images acquisition

The fluorescence images were obtained using an InnoScan[®]710 fluorescence reading scanner from Innopsys SA (Carbonne, France). This scanner provides uniform scanning across the whole microarray surface using confocal PMT detection (laser excitation wavelength at 532 nm or/and 635 nm) and a real time autofocus. The scanning parameters were PMT 532 at 5% and PMT 635 at 100% and brightness/contrast/balance at 50/10/50 respectively. The fluorescence intensity of each spot of a block was acquired using the Mapix software. The homogeneity of the printed DNA was estimated by determining the fluorescence intensity variation coefficient (CV), which is the standard deviation between the 25 spots

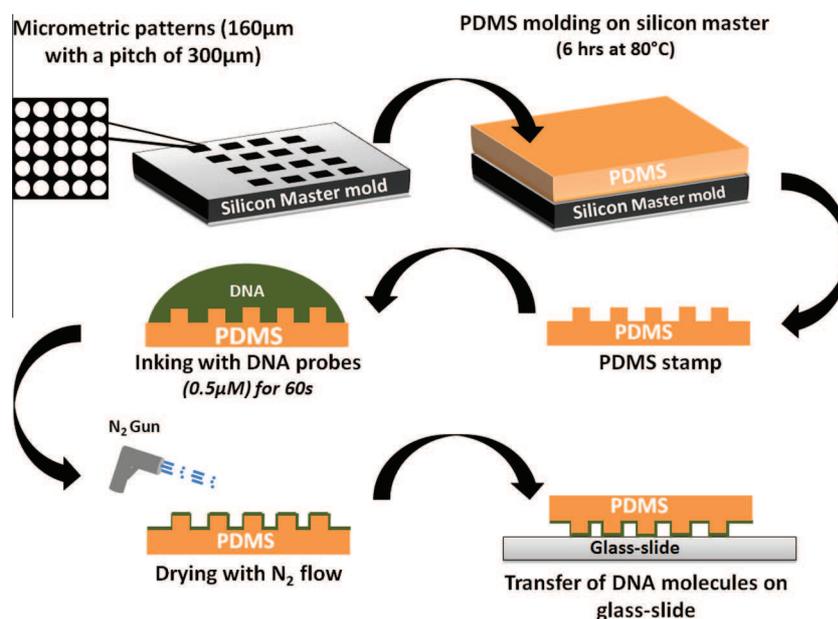


Fig. 1. Scheme of the microcontact printing process.

of a block over the average fluorescence of the 25 spots forming this block.

2.7. Statistical analysis

To compare statistically the two inking procedures with median fluorescence intensity, boxplots of fluorescence intensities distributions were done using R software (version 2.15.2). Overall, 16 independent experiments were performed randomly: 8 using the dynamic inking method and 8 using the standard inking method.

3. Results and discussion

In the literature, the description of the μ CP process is usually rather simplified to an inking time, followed by dry blowing in nitrogen flow and finally a contact time between the inked PDMS stamp and the surface to print [5,7]. Although the inking time and contact time have been considered important and may vary from ink to ink and from process to process, the dry blowing conditions always remained vague. Let's consider more carefully what is happening during this dry blowing step in the case of DNA. During this step, the front and rear menisci of the DNA droplet are

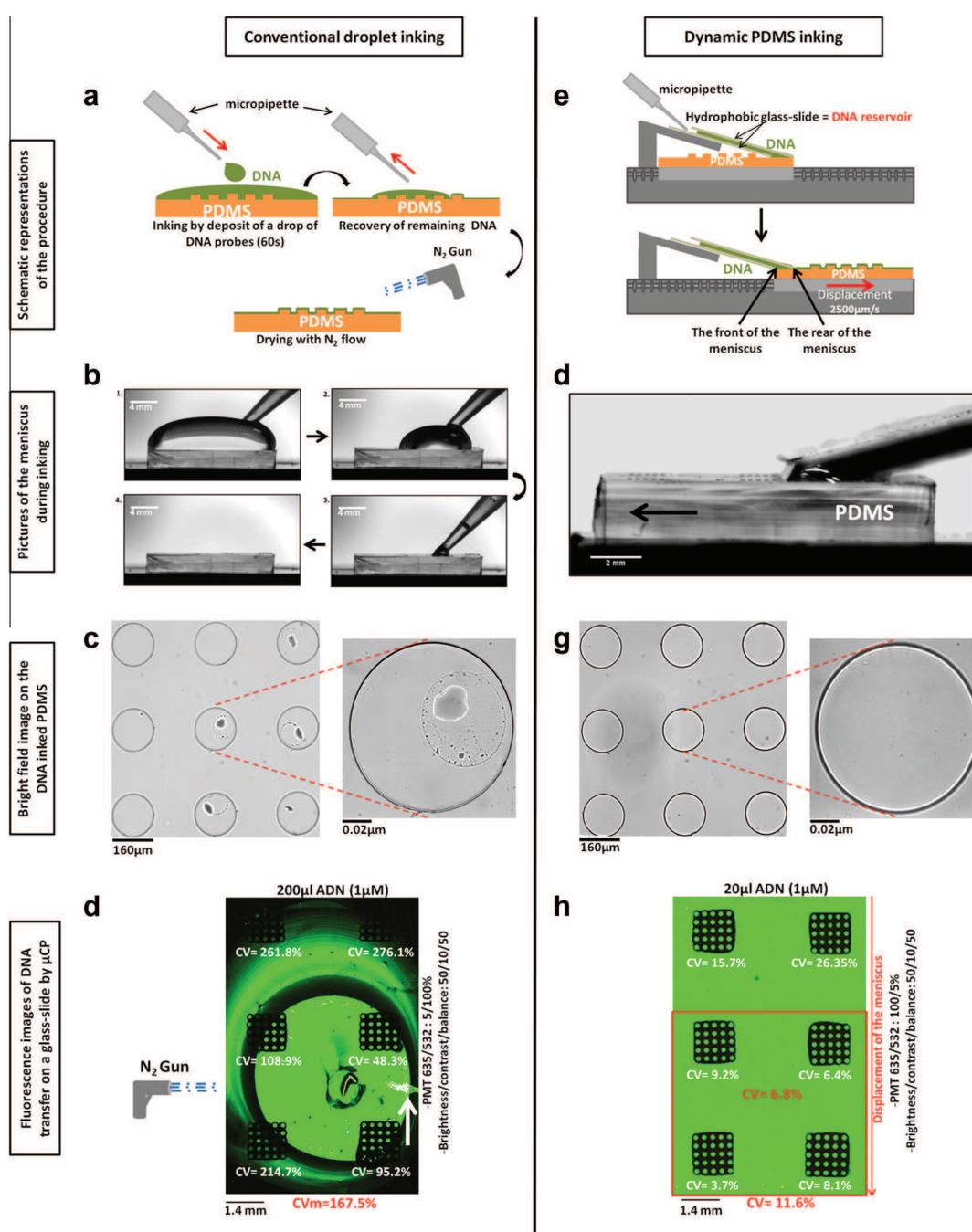


Fig. 2. Schematic representations of the procedure of manual inking PDMS stamps using a micropipette (a) or of the dynamic PDMS inking (e); pictures of the meniscus during inking by deposition of a drop (b) or during dynamic PDMS inking (f); optical microscopy analysis (bright field image) of the PDMS stamp inked by conventional method (c) or by dynamic inking system (g); fluorescence images of printed Cy3-labeled oligonucleotides patterned on a glass slide obtained from conventionally inked (d) and dynamically inked (h) PDMS contact.

pushed across the entire PDMS stamp at very high velocity and in an uncontrolled fashion (Fig. 2a). Depending of the dry blowing angle (*i.e.* at 90° with the PDMS surface), the droplet could eventually be blown away by the air drying jet. In this case, there is even less control over the movement of the different meniscus formed by the exploding ink droplets. In some cases, before the dry blowing step, the DNA droplet is pumped back into the pipette in one or several steps (Fig. 2b). This leads to a concentric movement of the meniscus at a non constant velocity. A typical result of such a process of DNA transfer from the stamp to the surface is presented in Fig. 2d. In this school case, the size of the DNA droplet was 200 μl in order to cover entirely the PDMS stamp as described in the material & methods section. Even after removal of the remaining solution by a second pipetting, followed by drying the stamp under a nitrogen flow, one can observe upon transfer on the dendrislide a remaining trace as a dark ring of about 0.7 mm thickness in the middle of the slide. This dark ring corresponds to an area where no fluorescence of the DNA can be observed. A second and smaller fluorescence free ring can be observed around the final droplet. The trail left by this final droplet upon dry blowing from left to right can be seen at the right edge of the picture and is marked with an arrow. Although the central fluorescent disc appears uniform, careful analysis of the fluorescence on top of the patterns presents very high CVs reflecting the lack of reproducibility in the transfer of the DNA inked PDMS (Fig. 2d). Moreover, bright field images of independent spots revealed aggregation of molecules surrounded by a ring of material that looks like the drying of a droplet on a hydrophobic surface (Fig. 2c). This phenomenon, called “coffee stain effect”, has been described by Eral et al. [11] as being the consequence of a convective macroscopic flow into the contact line driven by evaporation. This inking technique is thus not satisfactory as it may lead to poor and irreproducible response signal (*e.g.* hybridization with respect to DNA biochips or

interaction with respect to protein chips) and hamper any future industrial development of the μCP technique in the field of biochips.

To overcome this serious technical problem, our approach depicted in Fig. 2e aims at better controlling the drying process and the removal of the ink droplets from the PDMS stamp. Our purposely designed motorized setup for dynamic inking takes advantage of previous work realized in the field of DNA combing [12–14]. However, our system differs from previously described setups as it takes advantage of a second plastic cover slip to precisely control the inking area between the rear and front menisci (Fig. 2f). This system therefore bears more similarities with the technique known as dip-coating, which use a rear and front meniscus for deposition of regular layer of material [15]. Several optimization steps have been realized to obtain an optimal configuration for this dynamic process. In particular, we have tested different velocity of meniscus displacement (650, 1250 and 2500 $\mu\text{m/s}$), and found that the faster velocity, the lower CVs is for a better inking quality (data not shown). Thus, we concluded that the sliding speed appears to be a relevant parameter for an optimal DNA transfer on the PDMS stamp.

Upon contact of the meniscus formed between the two plastic cover slips with the PDMS stamp, a 30 mm² contact area was formed. In our system, the hydrophobic nature of both plastic cover slips and the PDMS substrate ensures that the meniscus neither dribble over the PDMS stamp, nor over the cover slips's edges. However, depending on the translation velocity of the PDMS stamp, the rear meniscus could be stretched, which decreased the contact angle. We found that at 2.5 mm/s, the dynamical rear contact angle was 49°. At this inking speed, the equivalent inking time for a given point away from the loading or unloading zone is only 1.5 s. Our entire stamp (1.12 cm²) was dynamically inked in 5.6 s, which contrasted with 30 s or 1 min for the conventional

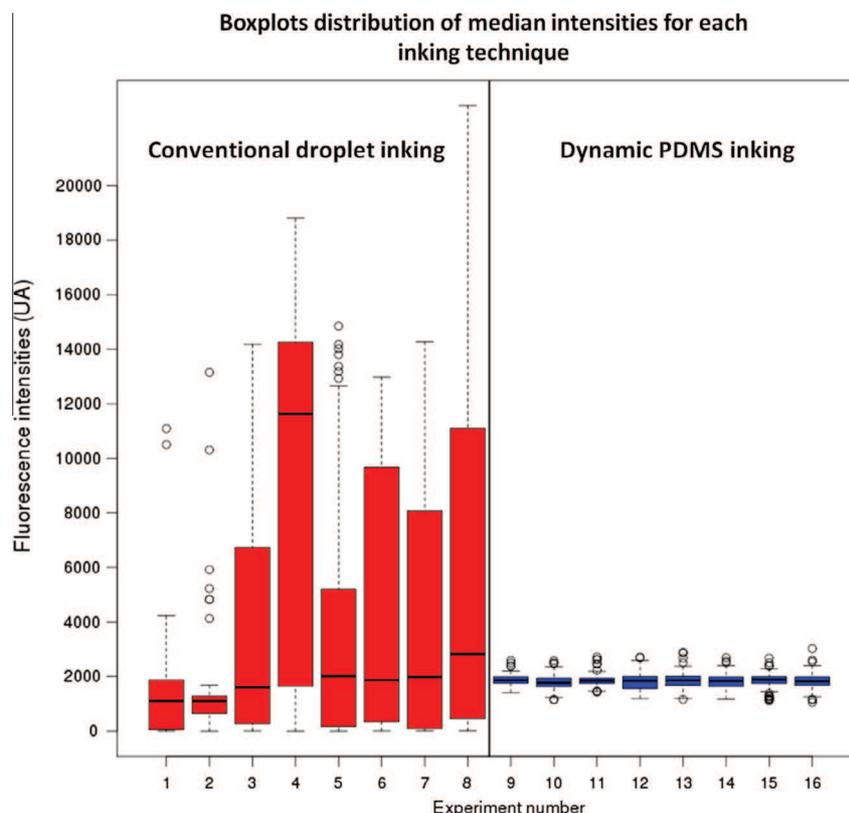


Fig. 3. Boxplots distribution of median intensities for each inking technique. Circles denote outliers that are either above or below 1.5 times the inter-quartile range.

inking time in μCP . When we decreased the inking speed twice (1.25 mm/s), the coat of deposited DNA solution was no longer regular. It seems from these results that the inking time is not the main factor in the inking quality. This counter intuitive result is further confirmed when considering the dark rings of Fig. 2d that are formed in between the two pipetting action and the dry blowing of the final droplet. These rings, despite being exposed to the 30 s inking time bear no fluorescent DNA. This fact confirms that the inking time is not the main factor while the stretching of the meniscus during the recess of the droplet or the translation of the PDMS stamp may play a crucial role in the inking process, as suggested the fact that the recessing meniscus of the pumped droplet travels must be equal or greater than 2.5 mm/s.

We also tested various concentrations of DNA probes for the inking and found that 1 μM was the optimum DNA concentration for obtaining a reproducible and regular 'coating' (data not shown). The resulting transfer of DNA inked on the PDMS stamp by our new dynamic process is presented in Fig. 2h, according to the optimal parameters described above. Though there was an irregularity at the top of the print, likely due to the loading of the meniscus, the total fluorescent intensity measured on each block bearing DNA spots was consistent between blocks, with a CV in the range of 5–15%. This value was almost 20 times lower than with the conventional inking method, proving the high reproducibility and robustness of our dynamic inking technique. Moreover, and contrary to the conventional method, there was no formation of aggregates with our dynamic inking process (Fig. 2g).

Furthermore, the superiority of our dynamic inking over the conventional method in terms of reproducibility and regularity of DNA 'coating' on the PDMS stamp was assessed by a statistical analysis of the fluorescent signal intensities that was carried out on 16 independent prints, half of them using the classical inking method, the other half using the dynamic inking method. For each print, 150 spots were taken into account. The boxplots (Fig. 3) expressed the distribution of median fluorescence intensities of these 150 spots for 8 prints obtained with each inking procedure. The smaller the interquartile range of the boxplot is, the better the reproducibility. This representation firmly illustrates the robustness of dynamic inking over conventional inking. Quantitatively, the overall CV for the 8 experiments of the dynamic inking process is only 13% compared in 189% for the overall CV for the 8 experiments of the conventional technique.

Finally, another advantage of our dynamic inking system using the two plastic cover slips configuration as a reservoir was to reduce by 10 times the amount of DNA to ink the stamp. Furthermore, this reservoir remains available for several inking processes without loss of material as the evaporation from the res-

ervoir is negligible. This is also an additional benefit in the perspective of making this inking method available for an industrial process.

4. Conclusions

Dynamic PDMS inking for DNA patterning appears to be an innovative and promising inking strategy. In this report, we show that the dynamic PDMS inking process leads to reproducible and regular inking over the entire stamp, *via* a controlled displacement of the meniscus. We have found that the inking time does not seem to play an important role in the inking process while the speed of the triple line during the stretched meniscus recess appears to be the key factor in the quality of the inking process. In addition, the use of a reservoir in our inking technique greatly reduces the consumption of biomolecules. The technique can be easily miniaturized for multiplex inking in the prospect of using μCP for bio-chip fabrication.

Acknowledgements

This work was supported by FUJ-AAP10 SECURIDIAL (grant contract number F110 1007B, OSEO, Midi-Pyrénées Region, and FED-ER). All the authors have read and approved the final manuscript.

References

- [1] G. Ramsay, *Nat. Biotechnol.* 16 (1998) 40–53.
- [2] T.R. Hughes, L.M. Mao, A.R. Jones, J. Burchard, M.J. Marton, K.W. Shannon, *Nat. Biotechnol.* 19 (2001) 342–347.
- [3] A. Pierik, F. Dijkman, A. Raaijmakers, T. Wismans, H. Stapert, *Biotechnol. J.* 3 (2008) 1581–1590.
- [4] R.J. Lipshutz, S.P.A. Fodor, T.R. Gingeras, D.J. Lockhart, *Nat. Genet.* 14 (1999) 1675–1680.
- [5] S.A. Lange, V. Benes, D.P. Kern, J.K. Heinrich Hörber, A. Bernard, *Anal. Chem.* 76 (6) (2004) 1641–1647.
- [6] C. Thibault, V. Le Berre, S. Casimirius, E. Trévisiol, J.M. François, C. Vieu, *J. Nanobiotechnol.* 3 (2005) 7.
- [7] S.A. Ruiz, C.S. Chen, *Soft Matter* 3 (2007) 1–11.
- [8] J.C. Cau, A. Cerf, C. Thibault, M. Geneviève, C. Séverac, J.P. Peyrade, C. Vieu, *Microelectron. Eng.* 85 (2008) 1143–1146.
- [9] J. Chalmeau, L. Salomé, C. Thibault, C. Séverac, C. Vieu, *Microelectron. Eng.* 84 (2007) 1754–1757.
- [10] E. Trévisiol, V. LeBerreAnton, J. Leclaire, G. Pratviel, A.M. Caminade, J.P. Majoral, J.M. François, B. Meunier, *New J. Chem.* 27 (12) (2003) 1713–1719.
- [11] H.B. Eral, D. Mampallil Augustine, M.H.G. Duits, F. Mugele, *Soft Matter* 7 (2011) 4954–4958.
- [12] A. Cerf, C. Thibault, M. Geneviève, C. Vieu, *Microelectron. Eng.* 86 (2009) 1419–1423.
- [13] A. Cerf, T. Alava, R.A. Barton, H.G. Craighead, *Nano Lett.* 11 (2011) 4232–4238.
- [14] A. Cerf, B.R. Cipriany, J.J. Benitez, H.G. Craighead, *Anal. Chem.* 83 (2011) 8073–8077.
- [15] L.E. Scriven, *Mater. Res. Soc. Symp. Proc.* 121 (1988) 717–729.

Résumé

Le marché du diagnostic connaît un essor considérable depuis l'avènement de la biologie moléculaire. Plus précis et souvent plus rapide, le diagnostic moléculaire *in vitro* (DIV) est de plus en plus utilisé dans les laboratoires d'analyses médicales. L'ensemble des tests dédiés au marché du DIV répond à des contraintes socio-économiques très précises comme : la fiabilité du résultat, le délai de réponse court, le faible coût et la facilité d'utilisation. Les indicateurs socio-économiques montrent que la technologie des biopuces est un potentiel bon candidat pour répondre aux attentes du marché. En effet, cet outil permet l'analyse simultanée de plusieurs dizaines voire centaines de séquences nucléiques et donc l'identification d'autant d'organismes en une seule analyse. Cette technologie s'inscrit en complément de la PCR en apportant l'avantage de l'analyse multiplexée à moyen débit. De plus, elle permet de donner une réponse globale de la multiplicité des espèces présentes dans l'échantillon sans avoir besoin de passer par une étape de culture. Néanmoins, cette technologie n'est pas optimisée pour le marché du DIV. En effet, son usage est complexe, peu robuste et trop cher pour concurrencer les méthodes actuelles (microbiologie pasteurienne, PCR, Elisa, etc.). Dans le but de réduire le coût de fabrication des biopuces à ADN, il est donc nécessaire de développer des méthodes alternatives.

Dans un premier temps, l'objectif de cette thèse Cifre a été de mettre au point un prototype nouveau de dépôt de biomolécules basé sur la lithographie douce, permettant de déposer les oligonucléotides sondes de façon multiplexée et selon des motifs micrométriques. Cette nouvelle technologie a été évaluée par rapport aux technologies de références. Puis, nous avons développé un procédé innovant de double fonctionnalisation de surface. Ce procédé simple et rapide a pour avantages de fonctionnaliser la biopuce avec la chimie de surface et les sondes en une seule étape et d'augmenter les signaux d'hybridation. La seconde partie de la thèse a été de coupler cette nouvelle technologie à la détection des événements d'hybridation sans marquage en utilisant la diffraction de la lumière. La principale différence avec la méthode de détection par fluorescence repose sur l'adressage des sondes. En effet, le dépôt doit être réalisé sous forme de réseaux de lignes nanométriques diffractants de façon à ce que l'interaction entre les molécules déposées et les cibles qui interagissent soit très sensible. Cette seconde phase du projet a été très ambitieuse et innovante. La faisabilité de cette méthode de détection, démontrée par des simulations théoriques, a fait l'objet d'un travail d'optimisation très important et les résultats obtenus montrent que cette technologie sans marquage est possible.

MOTS CLES : biopuce, diagnostic, oligonucléotides, fonctionnalisation structurée de surface, détection sans marquage.